

N° d'ordre : 3301

THESE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITE DE BORDEAUX I

ECOLE DOCTORALE SCIENCE DU VIVANT, GEOSCIENCES, SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR

Ludovic CALANDREAU

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPECIALITE : NEUROSCIENCES ET NEUROPHARMACOLOGIE

CONTRIBUTION DU RESEAU HIPPOCAMPO-AMYGDALIEN A LA SELECTION DES INFORMATIONS PERTINENTES DANS LE CONDITIONNEMENT CLASSIQUE AVERSIF CHEZ LA SOURIS

Soutenu le 18 décembre 2006

Après avis de :

Mme Martine AMMASARI-TEULE, DR, Inst. des Neurosciences du CNR, Rome, Italie.....*Rapporteurs*
M. Jean Michel LASSALLE, Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse

Devant la commission d'examen formée de :

M. Georges DI SCALA, DR, CNRS, Université de Bordeaux I*Président*
Mme Martine AMMASARI-TEULE, DR, Inst. des Neurosciences du CNR, Rome, alie.....*Rapporteurs*
M. Jean Michel LASSALLE, Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse
Mlle Aline DESMEDT, Maître de Conférences, Université de Bordeaux I.....*Examineurs*
M. Robert JAFFARD, Professeur, Université de Bordeaux I
M. Pier Vincenzo PIAZZA, DR, INSERM, Université de Bordeaux II

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Neurosciences Cognitives de l'Université de Bordeaux I.

Toute activité de recherche doctorale exige la collaboration scientifique ou technique de nombreuses personnes. De façon plus spécifique, celle-ci n'aurait pas été possible sans le soutien de certains membres du laboratoire que je tiens à remercier.

*Je tiens à exprimer toute ma gratitude en premier lieu au Professeur **Robert Jaffard** qui dirigea ces travaux de thèse. Sa passion pour la recherche d'une façon générale, son approche théorique de la discipline ainsi que la confiance qu'il m'a accordée depuis mon année de Licence m'ont permis de m'éveiller aux multiples aspects que revêt la démarche scientifique et de m'investir pleinement dans ces travaux. Pour toutes ces raisons, je tiens à le remercier et à lui exprimer mon admiration.*

*Cette thèse a été réalisée en étroite collaboration avec le Docteur **Aline Desmedt**, Maître de Conférences au laboratoire. Malgré un emploi du temps souvent très chargé, Aline n'a ménagé ni son temps ni sa patience pour me faire bénéficier de toute ses compétences scientifiques. Son dynamisme et son enthousiasme ont été de véritables moteurs tout au long de ce travail. Les nombreuses heures passées à ses côtés m'ont également permis d'apprécier ses nombreuses qualités humaines. Qu'elle soit assurée de ma profonde reconnaissance, de toute mon amitié et de ma volonté à poursuivre notre « binôme » dans les années à venir.*

*Madame **Martine Ammasari-Teule** et Monsieur **Jean Michel Lassalle** ont accepté de juger la version préliminaire de ce travail. Connaissant leur engagement dans le champ de la neurobiologie de la mémoire, je tiens à leur exprimer mes plus vifs remerciements pour leurs critiques de ce mémoire. Je tiens également à remercier Monsieur **Pier Vincenzo Piazza** de m'avoir accueilli au sein de son unité de recherche afin de terminer mon travail de thèse ainsi que pour avoir accepté d'examiner ce travail. Je suis certain, connaissant l'enthousiasme de l'ensemble des membres du jury pour notre discipline de recherche, que la soutenance de thèse sera un lieu de discussion particulièrement enrichissant.*

*Je suis très reconnaissant à Monsieur **Georges DiScala** d'avoir accepté de juger ce travail. Je suis conscient qu'un nombre important de manuscrits issus du laboratoire a été déposé sur son bureau depuis quelques semaines et qu'ils s'ajoutent à un emploi du temps déjà bien chargé. Je tiens à cet égard à lui témoigner toute ma reconnaissance.*

*Les interactions scientifiques et amicales que j'ai pu entretenir avec **Aline Marighetto**, **Jacques Micheau**, ou **Nicole Mons** m'ont permis d'évoluer au fil de des années passées au laboratoire. Je tiens ici à leur témoigner une marque amicale de toute ma reconnaissance.*

*Je tiens également à remercier **Pierre Trifilieff** et **Stéphane Valério**, deux complices de mes années de thèse, avec qui j'ai pu expérimenter bon nombre de sensations telles que la*

*joie, l'angoisse et surtout de nombreux délires. Je remercie aussi **Nicole Etchamendy** pour les encouragements et les fous rires (dus au manque de nicotine).*

Je remercie l'ensemble des enseignants chercheurs, chercheurs et étudiants du laboratoire pour leur soutien.

*Je suis également très reconnaissant aux membres du personnel technique et administratif pour leur disponibilité et leur gestion du quotidien, contributions indispensables à ce travail expérimental. Je remercie en particulier **Laurence Costes** pour l'aide qu'elle m'a apportée lors des longs moments de microdialyse et d'HPLC.*

Je remercie également mes proches qui ont largement bénéficié des moments les plus difficiles de ce travail...

Enfin, merci Aude...nul doute que sans ton soutien permanent et les innombrables attentions dont j'ai pu bénéficier ces années n'auraient pas eu la même saveur...

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE

1. Le polymorphisme de mémoire	5
2. Systèmes de mémoire	6
<i>A- Des opérations qui peuvent être regroupées dans un domaine spécifiable</i>	7
<i>B- Propriétés et relations entre systèmes</i>	7
<i>C- Dissociations convergentes</i>	7
3. Systèmes de mémoire chez l'animal	9
4. Un exemple de continuité Homme-animal	10
OBJECTIF GENERAL	12

PARTIE I : Un modèle d'apprentissage : le conditionnement classique

1. Définition et intérêt du conditionnement classique	15
2. Contiguïté et contingence	15
3. « Rôle » du contexte dans le conditionnement classique	17
4. Relations entre les associations SC-SI et contexte-SI	19

PARTIE II : Rôle de l'amygdale dans la mémoire émotionnelle

1. Rappel anatomique	23
2. Amygdale et apprentissages émotionnels : De l'Homme à l'animal	25
3. Amygdale et modulation des souvenirs émotionnellement connotés	26
<i>A- Données chez l'Homme</i>	26
<i>B- Données chez l'animal</i>	27

<i>C-Les régions cibles de la modulation amygdalienne</i>	29
4. Amygdale et conditionnement	30
<i>A- Rôle essentiel du noyau latéral de l'amygdale dans le conditionnement classique élémentaire</i>	30
<i>-Niveau d'analyse structural</i>	30
<i>-Mécanismes moléculaires d'un conditionnement élémentaire</i>	32
<i>B- Amygdale et conditionnement au contexte</i>	34
<i>C- Limites et extension du modèle</i>	35
PARTIE III : Implication de l'hippocampe dans le conditionnement classique	
1. Rappel anatomique	39
2. Hippocampe et représentation « élaborée » de l'expérience	41
3. Hippocampe et conditionnement classique	42
4. Sollicitation différentielle de l'hippocampe selon le type de conditionnement	43
PARTIE IV : Sollicitation différentielle du système septo-hippocampique selon le type de conditionnement	
1. Rappel anatomique	49
<i>A -Le complexe septum médian- bande diagonale de Broca</i>	49
<i>B -Le septum latéral</i>	49
<i>C -Relations intra-septales</i>	50
2. Rôle controversé du septum dans le conditionnement	50
3. Système septo-hippocampique et conditionnement	51
4. Un rôle du septum dans l'évaluation de la pertinence du SC quant à l'occurrence du SI ?	52
OBJECTIFS DES TRAVAUX : Vers un modèle d'analyse neurobiologique sous-tendant deux représentations d'une expérience aversive	55

CHAPITRE I : Implication différentielle des noyaux latéral et basolatéral de l'amygdale dans le conditionnement classique élémentaire et contextuel (Article1)

1. Introduction	59
2. Résumé des principaux résultats	60

CHAPITRE II : Implication différentielle des régions latérale et médiane du complexe septal dans le conditionnement classique élémentaire et contextuel (Article2)

1. Introduction	69
2. Résumé des principaux résultats	70

CHAPITRE III : Les interactions hippocampo-amygdaliennes contribuent à la sélection de l'information pertinente dans une situation d'apprentissage émotionnel (Articles 3 et 4)

I. Etude 1 : Contrôle de la fonction amygdalienne par le système cholinergique hippocampique dans le conditionnement classique	91
1. Introduction	91
2. Résumé des principaux résultats	94
II. Synthèse de l'étude 2 : Contribution de la voie des MAPK/ERK à la consolidation de deux représentations différentes d'une expérience aversive	95

DISCUSSION GENERALE

1. Contribution différentielle des noyaux LA et BLA de l'amygdale au conditionnement classique aversif	154
2. Contribution différentielle du complexe septal au conditionnement classique aversif en fonction de la procédure	156
3. Sollicitation de la voie S-HPC cholinergique dans le conditionnement classique aversif	157
4. Interactions hippocampo-amygdaliennes	160
5. Modèle d'analyse	163

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

- 1. Contrôle putatif du cortex préfrontal sur l'activité amygdalienne sous tendant un conditionnement élémentaire ou contextuel** 167
- 2. Régulation du système septo-hippocampique** 169
- 3. Contingence et conditionnement** 170
- 4. Relations hippocampo-amygdaliennes** 173

CONCLUSION 176

ANNEXES 177

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 185

LISTE DES ABREVIATIONS

AMPA : α -amino-5-hydroxy-3-methyl-4-isoxazole propionic acid.

AMP-c : adenosine monophosphate cyclique.

ACh : acétylcholine.

AVP : arginine-vasopressine.

BLA : noyau basolatéral de l'amygdale.

BLC : complexe basolatéral (comprenant le LA et le BLA) de l'amygdale.

BNST : noyau du lit de la strie terminale.

CAMK : calcium calmodulin kinase.

CE : noyau central de l'amygdale.

CRE : cAMP-responsive element.

CREB : CRE-binding protein.

ERK : extracellular-signal regulated kinase.

FH : formation hippocampique.

GABA : acide gamma-ammino butyrique.

GD : gyrus denté ou dentelé.

HPC : hippocampe.

HPC-SL : voie hippocampo-septale.

ISD : immediate shock deficit.

ITC : intercalated cell masses.

LA : noyau latéral de l'amygdale.

LC : locus coeruleus.

MAPK : mitogen-activated protein kinase.

MEK : MAPK ERK Kinase.

mGLUR : metabotropic glutamate receptor.

NMDA : N-méthyl-D-aspartate.

NTS : noyau du tractus solitaire.

PK : protein kinase.

PLT : potentialisation à long terme.

QI : quotient intellectuel.

RCE : réponse conditionnée émotionnelle.

RI : réponse inconditionnelle.

SC : stimulus inconditionnel.

S-HPC : voie septo-hippocampique.

SI : stimulus inconditionnel.

SL : septum latéral.

SM/BDB : complexe septum médian / bande diagonale de Broca.

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Selon Delacour (1984), la mémoire est la capacité pour un organisme vivant d'acquérir, de conserver, puis de restituer ou d'utiliser des informations ou un comportement. Cette définition simple et accessible nous renseigne sur la ou les fonction(s) générale(s) de la mémoire. Néanmoins, elle ne nous renseigne pas sur l'aspect polymorphe de la fonction mnésique et ne précise pas la nature des informations que cette fonction peut traiter. Elle ne caractérise pas les propriétés permettant de définir les différentes formes de mémoire. Enfin, elle ne nous renseigne pas sur les substrats neurobiologiques de cette fonction psychologique. Ainsi, dans cette introduction générale, nous tenterons d'apporter une définition plus précise de la mémoire basée sur un ensemble de données de la littérature. Nous essaierons également de convaincre le lecteur que des propriétés relativement communes de la mémoire humaine et animale peuvent être dégagées au plan psychologique et neurobiologique justifiant ainsi l'intérêt des Neurosciences Cognitives. Enfin, l'ensemble de ces données permettra de dégager l'objectif principal de mon travail : les bases neurobiologiques de la sélection de différents systèmes mnésiques selon la situation d'apprentissage.

1. Le polymorphisme de la mémoire.

L'idée de l'existence de différentes formes de mémoires s'est enracinée dans un certain nombre de réflexions philosophiques depuis l'antiquité jusqu'au XIX^{ème} siècle. Toutefois, les conceptions modernes du polymorphisme de la mémoire ont résulté de l'étude de patients cérébro-lésés. Une des descriptions les plus marquantes est celle du célèbre cas H.M. par Scoville et Milner en 1957. Ce patient d'intelligence normale (QI estimé à 100) a du subir une ablation des lobes temporaux internes incluant bilatéralement les 2/3 antérieurs de l'hippocampe, le gyrus parahippocampique, le cortex temporal antérieur, l'uncus et l'amygdale afin de remédier à une épilepsie rebelle à tout traitement classique. Son évaluation neuropsychologique post-opératoire a fait apparaître d'importants déficits dans la réalisation

de certaines activités cognitives alors que d'autres aspects de ses aptitudes étaient totalement préservés. H.M présentait une amnésie rétrograde portant sur une fenêtre temporelle de 1 à 4 ans avant l'opération mais surtout une amnésie antérograde sévère. Ses capacités sociales et verbales étaient largement préservées. Ses capacités perceptives et sa mémoire à très court terme étaient également intactes. H.M était également capable d'acquérir et de retenir certains types d'informations lorsque les conditions de présentation et de récupération étaient implicites (cf. infra). En revanche, sa mémoire épisodique, c'est-à-dire, ses capacités d'encodage et de rappel d'événements autobiographiques (cf. infra), était sévèrement atteinte. La description du cas H.M. associée à l'étude d'autres patients présentant des lésions temporales préservant l'hippocampe (absence de déficit de mémoire épisodique) a été fondamentale pour comprendre qu'il existait plusieurs formes de mémoire supportées par des systèmes cérébraux distincts. Cette étude a été le point de départ de nombreux travaux qui mèneront à des classifications des systèmes de mémoire précisant la nature des opérations psychologiques impliquées et les bases neurobiologiques sous-jacentes.

2. Systèmes de mémoire.

De nouvelles études vont venir confirmer les interprétations issues des observations cliniques du cas H.M. en montrant que des patients sévèrement amnésiques conservent certaines capacités d'apprentissage et de mémorisation. Ainsi, Warrington et Weiskrantz (1968) ont montré que des patients amnésiques n'étaient pas capables de reconnaître des mots (ou images) qui leur avaient été préalablement présentés. Pourtant, lorsque l'épreuve consistait simplement à compléter des fragments de ces mots (ou images), les patients réussissaient parfaitement l'épreuve. En d'autres termes, ces patients pouvaient utiliser de manière implicite (non consciente) leurs connaissances (compléter des fragments de l'item) mais ne pouvaient explicitement (consciemment) s'y référer (reconnaître l'item). Il apparaissait ainsi que le rappel plus ou moins conscient d'une expérience passée semblait être un critère de distinction et de classification des différentes formes de mémoire.

Sur cette base, Cohen et Squire (1980) vont opposer la mémoire déclarative et la mémoire non déclarative. La mémoire déclarative est accessible à la conscience et son contenu peut être déclaré (décrit). Elle permet une récupération consciente des faits et événements. Son fonctionnement requiert l'intégrité de la formation hippocampique (FH). La mémoire non déclarative regroupe un ensemble de capacités mnésiques diverses (e.g., habiletés perceptives, motrices ou cognitives, amorçage, « conditionnement classique ») qui

s'expriment au travers d'une performance, éventuellement à l'insu du sujet, plutôt que sous la forme d'une récupération consciente. La mémoire non déclarative n'est pas sous-tendue par un système cérébral unique. Les diverses fonctions mnésiques qu'elle recouvre ont en commun le fait que leurs substrats neurobiologiques respectifs ne semblent pas strictement dépendre du lobe temporal médian et en particulier de l'hippocampe.

De façon comparable, Schacter (1987 ; 1992) distinguera la mémoire explicite de la mémoire implicite. Cette distinction est descriptive et fait référence à deux moyens d'expression d'une expérience antérieure mais ne renvoie pas à l'existence de deux systèmes sous-jacents et n'implique pas nécessairement leur existence. La mémoire explicite se réfère à la récupération intentionnelle d'une expérience antérieure alors que la mémoire implicite ne suppose aucune récupération volontaire de l'expérience passée.

De ces modèles, il ressort donc une distinction entre, d'une part, la notion de système de mémoire et, d'autre part, l'existence de différentes formes d'expression de la mémoire. Selon Schacter et Tulving (1994) des systèmes mnésiques particuliers doivent pouvoir être spécifiés en termes de règles opératoires, de types d'information et de mécanismes et voies neuronales qui les sous-tendent. Les auteurs vont alors proposer trois critères permettant de qualifier un système de mémoire :

A- Des opérations qui peuvent être regroupées dans un domaine spécifiable :

Un système de mémoire permet de réaliser un grand nombre d'épreuves, relevant d'une classe ou catégorie particulière, indépendamment du contenu informationnel de l'épreuve. Ainsi, un système opère par inclusion dans une classe en ce sens qu'il peut traiter toute information relevant de la catégorie pour laquelle il est spécialisé.

B- Propriétés et relations entre systèmes :

Un système est caractérisé par une liste de propriétés et par ses relations avec les autres systèmes. Ces propriétés sont déterminées par les règles des opérations impliquées, le type d'informations qui est traité et le substrat neuronal qui sous-tend ces opérations.

C- Dissociations convergentes :

Ce dernier critère suppose que des épreuves différentes mais impliquant un même système seront également épargnées ou altérées selon le type de patients testés. Cette notion de convergence est fondamentale car elle restreint la possibilité d'ajouter de nouveaux systèmes dès l'apparition de nouvelles dichotomies.

Les critères d'identification d'un système proposés par Schacter et Tulving les conduisent à distinguer la notion de système et de sous-système de mémoire. Plusieurs « sous-systèmes » peuvent en effet partager les mêmes règles opératoires caractéristiques d'un même « système ». Ils se différencient néanmoins quant à la nature des informations qu'ils traitent et la sollicitation des structures cérébrales impliquées dans la circuiterie neuronale sous-tendant le « système ». Schacter et Tulving proposent une classification basée sur cinq systèmes de mémoire principaux (figure 1), allant du système procédural au système de mémoire épisodique. Selon les auteurs, l'ordre d'apparition de ces systèmes correspondrait à une séquence développementale tant ontogénique que phylogénique. Le système procédural est impliqué dans l'apprentissage de nombreux type d'habiletés et d'algorithmes comportementaux et cognitifs. Il se présente comme un système d'action opérant à un niveau automatique plutôt que consciemment contrôlé. Ce système semble pouvoir fonctionner et s'exprimer de façon normale sans requérir l'intégrité de la formation hippocampique. Les auteurs présentent les quatre autres systèmes comme des systèmes « cognitifs ». Ces quatre systèmes correspondent successivement au PRS ou « système de représentation perceptive », au système sémantique, primaire (ou mémoire de travail) et enfin épisodique.

Cette classification a permis de préciser les caractéristiques psychologiques et les règles opératoires des systèmes proposés guidant ainsi la recherche des substrats neurobiologiques qui les sous-tendent. Toutefois, ces différents systèmes ne sont pas aussi clairement identifiables et indépendants. Des relations étroites entre ces systèmes (Jaffard & Meunier, 1993 ; Schacter, 1994 ; Van Der Linden, 1994 ; Kim & Baxter, 2001) ou entre les processus cognitifs sous tendant les aspects implicites ou explicites (automatiques ou intentionnels) de la mémoire (Roediger, 1990 ; Jacoby, 1991) ont été mis en évidence.

Systèmes principaux d'apprentissage et de mémoire chez l'Homme			
Système	Autres termes	Sous-systèmes	Récupération
Procédural	Non déclaratif	Habiletés motrices Habiletés cognitives Conditionnement simple Apprentissage associatif simple	<i>Implicite</i>
PRS	Non déclaratif	Forme visuelle des mots Forme auditive des mots Description structurale	<i>Implicite</i>
Sémantique	Générique Factuelle Connaissance	Spatial Relationnel	<i>Implicite</i>
Primaire	De travail	Visuel Auditif	<i>Explicite</i>
Episodique	Personnelle Autobiographique Mémoire des événements		<i>Explicite</i>

Figure 1 : Principaux systèmes et sous-systèmes de mémoire chez l'Homme (d'après Schacter & Tulving, 1994). Se reporter au texte.

3. Systèmes de mémoire chez l'animal :

Comme le notent Schacter et Tulving (1994), les espèces ont évolué de façon à trouver des solutions à des problèmes de survie qui leur sont bien spécifiques. En conséquence, les systèmes d'apprentissage et de mémoire se différencient probablement de façon

correspondante. Selon les auteurs, les distinctions établies chez l'Homme semblent difficiles voire impossibles à étudier chez l'animal. En effet, une distinction telle que celle établie entre mémoire explicite (ou déclarative) et implicite (ou procédurale) semble a priori inaccessible à l'expérimentation animale. Cependant, comme le note Jaffard (2000), si l'on fait abstraction de la verbalisation et du problème de la conscience (en particulier de la conscience de soi), il semble alors possible de dégager des règles opératoires communes à des formes de mémoire humaine et à certaines manifestations et propriétés de la mémoire animale. Les similitudes observées sur le plan opératoire associées à celles relatives à l'organisation du système nerveux central semblent justifier la pertinence des études chez l'animal.

La classification systématique de la mémoire non humaine est fermement ancrée autour des structures hippocampiques. Toutefois, il faut noter que le passage de l'homme à l'animal n'a pas eu pour effet de simplifier le problème. En effet, une multiplicité de classification principalement due à des choix de critères d'identification très différents selon les auteurs a pu être observée chez l'animal. Ainsi, pour certains auteurs c'est la nature des informations qui est cruciale (information spatiale : O'Keefe & Nadel, 1978), pour d'autres ce serait un processus (activation : Delacour, 1994 ; consolidation : Alvarez & Squire, 1994) ou encore un ensemble de propriétés (variance/invariance : Sherry & Schacter, 1987 ; flexibilité/rigidité : Hirsh, 1974 ; Einchenbaum, 1994; mémoire de travail/mémoire de référence : Olton et al., 1979 ; représentations cognitives/habitudes : Mishkin et al., 1984).

D'une manière générale, ces différents auteurs distinguent deux grandes formes de mémoire : la première serait une forme plus complexe d'organisation des souvenirs basée sur des relations pertinentes entre items. Cette forme de mémoire nécessiterait l'intégrité de l'hippocampe. La seconde serait une forme de mémoire simple, basée sur des représentations élémentaires, non flexibles voire stéréotypées.

4. Un exemple de continuité Homme-animal.

Bien que les analogies entre mémoire humaine et mémoire animale soient à relativiser à bien des égards, les données de la littérature indiquent tout de même un certain continuum entre la mémoire humaine et la mémoire animale. Ainsi, la classification dont nous avons discuté ci-dessus a fait apparaître que la mémoire « explicite » d'une expérience passée nécessite l'intégrité de l'hippocampe, tandis que la mémoire implicite, et en particulier certaines formes d'apprentissage impliquant une composante émotionnelle (i.e.

conditionnement classique), nécessite l'intégrité du complexe amygdalien (Zola-Morgan et al., 1986 ; 1993 ; Squire, 1994). Chez l'homme des études neuropsychologiques menées par l'équipe de Damasio (Bechara et al., 1995) ont mis en évidence qu'un sujet présentant une lésion bilatérale de l'hippocampe pouvait exprimer des réponses conditionnées émotionnelles (RCE) normales (réponses électrodermales) à divers types de stimuli conditionnels (visuels ou auditifs), alors qu'il était incapable de rapporter explicitement (réponse à un questionnaire) l'expérience de conditionnement passée ayant conduit à ces réponses conditionnées. Inversement, un patient présentant une lésion bilatérale de l'amygdale présentait une altération sélective de la RCE sans déficit de mémoire explicite.

De façon similaire, des études menées chez le singe ont également montré une altération spécifique de la réactivité émotionnelle à divers stimuli sensoriels sans déficit mnésique après lésion amygdalienne. En revanche, un déficit de performances mnésiques dans une épreuve de discrimination d'objets associé à une réactivité émotionnelle normale était observé après lésion de l'hippocampe et des aires corticales associées (Zola-Morgan et al., 1991). Plus récemment, une étude menée au laboratoire est venue confirmer, chez le rongeur, cette relative dissociation entre le système amygdalien et le système hippocampique (Desmedt et al., 1998). En effet, en accord avec les résultats de Damasio, les auteurs ont montré que la lésion du noyau central de l'amygdale (CE) supprimait bien l'expression de réponses conditionnées émotionnelles tandis qu'elle préservait des modifications électrophysiologiques septo-hippocampiques dépendantes du type de conditionnement passé. Ces résultats étaient alors interprétés comme une relative dissociation fonctionnelle entre le système amygdalien (nécessaire à l'expression des réponses émotionnelles conditionnées) et le système hippocampique (reflétant une connaissance « factuelle » de l'expérience aversive).

Ces données suggèrent donc l'existence d'un certain continuum entre mémoire humaine et mémoire animale. Elles révèlent qu'au cours d'une même épreuve (épreuve de conditionnement), deux grands systèmes neurobiologiques, l'un centré autour de l'hippocampe et l'autre centré autour de l'amygdale, sont tous deux mis en jeu chez l'Homme et chez l'animal. Il est important de noter que des études récentes ont révélé que ces deux systèmes neurobiologiques n'étaient pas totalement indépendants mais qu'ils interagissaient contribuant ainsi à l'établissement de différentes représentations de l'expérience aversive (Phelps, 2004). Enfin, ces données soulignent l'intérêt du conditionnement classique. Elles indiquent que ce modèle d'apprentissage est particulièrement intéressant pour les études visant à développer des modèles animaux de mémoire humaine et à élucider les bases neurobiologiques de différents systèmes de mémoire.

OBJECTIF GENERAL :

Dans ce contexte, mes travaux de thèse m'ont donc amené à préciser, chez la souris C57/Bl6J, le fonctionnement, ainsi que les éventuels dysfonctionnements, d'un système cérébral septo-hippocampo-amygdalien dans des épreuves de conditionnement classique aversif.

L'objectif était d'examiner comment ce circuit cérébral contribue, chez l'animal, à l'élaboration de différentes représentations mnésiques d'une expérience aversive. Notre champ d'investigation, limité au niveau de l'analyse structurale, devait nous permettre de spécifier des configurations d'activité neuronale qui sous-tendent l'établissement de deux types de conditionnement Pavlovien. Les arguments théoriques évoqués ayant conduit à la formulation de nos hypothèses de travail s'articulent autour de deux grandes propositions :

-D'une part, l'idée que les régions hippocampiques et amygdaliennes sont toutes deux requises dans des situations d'apprentissage émotionnellement connotés et qu'elles contribuent à la sélection et au traitement des informations pertinentes.

-D'autres part, que ces régions interagissent de manière différentielle et spécifique selon la situation d'apprentissage rencontrée et constituent un véritable circuit neurobiologique permettant la formation d'une représentation spécifique de l'expérience aversive. La sollicitation différentielle de ce circuit hippocampo-amygdalien contribuerait ainsi à une optimisation du traitement des informations pertinentes sous tendant l'expression de réponses émotionnelles adaptées.

PARTIE I

Un modèle d'apprentissage : le conditionnement classique

1. Définition et intérêt du conditionnement classique.

Précisons dès ce premier chapitre que parmi les différentes formes de conditionnement seul le conditionnement classique aversif a fait l'objet de nos travaux. Une épreuve de conditionnement classique (i.e. Pavlovien) aversif, consiste à présenter à un animal un stimulus saillant, simple et phasique (e.g. un stimulus sonore ou visuel dit « neutre »), de manière appariée à un stimulus inconditionnel (e.g. SI, un choc électrique) induisant une réponse inconditionnelle (RI). En raison de ses relations (i.e. appariement systématique) avec le stimulus inconditionnel, le stimulus neutre acquiert des propriétés aversives et devient un stimulus conditionnel (SC) capable d'évoquer seul une réponse conditionnée émotionnelle (RCE) telle qu'une réponse de peur. La mesure et la quantification de la RCE permettent d'attester de la réalisation par l'organisme de l'association SC-SI. La réponse de « freezing » induite par la présentation du SC et caractérisée par une immobilisation totale de l'animal, exception faite des mouvements dus à la respiration, est l'une des RCE les plus utilisées dans le conditionnement classique aversif (Blanchard & Blanchard, 1969).

L'un des intérêts majeur du conditionnement classique vient du fait qu'il se prête bien à l'expérimentation. En effet, sa définition et sa mesure sont relativement précises. De plus, la stabilité d'un conditionnement est considérable. Sa rétention peut être presque parfaite pendant des durées qui constituent une part importante de la durée totale de la vie de l'organisme. Enfin, il existe des relations reproductibles entre les mesures d'un conditionnement et des paramètres de la situation expérimentale (délai SC-SI, intensité des stimuli, intervalles entre les essais). Un autre intérêt majeur du conditionnement vient du fait que son extension phylogénétique et ontogénétique est telle qu'il participe probablement aux phénomènes d'apprentissage chez la plupart des espèces et à partir de stades précoces du développement (Delacour, 1980). Pourtant, la généralité des phénomènes de conditionnement et l'apparente simplicité de cet apprentissage contrastent nettement avec la difficulté d'explication des processus opératoires sous-jacents.

2. Contiguïté et contingence.

Les premières recherches menées par Pavlov (1927) et Thorndike (1911) consacrées à l'étude du conditionnement ont d'abord abouti à l'idée que la proximité temporelle, ou *contiguïté*, entre le SC et le SI constituait le facteur déterminant à l'établissement d'une

association SC-SI. Le fait que des intervalles de temps croissants entre la survenue du SC et celle du SI conduisent à un affaiblissement de la RCE a, par exemple, conforté l'idée d'une nécessaire contiguïté entre le SC et le SI à l'établissement d'un conditionnement classique à un SC.

Toutefois, les travaux menés par Rescorla (1968) ont permis de démontrer que cette notion de contiguïté ne semblait ni suffisante ni même nécessaire à l'établissement d'un conditionnement. En effet, Rescorla a démontré que deux situations de conditionnement présentant une même contiguïté entre le SC et le SI pouvaient se traduire par des niveaux de conditionnement très différents. Par exemple, dans une situation où le nombre de SC systématiquement suivis d'un SI est constant (i.e. contiguïté), il suffit d'ajouter des SI seuls pour que le conditionnement au SC se dégrade proportionnellement à cet ajout. Ainsi, les travaux de Rescorla ont aboutit à l'idée que la notion de *valeur informative* du SC quant à l'occurrence du SI semblait être déterminante à l'établissement d'un conditionnement. Selon la théorie développée par l'auteur, au cours d'un conditionnement, tous les stimuli présents durant l'apprentissage rentrent en compétition afin d'acquérir une part de la force associative du SI. La valeur informative, ou *valeur prédictive* (notée Δp) de ces stimuli, détermine la part de force associative qu'ils vont alors acquérir. Les stimuli présentant une valeur prédictive plus importante vont, au fil de l'apprentissage, acquérir une force associative croissante impliquant une réduction progressive de la force associative des autres stimuli moins prédictifs. La valeur prédictive d'un SC est déterminée à la fois par la probabilité d'occurrence du SI en présence du SC, $p(\text{SI/SC})$, et la probabilité d'occurrence du SI en l'absence du SC, $p(\text{SI/noSC})$.

Brièvement, les données développées par Rescorla montrent que la valeur $\Delta p = p(\text{SI/SC}) - p(\text{SI/noSC})$ détermine l'évaluation subjective de la valeur informative ou prédictive du SC. Ainsi, il suffit que $p(\text{SI/noSC}) = p(\text{SI/SC})$ (i.e. $\Delta p = 0$) pour que l'organisme se comporte comme si le SC ne prédisait pas le SI. Selon Rescorla, une relation quasi linéaire est observée entre la valeur de Δp et la prise en compte subjective de la valeur prédictive du SC. Ainsi, l'intensité ou la fréquence d'une RCE au SC serait directement dépendante de la valeur Δp (pour exemples, cf. Rescorla, 1988 ; Wasserman & Miller, 1997). En accord avec sa théorie, Rescorla observa que lorsque la probabilité d'occurrence du SI en l'absence du SC est supérieure à la probabilité d'occurrence du SI en présence du SC, $p(\text{SI/noSC}) > p(\text{SI/SC})$, un conditionnement inhibiteur était acquis (objectivé par une baisse de la RCE en présence du

SC). Même si ce positionnement théorique est aujourd'hui encore largement débattu, de nombreuses expériences tendent à le conforter.

L'insuffisance de la notion de contiguïté temporelle fut également mise en évidence par l'effet de blocage de Kamin (1969). Le blocage se réfère à un déficit de conditionnement à un SC2 lorsque ce dernier est apparié au SI en présence d'un SC1 (SC1-SC2-SI) ayant été préalablement apparié au SI (SC1-SI). Bien que le SC2 soit apparié au SI, le SC1 étant déjà prédictif de l'occurrence du SI, le SC2 n'acquiert aucune valeur informative pertinente quant à la survenue du SI et ne peut de ce fait évoquer seul la RCE.

Inversement, dans le cas d'un conditionnement de second ordre, un SC2 apparié au SC1 (SC2-SC1) ayant préalablement été apparié à SI (SC1-SI) acquiert le pouvoir d'évoquer une RCE bien qu'il n'ait jamais été lui-même apparié au SI.

D'autres expériences ont également montré que « l'histoire » d'un SC pouvait interférer avec l'établissement d'un conditionnement à ce SC et ce, malgré une relation de contiguïté entre le SC et le SI au moment de l'apprentissage. Ainsi, le phénomène d'inhibition latente correspondant à un retard d'acquisition d'une RCE à un SC après pré-exposition de l'organisme à ce seul SC supporte l'idée selon laquelle la valeur informative du SC et non pas simplement la contiguïté entre les stimuli est déterminante pour l'établissement d'un conditionnement au SC.

3. « Rôle » du contexte dans le conditionnement classique.

Initialement, Pavlov (1927) avait observé qu'au cours d'une procédure de conditionnement, des RCE évoquées par des stimuli contextuels diminuaient progressivement au fur et à mesure que le conditionnement à un SC discret progressait. Selon lui, bien que non neutres, ces stimuli contextuels progressivement neutralisés ne devaient pas exercer de contrôle sur la RCE. Inversement, d'autres auteurs avancèrent que les stimuli contextuels présents pendant l'apprentissage pouvaient affecter cet apprentissage, soit en modulant la perception du SC et du SI (Hull, 1943), soit en modulant ou en orientant la RCE (Tolman, 1959), soit en modulant la formation de l'association entre le SC et le SI par association avec le SC (Konorski, 1967). Cependant, l'importance des indices contextuels dans les processus de conditionnement fut longtemps sous-estimée.

Ce n'est que plus récemment que des modèles d'analyse du conditionnement classique ont inclus des processus potentiels par lesquels le contexte interviendrait dans l'apprentissage.

Comme nous l'avons énoncé ci-dessus, Rescorla & Wagner (1972) développèrent un modèle de conditionnement selon lequel tous les stimuli présents dans une situation de conditionnement seraient en interaction et en compétition vis-à-vis d'une force associative limitée supportée par le SI. Tous les stimuli seraient associés au SI, mais seul le stimulus présentant la plus forte valeur informative quant à l'occurrence du SI présenterait une force associative croissante, impliquant une réduction de la force associative des autres stimuli. Dans ce modèle, le contexte est considéré comme une entité globale équivalente à tout autre SC. Le conditionnement au contexte se présente donc comme inversement proportionnel au conditionnement à un SC discret.

Dans une version modifiée de ce modèle, Mackintosh (1975) proposa que les stimuli ne rentreraient pas en compétition vis-à-vis d'une force associative limitée portée par le SI. Ainsi, la force associative d'un SC pourrait croître en raison du degré de prédictibilité quant à l'occurrence du SI sans entraîner une diminution de la force associative des autres stimuli (contextuels notamment).

Miller & Matzel (1988) proposent eux, un modèle dans lequel un mécanisme de comparaison permet, lors de la situation de test plutôt qu'en acquisition, d'évaluer les forces associatives d'un SC et du contexte. L'hypothèse centrale de ce modèle est que, en situation de test, la RCE est directement fonction d'une représentation du SI activée par le SC, et inversement liée à une représentation du SI activée par une représentation du contexte. En d'autres termes, plus la représentation du SI évoquée par celle du contexte sera faible plus la RCE au stimulus discret sera forte.

Parallèlement à ces modèles qui décrivent une modulation des phénomènes d'apprentissage associatifs par le contexte via une association directe contexte-SI, d'autres modèles proposent l'existence d'une relation plus hiérarchique entre les stimuli contextuels et un SC discret (pour une synthèse, voir Holland & Bouton, 1999). Le contexte interviendrait alors dans l'acquisition d'un conditionnement au travers de ces relations particulières avec le SC (préconditionnement sensoriel, conditionnement de second ordre, inhibition latente) ou bien en modulant l'association SC-SI (« occasion setting », extinction). Ce rôle modulateur du contexte impliquerait un processus d'attribution d'une signification particulière au SC plutôt qu'un processus de compétition directe entre le contexte et le SC discret.

4. Relations entre les associations SC-SI et contexte-SI : vers deux représentations d'une expérience aversive.

Il est important de noter que les différents modèles présentés ci-dessus ne s'excluent pas mutuellement. Il est probable que le contexte dans lequel se déroule l'apprentissage puisse acquérir une force associative du SI et puisse également interagir avec un ou plusieurs autres SC associé(s) à ce SI. Le contexte semble pouvoir moduler le conditionnement à un SC discret soit en le bloquant soit en le facilitant (renforcement par indexation contextuelle). Inversement la force associative d'un SC discret semble également pouvoir moduler celle du contexte. Ainsi, en utilisant un conditionnement de suppression de léchage dans un appareil à deux compartiments, Marlin (1981) montra que lorsque la valeur informative du SC diminue (i.e. en augmentant l'intervalle de temps entre le SC et le SI aversif) un conditionnement plus faible à ce SC est observé (i.e. diminution de la latence de prise de boisson lors de la présentation du SC) alors que le conditionnement aux stimuli contextuels augmente (i.e. augmentation du temps passé dans le compartiment neutre).

De manière concordante avec les travaux développés ci-dessus, des études menées au laboratoire suggèrent également l'existence de relations étroites et relativement complexes entre les associations SC-SI et contexte-SI au cours d'une épreuve de conditionnement classique aversif. Ces études ont montré que des animaux soumis à une procédure de *d'appariement SC-SI* (i.e. le son est systématiquement suivi d'un choc électrique délivré aux pattes de l'animal) présentent, en rétention, une RCE importante au son associée à une faible RCE au contexte. A l'inverse, les animaux soumis à une procédure de *non appariement SC-SI* (i.e. le son n'est jamais suivi du choc électrique et le choc électrique est délivré de façon pseudo-aléatoire) présentent en rétention une RCE importante au contexte associée à une très faible RCE au SC discret. Ces études suggèrent, en accord avec le modèle développé par Rescorla & Wagner, qu'au cours d'un conditionnement, la valeur informative d'un SC discret (le SC prédit ou non la survenue du SI) détermine non seulement la force de l'association SC-SI mais également celle de l'association contexte-SI. Plus encore, elles suggèrent une relation quasi inversement proportionnelle entre ces deux associations.

Ces expériences ont conduit à suggérer l'établissement de représentations différentes d'une expérience aversive basées sur les forces des associations SC-SI et contexte-SI. Lorsque le SC prédit la survenue du SI (i.e. le SC est systématiquement apparié au SI), un conditionnement dit « élémentaire », objectivé par une RCE prédominante à un SC simple et discret (et une faible RCE au contexte) s'établit. La relation de contingence forte entre le SC

et le SI induit dans ce cas la réalisation d'une association simple majeure (SC-SI) au détriment d'une association contextuelle (contexte-SI). Les animaux soumis à ce type de conditionnement acquerraient une *représentation élémentaire* de l'expérience aversive basée sur le traitement et la rétention du SC discret en tant que « prédicteur » majeur de l'occurrence du SI. Par contre, lorsque le SC ne prédit pas (ou peu) la survenue du SI (*non appariement SC-SI*) un conditionnement dit « contextuel », objectivé par une RCE prédominante au contexte (et une RCE faible ou nulle au SC discret) serait réalisé. La relation de contingence faible entre le SC et le SI permettrait alors un traitement privilégié des indices contextuels conduisant ainsi à l'établissement d'une association contexte-SI majeure (comparée à l'association simple SC-SI). Par suite, les animaux acquerraient une représentation de l'expérience aversive basée sur le traitement et la rétention du contexte en tant que « prédicteur » majeur de l'occurrence du SI.

En résumé, cette brève présentation de quelques hypothèses relatives aux processus opératoires sous-jacents à l'acquisition et/ou l'expression d'un conditionnement classique souligne combien la simplicité apparente d'un tel apprentissage contraste avec les opérations susceptibles de le sous-tendre. Quelle que soit la position théorique adoptée, elle révèle qu'un conditionnement ne se résume pas à la seule formation d'une association SC-SI mais que les indices contextuels peuvent également être associés au SI. Elle souligne également que des relations étroites et complexes entre ces associations contribuent à l'élaboration de différentes représentations d'une expérience aversive. En particulier, selon la valeur informative du SC, une représentation préférentielle à un SC discret ou au contexte d'apprentissage s'établit. Enfin, l'ensemble de ces données révèle la nécessité de mieux spécifier les processus opératoires ainsi que les mécanismes neurobiologiques qui sous-tendent la formation de ces différentes représentations d'une expérience de conditionnement.

PARTIE II

Rôle de l'amygdale dans la mémoire émotionnelle

1. Rappel anatomique.

L'amygdale est l'une des principales structures du système limbique. Elle correspond à un ensemble de noyaux qui, chez la plupart des mammifères, est situé à la face médiane du lobe temporal, dans la partie antérieure de l'extrémité temporale de la corne des ventricules latéraux (Isaacson, 1974). Différentes descriptions anatomiques de cette structure relativement hétérogène utilisant des nomenclatures différentes ont été réalisées (Paxinos & Watson, 1986 ; Swanson, 1992 ; Pitkanen, 2000).

Brièvement, le noyau latéral (LA) est principalement connecté aux cortex temporaux, insulaires et pariétaux. Il reçoit un grand nombre d'afférences en provenance des cortex sensoriels (e.g. visuel, auditif, somatosensoriel). Les régions hypothalamiques et surtout thalamiques constituent également les afférences principales du LA. Le LA reçoit et envoie de nombreuses projections vers les autres noyaux amygdaliens. Il projette plus légèrement vers la formation hippocampique, le cortex périrhinal et le cortex préfrontal.

Le noyau basal ou basolatéral (BLA) reçoit l'essentiel de ses afférences des aires sensorielles corticales, du cortex préfrontal et de la formation hippocampique. Il projette massivement vers le cortex préfrontal, la formation hippocampique, le noyau du lit de la strie terminale (BNST), la substance innominée, le noyau accumbens et le caudé-putamen.

Le noyau médian (M) reçoit des projections du cortex préfrontal, du BNST et de la région hypothalamique. Il projette à son tour vers les régions du système olfactif, hypothalamiques, thalamiques ainsi que sur le BNST.

Enfin, les afférences du noyau central de l'amygdale (CE) incluent des projections en provenance des cortex sensoriels, du BNST, de la formation hippocampique, du cortex préfrontal, de la substance innominée, d'un certain nombre de noyaux thalamiques et hypothalamiques ainsi que de plusieurs régions pontines. Il reçoit également des projections en provenance des noyaux LA, BLA et basal. En retour, le CE projette principalement vers le BNST, de nombreux noyaux hypothalamiques, la substance grise centrale du mésencéphale, le noyau parabrachial, le noyau moteur dorsal du nerf vague, le noyau ambigu.

Pour résumer, l'organisation des connections des noyaux amygdaliens avec les différentes autres régions du cerveau ainsi que celle existant entre les différents noyaux amygdaliens révèlent une relative organisation topographique des projections amygdaliennes (Figure 2). Le noyau latéral serait le relais amygdalien essentiel des signaux en provenance de régions thalamiques et corticales codant pour des informations relativement simples. Le noyau basal serait un relais amygdalien pour des régions du lobe temporal médian et les « centres

moteurs » ; régions considérées comme impliquées dans le traitement d'informations et l'élaboration de réponses comportementales relativement élaborées. Enfin, le noyau central serait lui en relation étroite avec des régions impliquées dans les activations endocriniennes, du système nerveux autonome, ou dans l'expression comportementale de peur (Figure 2).

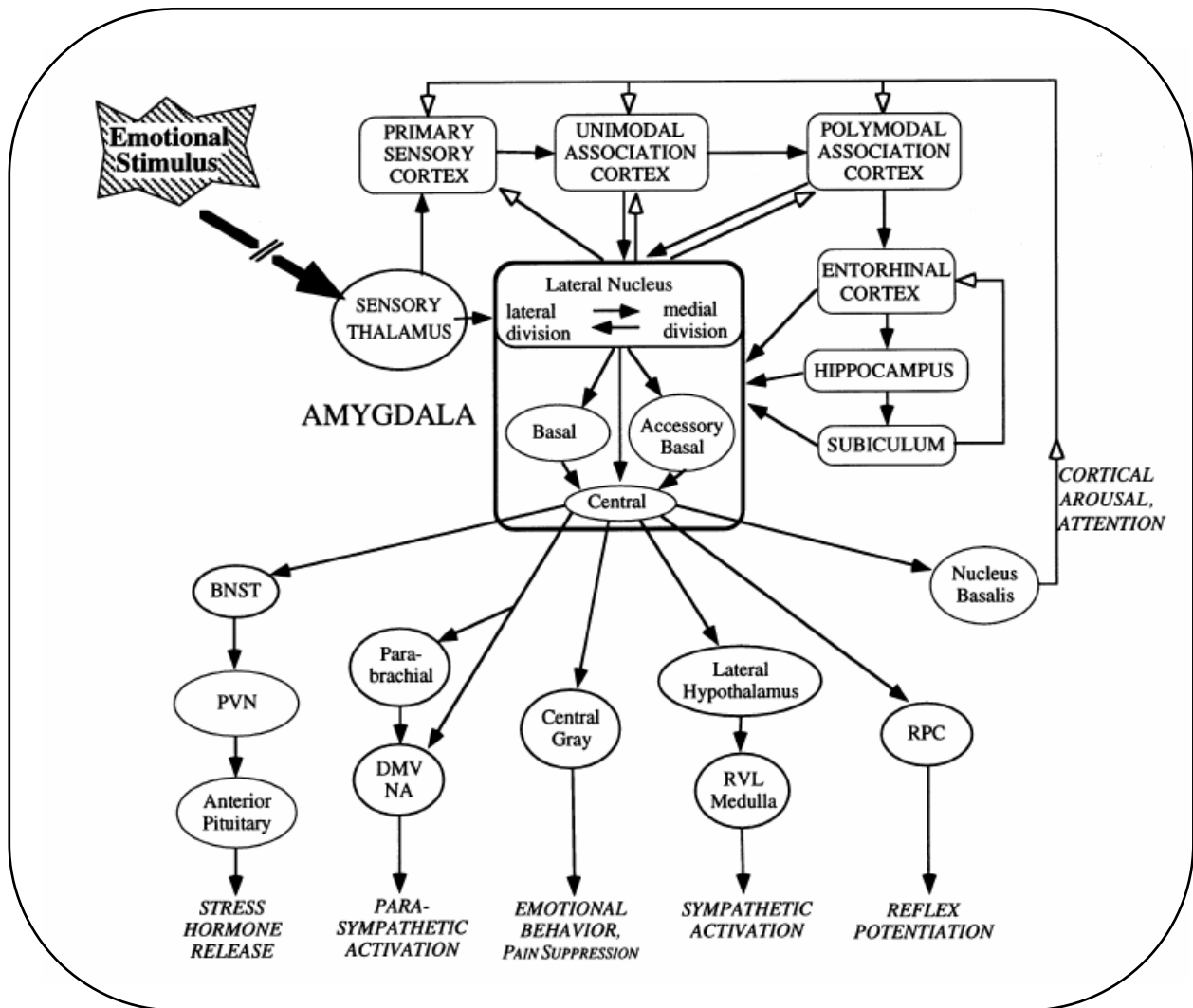


Figure 2 : Représentation schématique des connexions extrinsèques de l'amygdale (Muller & LeDoux, 1997). Le noyau latéral serait le relais amygdalien essentiel des signaux en provenance de régions thalamiques et corticales codant pour des informations relativement simples. Le noyau basal serait un relais amygdalien pour des régions du lobe temporal médian et les « centres moteurs » ; régions considérées comme impliquées dans le traitement d'informations et l'élaboration de réponses comportementales relativement élaborées. Enfin, le noyau central serait lui en relation étroite avec des régions impliquées dans les activations endocriniennes, du système nerveux autonome, ou dans l'expression comportementale de peur.

2. Amygdale et apprentissage émotionnel : de l'Homme à l'animal.

L'une des descriptions les plus célèbres ayant permis d'étudier chez l'homme, le rôle de l'amygdale, est celle de la patiente S.M. Cette patiente souffrait de la maladie d'Urbach-Wiethe affectant les tissus épithéliaux. Des études d'imageries cérébrales ont pu révéler la présence de lésions bilatérales (calcifications bilatérales) relativement sélectives de la région amygdalienne (des dommages mineurs ont également été constatés au niveau du cortex entorhinal). L'investigation neuropsychologique de S.M (Tranel & Hyman, 1990) a révélé un quotient intellectuel normal. Les performances de S.M au cours d'épreuves de mémoire déclarative, linguistiques ou mettant en jeu des capacités perceptives et des fonctions exécutives se sont avérées préservées. Bien que S.M ait une personnalité singulière (i.e. forte tendance à rejeter l'autorité et les conventions sociales) le déficit le plus caractéristique de cette patiente résidait dans son incapacité à détecter et analyser de manière appropriée les émotions. Ainsi, S.M éprouvait de grandes difficultés à discriminer des visages qui ne diffèrent les uns des autres que par l'émotion qu'ils expriment. En particulier, ses difficultés s'avéraient marquées lorsqu'il s'agissait de reconnaître des émotions négatives (e.g. peur, colère). D'autres études de patients porteurs de lésions amygdaliennes (Adolphs et al., 1994 ; 1995 ; Young et al., 1995 ; 1996 ; Broks et al., 1998 ; Adolphs et al., 1999) et des études d'imagerie cérébrale (Breiter et al., 1996 ; Morris et al., 1996 ; Phillips et al., 1997 ; Morris et al., 1998) sont venues confirmer cette première étude neuropsychologique en soulignant un rôle crucial de l'amygdale dans des situations émotionnellement connotées.

De nombreuses études réalisées chez l'animal ont conforté cette vue et ont permis d'aboutir à un large consensus quant à l'implication de l'amygdale dans un processus d'attribution d'une valeur positive ou négative à des événements vécus ainsi que dans l'organisation d'un comportement émotionnel approprié. Ces recherches faisaient suite à la classique description de Kluver & Bucy (1939) de troubles comportementaux observés chez le singe à la suite de larges lésions du lobe temporal médian. Le comportement des animaux décrit par ces auteurs se caractérisait par une hypersexualité souvent dirigée sur des objets inappropriés, une hyperoralité, des déficits perceptuels, et un profond déficit d'expression et de réactivité émotionnelle. Par la suite, une série d'études a tenté de préciser les structures du lobe temporal médian dont la lésion pouvait plus spécifiquement rendre compte du syndrome décrit par cette équipe (Pribam & Bagshaw, 1953 ; Weiskrantz, 1956 ; Akert et al., 1961). En particulier, celles réalisées par Weiskrantz, alliant lésions localisées à l'utilisation d'épreuves comportementales spécifiques (épreuve d'évitement actif), ont permis d'aboutir à une

proposition quant à la fonction de l'amygdale dans les apprentissages émotionnels. Ainsi, l'auteur interprète les déficits comportementaux observés comme une incapacité à former des associations par lesquelles des stimuli neutres acquièrent une signification émotionnelle (i.e. un signal « prédit » un événement aversif). Des études ultérieures, utilisant des épreuves de conditionnement instrumental, viendront renforcer cette interprétation (Jones & Mishkin, 1972 ; Aggleton & Mishkin, 1986 ; Everitt & Robbins, 1992 ; Gaffan, 1992 ; Rolls, 1992).

3. Amygdale et modulation des souvenirs émotionnellement connotés.

A -Données chez l'Homme.

Un nombre significatif d'études a permis de révéler un rôle crucial de l'amygdale dans le stockage et/ou la restitution de souvenirs chargés émotionnellement. Ainsi, l'étude de patients porteurs de lésions bilatérales (Cahill et al., 1995 ; Adolphs et al., 1997) ou unilatérales (LaBar & Phelps, 1998 ; Frank & Tomaz, 2003) de l'amygdale a révélé que l'augmentation classique de la rétention mnésique d'événements émotionnellement connotés (vs. événements neutres) était altérée chez des sujets cérébro-lésés. Des études d'imagerie fonctionnelle supportent ces premières données en montrant que l'activation amygdalienne peut être corrélée aux performances mnésiques des sujets pour des informations chargées émotionnellement (Cahill et al., 1996 ; Hamann et al., 1999; Canli et al., 2000 ; Hamann et al., 2002). Hamann et coll (1999), Dolcos et coll (2004) ou encore Kilpatrick & Cahill (2003) ont également montré l'existence de corrélations entre les activités des régions amygdalienne et hippocampique et les performances mnésiques relatives à des événements émotionnellement connotés. De manière conjointe, il a également été montré que l'éveil émotionnel et/ou la libération des hormones de stress pouvait favoriser la consolidation des souvenirs. Des études menées par Cahill et coll (1994) montrent que l'administration de propranolol (antagoniste β -adrénergique) perturbe les performances des sujets pour le rappel des informations à connotation émotionnelle. Ainsi, si les données présentées en introduction révélaient le rôle crucial de l'amygdale dans l'apprentissage émotionnel décrit comme implicite (e.g. expression de RCE), ces nouvelles données soulignent la contribution essentielle de cette structure à la consolidation de souvenirs épisodiques (i.e. typiquement explicites) émotionnellement connotés. Elles suggèrent donc l'existence d'interactions amygdalo-hippocampiques au cours d'une expérience émotionnellement connotées.

B -Données chez l'animal.

Les premières données chez l'animal montrant un rôle modulateur de l'amygdale sur la consolidation des souvenirs connotés émotionnellement ont été obtenues dans les années 1960-70 en étudiant les effets de stimulations électriques amygdaliennes sur la restitution mnésique (Kesner & Willburn, 1974, McGaugh & Gold, 1976). En 1983, Liang et McGaugh montrent que les effets bénéfiques des stimulations électriques amygdaliennes pouvaient être bloqués par des lésions de la strie terminale, considérée comme une voie de « sortie » majeure de la région amygdalienne. Au cours des années 80, Gallagher et coll. démontrent que des injections d'antagonistes β -adrénergiques dans l'amygdale consécutives à l'acquisition bloquent la rétention d'une épreuve d'évitement passif. Par ailleurs, ces auteurs observent que cet effet est aboli si une injection de norépinéphrine co-occurente de la première est réalisée. Le rôle modulateur de l'amygdale a été démontré dans de nombreuses études révélant les effets bénéfiques et/ou délétères de traitements pharmacologiques délivrés après l'apprentissage sur la restitution mnésique. Ainsi, les effets de traitements intra-amygdaliens délivrés en post essais sur la restitution des informations ont été observés dans des épreuves de conditionnement contextuel aversif (Sacchetti et al., 1999 ; Vazdarjanova & McGaugh, 1999 ; LaLumiere et al., 2003), de conditionnement aversif à un stimulus phasique simple (Sacchetti et al., 1999), de discrimination spatiale (McGaugh et al., 1988), dans des conditionnements de place (Schroeder & Packard, 2000 Hsu et al., 2002) et lors d'apprentissages en labyrinthes aquatiques et radiaires (Packard et al., 1994 ; Packard & Chen, 1999). L'ensemble de ces études a permis d'aboutir à une description des mécanismes neurobiologiques sous tendant cette fonction amygdalienne. Ces mécanismes ont été réunis au sein d'un modèle proposé par l'équipe de McGaugh pouvant être décrit de la manière suivante (McGaugh, 2004) (Figure 3):

La charge ou l'éveil émotionnel présent lors d'une situation d'apprentissage induit une libération d'adrénaline par les glandes surrénales. L'adrénaline libérée induit une activation du nerf vague qui projette sur le noyau du tractus solitaire (NTS). Ce dernier entraîne directement ou indirectement (par l'intermédiaire du locus coeruleus ; LC) une libération de noradrénaline allant activer des récepteurs noradrénergique (de type α mais surtout de type β) du complexe basolatéral (BLC) de l'amygdale. Cette libération de noradrénaline peut être modulée négativement par des neurones GABAergiques et opioïdiques du complexe amygdalien.

La charge émotionnelle provoque également une libération de corticostérone allant activer les récepteurs aux glucocorticoïdes présents dans le NTS et le BLC. Cette activation des récepteurs aux glucocorticoïdes participe à une potentialisation du signal noradrénergique amygdalien. Des activations glutamatergiques et cholinergiques (issues du noyau basal) se produisent également en aval du signal noradrénergique. L'ensemble de ces signaux module l'activation des projections de l'amygdale sur les structures clé de la mémoire contribuant ainsi au rôle modulateur de l'amygdale sur les souvenirs chargés émotionnellement.

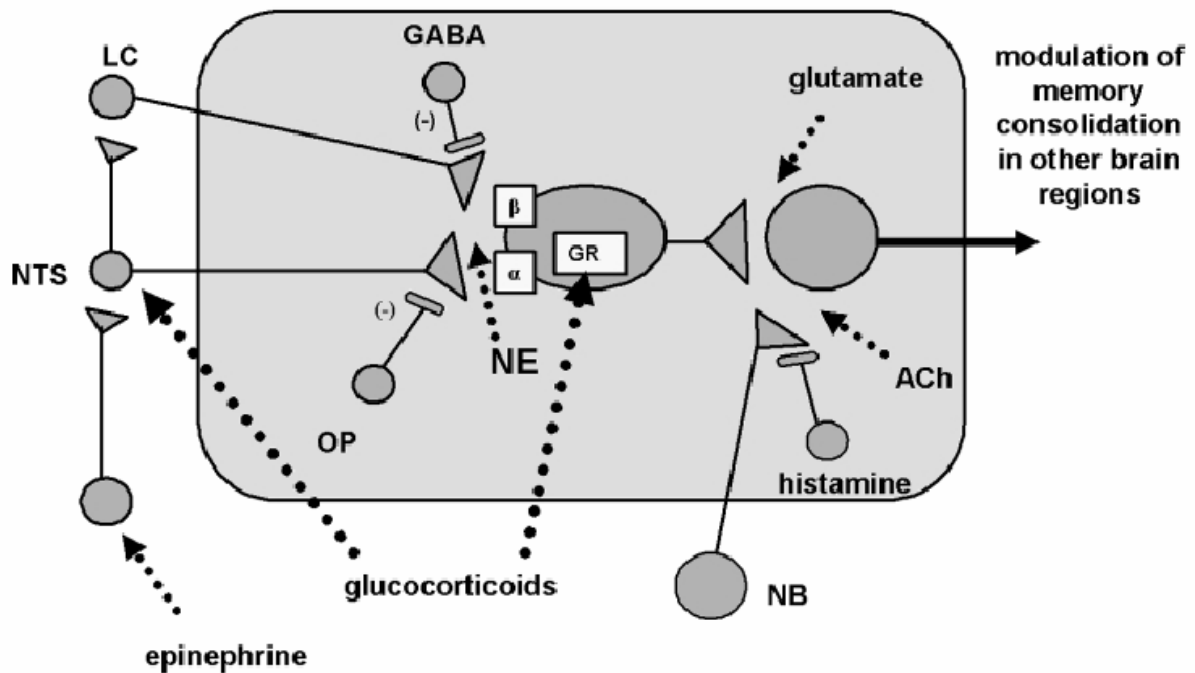


Figure 3 : Modèle de fonctionnement de la modulation amygdalienne (McGaugh, 2004).

La charge émotionnelle induit une libération d'adrénaline qui induit une libération de noradrénaline (via le NTS et le LC). L'éveil émotionnel produit également une libération de glucocorticoïdes qui, elle-même, induit une libération de noradrénaline. En amont, la libération de noradrénaline peut être modulée par des neurones opioïdiques ou GABAergiques de l'amygdale. En aval, des activations glutamatergiques et cholinergiques modulent également le signal noradrénergique. L'ensemble de ces signaux module l'activation des projections de l'amygdale sur les structures clé de la mémoire contribuant ainsi au rôle modulateur de l'amygdale sur les souvenirs chargés émotionnellement.

Noyau du tractus solitaire (NTS); Locus Coeruleus (LC); noradrénaline (NE); Noyau basal (NB); Acétylcholine (ACh); neurones opioïdiques (OP).

C - Les régions cibles de la modulation amygdalienne.

Les régions cibles de la modulation amygdalienne sont principalement le noyau accumbens, le noyau caudé, l'hippocampe et certaines régions corticales (Paré, 2003). Ainsi, Packard et coll (1994) ont montré que l'injection post apprentissage de d-amphétamine dans l'hippocampe améliore spécifiquement la version spatiale de l'apprentissage en piscine de Morris, alors que la même injection effectuée dans le noyau accumbens n'améliore que la version guidée de l'épreuve. En revanche, l'injection intra-amygdalienne d'amphétamine améliore les performances des animaux dans les deux versions de l'apprentissage. Par ailleurs, les auteurs montrent que l'inactivation de l'hippocampe ou du noyau caudé avant le test de rétention perturbe respectivement les performances des versions spatiales et guidées alors que l'inactivation de l'amygdale est, elle, sans aucun effet. De façon comparable, cette équipe (Packard, 1999) démontre également que l'injection post-apprentissage de glutamate dans l'hippocampe améliore spécifiquement la stratégie spatiale alors que l'injection de glutamate dans le caudé-putamen améliore spécifiquement la stratégie égocentrée dans une épreuve réalisée dans un labyrinthe en croix. De manière intéressante, Packard & Chen (1999) montrent qu'une injection de lidocaïne intra-amygdalienne co-occurrence d'une injection intra-hippocampique de glutamate bloque l'amélioration des performances des animaux dans une épreuve en labyrinthe radiaire.

Conjointement aux analyses comportementales et pharmacologiques citées ci-dessus, des études neurophysiologiques ont permis de conforter l'idée d'un rôle modulateur de l'amygdale sur le fonctionnement d'autres régions cérébrales. Ainsi, la stimulation électrique du BLA favorise l'induction d'une potentialisation à long terme (PLT) dans le gyrus denté (GD) hippocampique (Ikegaya et al., 1995 ; Akirav & Richter Levin, 1999 ; Frey et al., 2001). La lésion du BLC ou l'injection d'antagonistes β adrénergiques dans le BLC bloque l'induction de cette PLT dans le GD (Ikegaya et al., 1994 ; 1997). Par ailleurs, Akirav & Richter Levin (2002) montrent que l'administration de noradrénaline et de corticostérone peut également moduler l'effet d'une stimulation du BLC sur l'induction de la PLT dans le GD.

L'ensemble de ces études démontre que le fonctionnement du BLA peut moduler la plasticité synaptique au sein d'autres régions cérébrales (en particulier celle de l'hippocampe) ainsi que leur mise en jeu dans des situations d'apprentissages émotionnellement connotés. Toutefois, de nombreuses autres données montrent que l'implication de l'amygdale dans les apprentissages émotionnellement connotés n'est pas limitée à un simple rôle modulateur.

Elles soulignent le fait que cette structure peut directement être impliquée dans le traitement des informations.

4. Amygdale et conditionnement.

Comme nous l'avons mentionné en introduction, des études neuropsychologiques ont montré que des patients porteurs d'une lésion bilatérale de l'amygdale (Bechara et al., 1995), ou d'une lésion unilatérale du lobe temporal médian (Labar et al., 1995) présentent des déficits d'acquisition d'une réponse émotionnelle conditionnée à un SC. Cependant, ces patients sont capables de rapporter verbalement les faits relatifs à l'expérience de conditionnement. Ainsi, ces sujets semblent incapables de réaliser une association conditionnée, c'est-à-dire d'attribuer (de manière implicite) les propriétés aversives du SI à un stimulus neutre auquel il est apparié. Ces études montrent donc, qu'au-delà d'une simple implication de l'amygdale dans la régulation et l'expression des émotions ou des souvenirs émotionnellement connotés, l'intégrité de cette structure paraît requise pour l'acquisition d'apprentissages basés sur l'attribution d'une valeur émotionnelle à des stimuli.

Les études menées chez l'animal, grâce à l'utilisation d'approches multiples (lésions, inactivations réversibles, administrations de drogues) ont non seulement confirmé le rôle nécessaire de l'amygdale dans l'attribution d'une valeur émotionnelle à des stimuli, mais plus encore ont conduit à l'élaboration d'un modèle fonctionnel dans lequel l'amygdale sous-tend l'acquisition d'un conditionnement élémentaire aversif (Maren et al., 1996 ; LeDoux, 2000) (voir Figure 4). Ce modèle tente d'expliquer comment un SC parvient à l'amygdale, comment il y est associé à un SI et enfin comment les réponses de peurs associées à ce traitement (RCE) sont contrôlées par le système amygdalien.

A- Rôle essentiel du noyau latéral de l'amygdale dans le conditionnement classique élémentaire.

- Niveau d'analyse structural.

Un premier circuit incluant des projections directes thalamo-amygdaliennes (en provenance du corps genouillé médian et du noyau intralaminaire postérieur ; LeDoux et al., 1990 ; Turner & Herkenham, 1991) sous-tendent la formation d'un conditionnement

élémentaire impliquant une association entre un SC sonore simple et unimodal et le SI. Lorsque le SC doit faire l'objet d'une discrimination sur la base de ces traits perceptuels, un second circuit incluant le cortex auditif s'avère nécessaire (Romanski & LeDoux, 1993). L'intégration des signaux provenant des deux circuits s'effectue au niveau du LA. En effet, les projections thalamo-amygdaliennes et cortico-amygdaliennes convergent toutes deux sur les mêmes neurones au sein de ce noyau (LeDoux et al., 1991 ; Li et al., 1996). A l'appui de ce modèle, des données électrophysiologiques ont mis en évidence qu'une PLT induite par stimulation de la voie thalamo-amygdalienne, ou par l'acquisition d'un conditionnement élémentaire, augmente l'amplitude des potentiels de champ naturellement évoqués dans le LA par des entrées sensorielles auditives (Rogan & LeDoux, 1995 ; Rogan et al., 1997). Par ailleurs, des lésions ou inactivations du LA perturbant le conditionnement à un SC simple sonore ont confirmé le rôle de ce noyau dans le conditionnement élémentaire (Muller et al., 1997 ; Wilensky et al., 1999 ; Amorapanth et al., 2000 ; Nader et al., 2001).

Enfin, le CE, fortement connecté aux régions hypothalamiques, pontine et médullaire impliquées dans la régulation du système nerveux autonome, assure lui l'expression de la réponse conditionnée au SC. Des études lésionnelles ont en effet montré qu'une atteinte du CE interfère avec l'expression des réponses conditionnées (Kapp et al., 1979 ; Gentile et al., 1986 ; Hitchcock & Davis, 1986).

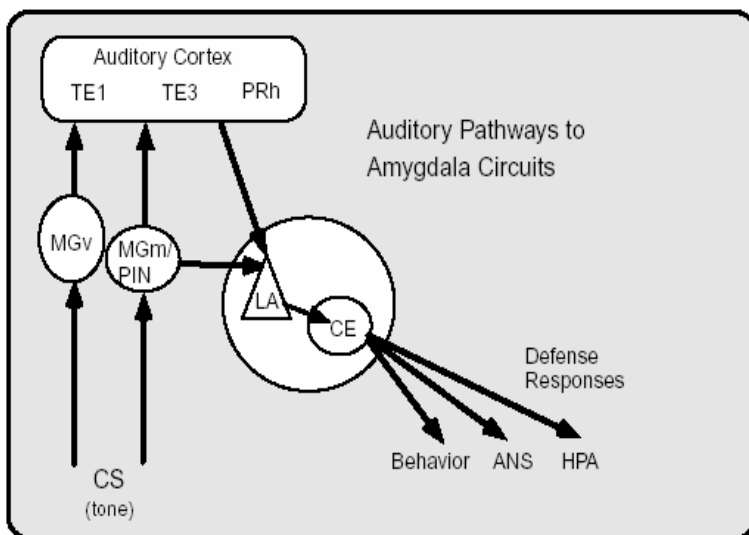


Figure 4 : Modèle fonctionnel de l'amygdale dans le conditionnement élémentaire (LeDoux, 2000). Les projections thalamo-amygdaliennes et cortico-amygdaliennes convergent toutes deux sur les mêmes neurones au sein du LA. La convergence des signaux codant pour le SC et de ceux codant pour le SI au niveau des neurones du LA permet la formation de l'association simple SC-SI. Le CE, fortement connecté aux régions

hypothalamiques, pontine et médullaire impliquées dans la régulation du système nerveux autonome, assure lui l'expression de la réponse conditionnée au SC.

-Mécanismes moléculaires d'un conditionnement élémentaire.

Ce modèle de fonctionnement a également fait l'objet d'un nombre important d'études visant à décrire les mécanismes moléculaires associés à l'établissement d'un conditionnement élémentaire (Figure 5). L'acquisition d'un conditionnement requiert une convergence des signaux codant pour le SC et le SI au niveau des neurones du LA. A ce niveau, le signal codant pour le SC induit une libération de glutamate qui se fixe à ces différents types de récepteur (i.e., récepteurs AMPA, NMDA ainsi que les récepteurs métabotropiques mGluR). Le signal codant pour le SI entraîne une dépolarisation des cellules du LA permettant ainsi une entrée de calcium via les récepteurs NMDA (Miserendino et al., 1990 ; Campeau et al., 1992 ; Fanselow & Kim, 1994 ; Lee & Kim, 1998 ; Bauer et al., 2002). L'entrée de calcium est également induite par l'intermédiaire des canaux calciques voltages dépendants (L-VGCC) (Weisskopf et al., 1999 ; Bauer et al., 2002 ; Karst et al., 2002 ; Shinnick-Gallagher et al., 2003). En particulier, l'entrée de calcium dans le neurone post-synaptique a pour effet majeur l'activation de l' α -CAMKII (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II). La grande majorité des expériences ayant mis en évidence ces mécanismes moléculaires dans des apprentissages de peur conditionnée démontre que l'implication des récepteurs NMDA (en particulier la sous-unité NR2B), des récepteurs mGluR5 et de l' α -CaMKII est nécessaire à l'acquisition et/ou la formation à court terme de l'association simple SC-SI. En revanche, ces expériences ont également révélé une implication des L-VGCC dans le stockage à long terme de cette association (Rodrigues et al., 2004).

Suite à l'entrée de calcium dans la cellule, une cascade d'événements moléculaires (activation de protéine kinase de type A, PKA, de type C, PKC) est requise afin de permettre un stockage permanent du conditionnement élémentaire (Bourtchouladze et al., 1998 ; Goosens et al., 2000 ; Schafe & LeDoux, 2000 ; Weeber et al., 2000 ; Rodrigues et al., 2004). En particulier, le rôle déterminant de kinases telles que la PKA (cyclic AMP dependent protein kinase) (Abel et al., 1997 ; Bourtchouladze et al., 1998 ; Schafe & LeDoux, 2000) et MAPK (mitogen-activated protein kinase) a été démontré dans le conditionnement classique aversif. Ces kinases stimulent la transcription, au niveau nucléaire, en activant des facteurs de transcriptions tels que CREB (c-AMP response element binding protein) (Alberini et al., 1995 ; Silva et al., 1998) qui vont alors permettre l'expression de gènes aboutissant enfin à la production de nouvelles protéines. Ces événements moléculaires vont non seulement assurer des modifications à long terme au niveau synaptique mais également permettre l'élaboration de changements structuraux au niveau dendritique (Rodrigues et al., 2004). En résumé,

l'ensemble de ces mécanismes va permettre la formation ainsi que le maintien (consolidation) de l'association simple SC-SI.

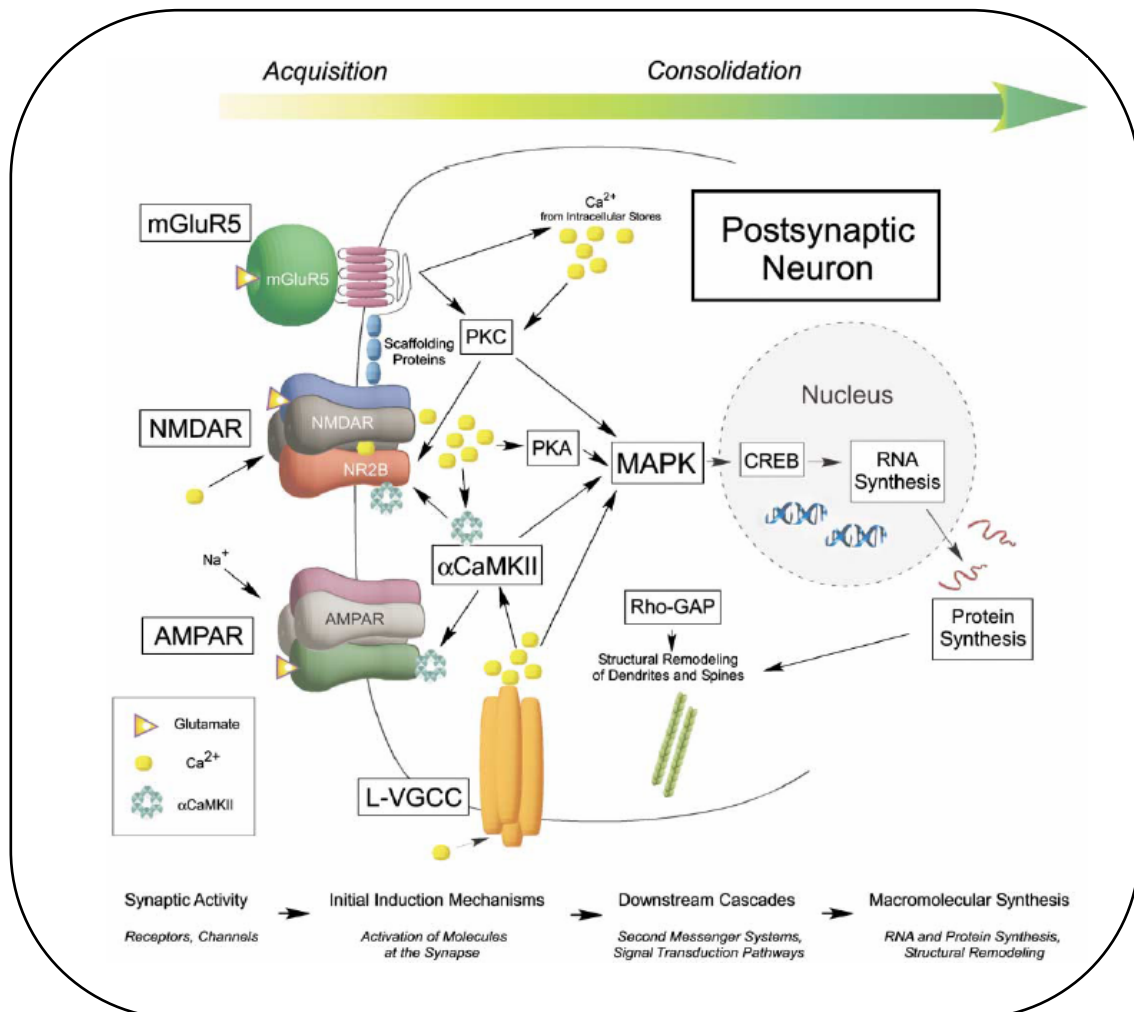


Figure 5 : mécanismes moléculaires du conditionnement élémentaire (Rodrigues et al., 2004).

L'élévation de la concentration de calcium dans la cellule permet l'activation de cascades de seconds messagers (PKA, PKC, αCaMKII , MaPK). Ces kinases stimulent la transcription, au niveau nucléaire, en activant des facteurs de transcriptions tels que CREB qui vont alors permettre l'expression de gènes aboutissant enfin à la production de nouvelles protéines. Ces événements moléculaires vont non seulement assurer des modifications à long terme au niveau synaptique mais également permettre l'élaboration de changements structuraux au niveau dendritique.

B- Amygdale et conditionnement au contexte.

Il est établi que lorsqu'un animal est soumis à une épreuve de conditionnement, il n'associe pas seulement le SC à la survenue du SI. En effet, les stimuli présents dans le contexte de conditionnement peuvent également être associés à ce SI. On parle alors de conditionnement au contexte (cf. Introduction, « rôle » du contexte). Comme nous l'avons précisé ci-dessus, la plupart des études ayant étudié le rôle de l'amygdale dans le conditionnement classique se sont focalisées sur l'implication du LA ou plus généralement du complexe basolatéral (réunissant le noyau LA et BLA) dans le conditionnement élémentaire.

En revanche, celles destinées à la spécification des bases neurobiologiques du conditionnement contextuel se sont focalisées sur l'implication de l'hippocampe. Un nombre limité d'études suggère toutefois l'implication de projections issues de la formation hippocampique vers l'amygdale dans le conditionnement au contexte. Le BLA semble être l'un des sites privilégiés de ces projections, notamment en provenance du cortex entorhinal et du subiculum. En effet, une stimulation de la formation hippocampique à l'origine d'une projection vers le complexe basolatéral potentialise une composante d'un potentiel de champ évoqué dans le BLA (Maren & Fanselow, 1995). Ces données suggèrent ainsi que le noyau BLA pourrait être critique à la formation de l'association contexte-SI. Toutefois, une étude visant à spécifier les rôles respectifs des noyaux LA et BLA dans le conditionnement élémentaire et contextuel n'a toujours pas été réalisée.

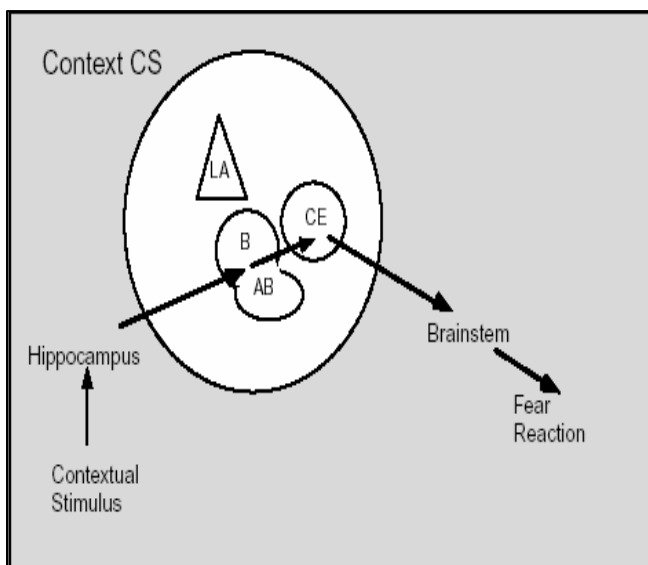


Figure 6 : Modèle de fonctionnement amygdalien dans le conditionnement aversif au contexte (LeDoux, 2000). L'hippocampe est impliqué dans le traitement des indices du contexte. Le BLA, site privilégié des projections hippocampiques permettrait la formation de l'association contexte-SI.

C- Limites et extension du modèle.

Dans une expérience menée en 1997, Killcross et coll. ont montré qu'une lésion du BLC (complexe basolatéral de l'amygdale) induit un déficit marqué de réponses instrumentales d'un conditionnement à un SC simple, alors que celle du noyau central de l'amygdale perturbe uniquement l'expression « pavlovienne » (réponse de suppression conditionnée) de cet apprentissage. De manière intéressante, les données issues de cette étude étaient alors incompatibles avec le modèle proposé par l'équipe de LeDoux. En effet, selon le modèle proposé, une lésion du BLC ne devait plus permettre à l'animal de réaliser une association simple de type SC-SI. Par conséquent, la lésion du BLC ne devait plus permettre non plus à l'animal d'exprimer sous quelque forme que se soit une connaissance de cette association (i.e. instrumentale ou pavlovienne). Néanmoins, les différences entre les épreuves de conditionnement utilisées dans cette expérience et celles utilisées par l'équipe de LeDoux, ainsi que les incertitudes quant à l'atteinte systématique du LA dans l'expérience menée par Killcross, rendaient difficiles la comparaison et l'affirmation d'une incompatibilité entre ces nouvelles données et celles préalablement rapportées.

Plus récemment, Amorapanth et coll. (2000) ont montré que la lésion du LA perturbe bien l'acquisition d'une réponse conditionnée à un SC simple (i.e. attestée par une réponse de « freezing ») mais également la capacité de l'animal à utiliser ce stimulus comme un SC dans une nouvelle épreuve nécessitant une réponse instrumentale (réponse d'échappement). De manière intéressante, la lésion spécifique du BLA perturbe, elle, la capacité à effectuer une réponse instrumentale alors qu'elle préserve la réponse conditionnée de « freezing » au SC simple. Cette nouvelle expérience révélait à nouveau une insuffisance du modèle développé par l'équipe de LeDoux. En particulier, elle semblait indiquer que la nature des informations traitées et/ou le type de réponse conditionnée exprimée par l'animal étaient déterminants pour la mise en jeu des différents noyaux amygdaliens au cours d'un conditionnement.

Sur cette base, LeDoux et coll. (2000) ou encore Yaniv et coll. (2004) ont proposé de nouveaux modèles de fonctionnement de l'amygdale tentant, au moins en partie, de rendre compte de ces apparentes incompatibilités. En particulier, Yaniv et coll. (2004) proposent l'existence d'un gradient de complexité fonctionnelle croissant allant du LA jusqu'au BLA. Comme nous l'avons mentionné en introduction de ce chapitre, les auteurs s'appuient sur les données anatomiques montrant que les projections parvenant au LA proviennent de régions sensées participer à un traitement d'informations relativement plus simples (thalamus, cortex sensoriels primaires) que celles parvenant au BLA (cortex associatif et formation

hippocampique). En confirmation de ces données, ils constatent par ailleurs que l'induction d'une PLT est observée dans le LA, et non dans le BLA, lorsque la stimulation est effectuée dans le corps genouillé médian du thalamus. A l'inverse, ils observent qu'une telle PLT est induite dans le BLA, mais non dans le LA, après stimulation du cortex périrhinal ventral (Yaniv et al., 2001). Ainsi les auteurs proposent qu'au cours d'un conditionnement, le LA serait impliqué dans le traitement d'informations simples (i.e. association simple SC-SI). En revanche, lorsque la situation de conditionnement nécessite un traitement d'informations plus complexes (traitement des informations contextuelles ou nécessité d'élaborer une réponse émotionnelle conditionnée plus élaborée) le BLA serait alors requis.

En résumé, les travaux de l'équipe de LeDoux, confortés par ceux de nombreuses autres équipes ont abouti à la spécification, au niveau structural, cellulaire et moléculaire, des mécanismes amygdaliens impliqués dans l'établissement d'une association simple de type SC-SI (Pare et al., 2004 ; Fanselow & Poulos, 2005 ; Maren et al., 2005 ; Kim & Jung, 2006). Toutefois, l'ensemble des données énoncées ci-dessus souligne également qu'au sein de cette structure anatomiquement hétérogène, le rôle des noyaux amygdaliens reste encore à spécifier. En particulier, elles suggèrent que différentes voies de projections vers l'amygdale, impliquées dans différents types de conditionnement aversif, pourraient solliciter différemment les noyaux LA et BLA. La première partie de nos travaux a consisté à tester cette hypothèse.

PARTIE III

Implication de l'hippocampe dans le conditionnement classique

1. Rappel anatomique.

L'hippocampe occupe la face médiale du lobe temporal où il est en grande partie recouvert par la circonvolution parahippocampique. La « formation hippocampique » (FH) se compose du gyrus parahippocampique (comprenant le cortex entorhinal et le complexe subiculaire) et de la région hippocampique comprenant l'hippocampe lui-même ou corne d'Ammon (subdivisé en quatre champs allant du CA1 au CA4) et le gyrus denté.

Les projections intrinsèques et extrinsèques de la FH présentent une organisation le plus souvent topographique qui a fait l'objet de plusieurs analyses (Witter et al., 1989 ; Amaral & Witter, 1995).

Les différentes subdivisions de la FH sont en étroite relation entre elles, en grande partie grâce au circuit tri-synaptique (Figure 6). Brièvement, les axones des cellules étoilées et pyramidales des couches II et III du cortex entorhinal sont regroupés au sein de la voie perforante qui traverse le cortex entorhinal dans sa profondeur. Après avoir traversé le subiculum, ces axones projettent massivement sur la partie terminale des dendrites apicales des cellules granulaires du GD (Amaral & Witter, 1989 ; Dolorfo & Amaral, 1998) et, de façon plus diffuse, sur les dendrites apicales des cellules pyramidales des champs CA3 mais aussi CA1. Par l'intermédiaire des fibres moussues, les cellules granulaires du GD projettent sur les cellules du champ CA3 qui, à leur tour, envoient des projections denses sur le champ CA1, via les collatérales de Schaeffer. A partir des cellules du CA1, de nombreuses projections atteignent les cellules pyramidales du subiculum. En retour, de nombreuses connexions provenant majoritairement du subiculum mais aussi du CA1 projettent sur les couches profondes du cortex entorhinal.

La FH reçoit des afférences de nombreuses structures corticales et sous-corticales. Seuls le cortex entorhinal et, dans une moindre mesure, le subiculum reçoivent des afférences corticales. Les afférences corticales du cortex entorhinal peuvent schématiquement être divisées en deux groupes. Le premier groupe est constitué par les afférences qui projettent sur les couches superficielles I, II, III (donnant naissance à la voie perforante). Ces afférences proviennent principalement des structures olfactives (bulbe, cortex piriforme) et du cortex périrhinal adjacent (Burwell & Amaral, 1998). Le second groupe est constitué des afférences provenant de régions corticales diverses (cortex paralimbiques, prélimbiques ou cingulaires) qui projettent sur les couches profondes IV, V et VI.

L'ensemble des subdivisions de la FH reçoit des afférences sous-corticales. Les afférences cholinergiques proviennent du septum médian et de la partie verticale de la bande de Broca (Alonso & Köhler, 1984 ; Gaykema et al., 1990). Les afférences noradrénergiques proviennent du Locus Coeruleus et innervent principalement le CA3 (Haring & Davis, 1985). Les afférences dopaminergiques proviennent de l'aire tegmentale ventrale et innervent principalement le CA1 et le cortex entorhinal (Verney et al., 1985 ; Gasbarri et al., 1994). Les afférences sérotoninergiques proviennent des noyaux du raphé, en particulier du raphé médian (Azmitia & Segal, 1978). Enfin la FH reçoit une innervation importante des noyaux amygdaliens et thalamiques.

Les efférences hippocampiques sont essentiellement constituées du système fimbria-fornix. Les fibres du fornix précommissurales projettent vers les régions septales et hypothalamiques (région pré-optique notamment). Les fibres postcommissurales projettent vers le noyau antérieur du thalamus et dans l'hypothalamus (corps mamillaires notamment) (Chronister & White, 1975).

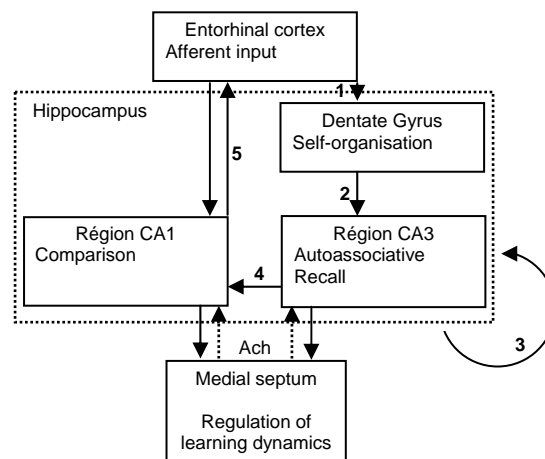


Figure 6 : Représentation schématique du modèle de fonctionnement de l'hippocampe proposé par Hasselmo et coll. (1995). L'intérêt de ce modèle vient du fait qu'il décrit les fonctions assurées par les différentes voies synaptiques. 1. les synapses de la voie perforante entretiennent une activité d'auto-organisation dans le gyrus dentelé afin de constituer de nouvelles représentations des inputs provenant du cortex entorhinal. 2. L'activité des fibres moussues issue du gyrus permet un stockage d'informations sous formes de matrices auto-associatives dans le CA3. 3. L'activité récurrente au sein du CA3 permet les opérations de stockage ou de rappel. 4. Les collatérales de Schaffer permettent la formation de matrices hétéro-associatives. 5. L'entrée de la voie perforante dans le CA1 sous-tend une activité auto-organisatrice entraînant une nouvelle représentation de l'entrée entorhinal permettant ainsi une comparaison avec les représentations stockées dans le CA3 et celles stockées dans le CA1.

2. Hippocampe et représentation « élaborée » de l'expérience.

Les données anatomiques montrent que l'hippocampe est une zone de réception majeure de signaux en provenance des aires corticales sensorielles (aires d'association multimodales frontales, pariétales et temporales). Elles révèlent également que son organisation intrinsèque se caractérise par un haut degré d'interconnexions favorable à une activité auto-soutenue et récurrente. Elles suggèrent ainsi que cette structure, tant par ses connexions extrinsèques que par son organisation intrinsèque, pourrait idéalement contribuer à un traitement ainsi qu'à l'utilisation flexible de représentations complexes de stimuli.

Dès 1978 O'Keefe et Nadel proposent sur la base d'études comportementales et neurophysiologiques que cette structure cérébrale est critique pour l'acquisition, la conservation et l'utilisation d'informations spatiales de l'environnement sous une forme proche de celle d'une carte. A l'échelle cellulaire, ces auteurs mettent en évidence des cellules dites « cellules de lieux » dans l'hippocampe. En effet, ces cellules déchargent spécifiquement en fonction de la localisation de l'animal dans un environnement. Associées à la découverte de cellules dites de « direction » (i.e. déchargeant spécifiquement pour certaines orientations de la tête ou du déplacement de l'animal) (Taube et al., 1990), ces cellules semblent refléter le codage d'une carte spatiale de l'environnement dans lequel évolue l'animal. Par ailleurs, des études lésionnelles montrent que des animaux porteurs de lésions hippocampiques sont largement déficitaires dans des apprentissages spatiaux et des épreuves d'explorations, alors qu'ils ne sont pas perturbés dans des épreuves dites non spatiales (Morris et al., 1982 ; Sutherland et al., 1982 ; Gallagher & Holland, 1992 ; Jarrard, 1993).

Plus récemment, Eichenbaum et coll. (1988 ; 1989) observent chez le rat que la lésion bilatérale du fornix lors d'une épreuve de discrimination d'odeurs perturbe les performances des animaux lorsque que les odeurs sont présentées simultanément (e.g. présentation de paires d'odeurs). En revanche cette lésion facilite la discrimination dans le cas où les odeurs sont présentées successivement aux animaux. Dans une variante de ce protocole de discrimination, les auteurs montrent que certains animaux lésés parviennent tout de même, avec beaucoup d'entraînement, à apprendre des discriminations simultanées. En revanche, ces animaux demeurent incapables de discriminer des odeurs connues lorsque ces dernières, préalablement présentées en acquisition, sont présentées sous forme de paires nouvelles (i.e. recombinaisons lors du test). Depuis, des études menées au laboratoire sont venues conforter les premières observations d'Eichenbaum dans une autre épreuve se déroulant dans un labyrinthe radiaire (Marighetto et al., 1999). De manière conjointe, l'étude d'enregistrements de l'activité

unitaire de neurones hippocampiques (Eichenbaum et al., 1989 ; Wiener et al., 1989 ; Wood et al., 1999) révèlent la présence de cellules qui ne déchargent pas uniquement pour des informations spatiales. Selon ces études, le fonctionnement des neurones hippocampiques ne serait pas exclusivement dévolu à la constitution de cartes spatiales mais contribuerait plus généralement à l'élaboration de représentations relationnelles. De telles représentations permettrait à l'animal de comparer, d'opposer les informations présentées dans la situation d'apprentissage afin de les utiliser de manière flexible, inférentielle, dans des situations nouvelles.

3. Hippocampe et conditionnement classique.

Sur la base de ces données, les études visant à spécifier le rôle de la FH dans le conditionnement classique ont abouti à l'idée générale d'une nécessaire intégrité de cette structure dans le conditionnement au contexte (Holland & Bouton, 1999 ; Rudy, 2004). Dans la mesure où cette structure serait requise dans la formation d'associations polymodales, complexes, l'hippocampe pourrait participer à la formation de représentations configurales d'un contexte (Sutherland & Rudy, 1989) tout autant qu'à celle de représentations spatiales ou relationnelles. Son intégrité ne serait en revanche pas nécessaire à la réalisation d'une représentation élémentaire basée sur une association simple de type SC-SI.

Pourtant, l'implication de l'HPC dans le conditionnement contextuel fait encore l'objet d'un débat compte tenu de la divergence des effets des lésions hippocampiques sur l'acquisition d'un conditionnement contextuel. En effet, certains auteurs ont avancé l'idée que les effets délétères de la lésion hippocampique sur le conditionnement, objectivés par une diminution de la RCE (i.e. réponse de « freezing »), étaient attribuables à de simples effets locomoteurs (McNish et al., 1997). La lésion n'induirait pas de déficits mnésiques mais simplement une hyperactivité des animaux. Toutefois, l'absence de corrélation entre l'hyperactivité éventuellement observée à la suite de lésion hippocampique et la diminution de RCE au contexte constatée suggère une relative indépendance entre ces deux paramètres comportementaux (Anagnostaras et al., 2001 ; Maren et al., 1997). De plus, le fait que la lésion hippocampique puisse préserver l'acquisition d'un conditionnement à un SC simple et phasique (i.e. un son) suggère que l'hyperactivité éventuellement induite ne peut à elle seule rendre compte du déficit spécifique de RCE au contexte. En effet, des études visant à ne léser que partiellement l'hippocampe (Kim et al., 1992 ; Young et al., 1994 ; Maren et al., 1997) ou

utilisant une approche pharmacologique (Stiedl et al., 2000 ; Bast et al., 2001 ; Gale et al., 2001 ; Zang et al., 2001) n'entraînant pas une telle hyperactivité semblent confirmer l'idée d'un rôle nécessaire de l'hippocampe dans le traitement des informations contextuelles.

Il existe un ensemble important de données montrant que des lésions hippocampiques peuvent altérer un conditionnement au contexte. Par exemple, certaines études montrent que de telles lésions (i) altèrent une RCE aux indices contextuels constituant l'arrière-plan d'une expérience de conditionnement classique (Selden et al., 1991 ; Kim & Fanselow, 1992 ; Phillips & LeDoux, 1992 ; 1994 ; Anagnostaras et al., 1999), (ii) induisent un déficit de discrimination contextuelle basée sur un ensemble d'indices contextuels (Good & Honey, 1991 ; Honey & Good, 1993 ; Desmedt et al., 2003), tandis qu'elle préservent la réalisation de discriminations contextuelles simples.

En particulier, un ensemble d'études menées par l'équipe de Rudy démontre, en utilisant un protocole d'immediate shock deficit (ISD), le rôle critique de l'hippocampe dans le traitement des informations contextuelles et l'élaboration d'une représentation contextuelle (Rudy, 2004). Un protocole d'ISD consiste généralement à délivrer quelques chocs électriques aux pattes de l'animal immédiatement après l'avoir été placé dans un contexte de conditionnement et à le retirer aussitôt après les chocs. Lors d'un test de réexposition au contexte, l'animal n'ayant pas eu le temps de traiter les informations contextuelles au moment de la phase d'ISD, un très faible conditionnement au contexte est alors constaté. En revanche, lorsque l'animal est pré-exposé au contexte avant la procédure d'ISD, l'animal se conditionne au contexte. Dans ce cas, la phase de pré-exposition a permis l'établissement d'une représentation du contexte et cette dernière a été associée au SI lors de la procédure d'ISD (Rudy & O'Reilly, 1999 ; 2001 ; Rudy et al., 2002 ; Rudy, 2004). Dans une étude récente, Matus-Amat et coll. (2004) montrent qu'une inactivation temporaire de l'hippocampe durant pendant la phase de pré-exposition perturbe l'établissement du conditionnement au contexte. Ainsi, cette étude indique que l'hippocampe est bien requis pour le traitement des informations contextuelles et nécessaire à l'élaboration d'une représentation du contexte.

4. Sollicitation différentielle de l'hippocampe selon le type de conditionnement.

Parrallèlement à ces travaux, d'autres études montrent, inversement, que des animaux hippocampiques sont également capables de traiter leur environnement contextuel et présentent même parfois de meilleures performances que des animaux non lésés. Dans ces

épreuves toutefois, le contexte, généralement soit inclus un indice simple particulièrement saillant (Hall et al., 1996), soit est réduit à un environnement très pauvre (Winocur et al., 1987 ; McAlonan et al., 1995 ; Gisquet-Verrier et al., 1999). L'absence de déficit, voire la facilitation du conditionnement au contexte chez les animaux présentant une lésion de l'hippocampe pourrait, en partie, être expliquée si l'on considère que ces animaux sont conditionnés à un élément saillant, simple du contexte (e.g. une odeur, la grille) plutôt qu'à une configuration polymodale de stimuli contextuels. En d'autres termes, les informations contextuelles pourraient être traitées sur la base d'une association simple entre le SI et un SC unimodal (Maren et al., 1998 ; Cho et al., 1999 ; Anagnostaras et al., 2001) ne nécessitant pas l'intégrité de l'hippocampe. L'absence d'effet de la lésion hippocampique sur le conditionnement au contexte ne remettrait alors pas en cause le rôle de cette structure dans la formation d'une représentation configurale mais serait expliquée par l'utilisation d'une stratégie « élémentaire » (pour revue cf. Rudy et al., 2001 ; 2004).

En accord avec cette hypothèse une étude menée au laboratoire a révélé que la lésion de l'hippocampe pouvait avoir des effets opposés sur une discrimination contextuelle selon la procédure de conditionnement utilisée (Desmedt et al., 2003). Plus spécifiquement, cette étude révèle chez les animaux témoins (i.e. non lésés) une discrimination contextuelle plus rapide et plus importante lorsque le CS n'est pas apparié au SI comparée à une situation d'*appariement SC-SI*. Ce premier résultat indique que lorsque le SC ne prédit pas ou peu la survenue du SI et que les indices contextuels sont placés au premier plan, les animaux utilisent ces indices contextuels dont le traitement facilite la discrimination de deux environnements. A l'inverse, lorsque le son prédit la survenue du SI, les animaux « se focalisent » sur l'association simple SC-SI prédominante au détriment des indices contextuels d'arrière plan. Cette relation d'appariement SC-SI induirait un masquage, au moins partiel et temporaire, des indices contextuels conduisant ainsi à un retard de discrimination. De manière intéressante, les auteurs constatent que la lésion hippocampique *retarde* la discrimination contextuelle en situation de *non-appariement SC-SI*. Ce second résultat indique que, lorsque les indices contextuels sont au premier plan, l'hippocampe est requis et contribue directement au traitement de ces informations contextuelles favorisant ainsi la discrimination. Selon les auteurs, le processus mis en jeu dans une telle discrimination implique selon toute vraisemblance la réalisation d'une représentation configurale du contexte qui nécessite l'intégrité de l'hippocampe. Ils constatent, en revanche, que la lésion de l'hippocampe *facilite* la discrimination contextuelle sur la base d'un indice simple et saillant (i.e. le SC) en situation d'*appariement*. Ce résultat indique que lorsqu'un SC simple et phasique est prédictif de

l'occurrence du SI, l'hippocampe contribue à reléguer les indices contextuels au second plan, et, par voie de conséquence, à une « focalisation » des animaux sur l'association simple SC-SI. Cette association simple SC-SI prédominante conduirait à un retard de discrimination.

En résumé, cette étude révèle une sollicitation différentielle de l'hippocampe selon les conditions d'apprentissage. L'hippocampe contribuerait au traitement des indices contextuels et à la formation d'une représentation configurale du contexte au détriment d'une association simple SC-SI en situation de *non-appariement*. En revanche, en condition d'*appariement*, il contribuerait à reléguer au second plan (i.e. phénomène de masquage) ces indices contextuels contribuant ainsi à la formation d'une association simple SC-SI prédominante. Cette implication différentielle de l'hippocampe dans le conditionnement selon la procédure utilisée reste toutefois à préciser. En particulier, l'hypothèse selon laquelle cette structure contribuerait à une association préférentiellement contextuelle ou élémentaire selon la procédure utilisée reste à objectiver.

PARTIE IV

Sollicitation différentielle du système septo-hippocampique selon le type de conditionnement

1. Rappel anatomique.

Le septum ou « complexe septal », est une structure télencéphalique sous-jacente au corps calleux située entre les cornes antérieures des ventricules latéraux. Selon la terminologie de Swanson & Cowan (1979), le complexe septal peut être divisé en trois régions : médiane, latérale et postérieure. Bien que le noyau du lit de la strie terminale (BNST) ait été initialement inclus dans l'aire septale, ce dernier est généralement maintenant considéré comme une partie du complexe « noyau lit-amygdale » (Jacab & Leranthe, 1995).

A- Le complexe septum médian-bande diagonale de Broca.

La division médiane du septum est classiquement divisée en une région dorsale correspondant au noyau septal médian (SM) et une région ventrale correspondant à la bande diagonale de Broca (BDB). Cette bande diagonale de Broca se subdivise elle-même en une partie verticale (dorsale) et une partie horizontale (ventrale). Le septum médian et la bande diagonale de Broca forment un continuum cellulaire nommé complexe septum médian-bande diagonale (SM/BDB). Les neurones du SM/BDB se répartissent en deux grandes populations qui utilisent soit l'acétylcholine soit le GABA comme neurotransmetteur. Les neurones GABA sont préférentiellement localisés dans la zone médiane du SM. Les neurones cholinergiques se situeraient essentiellement dans la zone latérale du complexe SM/BDB.

Le complexe SM/BDB adresse des projections ascendantes dans les régions télencéphaliques, l'hippocampe, le cortex, et descendantes dans le diencephale et le tronc cérébral. Le SM projette via le fornix dans le gyrus denté, les champs CA1, CA2 et CA3 de l'hippocampe ainsi que dans le subiculum et le cortex entorhinal. Ces projections septo-hippocampiques et septo-corticales sont essentiellement cholinergiques mais aussi GABAergiques (Amaral & Kurz, 1985 ; Linke et al., 1994).

Le SM reçoit des projections de la formation hippocampique qui proviennent pour l'essentiel des cellules non pyramidales du stratum oriens des champs CA1-CA3 (Alonso & Köhler, 1982). La majorité de ces fibres serait GABAergiques et projetterait à la fois sur les neurones GABAergiques et cholinergiques du SM (Leranthe & Frotscher, 1989 ; Toth & Freund, 1992 ; Toth et al., 1993). Certaines études montrent que le SM reçoit du tronc cérébral des afférences noradrénergiques, sérotoninergiques et dopaminergiques (Milner & Veznedaroglu, 1993 ; Milner et al., 1995).

B- Le septum latéral.

L'hypothalamus représente la cible majeure des afférences du septum latéral (SL). D'autres régions telles que le BNST, le noyau médian de l'amygdale et la substance grise périacqueducule reçoivent aussi des projections du SL.

La formation hippocampique (CA1-CA3, subiculum et cortex entorhinal) constitue la source majeure des afférences du SL via le fornix (Raisman et al., 1966 ; Swanson & Cowan, 1977 ; 1979). Ces projections sont topographiquement organisées de sorte que la partie dorsale du SL reçoit des fibres issues de l'HPC dorsal et du subiculum alors que le SL ventral reçoit des fibres en provenance du pôle temporal ventral. Ces fibres utiliseraient le glutamate comme neurotransmetteur. Le SL reçoit également des projections peptidergiques qui proviennent essentiellement de l'hypothalamus (enképhalines, somatostatine, CRF) mais aussi de l'aire tegmentale ventrale (neurotensine, CCK) ainsi que d'autres noyaux comme le BNST, le noyau médian de l'amygdale (vasopressine). Le SL reçoit des afférences dopaminergiques de l'hypothalamus, de l'aire tegmentale ventrale, des afférences sérotoninergiques du raphé, et noradrénergiques du Locus Coeruleus (Jakab & Leranthe, 1995).

C- Relations intra-septales.

Les relations intra-septales sont relativement complexes et peu connues. Le SL semble projeter plus massivement sur la BDB que sur le SM. Réciproquement, le complexe SM/BDB présente des projections sur le SL essentiellement en provenance de la BDB (Staiger & Nürnberger, 1991).

Ces quelques données anatomiques conduisent à concevoir le complexe septal comme un carrefour vers lequel convergent les projections de nombreuses régions télencéphaliques limbiques généralement impliquées dans des fonctions « cognitives » et un grand nombre de régions du diencephale et du tronc cérébral plutôt impliquées dans des fonctions autonomes et endocrines. Ainsi, la région médiane du septum constitue un relais pour les voies ascendantes projetant sur les régions télencéphaliques alors que la division latérale constitue un relais pour les voies corticales limbiques descendantes projetant sur des aires diencephaliques.

2. Rôle controversé du septum dans le conditionnement.

Un « syndrome de rage » a été observé à la suite de lésions septales dans de nombreuses études (Brady & Nota, 1953 ; Albert & Chew, 1980). Une interprétation simple

de ce syndrome est que la lésion induit une desinhibition des comportements de peur, induisant des réactions de défense exagérées ou inappropriées à des éléments pourtant non menaçants de l'environnement. Ainsi, la lésion septale induit une augmentation de la réponse de sursaut (« startle », Brady & Nauta, 1953) et augmente la RCE au contexte de conditionnement (Sparks & LeDoux, 1995).

Inversement, d'autres études ont rapporté, après lésion septale, une diminution du niveau d'anxiété (Pesold & Treit, 1990 ; Treit & pesold, 1990 ; Decker et al., 1995; Treit & Menard, 1997; Menard & Treit 1996a; 1996b), une réduction des réponses conditionnées à un SC (Slotnick & Brown, 1970 ; Slotnick & Jarvik, 1966) suggérant ainsi une implication de la région septale dans la genèse d'un état d'anxiété. Ces dernières observations sont en accord avec l'hypothèse de Gray (1982) selon laquelle le septum (en association avec l'HPC) contribuerait à promouvoir un « état d'anxiété » lors de la survenue d'événements imprévus.

Ces effets opposés des lésions septales sur le comportement de peur sont aussi observés dans le conditionnement classique aversif. Ainsi, si des études ont rapporté un déficit de RC à un SC après lésion ou inactivation temporaire de la région septale (Slotnick & Brown, 1970 ; Duncan, 1971 ; Mattingly et al., 1979), une restauration de cette RC a également pu être observée lorsque le SC est présenté de manière répétée. Par ailleurs, alors que la lésion semble augmenter l'amplitude basale d'une réponse de sursaut, elle ne semble pas altérer la potentialisation de cette réponse induite par un SC aversif (Fear potentiated startle, Brady & Nauta, 1953). D'autres études ont également rapporté une absence d'effet de la lésion septale sur la RCE à un SC discret, mais une potentialisation de la RCE au contexte de conditionnement (McAlonan et al., 1995 ; Sparks & LeDoux, 1995 ; Sparks & LeDoux, 2000)

Si l'ensemble de ces données confirme l'implication de la région septale dans l'expression des comportements de peur, les effets extrêmement variables des études lésionnelles ne permettent pas de conclure de manière univoque quant au rôle précis (inhibiteur *vs.* excitateur) de cette région dans ces comportements.

3. Système septo-hippocampique et conditionnement.

Comme nous l'avons mentionné en introduction de ce chapitre, les données anatomiques révèlent des relations étroites entre la région septale et la formation

hippocampique. Sur cette base, Sparks & LeDoux (2000) ont alors émis l'hypothèse selon laquelle le septum aurait un rôle similaire à celui de la formation hippocampique dans les apprentissages associatifs et, en particulier, dans le conditionnement classique aversif. Selon les auteurs, un dysfonctionnement du complexe septal devrait induire des effets comportementaux similaires à ceux induits par un dysfonctionnement de l'hippocampe. A l'appui de cette hypothèse, certaines études ont effectivement montré que la lésion septale, tout comme la lésion hippocampique, pouvait induire un déficit d'inhibition conditionnée et d'inhibition latente (Gray & McNaughton, 1983). D'autres études ont également rapporté une absence d'effets de la lésion septale sur des conditionnements à un SC simple et phasique supposés ne pas requérir l'intégrité de la formation hippocampique. Enfin, en accord avec l'hypothèse posée, les auteurs ont également montré une altération du conditionnement au contexte après lésion septale, conditionnement supposé requérir l'intégrité de la formation hippocampique (Selden et al., 1991 ; Phillips & LeDoux, 1992 ; 1994 ; Anagnostaras et al., 2001).

Toutefois, il est important de noter que l'effet de la lésion observé par certains auteurs (Sparks & LeDoux, 1995 ; McAlonan et al., 1995) n'est pas une diminution de la RCE au contexte, comme celle classiquement observée après lésion de la formation hippocampique, mais au contraire, une augmentation de cette RCE. Ainsi, dans certain cas les effets de la lésion septale semblent mimer ceux de la lésion hippocampique, alors que dans d'autres situations ils semblent être opposés à ceux constatés après lésion hippocampique.

4. Un rôle du septum dans l'évaluation de la valeur informative du SC quant à l'occurrence du SI ?

Les effets différentiels des lésions septales sur l'apprentissage pourraient dépendre de la procédure utilisée. Des études neurophysiologiques menées au laboratoire tendent à conforter cette hypothèse. Ces études avaient préalablement montré que la stimulation électrique des fibres de la fimbria (voie glutamatergique HPC-SL) induit un potentiel de champ caractérisé par deux composantes négatives (N2 et N3) résultant de la dépolarisation des cellules cibles du septum latéral (DeFrance et al., 1973 ; DeFrance et al., 1976). La stimulation à haute fréquence de ces fibres induit une potentialisation à long terme (PLT) de la composante N3 (Garcia & Jaffard, 1992 ; 1993). D'un point de vue fonctionnel, ces auteurs montrent que la ré-exposition au contexte de conditionnement bloque l'induction d'une telle

PLT. De manière intéressante, ils montrent également que l'induction d'une telle PLT dans le SL avant un conditionnement au contexte réduit considérablement la RCE au contexte, tandis qu'une lésion électrolytique des cellules générant la composante N3 induit au contraire une augmentation de la RCE au contexte (Vouimba et al., 1998). De manière concordante, la ré-exposition au contexte de conditionnement induit une diminution de l'excitabilité de la voie HPC-SL à la suite d'un conditionnement au contexte seul (i.e. le choc électrique seul est délivré aux pattes de l'animal, aucun SC n'est délivré ; Vouimba, 1997), ou réalisé selon une procédure de *non appariement SC-SI* (Garcia & Jaffard, 1996).

Plus récemment, Desmedt et coll. (2003) ont montré qu'un conditionnement élémentaire répété (*appariement SC-SI*) induit une augmentation d'excitabilité de la voie HPC-SL alors qu'un conditionnement contextuel (*non appariement SC-SI*) induit une baisse d'excitabilité de cette voie. L'ensemble de ces études indique donc que le sens des variations d'excitabilité de cette voie HPC-SL semble déterminé par le type de conditionnement auquel l'animal est soumis. Elles indiquent que lorsque le SC prédit la survenue du SI, un conditionnement préférentiel au SC discret est associé à un maintien ou une augmentation d'excitabilité HPC-SL. A l'inverse, lorsque ce dernier ne prédit pas la survenue du SI, un conditionnement préférentiel au contexte de conditionnement est associé à une baisse d'excitabilité de la voie HPC-SL.

En accord avec ces données, ces auteurs ont montré que la manipulation indirecte de la transmission glutamatergique HPC-SL altérait l'établissement, selon la valeur informative du SC, d'un conditionnement préférentiel au SC discret ou au contexte. Pour cela, ils se sont basés sur des études préalables montrant que l'injection de vasopressine pouvait altérer les performances d'animaux dans des épreuves d'évitements actifs et surtout que l'injection de vasopressine (AVP) augmentait la transmission glutamatergique HPC-SL et facilitait le maintien d'une PLT dans le SL (Van den Hoof et al., 1989). Ainsi, Desmedt et coll. (1999) montrent qu'en augmentant la transmission HPC-SL par injection dans le septum latéral d'AVP, les animaux pourtant *objectivement soumis à une procédure de non- appariement* (SC non prédictif) se comportent comme si le SC avait été prédictif de l'occurrence du SI. A l'inverse, les auteurs observent que l'injection d'antagonistes vasopressinergiques dans le SL mime un conditionnement préférentiel au contexte chez des animaux pourtant *objectivement soumis à une procédure d'appariement SC-SI*. En d'autres termes, la manipulation pharmacologique de la transmission glutamatergique HPC-SL semble supprimer la capacité des animaux à privilégier de *manière adaptée* (e.g. selon la valeur informative du SC)

l'association SC-SI ou contexte-SI. Cette manipulation semble mimer l'établissement d'un conditionnement préférentiel au SC discret ou au contexte de conditionnement.

OBJECTIFS DES TRAVAUX

**Vers un modèle d'analyse neurobiologique sous-
tendant deux représentations d'une expérience
aversive**

OBJECTIFS DES TRAVAUX

L'ensemble des travaux énoncés ci-dessus indique que les régions amygdaliennes, septales et hippocampiques contribuent à l'établissement d'un conditionnement classique. Plus encore, ces études révèlent une sollicitation différentielle de ces régions selon le type de conditionnement réalisé (i.e. élémentaire ou contextuel). Sur ces bases, un modèle d'analyse, définissant deux modes de fonctionnement d'un circuit cérébral incluant le système septo-hippocampique et le complexe amygdalien dans l'établissement d'un conditionnement élémentaire et contextuel a été proposé (Desmedt et al., 1999 ; 2000) (Figure 7).

Ce modèle postule qu'une diminution d'excitabilité de la voie HPC-SL est requise lors d'un conditionnement contextuel. En revanche, une absence de diminution, voire une augmentation d'excitabilité semble requise lors d'un conditionnement élémentaire. Cette modulation différentielle serait médiée par l'amygdale qui, dans le premier cas, contribuerait à la dépression synaptique ou, au contraire, inhiberait cette dépression dans le second cas (Desmedt et al., 1998). Cette modulation différentielle de l'excitabilité HPC-SL par l'amygdale aurait pour conséquence une modulation de la transmission cholinergique septo-hippocampique. Plus précisément, dans le cas d'un conditionnement élémentaire, un accroissement de la transmission glutamatergique HPC-SL, favorisé par une libération d'AVP intra-septale, induirait, via une transmission GABAergique, une diminution de l'activité des neurones cholinergiques de la région SM/BDB, et donc une diminution de la transmission cholinergique S-HPC. Ce mécanisme conduirait à une réduction de la prise en compte des stimuli contextuels au profit du SC discret dont l'association avec le SI serait alors favorisée.

Par contre, dans le cas d'un conditionnement contextuel, une dépression de la transmission glutamatergique HPC-SL induirait, via un mécanisme inverse au précédent, un accroissement de l'activité cholinergique hippocampique et, par voie de conséquence, conduirait à une amplification de la prise en compte des stimuli contextuels au détriment du SC discret. Il en résulterait une association prédominante contexte-SI.

Les RCE résultant de ces processus seraient respectivement prédominantes au SC discret (i.e. le son) et au contexte.

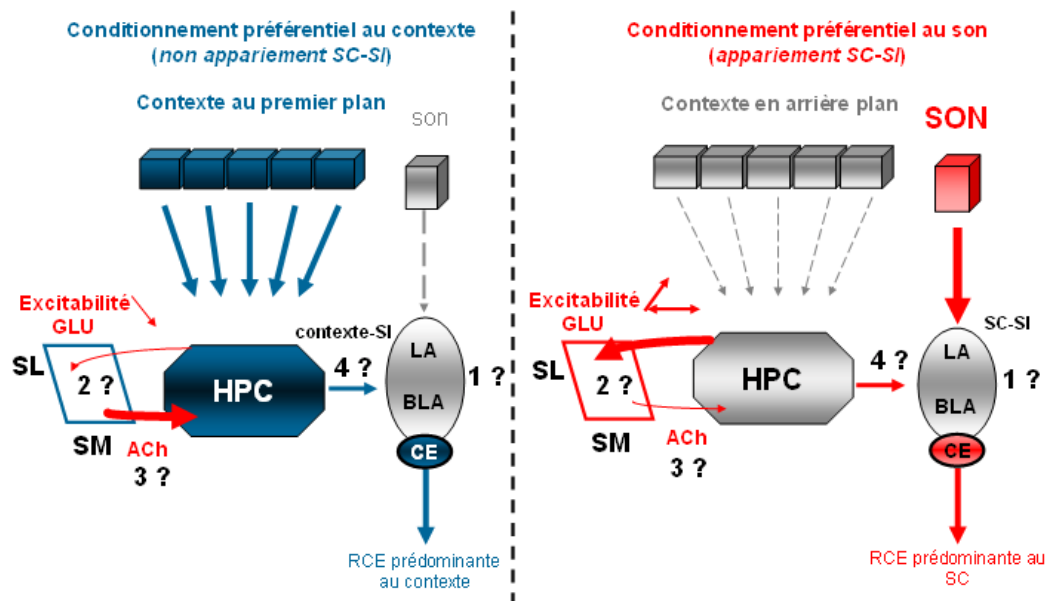


Figure 7: Deux modes de fonctionnement putatifs du circuit incluant le système septo-hippocampique et le complexe amygdalien (cf. texte). ACh : acétylcholine ; CE: noyau central de l'amygdale ; HPC : hippocampe ; SM : septum médian ; SL : septum latéral ; RCE : réponse émotionnelle conditionnée.

- (1) Une contribution relative des noyaux LA et BLA de l'amygdale (CHAPITRE I, article 1) et (2) des sous-régions latérale et médiane du complexe septal (CHAPITRE II, article 2) a été étudiée. (3) Par ailleurs, l'analyse du décours de l'activité cholinergique hippocampique selon la procédure de conditionnement a été réalisée (article 3).
- (4) A ces premiers objectifs s'associait la recherche d'interactions fonctionnelles entre les différentes régions du circuit en fonction du type de conditionnement (CHAPITRE III, articles 3 et 4).

En résumé, les deux types de fonctionnement neurobiologiques proposés et reposant sur une sollicitation différentielle du système septo-hippocampo-amygdalien, participeraient à l'attribution d'une valeur informative (quant à l'occurrence du SI) prédominante au SC discret ou au contexte en fonction du degré de contingence entre le SC et le SI.

Plusieurs points essentiels de ce modèle restaient toutefois à soumettre à une analyse fonctionnelle et font l'objet des travaux présentés dans ce manuscrit (Figure 7).

-Nous devons, dans un premier temps déterminer l'implication relative de différentes régions cérébrales du circuit étudié (hippocampe, région septale et complexe amygdalien) dans ces deux types de conditionnement. En particulier, une contribution relative des noyaux LA et BLA de l'amygdale (CHAPITRE I, article 1) et des sous-régions latérale et médiane du complexe septal (CHAPITRE II, article 2) au conditionnement élémentaire et contextuel a été étudiée. Par ailleurs, l'analyse du décours de l'activité cholinergique hippocampique selon la procédure de conditionnement a été réalisée (article 3).

-A ces premiers objectifs s'associait la recherche d'interactions fonctionnelles entre les différentes régions du circuit en fonction du type de conditionnement (CHAPITRE III, articles 3 et 4). En particulier, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle différentes interactions hippocampo-amygdaliennes contribueraient à la sélection du ou des SC(s) prédictif(s) d'un événement aversif en fonction du type d'apprentissage utilisé.

Afin de simplifier la lecture, l'ensemble des chapitres énoncés ci-dessus sera constitué d'une brève introduction, d'une présentation synthétique des résultats et du manuscrit associé. Les résultats de ces différentes études seront ensuite discutés plus amplement dans la dernière partie de cette thèse.

CHAPITRE I

**Implication différentielle des noyaux latéral et
basolatéral de l'amygdale dans le conditionnement
classique élémentaire et contextuel.**

CHAPITRE I

Implication différentielle des noyaux latéral et basolatéral de l'amygdale dans le conditionnement classique élémentaire et contextuel. (Article 1)

1. Introduction.

Il existe actuellement un large consensus quant au rôle crucial de l'amygdale dans des formes d'apprentissage et de mémoire émotionnellement connotées. En particulier, dans le cadre du conditionnement classique, un nombre important d'études implique cette structure dans l'acquisition et/ou l'expression de RCE à un SC discret ou encore au contexte d'apprentissage (LeDoux et al., 1990; Maren et al., 1996; Cousens & Otto, 1998; Maren, 1999). Ces études ont permis l'élaboration d'un modèle de fonctionnement de l'amygdale dans le conditionnement classique aversif (LeDoux, 2000). Ce modèle postule que le LA est requis de manière cruciale dans l'acquisition d'un conditionnement élémentaire (Romanski & LeDoux, 1992; Li et al., 1996; LeDoux & Muller, 1997). A l'appui de ce modèle, des lésions du LA, mais non du BLA, du noyau basal accessoire ou du noyau médian perturbent le conditionnement élémentaire (Nader et al., 2001).

L'implication de l'amygdale dans le conditionnement contextuel est en revanche moins bien connue. En effet, la majeure partie des études visant à étudier les bases neurales de ce conditionnement se sont, pour l'essentiel, focalisées sur l'implication de l'hippocampe dans la formation d'une représentation intégrée des indices constitutifs du contexte dans

lequel a lieu l'expérience aversive. Cette représentation serait ensuite associée au stimulus inconditionnel au niveau de l'amygdale (Maren et al., 2001). Des données anatomiques (Canteras & Swanson, 1992) et neurophysiologiques (Maren & Fanselow, 1995 ; Yaniv et al., 2001) suggèrent que le BLA serait le site privilégié des afférences hippocampiques et permettrait la formation de l'association contexte-SI. Néanmoins, le rôle des noyaux LA et BLA dans le conditionnement contextuel reste à spécifier.

Afin de définir le rôle de ces noyaux dans le conditionnement classique aversif, nous avons donc réalisé une inactivation temporaire bilatérale du LA ou du BLA immédiatement avant l'acquisition d'un conditionnement « élémentaire » ou « contextuel ». Ainsi, les animaux ont reçu une injection bilatérale de 0,15µl d'une solution de lidocaïne à 2% ou de solution saline. Les animaux ont ensuite été soumis soit à une procédure d'*appariement* SC-SI (i.e. où le SC, un son, est systématiquement suivi du SI, un choc électrique délivré aux pattes de l'animal ; le contexte est placé en « arrière plan »), soit à une procédure de *non appariement* SC-SI (distribution pseudo-aléatoire du SC et du SI ; le contexte est alors placé au « premier plan »). Vingt quatre heures plus tard, les acquisitions du conditionnement au SC discret et au contexte ont été évaluées (i) lors d'un test de ré-exposition au SC simple réalisé dans la cage d'élevage de l'animal, suivi (ii) d'un test de ré-exposition au contexte de conditionnement. Au cours de ces tests, la réponse conditionnée de « freezing » a été mesurée.

2. Résumé des principaux résultats.

Les résultats du test au SC discret (i.e. le son) révèlent que l'inactivation du LA abolit l'acquisition du conditionnement élémentaire. En revanche, celle du BLA n'a aucun effet sur ce type de conditionnement. Ce résultat confirme le rôle crucial du LA dans le conditionnement à un SC simple.

Les résultats du test au contexte révèlent qu'en situation de *non-appariement* (contexte au premier plan) l'inactivation du LA ou du BLA altère l'acquisition du conditionnement contextuel (i.e. baisse de la RCE au contexte). En revanche, en situation d'*appariement* (contexte en arrière plan), l'inactivation amygdalienne a des effets opposés sur le conditionnement au contexte en fonction du noyau ciblé. L'inactivation du LA potentialise la RCE au contexte alors que celle du BLA diminue au contraire cette RCE.

Ces données révèlent une contribution différentielle des noyaux LA et BLA au conditionnement classique aversif selon la procédure de conditionnement utilisée. Elles nous

conduisent à modifier le modèle de fonctionnement amygdalien classiquement proposé. Lorsque le SC prédit la survenue du SI (i.e. appariement SC-SI, le contexte est en arrière plan), le LA est non seulement requis pour la formation de l'association simple SC-SI prédominante, mais inhibe également la formation de l'association contexte-SI (requérant l'intégrité du BLA). En revanche, lorsque le contexte est un meilleur « prédicteur » que le SC discret pour l'occurrence du SI (i.e. non appariement SC-SI), les deux noyaux contribuent de manière équivalente au conditionnement au contexte, alors prépondérant dans cette situation.

A different recruitment of the lateral and basolateral amygdala promotes contextual or elemental conditioned association in Pavlovian fear conditioning

Ludovic Calandreau,¹ Aline Desmedt,^{1,2} Laurence Decorte, and Robert Jaffard

Laboratoire de Neurosciences Cognitives, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 5106, Université de Bordeaux I, 33405 Talence, France

Convergent data suggest dissociated roles for the lateral (LA) and basolateral (BLA) amygdaloid nuclei in fear conditioning, depending on whether a discrete conditioned stimulus (CS)–unconditional stimulus (US) or context–US association is considered. Here, we show that pretraining inactivation of the BLA selectively impaired conditioning to context. In contrast, inactivation of the LA disrupted conditioning to the discrete tone CS, but also either impaired or enhanced contextual conditioning, depending on whether the context was in the foreground or in the background. Hence, these findings refine the current model of the amygdala function in emotional learning by showing that the BLA and the LA not only differentially contribute to elemental and context–US association, but also promote, through their interaction, the most relevant of these two associations.

Consensus has emerged concerning the involvement of the amygdala in mediating appropriate emotional behavior (Bechara et al. 1995; LaBar et al. 1995; LeDoux and Muller 1997; LeDoux 2000). For instance, lesions to the amygdala have been shown to disrupt conditioned fear responses (LeDoux et al. 1990; Maren et al. 1996; Cousens and Otto 1998; Maren 1999) that typically constitute a defense reaction elicited by a discrete conditioned stimulus (CS, e.g., a tone) previously paired with an aversive unconditional stimulus (US, e.g., foot-shock). It is also well established that the amygdala has an indispensable role in contextual fear conditioning, a situation in which conditioned fear responses are elicited by various static contextual stimuli present in the training environment. However, the amygdala is anatomically heterogeneous and the contribution of different amygdaloid nuclei to these different types of fear conditioning remains elusive. In a current theoretical model developed by LeDoux (2000), the basolateral amygdala complex (BLC), defined as the set of lateral (LA), basolateral (BLA), and basomedial (BM) nuclei, is known to play a critical role in both elemental (discrete auditory-cue CS–US association) and contextual fear conditioning. In particular, several lines of investigation have highlighted the crucial role of the LA in elemental fear conditioning. Two circuits, including either the direct projections from the thalamus or the projections from the auditory cortex to the LA are thought to be critical for auditory-cue CS–US associations (Romanski and LeDoux 1992; Li et al. 1996; LeDoux and Muller 1997). Moreover, lesions of the LA, but not of the BLA, accessory basal, or medial nucleus of the amygdala block auditory-cue conditioning (Nader et al. 2001).

In contrast, amygdaloid involvement in contextual conditioning is poorly understood. According to a current view, the hippocampus would be required for forming an integrated representation of the context (Fanselow 2000), which then comes

into association with the US in the amygdala (Maren 2001). This implies that projections from the hippocampal formation (HF) are required for processing context–US associations (Selden et al. 1991; Phillips and LeDoux 1992). The BLC, and the BLA nucleus in particular, constitutes one of the major efferent loci for these projections (Canteras and Swanson 1992; Maren 1996). In this respect, it has been shown that HF–BLC (among which, presumably, HF–BLA) synapses sustained long-term potentiation (LTP) (Maren and Fanselow 1995) in a similar manner as thalamo-LA synapses (Rogan et al. 1997). However, the respective roles of the LA and the BLA in contextual conditioning have not yet been specified.

In order to address this issue, we have compared, in mice, the effects of reversible neural inactivation of either the LA or the BLA on two types of fear conditioning known to result in different contextual processing (i.e., background versus foreground contextual conditioning) (Phillips and LeDoux 1994). Since these two conditioning procedures (i.e., CS–US paired versus CS–US unpaired) are supposed to result in either a predominant discrete CS–US or context–US association (Desmedt et al. 1998, 1999), such an experimental design further enables us to directly assess the relative contribution of these two amygdaloid nuclei to elemental and contextual conditioning.

Results

Histology

An illustration of injection sites and approximate diffusional area of the injectate, which was found to overlap the targeted nucleus (BLA or LA), are shown in Figure 1. Only data from subjects that exhibited correctly placed injection sites were used in the analysis. Among a total of 110 animals, 14 mice exhibited either dislocated cannulae placements relative to the targeted nucleus or injection sites that reached the central nucleus. All of those subjects that exhibited injection sites involving possible drug diffusion to a nucleus other than the one of interest were excluded from the analysis.

¹These two authors contributed equally to this work.

²Corresponding author.

E-mail a.desmedt@inc.u-bordeaux1.fr; fax +33 5 40 00 87 43.

Article published online ahead of print. Article and publication date are at <http://www.learnmem.org/cgi/doi/10.1101/lm.92305>.

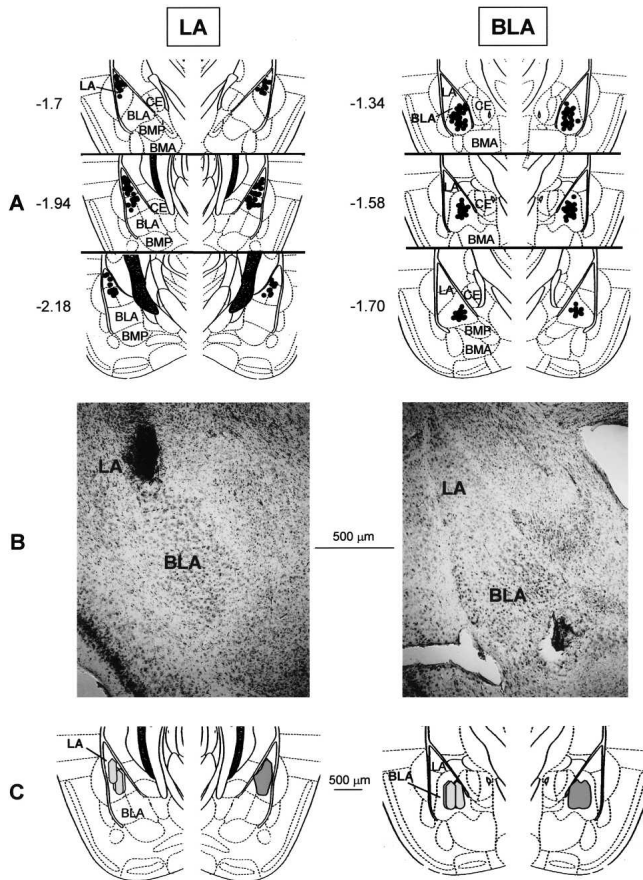


Figure 1. Histological controls. (A) Illustration of the injectors' tip location within the LA (left) and the BLA (right). Numbers indicate relative position of the coronal sections in millimeters posterior to bregma (adapted with permission from Elsevier © 1997, Franklin and Paxinos 1997). (BLA) Basolateral nucleus; (BMA) basomedial nucleus, anterior; (BMP) basomedial nucleus, posterior; (LA) lateral nucleus; (CE) central nucleus. (B) Representative photomicrograph depicting the cannulae placement into the LA (left) and the BLA (right). (C) Schematic drawing of coronal sections of a mouse brain hemisphere (-1.94 [left] and -1.58 [right] posterior to bregma), showing the sphere of diffusion of a 0.15- μ L solution of India ink into the LA (left) or the BLA (right) under the conditions as detailed in Materials and Methods. For each coronal section, the gray area (right part of the section) represents the superimposed sphere of diffusion in a sample of four animals that were either LA- (left) or BLA- (right) infused mice.

Behavioral results

Mice were bilaterally infused with either lidocaine or NaCl (or pseudo-infused) into the BLA or into the LA just prior to training for fear conditioning. During training, they received either paired tone CS-US presentations (i.e., with the conditioning context in the background) or unpaired tone CS-US presentations (i.e., context in the foreground). Twenty-four hours later, all animals were tested for conditioned freezing to the tone CS (auditory-cue test), and 2 h later for conditioned freezing to the conditioning context (context test) (Fig. 2).

Auditory-cue conditioning

Overall conditioned freezing to the tone CS (Fig. 3) was specific both to the paired (versus unpaired) conditioning procedure and to tone presentation (2nd versus 1st block) [block \times conditioning interaction: $F_{(1,84)} = 39.85, P < 0.001$]. As compared with their matched controls (pseudo- and NaCl-infused groups), mice in-

fused with lidocaine into the LA prior to training with the paired procedure were impaired in conditioned freezing to the tone CS (Fig. 3B), whereas those infused into the BLA were not (Fig. 3A) [block \times treatment \times nucleus triple interaction: $F_{(2,45)} = 3.99, P = 0.025$]. Namely, the specific increase in freezing observed between the 1st and 2nd blocks in control mice trained with the paired (versus unpaired) procedure [block \times conditioning interaction: $F_{(1,56)} = 28.73, P < 0.001$] was totally abolished by inactivation of the LA [interaction: $F_{(1,14)} = 1.03, ns$], but fully preserved when inactivation was targeted to the BLA [interaction: $F_{(1,14)} = 12.08, P = 0.003$]. Otherwise, inactivating either the LA or the BLA prior to training with the unpaired procedure did not affect the subsequent amount of freezing recorded during the auditory-cue test (all F values < 1). These results demonstrate that the LA, but not the BLA, is necessary for the acquisition of auditory-cue conditioning.

Contextual conditioning

Control mice (pseudo- and NaCl-infused mice) displayed significantly more conditioned freezing to the context when trained with the unpaired (context in the foreground) than with the paired procedure (context in the background) [effect of conditioning: $F_{(1,56)} = 42.61, P < 0.0001$]. Changes in contextual freezing produced by lidocaine infusions were both dependent on the targeted nucleus (LA versus BLA) and on the conditioning procedure used [conditioning \times treatment \times nucleus triple interaction: $F_{(2,84)} = 4.59, P = 0.012$; see Fig. 4].

General impairment after BLA inactivation

Mice infused with lidocaine into the BLA (Fig. 4A) were impaired in contextual freezing [effect of treatment: $F_{(2,41)} = 14.78, P < 0.001$] irrespective of the conditioning procedure used [conditioning \times treatment interaction: $F_{(2,41)} = 1.79, ns$]. These results demonstrate that the BLA is necessary for both background and foreground contextual conditioning.

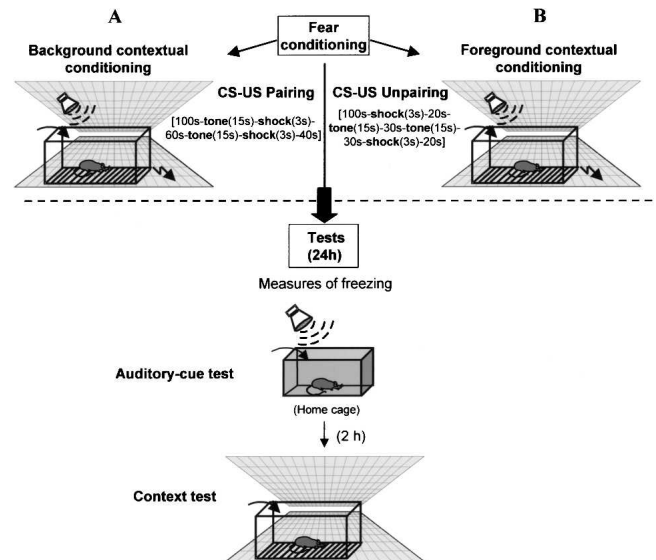


Figure 2. Behavioral procedure. For acquisition of fear conditioning, animals were either submitted to an auditory-cue conditioning, which consists in tone CS-footshock-US pairing (background contextual conditioning) (A), or to a CS-US unpairing (foreground contextual conditioning) (B). Then, animals were replaced in their home cages. Twenty-four hours later, each animal was first submitted to the auditory-cue test while maintained in its home cage, then (2 h later) was re-exposed to the conditioning context for the context test. During each of these tests, the amounts of freezing were assessed by 2-min blocks.

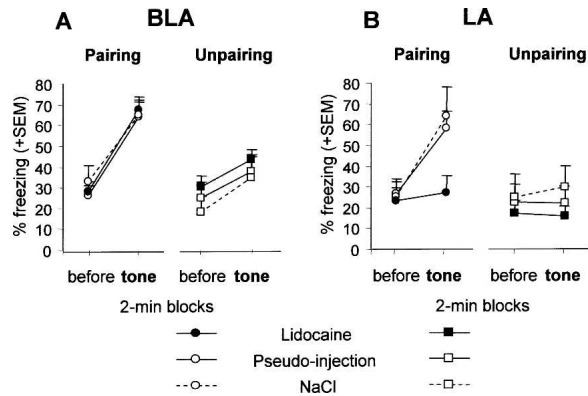


Figure 3. Auditory-cue test. Mean percentage freezing (\pm SEM) on successive 2-min blocks before and during tone presentation in animals that were submitted to lidocaine infusion ($n = 32$), NaCl ($n = 31$), or pseudo-injection ($n = 33$) into the BLA (A) or into the LA (B), before either CS-US pairing or CS-US unpairing.

Contrasted effects of LA inactivation

In mice infused with lidocaine into the LA (Fig. 4B), contextual freezing was either impaired or enhanced, depending on whether animals were trained with the unpaired or with the paired procedure [conditioning \times treatment interaction $F_{(2,43)} = 17.37$, $P < 0.0001$]. Namely, mice infused with lidocaine into the LA and trained with the unpaired procedure displayed a significant impairment of contextual freezing with respect to each control group [pseudo-injections: $F_{(1,14)} = 41.63$, $P < 0.0001$; NaCl infusions: $F_{(1,13)} = 5.46$, $P = 0.036$]. In contrast, the same lidocaine infusion, but in animals trained with the paired procedure resulted in a significant enhancement of freezing with respect to controls [$F_{(1,17)} = 9.45$, $P < 0.01$ and $F_{(1,13)} = 5.99$, $P = 0.029$, respectively]. These results demonstrate that the LA is involved in contextual conditioning, but that the direction of this involvement (i.e., facilitation versus inhibition of conditioned freezing) may change according to the conditioning procedure used.

Hence, in foreground contextual conditioning (unpaired procedure), lidocaine-infused mice displayed an impaired freezing to contextual cues whatever the targeted nucleus [nucleus \times treatment interaction: $F_{(2,39)} = 1.75$, ns], whereas in background contextual conditioning (paired procedure), freezing to the context was either impaired or enhanced, depending on whether the inactivated nucleus was the BLA or the LA, respectively [nucleus \times treatment interaction: $F_{(2,45)} = 9.12$, $P = 0.005$].

Discussion

Numerous experiments have shown that the BLC is critically involved in the acquisition of both cued (elemental) and contextual fear conditioning (Fanselow and Kim 1994; Helmstetter and Belgowan 1994; Muller et al. 1997; Fanselow and LeDoux 1999; Wilensky et al. 1999; Goosens and Maren 2001). However, these studies have not provided any direct evidence for a distinct role of the BLA and the LA nuclei in these two components of conditioned fear behavior. This is probably because most of the amygdalar damage/inactivation extended to the whole BLC, and/or because analysis was restricted to

either cued or contextual conditioning. However, one study showed that lesions restricted to the LA, but not those restricted to the BLA, impaired auditory-cue fear conditioning (Nader et al. 2001). While confirming this functional dissociation, the present study showed that, irrespective of the conditioning procedure used (i.e., tone CS-US paired or unpaired), inactivation of the BLA selectively impaired contextual fear conditioning. Moreover, inactivating the LA was found not only to disrupt auditory-cue conditioning, but also to either impair or enhance contextual conditioning, depending on whether the context was in the foreground (unpaired procedure) or in the background (paired procedure). Thus, in contrast to the BLA, the role of which would be restricted to contextual conditioning, the LA (1) is involved in both types of conditioning (auditory-cued and contextual), and (2) its contribution to contextual conditioning would change depending on the relative predictability of static contextual cues (with respect to the phasic-tone CS) for signaling the occurrence of the US.

From a pharmacological point of view, several observations indicate that the active site of the injected volume of lidocaine was limited either to the LA or the BLA. First, previous technical (Peterson 1998) and functional (Malpeli and Schiller 1979) studies examining the diffusion of microinjected drugs into discrete brain areas, allowed us to estimate that a 0.15- μ L volume administered over 3 min resulted in a sphere of functional inactivation of ~ 200 – $400 \mu\text{m}^3$ in the brain. In our experiment, this implies that the drug spread was mostly limited to the targeted region. Second and more importantly, the observed dissociation of the behavioral effects of the injections depending on the targeted nucleus indicates that there exists only minimal overlap, if indeed there was any overlap at all between the two spheres of drug diffusion.

Role of the BLA

While being totally inefficient in altering auditory-cue fear conditioning, inactivation of the BLA selectively impaired fear conditioning to context. This impairing effect was more pronounced when the context was in the foreground than in the background. However, this difference might well be accounted for by a floor effect (Fig. 4A), due to the overshadowing of contextual cues by the predictive-tone CS (see Marlin 1981). The selective involvement of the BLA in contextual conditioning is congruent with findings from anatomical and electrophysiological studies. Namely, a prominent source of BLA afferents is the hippocampal formation with projections arising from the hippocampal

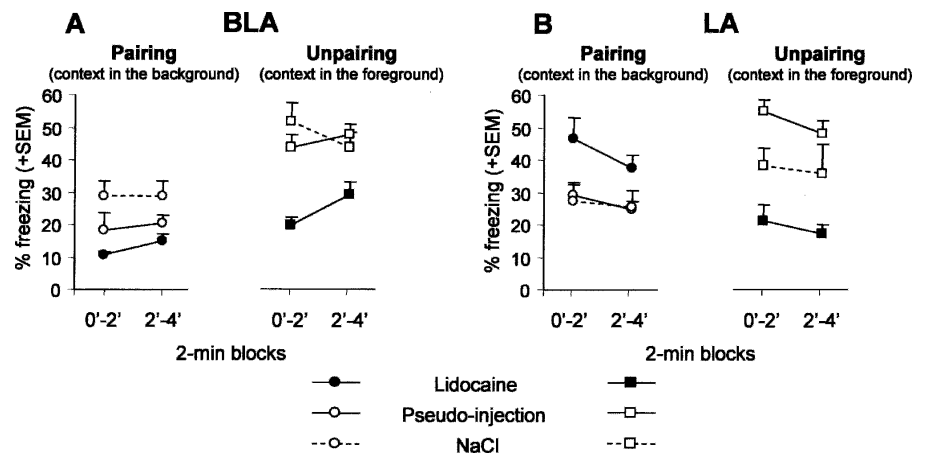


Figure 4. Context test. Mean percentage freezing (\pm SEM) on successive 2-min blocks during re-exposure to the conditioning context in animals that were submitted to lidocaine, NaCl, or pseudo-injection into the BLA (A) or into the LA (B), before either CS-US pairing or CS-US unpairing.

CA1, the ventral subiculum, and the lateral entorhinal cortex, and coursing through the ventral angular bundle (Ottersen 1982; Canteras and Swanson 1992). Such projections are thought to be required for contextual, but not elemental conditioning (e.g., Phillips and LeDoux 1992). In contrast, the pathways through which auditory CS inputs arising from the medial geniculate and temporal neocortical areas reach the amygdala points to the LA as the main, if not exclusive, target (Romanski et al. 1993; Maren 1996; LeDoux and Muller 1997). In addition, it has been shown that electrical stimulation of the ventral perirhinal cortex was able to induce long-term potentiation in the BLA, but not in the LA, whereas electrical stimulation of the medial geniculate nucleus produced just the opposite pattern of effect (Yaniv et al. 2001). Altogether, these findings suggest that, within the BLC, there would be a segregation between synapses involved in the processing of context-US association (i.e., within the BLA) and those involved in the processing of tone CS-US association (i.e., within the LA). Hence, the dissociation presently observed is in agreement with the theoretical model proposed by LeDoux (1993, 2000), which suggests dissociated roles for the LA and the BLA in elemental and contextual fear conditioning, respectively. However, the pattern of effects produced by LA inactivation on both elemental and contextual conditioning points toward a more complex functional scheme.

Role of the LA in contextual conditioning

Although LA-inactivated mice did not exhibit conditioned freezing to the tone CS, these mice still displayed different amounts of conditioned freezing to the context as a function of the training (i.e., CS-US paired versus unpaired) procedure. However, in contrast to controls that exhibited higher levels of foreground than background contextual freezing, LA-inactivated mice displayed an opposite pattern of responding (Fig. 4B). Two important conclusions follow from these observations. First, the LA cannot be the only brain site where tone CS-US contingencies are processed. Indeed, LA-inactivated mice did discriminate between the two training conditions as assessed by their levels of contextual freezing. This finding is in line with previous data showing that despite amygdalar damage, animals still displayed neural activities or conditioned responses dependent on the CS-US contingency (Killcross et al. 1997; Desmedt et al. 1998). Second, the LA is nevertheless necessary for adapting the magnitude of contextual freezing at the appropriate level, that is, in relation to the contingency between the tone CS and the US. Finally, it must be re-emphasized that, in contrast to the BLA, the inactivation of which impaired contextual conditioning in both training conditions, inactivation of the LA either enhanced or impaired such conditioning, depending on whether the context was in the background or in the foreground, respectively. This indicates that, depending on whether the occurrence of the US is (or is not) predicted in a precise (explicit) time-dependent manner by the tone CS, the processing of contextual information is subserved by a differential recruitment of the LA and the BLA.

LA and background contextual conditioning

With the context in the background, inactivation of the LA prior to training resulted in an enhancement of contextual conditioned freezing. The question then arises as to how such facilitation may occur. Multiple-systems theories of brain function generally consider that facilitation of performance in a learning task following brain damage occurs because of the weakening (or suppression) of a process (or a "solution"), which competes with

another one to solve the problem at hand (Jaffard and Meunier 1993; Kim and Baxter 2001). Thus, increased conditioning to background contextual cues would thus occur, because preventing the phasic-tone CS to enter into association with the US within the LA would unmask (facilitate) the BLA-mediated context-US association. Hence, we suggest that in this learning situation (i.e., CS-US paired), the LA would not only process the tone CS-US association, but would also inhibit (or compete with) the processing of context-US association by the BLA.

LA and foreground contextual conditioning

With the context in the foreground, inactivation of the LA produced the same degree of impairment of contextual conditioning as the inactivation of the BLA. This indicates that both nuclei are required for an optimal level of fear conditioning to context, suggesting thereby a synergistic contribution of LA- and BLA-mediated processes to contextual conditioning. The observation that LA inactivation impairs both elemental and foreground contextual conditioning could indicate that the LA contributes to the association based on the more predictive information for the occurrence of the US (i.e., the tone CS in the CS-US paired condition and the context in the unpaired condition, respectively). More parsimoniously, the LA may contribute to contextual conditioning by promoting elemental associations between individual static contextual cues and the US. This is congruent with data suggesting that the context could be processed as individual elements or as a unified representation of environmental cues (Frankland et al. 1998; Gerlai 1998; Cho et al. 1999; Anagnostaras et al. 2001). Thus, the impairing effect of LA inactivation on fear conditioning to both the foreground context and the explicit-tone CS could result from the same basic impairment in forming elemental CS (either phasic or static)-US associations.

Whatever be the case, the contrasted pattern of effects of LA and BLA inactivation on contextual conditioning (i.e., similar impairing effect on foreground versus opposite effect on background contextual conditioning) suggests that decreasing the predictive value of the discrete-tone CS (i.e., from CS-US pairing to CS-US unpairing) changes the way the BLA- and LA-mediated processes interact, that is, from competition (high-predictive value) to synergy (low-predictive value).

In conclusion, selective neural inactivation of either the BLA or the LA has revealed dissociated roles for these amygdaloid nuclei in contextual and elemental fear conditioning. These findings are congruent with anatomical and electrophysiological data suggesting that heaviest projections to LA are thought to convey signals subserving simple/unimodal stimuli and would be gradually replaced by more complex polymodal projections when moving toward BLA (Gloor 1997; Yaniv et al. 2001, 2004). However, the present study further demonstrates that the LA is also involved in contextual conditioning, and that this involvement is dependent on the training procedure (i.e., foreground versus background contextual conditioning). This led us to refine the standard model (LeDoux 1993, 2000) describing LA/BLA recruitment as subserving Pavlovian fear conditioning. We propose that, depending on the predictive value of the discrete-tone CS for the occurrence of the US, LA-mediated processes would either compete (tone CS-US paired) or cooperate (tone CS-US unpaired) with BLA-mediated processes, thereby promoting, in both cases, the most relevant association (tone CS-US or context-US). Although further experiments are needed to unveil the mechanisms subserving such a differential interaction, the present findings highlight the BLA and LA contributions to appropriate emotional responses as a function of the particular learning situation considered.

Materials and Methods

Subjects and surgery

The experiments were conducted on naive adult (4–6 mo) male mice (C57Bl/6 JI Co, IFFA Credo) weighing 27–32 g. They were housed individually 7 d before the experiment and maintained in an animal room (23°C) with a 12-h artificial light/dark cycle and with ad libitum access to food and water.

Mice were anesthetized with avertin (tribromoethanol; 10 mL/kg, i.p.) and secured in a Narishige stereotaxic apparatus. Stainless-steel guide cannulae (26 gauge, 8-mm length) were implanted bilaterally either 1 mm above the BLA (3900 μ m below the skull surface, 1400 μ m posterior to bregma, and 2900 μ m lateral from midline), or 1 mm above the LA (3250 μ m below the skull surface, 2000 μ m posterior to bregma, and 3250 μ m lateral from midline) (Franklin and Paxinos 1997), then fixed in place with dental cement and two jewel screws attached to the skull. Mice were then allowed to recover in their home cages in the animal room for at least 8 d before behavioral experiment.

Intra-cerebral injections

For injection, the dummy stylets that obturated the free end of the guide cannulae were removed, and 32-gauge stainless-steel cannulae (9 mm) attached to 1- μ L Hamilton syringes (PolyLabo) with polyethylene catheter tubing were inserted through the guides. The syringes were fixed in a constant rate infusion pump (Roucaire), and 2% lidocaine (2-diethylamino-N-[2,6-dimethylphenyl]-acetamide hydrochloride, Sigma) was bilaterally infused (0.15 μ L per side) either into the BLA or the LA over a 3-min period, during which the mouse was maintained in its home cage. Infusion flow rates were checked visually. The cannulae were left in place for a further 3 min before removal to allow diffusion of the drug away from the cannulae tip (Desmedt et al. 1999).

The injection volume was chosen on the basis of previous findings reporting that this resulted in selective functional inactivation of 200–400 μ m³ brain regions (Malpeli and Schiller 1979), that is, in our experiment, a drug spread limited to the targeted region. By inducing a peak of inactivation within the targeted brain site lasting from 3 to 10 min, this pre-training infusion was supposed to induce a functional inactivation of either the BLA or the LA that was limited mostly to the acquisition phase of conditioning. Two control groups were submitted to the same procedure, except that animals either received NaCl infusion, or no infusion (pseudo-infusion). The sphere of diffusion of the injection volume was estimated in a set of animals microinjected with 0.15 μ L of India ink either into the LA or the BLA.

Behavioral procedure

Once transferred to the experimental room, mice were submitted either to lidocaine, NaCl infusions, or pseudo-infusions 5 min before acquisition of conditioning. Classical fear conditioning took place in a Plexiglas box (30 \times 24 \times 22 cm high) affording access to the visuo-spatial cues in the experimental room. The floor of this conditioning chamber consisted of stainless steel rods (2 mm diameter), spaced 5 mm apart and connected to a shock generator (Imetronic). The four sides of the chamber and the rods of the floor were cleaned with 90% ethanol before each trial. For acquisition, half of the animals were submitted to two tone CS (63 dB, 1kHz, 15 sec)-footshock US (0.9 mA, 50 Hz, 3 sec) pairings (Fig. 2A). In this training condition, the prevalent association is the elemental CS-US association, which consigns the conditioning context to the background. The other half was submitted to tone-shock unpairing; the only difference with the previous training condition was that the two shocks and the two tones were pseudo-randomly distributed (Fig. 2B). This explicit unpairing of CS and US is known to make the contextual cues the primary stimuli that enter into association with the US (i.e., context in the foreground) (Phillips and LeDoux 1994; Desmedt et al. 1999).

Twenty-four hours later, while mice were drug free, they were tested for freezing behavior (measured second-by-second), used as an index of conditioned fear, and defined as a lack of all movement except for respiratory-related movements (Blanchard and Blanchard 1969). First, mice were submitted to the auditory-cue test; they were maintained in their home cage, and two successive recording sessions of behavioral responses were performed prior to (first 2 min) and during (next 2 min) tone presentation. Two hours later, mice were submitted to the context test; they were re-exposed to the conditioning chamber and two successive 2-min recordings of behavioral responses were performed. Animals were continuously videotaped for off-line scoring of freezing.

Histology

After completion of the behavioral study, animals were given an overdose of sodium thiopental (120 mg/kg) and transcardially perfused with physiological saline, followed by 10% buffered formalin. Brains were post-fixed in formalin-saccharose 30% solution for 1 wk, frozen, cut coronally on a sliding microtome into 60- μ m sections that were mounted on a gelatin-coated slide, and stained with thionine in order to evaluate the cannulae placements.

Data analysis

Freezing was calculated as the percentage (\pm SEM) of the total time spent freezing during every 2-min recording session. Statistical analysis of the data was performed using analysis of variance (ANOVA) (Systat).

Acknowledgments

We thank Dr. A. Marighetto and Dr. T.P. Durkin for linguistic corrections of the manuscript and helpful discussions. This study was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique.

References

- Anagnostaras, S.G., Gale, G.D., and Fanselow, M.S. 2001. Hippocampus and contextual fear conditioning: Recent controversies and advances. *Hippocampus* **11**: 8–17.
- Bechara, A., Tranel, D., Damasio, H., Adolphs, R., Rockland, C., and Damasio, A.R. 1995. Double dissociation of conditioning and declarative knowledge relative to the amygdala and hippocampus in humans. *Science* **269**: 1115–1118.
- Blanchard, R.J. and Blanchard, D.C. 1969. Crouching as an index of fear. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **67**: 370–375.
- Canteras, N.S. and Swanson, L.W. 1992. Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: A PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. *J. Comp. Neurol.* **324**: 180–194.
- Cho, Y.H., Friedman, E., and Silva, A.J. 1999. Ibotenate lesions of the hippocampus impair spatial learning but not contextual fear conditioning in mice. *Behav. Brain. Res.* **98**: 77–87.
- Cousens, G. and Otto, T. 1998. Both pre- and post-training excitotoxic lesions of the basolateral amygdala abolish the expression of olfactory and contextual fear conditioning. *Behav. Neurosci.* **112**: 1092–1103.
- Desmedt, A., Garcia, R., and Jaffard, R. 1998. Differential modulation of changes in hippocampal-septal synaptic excitability by the amygdala as a function of either elemental or contextual fear conditioning in mice. *J. Neurosci.* **18**: 480–487.
- . 1999. Vasopressin in the lateral septum promotes elemental conditioning to the detriment of contextual fear conditioning in mice. *Eur. J. Neurosci.* **11**: 3913–3921.
- Fanselow, M.S. 2000. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behav. Brain Res.* **110**: 473–486.
- Fanselow, M.S. and Kim, J.J. 1994. Acquisition of contextual Pavlovian fear conditioning is blocked by application of an NMDA receptor antagonist D,L-2-amino-5-phosphonovaleric acid to the basolateral amygdala. *Behav. Neurosci.* **108**: 210–212.
- Fanselow, M.S. and LeDoux, J.E. 1999. Why we think Plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. *Neuron* **23**: 229–232.
- Frankland, P.W., Cestari, V., Filipkovi, R.K., McDonald, R.J., and Silva, A.J. 1998. The dorsal hippocampus is essential for context

- discrimination but not for contextual conditioning. *Behav. Neurosci.* **112**: 863–874.
- Franklin, K.B.J. and Paxinos, G. 1997. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, New York.
- Gerlai, R. 1998. Contextual learning and cue association in fear conditioning in mice: A strain comparison and a lesion study. *Behav. Brain. Res.* **95**: 191–203.
- Gloor, P. 1997. *The temporal lobe and limbic system*. Oxford University Press, New York.
- Goossens, 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.
- 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.
- Jaffard, R. and Meunier, M. 1993. Role of the hippocampal formation in learning and memory *Hippocampus* **3**: 203–217.
- Killcross, S., Robbins, T.W., and Everitt, B.J. 1997. Different types of fear-conditioned behaviour mediated by separate nuclei within amygdala. *Nature* **388**: 377–380.
- Kim, J.J. and Baxter, M.G. 2001. Multiple brain-memory systems: The whole does not equal the sum of its parts. *Trends Neurosci.* **24**: 324–330.
- LaBar, K.S., LeDoux, J.E., Spencer, D.D., and Phelps, E.A. 1995. Impaired fear conditioning following unilateral temporal lobectomy in humans. *J. Neurosci.* **15**: 6846–6855.
- LeDoux, J.E. 1993. Emotional memory systems in the brain. *Behav. Brain. Res.* **58**: 69–79.
- . 2000. Emotion circuits in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.* **23**: 155–184.
- LeDoux, J.E. and Muller, J. 1997. Emotional memory and psychopathology. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **352**: 1719–1726.
- LeDoux, J.E., Cicchetti, P., Xagoraris, A., and Romanski, L.M. 1990. The lateral amygdaloid nucleus: Sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *J. Neurosci.* **10**: 1062–1069.
- Li, X., Stutzman, G.E., and LeDoux, J.E. 1996. Convergent but temporally separated inputs to the lateral amygdala neurons from the auditory thalamus and auditory cortex use different postsynaptic receptors: In vivo intracellular and extracellular recordings. *Learn. Mem.* **3**: 229–242.
- Malpeli, J.G. and Schiller, P.H. 1979. A method of reversible inactivation of small regions of brain tissue. *J. Neurosci. Meth.* **1**: 143–151.
- Maren, S. 1996. Synaptic transmission and plasticity in the amygdala, an emerging physiology of fear conditioning circuits. *Mol. Neurobiol.* **13**: 1–22.
- . 1999. Neurotoxic basolateral amygdala lesions impair learning and memory but not the performance of conditional fear in rats. *J. Neurosci.* **19**: 8696–8703.
- . 2001. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**: 897–931.
- Maren, S. and Fanselow, M.S. 1995. Synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by hippocampal formation stimulation in vivo. *J. Neurosci.* **15**: 7548–7564.
- Maren, S., Aharonov, G., and Fanselow, M.S. 1996. Retrograde abolition of conditional fear after excitotoxic lesions in the basolateral amygdala of rats: Absence of temporal gradient. *Behav. Neurosci.* **110**: 718–726.
- Marlin, N.A. 1981. Contextual associations in trace conditioning. *Anim. Learn. Behav.* **9**: 519–523.
- Muller, J., Corodimas, K.P., Fridel, Z., and LeDoux, J.E. 1997. Functional inactivation of the lateral and basal nuclei of the amygdala by muscimol infusion prevents fear conditioning to an explicit conditioned stimulus and to contextual stimuli. *Behav. Neurosci.* **111**: 683–691.
- Nader, K., Majidishad, P., Amorapanth, P., and LeDoux, J.E. 2001. Damage to the lateral and central, but not other, amygdaloid nuclei prevents the acquisition of auditory fear conditioning. *Learn. Mem.* **8**: 156–163.
- Ottersen, O.P. 1982. Connections of the amygdala of the rat. IV: Corticoamygdaloid and intraamygdaloid connections as studied with axonal transport of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* **205**: 30–48.
- Peterson, S.L. 1998. Drug microinjection in discrete brain regions. *Kopf Carrier* **50**: 1–6.
- Phillips, R.G. and LeDoux, J.E. 1992. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav. Neurosci.* **106**: 274–285.
- . 1994. Lesions of the dorsal hippocampal formation interfere with background but not foreground contextual fear conditioning. *Learn. Mem.* **1**: 34–44.
- Rogan, M.T., Stäubli, U.V., and LeDoux, J.E. 1997. Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature* **390**: 604–607.
- Romanski, L.M. and LeDoux, J.E. 1992. Equipotentiality of thalamo-amygdala and thalamo-cortico-amygdala circuits in auditory fear conditioning. *J. Neurosci.* **12**: 4501–4509.
- Romanski, L.M., Clugnet, M.C., Bordi, F., and LeDoux, J.E. 1993. Somatosensory and auditory convergence in the lateral nucleus of the amygdala. *Behav. Neurosci.* **107**: 444–450.
- Selden, N.R.W., Everitt, B.J., Jarrard, L.E., and Robbins, T.W. 1991. Complementary roles for the amygdala and hippocampus in aversive conditioning to explicit and contextual cues. *Neuroscience* **42**: 335–350.
- Wilensky, A.E., Schafe, G.E., and LeDoux, J.E. 1999. Functional inactivation of the amygdala before but not after auditory fear conditioning prevents memory formation. *J. Neurosci.* **19**: RC48: 1–5.
- Yaniv, D., Schafe, G.E., LeDoux, J.E., and Richter-Levin, G. 2001. A gradient of plasticity in the amygdala revealed by cortical and subcortical stimulation, in vivo. *Neuroscience* **106**: 613–620.
- Yaniv, D., Desmedt, A., Jaffard, R., and Richter-Levin, G. 2004. The amygdala and appraisal processes: Stimulus and response complexity as an organizing factor. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **44**: 179–186.

Received February 1, 2005; accepted in revised form May 6, 2005.

CHAPITRE II

Implication différentielle des régions latérale et médiane du complexe septal dans le conditionnement classique élémentaire et contextuel.

CHAPITRE II

Implication différentielle des régions latérale et médiane du complexe septal dans le conditionnement classique élémentaire et contextuel. (Article 2)

1. Introduction.

De nombreuses études lésionnelles ont révélé l'implication du complexe septal dans les comportements de peur et d'anxiété (Gray & McNaughton, 1983). Toutefois, un rôle univoque de cette structure dans ces comportements n'a toujours pas été dégagé. Certains auteurs montrent en effet que la lésion du septum, du fait de ses relations anatomiques étroites avec la formation hippocampique, a des effets similaires à ceux produits par la lésion hippocampique (Gray & McNaughton, 1983). D'autres auteurs rapportent, au contraire, que la lésion septale produit des effets opposés à celle de la lésion hippocampique (Sparks & LeDoux, 2000).

Cette disparité peut, au moins en partie, être expliquée par le caractère hétérogène du complexe septal. Deux sous-régions de ce complexe semblent, en effet, pouvoir être distinguées d'un point de vue anatomique et fonctionnel. Au plan anatomique, le SL reçoit des projections massives de l'hippocampe via les fibres glutamatergiques du système fimbria/fornix. Le SM en revanche, présente lui, d'importantes projections cholinergiques et GABAergiques vers l'hippocampe (Amaral & Kurz, 1985 ; Jakab & Leranth, 1995 ; Swanson

& Risold, 2000). Au plan fonctionnel, bien qu'un rôle précis du SL dans le conditionnement classique n'ait pas encore été défini, un consensus existe néanmoins quant à l'implication de cette sous-région dans l'aptitude de l'animal à traiter les aspects motivationnels d'un renforcement. Le SM semble, lui, être critique pour la régulation des propriétés physiologiques des neurones hippocampiques (King et al., 1998 ; Dragoi et al., 1999 ; Borhegyi et al., 2004). De plus, des études lésionnelles et pharmacologiques ont montré qu'il était requis dans des épreuves dépendantes de l'intégrité de la formation hippocampique.

Toutefois, une analyse directe des rôles respectifs du SL et du SM dans le conditionnement classique aversif n'a toujours pas été réalisée. Dans ce but, une analyse immunohistochimique de la protéine c-Fos a été conduite sur des animaux ayant été soumis à un conditionnement « élémentaire » (i.e. *appariement* SC-SI) ou à un « conditionnement contextuel » (i.e. *non appariement* SC-SI). Cette première expérience visait à examiner une possible sollicitation différentielle de ces deux sous-régions septales selon le type de conditionnement réalisé. Afin de compléter cette première étude corrélative, une seconde expérience visait à déterminer l'implication causale du SL et du SM dans nos deux types de conditionnement classique. Au cours de cette expérience, nous avons réalisé une inactivation temporaire du SL ou du SM immédiatement avant l'acquisition d'un conditionnement élémentaire ou contextuel. Comme dans l'expérience rapportée dans le chapitre précédent, les animaux ayant reçu une injection de lidocaïne ou de solution saline ont ensuite été soumis soit à une procédure d'*appariement* SC-SI (i.e. son-choc ; contexte en « arrière-plan »), soit à une procédure de *non appariement* SC-SI (i.e. contexte au « premier plan »). Le lendemain, les acquisitions du conditionnement au SC discret et au contexte ont été évaluées (i) lors d'un test de ré-exposition au SC simple réalisé dans la cage d'élevage de l'animal, suivi (ii) d'un test de ré-exposition au contexte de conditionnement. Au cours de ces tests, la réponse conditionnée de « freezing » été mesurée.

2. Résumé des principaux résultats.

L'étude immunohistochimique révèle qu'au sein du SL dorsal seuls les animaux soumis à une procédure d'*appariement* SC-SI présentent une expression de la protéine c-Fos significativement supérieure à celle d'animaux naïfs maintenus à l'animalerie. En revanche, au sein du SM, cette analyse révèle que seuls les animaux soumis à la procédure de *non appariement* présentent une expression c-Fos significativement supérieure à celle d'animaux

naïfs. Cette première étude révèle donc une sollicitation différentielle du SL et du SM dans le conditionnement classique en fonction de la procédure utilisée et suggère une relative dissociation fonctionnelle de ces deux sous-régions septales.

La seconde expérience confirme cette dissociation. En effet, l'inactivation du SL abolit le conditionnement au SC simple et phasique (i.e. le son) chez les animaux soumis à une procédure d'*appariement*. Cette même inactivation réduit le conditionnement au contexte chez les animaux soumis à un *non appariement*. En d'autres termes, l'inactivation du SL semble perturber l'établissement du conditionnement au « stimulus » le plus prédictif de l'occurrence du SI (i.e. le son dans le cas d'un *appariement* et le contexte dans le cas d'un *non appariement*). Toutefois, l'inactivation du SL préserve une RCE au contexte accrue après la procédure de *non-appariement* comparée à la procédure d'*appariement* (i.e. le masquage du contexte par le son est préservé).

L'inactivation du SM n'a pas d'effet sur le conditionnement au SC simple et phasique et affecte spécifiquement le conditionnement au contexte : elle potentialise la RCE au contexte chez les animaux soumis à la procédure d'*appariement*, alors qu'elle diminue cette RCE chez les animaux soumis au protocole de *non appariement*. En d'autres termes, l'inactivation du SM abolit la différence d'amplitude de RCE au contexte normalement observée chez les animaux contrôles en fonction de la procédure. Le SM apparaît donc nécessaire au traitement approprié des indices contextuels (i.e. masquage ou non des informations contextuelles par le SC discret) en fonction du degré de prédictibilité du SC quant à l'occurrence du SI.

Dissociated roles for the lateral and medial septum in elemental and contextual fear conditioning

Ludovic Calandreau, Robert Jaffard and Aline Desmedt

CNRS UMR 5106, Laboratoire de Neurosciences Cognitives, Avenue des Facultés, 33405 Talence, France.

Abbreviated title: septum and fear conditioning

Text pages: 17

Figures: 3

Table: 0

Abstract: 248 words; Introduction: 515 words; Discussion: 1552 words.

Correspondence should be addressed to Dr Aline Desmedt, Laboratoire de Neurosciences Cognitives, Avenue des Facultés, 33405 Talence, France. E-mail: a.desmedt@lnc.u-bordeaux1.fr

Acknowledgements: We thank Dr A. Marighetto and Dr T.P. Durkin for linguistic corrections of the manuscript and helpful discussions. This study was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique.

Key words: septum, Pavlovian conditioning, fear, inactivation, mice

Abstract

Extensive evidence indicates that the septum plays a predominant role in fear learning, yet the direction of this control is still a matter of debate. In particular, a long history of lesions and electrophysiological studies suggests that the medial (MS) and lateral septum (LS) would be differentially required in fear conditioning depending on whether a discrete conditional stimulus (CS) predicts, or not, the occurrence of an aversive unconditional stimulus (US). Thus, in order to test this hypothesis, we have compared in mice, the effects of reversible neural inactivation of either the MS or the LS on two types of fear conditioning (tone CS-US pairing vs. unpairing) known to promote either a predominant elemental tone CS-US (context in background) or context-US association (context in foreground). Inactivating the LS totally disrupted tone fear conditioning, which, otherwise, was spared by inactivation of the MS. Inactivating the LS also reduced foreground contextual fear conditioning, although the higher level of conditioned freezing to the foreground context (CS-US unpairing) with respect to the background context (CS-US pairing) was maintained. In contrast, inactivation of the MS totally abolished this training-dependent level of contextual freezing. Hence, the present findings reveal a functional dissociation between the LS and the MS in Pavlovian fear conditioning depending on the predictive value of the discrete CS. While the requirement of the LS is crucial for the appropriate processing of the simple tone CS-US association, the MS is crucial for an appropriate processing of contextual cues as foreground or background information.

Introduction

Extensive evidence has implicated the septum in fear and anxiety. On the one hand, previous studies have shown that damage to the septum could result in anxiolytic-like behavioral effects (Gray and McNaughton, 1983; 2000). In this context, Gray (1982) proposed a model according to which activity of the septal-hippocampal complex reflects a state of “anxiety” produced when there is a mismatch between predicted and actual sensory events. By preventing animals from detecting such a change, lesions or inactivation of the septum would then cause a decrease in fear or anxiety. On the other hand, septal lesions were also found to profoundly increase fear and anxiety-related behaviors (Thomas, 1988) producing the “septal rage syndrome” in many species (Brady and Nauta, 1953). This syndrome would result from a generalized disinhibition of fear leading to exacerbated defensive reactions. Hence, a long history of lesion studies indicates that the septum plays a predominant role in fear learning, yet the direction of this control is still a matter of debate.

The septal complex is anatomically heterogeneous. While the lateral septum (LS) receives a massive glutamatergic fiber input from the hippocampus by the fornix pathway, the medial septum (MS) sends impressive cholinergic and gabaergic projections to the hippocampus (Jakab and Leranth, 1995; Swanson and Risold, 2000).

Functionally, the MS has been shown to be critically involved in regulating some physiological properties of hippocampal neurons, such as theta rhythm, and place-related cells firing (King et al., 1998; Dragoi et al., 1999; Borhegyi et al., 2004). In line with this, lesions and pharmacological studies demonstrated its involvement in both spatial learning tasks and contextual fear conditioning (Rawlins and Olton, 1982; Hagan et al., 1988; Kelsey and Vargas, 1993; Mc Alonan et al., 1995a; 1995b; Kirby and Rawlins, 2003). Regarding the LS, although several studies pointed out its involvement in fear learning, current results are somewhat equivocal as to whether the LS has a positive or negative influence on fear learning, a disparity which may depend on the behavioral test used (Sheehan et al., 2004). In addition, most of these studies have used large lesions that damaged most of the MS and LS. Thus, in order to specify the role of these two septal sub-regions in fear learning, we have (i) mapped, in mice, c-Fos expression in the LS and MS after two types of fear conditioning known to differentially require the hippocampal system (Desmedt et al., 1998; Trifilieff et al., 2006), and then (ii) compared the effects of reversible neural inactivation of either the MS or the LS on the acquisition of these two types of fear conditioning. In the first procedure, a discrete conditional stimulus (CS) is systematically paired with an aversive unconditional

stimulus (US), whereas in the second procedure, the CS and the US are unpaired. Because these two procedures result in either a predominant discrete CS–US (context in background) or context–US association (context in foreground) (Desmedt et al., 1998; 1999; Calandreau et al., 2005), such experimental design enables us to directly assess the relative contribution of both the LS and the MS to elemental and contextual conditioning.

MATERIALS AND METHODS

Subjects and surgery

The experiments were conducted on naive adult (4-6 months) male mice (C57Bl/6 JI Co, IFFA Credo, Arbresle, France) weighing 27 - 32 g. They were housed individually 7 days before the experiment and maintained in an animal room (23°C) with a 12 hr artificial light/dark cycle and with ad libitum access to food and water.

Mice were anaesthetised with avertin (tribromoethanol; 10 ml/kg, ip) and secured in a Narishige stereotaxic apparatus. Stainless-steel guide cannulae (26 gauge, 8 mm length) were implanted bilaterally either 1 mm above the MS (3.6 mm below the skull surface, 0.9 mm anterior to bregma and 0 µm lateral from midline), or 1 mm above the LS (2.1 mm below the skull surface, 0.9 mm anterior to bregma and 0.4 mm lateral from midline) (Franklin and Paxinos, 1997), then fixed in place with dental cement and two jewel screws attached to the skull. Mice were then allowed to recover in their home cages in the animal room for at least 8 days before behavioral experiments.

Intra-cerebral infusions

For infusion, the dummy stylets that obturated the free end of the guide cannulae were removed and 32 gauge stainless-steel cannulae (9 mm), attached to 1-µl Hamilton syringes (PolyLabo, France) with polyethylene catheter tubing, were inserted through the guides. The syringes were fixed in a constant rate infusion pump (Roucaire, France), and 2 % lidocaine (2-diethylamino-N-[2,6-dimethylphenyl]-acetamide hydrochloride, Sigma, St. Louis, MO) was bilaterally infused (0.2 µl per side) into the LS or unilaterally infused (0.2µl) into the MS over a 3-min period during which the mouse was maintained in its home cage. Infusion flow rates were checked visually. The cannulae were left in place for further 3 min before removal to allow diffusion of the drug away from the cannulae tip (Desmedt et al., 1999).

The injection volume was chosen on the basis on previous findings reporting that this resulted in selective functional inactivation of 200-400 µm³ brain regions (Malpelli and Schiller,

1979), that is, in our experiment, a drug spread limited to the targeted region. By inducing a peak of inactivation within the targeted brain site lasting from 3 to 10 min, this pre-training infusion was thought to induce a functional inactivation of either the LS or the MS that was limited mostly to the acquisition phase of conditioning. One control group was submitted to the same procedure except that animals received NaCl infusion.

Behavioral procedure

Once transferred to the experimental room, mice were submitted either to lidocaine or to NaCl infusions 5 min before acquisition of conditioning. Classical fear conditioning took place in a plexiglas box (30 x 24 x 22 cm high) affording access to the visuo-spatial cues in the experimental room. The floor of this conditioning chamber consisted of stainless steel rods (2 mm diameter), spaced 5 mm apart and connected to a shock generator (Imetronic, Talence, France). The four sides of the chamber and the rods of the floor were cleaned with 90 % ethanol before each trial. For acquisition, half of the animals were submitted to two tone CS (63 dB, 1kHz, 15 sec)-footshock US (0.9 mA, 50 Hz, 3 sec) pairings. In this training condition, the prevalent association is the elemental CS-US association, which consigns the conditioning context to the background. The other half was submitted to tone-shock unpairing: the only difference with the previous training condition was that the two shocks and the two tones were pseudo-randomly distributed. This explicit unpairing of CS and US is known to make the contextual cues the primary stimuli that enter into association with the US (i.e., context in the foreground) (Phillips and LeDoux, 1994; Desmedt et al., 1999).

Twenty-four hours later, while mice were drug free, they were tested for freezing behavior (measured second-by-second), used as an index of conditioned fear and defined as a lack of all movement, except for respiratory-related movements (Blanchard and Blanchard, 1969). First, mice were submitted to the auditory cue test. They were maintained in their home cage and two successive recording sessions of behavioral responses were performed, prior to (first 2 min) and during (next 2 min) tone presentation. Two hours later, mice were submitted to the context test. They were re-exposed to the conditioning chamber and two successive 2 min recordings of behavioral responses were performed. Animals were continuously videotaped for off-line scoring of freezing. Freezing was calculated as the percentage (+/- SEM) of the total time spent freezing during every 2-min recording session. All the behavioral procedure has been fully described in previous experiments (Desmedt et al., 1999; Calandreau et al., 2005).

Histology

After completion of the behavioral study, animals were given an overdose of sodium thiopental (120 mg/kg) and transcardially perfused with physiological saline, followed by 10% buffered formalin. Brains were post-fixed in formalin-saccharose 30% solution for 1 week, frozen, cut coronally on a sliding microtome into 60 µm sections that were mounted on a gelatin-coated slide, and stained with thionine in order to evaluate the cannulae placements.

Immunohistochemistry

Twenty three mice were deeply anesthetized using avertin (10 ml/Kg, i.p.) 1.5h after conditioning with either a CS-US pairing (n = 8) or unpairing (n = 8) procedure and perfused intracardially with 100 ml of 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ buffer, pH 7.5, 4°C. Additional mice (NAÏVE, n = 7) were taken directly from their home cage in the animal room and sacrificed for immunohistochemistry analysis. Brains were removed, post-fixed overnight in the same fixative solution as described above and then sectioned using a Vibratome (Leica). Free-floating sections were rinsed in phosphate buffer saline (PBS) and pretreated with 0.3% H₂O₂ in PBS to reduce endogenous peroxidase activity. After four rinses (15 min each), sections were incubated in a blocking solution (2% bovine serum albumin (BSA)/ 2% normal goat serum/ 0.2% Triton X100) for 1 hr at room temperature (RT). Then, they were incubated in primary polyclonal rabbit anti-c-Fos (Oncogene Research Products; 1:20000 dilution) antibodies in the blocking solution overnight at RT. Subsequently, sections were washed with PBS and incubated for 2 hrs at RT with biotinylated goat anti-rabbit IgG (Jackson Immunoresearch; 1:2000 in PBS) followed by 2 hrs at RT in the avidin-biotin peroxidase complex (Vectastain Elite kit, Vector Laboratories). Sections were rinsed in PBS and then PB. The peroxidase reaction end-product was visualized by incubating sections in 0.05 M Tris (pH 7.6) containing 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, 0.037%) as chromogen and hydrogen peroxide (0.015%) for 15 min. Finally, immunolabeled sections were washed in PB, mounted on gelatin-coated slides, dehydrated and coverslipped. A video camera (SONY DXC-950P) attached to a microscope (OLYMPUS BX 50) and connected to an analysis software (Biocom, Visiolab 2000, V4.50) was used for labelled cells quantification. For all brain regions, 6 measurements (three per hemisphere) were made from 3 different sections per animal and averaged. Quantifications were carried out at ×10 magnification. Sections from the LS (dorsal and ventral part) and the MS were between bregma 1 mm and bregma 0.6 mm (Franklin and Paxinos, 1997). The

computer automatically counted all positive targets in the regions of interest excluding noncellular irregularities in the background staining. Results were expressed as number of c-Fos immunopositive cells per mm² for each region. At all stages the experimenter was blind to the experimental groupings.

Data analysis

Statistical analyses were performed using analysis of variance (ANOVA) (Statview, SAS Institute Inc., NC), followed by *post hoc* analyses (Tukey-Kramer) when appropriate.

Results

Histology

A representative guide cannulae placement and infusion sites is shown in figure 1. Only data from subjects that exhibited correctly placed infusion sites were used in the analysis. Among a total of 74 animals, 8 mice were excluded from the analysis due to either dislocated guide cannulae placement relative to the targeted septal sub-region or infusion sites that reached the lateral ventricle.

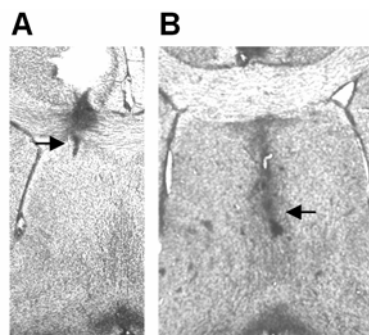


Figure 1. Representative guide cannulae placement and infusion sites (arrows) into the dorsal LS (**A**) and MS (**B**).

Immunohistochemistry

In a preliminary experiment, mice were submitted either to a CS-US pairing or unpairing procedure, then sacrificed for examination of c-Fos within the septum. Because c-Fos is a molecular marker commonly used to delineate learning-dependent circuits, we have mapped the patterns of c-Fos expression in the LS and MS after training in order to point out a differential involvement of these two sub-regions in fear conditioning as a function of the procedure used (i.e. CS-US pairing vs. unpairing).

As shown in figure 2, levels of c-Fos expression were dependent on both the septal sub-region analysed and the conditioning procedure used. A two-way ANOVA with conditioning procedure (CS-US pairing vs. unpairing) and septal sub-region (LS vs. MS) as between-groups factors indicated a significant sub-region by conditioning interaction ($F_{(1,28)} = 4.49$, $P = 0.043$).

First, within the LS (Fig. 2A), c-Fos expression was different among the three groups in both the ventral LS (group effect: $F_{(2,20)} = 29.96$, $P < 0.0001$) and dorsal LS ($F_{(2,20)} = 6.60$, $P = 0.006$). However, *post hoc* analysis revealed that while both conditioning procedures resulted in similar increased c-Fos levels as compared to the naïve condition in the ventral LS (both $P < 0.01$), only the CS-US pairing procedure was found to produce significantly higher c-Fos levels with respect to the naïve condition in the dorsal LS ($P < 0.01$).

Second, in the MS (Fig. 2B), an opposite pattern of c-Fos expression was observed (group effect: $F_{(2,20)} = 10.54$, $P = 0.0007$). Specifically, *post hoc* analysis revealed that only the CS-US unpairing procedure produced significantly higher c-Fos levels with respect to the naïve condition ($P < 0.01$).

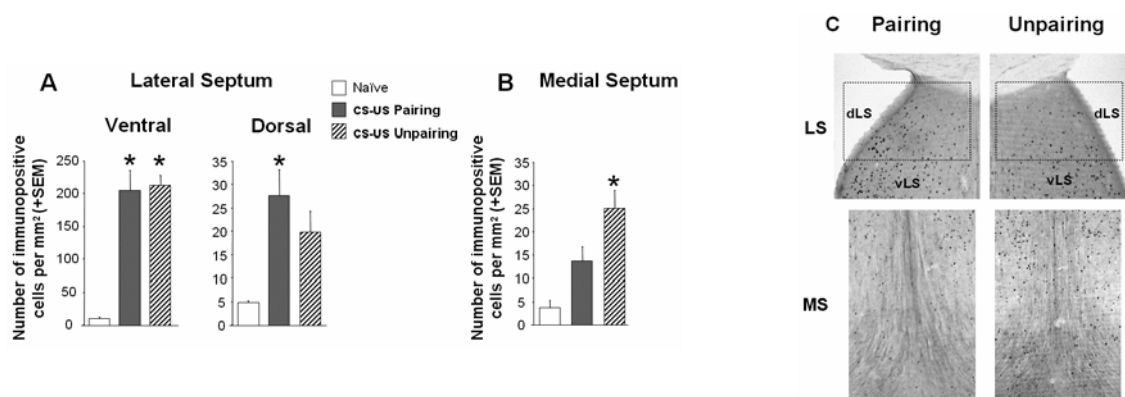


Figure 2. Number of c-Fos immunopositive cells per mm² (mean + s.e.m.) in the ventral LS (A, left), the dorsal LS (A, right) and the MS (B) in mice submitted to either a CS-US pairing (n = 8) or unpairing (n = 8) conditioning procedure and in naïve animals (n = 7).

C, Representative photomicrographs depicting c-Fos expression within the dorsal, ventral LS (up) and MS (bottom) in mice submitted to the CS-US pairing or unpairing procedure. * significantly different from the naïve group: $P < 0.05$.

Auditory-cue conditioning

Effects of LS inactivation

Overall conditioned freezing to the tone CS (2nd vs. 1st block) was specific to the pairing (vs. unpairing) conditioning procedure and treatment (saline vs. lidocaine) (block × conditioning × treatment interaction: $F_{(1,29)} = 13.21$, $P = 0.001$). Although there was an overall significant tendency for lidocaine-infused mice to display decreased levels of freezing as compared to saline-infused mice (effect of treatment: $F_{(1,29)} = 6.43$, $P = 0.016$), one can note that this effect was more marked in the pairing ($F_{(1,15)} = 7.87$, $P = 0.013$) than in the unpairing condition ($F_{(1,14)} = 0.33$, ns). This is mainly because the specific increase in freezing observed between the 1st and 2nd block in saline-infused mice trained with the pairing procedure (block × conditioning interaction: $F_{(1,12)} = 32.02$, $P = 0.0001$) was abolished by inactivation of the LS (block × conditioning: $F_{(1,17)} = 1.24$, ns) (Fig. 3A). These results demonstrate that the LS is required for acquisition of auditory-cue fear conditioning.

Effects of MS inactivation

Lidocaine-infused mice again displayed overall decreased levels of freezing as compared to saline-infused mice (effect of treatment: $F_{(1,29)} = 5.86$, $P = 0.021$). Nevertheless, irrespective of the treatment, conditioned freezing to the tone (2nd vs. 1st block) remained specific to the pairing conditioning procedure (block × conditioning interaction: $F_{(1,29)} = 11.63$, $P = 0.001$). Namely, both saline and lidocaine-infused mice trained with the pairing (vs. unpairing) procedure displayed a specific increase in freezing during tone presentation (block × conditioning interaction in SAL: $F_{(1,15)} = 4.86$, $P = 0.043$; in LIDO: $F_{(1,14)} = 7.72$, $P = 0.014$) (Fig. 3B). These results demonstrate that the MS is not required for the acquisition of auditory-cue conditioning

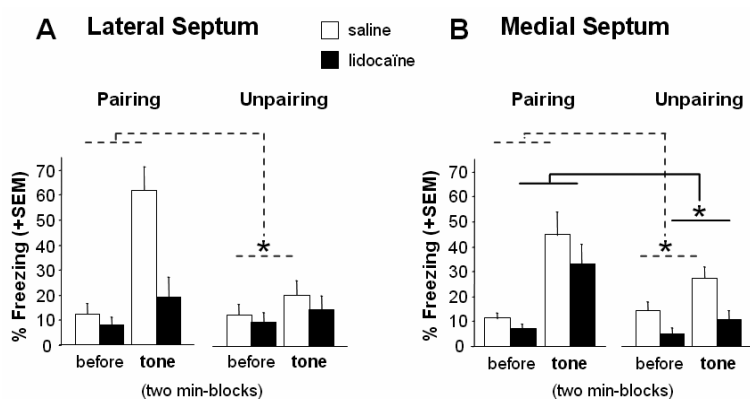


Figure 3. Auditory-cue test. Mean percentage freezing (+ s.e.m) on successive two min blocks before and during tone presentation in animals that received lidocaine (n = 35), or NaCl (n = 31) infusions into the LS (A) or into the MS (B), before acquisition with either a CS-US pairing or unpairing procedure. * statistically significant block x conditioning interaction: $P < 0.05$.

Contextual conditioning

Effects of LS inactivation

Lidocaine infusion into the LS resulted in a significantly diminished conditioned freezing to the context in mice trained with the unpairing procedure (effect of treatment: $F_{(1,14)} = 5.21$, $P = 0.038$) (Fig. 4A). Importantly, however, lidocaine infusion did not abolish the typical effect of conditioning on freezing to the context (conditioning \times treatment: $F_{(1,29)} = 3.98$, ns), as both saline- and lidocaine-infused mice displayed significantly more conditioned freezing to the context when trained with the unpairing (context in the foreground) than with the pairing procedure (context in the background) (effect of conditioning in SAL: $F_{(1,12)} = 54.40$, $P < 0.0001$; in LIDO: $F_{(1,17)} = 10.68$, $P = 0.004$).

Effects of MS inactivation

Lidocaine infusion into the MS resulted in a significantly diminished conditioned freezing to the context in mice trained with the unpairing procedure (effect of treatment: $F_{(1,15)} = 8.83$, $P = 0.009$), while significantly increasing contextual freezing in mice trained with the pairing procedure (effect of treatment: $F_{(1,14)} = 5.51$, $P = 0.034$) (Fig. 4B). As a consequence, the typical training-dependent effect observed in saline-infused mice on contextual freezing was abolished in lidocaine-infused mice (conditioning \times treatment interaction: $F_{(1,29)} = 13.98$, $P = 0.0008$). Specifically, while saline-infused mice displayed more conditioned freezing to the context when trained with the unpairing than with the pairing procedure (effect of conditioning: $F_{(1,15)} = 16.61$, $P = 0.001$), lidocaine-infused mice displayed similar levels of freezing in both training conditions (no conditioning effect: $F_{(1,14)} = 1.95$, ns).

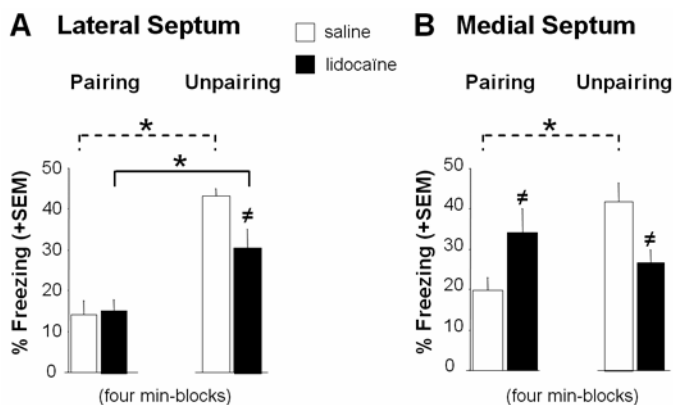


Figure 4. Context test. Mean percentage freezing (+ s.e.m) on four min block during re-exposure to the conditioning context in animals that received lidocaine or NaCl infusions into the LS (A) or into the MS (B), before acquisition with either CS-US pairing or unpairing procedure. * statistically significant conditioning effect (CS-US pairing vs. unpairing: $P < 0.05$; # treatment effect (LIDO vs. NaCl): $P < 0.05$.

Discussion

So far, the septum had been shown to be involved in fear conditioning (Gray and McNaughton, 1983; Sparks and LeDoux, 2000), yet previous studies had not provided direct evidence for distinct role of the LS and MS in elemental and contextual fear conditioning. This is probably because most of septal damage or inactivation extended the whole septum and also because analysis was restricted to either cue or contextual conditioning. The present findings reveal a functional dissociation between the LS and the MS in Pavlovian fear conditioning. Inactivating the LS totally disrupted auditory fear conditioning, which, otherwise, was spared by inactivation of the MS. In addition, while reducing contextual fear conditioning under the unpairing condition, inactivating the LS spared the training-dependent level of contextual freezing (i.e. more freezing to the foreground than to the background context). In contrast, inactivation of the MS specifically abolished this training-dependent effect. Note that the presently observed behavioral dissociation being dependent on the targeted sub-region supposes a minimal, if any, overlap between the two spheres of drug diffusion.

Dissociated roles of the LS and MS in elemental conditioning

The present study provides direct evidence for a different contribution of the LS and MS to the acquisition of auditory-cue conditioning. LS inactivation totally abolished the specific increase in conditioned freezing to the simple tone CS in mice trained with the CS-US pairing procedure. In contrast, MS inactivation, while diminishing levels of freezing during the auditory-cue test, spared the acquisition of auditory-cue conditioning. Although the overall diminished levels of freezing after both MS and LS inactivation is generally consistent with previous findings reporting anxiolytic-like effects of septal lesions (Gray and Mc Naughton, 1983; Pesold and Treit, 1992; Meinard and Treit, 1996), a direct comparison of these effects with the present findings must be taken with caution. In particular, the present decreased levels of freezing were dependent on both the training procedure and the targeted septal sub-region. This indicates a more specific, although different, contribution of the LS and MS in fear conditioning as a function of the cognitive process engaged.

The presently observed disruption and preservation of significant tone fear conditioning after LS and MS inactivation respectively, suggests a functional segregation between lateral and medial septal cells. Using field potentials recordings, we previously reported bidirectional changes in hippocampal-lateral septal synaptic excitability as a function of the predictive

value of the tone CS for the occurrence of the US (Garcia and Jaffard, 1996; Desmedt et al., 1998; Desmedt et al., 2003a). In line with this, cell unit recordings in the LS also revealed bidirectional changes in cell firing rate depending on whether a CS signalled, or not, an aversive US. By comparison, most of medial septal cells are less sensitive to the CS-US contingency (Thomas and Yadin, 1980; Yadin and Thomas, 1981; Thomas et al., 2005), but interestingly, their predominant responses appear to be the reverse of what is observed in the LS (Thomas et al., 1991). In accordance with these studies, the present immunohistochemical data showed an opposite pattern of C-fos expression in the LS and MS depending on whether the discrete tone CS was predictive or not of the footshock US. While a significant increase in c-Fos expression was observed in the LS, but not in the MS, after a CS-US pairing procedure (context in the background), an inverse pattern was observed after a CS-US unpairing procedure (context in the foreground). Congruent with this finding, a previous study using conditioned taste aversion similarly showed an opposite pattern of cAMP-response element-binding protein activation in the LS and MS depending on whether a simple (taste) CS-US or context-US association was acquired (Desmedt et al., 2003b). Altogether, these data support the idea of a crucial requirement of the LS in elemental fear conditioning, and suggest a main contribution of the MS to contextual conditioning.

Dissociated roles of the LS and MS in contextual conditioning

Pre-training inactivation of the LS not only abolished auditory_fear conditioning (pairing condition), but also reduced conditioned freezing to the foreground context (unpairing condition). This dissociation strongly suggests that the LS plays a role in the selection of the most predictive stimulus of the US occurrence depending on the conditioning procedure (tone CS vs. context). Given the pivotal anatomical position of the LS within the limbic system, this training-dependent effect of LS inactivation might reflect alteration in the encoding neural system of reinforcing stimuli. In particular, lesion and electrophysiological studies revealed functional interactions between the LS and the amygdala (Melia et al., 1992; Desmedt et al., 1998; 1999). Since the amygdala has been shown to be differentially required for fear conditioning as a function of the procedure used (Calandreau et al., 2005), it is likely that the LS may also be differentially required for a preferential tone (CS-US pairing) or contextual fear conditioning (CS-US unpairing).

Nevertheless, while decreasing contextual freezing in mice trained with the unpairing procedure, yet inactivation of the LS spared a differential freezing level to the context depending on the CS-US contingency. Indeed, as observed in saline-infused mice, lidocaine-

infused mice exhibited higher freezing levels to the foreground than to the background context. This training-dependent effect can be explained by the overshadowing of the less predictive cues by the most predictive one (Desmedt et al., 1999; Calandreau et al., 2005). For instance, when the tone CS predicts the occurrence of the US in a precise (explicit) time-dependent manner (CS-US pairing), a prevalent simple tone-shock association is formed to the expense of the less predictive contextual cues, which are consigned in the background. By contrast, when the tone does not predict the US occurrence (CS-US unpairing) a prevalent context-US association is formed (i.e. context in the foreground). Interestingly, this training-dependent effect was specifically abolished by MS inactivation, which reduced contextual freezing under the unpairing condition and, conversely, potentiated contextual freezing under the pairing condition.

First, the present impairment in foreground contextual conditioning is in agreement with previous studies showing a deficit in hippocampal-dependent learning following MS lesions (Rawlins and Olton, 1982; Hagan et al., 1988; Kelsey and Vargas, 1993). Because of the strong anatomical and functional interlink between the MS and the hippocampus, MS lesions are expected to produce the same disrupting effect as hippocampal lesions on spatial learning and contextual fear conditioning (Selden et al., 1991; Phillips and LeDoux, 1992; Richmond et al., 1999). It is important to note, however, that Bannerman et coll. (2004) showed that MS lesions had no effect on conditioned contextual freezing. This absence of deficit is reminiscent of the lack of impairment of contextual conditioning observed in some studies after hippocampal lesions (Maren et al., 1997; Frankland et al., 1998; Gerlai, 1998). Evidence strongly suggest that under certain conditioning procedures, which for instance do not use any discrete CS (i.e. shock alone condition), animals could associate the footshock US with a simple salient contextual cue (e.g. footshock grid). Such a procedure actually used in the Bannerman's study (2004), might in fact promote a contextual conditioning based on an elemental associative strategy, which would not require the integrity of the hippocampus (Maren et al., 1997; Frankland et al., 1998; Cho et al., 1999; Holland and Bouton, 1999; Anagnostaras et al., 2001) nor that of the MS. By contrast, the present inactivation study reveals that when contextual cues are in the foreground as compared to the discrete tone CS (CS-US unpairing), the MS is required for contextual fear conditioning.

Second, the potentiation of contextual freezing under the pairing condition born out previous studies showing that septal lesions enhanced contextual fear conditioning when the delivery of shock is signalled (McAlonan et al., 1995b; Sparks and LeDoux, 1995). While in accordance with these data, our present findings reveal that the MS actually contributes to the

appropriate processing level of contextual information as a function of the predictive value of the discrete CS. Indeed, in contrast to the control condition, pre-training inactivation of the MS produced similar levels of contextual freezing after both types of conditioning procedures. In line with this, previous data indicated that the subcortical cholinergic projection to the hippocampus might increase the signal-to-noise ratio by decreasing noise (i.e. background contextual cues) (McAlonan et al., 1995b). Thus, inactivating the MS would prevent animals from appropriately processing the less predictive contextual cues in the background when trained with the pairing procedure. Similarly, this inactivation would also prevent animal from optimally processing contextual cues in the foreground when trained with the unpairing procedure. Hence, these findings reveal that the MS is not only required for processing contextual cues but is mostly required for an adaptive, that is CS-US contingency-dependent, processing level of contextual information.

In conclusion, the present study demonstrates dissociated roles for the LS and MS in elemental and contextual fear conditioning. While the LS is crucially required for the simple tone-shock association, the MS is required for the context-US association. More specifically, these findings show that both septal sub-regions are involved in the processing of the CS-US contingency. Nevertheless, while the LS has a key role in elemental conditioning, the MS specifically subserves the appropriate processing of contextual cues as foreground or background information. Although further experiments are needed to unveil the mechanisms and specific neural circuitry involved in this newly revealed functional dissociation, the present findings highlight the LS and MS contributions to adaptive conditioned emotional responses as a function of the learning situation considered.

REFERENCES

- Anagnostaras SG, Gale GD, Fanselow MS (2001) Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippocampus* 11:8-17.
- Bannerman DM, Matthews P, Deacon RM, Rawlins JN (2004) Medial septal lesions mimic effects of both selective dorsal and ventral hippocampal lesions. *Behav Neurosci* 118:1033-1041.
- Blanchard RJ, Blanchard DC (1969) Crouching as an index of fear. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 67: 370–375.
- Borhegyi Z, Varga V, Szilagyi N, Fabo D, Freund TF (2004) Phase segregation of medial septal GABAergic neurons during hippocampal theta activity. *J Neurosci* 24:8470-8479.
- Brady JV, Nauta WJ (1953) Subcortical mechanisms in emotional behavior: affective changes following septal forebrain lesions in the albino rat. *J Comp Physiol Psychol* 46:339-346.
- Calandreau L, Desmedt A, Decorte L, Jaffard R (2005) A different recruitment of the lateral and basolateral amygdala promotes contextual or elemental conditioned association in Pavlovian fear conditioning. *Learn Mem* 12:383-388.
- Cho YH, Friedman E, Silva AJ (1999) Ibotenate lesions of the hippocampus impair spatial learning but not contextual fear conditioning in mice. *Behav Brain Res.* 98:77-87.
- Degroot A, Treit D (2004) Anxiety is functionally segregated within the septo-hippocampal system. *Brain Res* 1001:60-71.
- Desmedt A, Garcia R, Jaffard R (1998) Differential modulation of changes in hippocampal-septal synaptic excitability by the amygdala as a function of either elemental or contextual fear conditioning in mice. *J Neurosci* 18:480-487.
- Desmedt A, Garcia R, Jaffard R (1999) Vasopressin in the lateral septum promotes elemental conditioning to the detriment of contextual fear conditioning in mice. *Eur J Neurosci* 11:3913-3921.
- Desmedt A, Garcia R, Jaffard R (2003a) An 8-day extensive elemental, but not contextual, fear conditioning potentiates hippocampal-lateral septal synaptic efficacy in mice. *Synapse.* 49:270-278.
- Desmedt A, Hazvi S, Dudai Y (2003b) Differential pattern of cAMP response element-binding protein activation in the rat brain after conditioned aversion as a function of

- the associative process engaged: taste versus context association *J Neurosci.* 23:6102-10.
- Dragoi G, Carpi D, Recce M, Csicsvari J, Buzsaki G (1999) Interactions between hippocampus and medial septum during sharp waves and theta oscillation in the behaving rat. *J Neurosci* 19:6191-6199.
- Frankland PW, Cestari V, Filipkowski RK, McDonald RJ, Silva AJ (1998) The dorsal hippocampus is essential for context discrimination but not for contextual conditioning. *Behav Neurosci.* 112:863-74.
- Franklin, KBJ, Paxinos, G. (1997). *The mouse brain in stereotaxic coordinates.* Academic Press, New York.
- Garcia R, Jaffard R (1996) Changes in synaptic excitability in the lateral septum associated with contextual and auditory fear conditioning in mice *Eur J Neurosci.* 8:809-815.
- Gerlai R (1998) Contextual learning and cue association in fear conditioning in mice: a strain comparison and a lesion study. *Behav Brain Res.* 95:191-203.
- Gray JA (1982) *Neuropsychological theory of anxiety: an investigation of the septal-hippocampal system.* Cambridge: Cambridge University Press.
- Gray JA, McNaughton N (1983) Comparison between the behavioural effects of septal and hippocampal lesions: a review. *Neurosci Biobehav Rev* 7:119-188.
- Gray JA, McNaughton N (2000) *The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Function of the Septo-hippocampal System*, vol XVI, Oxford Univ. Press, Oxford, NY (424 pp.)
- Hagan JJ, Salamone JD, Simpson J, Iversen SD, Morris RG (1988) Place navigation in rats is impaired by lesions of medial septum and diagonal band but not nucleus basalis magnocellularis. *Behav Brain Res* 27:9-20.
- Holland PC, Bouton ME (1999) Hippocampus and context in classical conditioning *Curr Opin Neurobiol.* 9:195-202.
- Jakab RL, Leranth C (1995) Septum. In *The rat nervous system*, G Paxinos (Ed.), Academic Press, Inc, pp 405-442
- Kelsey JE, Vargas H (1993) Medial septal lesions disrupt spatial, but not nonspatial, working memory in rats. *Behav Neurosci* 107:565-574.
- King C, Recce M, O'Keefe J (1998) The rhythmicity of cells of the medial septum/diagonal band of Broca in the awake freely moving rat: relationships with behaviour and hippocampal theta. *Eur J Neurosci* 10:464-477.

- Kirby BP, Rawlins JN (2003) The role of the septo-hippocampal cholinergic projection in T-maze rewarded alternation. *Behav Brain Res* 143:41-48.
- Malpeli JG, Schiller PH (1979) A method of reversible inactivation of small regions of brain tissue. *J Neurosci Methods* 1:143-151.
- Maren S, Aharonov G, Fanselow MS (1997) Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. *Behav Brain Res.* 88:261-74.
- McAlonan GM, Dawson GR, Wilkinson LO, Robbins TW, Everitt BJ (1995a) The effects of AMPA-induced lesions of the medial septum and vertical limb nucleus of the diagonal band of Broca on spatial delayed non-matching to sample and spatial learning in the water maze. *Eur J Neurosci* 7:1034-1049.
- McAlonan GM, Wilkinson LS, Robbins TW, Everitt BJ (1995b) The effects of AMPA-induced lesions of the septo-hippocampal cholinergic projection on aversive conditioning to explicit and contextual cues and spatial learning in the water maze. *Eur J Neurosci* 7:281-92.
- Melia KR, Sananes CB, Davis M (1992) Lesions of the central nucleus of the amygdala block the excitatory effects of septal ablation on the acoustic startle reflex. *Physiol Behav.* 51:175-80.
- Menard J, Treit D (1996) Lateral and medial septal lesions reduce anxiety in the plus-maze and probe-burying tests. *Physiol Behav* 60:845-853.
- Pesold C, Treit D (1992) Excitotoxic lesions of the septum produce anxiolytic effects in the elevated plus-maze and the shock-probe burying tests. *Physiol Behav* 52:37-47.
- Phillips RG, LeDoux JE (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 106:274-285.
- Phillips RG, LeDoux JE (1994) Lesions of the dorsal hippocampal formation interfere with background but not foreground contextual fear conditioning. *Learn Mem* 1:34-44.
- Rawlins JN, Olton DS (1982) The septo-hippocampal system and cognitive mapping. *Behav Brain Res* 5:331-358.
- Richmond MA, Yee BK, Pouzet B, Veenman L, Rawlins JN, Feldon J, Bannerman DM (1999) Dissociating context and space within the hippocampus: effects of complete, dorsal, and ventral excitotoxic hippocampal lesions on conditioned freezing and spatial learning. *Behav Neurosci* 113:1189-1203.
- Selden NR, Everitt BJ, Jarrard LE, Robbins TW (1991) Complementary roles for the amygdala and hippocampus in aversive conditioning to explicit and contextual cues. *Neuroscience* 42:335-350.

- Sheehan TP, Chambers RA, Russell DS (2004) Regulation of affect by the lateral septum: implications for neuropsychiatry. *Brain Res Brain Res Rev* 46:71-117.
- Sparks PD, LeDoux JE (1995) Septal lesions potentiate freezing behavior to contextual but not to phasic conditioned stimuli in rats. *Behav Neurosci* 109:184-188.
- Sparks PD, LeDoux JE (2000) The septal complex as seen through the context of fear. In the *Behavioral Neuroscience of the septal region*, R Numan (Ed.), Springer-Verlag, New York, pp.234-269
- Swanson LW, Risold PY (2000) On the basic architecture of the septal region. In R Numan (Ed.) *The Behavioral Neuroscience of the Septal Region*, Springer-Verlag, New York, pp. 1-14
- Thomas E (1988) Forebrain mechanism in the relief of fear: the role of the lateral septum. *Psychobiology*, 16:36-44
- Thomas E, Yadin E (1980) Multiple-unit activity in the septum during Pavlovian aversive conditioning: evidence for an inhibitory role of the septum. *Exp Neurol* 69:50-60.
- Thomas E, Yadin E, Strickland CE (1991) Septal unit activity during classical conditioning: a regional comparison. *Brain Res* 547:303-308.
- Thomas E, Strickland CE, Yadin E, Burock DA (2005) Effects of chlordiazepoxide on single-unit activity in the septal region of the freely moving rat: aversive vs. non-aversive contexts. *Pharmacol Biochem Behav* 80:151-159.
- Trifilieff P, Herry C, Vanhoutte P, Caboche J, Desmedt A, Riedel G, Mons N, Micheau J (2006) Foreground contextual fear memory consolidation requires two independent phases of hippocampal ERK/CREB activation. *Learn Mem.* 13:349-58.
- Yadin E, Thomas E (1981) Septal correlates of conditioned inhibition and excitation in rats. *J Comp Physiol Psychol* 95:331-340.

CHAPITRE III

**Les interactions hippocampo-amygdaliennes
contribuent à la sélection de l'information
pertinente dans une situation d'apprentissage
émotionnel.**

CHAPITRE III

Les interactions hippocampo-amygdaliennes contribuent à la sélection de l'information pertinente dans une situation d'apprentissage émotionnel. (Articles 3 et 4)

I. Etude 1 : Contrôle de la fonction amygdalienne par le système cholinergique hippocampique dans le conditionnement classique.

1. Introduction.

A la fin de notre introduction, nous présentions un modèle neurobiologique de fonctionnement du système septo-hippocampo-amygdalien sous-tendant deux représentations d'une expérience aversive. Ce modèle postule une implication différentielle de l'hippocampe et en particulier du système cholinergique septo-hippocampique (S-HPC) selon le type de conditionnement. Une activité plus importante de ce système cholinergique devrait être observée en situation de *non-appariement* (comparée à la situation d'*appariement*) contribuant ainsi à une prise en compte plus importante des informations contextuelles dans cette condition d'apprentissage (Desmedt et al., 1999).

Cette variation différentielle supposée de l'activité cholinergique S-HPC repose en grande partie sur des données antérieures obtenues au laboratoire. Ces dernières mettaient en

évidence un accroissement de l'activité cholinergique hippocampique immédiatement après une épreuve de mémoire « spatiale » en labyrinthe radiaire. Toutefois, le décours de cette activité était différent selon le type de processus opératoires spécifiquement sollicités au cours de l'épreuve. Ainsi, une épreuve de « mémoire de référence », impliquant l'acquisition et la rétention d'informations stables, ou « invariantes » (i.e. l'emplacement du renforcement est stable d'un essai à l'autre), induisait un pattern biphasique de la réponse cholinergique hippocampique (mesure de la vitesse de capture sodium dépendante et à haute affinité de la choline, SDHAU, comme indicateur d'activité présynaptique cholinergique dans l'hippocampe). Ce pattern biphasique consistait en une activation suivie d'une désactivation rapide du signal cholinergique. Par ailleurs, une analyse corrélative entre l'activité cholinergique mesurée et les performances des animaux révélait que le désengagement du signal cholinergique était associé à une meilleure rétention de la tâche. En revanche, une épreuve de « mémoire de travail », impliquant la gestion d'informations « variantes » (i.e. la localisation du renforcement change à chaque essai) induisait, elle, un pattern monophasique de la réponse cholinergique (activation durable suivie d'un retour lent et progressif au niveau basal) (Marighetto et al., 1993).

Ces résultats indiquaient alors que le caractère « variant ou invariant » d'une situation d'apprentissage était associé à une sollicitation différentielle du système cholinergique S-HPC. Ils suggéraient qu'un apprentissage impliquant la gestion d'informations variantes ou difficilement prédictibles requerrait l'activation durable de la voie S-HPC tandis que cette dernière serait défavorable à une gestion d'informations invariantes, prédictibles, telles que celles impliquées dans la réalisation d'associations simples de type SC-SI.

Sur la base de ces données, l'acquisition d'un conditionnement contextuel, requérant le traitement d'informations polymodales et caractérisé par une certaine variance quant à la façon dont le contexte peut prédire la survenue du SI, devait nécessiter un accroissement important de la transmission cholinergique S-HPC. En revanche, un conditionnement élémentaire, impliquant la réalisation d'une association simple prédominante et caractérisé par un degré de prédictibilité relativement élevé (le SC simple et phasique prédit systématiquement la survenue du SI), ne devait pas être associé à un tel accroissement de la transmission cholinergique.

Par ailleurs, les auteurs suggéraient que cette activité cholinergique différentielle selon le type d'épreuve pourrait plus largement contribuer à réguler la mise en jeu de différents systèmes neurobiologiques sous-tendant différents systèmes de mémoire (Marighetto et al., 1993). Cette hypothèse a été depuis largement reprise dans les travaux menés par P.E. Gold

(pour revue, Gold, 2004). Des études de microdialyse intra-cérébrale ont en effet révélé une corrélation positive entre le taux extra-cellulaire d'acétylcholine (ACh) hippocampique et le niveau de performance des animaux dans une épreuve d'alternance spontanée requérant l'intégrité de l'hippocampe (McIntyre et al., 2002). À l'inverse, l'activité cholinergique hippocampique est négativement corrélée avec les performances lorsque l'épreuve (i.e. un conditionnement de place) repose plus particulièrement sur l'intégrité de l'amygdale (McIntyre et al., 2003).

Ainsi, ces études suggèrent (i) que le niveau d'activité cholinergique hippocampique reflète non seulement le degré d'implication de la structure dans la tâche mais aussi, plus généralement, (ii) que le système cholinergique coordonnerait la mise en jeu des différents systèmes de mémoire sollicités au cours de l'épreuve.

Afin de tester ces deux hypothèses, nous avons, dans un premier temps, mesuré par microdialyse intra-cérébrale, la libération d'ACh hippocampique dans nos deux épreuves de conditionnement. Dans un second temps, nous avons mené une étude immunohistochimique permettant d'évaluer la phosphorylation de la protéine ERK1/2 (i.e. p-ERK1/2) au sein des régions hippocampiques et amygdaliennes à la suite de nos épreuves de conditionnement. Cette expérience devait nous permettre de révéler une sollicitation différentielle de ces régions selon que les animaux avaient été soumis à une procédure d'*appariement* ou de *non appariement* SC-SI. Notons que le choix de p-ERK1/2 a été basé (i) sur des études montrant un rôle clef de cette kinase au sein des régions amygdaliennes et hippocampiques dans l'établissement d'un conditionnement élémentaire et contextuel (Atkins et al., 1998 ; Schafe et al., 1999 ; Revest et al., 2005 ; Trifilieff et al., 2006), ainsi que (ii) sur des données révélant un lien direct entre l'activité du système cholinergique et l'expression de cette kinase (Berkeley & Levey, 2000 ; Hamilton et al., 2000 ; Rosenblum et al., 2000 ; Berkeley et al., 2001 ; Yokoyama et al., 2003). Enfin, nous avons couplé à nos épreuves comportementales la manipulation pharmacologique de l'activité cholinergique hippocampique (i.e. injection intra-hippocampique de scopolamine ou de physostigmine) et l'analyse immunohistochimique de p-ERK1/2. Cette dernière expérience devait nous permettre de déterminer dans quelle mesure l'activité cholinergique hippocampique contribue effectivement à une sollicitation différentielle des régions hippocampiques et amygdaliennes dans les conditionnements classiques élémentaire et contextuel.

2. Résumé des principaux résultats.

Conformément à notre hypothèse, l'expérience de microdialyse révèle que la concentration extracellulaire d'ACh hippocampique est plus importante en situation de *non-appariement* (i.e. conditionnement préférentiel au contexte) qu'en situation d'*appariement* (i.e. conditionnement préférentiel au SC simple).

L'analyse immunohistochimique de p-ERK1/2 révèle une sollicitation différentielle des régions hippocampiques et amygdaliennes selon le type de conditionnement. En particulier, l'expression de p-ERK1/2 mesurée au sein du CA1 ventral est plus importante en situation de *non-appariement* qu'en situation d'*appariement*. De manière intéressante, elle révèle un pattern d'activation de p-ERK1/2 au sein des noyaux LA et BLA de l'amygdale dépendant du type de conditionnement et cohérent avec notre étude précédente (cf. CHAPITRE 1, article1). En effet, le niveau d'expression de p-ERK1/2 est similaire dans le LA et le BLA en situation de *non-appariement* (i.e. schématisé LA=BLA), et supporte ainsi l'idée d'une contribution similaire de ces deux noyaux à un conditionnement préférentiel au contexte. En revanche, en situation d'*appariement*, l'expression de p-ERK1/2 est plus importante dans le LA que dans le BLA (i.e. schématisé LA>BLA), et supporte donc l'idée d'une inhibition de l'association contexte-SI médiée par le BLA (le contexte étant en arrière plan dans cette situation) par l'association simple SC-SI (dépendante du LA).

Enfin, l'étude pharmacologique révèle que le niveau d'activité cholinergique hippocampique, est causalement relié à l'expression de p-ERK1/2 associée au conditionnement réalisé. En effet, l'injection intra-hippocampique de scopolamine (antagoniste des récepteurs muscariniques bloquant la transmission cholinergique) mime au niveau comportemental, mais également au niveau du patron d'activation ERK1/2 au sein du LA/BLA, l'acquisition d'un conditionnement préférentiel à un SC simple et phasique. En particulier, les animaux ayant reçu l'injection de scopolamine et soumis à une procédure de *non-appariement* se comportent ultérieurement comme s'ils avaient été soumis à une procédure d'*appariement* (i.e. ils expriment une RCE importante au son et une faible RCE au contexte). Ces mêmes animaux présentent un patron d'expression de p-ERK1/2 amygdalien, LA>BLA, comparable à celui normalement observé chez des animaux soumis à une procédure d'*appariement*. En revanche, l'injection intra-hippocampique de physostigmine (anticholinestérasique, favorisant la transmission cholinergique) chez des animaux objectivement soumis à une procédure d'*appariement* SC-SI mime, tant au niveau comportemental qu'au niveau immunohistochimique, l'acquisition d'un conditionnement

préférentiel au contexte. Ainsi, ces résultats indiquent que le niveau d'activité cholinergique hippocampique détermine la mise en jeu d'interactions hippocampo-amygdaliennes spécifiques du type de conditionnement et que ces interactions sous-tendent l'acquisition d'un conditionnement préférentiel à un SC simple ou au contexte.

II. Synthèse de l'étude 2 : Contribution de la voie des MAPK/ERK à la consolidation de deux représentations différentes d'une expérience aversive : entre activité moléculaire et configuration de circuit.

Des travaux préalables menés au laboratoire (Trifilieff, 2006) et visant à spécifier comment des événements moléculaires participent, au plan systémique, à l'élaboration de représentations mnésiques spécifiques ont montré que des activations différentes de la voie des MAPK/ERK au niveau du CA1 sont associées à l'établissement d'un conditionnement préférentiel au contexte ou au SC discret (Trifilieff et al., 2006). En effet, une procédure de *non appariement* est associée à une phase précoce d'activation de ERK1/2 (0-1h) suivie d'une seconde phase plus tardive (9-12h) au sein du CA1, et l'administration intra-hippocampique d'U0126 (inhibiteur de MEK) réalisée 30 min avant l'apprentissage (blocage du premier pic d'activation) ou 7h30 après l'apprentissage (blocage du second pic) altère la consolidation d'un conditionnement préférentiel au contexte. En revanche, une procédure d'*appariement* est associée à une seule phase précoce et transitoire (0-15 min) d'activation de ERK1/2 au sein du CA1, et cette activation est critique pour l'établissement d'un conditionnement préférentiel au SC discret (prédictif du SI aversif dans cette situation).

Sur ces bases, nous avons montré que ces mécanismes de consolidation différentiels en fonction de la procédure de conditionnement classique ne sont pas limités au seul CA1 de l'hippocampe, mais sont également observés au sein des noyaux LA et BLA de l'amygdale. En effet, l'analyse immunohistochimique de p-ERK1/2 révèle qu'une procédure de *non appariement* est aussi associée à un pattern biphasique de p-ERK1/2 au sein des noyaux LA et BLA. En revanche, une seule phase d'activation (au sein du LA) est observée après un *appariement*. De plus, cette étude révèle que l'injection intra-hippocampique d'U0126 réalisée avant une procédure de *non appariement* ne diminue pas seulement l'activation de ERK1/2 au sein de l'hippocampe mais tend également à diminuer celle mesurée au niveau du BLA.

Ainsi, ces données confirment nos résultats précédents (cf. étude 1 ci-dessus) en montrant qu'un *non appariement SC-SI* est associé à des activations comparables de ERK1/2 au sein des noyaux LA et BLA, alors qu'un *appariement* est associé à une activation plus importante dans le LA que dans le BLA. Par ailleurs, en montrant (i) que l'hippocampe et l'amygdale présentent tous deux des activations de ERK1/2 biphasiques ou monophasiques selon le type de conditionnement réalisé et (ii) qu'une injection intra-hippocampique d'U0126 affecte l'activation de ERK1/2 dans l'amygdale et l'établissement d'un conditionnement, ces nouvelles données corroborent l'idée que des interactions hippocampo-amygdaliennes spécifiques contribuent à l'établissement d'un conditionnement préférentiel au contexte ou au SC discret.

Extracellular hippocampal acetylcholine level controls amygdala function and promotes adaptive conditioned emotional response

Ludovic Calandreau¹, Pierre Trifilieff¹, Nicole Mons¹, Laurence Costes^{1,2}, Marc Marien³, Aline Marighetto¹, Jacques Micheau¹, Robert Jaffard¹, and Aline Desmedt¹

¹CNRS UMR 5106, Laboratoire de Neurosciences Cognitives, Avenue des Facultés, 33405 Talence, France.

²INRA UMR 1244, Institut François Magendie, 146 rue Léo Saignat, 33077 Bordeaux cedex, France.

³Centre de Recherche Pierre Fabre, Division de Neurobiologie I, 17 avenue Jean Moulin, 81106 Castres, France.

Abbreviated title: Hippocampal acetylcholine and amygdala function

Text pages: 29 / Figures: 6 / Table: 0

Abstract: 239 words; Introduction: 507 words; Discussion: 1756 words.

Correspondence should be addressed to Dr Aline Desmedt, Laboratoire de Neurosciences Cognitives, Avenue des Facultés, 33405 Talence, France. E-mail: a.desmedt@lnc.u-bordeaux1.fr

Acknowledgements: We are grateful to B.K. Yee for helpful comments on the manuscript. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique. P.Trifilieff was supported by the foundation “Jérôme Lejeune”.

Key words: acetylcholine, amygdala, hippocampus, Pavlovian conditioning, fear, ERK.

Abstract

Ample data indicate that tone and contextual fear conditioning differentially require the amygdala and the hippocampus. However, mechanisms subserving the adaptive selection among environmental stimuli (discrete tone *versus* context) of those that best predict an aversive event are still elusive. Because the hippocampal cholinergic neurotransmission is thought to play a critical role in the coordination between different memory systems leading to the selection of appropriate behavioral strategies, we hypothesized that this cholinergic signal may control the competing acquisition of amygdala-mediated tone and contextual conditioning. Using Pavlovian fear conditioning in mice, we first show a higher level of hippocampal acetylcholine release and a specific pattern of ERK1/2 activation within the lateral (LA) and basolateral (BLA) amygdala under condition in which the context is a better predictor than a discrete tone stimulus. Second, we demonstrate that levels of hippocampal cholinergic neurotransmission are causally related to the patterns of ERK1/2 activation in amygdala nuclei and actually determine the selection among the context or the simple tone the stimulus that best predicts the aversive event. Specifically, decreasing the hippocampal cholinergic signal not only impaired contextual conditioning but also mimicked conditioning to the discrete tone, both in terms of the behavioral outcome and the LA/BLA ERK1/2 activation pattern. Conversely, increasing this cholinergic signal not only disrupted tone conditioning, but also promoted contextual fear conditioning. Hence, these findings highlight that hippocampal cholinergic neurotransmission controls amygdala function, thereby leading to the selection of relevant emotional information.

Introduction

In classical fear conditioning, subjects adaptively select among environmental stimuli those that predict an aversive event (Fendt and Fanselow, 1999; LeDoux, 2000; Yaniv et al., 2004). When a discrete conditioned stimulus (CS, a tone) is systematically paired with the unconditional stimulus (US, a footshock), subjects process this discrete CS as the main predictor and consign the less predictive contextual cues to the background. In contrast, when the CS has no or low predictive value (e.g. CS-US unpairing), contextual cues are selected as valid predictors (Rescorla and Wagner, 1972; Winocur et al., 1987; Desmedt et al., 1998; 1999). While neural bases of tone and contextual fear conditioning have been extensively studied, mechanisms that specifically subserve the balance between a prevalent simple CS and contextual conditioning are still elusive.

We recently demonstrated that, in acquisition, the selection of either the discrete CS or the context as best predictor for the US differentially required the lateral (LA) and basolateral (BLA) nuclei of the amygdala (Calandreau et al., 2005). Nevertheless, the hippocampus is also differentially required for fear conditioning depending on the predictive value of the discrete CS (Marlin, 1981; Phillips and LeDoux, 1994; Desmedt et al., 2003). In addition, clinical studies indicate that having a hippocampal-dependent episodic representation of the predictive value of CSs influences amygdala-based memories (Phelps et al., 2001; Oshner et al., 2002; Schaefer et al., 2002). These data, thus, suggest that the hippocampus could specifically influence the amygdalar function thereby contributing to the selection of the most relevant information. Yet, such hippocampal influence in amygdala-based emotional learning remains largely unknown (Phelps, 2004).

The hippocampal cholinergic neurotransmission is involved in CSs processing (Wilkinson et al., 1995; Baxter et al., 1997; Gale et al., 2001; Wallenstein and Wago, 2001; Rogers and Kesner, 2004) and, importantly, is thought to play a critical role in the coordination between different neural memory systems leading to the selection of appropriate behavioral strategies (Marighetto et al., 1993; Gold, 2003; Parent and Baxter, 2004). We thus hypothesized that the hippocampal cholinergic signal may control the competing acquisition of amygdala-mediated CS- and context-US associations, which underlies adaptive emotional behaviors.

First, with *in vivo* microdialysis, we observed a higher hippocampal acetylcholine (ACh) release when the context is a better predictor of shock US than the simple tone CS. Second, immunohistochemistry of ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase)

phosphorylation, a critical molecular device for fear conditioning (Atkins et al., 1998; Schafe et al., 2000; Shalin et al., 2004; Trifilieff et al., 2006), reveals that distinct patterns of ERK1/2 activation are observed within the LA and the BLA depending on whether the simple CS or the context is the valid predictor. Third, increasing the hippocampal cholinergic signal replaces the use of the simple tone CS by that one of the context as valid predictor, thereby mimicking a predominant contextual conditioning regarding both the behavioral outcome and the LA/BLA ERK1/2 activation pattern. In contrast, decreasing this signal mimics a predominant simple tone CS conditioning. Hence, this study reveals that hippocampal cholinergic neurotransmission controls the balance between amygdala-based contextual and simple CS conditioning.

Materials and Methods

Subjects

The experiments were conducted on naive adult (4-6 month old) male mice (C57Bl/6 JI Co, Charles River Laboratories, France) weighing 27-32 g. They were housed individually 7 days before all experiments and maintained in an animal room (23°C) with a 12 hr light/dark cycle and with *ad libitum* access to food and water. All the experiments were conducted in strict compliance with current European Conventions and institutional regulations.

Surgical procedure

Mice were anaesthetised with ketamine and xylazine (Bayer) (8 ml per kg body weight, injected intraperitoneally) and secured in a Kopf stereotaxic apparatus. For the microdialysis experiment a guide cannulae (CMA/7, CMA Microdialysis AB, Sweden) was implanted just above the HPC (A/P, -2.8 mm; M/L, -2.8 mm; D/V, 1.5 mm; relative to dura and bregma) according to Franklin and Paxinos (1997). For intra-hippocampal infusions, stainless-steel guide cannulae (26-gauge, 8 mm in length) were implanted bilaterally 1 mm above the dorsal HPC (A/P, -2 mm; M/L, 1.3 mm; D/V, 1 mm). In all experiments, guides were permanently fixed to the skull with dental cement and two jewel screws. Guides were obturated by appropriate stylets until behavioral manipulations. Following surgery, mice were allowed to recover for at least 8 days.

Microdialysis procedure

Twenty-four hours before fear conditioning, a microdialysis probe (CMA/7, CMA Microdialysis AB) filled with a Ringer's solution (in mM: NaCl 145; KCl 3; CaCl₂ 1.3; MgCl₂ 1; aqueous phosphate buffer 1.0; pH 7.4) containing 0.5 μM neostigmine bromide (reversible cholinesterase inhibitor; Sigma, St Louis, MO) was inserted into the guide cannulae. On the conditioning day, the dialysis probe was connected to a microlitre syringe pump (CMA/100, CMA Microdialysis AB) and perfused with the Ringer's solution at a flow rate of 1.0 μl/min. After a 3 hours equilibration period, 4 dialysate samples (15 μl) were collected every 15 min for baseline measurement of endogenous ACh levels. During this period, animals were maintained in their home cage. Then, mice were transferred into the conditioning chamber without disconnecting or interrupting the perfusion, and were submitted to either a *pairing* or an *unpairing* tone-shock conditioning procedure (see behavioral procedure). Afterwards, animals were replaced in their home cage. After collection of a total of 16 dialysate samples, mice were disconnected from the perfusion system and returned to the animal room. All collected samples were immediately frozen and stored at -80°C until assay.

ACh assay

ACh content in each dialysate sample was assayed by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection in conjunction with an enzyme reactor. ACh and choline were separated on a reversed-phase column pre-treated with lauryl sulphate. A post column enzymatic reactor containing acetylcholinesterase and choline oxidase (both covalently bonded to glutaraldehyde-activated Lichrosorb NH₂) converted ACh to choline and choline to hydrogen peroxide (H₂O₂). H₂O₂ was detected by an electrochemical detector with a platinum electrode (Coulchem, ESA) set at 350mV vs. Ag/AgCl reference electrode. The mobile phase consisted of 0.1 M aqueous potassium phosphate buffer pH 8.0 containing 2 mM tetramethylammonium hydroxide and disodium ethylenediaminetetraacetic acid 0.2 mM, and was delivered by a pump at a flow rate of 0.7 ml/min (Model 515, Waters). The sensitivity of the system was 10 fmol. Chromatogram acquisition time was 4-5 min.

In order to neutralize possible interindividual variability and optimize the detection of changes due to fine differences between the two behavioral procedures (see below), biochemical data are presented as relative changes (% from baseline) from each animal's average baseline concentration. This baseline is defined as the average of the four values preceding the conditioning. Nevertheless, because this data presentation can influence

interpretation when basal values are somewhat heterogeneous, an analysis has also been conducted on the absolute, rather than the relative, changes from the averaged baseline value using a difference (δ) rather than a percentage.

Intra-hippocampal infusions

For infusions, the stylets normally protruding the guide cannulae were removed. Stainless-steel cannulae (32 gauge, 9 mm) attached to 1- μ l Hamilton syringes (PolyLabo, France) with polyethylene catheter tubing were inserted through the guide cannulae. The syringes were fixed in a constant rate infusion pump. Each mouse was given bilateral infusions (0.2 μ l) of normal saline (0.9%), scopolamine hydrobromide (50 μ g/ μ l, Sigma) or physostigmine (0.1 μ g/ μ l, Sigma) into the dorsal hippocampus. Injections were delivered 15 min prior to the acquisition of fear conditioning (see behavioral procedure). The cannulae were left in place for a further 3 min before removal to allow diffusion of the drug away from the cannulae tip (Desmedt et al., 1999; Calandreau et al., 2005). Scopolamine and physostigmine were dissolved in 0.9% saline solution. The dose of scopolamine has been selected on the basis of previous studies (Gale et al., 2001; Wallenstein and Wago, 2001) reporting specific effects of intra-hippocampal infusions of 20, 50 or 100 μ g/ μ l of scopolamine on different learning tasks. The dose of physostigmine was selected on the basis of a pilot study, using 0.1, 1 or 10 μ g/ μ l of physostigmine, in which the criteria for selection were the absence of drug-induced major changes in the activity level and no obvious side effects.

Dose response analyses

Additional groups of mice were submitted to the same intra-hippocampal infusions procedure but received either saline or 20, 50 or 100 μ g/ μ l of scopolamine infusions (0.2 μ l per side) 15 minutes before the unpairing conditioning procedure (see behavioral procedure). A second cohort of mice was submitted either to saline or to 0.02, 0.1 or 1 μ g/ μ l of physostigmine infusions (0.2 μ l per side) 15 minutes before the pairing conditioning procedure.

Fear conditioning procedures

Classical fear conditioning took place in a Plexiglas chamber (30 x 24 x 22 cm high) given access to the different visual-spatial cues in the experimental room. The floor of this conditioning chamber consisted of stainless steel rods (2 mm diameter), spaced 5 mm apart and connected to a shock generator (Imetronic, Talence, France). The four sides of the chamber and the rods of the floor were cleaned with 70 % ethanol before each trial. For

acquisition, half of the animals was given two explicit *pairings* of the tone CS (63 dB, 1kHz, 15s) and a footshock US (0.7 mA, 50 Hz, 3 sec). Specifically, each animal was placed in the conditioning chamber for 4 min; 100 s after being placed into the chamber, a tone was presented and was immediately followed by a footshock. Sixty seconds later, the same tone-shock pairing was presented. After an additional delay of 40 s, each mouse was removed from the conditioning chamber and replaced in its home cage. In this training condition, the prevalent association is the elemental CS-US association, which consigns the conditioning context to the background. The other half of the subjects was trained under the *unpairing* tone-shock procedure, which differed from the previous training condition with that the two shocks and the two tones were pseudo-randomly distributed. Specifically, 100 s after being placed into the chamber, animals received a footshock, then after a 20 s delay, a tone was presented; finally, after a 30 s delay, the same tone and the same shock spaced out 30 s apart were presented, and each animal was replaced in its home cage after a final delay of 20 s. This explicitly unpaired arrangement of tone and shock is known to enable the contextual cues to be processed as the primary stimuli to enter into association with the US (i.e. context in foreground) (Desmedt et al., 1999; Calandreau et al., 2005).

Twenty-four hours later, while animals were drug free, they were tested for freezing behavior (measured second-by-second), used as an index of conditioned fear and defined as a lack of all movement, except for respiratory-related movements (Blanchard and Blanchard, 1969). First, mice were submitted to the *auditory cue test*: they were maintained in their home cage and three successive recording sessions of behavioral responses were performed: one prior to (first 2 min), one during (next 2 min) and one after (2 last min) tone presentation. Two hours later, mice were submitted to the *context test*: they were re-exposed for 4 min to the conditioning chamber. Animals were continuously videotaped for off-line scoring of freezing.

Assessment of the specificity of the conditioned fear response to the tone CS

Additional groups of mice submitted, as above detailed, to intra-hippocampal saline infusions and to the tone CS-US pairing procedure, were subsequently tested for freezing behavior to the tone CS (auditory cue test: 24 hrs or 48hrs later) and to a discrete neutral new tone (white noise) (48 hrs or 24 hrs later) in a counterbalanced manner. The same behavioral testing procedure was performed in an additional group of scopolamine-infused animals submitted to a CS-US unpairing procedure. The specific increase in conditioned freezing behavior to the tone CS in both the saline-infused paired group and the scopolamine-infused unpaired group

was thus assessed in a discrimination task by measuring the conditioned fear to the tone CS as compared to the fear expressed to the white noise.

In addition, two additional control groups of saline-infused mice were submitted to either a white noise-US pairing or unpairing procedure in order to assess the ability of animals to specifically process this discrete white noise as a predictive CS when it is paired with the footshock US.

Assessment of locomotor activity

In order to assess to what extent drug infusions-dependent changes in freezing behavior could be due to changes in locomotor behavior, the activity of mice was assessed in the first behavioral test, 24h after conditioning while animals were drug free. The number of ambulatory crossovers, which are used as a relevant index of animal activity (Gale et al., 2001), were measured during 1-min period prior tone delivery while mice were placed in the neutral context (home cage used for the auditory cue test). A crossover was defined as the animal's hind paws crossing the midline of the observation chamber.

Histology

After completion of behavioral evaluations, animals were given an overdose of sodium thiopental (120 mg/kg) and transcardially perfused with physiological saline, followed by 10% buffered formalin. Brains were post-fixed in formalin-saccharose 30% solution for 1 week, frozen, cut coronally on a sliding microtome into 60 µm sections that were mounted on gelatin-coated glass slides, and stained with thionine in order to evaluate the cannulae placements.

Immunohistochemistry

Thirty mice were anesthetized 15 minutes after the fear conditioning session by overdose of sodium thiopental (120 mg/kg) and perfused intracardially with 100 ml of 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ buffer, pH 7.5, 4°C. This time point has been chosen on the basis of previous data showing not only ERK activation in the hippocampus 15 min post conditioning, but also a significant difference between the pairing and unpairing conditioning procedures at this time point (Trifilieff et al., 2006). Brains were removed, post-fixed for 12 h in the same fixative solution described above and then sectioned using a Vibratome (Leica). Sections were immediately processed for immunohistochemistry. Specifically, after 4 rinses (15 min each) in Tris-buffered saline (TBS/NaF) (0.1 M Tris and 0.5 M NaCl, 0.5 g/240 ml

NaF, pH 7.5), sections were incubated for 30 min in a TBS/NaF solution containing 0.5% H₂O₂. After additional 4 rinses in TBS/NaF, sections were incubated at 4°C, first, for 1 h in a TBS/NaF-0.2% Triton X-100-3% bovine serum solution (BSA) and, second, for 48 h in the solution containing the primary antibody anti phospho-ERK1/2 (anti-phospho Thr²⁰²-Tyr²⁰⁴, rabbit polyclonal antibody, 1:500 [Cell signaling, Beverly, ME] in TBS/NaF-0.2% Triton X-100-3% BSA). After this incubation phase, sections were rinsed in TBS and incubated for 2 h with the secondary biotinylated antibody (anti-rabbit IgG, 1:2000, [Jackson Immunoresearch] in TBS). They were afterwards rinsed and incubated at room temperature for 2 h in avidin-biotin-complex solution (ABC solution, Vector Laboratories) in TBS. Finally, sections were rinsed in TBS, TB and the peroxidase reaction end product was visualized in 0.05 M TB (pH 7.6) containing diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, 0.025%), 0.03% H₂O₂ and 5% nickel ammonium sulfate for 10 min. Immunolabeled sections were washed in phosphate buffer (PB), mounted onto gelatin-coated glass slides and dehydrated through an alcohol to toluen series prior to examination by light microscopy. A video camera (SONY DXC-950P) attached to a microscope (OLYMPUS BX 50) and connected to an analysis software (Biocom, Visiolab 2000, V4.50) was used for labeled cells quantification. For all brain regions, 6 measurements (three per hemisphere) were made from 3 different sections per animal and averaged. Quantifications were carried out at ×10 magnification. Sections from DG, CA3 and CA1 areas quantified in the dorsal hippocampus were between bregma -2 mm and bregma -2.4 mm. Sections from these areas quantified in the ventral hippocampus were between -2.9 bregma and bregma -3.3 mm (Franklin and Paxinos, 1997). DG granular cell layer, CA1 and CA3 pyramidal layers were targeted. For LA and BLA, sections were between bregma -1.2 mm and bregma -1.6 mm. The computer automatically counted all positive targets in the regions of interest excluding noncellular irregularities in the background staining. Results were expressed as number of pERK1/2-positive cells per mm² for each region. At all stages the experimenter was blind to the experimental groupings.

Data analysis

Statistical analyses were performed using analysis of variance (ANOVA) followed by t-test for pairwise comparisons when appropriate (Statview, SAS Institute Inc., NC).

Results

Histology

Only data from subjects that exhibited correctly placed cannulae or microdialysis probe were used in the analysis. In the microdialysis experiment, one animal was excluded due to an incorrect location of the microdialysis probe into the targeted hippocampus area. In the immunohistochemical study, labelled cells within the dorsal regions from DG, CA3 and CA1 areas could not be quantified in one animal due to tissue damage.

Hippocampal ACh release depends on the conditioning procedure

In order to show the differential recruitment of the hippocampal cholinergic system in fear conditioning as a function of the informative value of the CS, we compared the time-course of the ACh release in the hippocampus between two conditioning procedures (i.e. CS-US pairing and CS-US unpairing) using *in vivo* microdialysis.

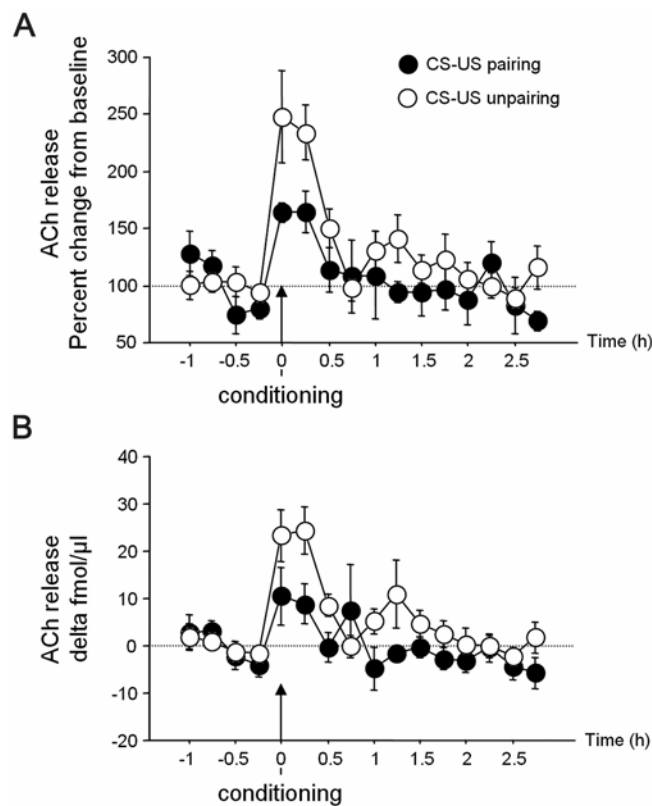


Figure 1. Time-course of ACh release in the hippocampus in animals submitted to either a CS-US pairing ($n = 5$) or CS-US unpairing procedure ($n = 6$).

A, Extracellular ACh changes as expressed in percent from baseline levels (mean \pm s.e.m.).

B, Extracellular ACh changes as expressed in absolute, rather than relative, changes from the averaged baseline value and presented using a difference (delta fmol/ μ l \pm s.e.m.).

Basal extracellular levels of ACh (raw values) measured prior to acquisition (first 4 samples) were similar between the two groups [pairing: 14.2 +/- 6.3; unpairing: 19.2 +/- 3.8; fmol/ μ l; $F_{(1,9)} = 0.499$, $p > 0.05$) and did not vary significantly across time ($F_{(3,27)} = 1.76$, $p > 0.05$). The statistical analysis conducted on percentage from baseline revealed that conditioning induced an increase in ACh release ($F_{(6,54)} = 14.81$, $p < 0.0001$) that lasted for about 30 min post-conditioning (Fig. 1A). This increase was significantly higher in the unpaired group than in the paired group (time x conditioning: $F_{(6,54)} = 2.51$, $p = 0.032$). Specifically, during the first 30 min post-conditioning, ACh levels were higher in the unpairing as compared to the pairing condition ($F_{(1,9)} = 5.78$, $p = 0.039$). The same analysis conducted on absolute, rather than relative, values (Fig. 1B) also confirmed this conditioning effect ($F_{(1,9)} = 8.48$, $p = 0.017$).

Hippocampal ACh and simple tone fear conditioning

The previous experiment indicates that conditioning induces less ACh release in the hippocampus when the tone CS is fully predictive of the occurrence of the US (pairing procedure) than when it is non predictive (unpairing procedure). The following experiment was aimed at determining whether the level of hippocampal cholinergic neurotransmission is causally linked with the magnitude of conditioning to the tone CS. For this purpose, the effects of pharmacological-induced decrease or increase in this cholinergic neurotransmission on fear conditioning to the discrete tone were assessed. Infusions into the dorsal hippocampus of muscarinic antagonist scopolamine or acetylcholinesterase inhibitor physostigmine were performed 15 minutes prior to training with either the CS-US pairing or unpairing procedure. Effects of these intra-hippocampal infusions were assessed on conditioned freezing to the tone measured 24 hours later. As expected, saline-infused mice displayed much more freezing specific to tone presentation when trained with the pairing than with the unpairing procedure ($F_{(1,19)} = 34.91$, $p < 0.0001$) (Fig. 2A). This training-dependent effect was abolished in the scopolamine (conditioning x treatment: $F_{(1,36)} = 8.50$, $p = 0.006$; no conditioning effect in SCOP: $F_{(1,17)} = 0.32$, $p > 0.05$) and physostigmine-infused groups (conditioning x treatment: $F_{(1,36)} = 5.80$, $p = 0.021$; no conditioning effect in PHY: $F_{(1,17)} = 0.60$, $p > 0.05$). Specifically, despite being trained with the pairing procedure, physostigmine-infused mice displayed no conditioning to the tone (PHY vs. SAL: $F_{(1,18)} = 18.96$, $p = 0.0004$). In contrast, scopolamine-infused mice displayed significant conditioning to the tone even when trained without any explicit tone CS-US pairing (SCOP vs. SAL: $F_{(1,17)} = 15.91$, $p = 0.0009$).

Hippocampal ACh and contextual fear conditioning

The previous results show that blocking and increasing the hippocampal cholinergic neurotransmission promotes and disrupts conditioned freezing to the tone CS, following conditioning in the unpairing and pairing procedures, respectively. Previous studies indicated that the prevalent tone CS-US association is replaced by a prevalent context-US association when diminishing the informative value of the CS (from CS-US pairing to unpairing procedure) (Rescorla and Wagner, 1972; Winocur et al., 1987; Desmedt et al., 1998; 1999; Calandreau et al., 2005). We thus next examined on the same animals whether, compared to tone fear conditioning, such cholinergic manipulation could result in opposite changes on contextual conditioning. As expected, saline-infused mice trained under the unpairing procedure (context in the foreground) displayed significantly more conditioned freezing to the context than saline-infused mice trained with the pairing procedure (context in the background) ($F_{(1,19)} = 64.41, p < 0.0001$) (Fig. 2B). This training-induced difference in contextual freezing was abolished in both the scopolamine (conditioning x treatment: $F_{(1,36)} = 56.76, p < 0.0001$; no conditioning effect in SCOP: $F_{(1,17)} = 1.96, p > 0.05$) and physostigmine-infused groups (conditioning x treatment: $F_{(1,36)} = 17.11, p = 0.0002$; no conditioning effect in PHY: $F_{(1,17)} = 0.50, p > 0.05$). Specifically, irrespective of the training condition, scopolamine-infused mice overall displayed significantly lower levels of conditioned freezing to the context than saline-infused mice ($F_{(1,36)} = 99.67, p < 0.0001$). This scopolamine-induced decrease in contextual freezing was mainly observed in the unpairing condition ($F_{(1,17)} = 109.84, p < 0.0001$). In contrast, physostigmine infusions enhanced contextual freezing in the pairing condition ($F_{(1,18)} = 10.02, p = 0.005$). Although physostigmine infusions reduced contextual freezing in animals trained with the unpairing procedure ($F_{(1,18)} = 8.72, p = 0.008$), these levels of freezing did not significantly differ from that of physostigmine-infused mice trained with the pairing procedure.

Dose response analyses of scopolamine and physostigmine infusions

Our previous experiments show that (1) intra-hippocampal infusions of 50µg/µl of scopolamine do induce a conditioned fear to the tone CS while disrupting contextual conditioning in mice trained with the unpairing procedure and that (2) by contrast, physostigmine infusions (0.1µg/µl) enhance contextual fear conditioning to the detriment of tone fear conditioning when mice are trained with the pairing procedure. In order to confirm the specific effect of each drug observed in the unpairing (SCOP) and pairing (PHYS) conditions respectively, a dose response experiment has been conducted in animals submitted to a CS-US unpairing procedure (SAL vs. SCOP: 20, 50 or 100 µg/µl; 0.02 µl per side) and in animals submitted to a pairing procedure (SAL vs. PHYS: 0.02, 0.1 or 1 µg/µl).

First, the effects of scopolamine infusions in the unpairing condition were dependent on the dose used whichever the behavioral test (dose effect in auditory cue test: $F_{(3,36)} = 6.50$, $p = 0.001$; in context test: $F_{(3,36)} = 26.40$, $p < 0.0001$). As shown in Figure 2C, infusions of 20µg/µl of scopolamine had no significant effect on tone conditioning compared to saline infusions ($F_{(1,13)} = 0.69$, $p > 0.05$), whereas infusions of both 50 and 100 µg/µl resulted in a significant increase in conditioning to the tone ($F_{(1,22)} = 13.56$, $p = 0.001$ and $F_{(1,13)} = 5.62$, $p = 0.033$, respectively). It must be noted, however, that the 50µg/µl infusions are the only ones to significantly enhance tone fear conditioning as compared to the 20µg/µl infusions (50 vs. 20: $F_{(1,23)} = 10.01$, $p = 0.004$ and 100 vs. 20: $F_{(1,14)} = 3.81$, $p > 0.05$). Results from the context test (Fig. 2D) revealed that while all concentrations of scopolamine reduced levels of freezing to context (all F values > 17 , all p values < 0.002), the disrupting effect of 50 µg/µl infusions was significantly more pronounced than that produced by 20 µg/µl (50 vs. 20: $F_{(1,23)} = 5.06$, $p = 0.034$), but was not different from that produced by the highest dose (50 vs. 100: $F_{(1,23)} = 2.44$, $p > 0.05$). All in all, these results provide evidence for an optimal efficacy of 50µg/µl of scopolamine in mimicking a preferential tone fear conditioning to the detriment of contextual fear conditioning.

Second, the effects of physostigmine infusions in the pairing condition were also dependent on the dose used whichever the behavioral test (dose effect in auditory cue test: $F_{(3,36)} = 9.53$, $p < 0.0001$; in context test: $F_{(3,36)} = 5.05$, $p = 0.005$). As shown in Figure 2E, while all concentrations impaired tone fear conditioning (all F values > 4.8 , all p values < 0.04), the disrupting effect of 0.1 µg/µl was significantly more pronounced than that produced by 0.02 µg/µl (0.1 vs. 0.02: $F_{(1,16)} = 9.67$, $p = 0.006$), but was not different from that one induced by the highest dose (0.1 vs. 1: $F_{(1,15)} = 0.014$, $p > 0.05$). In contrast, results from the context test indicated that while all doses tested tended to increase contextual conditioning

(Fig. 2F), infusions of 0.1 and 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of physostigmine were the only ones to significantly increase levels of freezing to context as compared to saline infusions ($F_{(1,21)} = 15.05$, $p = 0.0009$ and $F_{(1,21)} = 8.56$, $p = 0.008$, respectively). All in all, these results provide evidence for a maximal efficacy of 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of physostigmine in mimicking a preferential contextual fear conditioning to the detriment of tone fear conditioning.

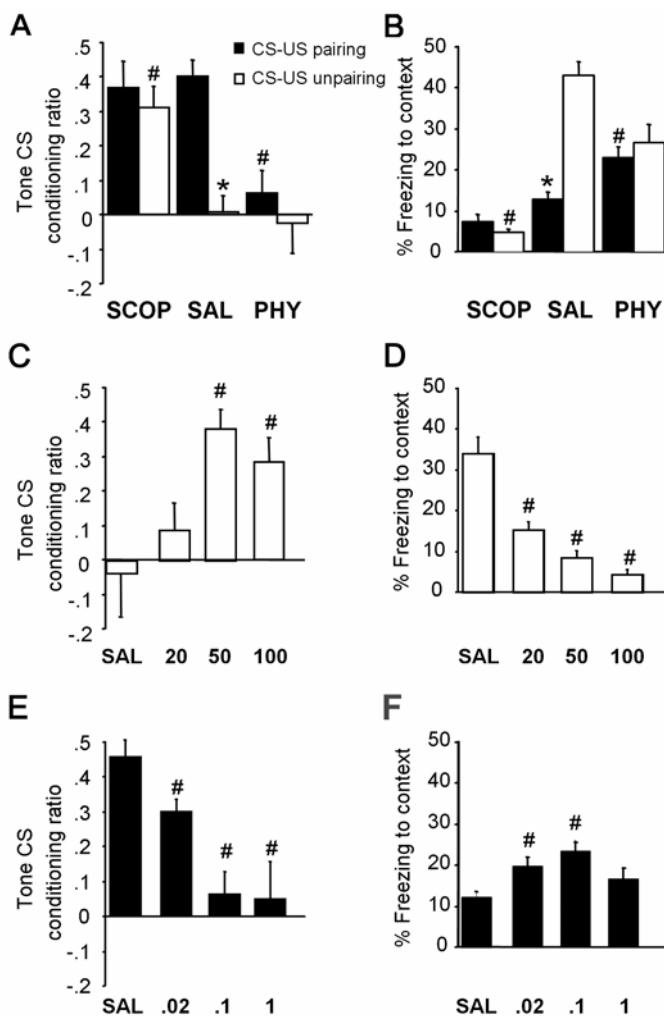


Figure 2. Effects of intrahippocampal infusions of saline (SAL), scopolamine (SCOP) and physostigmine (PHY) on cue tone and contextual fear conditioning as a function of the conditioning procedure.

A, Auditory cue test. Conditioned response to the tone is expressed as percentage of freezing increase to the tone with respect to a baseline freezing level (i.e. pre/post tone periods mean). The ratio was calculated as follow: [% freezing during the tone presentation - (% pre-tone period freezing + % post-tone period freezing) / 2] / [% freezing during the tone presentation + (% pre-tone period freezing + % post-tone period freezing) / 2]. Values of this ratio (mean + s.e.m.) are illustrated for mice submitted to SAL (n = 21), SCOP (n = 19) or PHY (n = 19) intrahippocampal infusions before either a CS-US pairing or a CS-US unpairing procedure.

B, Context test. Percentage of conditioned freezing (mean + s.e.m.) during the 4 minutes re-exposure period in animals submitted to SAL, SCOP or PHY intrahippocampal infusions before either a CS-US pairing or unpairing procedure.

C, Scopolamine dose effect on conditioned freezing to the tone CS (mean + s.e.m.) in mice submitted to SAL (n = 7) or SCOP intrahippocampal infusions [20 (n = 8), 50 (n = 17) or 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (n = 8)] before a CS-US unpairing procedure.

D, Scopolamine dose effect on conditioned freezing to the context (mean + s.e.m.) in animals submitted to SAL, or SCOP intrahippocampal infusions (20, 50 or 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) before a CS-US unpairing procedure.

E, Physostigmine dose effect on conditioned freezing to the tone CS (mean + s.e.m.) in mice submitted to SAL (n = 14) or PHY intrahippocampal infusions [0.02 (n = 9), 0.1 (n = 9) or 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (n = 8)] before a CS-US pairing procedure.

F, Physostigmine dose effect on conditioned freezing to the context (mean + s.e.m.) in animals submitted to SAL, or PHY intrahippocampal infusions (0.02, 0.1 or 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) before a CS-US pairing procedure.

* conditioning effect (CS-US pairing vs. unpairing); # pharmacological effect (SAL vs. SCOP or SAL vs. PHY)

Specificity of the conditioned fear response to the tone CS

In order to assess the extent to which the increased freezing levels to the tone CS observed in control paired and in scopolamine-infused unpaired mice were specific to the tone CS, we compared the levels of conditioned freezing to the discrete CS with the fear responses expressed to a neutral white noise. As shown in Figure 3A, in each group, animals displayed significantly more freezing to the tone CS than to the white noise (control paired: $F_{(1,13)} = 19.90$, $p = 0.0006$; SCOP unpaired: $F_{(1,16)} = 15.95$, $p = 0.001$). Because this behavioral discrimination was observed whatever the order of the tests [type of test (white noise vs. tone CS test) x order (24h vs. 48h): $F_{(1,12)} = 0.88$, $p > 0.05$ in control paired and $F_{(1,15)} = 1.68$, $p > 0.05$ in SCOP unpaired], results have been pooled for each group.

It must be noted that this discrimination cannot be due to the fact that mice cannot display freezing behavior to the white noise. Indeed, as shown in Figure 3B, among additional control mice, those submitted to a white noise-US pairing procedure significantly displayed more conditioned fear to the white noise CS than mice submitted to an unpairing procedure (conditioning effect: $F_{(1,9)} = 29.76$, $p = 0.0004$). This pattern of results shows that the white noise used can actually be processed as a discrete tone CS when it is paired with the footshock US. Altogether, these results indicate that increased levels of freezing to the tone CS in control paired and SCOP-infused unpaired mice are specific to the discrete CS and cannot be explained in terms of generalised fear to other discrete auditory stimuli.

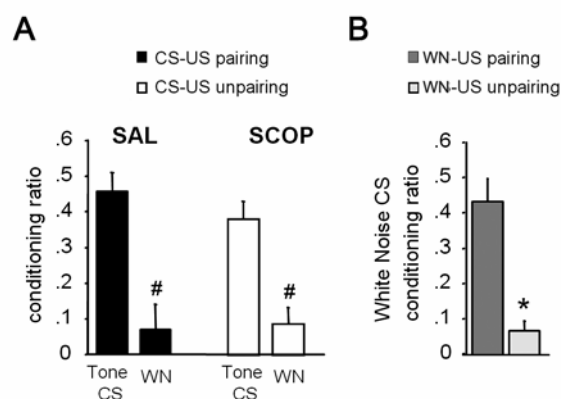


Figure 3. Specificity of the freezing response to the tone CS.

A, Fear responses to the tone CS and to the neutral white noise (WN) is expressed as percentage of freezing increase to the tone, or to the white noise, with respect to a baseline freezing level (i.e. pre/post tone periods mean). Values of this ratio (mean + s.e.m.) are illustrated for SAL-infused mice submitted to a pairing procedure ($n = 14$) and for SCOP-infused mice submitted to a CS-US unpairing procedure ($n = 17$).

B, Conditioned freezing responses to the white noise (WN) CS, expressed as percentage of freezing increase to the WN with respect to a baseline freezing level (mean + s.e.m.) in SAL-infused mice submitted to a WN-US pairing ($n = 5$) or unpairing procedure ($n = 6$).

* conditioning effect (CS-US pairing vs. unpairing); # test effect (tone CS vs. white noise)

Our previous experiments provide evidence for a maximal efficacy of intra-hippocampal infusions of 50µg/µl of scopolamine and 0.1µg/µl of physostigmine. These effects were dependent on both the conditioning procedure and the behavioral test, suggesting that drug-induced changes in freezing behavior are unlikely to be due to a general alteration in locomotor activity. Nevertheless, in order to directly examine the question of a potential long lasting effect of drug infusions on locomotor activity, we have measured the number of crossovers in mice, 24 hrs after conditioning. The measure of crossovers revealed no significant differences in levels of activity between SAL-, SCOP- and PHY-infused mice whatever the conditioning procedure used (treatment: $F_{(2,53)} = 0.61, p > 0.05$; treatment x conditioning: $F_{(2,53)} = 1, p > 0.05$) (Fig. 4). This supplementary analysis thus confirmed that differences in freezing levels between the different groups cannot be due to changes in levels of locomotor activity.

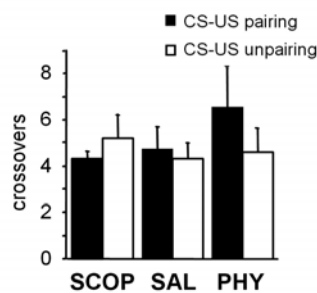


Figure 4. Locomotor activity. Number of crossovers (mean + s.e.m.) during the first minute of the auditory cue test displayed by mice previously submitted to SAL, SCOP (50 µg/µl) or PHY (0.1 µg/µl) intrahippocampal infusions before either a CS-US pairing or unpairing procedure.

Our previous analyses revealed that hippocampal cholinergic activity plays a crucial role in the processing of, and competition between, context- and elemental (tone) CS-US associations. Increasing cholinergic transmission by physostigmine suppresses the use of the tone CS as a valid (pairing procedure) predictor for the occurrence of the US, and gives more credence to the background context as a predictor. In contrast, decreasing such transmission by scopolamine tends to make the animals perceive the invalid CS (unpairing procedure) as if it was a reliable predictor for US occurrence, in the expense of the relatively more valid context. These findings suggest that intra-hippocampal infusions of physostigmine and of

scopolamine mimic the processing of cues by normal subjects trained under the unpairing and pairing procedure, respectively.

The following experiment was designed to determine whether, and the extent to which, intra-hippocampal infusions of each drug (SCOP: 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ and PHY: 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) could bias the functioning of the hippocampus and the amygdala in a manner consistent with our hypothesis developed above.

To this end, a separate cohort of mice was prepared as before, underwent intra-hippocampal infusions and then conditioned as described above. They were then sacrificed 15 min post-training for examination of phosphorylation of ERK1/2. Activation of ERK1/2 was studied because it is an important molecular marker commonly used to delineate learning-dependent circuits as a function of the prevalent conditioned association encoded. First, previous studies demonstrated that p-ERK1/2 can serve in neural cells, and particularly in hippocampal neurons, as convergence site for several neurotransmitter receptors activation including acetylcholine receptors (Rosenblum et al., 2000; Berkeley et al., 2001). Second, ERK1/2 activation has been shown to be critically required for learning-dependent plasticity within the hippocampus and the amygdala, in contextual- and tone CS fear conditioning, respectively (Atkins et al., 1998; Schafe et al., 2000; Shalin et al., 2004; Revest et al., 2005; Trifilieff et al., 2006). We have thus examined ERK1/2 phosphorylation in order to map and compare the patterns of activation of different hippocampal and amygdalar sub-regions as a function of the pharmacologically-induced manipulation of the hippocampal cholinergic transmission.

ACh manipulation affects ERK1/2 activation in the hippocampus

p-ERK1/2 levels were assessed within the dentate gyrus (DG), CA3 (Fig. 5A) and CA1 (Fig. 5B) hippocampal subfields. Scopolamine and physostigmine produced an overall opposite effect on p-ERK1/2 expression within the hippocampus with respect to saline. Specifically, scopolamine decreased ERK1/2 phosphorylation with a statistically significant effect in ventral ($F_{(1,16)} = 5.72, p = 0.029$) and dorsal CA1 ($F_{(1,15)} = 15.22, p = 0.001$). In contrast, physostigmine increased ERK1/2 phosphorylation in these areas with a statistically significant effect in the ventral ($F_{(1,16)} = 6.49, p = 0.02$) and dorsal DG ($F_{(1,15)} = 9.09, p = 0.008$). In addition, physostigmine produced an overall increase in p-ERK1/2 levels in CA1, with a statistically significant effect in the ventral CA1 in the pairing condition ($F_{(1,8)} = 6.60, p = 0.033$). No significant effect of infusions on p-ERK1/2 expression was found in ventral ($F_{(2,24)} = 2.47, p > 0.05$), nor in dorsal CA3 ($F_{(2,23)} = 1.78, p > 0.05$). In addition, whichever the type

of infusions, statistical analyses did not reveal any significant conditioning effect on p-ERK1/2 expression within the CA3 (dorsal: all values $F < 0.87$, all p values > 0.05 ; ventral: all F values < 0.98 , all p values > 0.05), or within the DG (dorsal: all F values < 1.61 , all p values > 0.05 ; ventral: all F values < 2.16 , all p values > 0.05).

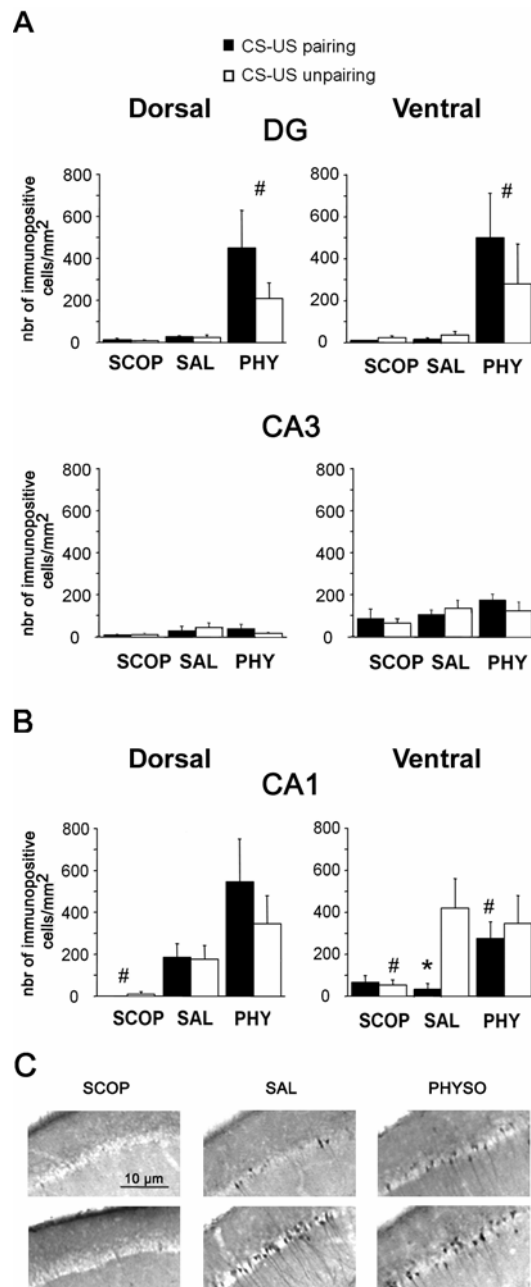


Figure 5. Effects of intrahippocampal infusions of SAL (n = 10), SCOP (n = 10) and PHY (n = 10) on ERK1/2 phosphorylation in the hippocampus as a function of the conditioning procedure.

A, Number of p-ERK1/2 immunopositive cells per mm² (mean + s.e.m.) in SAL, PHY and SCOP mice submitted to either a CS-US pairing or unpairing procedure in DG and CA3 sub-regions of the dorsal (left) and ventral (right) hippocampus.

B, Number of p-ERK1/2 immunopositive cells per mm² (mean + s.e.m.) in SAL, PHY and SCOP mice submitted to either a CS-US pairing or unpairing procedure in CA1 in the dorsal (left) and ventral (right) part of the hippocampus.

C, Representative photomicrographs depicting p-ERK1/2 levels within the CA1 sub-region of the ventral hippocampus in SAL, PHY and SCOP mice submitted to either a CS-US pairing (top) or unpairing (bottom) procedure.

* conditioning effect (CS-US pairing vs. unpairing); # pharmacological effect (SAL vs. SCOP or SAL vs. PHY)

Interestingly, in ventral (but not dorsal) CA1, saline-infused mice displayed significantly higher levels of p-ERK1/2 when trained with the unpairing than mice trained with the pairing procedure (conditioning effect: $F_{(1,8)} = 6.25$, $p = 0.036$). This training-dependent effect was abolished in mice infused with either scopolamine ($F_{(1,8)} = 0.086$, $p > 0.05$) or physostigmine ($F_{(1,8)} = 0.19$, $p > 0.05$) (Fig. 5B and 5C). While scopolamine infusions decreased p-ERK1/2 levels in the unpairing condition ($F_{(1,8)} = 6.55$, $p = 0.033$), physostigmine infusions increased p-ERK1/2 levels in the pairing condition ($F_{(1,8)} = 6.60$, $p = 0.033$). It follows that whatever the training procedure, scopolamine infusions led to a low level of ERK1/2 activation indistinguishable from that observed in the saline-infused mice trained with the pairing procedure (all F values < 0.03 , all $p > 0.05$). In contrast, physostigmine infusions, again independent of training procedures, resulted in a level of ERK1/2 activation similar to saline-infused mice trained with the unpairing procedure (all F values < 0.8 , all $p > 0.05$).

ACh manipulation affects ERK1/2 activation in the amygdala

Analysis of p-ERK1/2 was performed in the lateral and basolateral nuclei of the amygdala because these two nuclei have been shown to be critically required for the formation of the simple CS-US and context-US association (LeDoux, 2000; Nader et al., 2001; Yaniv et al., 2004; Calandreau et al., 2005).

First, in the LA, whatever the infusion group, p-ERK1/2 levels did not significantly differ as a function of the training procedure (conditioning: $F_{(1,24)} = 3.8$, $p > 0.05$; conditioning x treatment: $F_{(2,24)} = 1.03$, $p > 0.05$). Intra-hippocampal infusions of scopolamine resulted in an overall decrease in p-ERK1/2 levels ($F_{(1,16)} = 19.35$, $p = 0.0004$), whereas physostigmine had no overall effect on ERK1/2 activation ($F_{(1,16)} = 2.49$, $p > 0.05$) (Fig. 6A).

Second, training- but also infusions-related changes on p-ERK1/2 levels observed in the BLA very closely approximate that one described above in ventral hippocampus CA1. Namely, saline-infused animals trained with the pairing procedure displayed significantly lower p-ERK1/2 levels in the BLA than saline-infused animals trained with the unpairing procedure ($F_{(1,8)} = 9.22$, $p = 0.016$). Moreover, scopolamine infusions decreased p-ERK1/2 levels in mice trained with the unpairing procedure ($F_{(1,8)} = 15.05$, $p = 0.004$), whereas physostigmine infusions increased p-ERK1/2 levels in mice trained with the pairing condition ($F_{(1,8)} = 6.02$, $p = 0.039$). It follows that in the BLA, as in CA1 subfield of the ventral hippocampus, regardless of training procedure, scopolamine-infused mice displayed similarly low levels of ERK1/2 activation as in the saline-infused mice trained with the pairing

procedure. In contrast, physostigmine-infused mice did not differ from saline-infused mice trained with the unpairing procedure (all F values < 2.3, all *p* values > 0.05).

The patterns of p-ERK1/2 levels in the LA and BLA observed here in saline-infused mice confirm our previous demonstration that the LA and BLA nuclei are differentially involved in fear conditioning as a function of the training procedure used (Calandreau et al., 2005). This training-related mapping of p-ERK1/2 in the basolateral complex of the amygdala can be further illustrated by the LA/BLA ratio of p-ERK1/2 levels (see legends Fig. 6B). Namely, when mice were trained with the pairing procedure, the LA displayed much more p-ERK1/2 levels than the BLA (ratio: 0.75 for a maximum of 1.0). In contrast, when mice were trained with the unpairing procedure, similar levels p-ERK1/2 activation were observed in both nuclei (ratio: 0.10 for a minimum of zero) (conditioning effect: $F_{(1,8)} = 21.50$, $p = 0.001$) (Fig. 6B). This effect of conditioning on the differential LA/BLA p-ERK1/2 activation was not observed in scopolamine- nor physostigmine-infused mice. Indeed, irrespective of the training procedure, scopolamine produced a LA/BLA p-ERK1/2 mapping similar to that one observed in controls (saline) trained with the pairing procedure (all ratio values tended to 1). In contrast, physostigmine produced a pattern of LA/BLA p-ERK1/2 activation close to that one observed in controls trained with the unpairing procedure (all ratio values tended to 0) (Fig. 6B and 6C).

The above differences in ERK1/2 phosphorylation between the experimental groups cannot be accounted for by exposure to the tone CS, footshock US, or context *per se*, because all these stimuli were presented equally in both the pairing and unpairing tone CS-US procedures. In addition, the present changes in p-ERK1/2 levels within the hippocampus and the amygdala are unlikely to be due to changes in ERK1/2 expression. Indeed, previous immunohistochemical data or western blot analyses systematically showed no change in ERK1/2 expression whatever the brain region considered (including both the hippocampus and the amygdala), the post-conditioning delay or the cholinergic manipulation used (Rosenblum et al., 2000; Schafe et al., 2000; Atkins et al., 1998; Berkeley et al., 2001).

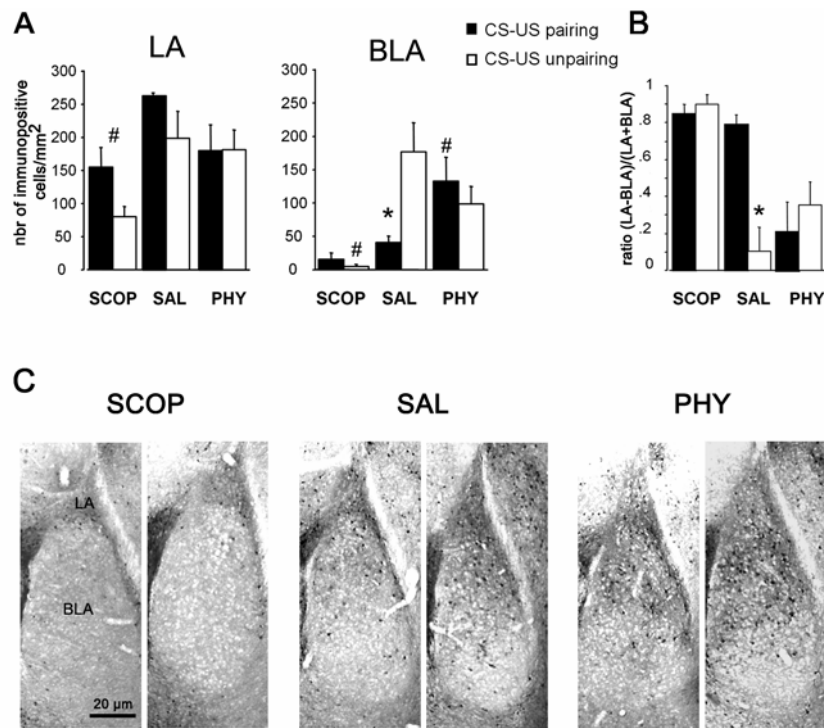


Figure 6. Effects of intrahippocampal infusions of SAL, SCOP and PHY on ERK1/2 phosphorylation in the amygdala as a function of the conditioning procedure.

A, Number of p-ERK1/2 immunopositive cells per mm² (mean + s.e.m.) in SAL, SCOP, and PHY mice trained with either a CS-US pairing or unpairing conditioning procedure in the lateral (LA) and basolateral (BLA) nuclei of the amygdala.

B, For each animal, the relative activity of each nucleus within the LA/BLA neural complex was calculated using the following ratio: (LA-BLA)/(LA+BLA). For each group, the mean ratio (+ s.e.m.) is presented.

C, Representative photomicrographs depicting p-ERK1/2 levels in the LA and BLA nuclei of the amygdala in SAL, PHY and SCOP mice submitted to either a CS-US pairing (left) or unpairing (right) procedure.

* conditioning effect (CS-US pairing vs. unpairing); # pharmacological effect (SAL vs. SCOP or SAL vs. PHY)

Discussion

This study reveals that hippocampal cholinergic transmission regulates amygdala ERK1/2 activation and the adaptive balance between elemental and contextual fear conditioning. First, we show that a predominant context-US association (vs. simple CS-US association) is associated with increased levels of ACh release in the hippocampus and with a specific pattern of plasticity-related ERK1/2 activation within the LA and BLA nuclei of the amygdala. Second, using pharmacological manipulations, we provide evidence that changes in hippocampal cholinergic transmission make a causal contribution both to the selection of the relevant emotional information and to the associated pattern of ERK1/2 activation within the amygdala. Namely, intra-hippocampal infusions of physostigmine suppressed conditioning to the predictive simple CS (pairing procedure) but promoted, in the same animals, conditioning to the context. Concomitantly, these infusions induced a pattern of

LA/BLA ERK1/2 activation similar to that one observed in controls trained with the CS-US unpairing procedure. Conversely, infusions of scopolamine mimicked both the behavioral (conditioning) and amygdalar (ERK1/2 activation) pattern of effects observed in controls trained with the CS-US pairing procedure.

Hippocampal ACh contributes to stimulus selection in emotional learning

The first experiment shows that the magnitude of hippocampal ACh release is modulated by the conditioning procedure used. When the tone CS predicts the occurrence of the US in a precise (explicit) time-dependent manner (CS-US pairing; context in the background), the increment in ACh release is less than in situation where contextual stimuli are the primary stimuli to enter into association with the US (CS-US unpairing; context in the foreground). Hence, in agreement with the well documented role of the hippocampus in contextual conditioning (Selden et al., 1991; Phillips and LeDoux, 1992; Holland and Bouton, 1999; LeDoux, 2000; Nail-Boucherie et al., 2000; Anagnostaras et al., 2001; Maren, 2001; Desmedt et al., 2003; Rudy et al., 2004; Yaniv et al., 2004), the magnitude of ACh release would reflect the degree to which the static contextual stimuli are processed by the hippocampus for their subsequent association with the US.

Results from our pharmacological experiment demonstrate that levels of hippocampal ACh are not only related to the magnitude of contextual conditioning but also play a deciding role in the selection of the best predictor (static contextual cues vs. discrete tone stimulus) for the occurrence of the aversive event. First, enhancing hippocampal cholinergic transmission with physostigmine resulted in the selection of contextual stimuli (enhanced conditioning to the background context) instead of the tone cue (impaired conditioning to the tone explicitly paired with shock). Previous experiments have shown that interfering with hippocampal processes can disrupt elemental conditioning (Bast et al., 2003). Here, we show that augmenting the hippocampal cholinergic signal not only disrupts tone fear conditioning but also promotes contextual conditioning. This indicates that the level of hippocampal cholinergic transmission plays a crucial role in the adaptive balance between discrete cue- and contextual fear conditioning. Second, and in accordance with this assumption, we also show that decreasing this cholinergic transmission with scopolamine resulted in the selection of the tone cue instead of foreground contextual cues, converting the non-predictive tone CS (unpaired with shock) in a valid predictor for the US (conditioning to the tone). Moreover, our study indicates that this scopolamine-induced fear conditioning to the discrete tone is specific to the phasic CS since such behavioral response cannot be explained by a generalized fear to

any discrete stimulus that is not related to the aversive experience. Strikingly, this indicates that under certain conditions a discrete CS cue may enter into association with a US in spite of the absence of any explicit CS-US pairing. Actually, a similar switch from contextual to tone conditioning was previously observed in mice subjected to septal pharmacological manipulations aimed to reducing ACh release in the hippocampus (Desmedt et al., 1999). It has been suggested that decreasing hippocampal cholinergic transmission may prevent animals from forming a configural (polymodal) representation of the static contextual stimuli (Gale et al., 2001). As a consequence, animals would focus on the phasic tone CS, which would thus overshadow other cues because of its relatively high salience, and capture most of the associative strength to the US.

Results from analysis of p-ERK1/2 support a role of the hippocampal cholinergic transmission in the processing of contextual stimuli as foreground or background information depending on the predictive value of the simple tone CS. Specifically, physostigmine and scopolamine produce opposite effects on the overall levels of hippocampal (CA1 and DG) ERK1/2 activation. The pharmacologically-induced increase (physostigmine) and decrease (scopolamine) in p-ERK1/2 activation parallel a prevalent contextual (context in foreground) and tone CS conditioning (context in background), respectively. Altogether, our results indicate that hippocampal ACh transmission regulates the hippocampal recruitment in fear conditioning, thereby contributing to the selection of the relevant information in emotional learning.

Hippocampal ACh controls amygdalar function

The present report also demonstrates that hippocampal cholinergic transmission influences learning-dependent mechanisms in the amygdala as evidenced by the observed patterns of ERK1/2 activation in the LA and BLA nuclei. First, we show that control (saline-infused) mice trained with the pairing procedure displayed significantly higher p-ERK1/2 levels in the LA than in the BLA. In contrast, when animals were trained with the unpairing procedure similar levels of p-ERK1/2 were observed in both nuclei. This observation is in agreement with previous data indicative of distinct roles for LA and BLA nuclei in forming simple CS- and context-US associations (Nader et al., 2001; Yaniv et al., 2004; Calandreau et al., 2005). Indeed, using reversible inactivation restricted to either nucleus, we previously showed that when the elemental CS predicts the occurrence of the US (pairing procedure) the LA is not only crucial for forming the CS-US association, but also inhibits the BLA-mediated background context-US association. In contrast, when the CS does not predict the occurrence

of the US (unpairing procedure), both nuclei contribute synergistically to the foreground context-US association. Consistent with that study (Calandreau et al., 2005), the present LA/BLA p-ERK1/2 mapping provides direct evidence that the engagement of each nucleus relative to the other one is dependent on whether a prevalent CS- or context-US association is selected.

Second, our study indicates that hippocampal cholinergic transmission constrains the amygdala function, contributing to the acquisition of either a predominant simple CS- or a context-US association. Specifically, scopolamine produced an overall (irrespective of the conditioning procedure) decrease of p-ERK1/2 levels in the LA with respect to saline treatment and markedly reduced p-ERK1/2 levels in the BLA only in animals trained with the unpairing procedure. It follows that regardless the conditioning procedure, the LA/BLA pattern of p-ERK1/2 in scopolamine-infused mice mimics that observed in controls trained with the pairing procedure (i.e. predominant tone conditioning: higher p-ERK1/2 levels in LA than in BLA). In contrast, physostigmine had no effect on LA p-ERK1/2 levels, but increased p-ERK1/2 levels in the BLA only in animals trained with the pairing procedure. It follows that the LA/BLA pattern of p-ERK1/2 in physostigmine-infused mice mimics the pattern observed in controls trained with the unpairing procedure (i.e. predominant contextual conditioning: similar p-ERK1/2 levels in LA and BLA). These findings are thus in accordance with the current view supporting a role for ACh in regulating the relative contribution of different neural systems to learning (Marighetto et al., 1993; McIntyre et al., 2002; Gold, 2003; Parent and Baxter, 2004; Pych et al., 2005). It has been shown that a high level of ACh release in the hippocampus was associated with poor memory for the amygdala-dependent conditioned cue preference task (McIntyre et al., 2002) and, more generally, that the hippocampal dependent processing of contextual information can interfere with the acquisition of this amygdala-dependent learning task (McDonald and White, 1995; White and McDonald, 2002). In particular, these studies showed that a pre-exposure to a novel environment is associated with the formation of a latent spatial map of this environment. This representation required an intact fimbria-fornix pathway and subsequently reduced the ability to develop an amygdala-based Pavlovian learning. While in keeping with these previous findings, our present study further reveals that elevated levels of the hippocampal ACh not only favor the formation of a contextual representation but also impede formation of an amygdala-based simple tone-shock association. Conversely, reduced levels of the hippocampal ACh impede conditioning to the context but promote elemental conditioning to the tone.

Altogether, our findings provide direct evidence for the contribution of the hippocampal cholinergic signal to the tuning of the hippocampus-amygdalar network and thereby to a selection process of the best predictor (simple CS or context) for the occurrence of an aversive event. Several data support this view. First, it is known that ACh increases the probability of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated generation of long term potentiation (LTP) (Markram and Segal, 1990), which is a major cellular model of learning and memory. Second, ERK1/2 activation has been shown to be required for hippocampal LTP (English and Sweatt, 1997) and regulated by ACh muscarinic receptors activity (Rosenblum et al., 2000). Third, we recently demonstrated that different hippocampal patterns of ERK1/2 activation are associated with either a preferential tone or contextual fear conditioning (Trifilieff et al., 2006). Thus, hippocampal ACh signalling might constrain ERK1/2 activation within the hippocampal-amygdalar network, subserving thereby the processing of either the context or the tone as the best predictor of the footshock occurrence.

Concluding remarks

Our study reveals that the hippocampal cholinergic neurotransmission controls the strength of both amygdala-mediated context- and simple CS-US associations, thereby providing adaptive emotional responses. Depending on the predictive value of the CS for the occurrence of an aversive event, different levels of hippocampal ACh determine the relative engagement of the LA and BLA nuclei in bringing about the adaptive selection of either the simple CS or the context as a valid predictor. We are just beginning to understand the subtleties of the hippocampus-amygdalar interaction and further experiments will be required for exploring the neural connection and mechanisms responsible for this newly revealed functional influence. It must be emphasized that alterations in this hippocampal cholinergic control of the amygdala are sufficient to produce a subjective appraisal of emotionally laden stimuli that does not match their predictive values for aversive events. In particular, the intensification of emotional memory for an arousing simple stimulus and the concomitant weakening of context learning following intrahippocampal scopolamine infusions is reminiscent of the paradoxical coupling of memory intensification (for a simple trauma-related stimulus) and amnesia (for traumatic contextual cues) observed in human posttraumatic stress disorder (Elzinga and Bremner, 2002; Layton and Krikorian, 2002). Since this ability to appropriately select or process relevant emotional information is altered in several trauma-related pathologies, such findings might highlight the neural dysfunctions involved in pathological emotional memories.

References

- Anagnostaras SG, Gale GD, Fanselow MS (2001) Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippocampus* 11: 8-17.
- Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM, Sweatt JD (1998) The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci* 1: 602-609.
- Bast T, Zhang WN, Feldon J (2003) Dorsal hippocampus and classical fear conditioning to tone and context in rats: effects of local NMDA-receptor blockade and stimulation. *Hippocampus* 13: 657-675.
- Baxter MG, Holland PC, Gallagher M (1997) Disruption of decrements in conditioned stimulus processing by selective removal of hippocampal cholinergic input. *J Neurosci* 17: 5230-5236.
- Berkeley JL, Gomez J, Wess J, Hamilton SE, Nathanson NM, Levey AI (2001) M1 muscarinic acetylcholine receptors activate extracellular signal-regulated kinase in CA1 pyramidal neurons in mouse hippocampal slices. *Mol Cell Neurosci* 18: 512-524.
- Blanchard RJ, Blanchard DC (1969) Crouching as a index of fear. *J Comp Physiol Psychol* 67: 370-375.
- Calandreau L, Desmedt A, Decorte L, Jaffard R (2005) A different recruitment of the lateral and basolateral amygdala promotes contextual or elemental conditioned association in Pavlovian fear conditioning. *Learn Mem* 12: 383-388.
- Desmedt A, Garcia R, Jaffard R (1998) Differential modulation of changes in hippocampal-septal synaptic excitability by the amygdala as a function of either elemental or contextual fear conditioning in mice. *J Neurosci* 18: 480-487.
- Desmedt A, Garcia R, Jaffard R (1999) Vasopressin in the lateral septum promotes elemental conditioning to the detriment of contextual fear conditioning in mice. *Eur J Neurosci* 11: 3913-3921.

- Desmedt A, Marighetto A, Garcia R, Jaffard R (2003) The effects of ibotenic hippocampal lesions on discriminative fear conditioning to context in mice: impairment or facilitation depending on the associative value of a phasic explicit cue. *Eur J Neurosci* 17: 1953-1963.
- Elzinga BM, Bremner JD (2002) Are the neural substrates of memory the final common pathway in posttraumatic stress disorder (PTSD)? *J Affect Disord* 70: 1-17.
- English JD, Sweatt JD (1997) A requirement for the mitogen-activated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation. *J Biol Chem* 272:19103-19106.
- Fendt M, Fanselow MS (1999) The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev* 23: 743-760.
- Franklin KBJ, Paxinos G (1997) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press.
- Gale G, Anagnostaras G, Fanselow M (2001) Cholinergic modulation of pavlovian fear conditioning: Effects of intrahippocampal scopolamine infusion. *Hippocampus* 11: 371-76.
- Gold PE (2003) Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. *Neurobiol Learn Mem* 80: 194-210.
- Holland PC, Bouton ME (1999) Hippocampus and classical conditioning. *Cur Op Neurobiol* 9: 195-202.
- Layton B, Krikorian R (2002) Memory mechanisms in posttraumatic stress disorder. *J Neuropsych Clin Neurosci* 14: 254-261.
- LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23: 155-184.
- Maren S (2001) Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci* 24: 897-931.
- Marighetto A, Micheau J, Jaffard R (1993) Relationships between testing-induced alterations of hippocampal cholinergic activity and memory performance on two spatial tasks in mice. *Behav Brain Res* 56:133-44.

- Markram H, Segal M (1990) Long-lasting facilitation of excitatory postsynaptic potentials in the rat hippocampus by acetylcholine. *J Physiol* 427:381-93.
- Marlin NA (1981) Contextual associations in trace conditioning. *Animal Learn Behav* 9: 519-523.
- McDonald RJ, White NM (1995) Information acquired by the hippocampus interferes with acquisition of the amygdala-based conditioned-cue preference in the rat. *Hippocampus* 5:189-197.
- McIntyre CK, Pal SN, Marriott LK, Gold PE (2002) Competition between memory systems: acetylcholine release in the hippocampus correlates negatively with good performance on an amygdala-dependent task. *J Neurosci* 22: 1171-1176.
- Nader K, Majidishad P, Amorapanth P, LeDoux JE (2001) Damage to the lateral and central, but not other, amygdaloid nuclei prevents the acquisition of auditory fear conditioning. *Learn Mem* 8:156-63.
- Nail-Boucherie K, Dourmap N, Jaffard R, Costentin J (2000) Contextual fear conditioning is associated with an increase of acetylcholine release in the hippocampus of rat. *Brain Res Cogn Brain Res* 9:193-197.
- Oschner KN, Bunge SA, Gross JJ, Gabrieli JDE (2002) Rethinking feelings: an fMRI study of the cognitive regulation of emotion. *J Cogn Neurosci* 14: 1215-1229.
- Parent MB, Baxter MG (2004) Septohippocampal acetylcholine: involved in but not necessary for learning and memory? *Learn Mem* 11: 9-20.
- Phelps EA (2004) Human emotion and memory : interactions of the amygdala and hippocampal complex. *Cur Opin Neurobiol* 14: 198-202.
- Phelps EA, O'Connor KJ, Gatenby JC, Gore JC, Grillon C, Davis M (2001) Activation of the left amygdala to a cognitive representation of fear. *Nat Neurosci* 4: 437-441.

- Phillips RG, LeDoux JE (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 106: 274-285.
- Phillips RG, LeDoux JE (1994) Lesions of the dorsal hippocampal formation interfere with background but not foreground contextual fear conditioning. *Learn Mem* 1: 34-44.
- Pych JC, Chang Q, Colon-Rivera C, Gold PE (2005) Acetylcholine release in hippocampus and striatum during testing on a rewarded spontaneous alternation task. *Neurobiol Learn Mem* 84: 93-101.
- Rescorla RA, Wagner AR (1972) A theory of Pavlovian conditioning: variations in the effectiveness of reinforcement and non reinforcement. In *Classical Conditioning II*, A.H. Black and W.F. Prokasy, eds. (New York: Appleton-Century-Croft), pp. 64-99.
- Revest JM, Di Blasi F, Kitchener P, Rouge-Pont F, Desmedt A, Turiault M, Tronche F, Piazza PV (2005) The MAPK pathway and Egr-1 mediate stress-related behavioral effects of glucocorticoids. *Nat Neurosci* 8: 664-672.
- Rogers JL, Kesner RP (2004) Cholinergic modulation of the hippocampus during encoding and retrieval of tone/shock-induced fear conditioning. *Learn Mem* 11: 102-107.
- Rosenblum K, Futter M, Jones M, Hulme EC, Bliss TV (2000) ERKI/II regulation by the muscarinic acetylcholine receptors in neurons. *J Neurosci* 20: 977-985.
- Rudy JW, Huff NC, Matus-Amat P (2004) Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. *Neurosci Biobehav Rev* 28: 675-85.
- Schaefer SM, Jackson DC, Davidson RJ, Kimberg DY, Thompson-Schill SL (2002) Modulation of amygdalar activity by the conscious regulation of negative emotion. *J Cogn Neurosci* 14: 913-921.
- Schafe GE, Atkins CM, Swank MW, Bauer EP, Sweatt JD, LeDoux JE (2000) Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning. *J Neurosci* 20: 8177-8187.

- Shalin SC, Zirrgiebel U, Honsa KJ, Julien JP, Miller FD, Kaplan DR, Sweatt JD (2004) Neuronal MEK is important for normal fear conditioning in mice. *J Neurosci Res* 75: 760-770.
- Selden NRW, Everitt BJ, Jarrard LE, Robbins TW (1991) Complementary roles for the amygdala and hippocampus in aversive conditioning to explicit and contextual cues. *Neuroscience* 42: 335-350.
- Trifilieff P, Herry C, Vanhoutte P, Caboche J, Desmedt A, Riedel G, Mons N, Micheau J (2006) Foreground contextual fear memory consolidation requires two independent phases of hippocampal ERK/CREB activation. *Learn Mem* 13:349-358.
- Wallentsein G, Wago D (2001) Intrahippocampal scopolamine infusions impairs both acquisition and consolidation of contextual fear conditioning. *Neurobiol Learn Mem* 75: 245-252.
- White NM, McDonald RJ (2002) Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol Learn Mem* 77:125-184.
- Wilkinson LS, Humby T, Robbins TW, Everitt BJ (1995) Differential effects of forebrain 5-hydroxytryptamine depletions on Pavlovian aversive conditioning to discrete and contextual stimuli in the rat. *Eur J Neurosci* 7: 2042-2052.
- Winocur G, Rawlins JN, Gray JA (1987) The hippocampus and conditioning to contextual cues. *Behav Neurosci* 101: 617-625.
- Yaniv D, Desmedt A, Jaffard R, Richter-Levin G (2004) The amygdala and appraisal processes: stimulus and response complexity as an organizing factor. *Brain Res Brain Res Rev* 44:179-186.

Biphasic ERK1/2 activation in both the hippocampus and the amygdala may reveal a system consolidation process of contextual fear memory.

Pierre Trifilieff¹, Ludovic Calandreau¹, Cyril Herry², Nicole Mons¹ and Jacques Micheau¹

¹CNRS UMR 5106, Laboratoire de Neurosciences Cognitives, Avenue des Facultés, 33405 Talence, France.

²Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research, CH-4058 Basel, Switzerland.

Introduction

It is yet widely accepted that long-term memory formation requires protein synthesis which initiates around the time of training and lingers within the few hours after (Davis and Squire, 1984). More recently, it has become evident that after the early phase a second period of protein synthesis was sometimes observed leading to the idea that more than one wave of protein synthesis is involved for memory consolidation (Grecksch and Matthies, 1980; Rose, 2000). Interestingly, upstream to protein synthesis (Bourtchouladze et al., 1998; Igaz et al., 2002; Ramirez-Amaya et al., 2005) two similar periods were found for signalling pathways (Bernabeu et al., 1997; Rose, 2000; Trifilieff et al., 2006) or new mRNA production (Igaz et al., 2002). In most of the cases the two critical periods were observed after fear-motivated learning (Grecksch and Matthies, 1980; Bernabeu et al., 1997; Bourtchouladze et al., 1998; Quevedo et al., 1999; Rose, 2000; Stanciu et al., 2001; Igaz et al., 2002; Trifilieff et al., 2006) or in stressful condition (Bilang-Bleuel et al., 2002) with the exception of scarce studies showing biphasic activation of either the ERK/RSK cascade during novel taste learning (Swank and Sweatt, 2001) or Arc protein expression after exploration of a new environment (Ramirez-Amaya et al., 2005). Therefore, the development of one or two waves of protein synthesis is not restricted to fear-motivated learning but is probably a more general mechanism that depends on the neuropsychological characteristics of the learning protocol (Bourtchouladze et al., 1998; Trifilieff et al., 2006). For example, it appears that the biphasic activation occurs early in the learning process as it is dependent on the level of training (Bourtchouladze et al., 1998) or it is observed after a single taste exposure but not during repeated presentation of the same stimulus (Swank and Sweatt, 2001). Another interesting issue is that this biphasic pattern of molecular and cellular activation has been revealed in various brain regions like the hippocampus (Grecksch and Matthies, 1980; Bernabeu et al., 1997; Bourtchouladze et al., 1998; Quevedo et al., 1999; Stanciu et al., 2001; Igaz et al., 2002; Trifilieff et al., 2006), the insular cortex (Swank and Sweatt, 2001), the parietal cortex (Ramirez-Amaya et al., 2005) or the amygdala (Stanciu et al., 2001). More recently it has been suggested that these two critical periods of memory consolidation take place within a neural network that has been specifically recruited during the learning situation (Ramirez-Amaya et al., 2005).

It is therefore, tempting to assume that the biphasic pattern embodies a “molecular signature” of the specific involvement of a brain structure in a particular information processing. Recently, we have demonstrated that fear conditioning induced two waves of ERK activation

in the CA1 subregion of the dorsal hippocampus that was related to the degree of association between the discrete auditory conditioned stimulus (CS) and the foot shock unconditioned stimulus (US) (Trifilieff et al., 2006). With immunocytochemistry, we found that the unpaired CS/US procedure induced in CA1 a biphasic pattern of ERK1/2 activation whereas paired CS-US procedure caused only an early transient activation. In addition, the blockade of either phase of ERK activation in CA1 was shown to specifically interfere with the consolidation of the associative processes between the CSs, contextual or discrete, depending on their predictive value, and the US (shock). Thus, as already outlined, the pattern of neuronal plasticity (biphasic vs. monophasic) could reflect a particular involvement of a brain area for consolidation process. Based on this hypothesis, we addressed whether the type of conditioning could influence the kinetic pattern of ERK1/2 activation in fear memory-related substructures. Indeed, numerous correlationnal studies using immunocytochemistry have analyzed the molecular modifications induced by fear conditioning in the different hippocampal subfields or in the amygdala nuclei. Several focused on the ERK/MAPK signalling pathway, demonstrating that the training procedure was determinant to reveal the particular involvement of a brain area in cued or contextual conditioning (Atkins et al., 1998; Schafe et al., 2000). However, most of these investigations have considered only one time point after fear conditioning and therefore, the lack of labelling in one brain structure after training may merely reflect a difference in the time course of the marker activation in this particular area.

With an immunocytochemical approach, we have analyzed in the hippocampal subfields and in the LA and BLA nuclei, the kinetics of ERK1/2 phosphorylation (activation) after the paired or the unpaired conditioning procedures in fear conditioning. This was aimed at testing the hypothesis of a differential pattern of ERK1/2 activation according to the brain region, in interaction with the conditioning procedure. We show that the unpaired CS/US procedure induced a biphasic pattern of ERK1/2 activation with a similar time course, in the hippocampal CA1 and CA3 as well as in the LA and BLA nuclei. On the contrary, pairing CS and US did not affect at all ERK1/2 phosphorylation in CA3 and in BLA, whereas we observed in the LA, the one hour delayed peak of p-ERK1/2 already shown by others (Schafe et al., 2000). Both conditioning procedures induced an immediate ERK1/2 activation in the DG unrelated to the conditioning procedure. We previously showed that hippocampal cholinergic neurotransmission influences contextual conditioning-induced ERK1/2 activation patterns in both the hippocampus and the amygdala, and concomitantly hippocampo-amygdalar-dependent contextual processing (Calandreau et al., submitted). To test whether

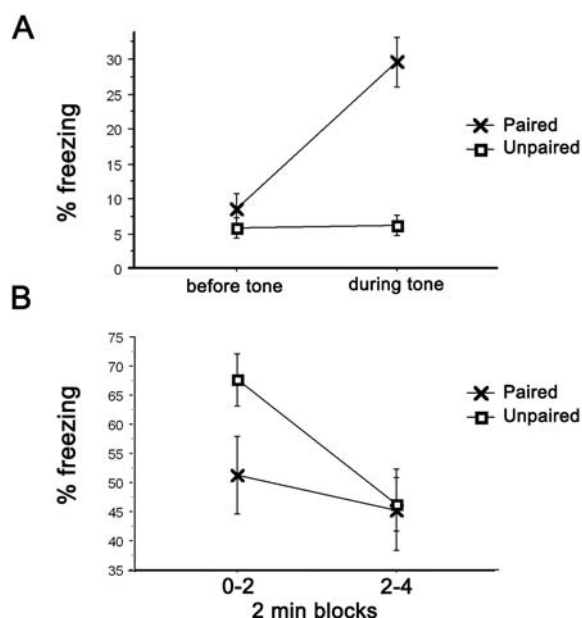
these concomitant biphasic patterns were reflecting a hippocampal-amygdalar interaction during memory consolidation, we analyzed the effect of the inhibition of both hippocampal waves on ERK1/2 activation in the amygdala. We showed only in the unpaired situation that inhibition of early hippocampal ERK1/2 activation had a strong tendency to specifically block the corresponding activation in the BLA. These data suggest that consolidation of foreground contextual conditioning may involve an ensemble of structures, including the hippocampal CA1 and CA3 and the LA and BLA nuclei whereas consolidation of cued conditioning neither requires the ERK signalling pathway, nor the co-activation of these different brain regions.

Results

Behavioral results

Figure 1 : paired and unpaired fear conditioning induce specific conditioned emotional responses to both tone and context.

Paired conditioning (elemental conditioning) consisted in the presentation of five tones which systematically co-terminated with one foot shock. Unpaired conditioning consisted in presenting tones and foot shocks in a pseudo-random manner, where tones never predict the foot shocks occurrence.



A- Tone test. 24 hours after conditioning, mice were submitted to a tone test which consisted in presenting the tone in a familiar environment and measuring freezing behaviour as a conditioned emotional response. Mice differed in their level of freezing to the tone (conditioning effect: $F_{(1,20)}=21.7$; $p<0.001$) as the paired group ($n=10$) exhibited significant increase freezing during tone presentation (tone effect: $F_{(1,9)}=46.9$; $p<0.01$) but not the unpaired group ($n=12$) (tone effect: $F_{(1,11)}=0.2$; $p=0.681$).

B- Context test. 1 hour after the tone test, mice were submitted to a context test which consisted in exposing animals to the context of conditioning without neither tone nor foot shocks, and measuring freezing behaviour during 4 minutes. Statistical analysis revealed the overshadowing effect of the context by the tone in the paired group as mice exhibited a lower level of freezing compared to the unpaired group during the first 2 minutes of context re-exposure (interaction conditioning x blocks of 2 minutes: $F_{(1,20)}=7.8$; $p=0.011$).

Tone test (fig 1A)

Mice differed in the expression of conditioned emotional response (CER) to the tone depending on the type of conditioning (conditioning effect: $F_{1, 20}=21.7$; $p<0.001$). Mice trained to the paired condition exhibited specific freezing to the tone (tone effect: $F_{1, 9}=46.9$; $p<0.001$), whereas the animals submitted to the unpaired condition did not display any CER to the tone ($F_{1, 11}=0.2$; $p=0.681$).

Context test (fig 1B)

As shown on Fig 1B, mice from the unpaired group expressed higher level of freezing during the first 2 min block of context test compared to the paired group (conditioning x 2 min.blocks: $F_{1, 20}=7.86$; $p=0.011$).

Altogether, these data confirm that mice of the unpaired group encoded the context but not the tone, as a predictor of shock occurrence, favoring a context (CS)-shock (US) association. In other hand, pairing the tone with the foot-shock produced both tone- and context –shock associations.

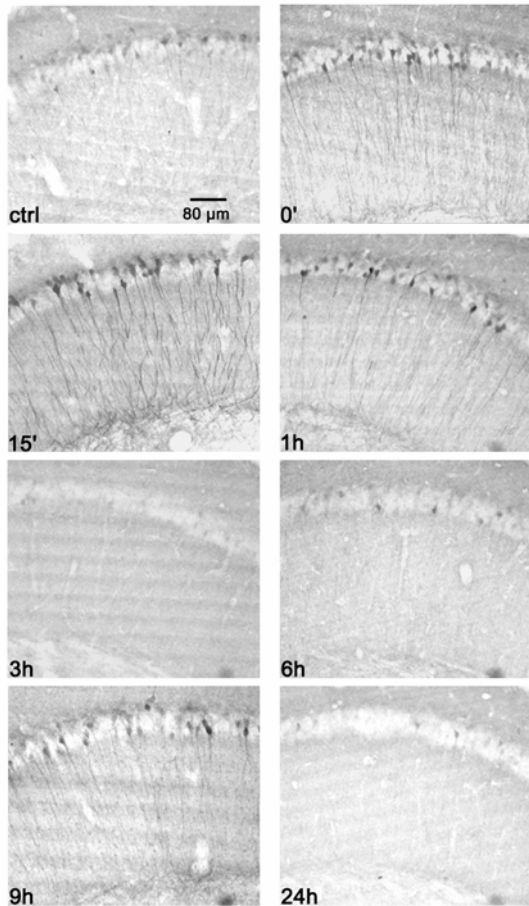
Immunohistochemical results

As revealed by immunohistochemistry and Western blotting we previously demonstrated a differential phosphorylation state of ERK1/2 in CA1, which was monophasic in paired conditioning, and biphasic in unpaired conditioning. We further showed the requirement of each activation phases for memory consolidation of context-US association, and the importance of the monophasic activation for the consolidation of the tone-US association (Trifilieff et al., 2006). In this study we questioned whether these specific patterns of ERK1/2 activation were restricted to the CA1, or whether they reflect a global fear memory-related neural network implementation. Therefore, we compared ERK1/2 activation at different time-points after each type of conditioning in the different hippocampal subfields including the CA1, CA3 and dentate gyrus (DG), and in the basal and lateral nuclei of the amygdala.

Fear conditioning-induced ERK1/2 activation in the area CA1 of the hippocampus.

Tissues harvested at different time-points post-conditioning were examined with immunohistochemistry using antibodies directed against the phosphorylated forms of ERK1/2 (pERK) (Fig 2). We confirmed in the CA1 the immediate and brief pERK increase after paired conditioning and the biphasic augmentation of pERK when the unpaired protocol was applied, with an early phase identified at 0-1h post-training and a second and also transient phase observed around 9h post-conditioning (Fig. 2A, B).

A



B

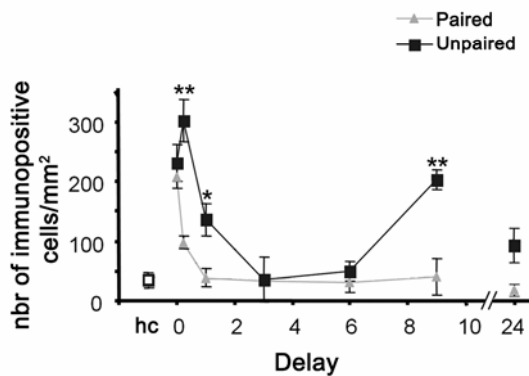


Figure 2: specific patterns of ERK1/2 activation in the CA1 of the hippocampus for each type of conditioning.

Mice were submitted to the paired or the unpaired protocol and sacrificed at different intervals to perform immunohistochemical detection of pERK.

A- Representative pictures showing pERK labelling in the CA1 of the hippocampus in mice submitted to the unpaired protocol and sacrificed at different time-delays after conditioning, as indicated on the pictures. Note that pERK was expressed in both dendritic and somato-nuclear compartments for each delay of ERK1/2 activation (compared to home cage controls; ctrl). As shown on fig 1B, the paired group just exhibited an immediate and transient activation of ERK1/2. The pattern of pERK expression did not significantly differ from the unpaired group at this delay (data not shown).

B- Quantifications of pERK immunopositive cells (for details on counts, see mat. Meth.) in the CA1 of the hippocampus of mice sacrificed at different time delays after paired or unpaired protocol. Each point corresponds to the delays showed in fig 1A. Statistical analysis revealed conditioning effect at 15 min ($p<0.001$), 60 min ($p<0.05$), and 9 hours ($p<0.001$) ($*p<0.05$; $**p<0.01$). Compared to the basal levels of pERK in home cage animals (hc), the unpaired protocol induced two waves of ERK1/2 activation, the first from 0 to 60 minutes, the second one around 9 hours. Paired protocol induced only a transient early activation (significant at 0 minute) of ERK1/2 which reached basal levels 15 minutes after conditioning (see text for details).

Analyses of variance with conditioning protocol and time as factors yielded main effects of conditioning protocol ($F_{1,52} = 39.3$, $p < 0.001$), time ($F_{6,52} = 19.2$, $p < 0.001$) and interaction ($F_{6,52} = 5$, $p < 0.001$) confirming a differential pattern of ERK1/2 activation depending on the conditioning protocol (Fig. 2B). Changes in pERK immunoreactivity were significant after both unpaired and paired conditioning (all F 's > 5 , p 's < 0.001) and a planned post-hoc analysis

confirmed the mono- versus biphasic nature of the activity increase in the two training regimes. The unpaired protocol significantly enhanced pERK labeling compared to control home cage at 0, 15 min (first wave) and 9 h (second wave) (all p 's <0.01), whereas the paired one induced only an increase of pERK expression immediately after learning (0 min; $p<0.001$), but not at any additional time interval.

Thus, each type of conditioning induced specific patterns of ERK1/2 activation in the hippocampal CA1.

ERK1/2 activation in CA3 of the hippocampus after each type of conditioning.

In the CA3 of the dorsal hippocampus unpaired conditioning induced a biphasic increase in pERK immunoreactivity reminiscent to the one observed in the CA1. On the contrary, paired conditioning did not cause any change in pERK (Fig. 3B). Analyses of variance with conditioning protocol and time as factors yielded main effects of conditioning protocol ($F_{1,52} = 17.5$, $p < 0.001$), time ($F_{6,52} = 3.4$, $p < 0.001$) and interaction ($F_{6,52} = 2.6$, $p < 0.05$). A planned post-hoc analysis confirmed for the unpaired condition, the existence of an immediate ERK1/2 activation (up to 15 min post-training) and a delayed second phase occurring 6-9 h after conditioning. At these later time points, pERK immunostaining was not significantly enhanced compared to control home cage (all p 's >0.05), but significantly higher when compared to the paired condition (see legend).

Conditioning-induced ERK1/2 activation in the DG.

Both types of conditioning did influence in the same way the pattern of ERK1/2 activation in the DG. As shown in Fig 4B pERK immunoreactivity was significantly increased immediately after conditioning and dropped down to basal level within 15 min (ANOVA: conditioning effect $F_{1,52} = 1.1$, $p > 0.05$; time effect $F_{6,52} = 18.5$, $p < 0.001$). Thus, ERK1/2 activation in the DG does not appear to be specifically related to the type of information processing which is engaged in each conditioning.

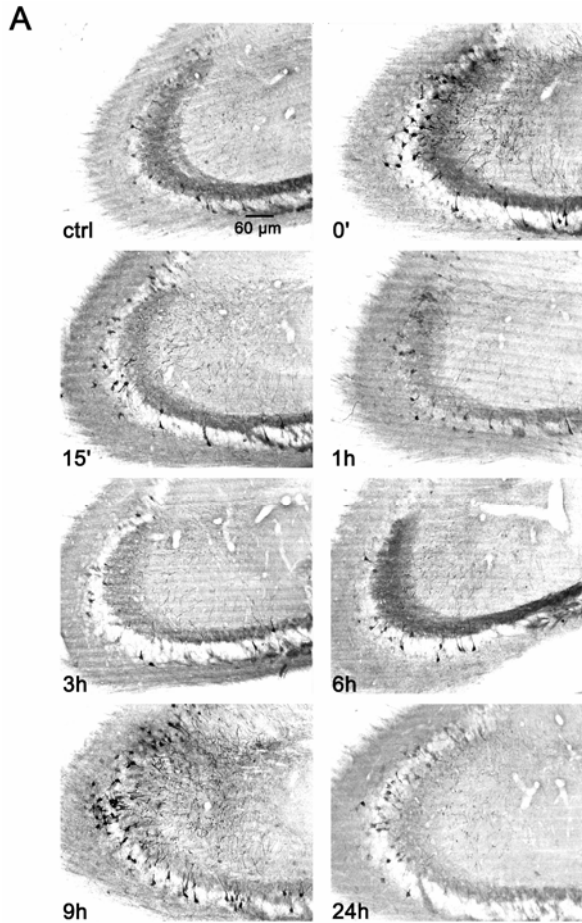
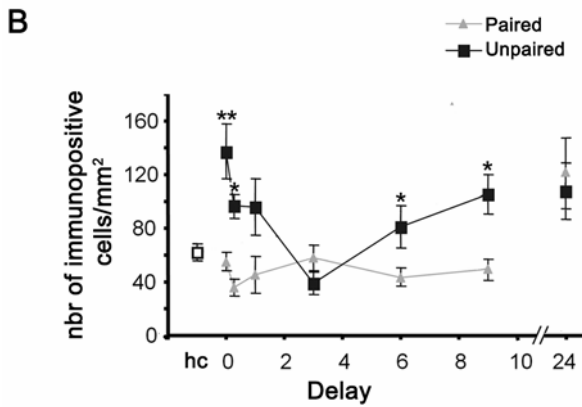


Figure 3: specific patterns of ERK1/2 activation in the CA3 of the hippocampus for each type of conditioning.

A- Representative pictures of pERK labelling in the CA3 of the hippocampus of mice submitted to the unpaired protocol and sacrificed at the different time-delays after conditioning, as indicated on the pictures. Note that pERK was expressed in both dendritic and somato-nuclear compartments for every delay of ERK1/2 activation (compared to home cage controls; ctrl).

B- Quantifications of pERK immunopositive cells (for details on counts, see mat. Meth.) in the CA3 of the hippocampus of mice sacrificed at different time delays after paired or unpaired protocol. Each point corresponds to the delays indicated on fig 2A. Statistical analysis revealed conditioning effect at 0 min ($p < 0.01$), 15 min ($p < 0.05$), 6 hours ($p < 0.05$), and 9 hours ($p < 0.05$) ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$). Both groups (paired and unpaired) presented a higher level of ERK activation at 24 hours compared to home cage controls, but with a high variability (see S.E.M).



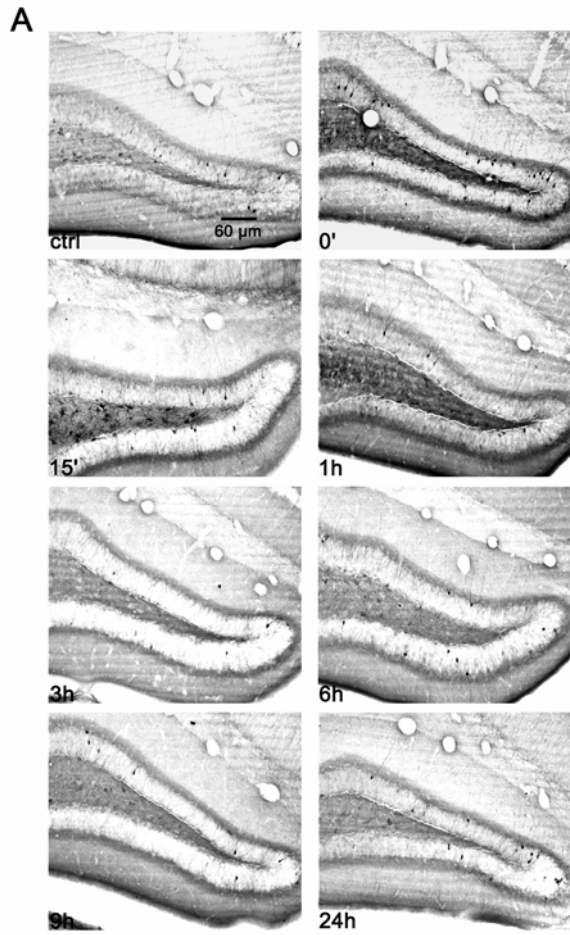
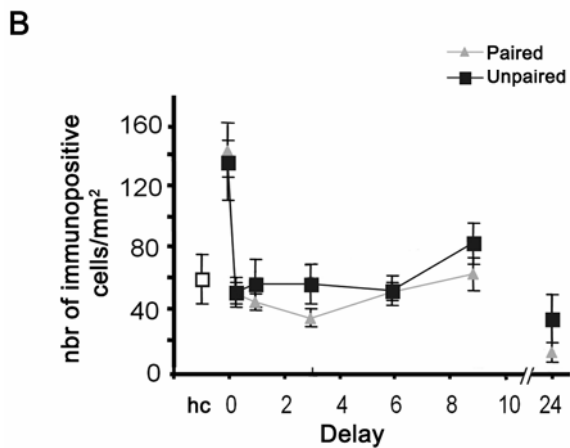


Figure 4: No differences in ERK activation in the dentate gyrus (DG) depending on the type of conditioning.

A- Representative pictures of pERK labelling in the DG of mice submitted to the unpaired protocol and sacrificed at the different time-delays after conditioning, as indicated on the pictures. Note that the number of immunopositive cells just after conditioning (0') was very low compared to the number of granular cells of the DG, even if statistically increased compared to home cage controls (ctrl) (see fig 3B).

B- Quantifications of pERK immunopositive cells in the DG of the hippocampus of mice sacrificed at different time delays after paired or unpaired protocol. Each point corresponds to the indicated delays on pictures of fig 3A. No differences were evidenced between each type of conditioning at any time-delay. But we observed the same transient early activation of ERK1/2 immediately after (0') each type of conditioning (see text for details). Thus, DG seems to be unspecifically activated after aversive experience.



ERK1/2 activation in the BLA and LA nuclei of the amygdala.

Depending on the training protocol we observed a differential pattern of ERK1/2 activation in the BLA. One-way ANOVA with repeated measures confirmed a significant main effect of

conditioning protocol ($F_{1,52} = 24.2$, $p < 0.001$), a strong tendency for time effect ($F_{6,52} = 3.4$, $p=0.058$), and a significant interaction ($F_{6,52} = 2.7$, $p < 0.05$) (Fig. 4B top). We found that unpaired conditioning enhanced ERK1/2 activation at 15 min ($p<0.001$) and nearly produced a significant activation at 9h compared to home cage controls ($p=0.057$). However, it was significantly higher when compared to the paired condition at the same delay (see figure legend), suggesting a biphasic ERK1/2 activation similar to the one observed in the CA1. However, as shown in the Fig 4 no pERK change was detected in the BLA at any delay after paired conditioning (all p 's >0.05).

In the LA, analyses of variance with conditioning protocol and time as factors yielded main effects of conditioning protocol ($F_{1,52} = 32.9$, $p < 0.001$), and time ($F_{6,52} = 3.4$, $p<0.05$) confirming a differential pattern of ERK1/2 activation depending on the conditioning protocol (Fig. 5). Planned post-hoc analyses confirmed the mono- versus biphasic nature of the increase of phosphorylation in the two training regimes (see Fig. 5B). The unpaired protocol elicited a first wave of activation occurring between 15 min ($p<0.05$) and 60 min ($p<0.05$) that was followed by a second wave which peaked around 9h ($p<0.05$) when compared to home cage controls. Regarding the paired protocol, we confirmed the increase of ERK1/2 phosphorylation already observed at 1h by other (Schafe et al., 2000).

Thus, paired conditioning activated ERK1/2 in a monophasic manner in the LA, but not in the BLA, whereas unpaired conditioning promoted biphasic ERK1/2 activation both in the LA and the BLA of the amygdala.

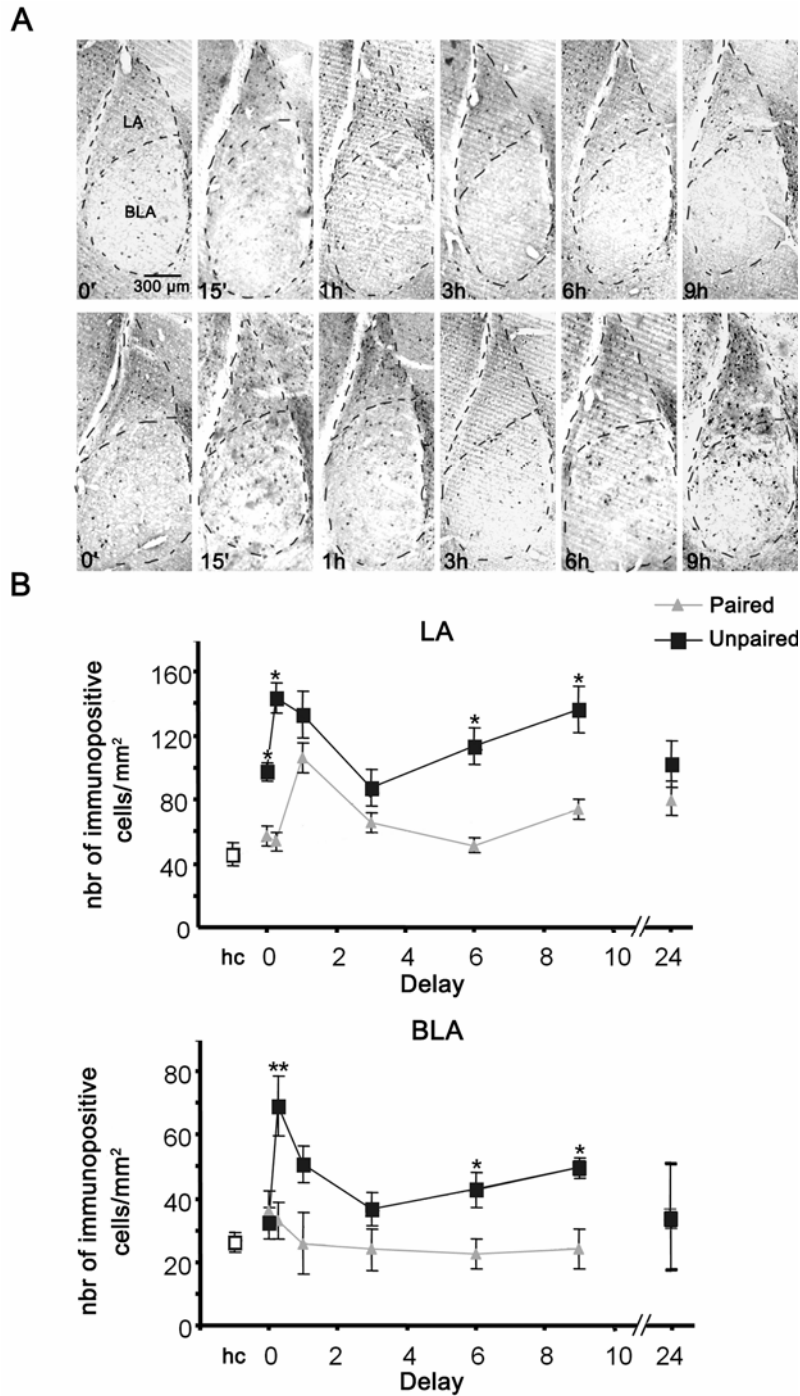


Figure 5: Similar patterns of amygdalar ERK1/2 activation compared to the hippocampus depending on the type of conditioning.

A- Representative pictures of pERK labelling in the lateral (LA) and basolateral (BLA) nuclei of the amygdala from animals sacrificed at different time points after paired (top) or unpaired (down) conditioning.

B- Quantifications of pERK immunopositive cells in the LA (top) and the BLA (down) of mice submitted to paired or unpaired conditioning. Each point corresponds to the indicated delays on pictures of fig 4A. Conditioning effects were significant at 15 min ($p < 0.001$), 6h ($p < 0.05$) and 9h ($p < 0.05$) in the BLA, 0 min ($p < 0.05$), 15 min ($p < 0.05$), 6h ($p < 0.05$) and 9 h ($p < 0.05$) in the LA (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). Compared to home cage animals (hc), mice submitted to the unpaired protocol expressed two waves of ERK1/2 activation in both the LA and the BLA with similar kinetics (see text for details). Paired protocol induced only an early activation of ERK1/2 at 1 hour in the LA, but no activation in the BLA at any time-delay after conditioning.

Correlations between structures involved in fear conditioning.

Except in the DG where the pattern of ERK1/2 activation was similar for both types of conditioning, collectively, our data pointed out that each type of conditioning induced specific pattern of pERK induction in the selected brain areas. To determine whether for each type of conditioning these patterns were reflecting concomitant recruitment of an ensemble of structures, we performed a correlation matrix on the global pERK kinetic for each type of conditioning (table 1).

A					
	CA1	CA3	BLA	LA	DG
CA1	1.000				
CA3	-.017	1.000			
BLA	* .413	-.003	1.000		
LA	-.110	.003	.318	1.000	
DG	***.739	-.108	.292	-.083	1.000

B					
	CA1	CA3	BLA	LA	DG
CA1	1.000				
CA3	.200	1.000			
BLA	* .377	.099	1.000		
LA	* .389	-.004	* .433	1.000	
DG	** .489	.228	-.126	.004	1.000

Table 1: Correlation matrix

Correlation matrix were performed between structures based on the entire kinetic of ERK1/2 activation in either paired (A) or unpaired (B) groups. The Fisher's r to z statistical test was used to evaluate the level of significance for each correlation (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

In paired conditioning, significant pERK correlation was found between CA1 and DG (p<0.001) in one hand and CA1 and BLA (p=0.013) in other hand (table 1A). This result was anticipated when looking at the pattern of ERK1/2 activation in the CA1 and the DG (significant at 0 min in both subfields) and to a less extent in the CA1 and the BLA.

As shown above very similar biphasic patterns of activation were observed in the selected brain regions after unpaired conditioning. It was therefore expected to find significant correlation between all the structures, except the DG. However, correlation matrix revealed significant correlations only between CA1 and BLA (p=0.036), CA1 and LA (p=0.030), CA1 and DG (p=0.005), and between LA and BLA (p=0.014) (table 1B).

These data suggest that for both conditioning situations the dorsal CA1 and the BLA exhibit ERK1/2 activations that are timely related. The next experiment was aimed at examining a

possible interplay between both brain areas during unpaired conditioning by analyzing the effect of hippocampal blockade of either activation phase on the concurrent ERK1/2 phosphorylation in the amygdala (fig5).

U0126 administration in the hippocampus influences the early pERK induction in the BLA.

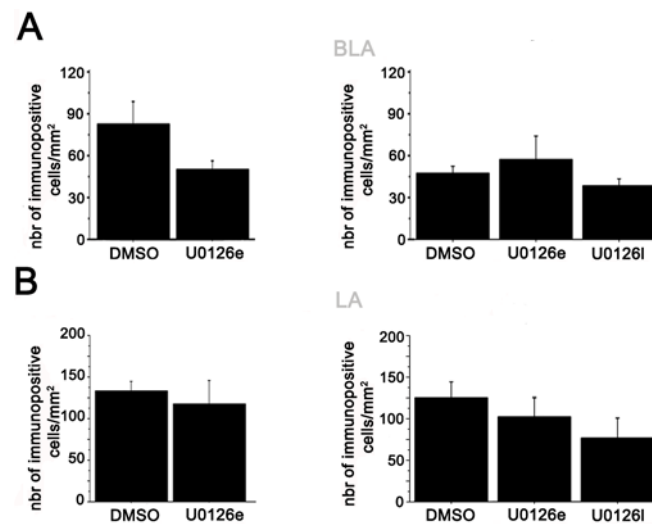


Figure 6: Blockade of either the first or the second unpaired conditioning-induced ERK1/2 activation waves in the hippocampus suggest a specific early interaction between the hippocampus and the BLA.

- (A) Levels of pERK staining in the BLA of the amygdala 15 minutes (left) or 9h (right) after unpaired conditioning when U0126 was administered in the hippocampus either 30 minutes before (U0126e) or 7.5h after (U0126l) learning. Neither the early (n=4), nor the late (n=4) U0126 injection had an effect on pERK staining 9h after conditioning (right, $F(2, 14)=2.3$; $p=0.14$) compared to vehicle (DMSO, n=6). However (left), U0126 intrahippocampal administration 30 min before conditioning (U0126e, n=4) tended to impair the early pERK induction in the BLA ($F(1, 5)=6.2$; $p=0.055$) 15 minutes after conditioning compared to DMSO (n=3).
- (B) pERK staining in the LA was also analyzed in the same animals. U0126 administration in the hippocampus had no effect on pERK levels in the LA, neither at 15 minutes (left; $F(1, 5)=0.11$; $p=0.75$), nor at 9h (right; $F(2, 14)= 2.3$; $p=0.14$) whatever the delay of U0126 administration.

U0126 was administered in the dorsal hippocampus either 30 min before (U0126e), or 7.5 h after (U0126l) unpaired conditioning. As previously shown, the treatments caused in CA1 an almost complete blockade of the early (measured 15 min post-conditioning) and the late (measured 9h post conditioning) ERK1/2 activation respectively (Trifilieff et al., 2006). This inhibition was restricted to the CA1 because we did not observe any effect on pERK expression in the CA3 (data not shown). ERK1/2 phosphorylation was measured in the LA and BLA nuclei of the amygdala at the same time points. The treatment had no effect on ERK1/2 activation in the LA ($F(1, 5)=0.113$; $p=0.75$) (fig 5B), but had a strong tendency to

inhibit the first wave of ERK1/2 activation in the BLA ($F(1, 5)=6.20$; $p=0.055$) (fig 5A). U0126 was also infused in the dorsal CA1 either 30 min before (U0126e), or 7.5 h after (U0126l) unpaired conditioning, and mice sacrificed at 9 h. None of these treatment conditions were shown to affect the late pERK induction either in the LA ($F(2, 11)=0.928$, $p=0.42$), or in the BLA ($F(2, 11)=0.861$; $p=0.45$).

In addition to the correlational analysis these data suggest interplay between the dorsal CA1 and the BLA during the early but not the late period of contextual fear memory consolidation.

Discussion

We have previously shown that unpaired conditioning procedure triggered a biphasic pattern of ERK1/2 activation in the CA1 of the hippocampus, and that each phase was crucially required for the consolidation of the context-US association. In contrast, the paired procedure generated only a transient early ERK1/2 activation phase, contributing nevertheless to the consolidation of the tone-US association. Thus, these data suggested that the pattern of ERK1/2 activation in the CA1 reflects a particular involvement of this brain area in consolidation process. The present study was aimed to further extend this investigation by analysing ERK phosphorylation in brain subregions that are involved in fear memory. We show that paired conditioning triggered ERK1/2 activation around the time of training in the hippocampal CA1 and the LA nucleus of the amygdala. Furthermore, the biphasic activation pattern induced by unpaired conditioning occurred in addition to CA1 in other selected brain subregions, specifically the CA3, LA and BLA. Finally, our data suggest a tight interplay between CA1 and BLA during contextual conditioning consolidation.

The present report shows both in the dorsal hippocampus and the amygdala a differential pattern of neuronal plasticity in relation to the degree of association between the discrete auditory conditioned stimulus (CS) and the foot shock unconditioned stimulus (US). By just manipulating the level of contingency between the CS and the US we determined two conditioning procedures (i.e. CS-US pairing *versus* CS-US unpairing) that result in the implementation of a predominant simple CS-US association or context-US representation (Desmedt et al., 1998; Calandreau et al., 2005; Trifilieff et al., 2006). Such an experimental design enabled us to assess the relative contribution of the hippocampal subfields and amygdala nuclei to elemental and contextual conditioning. Quantifications of pERK immunopositives cells as well as our correlational study revealed that each procedure differentially involved the hippocampo-amygdalar network.

Role of the hippocampal subfields and the amygdala nuclei in paired conditioning

The paired procedure induced significant pERK increase in the LA, the CA1, and the DG, but neither in the CA3 nor in the BLA. The rapid and very transient ERK1/2 activation in the DG was observed in both procedures probably reflecting an unspecific ERK1/2 activation related to the aversive experience (Alonso et al., 2002). In accordance with the well-documented literature on the role of the LA for the tone-US association (Romanski and LeDoux, 1992; Muller et al., 1997; Schafe et al., 2000; Nader et al., 2001; Calandreau et al., 2005), we confirmed the increase of ERK1/2 phosphorylation that was observed in this area 1h after the paired training (Schafe et al., 2000). Additionally, we found a rapid and transient increase of pERK immunoreactivity in the CA1 of the hippocampus which is coherent with previous data in which we showed that inhibition of ERK1/2 activity in the CA1 resulted in an impairment of the consolidation of tone-US association (Trifilieff et al., 2006). However, both subregions do not appear to cooperate in a synchronous manner as the early ERK1/2 post training activation has a different time course in the CA1 and the LA. As previously suggested the contribution of ERK1/2 activation in the CA1 might be related to the relative predictability of the CS (context or tone) for signalling the occurrence of the US (Trifilieff et al., 2006). This view was further supported by the observation that in paired conditioning the consolidation of the context which was in the background did not rely on ERK1/2 activation in the CA1 (Trifilieff et al., 2006).

We did not observe any ERK1/2 activation in both the CA3 and the BLA after the paired conditioning procedure. Lesion or transient inactivation studies have revealed a weak contribution of CA3 in learning and retrieval of cued fear conditioning (Lee and Kesner, 2004; Daumas et al., 2005). Imaging studies in other hand, showed activation of c-fos but not Zif268 expression in CA3 that was not specifically related to the acquisition of the cue-US association (Weitemier and Ryabinin, 2004; Perez-Villalba et al., 2005). Indeed, we did not observe any ERK1/2 activation in this area at any-time point after the paired conditioning. Collectively, these findings do not favour a possible CA3 recruitment in paired conditioning and its participation if any does not rely on ERK1/2 activation.

Considering the role of the BLA for both tone and context processing in the paired procedure (Goosens and Maren, 2001; Gale et al., 2004; Koo et al., 2004), the absence of ERK1/2 activation was unexpected. However, this lack of ERK1/2 activation does not rule out BLA recruitment in paired conditioning but more probably would suggest the involvement of an ERK-independent molecular pathway. This assumption accords with a recent observation showing in the BLA an increase of p-CREB one hour after the paired procedure (unpublished

data). This activation might depend on the cAMP/PKA signalling pathway which is also required in auditory fear conditioning consolidation in the amygdala (Schafe and LeDoux, 2000; Schafe et al., 2001).

Role of the hippocampal subfields and the amygdala nuclei in unpaired conditioning

The unpaired in contrast to the paired procedure induced specific ERK1/2 biphasic activation in an ensemble of structures including CA1 and CA3 hippocampal subregions and LA and BLA nuclei of amygdala. The biphasic activation of ERK1/2 observed in both CA1 and CA3 confirms the prominent role played by these hippocampal subfields in the different phases of contextual fear conditioning (Hall et al., 2001; Lee and Kesner, 2004; Daumas et al., 2005; Perez-Villalba et al., 2005). Some studies have already recorded hippocampal ERK1/2 activation after different fear conditioning procedures involving context-US association like contextual conditioning (Atkins et al., 1998) or passive avoidance (Camarota et al., 2000). These studies revealed monophasic ERK1/2 activation but this is presumably due to the absence of measure of pERK at the time points corresponding to the second phase in our study. Interestingly, the second phase of ERK1/2 activation emerged first in the CA3 compared to CA1, which could be related to the involvement of this area in the earliest stage of acquisition of contextual fear conditioning (Lee and Kesner, 2004; Daumas et al., 2005). Our data are confirming the importance of ERK1/2 activation in both the CA3 and the CA1 for contextual memory processing.

We also observed biphasic ERK1/2 activation in both the LA and the BLA nuclei of the amygdala. This confirms the involvement of both nuclei for contextual processing as previously demonstrated by inactivation experiments (Maren, 1999; Calandreau et al., 2005; Donley et al., 2005). The synchronized activation pattern in both nuclei suggests a synergistic contribution of LA- and BLA-mediated processes to contextual conditioning but, as it is discussed elsewhere (Calandreau et al., 2005) each nucleus contribution may underlie different contextual processing. Specifically, it has been shown that context could be processed as independent features or as a unified representation of these features (Fanselow, 2000; Matus-Amat et al., 2004) the former process could involve the LA and the latter the BLA (Calandreau et al., 2005). However, our data only enable us to assess that both the LA and the BLA act in concert for contextual conditioning processing.

These findings therefore, demonstrate that the psychological characteristics of the learning situation would differentially initiate in the same brain structures specific changes in molecular events that are associated to memory consolidation.

Does biphasic ERK1/2 activation reflect to a system consolidation process?

Although several studies have documented that hippocampal-dependent memory consolidation requires in some conditions two waves of neuronal plasticity (Grecksch and Matthies, 1980; Bernabeu et al., 1997; Bourtchouladze et al., 1998; Quevedo et al., 1999; Igaz et al., 2002; Trifilieff et al., 2006) current interpretations on the functional significance of the second wave are still elusive (Bourtchouladze et al., 1998; Rose, 2000; Trifilieff et al., 2006). The biphasic activation is not unique to the hippocampus as it was observed in different brain regions like the amygdala (Stanciu et al., 2001), the insular cortex (Swank and Sweatt, 2001) and the parietal cortex (Ramirez-Amaya et al., 2005) after different behavioral paradigms. At this stage, at least two alternative interpretations could be raised to account for the emergence of a second period of molecular activation. One suggestion is that the second period is merely a downstream molecular consequence of the first one (Bernabeu et al., 1997; Bourtchouladze et al., 1998; Swank and Sweatt, 2001). However, our data provide a weak support to this interpretation. First, the posttraining ERK1/2 activation observed after the paired procedure is not followed by a second phase in any of the brain structures studied. Conversely, the monophasic pattern is also detected in the DG after unpaired conditioning which indicates that the training procedure does not systemically constrain the mode of activation of ERK1/2. Thus, the onset of the second period of activation depends both on the training procedure and the brain region. Second, inhibition of the first phase does not prevent the occurrence of the second phase, suggesting that ERK1/2 reactivation is driven by a mechanism independent of the initial ERK1/2 phosphorylation (Trifilieff et al., 2006). Another possibility is that ERK1/2 reactivation might reflect a network activity. A recent work based on the catFISH method on *Arc* mRNA and protein expression has indeed demonstrated that the behaviorally-induced second wave of *Arc* expression was correlated in different selected brain areas revealing an anatomical signature of the neuronal network that underlies consolidation (Ramirez-Amaya et al., 2005). Our own data show correlations in pERK immunoreactivity between CA1, BLA and LA suggesting a reactivation of a hippocampal-amygdalar network for the consolidation of foreground contextual fear memory. The idea that consolidation process consists of a delayed reactivation of network states has gained support recently from single-cell recording experiments showing persistent experience-dependent ensemble activity pattern even after ≥ 20 h has elapsed (Louie and Wilson, 2001; Ribeiro et al., 2004). It is therefore possible that the second activation phase detected in hippocampal subfields (CA1, CA3) and in amygdala nuclei (BLA, LA) may reflect a system consolidation process.

Hippocampal-amygdalar interplay during contextual fear consolidation

Anatomical and electrophysiological findings have provided strong evidence for interaction between the hippocampus and the amygdala (Canteras and Swanson, 1992; Pitkanen et al., 2000; Pape, 2005). Namely, the LA and the BLA are sites of major reciprocal connections with the hippocampal formation including the CA1, the ventral subiculum and the lateral entorhinal cortex (Canteras and Swanson, 1992; Pikkarainen et al., 1999; Pitkanen et al., 2000). *In vivo* electrophysiological data have suggested that synchronization in oscillatory electrical activity in amygdalo-hippocampal pathways represent a rhythmic network activity associated with system consolidation of fear memory (Seidenbecher et al., 2003; Pape, 2005). This was further supported by recent behavioral observations in human and rat that indicate complementary and competitive interplay between amygdala and hippocampus during encoding of emotional memory (Richardson et al., 2004; Ito et al., 2006). However, the direction and the amplitude of these reciprocal influences may vary according to the intensity of the emotional event (Kim et al., 2005), the type of information processing (Calandreau et al., submitted; Desmedt et al., 1998) and to the state of the consolidation process. Most of the time, it is generally assessed that this is the amygdala, essentially the BLA, which influences hippocampal functions (Desmedt et al., 1998; Kim et al., 2005; McIntyre et al., 2005; Huff et al., 2006). Indeed, since several decades the concept of memory modulation has generated a large amount of data from which the BLA has emerged the principal region that modulates the storage of memories in many other regions (McGaugh et al., 2002; McGaugh, 2004). For example, a recent finding by the group of Rudy has demonstrated that BLA inactivation with muscimol attenuated the increase in *Arc* and *c-fos* mRNA in the hippocampus induced by contextual fear conditioning (Huff et al., 2006). However, we have recently reported evidence to support the view that the hippocampus may in turn control amygdala function during contextual fear memory acquisition. We showed that contextual conditioning produced increased levels of acetylcholine release in the hippocampus and that the magnitude of the cholinergic signal regulates the hippocampal recruitment in fear conditioning by contributing to the selection of the CS (context or tone) that would be the best predictor of the occurrence of the US. The pharmacological manipulation of hippocampal cholinergic levels was also associated with altered pattern of ERK1/2 activation within the LA and BLA nuclei of the amygdala (Calandreau et al., submitted). Consistent with the view of hippocampal influence on the BLA activity we show in the present report that the inhibition of the first wave of ERK1/2 activation in the CA1 was accompanied by a reduction of ERK1/2 concurrent activation in the BLA. Interestingly, blockade in the CA1 of any other ERK1/2 activation

phase did not induce any change in the ERK1/2 phosphorylation states normally observed in the BLA. This suggests that the modulatory influence of the hippocampal CA1 on the BLA may be driven by primary processing of contextual stimuli before their subsequent association with the shock in the BLA. By a feedback mechanism the BLA may then modulate in the hippocampus the storage of the conjunctive representation of the context that associates with shock (Matus-Amat et al., 2004; Huff et al., 2006). The latter assumption was speculated from the observation that the onset of the second activation phase of ERK1/2 in the LA and BLA was anticipating the occurrence of ERK1/2 activation in the CA1.

Collectively, our data led us to propose the existence of a sequential two-way interplay between the hippocampal CA1 and the BLA nucleus of the amygdala; a primary influence conveying the contextual stimuli from the hippocampus to the amygdala to enable context – US association and then, a feedback loop from the BLA to the CA1 to strengthen the consolidation of the conjunctive representation of the context associated with the aversive event.

Concluding remarks:

Our previous data pointed out that both paired and unpaired conditioning procedures involved the MAPK/ERK pathway, but with a quite different kinetic, reflecting differential involvement of the hippocampal CA1 subfield for fear memory processing (Trifilieff et al., 2006). The current study extends this observation on the other hippocampal regions and the BLA and LA nuclei of the amygdala. Moreover, we assume that the activation pattern of the MAPK/ERK pathway embodies a “molecular signature” of the specific involvement of a brain structure in a particular information processing. Specifically, we speculate that the biphasic pattern revealed in the CA1 and the BLA after unpaired conditioning may reflect a timed cooperative interplay between both structures to enable sequential processing related to foreground contextual fear memory consolidation. However, the assumption of a time-related cooperation between the hippocampus and BLA needs to be substantiated by further evidence. Finally, the notion of system consolidation requires integrating the hippocampal-amygdalar network into a wider system.

Materials and Methods

Subjects

Adult male C57Bl/6J mice (3-5 months) were purchased from IFFA Credo (Lyon, France). The animals were individually housed in standard Macrolon cages with *ad-libitum* access to food and water with a 12/12-h light/dark cycle. All experiments took place during the animal's light cycle. Three days before the experiments, mice were handled for 2-3 min/day. Animal care and behavioral tests were conducted in accordance with the standard ethical guidelines (European Communities Guidelines on the Care and Use of Laboratory Animals: 86/609/EEC).

For immunohistochemical studies, 80 mice were used, 13 were excluded *a posteriori* because of perfusion problems. Remaining mice were split as following: home cage n=6; paired conditioning: 0 min n=6, 15 min n=5, 60 min n=5, 3h n=6, 6h n=6, 9h n=5; 24h n=2; unpaired conditioning: 0 min n=5, 15 min n=4, 60 min n=5, 3h n=3, 6h n=3, 9h n=6; 24h n=7.

Behavioral procedure.

The behavioural procedure has been described in detail elsewhere (Desmedt et al., 1998).

Aversive conditioning: Experiments were performed in a conditioning chamber comprised of clear Perspex (30 x 24 x 22 cm high) and placed on a table in an experimental room with plenty of extra-maze cues. The floor of the chamber consisted of 60 stainless steel rods (2 mm diameter) connected to a shock generator (Imetronic, Talence, France). The box was cleaned with 70% ethanol before each trial. Animals were submitted to either unpaired or paired fear conditioning. In unpaired conditioning animals were placed in the conditioning chamber for a total of 7min during which they received 5 pseudo-randomly occurring tones (1000Hz, 65dB, 15s) that were not contingent with delivery of the 5 shocks (0.6mA, 50Hz, 3s). In contrast, paired conditioning was attained by pairing of 5 tones with foot shocks that co-terminated. Each animal was returned to its home cage after the conditioning procedure.

Retention test: twenty-four hours after conditioning, mice were examined for freezing behavior as an index of conditioned fear and defined as the absence of all movements except respiratory-related movements (Blanchard and Blanchard, 1969). Animals were submitted to the auditory cue first: they were kept in their home cage and this was placed into a gray Perspex chamber to prevent access to visuo-spatial cues in the experimental room. The 4min session was divided into two successive recording periods of the behavioral response: prior to (first 2min), and during (next 2min) tone presentation. Then, mice were returned to the animal

room for one hour before being submitted to the context test: they were exposed to the conditioning chamber for 4min, but no shocks were administered. The behavior of animals was videotaped for off-line scoring of freezing. In unpaired conditioning, freezing was continuously scored and calculated as the percentage of the total time spent freezing during every 2min period of the retention test. In paired conditioning, freezing was calculated as ratio of the percentage increase during the 2min of tone presentation relative to the 2min prior to presentation of the tone.

Immunochemical procedures

All immunohistochemical studies were performed after conditioning. Mice were anesthetized at specific time points after conditioning by an overdose of avertin and perfused intracardiacally with 100ml of 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ buffer, pH7.5. Brains were quickly removed, post-fixed in the same fixative for 12h, sectioned in a vibratome (Leica) and the sections were immediately processed for immunohistochemistry. Briefly, floating sections were rinsed 4 times in tris-buffered saline (TBS/NaF) (0.1 M Tris and 0.5 M NaCl, 0.5g/240ml NaF, pH 7.5), incubated for 30 min in TBS/NaF containing 0.5% H₂O₂, and rinsed 4 times in TBS/NaF. After 1h incubation in 0.2% Triton X-100, 3% bovin serum albumin (BSA) in TBS/NaF, sections were incubated 48h at 4°C in primary antibody anti phospho-ERK1/2 (anti phospho Thr²⁰²-Tyr²⁰⁴, rabbit polyclonal antibody, 1:500, Cell signaling, Beverly, ME) in TBS/NaF-0.2% Triton X-100- 3% BSA. After 4 rinses in TBS, sections were incubated for 2h with the secondary biotinylated antibody (anti-rabbit IgG, 1:2000, Jackson Immunoresearch) in TBS. Sections were rinsed 4 times and incubated at room temperature for 2h in avidin-biotin-complex solution (ABC solution, Vector Laboratories) in TBS. Sections were rinsed in TBS and then in TB and the peroxidase reaction end product was visualized in 0.05M TB (pH 7.6) containing diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, 0.025 %); 0.03 % H₂O₂ and 5 % nickel ammonium sulfate for 10 minutes. After processing, immunolabeled sections were washed in phosphate buffer, mounted onto gelatin-coated slides and dehydrated through alcohol to toluen for light microscopical examination. The quantification of pERK positive cells was carried out at x10 magnification, which yielded a field of view of 849 x 637 μm. At least three serial sections were digitized and analysed using a computerized image analysis system (Biocom, Visiolab 2000, V4.50). Structures were defined according to the Franklin and

Paxinos atlas. Labeled cells above a threshold determined from control animals were counted. Except for the control group the experimenter was blind to experimental grouping.

Data analysis.

Data are presented as the mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using an analysis of variance (ANOVA: Statview 512+) followed by an appropriate post-hoc test (Tukey/Kramer) set to a reliability level of $p=0.05$.

References

Alonso M, Viola H, Izquierdo I, Medina JH (2002) Aversive experiences are associated with a rapid and transient activation of ERKs in the rat hippocampus. *Neurobiol Learn Mem* 77:119-124.

Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM, Sweatt JD (1998) The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci* 1:602-609.

Bernabeu R, Bevilaqua L, Ardenghi P, Bromberg E, Schmitz P, Bianchin M, Izquierdo I, Medina JH (1997) Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7041-7046.

Bilang-Bleuel A, Rech J, De Carli S, Holsboer F, Reul JM (2002) Forced swimming evokes a biphasic response in CREB phosphorylation in extrahypothalamic limbic and neocortical brain structures in the rat. *Eur J Neurosci* 15:1048-1060.

Blanchard RJ, Blanchard DC (1969) Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. *J Comp Physiol Psychol* 68:129-135.

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

Calandreau L, Desmedt A, Decorte L, Jaffard R (2005) A different recruitment of the lateral and basolateral amygdala promotes contextual or elemental conditioned association in Pavlovian fear conditioning. *Learn Mem* 12:383-388.

Cammarota M, Bevilaqua LR, Ardenghi P, Paratcha G, Levi de Stein M, Izquierdo I, Medina JH (2000) Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. *Brain Res Mol Brain Res* 76:36-46.

Canteras NS, Swanson LW (1992) Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: a PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. *J Comp Neurol* 324:180-194.

Daumas S, Halley H, Frances B, Lassalle JM (2005) Encoding, consolidation, and retrieval of contextual memory: differential involvement of dorsal CA3 and CA1 hippocampal subregions. *Learn Mem* 12:375-382.

Davis HP, Squire LR (1984) Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull* 96:518-559.

Desmedt A, Garcia R, Jaffard R (1998) Differential modulation of changes in hippocampal-septal synaptic excitability by the amygdala as a function of either elemental or contextual fear conditioning in mice. *J Neurosci* 18:480-487.

Donley MP, Schulkin J, Rosen JB (2005) Glucocorticoid receptor antagonism in the basolateral amygdala and ventral hippocampus interferes with long-term memory of contextual fear. *Behav Brain Res* 164:197-205.

Fanselow MS (2000) Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behav Brain Res* 110:73-81.

Gale GD, Anagnostaras SG, Godsil BP, Mitchell S, Nozawa T, Sage JR, Wiltgen B, Fanselow MS (2004) Role of the basolateral amygdala in the storage of fear memories across the adult lifetime of rats. *J Neurosci* 24:3810-3815.

Goosens KA, 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.

Grecksch G, Matthies H (1980) Two sensitive periods for the amnesic effect of anisomycin. *Pharmacol Biochem Behav* 12:663-665.

Hall J, Thomas KL, Everitt BJ (2001) Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories. *J Neurosci* 21:2186-2193.

Huff NC, Frank M, Wright-Hardesty K, Sprunger D, Matus-Amat P, Higgins E, Rudy JW (2006) Amygdala regulation of immediate-early gene expression in the hippocampus induced by contextual fear conditioning. *J Neurosci* 26:1616-1623.

Igaz LM, Vianna MR, Medina JH, Izquierdo I (2002) Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *J Neurosci* 22:6781-6789.

Ito R, Robbins TW, McNaughton BL, Everitt BJ (2006) Selective excitotoxic lesions of the hippocampus and basolateral amygdala have dissociable effects on appetitive cue and place conditioning based on path integration in a novel Y-maze procedure. *Eur J Neurosci* 23:3071-3080.

Kim JJ, Koo JW, Lee HJ, Han JS (2005) Amygdalar inactivation blocks stress-induced impairments in hippocampal long-term potentiation and spatial memory. *J Neurosci* 25:1532-1539.

- Koo JW, Han JS, Kim JJ (2004) Selective neurotoxic lesions of basolateral and central nuclei of the amygdala produce differential effects on fear conditioning. *J Neurosci* 24:7654-7662.
- Lee I, Kesner RP (2004) Differential contributions of dorsal hippocampal subregions to memory acquisition and retrieval in contextual fear-conditioning. *Hippocampus* 14:301-310.
- Louie K, Wilson MA (2001) Temporally structured replay of awake hippocampal ensemble activity during rapid eye movement sleep. *Neuron* 29:145-156.
- Maren S (1999) Neurotoxic basolateral amygdala lesions impair learning and memory but not the performance of conditional fear in rats. *J Neurosci* 19:8696-8703.
- Matus-Amat P, Higgins EA, Barrientos RM, Rudy JW (2004) The role of the dorsal hippocampus in the acquisition and retrieval of context memory representations. *J Neurosci* 24:2431-2439.
- McGaugh JL (2004) The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci* 27:1-28.
- McGaugh JL, McIntyre CK, Power AE (2002) Amygdala modulation of memory consolidation: interaction with other brain systems. *Neurobiol Learn Mem* 78:539-552.
- McIntyre CK, Miyashita T, Setlow B, Marjon KD, Steward O, Guzowski JF, McGaugh JL (2005) Memory-influencing intra-basolateral amygdala drug infusions modulate expression of Arc protein in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:10718-10723.
- Muller J, Corodimas KP, Fridel Z, LeDoux JE (1997) Functional inactivation of the lateral and basal nuclei of the amygdala by muscimol infusion prevents fear conditioning to an explicit conditioned stimulus and to contextual stimuli. *Behav Neurosci* 111:683-691.
- Nader K, Majidishad P, Amorapanth P, LeDoux JE (2001) Damage to the lateral and central, but not other, amygdaloid nuclei prevents the acquisition of auditory fear conditioning. *Learn Mem* 8:156-163.
- Pape HC (2005) GABAergic neurons: gate masters of the amygdala, mastered by dopamine. *Neuron* 48:877-879.
- Perez-Villalba A, Teruel-Marti V, Ruiz-Torner A, Olucha-Bordonau F (2005) The effect of long context exposure on cued conditioning and c-fos expression in the rat forebrain. *Behav Brain Res* 161:263-275.
- Pikkarainen M, Ronkko S, Savander V, Insausti R, Pitkanen 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.
- Pitkanen A, Pikkarainen M, Nurminen N, Ylinen A (2000) Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann N Y Acad Sci* 911:369-391.

- Quevedo J, Vianna MR, Roesler R, de-Paris F, Izquierdo I, Rose SP (1999) Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learn Mem* 6:600-607.
- Ramirez-Amaya V, Vazdarjanova A, Mikhael D, Rosi S, Worley PF, Barnes CA (2005) Spatial exploration-induced arc mRNA and protein expression: evidence for selective, network-specific reactivation. *J Neurosci* 25:1761-1768.
- Ribeiro S, Gervasoni D, Soares ES, Zhou Y, Lin SC, Pantoja J, Lavine M, Nicolelis MA (2004) Long-lasting novelty-induced neuronal reverberation during slow-wave sleep in multiple forebrain areas. *PLoS Biol* 2:E24.
- Richardson MP, Strange BA, Dolan RJ (2004) Encoding of emotional memories depends on amygdala and hippocampus and their interactions. *Nat Neurosci* 7:278-285.
- Romanski LM, LeDoux JE (1992) Equipotentiality of thalamo-amygdala and thalamo-cortico-amygdala circuits in auditory fear conditioning. *J Neurosci* 12:4501-4509.
- Rose SP (2000) God's organism? The chick as a model system for memory studies. *Learn Mem* 7:1-17.
- Schafe GE, LeDoux JE (2000) Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala. *J Neurosci* 20:RC96.
- Schafe GE, Nader K, Blair HT, LeDoux JE (2001) Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. *Trends Neurosci* 24:540-546.
- Schafe GE, Atkins CM, Swank MW, Bauer EP, Sweatt JD, LeDoux JE (2000) Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning. *J Neurosci* 20:8177-8187.
- Seidenbecher T, Laxmi TR, Stork O, Pape HC (2003) Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. *Science* 301:846-850.
- Stanciu M, Radulovic J, Spiess J (2001) Phosphorylated cAMP response element binding protein in the mouse brain after fear conditioning: relationship to Fos production. *Brain Res Mol Brain Res* 94:15-24.
- Swank MW, Sweatt JD (2001) Increased histone acetyltransferase and lysine acetyltransferase activity and biphasic activation of the ERK/RSK cascade in insular cortex during novel taste learning. *J Neurosci* 21:3383-3391.
- Trifilieff P, Herry C, Vanhoutte P, Caboche J, Desmedt A, Riedel G, Mons N, Micheau J (2006) Foreground contextual fear memory consolidation requires two independent phases of hippocampal ERK/CREB activation. *Learn Mem* 13:349-358.
- Weitemier AZ, Ryabinin AE (2004) Subregion-specific differences in hippocampal activity between Delay and Trace fear conditioning: an immunohistochemical analysis. *Brain Res* 995:55-65.

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

L'objectif général de ce travail était d'examiner comment le circuit septo-hippocampo-amygdalien contribue, chez l'animal, à l'élaboration de différentes représentations mnésiques d'une expérience aversive. Des travaux antérieurs menés au laboratoire avaient conduit à proposer deux types de fonctionnement neurobiologique de ce circuit dans un conditionnement élémentaire et contextuel. Toutefois, plusieurs points importants de ce modèle devaient être soumis à une analyse fonctionnelle. Notre travail a permis de préciser les implications (i) des noyaux LA et BLA de l'amygdale et (ii) des sous-régions latérale et médiane du complexe septal dans le conditionnement classique élémentaire et contextuel. L'analyse du décours de l'activité cholinergique hippocampique selon la procédure de conditionnement a également été réalisée. Enfin, la manipulation de l'activité cholinergique hippocampique a révélé que des interactions fonctionnelles entre les différentes régions du circuit impliqué contribuent à l'acquisition (adaptée) d'un conditionnement classique aversif. Ces travaux nous permettent de compléter le modèle neurobiologique proposé. Ils confirment l'idée d'une sollicitation différentielle des régions de ce circuit selon le type de conditionnement réalisé. Ils révèlent, qu'au sein de ce circuit, chacune des régions impliquées contribue à la sélection de l'information la plus pertinente quant à l'occurrence de l'événement aversif. Enfin, ils suggèrent un rôle plus spécifique de ce circuit : le circuit septo-hippocampo-amygdalien pourrait bien constituer un système cérébral « d'évaluation probabiliste ».

1. Contribution différentielle des noyaux LA et BLA de l'amygdale au conditionnement classique aversif: vers un système d'optimisation de l'association conditionnée pertinente.

La première partie de ce travail révèle une relative dissociation fonctionnelle entre le LA et le BLA dans le conditionnement classique élémentaire et contextuel. Tout d'abord, elle confirme des données antérieures montrant qu'une lésion sélective du LA altère le conditionnement élémentaire (Nader et al., 2001). Par ailleurs, elle révèle que si l'inactivation du BLA est sans effet sur le conditionnement élémentaire, cette dernière perturbe spécifiquement le conditionnement contextuel. Ces premières données sont donc en parfait accord avec le modèle actuel de fonctionnement amygdalien dans le conditionnement classique aversif (LeDoux, 2000). Elles confirment, en effet, le rôle crucial du LA dans le conditionnement à un SC simple et confortent l'hypothèse d'un rôle déterminant du BLA dans le conditionnement contextuel.

De manière intéressante, les données de cette expérience sont relativement compatibles avec le modèle théorique de fonctionnement amygdalien récemment proposé par Yaniv et coll. (2004). En effet, les auteurs postulent que l'implication des noyaux LA et BLA est dépendante de la nature plus ou moins complexe des informations à traiter. En s'appuyant sur des données anatomiques et neurophysiologiques, ils proposent que la formation d'une association simple de type SC-SI (association entre un SC phasique, unimodal et le SI) nécessite l'intégrité du LA, alors qu'une association de type contexte-SI (association entre un ensemble d'indices contextuels polymodaux et statiques et le SI) nécessite celle du BLA. En accord avec ce modèle, nous montrons que le LA est bien requis en situation d'*appariement* dans la formation d'une association simple de type SC-SI (i.e. son-choc). Toujours en accord avec ce modèle, les effets délétères de l'inactivation du LA sur le conditionnement au contexte (i.e. *non-appariement*) pourraient révéler une implication de ce noyau dans la formation d'associations entre des indices simples du contexte et le SI. Enfin, le BLA, quelle que soit la procédure de conditionnement, serait requis pour la formation d'une association entre une représentation relativement intégrée du contexte de conditionnement et le SI.

Néanmoins, une donnée importante de notre expérience permet de compléter le modèle proposé. Notre étude révèle en effet que l'inactivation du LA a des effets opposés sur le conditionnement contextuel selon le type de conditionnement considéré. Ainsi, si le rôle du LA devait se limiter à la seule formation d'associations simples (de type son-choc et indices contextuels simples-choc) son inactivation aurait du, quelle que soit la procédure de

conditionnement utilisée, produire des effets identiques (i.e. délétères) sur le conditionnement contextuel. L'effet opposé de l'inactivation du LA sur la RCE au contexte selon le type de conditionnement utilisé (baisse de la RCE en situation de *non appariement* et potentialisation en situation d'*appariement*) suggère en réalité qu'un autre critère semble être déterminant pour le fonctionnement du système amygdalien dans le conditionnement classique: le caractère plus ou moins «prédictible» de l'expérience aversive.

Ainsi, dans le cas où un stimulus simple et phasique (i.e. le SC, le son) prédit la survenue de l'événement aversif (i.e. le SI, le choc électrique) le LA est non seulement requis pour la formation de l'association simple SC-SI mais inhibe également la formation de l'association contexte-SI dépendante de l'intégrité du BLA. En revanche, lorsqu'aucun stimulus simple ne prédit la survenue de l'événement aversif (*non appariement SC-SI*, dans ce cas l'élément le plus prédictif de l'occurrence du SI est le contexte), le LA et le BLA sont tous deux requis de manière équivalente pour l'établissement d'un conditionnement optimal au contexte. Il est à noter que les données immunohistochimiques issues de nos expériences ultérieures (cf. Articles 3 et 4) confortent cette proposition. En effet, une activation de ERK1/2 plus importante dans le LA que dans le BLA est constatée après un *appariement* (i.e. situation où le SC prédit la survenue du SI), donnée compatible dans ce cas avec l'idée d'une possible inhibition du BLA par le LA. A l'inverse, une activation similaire de ERK1/2 au sein des deux noyaux est constatée après un *non appariement* (i.e. le SC ne prédit pas l'occurrence du choc, le contexte est au premier plan) indiquant dans ce cas une possible coopération entre ces deux noyaux.

L'ensemble de ces données indique donc, qu'en fonction du degré de prédictibilité du SC quant à l'occurrence du SI, un fonctionnement spécifique du complexe LA/BLA est observé. Le fonctionnement amygdalien contribue, dans chacune des situations, à favoriser le traitement de l'élément le plus prédictif de l'occurrence du SI (le son ou le contexte). Ainsi, ces résultats nous permettent de proposer que lorsque l'expérience de conditionnement est «prédictible» (i.e. un SC prédit systématiquement la survenue du SI) une compétition LA/BLA contribue à optimiser le SC simple et discret comme élément le plus prédictif de l'occurrence du SI au détriment des indices contextuels moins prédictifs. En revanche, lorsque le SC ne prédit pas la survenue du SI, une coopération LA/BLA contribuerait à optimiser le traitement du contexte comme élément le plus prédictif, au détriment du traitement du SC simple.

En résumé, l'amygdale ne serait pas seulement le site privilégié pour la formation des différentes associations (i.e. associations simples SC-SI vs. contexte-SI) mais contribuerait également à un *processus d'optimisation* (via des processus de compétition vs. coopération) de l'association la plus pertinente en fonction du degré de prédictibilité du SC. Ce processus d'optimisation conduirait finalement à l'expression de *réponses comportementales émotionnelles adaptées* à la situation expérimentale (RCE de peur prédominante au SC simple ou au contexte de conditionnement).

2. Contribution différentielle du complexe septal au conditionnement classique aversif en fonction de la procédure utilisée.

L'inactivation du SL abolit la RCE au son chez les animaux soumis à une procédure d'*appariement* et altère la RCE au contexte chez ceux soumis à un *non appariement*. En d'autres termes, l'inactivation du SL perturbe l'établissement du conditionnement au stimulus le plus prédictif de l'occurrence du SI. Ces données sont en accord avec des études préalables montrant que les neurones du SL ont une activité différente selon qu'un CS prédit ou non la survenue d'un SI (Thomas et al., 1988). Elles sont également en accord avec des données montrant différents niveaux d'excitabilité de la voie HPC-SL selon le type de conditionnement (*appariement* ou *non appariement*) (Desmedt et al., 1998 ; 2003). Enfin, ces données confirment les résultats d'une étude précédente (Desmedt et al., 1999) qui montre qu'une manipulation pharmacologique indirecte de la neurotransmission glutamatergique au sein du SL peut abolir le conditionnement au son ou au contexte et qui indique un rôle critique du SL dans l'acquisition du conditionnement au stimulus le plus prédictif de l'occurrence du SI.

Toutefois, l'inactivation du SL n'altère pas la différence d'amplitude de la RCE au contexte en fonction du type de conditionnement. En effet, les animaux ayant reçu une injection de lidocaïne et soumis à une procédure de *non appariement* expriment toujours une RCE au contexte plus importante que celle exprimée par des animaux soumis à une procédure d'*appariement*. Il est important de noter qu'au contraire, si l'inactivation du SM n'a pas d'effet sur le conditionnement au son, elle perturbe spécifiquement ce conditionnement approprié au contexte (i.e. dépendant de la procédure). En particulier, elle diminue la RCE au contexte chez les animaux soumis à un *non appariement*, alors qu'elle potentialise cette RCE après un *appariement*. On constate ainsi que les animaux ayant reçu une injection de lidocaïne dans le SM et soumis à une procédure d'*appariement* expriment à la fois une RCE au son et

au contexte importante. A l'inverse, ceux soumis à un *non appariement* n'expriment pas de RCE au son et une faible RCE au contexte. En d'autres termes, quelle que soit la procédure utilisée, les animaux ayant reçu l'injection de lidocaïne semblent incapables d'évaluer correctement la pertinence des stimuli prédictifs de l'occurrence du SI. De manière cohérente avec nos observations, Mc Alonan et coll. (1995) montrent que lorsqu'un SC prédit un événement aversif, la lésion du SM n'a pas d'effet sur le conditionnement élémentaire alors qu'elle potentialise le conditionnement au contexte. Sur cette base, les auteurs postulent que le SM, via les projections cholinergiques hippocampiques, contribuerait à diminuer le traitement de l'information non pertinente (i.e. diminution du conditionnement au contexte quand le SC prédit la survenue du SI). En accord avec cette proposition, nos travaux révèlent que si le SM contribue à diminuer le traitement des informations non pertinentes (i.e. masquage des indices contextuels) lorsque le SI est prédit par un SC simple et phasique, il participe, en revanche, directement au traitement des informations contextuelles lorsqu'aucun SC simple, phasique, ne prédit la survenue du SI. Ainsi, ces données indiquent qu'au cours d'un conditionnement classique aversif, le SM contribue au traitement approprié des informations contextuelles. En particulier, selon la valeur prédictive du SC, il permet de placer les informations contextuelles au premier plan (*non appariement*) ou en arrière plan (*appariement*) relativement au SC simple et phasique. Ce processus contribuerait au final à la sélection de l'information la plus pertinente de l'occurrence de l'événement aversif.

En résumé, l'expérience d'inactivation des sous-régions latérale et médiane du complexe septal révèle que ces deux régions sont impliquées dans la détection des stimuli prédictifs d'un SI aversif au cours d'un conditionnement classique. Toutefois, elle indique également un rôle dissocié de chacune de ces régions : le septum latéral serait critique pour l'acquisition du conditionnement au stimulus simple et phasique. En revanche, le septum médian contribuerait au traitement approprié des informations contextuelles (indices contextuels placés au premier plan ou en arrière plan) en fonction de la valeur prédictive du SC simple.

3. Sollicitation de la voie S-HPC cholinergique dans le conditionnement classique aversif : élaboration d'une représentation « intégrée » de l'expérience.

Des travaux préalables menés au laboratoire ont abouti à un modèle de fonctionnement hippocampique cohérent avec celui proposé par G. Buzáki (1989 ; 1990) et dont l'intérêt

majeur réside, pour nous, dans le fait que les afférences sous-corticales sont prises en considération (Marighetto et al., 1993). Selon les auteurs, un « mode ouvert » de fonctionnement hippocampique serait critique à la mise en relation d'informations discontinuës, dans le temps ou dans l'espace. Les influences sous-corticales, telles que les afférences cholinergiques, contribueraient directement à ce mode de fonctionnement en permettant le stockage temporaire des informations, facilitant ainsi leur mise en relation. Nous avons montré, par microdialyse intra-cérébrale, qu'une activité cholinergique plus soutenue est observée lors d'un conditionnement préférentiel au contexte (vs. un conditionnement préférentiel au son). La manipulation pharmacologique de cette activité révèle que son niveau semble causalement relié à l'établissement d'un conditionnement préférentiel au SC simple ou au contexte. En effet, l'injection de physostigmine intra-hippocampique favorise l'acquisition d'un conditionnement préférentiel au contexte alors que l'injection de scopolamine bloque non seulement le conditionnement au contexte mais mime également l'acquisition d'un conditionnement élémentaire.

Ces données indiquent donc que l'activation du système cholinergique est nécessaire à un traitement privilégié des informations contextuelles. En accord avec le modèle de fonctionnement proposé par Marighetto et coll. (1993), elles suggèrent que l'activation de la voie cholinergique S-HPC serait critique à la mise en relation des différents indices constitutifs du contexte d'apprentissage et contribuerait à l'établissement d'une représentation relativement intégrée ou « configurale » de ce contexte. Ainsi, une activité cholinergique soutenue serait favorable à un traitement privilégié des indices contextuels et, par voie de conséquence, à l'établissement d'une représentation où le contexte constitue le « prédicteur majeur » de l'occurrence du SI aversif. Une moindre activation cholinergique serait, elle, favorable à la conservation d'une représentation où le SC simple et phasique constitue le « prédicteur majeur » de la survenue du SI (au détriment des indices contextuels).

Il est important de noter que le modèle de fonctionnement hippocampique proposé par Marighetto et coll. (1993) postule également que le désengagement de la modulation cholinergique hippocampique est également important puisqu'il détermine le type d'information devant être conservé. Lorsque l'apprentissage est basé sur des informations stables et invariantes (e.g. la position du renforcement est la même d'un essai à l'autre) les auteurs constatent une désactivation rapide de la modulation cholinergique. A l'inverse, lorsque les informations sont variantes (e.g. la position du renforcement change d'un essai à l'autre, elle est difficile à prédire) un retour plus lent au niveau basal est constaté. Selon ces observations, la cinétique d'activation du système cholinergique (activation puis

désactivation) serait donc (i) dépendante du caractère plus ou moins prédictible de l'expérience et (ii) critique à l'élaboration de représentations appropriées de l'expérience.

De manière cohérente avec cette hypothèse, nous avons montré que le niveau d'activité cholinergique hippocampique contraint bien les phénomènes de plasticité impliqués dans la consolidation d'un conditionnement élémentaire ou contextuel. En particulier, nous montrons que l'injection de scopolamine ou de physostigmine intra-hippocampique contraint le niveau d'expression de p-ERK1/2 au sein du CA1, niveau d'expression critique à la consolidation d'un conditionnement préférentiel au SC simple ou au contexte (Trifilieff et al., 2006 ; Trifilieff, 2006). En effet, des études spécifiques, portant sur le rôle de la voie des MAPK/ERK dans la consolidation d'un conditionnement, ont révélé que l'expression de p-ERK1/2 hippocampique était plus soutenue (pics d'activation plus ample ; activation biphasique) dans le cas d'un conditionnement préférentiel au contexte (vs. un conditionnement élémentaire) révélant ainsi une cinétique différente des mécanismes de consolidation selon le type de conditionnement réalisé (Trifilieff et al., 2006 ; article 4).

Ainsi, nos travaux indiquent que lorsque le SC ne prédit pas la survenue du SI, une activation forte de la modulation cholinergique hippocampique détermine le patron spécifique d'expression de p-ERK1/2 au sein de cette structure (forte activation de ERK1/2, activation biphasique). Ces mécanismes contribuent alors directement à la consolidation d'une représentation mnésique où le contexte est un « prédicteur majeur » de l'occurrence du SI. A l'inverse, lorsque le SC prédit la survenue du SI, une moindre activité cholinergique est observée. Cette moindre activité est alors associée à un patron spécifique des phénomènes de plasticité (plus faible activation de ERK1/2, voire transitoire), patron critique à la consolidation d'une représentation mnésique où le SC simple constitue le « prédicteur majeur » de l'occurrence du SI aversif.

En résumé, l'ensemble de ces données supporte l'idée selon laquelle la modulation cholinergique hippocampique détermine, via son action sur les phénomènes de plasticité, la formation d'une représentation de l'expérience aversive où soit le contexte soit le SC simple constitue le « prédicteur majeur » de l'occurrence du SI. Il est important de noter que cette hypothèse est confortée par plusieurs expériences menées durant notre travail de thèse. Premièrement, l'inactivation du SM, privant (au moins en partie) l'hippocampe de cette modulation cholinergique sous-corticale, et par voie de conséquence, bloquant l'établissement d'une représentation intégrée de l'expérience aversive, produit bien une incapacité des animaux à traiter de manière appropriée le son ou le contexte comme prédicteur majeur de la

survenue du SI. Deuxièmement, la manipulation pharmacologique de la modulation cholinergique hippocampique indique que le niveau d'activité de cette modulation contraint les phénomènes de plasticité hippocampique et est causalement relié à la sélection appropriée du son ou du contexte comme « prédicteur majeur » de la survenue du SI. Enfin, cette hypothèse rend également compte des résultats d'une étude comportementale que nous avons menée chez des animaux âgés (Annexes, Figure 1). En effet, chez ces animaux, dont une des atteintes neurobiologiques caractéristiques est l'altération du système cholinergique hippocampique, nous avons pu constater un déficit majeur dans la capacité à détecter de manière appropriée le stimulus le plus prédictif de l'occurrence du SI. En particulier, les animaux âgés soumis à un conditionnement préférentiel au contexte (i.e. *non appariement SC-SI*) se conditionnent non seulement au contexte d'apprentissage mais également au SC simple, phasique, pourtant non prédictif dans ce cas de l'occurrence du SI.

Plus généralement, cette interprétation de nos résultats est également compatible avec un ensemble de propositions théoriques postulant un rôle de la formation hippocampique dans l'élaboration de représentations relativement intégrées et complexes de l'expérience (Sutherland & Rudy, 1989 ; Eichenbaum et al., 1992 ; White & McDonald, 2002). Cette représentation dépendante de l'intégrité hippocampique, en interagissant avec des représentations plus simples réalisées au niveau amygdalien, contribuerait spécifiquement au fonctionnement d'un système hippocampo-amygdalien de sélection des informations pertinentes.

4. Interactions hippocampo-amygdaliennes : vers un système neurobiologique de sélection des informations pertinentes.

La plupart des études ayant abordé la question des relations entre l'hippocampe et l'amygdale dans des apprentissages émotionnellement connotés se sont focalisées sur l'influence de l'amygdale sur des régions clefs de la mémoire comme l'hippocampe. Comme nous l'avons précisé en introduction, les études menées par l'équipe de McGaugh ont permis d'aboutir à un modèle de fonctionnement décrivant les mécanismes de la modulation amygdalienne (McGaugh, 2004). Toutefois, un certain nombre d'expériences indique que les relations entre l'hippocampe et l'amygdale sont plus complexes que ce que nous propose ce modèle. McDonald & White (1993 ; 1995) ont montré qu'un apprentissage dépendant de l'intégrité de l'amygdale (conditionnement de place) était facilité lorsque l'animal avait une

représentation spatiale de l'environnement dans lequel il se déroule. Ils ont également montré que la lésion du fornix supprime une telle facilitation (White & McDonald, 1993). Les auteurs révèlent qu'une représentation spatiale de l'environnement, qui dépend de l'intégrité de l'hippocampe, peut influencer un apprentissage qui dépend de l'amygdale, indiquant ainsi, l'existence d'influences possibles de l'hippocampe sur le fonctionnement amygdalien (pour revue cf. White & McDonald, 2002). Plusieurs études d'imagerie cérébrale ont confirmé l'existence d'une telle influence de l'hippocampe (Ochsner et al., 2002 ; Schaefer et al., 2002 ; Phelps, 2004 ; Smith et al., 2006). En particulier, dans une étude neuropsychologique élégante, Phelps et coll. (2001) ont montré qu'il suffit qu'un patient soit informé de la règle d'apprentissage d'un conditionnement classique (i.e. on informe le patient qu'une diapositive bleue, le SC, sera suivi d'un SI aversif) pour que celui-ci exprime, ultérieurement, une RCE lors de la présentation du SC. En d'autres termes, lorsque le patient peut établir une représentation épisodique de la relation entre le SC et un SI (représentation dépendant de l'intégrité de la formation hippocampique), cette dernière influence le fonctionnement amygdalien (l'expression de RCE) alors même qu'aucun SI n'est délivré.

En accord avec ces données, notre travail révèle l'existence d'une influence de l'hippocampe sur le fonctionnement amygdalien dans le conditionnement classique. En effet, nous montrons que la manipulation pharmacologique de la modulation cholinergique hippocampique influence les mécanismes de plasticité amygdaliens. En particulier, l'injection de scopolamine intra-hippocampique induit, chez des animaux pourtant soumis à un conditionnement préférentiel au contexte, un patron d'expression de p-ERK1/2 au sein du LA/BLA normalement observé chez des animaux soumis à un conditionnement préférentiel au SC simple et phasique (i.e. LA>BLA). A l'inverse, l'injection intra-hippocampique de physostigmine induit, chez des animaux pourtant soumis à un conditionnement préférentiel au SC simple, un patron d'expression normalement observé chez ceux soumis à un conditionnement préférentiel au contexte (i.e. LA=BLA).

Ces nouvelles données révèlent deux informations importantes. Tout d'abord, elles indiquent que chez un animal normal, l'activité cholinergique hippocampique détermine la mise en jeu de phénomènes de plasticité hippocampo-amygdaliens spécifiques du type de conditionnement : (i) une « faible » activation de ERK1/2 au sein du CA1 et un patron d'expression « LA>BLA » est associé à un conditionnement préférentiel au SC simple tandis que (ii) une « forte » activation de ERK1/2 au niveau du CA1 et un patron d'expression « LA=BLA » est associé à un conditionnement préférentiel au contexte. Notons, que l'étude plus spécifique de la cinétique d'activation de ERK1/2 au sein des sous-régions

hippocampiques et des noyaux amygdaliens (Trifilieff, 2006 ; article 4) confirme cette idée puisqu'elle montre directement un recrutement différentiel des phénomènes de plasticité au sein d'un réseau hippocampo-amygdalien selon le type de conditionnement considéré.

Ces données suggèrent donc que la modulation cholinergique hippocampique régule le fonctionnement d'un système hippocampo-amygdalien visant à détecter et à sélectionner le stimulus (le son ou le contexte) le plus prédictif de l'occurrence de l'événement aversif. Confirmant cette idée, notre travail montre que des dérégulations de la modulation cholinergique hippocampique induisent non seulement des altérations des phénomènes de plasticité au sein du système hippocampo-amygdalien, mais aussi une sélection erronée des informations considérées comme pertinentes. En effet, une diminution de cette modulation (scopolamine) mime, au niveau du patron d'expression de p-ERK1/2 hippocampo-amygdalien et au plan comportemental, l'établissement d'un conditionnement préférentiel au SC simple. Tout ce passe comme si les animaux ayant reçu une injection de scopolamine, sélectionnaient « subjectivement » le SC comme prédicteur majeur de la survenue de l'événement aversif en dépit du fait que ce SC simple ne prédit pas « objectivement » la survenue du SI. A l'inverse, l'augmentation de cette modulation mime, tant au plan immunohistochimique qu'au plan comportemental, l'établissement d'un conditionnement préférentiel au contexte. Dans ce cas, alors que le SC phasique est objectivement prédictif de la survenue du SI, les animaux sélectionnent le contexte comme prédicteur majeur.

En résumé, nos résultats montrent que la modulation cholinergique hippocampique influence les phénomènes de plasticité (consolidation) au sein d'un réseau hippocampo-amygdalien et que cette influence contribue à la sélection du stimulus le plus prédictif de la survenue du SI (le son ou le contexte). Ils indiquent également que des manipulations de cette modulation induisent des dysfonctionnements au sein de ce système pouvant conduire à une sélection *subjective* de « prédicteurs » pourtant non pertinents d'un point de vue *objectif* (au regard de la règle d'apprentissage). Finalement, l'ensemble de ces données suggère que le système septo-hippocampo-amygdalien constitue un véritable circuit neurobiologique « d'évaluation probabiliste ».

5. Modèle d'analyse : fonctionnement du circuit septo-hippocampo-amygdalien dans le conditionnement classique.

L'ensemble de ces études nous permet de compléter le modèle d'analyse, définissant deux modes de fonctionnement d'un circuit cérébral incluant le système septo-hippocampique et le complexe amygdalien dans l'établissement d'un conditionnement élémentaire et contextuel (Desmedt et al., 1999 ; Desmedt, 2000).

Dans le cas d'un conditionnement élémentaire (*appariement SC-SI*) nous montrons que le LA est requis pour la formation de l'association simple entre le son et le SI alors que le BLA est requis pour la formation de l'association entre le contexte et le SI. Des mécanismes de compétition entre ces deux noyaux contribueraient à l'amplification de l'association simple SC-SI au détriment de l'association contexte-SI. Ce processus conduirait ainsi à la sélection puis à l'amplification du SC simple comme prédicteur majeur de l'occurrence du SI (le contexte est alors relégué à l'arrière plan). Dans le cas d'un conditionnement contextuel (*non appariement SC-SI*), chacun des noyaux coopéreraient à l'établissement d'un conditionnement préférentiel au contexte (contexte au premier plan) (Figure 8).

Ce modèle proposait que, dans le cas d'un conditionnement élémentaire, un accroissement de la transmission glutamatergique HPC-SL, favorisé par une libération intra-septale d'AVP induirait, via une transmission GABAergique, une diminution de l'activité des neurones cholinergiques de la région SM/BDB, et donc une diminution de la transmission cholinergique S-HPC. Par contre, dans le cas d'un conditionnement contextuel, une dépression de la transmission glutamatergique HPC-SL induirait, via un mécanisme inverse au précédent, un accroissement de la transmission cholinergique S-HPC et, par voie de conséquence, conduirait à une prise en compte plus importante des stimuli contextuels au détriment du SC discret. Nos travaux révèlent effectivement une implication différentielle du système septo-hippocampique selon le type de conditionnement réalisé. En particulier, en situation de *non appariement*, une activation soutenue de la modulation cholinergique permettrait le stockage temporaire des indices contextuels et contribuerait à l'élaboration d'une représentation relativement intégrée (configurale) du contexte de l'expérience aversive. Nous montrons également que cette activation cholinergique détermine le fonctionnement des phénomènes de plasticité nécessaire à l'élaboration d'une représentation de l'expérience aversive où le contexte constitue le prédicteur majeur de la survenue du SI. A l'inverse, en situation d'*appariement*, une moindre activation cholinergique paraît requise pour la

formation d'une représentation de l'expérience ou le SC simple et phasique constitue le prédicteur majeur de la survenue du SI.

Enfin, nos résultats indiquent que la modulation cholinergique hippocampique contraint les phénomènes de plasticité au sein du réseau hippocampo-amygdalien. Une forte activation cholinergique hippocampique contraint non seulement les phénomènes de plasticité hippocampique (augmentation de l'activation de ERK1/2 au sein du CA1) mais également ceux du complexe amygdalien (patron d'expression de p-ERK1/2 LA=BLA) de telle sorte que le fonctionnement du réseau contribue, dans ce cas, à sélectionner et à traiter le contexte comme prédicteur majeur de la survenue du SI. A l'inverse, une moindre activation cholinergique contraint les phénomènes de plasticité au sein de ce réseau (faible activation de ERK1/2 au sein du CA1 ; patron d'expression de p-ERK1/2 LA>BLA) de telle sorte qu'il contribue à sélectionner le SC simple et phasique comme stimulus le plus prédictif de la survenue du SI. Nos résultats indiquent donc que les systèmes septo-hippocampique et amygdalien interagissent et qu'ils constituent un véritable circuit neurobiologique d'attribution d'une valeur informative (ou prédictive) prédominante au SC discret ou au contexte en fonction du degré de contingence entre le SC et le SI aversif. Les RCE résultant de ces processus sont alors respectivement prédominantes au SC discret ou au contexte.

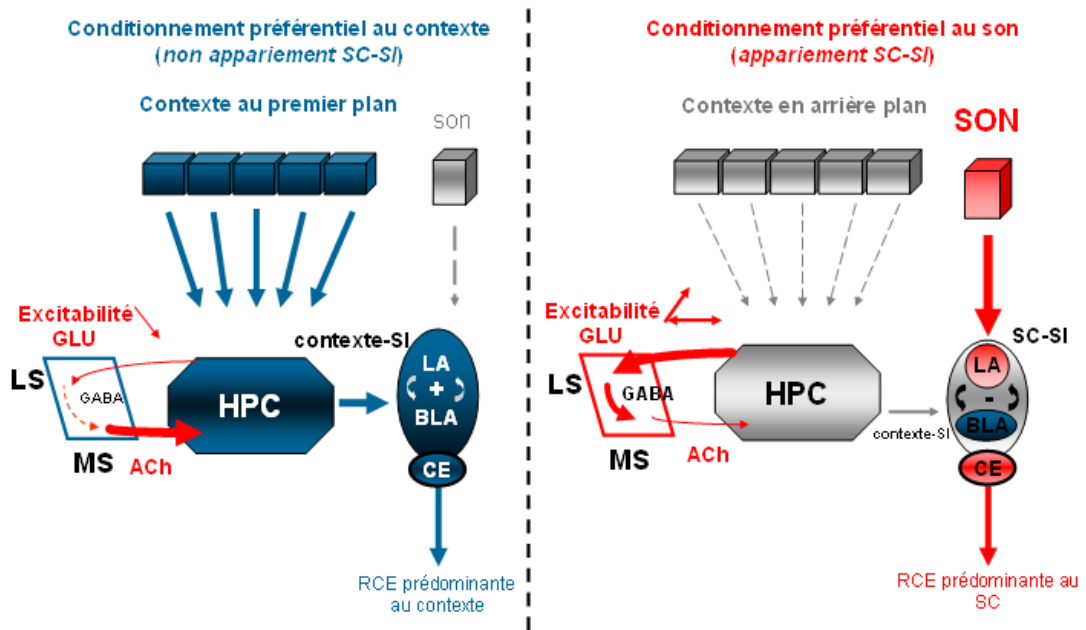


Figure 8 : Fonctionnement du circuit septo-hippocampo-amygdalien dans le conditionnement classique. Dans le cas d'un conditionnement préférentiel au contexte, une transmission importante de la voie SM/BDB contribue au traitement des indices contextuel et à la formation d'une représentation intégrée du contexte (prédictif dans ce pas de l'occurrence du SI). Cette activité cholinergique hippocampique soutenue contraint les phénomènes de plasticité au sein du réseau hippocampo-amygdalien. En particulier, une coopération entre le LA et le BLA permet d'optimiser l'association contexte-SI. L'ensemble de ces mécanismes contribue à la formation d'une représentation de l'expérience aversive où le contexte consitue le prédicteur majeur de la survenue du SI. Dans le cas d'un conditionnement préférentiel au son, une plus faible transmission de la voie SM/BDB est constatée (dans ce cas le SC simple est meilleur prédicteur de l'occurrence du SI que le contexte). Cette plus faible activité cholinergique hippocampique, associée à une compétition entre les noyaux LA (dont l'intégrité est requise pour l'association simple SC-SI) et BLA (dont l'intégrité est requise pour l'association contexte-SI) contribuent à l'établissement d'une représentation de l'expérience aversive où le SC simple est le prédicteur majeur de la survenue du SI.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

1. Contrôle putatif du cortex préfrontal sur l'activité amygdalienne sous tendant un conditionnement élémentaire ou contextuel.

De nombreux points de ce circuit putatif reste bien évidemment à soumettre à une analyse fonctionnelle. En particulier, nos travaux nous ont conduit à proposer deux modes de fonctionnement amygdalien selon la valeur prédictive du SC qui, via des processus de compétition ou de coopération, contribuent à la sélection et à l'optimisation de l'association pertinente. Cette proposition soulève selon nous une question importante. Quels mécanismes déterminent l'un ou l'autre de ces modes de fonctionnement ? Des données relativement récentes de la littérature, impliquant le cortex préfrontal et un groupement cellulaire dense de neurones GABAergiques au niveau de l'amygdale dans l'extinction de la peur apprise, nous semble particulièrement pertinentes pour tenter de répondre à ces questions (Paré et al., 2004).

Ces données indiquent que l'activation du cortex préfrontal est nécessaire à la consolidation de l'extinction de la peur apprise (Herry & Garcia, 2002 ; Milad & Quirk, 2002 ; Herry & Garcia, 2003). En particulier, l'activation des neurones glutamatergiques du cortex préfrontal (PFC) contribuerait, via son action sur un ensemble de cellules GABAergiques (ITC, intercalated cell masses) situées entre le complexe basolatéral (BLC) et le noyau central (CE), à la régulation des mécanismes de plasticité entre le BLC et le CE et, par voie de conséquence, à la consolidation de l'extinction de la peur apprise à un SC (Paré & Smith, 1993 ; Royer et al., 1999). En effet, les ITC assurent une connexion de type « excitatrice » entre le BLC et le CE par l'intermédiaire de deux interneurones GABAergiques entre les deux régions. Au cours de l'extinction, la présentation d'un SC seul (i.e. délivré sans le SI) activerait des neurones du BLC. Cette activation ne serait plus transmise aux neurones du CE puisque l'action « excitatrice » des ITC serait altérée par l'activation du PFC. Au final, l'activation du PFC, diminuerait (voire bloquerait) celle des neurones du CE normalement activés par le SC conduisant ainsi à affaiblir l'activité des

neurones du CE. Paré et coll. (2004) proposent que ce mécanisme contribuerait à diminuer la RCE induite par la présentation du SC mais aussi à la consolidation de l'extinction de la peur apprise au SC.

Bien que très hypothétique, une activation différentielle du PFC selon le type de conditionnement pourrait à la fois rendre compte (i) des processus d'amplification de l'association pertinente (SC-SI ou contexte-SI) constatés dans nos deux situations et (ii) de la mise en jeu de deux modes de fonctionnement amygdalien selon la valeur prédictive du SC.

Ainsi, dans le cas d'un conditionnement élémentaire (i.e. le SC prédit la survenue du SI) aucune activation du PFC ne serait observée. Dans ce cas, les neurones du BLC activés par le SC simple (principalement situés au sein du LA) ou par les indices contextuels (principalement situés au sein du BLA, site de projection privilégié des afférences hippocampiques), activerait les ITC qui, en retour, projettent sur les neurones du CE. La coïncidence systématique, au niveau des neurones du CE, entre l'activation induite par le SC et la dépolarisation induite par le SI conduirait à la formation d'une association SC-SI forte (relativement à l'association contexte-SI).

Un conditionnement préférentiel au contexte (i.e. situation où le SC n'est pas immédiatement suivi du SI, situation comparable à celle de l'extinction) serait lui associé à une activation du cortex préfrontal transitoire. En particulier, l'activation du PFC induite par la présentation d'un SC non contiguë du SI, diminuerait (bloquerait), via son action sur les ITC, la coïncidence entre les activations induites par le SC d'une part et celles induites par le SI d'autre part (au sein des neurones du CE). Une fois l'action inhibitrice du PFC levée, ce mécanisme conduirait alors à augmenter la coïncidence entre les activations induites par les indices contextuels et celles induites par le SI. Dans ce cas, les activations induites par les indices contextuels étant plus importantes (nous avons vu que l'activation hippocampique était plus importante dans cette situation) ce mécanisme contribuerait à l'établissement d'une association contexte-SI maximale.

En résumé, une activation différentielle du PFC selon la valeur prédictive du SC pourrait, via les ITC, déterminer le fonctionnement amygdalien afin que le SC ou le contexte soit sélectionné comme information la plus pertinente quant à la survenue de l'événement aversif.

2. Régulation du système septo-hippocampique.

Nous avons montré que l'activité cholinergique septo-hippocampique était différente selon le type de conditionnement. Cette activité cholinergique différentielle est, selon le modèle proposé, régulée par le fonctionnement d'une boucle hippocampo-septo-hippocampique. En particulier un conditionnement élémentaire serait associé à une augmentation de la transmission glutamatergique HPC-SL qui, en activant des neurones GABAergiques, diminuerait l'activité cholinergique SM/BDB-HPC. Par contre, dans le cas d'un conditionnement contextuel, une dépression de la transmission glutamatergique HPC-SL induirait, via un mécanisme inverse au précédent, un accroissement de la transmission cholinergique SM/BDB-HPC. Le fonctionnement différentiel proposé de la boucle hippocampo-septo-hippocampique est en partie basé sur des études préalables menées au laboratoire montrant que l'administration de glutamate dans le SL tend à diminuer le SDHACU dans l'hippocampe. Par ailleurs, l'injection bilatérale dans le SL de kynurénate (antagoniste des sites glycine des récepteurs NMDA) ou d'AP5 (antagoniste des récepteurs NMDA) provoque une augmentation du SDHACU (Marighetto et al., 1994). Ces résultats avaient par ailleurs été confortés par une autre étude montrant que l'infusion intra-septale à travers une sonde de dialyse de CPP (antagoniste NMDA) s'accompagne d'une augmentation de la libération d'ACh dans l'hippocampe (Giovannini et al., 1994). Toutefois, d'autres données semblent relativement incompatibles avec l'hypothèse selon laquelle l'activation des récepteurs glutamatergiques induirait une inhibition des neurones cholinergiques SM/BDB. Par exemple, Moor et coll. (1994) montrent que l'infusion intra-septale d'agonistes glutamatergiques produit une augmentation importante de la libération d'ACh dans l'hippocampe. Costa et coll. (1983) avait également montré que l'injection intra-septale de kaïnate ne modifiait pas le taux de renouvellement de l'ACh dans l'hippocampe.

Face à ces résultats apparemment contradictoires, nous avons testé l'effet d'injection d'agonistes et d'antagonistes des récepteurs glutamatergiques dans le SL (i) sur l'acquisition d'un conditionnement élémentaire et contextuel et (ii) sur l'activation des cellules cholinergiques du SM/BDB (Desgranges, 2004 ; Desmedt et al., (2005)). Immédiatement avant le conditionnement, les animaux ont reçu une injection bilatérale de kynurénate, d'acide glutamique ou de solution saline dans le SL. La moitié des animaux a été sacrifiée 90 minutes après le conditionnement pour une analyse immunohistochimique. L'utilisation d'un double marquage Zif268/ChAT au niveau du SM/BDB devait nous permettre d'évaluer l'activité des neurones cholinergiques à la suite des injections. L'autre moitié des animaux à

été soumise aux deux tests, le lendemain, afin de vérifier l'acquisition du conditionnement au son et au contexte.

Les résultats comportementaux révèlent que l'administration d'acide glutamique (Annexes, figure 2) mime l'établissement d'un conditionnement élémentaire (dans une situation de *non appariement*), alors que l'administration de kynurénate bloque le conditionnement élémentaire (dans une situation d'*appariement*) tout en préservant le conditionnement au contexte (dans les deux situations) (Annexes, figure 3). L'analyse immunohistochimique révèle que l'injection de kynurénate (Annexe, figure 5), quel que soit le type de conditionnement, augmente le pourcentage de neurones cholinergiques (ChAT+) exprimant Zif268. L'injection de glutamate (Annexes, figure 4) n'a pas d'effet sur le pourcentage de co-localisation Zif268/ChAT mais réduit le nombre de neurone ChAT+ au niveau du SM.

Dans leur ensemble, ces données supportent donc l'hypothèse qu'un accroissement de l'activité glutamatergique dans le SL contribue (i) à diminuer l'activité cholinergique dans le SM/BDB et (ii) promeut un conditionnement élémentaire. Au contraire, une diminution de cette activité (injection d'acide glutamique) contribuerait (i) à accroître l'activité cholinergique dans le SM/BDB tout en (ii) promouvant un conditionnement au contexte.

En résumé, si ces résultats ne constituent pas un argument définitif en faveur du rôle inhibiteur des afférences glutamatergiques (via des interneurons GABAergiques) sur les neurones cholinergiques du SM/BDB, ils confortent néanmoins cette hypothèse. Des études complémentaires, couplant des injections d'agonistes ou d'antagonistes glutamatergiques (intra-SL) à la technique de microdialyse cholinergique intra-hippocampique dans nos deux situations comportementales, permettraient une validation plus directe de cette hypothèse.

3. Contingence et conditionnement : manipulation de l'évaluation subjective d'une expérience émotionnelle.

En introduction, nous présentions de façon simplifiée quelques théories permettant de rendre compte de l'établissement d'un conditionnement classique. Selon Rescorla (1968 ; 1972), la valeur informative, ou valeur prédictive des stimuli présents lors de l'épreuve, détermine la part de force associative qu'ils vont acquérir. Les stimuli présentant une valeur prédictive plus importante vont, au fil de l'apprentissage, acquérir une force associative

croissante impliquant une réduction progressive de la force associative des autres stimuli moins prédictifs. Selon cette théorie, la valeur prédictive *subjective* (évaluée par la mesure de la RCE) du SC quant à l'occurrence du SI est directement liée à sa valeur *objective* (dépendante de la règle de contingence imposée à l'animal). Plusieurs données présentées dans ce manuscrit semblent en contradiction avec de tels énoncés issus de la psychologie expérimentale.

Nous montrons, par exemple, qu'une augmentation de la transmission cholinergique hippocampique est associée à la sélection et au traitement du contexte comme « prédicteur majeur » de l'occurrence du SI alors même que les animaux sont soumis à une procédure de conditionnement dans laquelle le SC est *objectivement* le stimulus le plus prédictif de la survenue du SI (*appariement SC-SI*). Inversement, une diminution de la modulation cholinergique hippocampique est associée à la sélection du SC simple comme « prédicteur majeur » alors même que les animaux sont soumis à un conditionnement préférentiel au contexte. De manière intéressante, nous avons également montré que cette sélection « erronée » du SC simple ne semble pas être attribuable à une peur généralisée à tout stimulus simple, phasique, ou encore à une réaction aspécifique à la présentation d'un stimulus saillant puisque ces animaux n'expriment aucune réponse de peur à un SC simple, phasique et saillant autre que le SC.

Il est à noter qu'un tel traitement « erroné » de la valeur prédictive des stimuli avait déjà été observé dans nos conditions expérimentales. Ainsi, l'injection d'un agoniste ou d'un antagoniste vasopressinergique dans le SL avant l'épreuve de conditionnement mime, respectivement, l'acquisition d'un conditionnement élémentaire ou contextuel (Desmedt et al., 1999). Ces résultats qui suggéraient que la modulation de la transmission glutamatergique HPC-SL détermine l'acquisition d'un conditionnement élémentaire ou contextuel ont été confirmé par l'expérience précédemment décrite montrant que l'activation ou le blocage des récepteurs glutamatergiques du SL mime, respectivement, l'établissement d'un conditionnement élémentaire ou contextuel (cf. 2. ci-dessus).

De façon comparable, des expériences récentes ont montré qu'une stimulation du cortex cingulaire antérieur (par stimulation électrique ou injection d'un agoniste glutamatergique) réalisée de manière contingente à la présentation d'un stimulus sonore entraîne, 24 h plus tard, l'établissement d'un conditionnement à ce stimulus ainsi qu'au contexte d'apprentissage (Tang et al., 2005). En revanche, si la stimulation est réalisée de manière non contingente à la présentation du stimulus sonore, les animaux ne se conditionnent plus au stimulus sonore mais seulement au contexte d'apprentissage (Tang

et al., 2005). Ainsi, si dans nos expériences tous les stimuli sont présentés à l'animal (i.e. le SC simple, le contexte et le SI) cette dernière expérience révèle qu'une manipulation de l'activité cérébrale peut induire l'établissement d'un conditionnement alors même que le SI n'a jamais été délivré. Chez l'homme, Phelps et coll. (2001) ont montré qu'alors même qu'aucun SI n'est délivré au sujet, le simple fait d'informer ce dernier qu'une diapositive de couleur bleue allait être suivie d'un petit choc électrique entraînait une activation amygdalienne (visualisée par IRMf) ainsi que l'expression d'une RCE lors de la présentation du « SC ».

L'ensemble de ces expériences révèle que, même si un stimulus ne prédit pas *objectivement* la survenue du SI (e.g. il n'est pas physiquement immédiatement suivi du SI), le sujet peut tout de même lui attribuer une valeur prédictive. La manipulation du réseau cérébral impliqué dans le codage des attributs émotionnels des stimuli (Tang et al., 2005) ou une modification de la représentation épisodique de l'expérience aversive (Phelps et al., 2001) interfère avec l'établissement d'un conditionnement. En accord avec ces données, nous montrons qu'une manipulation du système hippocampo-septo-hippocampique modifie l'attribution d'une valeur prédictive à un SC et au contexte au cours d'une expérience aversive. Ces manipulations pourraient ainsi interférer avec l'élaboration d'une représentation de type « épisodique » de l'expérience. A l'appui de cette proposition, des expériences menées chez l'animal ont montré que le système hippocampique était requis pour la formation de représentations dont certaines propriétés cardinales (e.g. flexibilité, capacité d'inférence) correspondent à celles qui caractérisent la mémoire épisodique humaine (hors conscience et verbalisation) (Daumas et al., 2004 ; 2005 ; Jaffard et al., 2000). Ainsi, au cours d'une expérience aversive, plusieurs systèmes cérébraux en interaction, l'un centré autour de l'hippocampe et l'autre centré autour de l'amygdale, contribueraient à l'élaboration d'une représentation de l'expérience aversive. La manipulation des interactions entre ces systèmes permettrait de modifier le traitement subjectif des informations « émotionnelles pertinentes » induisant ainsi une RCE prépondérante à un SC simple ou au contexte « indépendamment » des paramètres objectifs de la situation

4. Relations hippocampo-amygdaliennes : de la mémoire émotionnelle normale à la mémoire émotionnelle traumatique.

Les données de la littérature montrent que, du syndrome de stress post traumatique jusqu'aux troubles dépressifs, nombre de pathologies psychiatriques révèlent des dérégulations dans les capacités des patients à évaluer correctement les liens de causalité entre les événements (Grillon & Morgan, 1999 ; Bonne et al., 2004). En particulier, l'une des atteintes caractéristiques de l'état de stress post traumatique (ESPT) est une *hypermnésie* relative à certains éléments clés saillants directement liés au trauma associée à une *amnésie* vis à vis des éléments contextuels péritraumatiques (Layton & Krikorian, 2002). Layton et Krikorian proposent que ce profil comportemental caractéristique de l'ESPT serait du à des dérégulations dans les interactions hippocampo-amygdaliennes.

Selon ces auteurs, et en parfait accord avec l'ensemble des données de la littérature traitant de l'influence amygdalienne sur la consolidation des souvenirs émotionnellement connotés, au cours d'une expérience où la charge émotionnelle reste modérée, l'amygdale contribuerait favorablement à la consolidation des souvenirs épisodiques en « stimulant » l'hippocampe. Un certain nombre de travaux suggère même que cette modulation amygdalienne facilite, dans ce cas, la sélection de l'information pertinente par le système de représentations épisodiques (Adolphs et al., 2001 ; 2005). Au plan neurobiologique, cet effet facilitateur impliquerait l'activation spécifique des récepteurs aux glucocorticoïdes hippocampiques (McGaugh, 2004). En effet, l'injection intra-hippocampique de corticostérone, immédiatement après l'acquisition d'un conditionnement aversif contextuel (procédure de *non appariement* son-choc), potentialise la réponse de peur au contexte chez des animaux soumis à des chocs électriques de faible intensité (Revest et al., 2005). Ces données ainsi que nos travaux suggèrent donc que, dans des situations émotionnelles modérées, le circuit septo-hippocampo-amygdalien contribue effectivement à sélectionner et traiter l'information pertinente.

En revanche, lorsque la charge émotionnelle devient intense à extrême, le modèle théorique propose que l'influence amygdalienne devient néfaste pour le fonctionnement du système de représentations en mémoire épisodique. En particulier, une sur-activation amygdalienne inhiberait alors le fonctionnement de l'hippocampe perturbant ainsi le traitement épisodique des informations relatives à l'expérience traumatique. Ce processus pourrait également rendre compte d'une altération générale (i.e. à plus long terme) de la mémoire épisodique des patients atteints d'ESPT. En accord avec cette proposition, nous avons montré

qu'un hypofonctionnement cholinergique hippocampique (injection de scopolamine) induit un profil comportemental rappelant celui observé chez les patients atteints d'ESPT (RCE au son importante associée à une faible RCE au contexte). De plus, nos travaux montrent que ce profil comportemental est associé à l'établissement de phénomènes de plasticité spécifiques au sein du réseau hippocampo-amygdalien. Ils supportent ainsi l'idée que des interactions hippocampo-amygdaliennes altérées peuvent sous-tendre l'expression de réponses émotionnelles inadaptées, voire pathologiques.

A l'appui du modèle théorique développé par Layton et Krikorian, il a été montré que des animaux exposés à un stress intense ou à une injection de fortes doses de corticostérone présentent ultérieurement une perte neuronale, une diminution de l'arborisation dendritique, une diminution de la neurogénèse et un déficit de potentialisation à long terme dans l'hippocampe (Elzinga & Bremner, 2002). L'ensemble de ces données indique donc qu'une libération *modérée* de corticostérone peut faciliter la consolidation mnésique d'événements émotionnellement connotés, tandis qu'une libération *excessive* de corticostérone pourrait être à l'origine d'altérations spécifiques du système hippocampique, voire même des interactions hippocampo-amygdaliennes conduisant ainsi à l'établissement de profils mnésiques pathologiques tels que celui constaté chez les patients atteints d'ESPT.

Sur la base de cette hypothèse, nous avons évalué dans une expérience préliminaire les effets d'une injection intra-hippocampique de corticostérone sur la consolidation mnésique d'une réponse de peur conditionnée au contexte et à un stimulus simple en fonction du niveau de stress de la situation d'apprentissage (Calandreau et al., 2006). L'injection post-apprentissage de corticostérone intra-hippocampique potentialise la RCE de peur au contexte chez les animaux soumis à un choc de faible intensité (0,3 mA) quel que soit le type de conditionnement (*appariement et non appariement SC-SI*) (Annexe, figure 6B). En revanche, cette même injection altère le conditionnement au contexte des animaux soumis à un choc de « forte » intensité (0,7 mA ; Annexes figure 7B). De plus, à une forte intensité de choc, cette injection induit une RCE au son après une procédure de *non-appariement* (Annexes figure 7A), tandis qu'elle préserve le conditionnement au son après une procédure d'*appariement* (Annexes, figure 7A). En conséquence, les RCE de peur des animaux soumis à un choc de forte intensité et ayant reçu une injection de corticostérone rappellent le profil mnésique observé chez les patients atteints d'ESPT (RCE prédominante au son, réduction de la RCE au contexte). Bien que ces résultats soient très préliminaires, ils suggèrent toutefois qu'une sur-activation des récepteurs aux glucocorticoïdes hippocampiques pourrait, en situation de stress intense, altérer le fonctionnement hippocampique et plus généralement être associée à une

perturbation des interactions hippocampo-amygdaliennes. Ces interactions conduiraient le sujet à établir une représentation « traumatique » de l'expérience ; représentation focalisée sur des événements simples, saillants directement liés au trauma, au détriment des éléments contextuels péritraumatiques.

En résumé, l'ensemble de ces données suggère que selon la charge émotionnelle de l'expérience aversive, différentes interactions hippocampo-amygdaliennes sont mises en jeu. Dans le cas d'un stress modéré, le fonctionnement de ce circuit cérébral contribuerait à un processus normal de sélection et de traitement de l'information pertinente. Dans le cas d'un stress extrême, ces interactions seraient alors altérées, et conduiraient à l'établissement d'un état pathologique. L'étude des interactions hippocampo-amygdaliennes dans des situations de stress plus intense pourrait permettre de caractériser les supports neurobiologiques de certaines pathologies psychiatrique telles que l'état de stress post-traumatique.

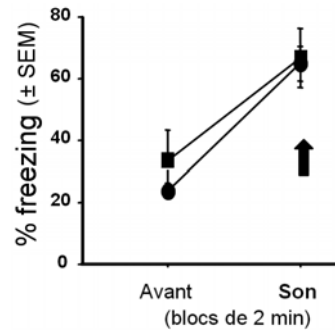
CONCLUSION :

En conclusion, ce travail de thèse nous a conduit à compléter le modèle de fonctionnement d'un circuit cérébral septo-hippocampo-amygdalien dans le conditionnement classique élémentaire et contextuel. Plus encore, il nous a conduit à proposer que plusieurs systèmes cérébraux, l'un centré autour de l'hippocampe et l'autre centré autour de l'amygdale interagissent et contribuent à la construction de représentations complémentaires de l'expérience, représentations participant à un processus général de sélection de « l'information émotionnelle » pertinente. Ce travail a également abouti à la formulation de quelques pistes de recherche qu'il nous semble nécessaire d'aborder. Puisqu'il semble logique de penser que ces deux systèmes neurobiologiques ne sont pas isolés du reste des régions du cerveau, l'implication de la région préfrontale dans nos situations d'apprentissage devrait être soumise à analyse. Des recherches visant à préciser le fonctionnement de la boucle hippocampo-septo-hippocampique devront également être menées. Enfin, l'étude des interactions hippocampo-amygdaliennes dans des situations de stress modéré à extrême pourrait permettre de caractériser les supports neurobiologiques de certaines pathologies psychiatriques telles que l'état de stress post-traumatique.

ANNEXES

● Appariement SC-SI
 ■ Non appariement SC-SI

A. TEST AU SON



B. TEST AU CONTEXTE

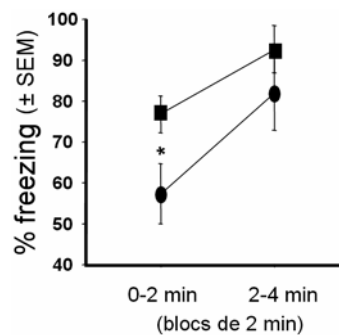


Figure 1: Conditionnement élémentaire et contextuel chez des animaux âgés de 21-22 mois.

A. *Test au son.* Quelle que soit la procédure utilisée (*appariement* ou *non appariement*) tous les animaux expriment une RCE au son.

B. *Test au contexte.* Les animaux soumis à un conditionnement préférentiel au contexte (*non appariement SC-SI*) expriment une RCE au contexte plus importante que ceux soumis à un conditionnement préférentiel au son (*appariement SC-SI*).

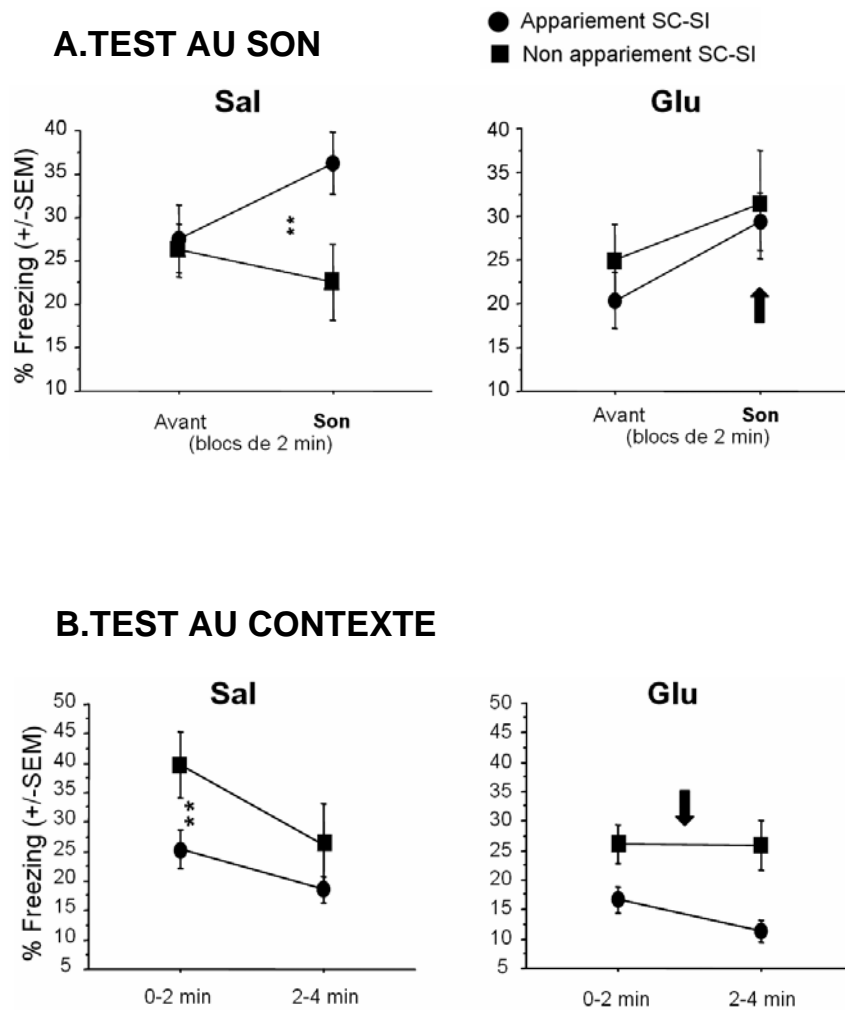


Figure 2: L'injection intra-SL d'acide glutamique (Glu) mime l'acquisition d'un conditionnement préférentiel au son.

A. *Test au son.* L'injection de Glu induit un conditionnement au son chez des animaux soumis à un conditionnement préférentiel au contexte (*non appariement*).

B. *Test au contexte.* Quelle que soit la procédure utilisée (*appariement* ou *non appariement*), l'injection de Glu diminue le conditionnement au contexte.

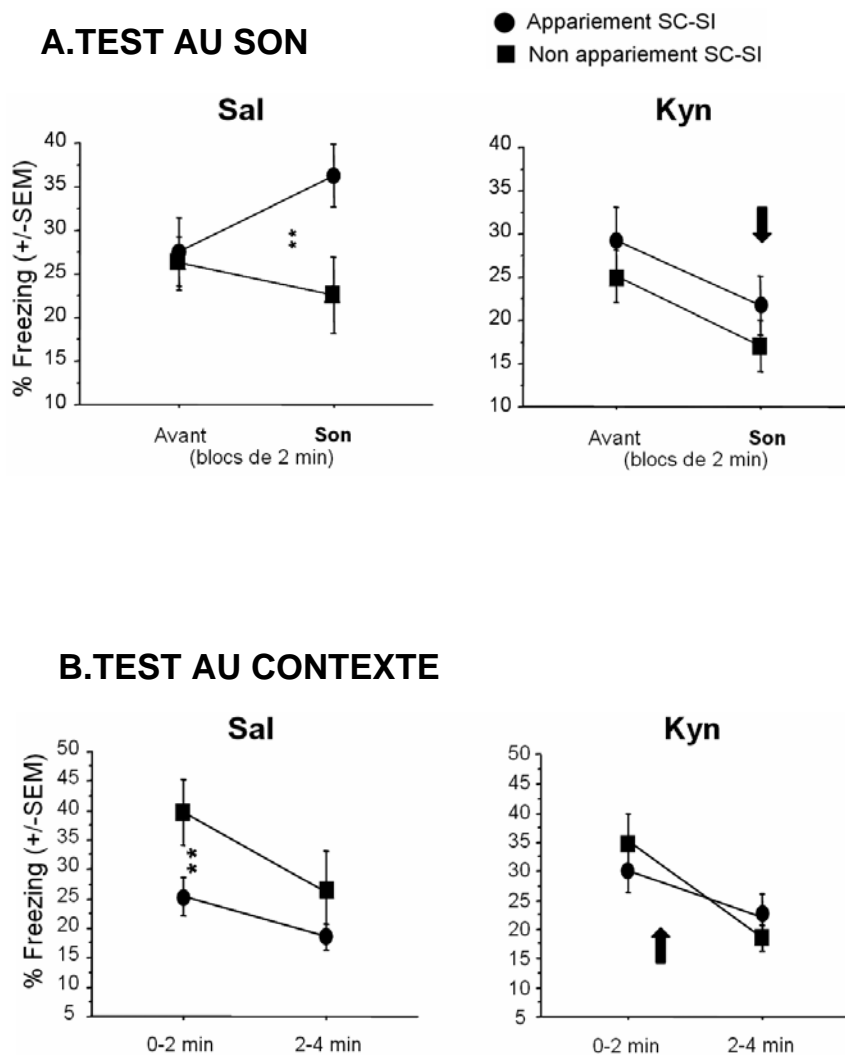


Figure 3: L'injection intra-SL de kynurénate (Kyn) bloque l'acquisition d'un conditionnement au son tout en préservant un conditionnement au contexte.

A. *Test au son.* L'injection de kyn bloque le conditionnement au son des animaux soumis à un conditionnement préférentiel au son (*appariement*).

B. *Test au contexte.* Quelle que soit la procédure utilisée (*appariement* ou *non appariement*), l'injection de Kyn maintient le conditionnement au contexte.

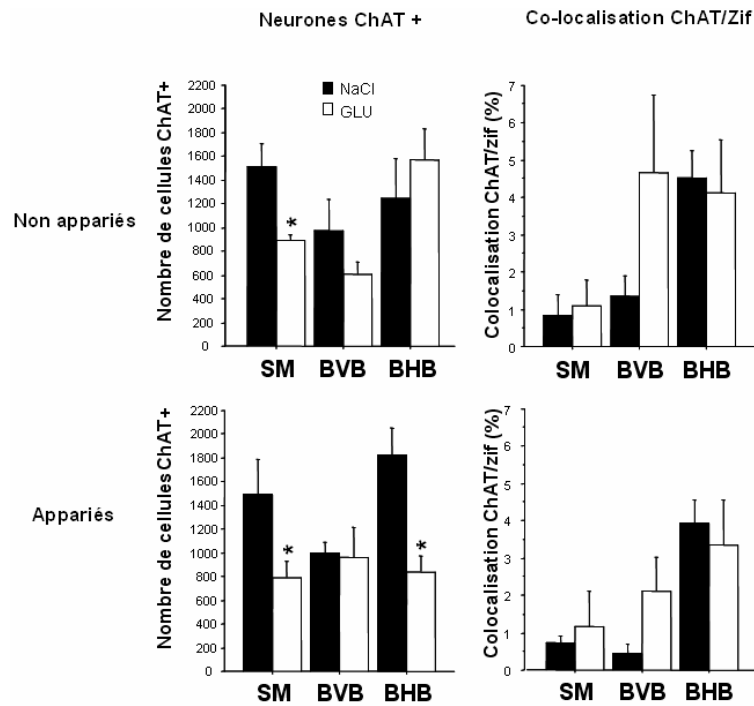


Figure 4: L'injection intra-SL de Glu diminue le nombre de cellules ChAT+ au sein du complexe SM/BDB. septum médian (SM) ; bandes horizontale et verticale de Broca (BHB et BVB).

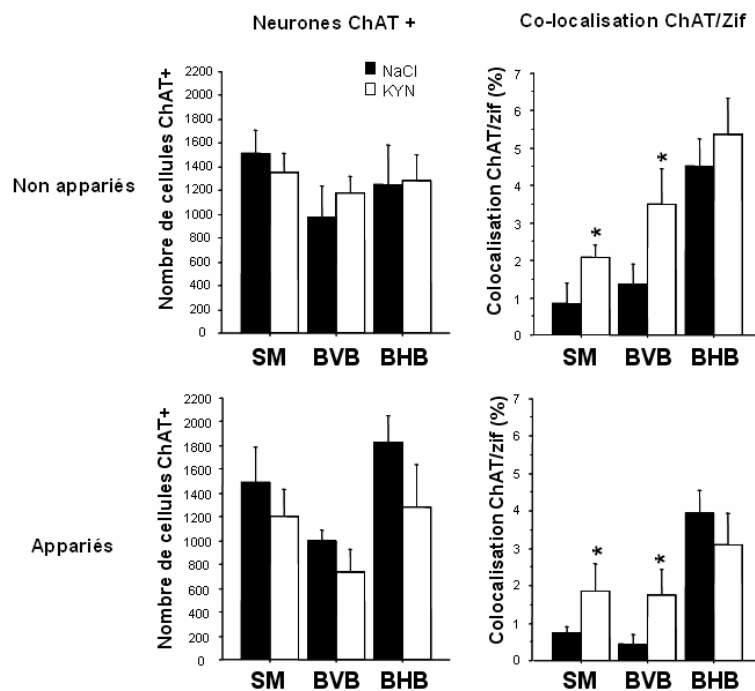


Figure 5: L'injection intra-SL de Kyn augmente le nombre de cellules ChAT+/Zif au sein du complexe SM/BDB.

septum médian (SM) ; bandes horizontale et verticale de Broca (BHB et BVB).

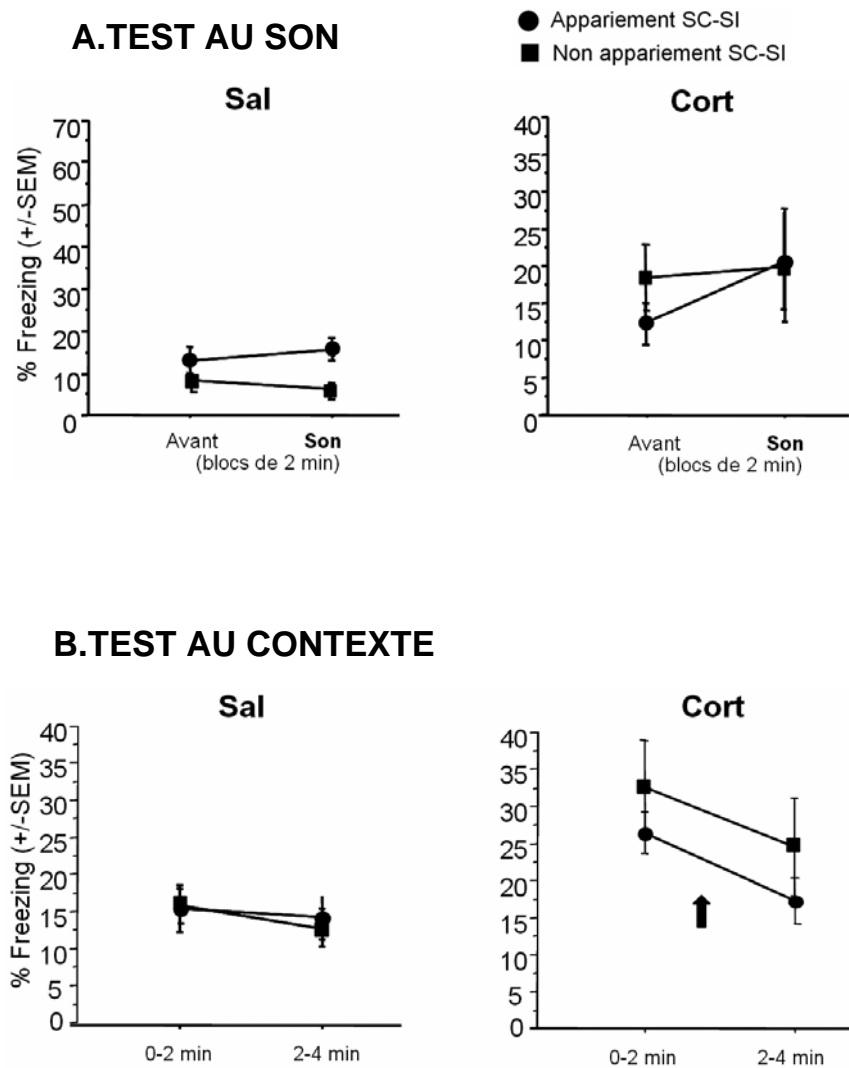


Figure 6: Dans une situation de stress « faible » (choc électrique de 0,3 mA), l'injection intra-HPC post-apprentissage de corticostérone (Cort) « potentialise » le conditionnement au contexte.

A. *Test au son.* L'injection de cort n'a pas d'effet. Toutefois, à cette intensité de choc, les animaux témoins (sal) ne sont pas conditionnés au son.

B. *Test au contexte.* Quelle que soit la procédure utilisée (*appariement* ou *non appariement*), l'injection de cort potentialise le conditionnement au contexte.

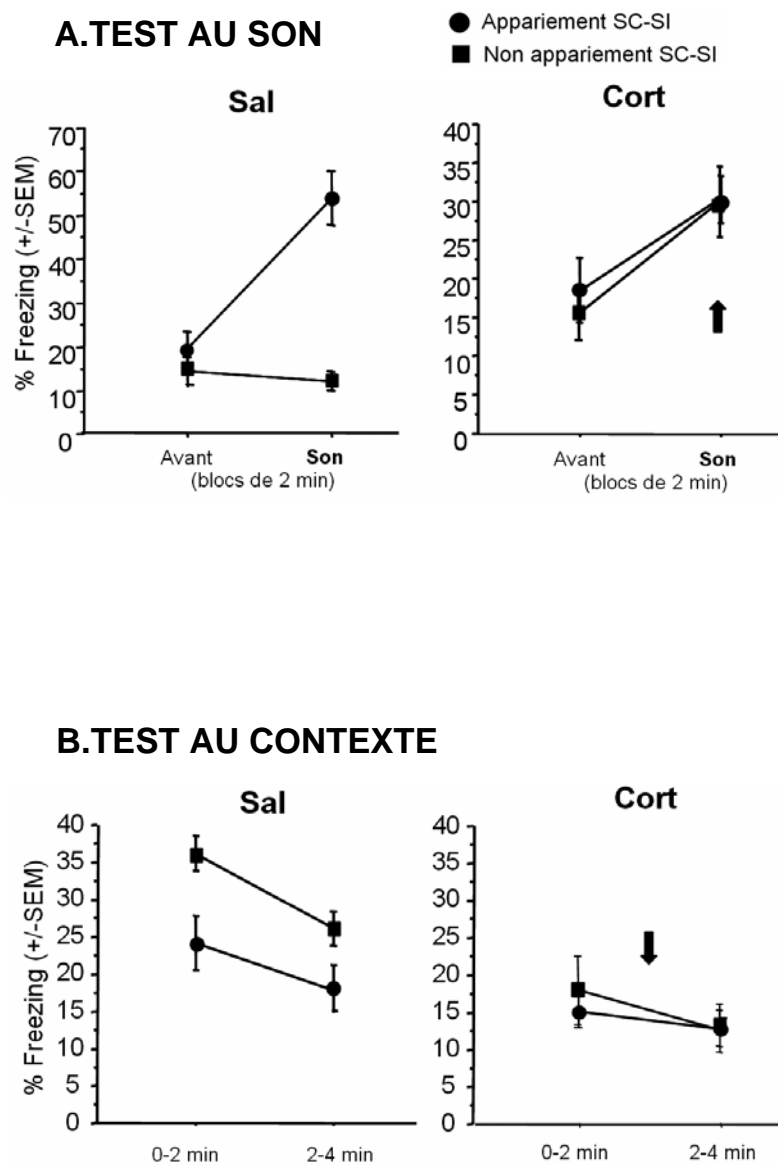


Figure 7: Dans une situation de stress « fort » (choc électrique de 0,7 mA), l'injection intra-HPC post-apprentissage de corticostérone (Cort) mime l'acquisition d'un conditionnement préférentiel au son.

A. *Test au son.* L'injection de cort induit un conditionnement au son chez les animaux pourtant soumis à un conditionnement préférentiel au contexte (*non appariement*).

B. *Test au contexte.* Quelle que soit la procédure utilisée (*appariement* ou *non appariement*), l'injection de cort diminue le conditionnement au contexte.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abel T, Nguyen PV, Barad M, Deuel TA, Kandel ER, Bourtchouladze R (1997) Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell* 88:615-626.
- Adolphs R, Denburg NL, Tranel D (2001) The amygdala's role in long-term declarative memory for gist and detail. *Behav Neurosci* 115:983-992.
- Adolphs R, Tranel D, Buchanan TW (2005) Amygdala damage impairs emotional memory for gist but not details of complex stimuli. *Nat Neurosci* 8:512-518.
- Adolphs R, Tranel D, Damasio H, Damasio A (1994) Impaired recognition of emotion in facial expressions following bilateral damage to the human amygdala. *Nature* 372:669-672.
- Adolphs R, Tranel D, Damasio H, Damasio AR (1995) Fear and the human amygdala. *J Neurosci* 15:5879-5891.
- Adolphs R, Cahill L, Schul R, Babinsky R (1997) Impaired declarative memory for emotional material following bilateral amygdala damage in humans. *Learn Mem* 4:291-300.
- Adolphs R, Tranel D, Hamann S, Young AW, Calder AJ, Phelps EA, Anderson A, Lee GP, Damasio AR (1999) Recognition of facial emotion in nine individuals with bilateral amygdala damage. *Neuropsychologia* 37:1111-1117.
- Aggleton JP, Mishkin M (1986) The amygdala: sensory gateway to the emotions. In *Emotion: Theory, Research and Experience*, Vol. 3, Plutchick R, Kellerman (Eds.), Academic Press, Orlando, Florida, pp. 281-299.
- Akert K, Gruesen RA, Woolsey CN, Meyer DR (1961) Kluver-Bucy syndrome in monkeys with neocortical ablations of temporal lobe. *Brain* 84:480-498.
- Akirav I, Richter-Levin G (1999) Biphasic modulation of hippocampal plasticity by behavioral stress and basolateral amygdala stimulation in the rat. *J Neurosci* 19:10530-10535.
- Akirav I, Richter-Levin G (2002) Mechanisms of amygdala modulation of hippocampal plasticity. *J Neurosci* 22:9912-9921.
- Alberini CM, Ghirardi M, Huang YY, Nguyen PV, Kandel ER (1995) A molecular switch for the consolidation of long-term memory: cAMP-inducible gene expression. *Ann N Y Acad Sci* 758:261-286.
- Albert DJ, Chew GL (1980) The septal forebrain and the inhibitory modulation of attack and defense in the rat. A review. *Behav Neural Biol* 30:357-388.

- Alonso A, Kohler C (1982) Evidence for separate projections of hippocampal pyramidal and non-pyramidal neurons to different parts of the septum in the rat brain. *Neurosci Lett* 31:209-214.
- Alonso A, Kohler C (1984) A study of the reciprocal connections between the septum and the entorhinal area using anterograde and retrograde axonal transport methods in the rat brain. *J Comp Neurol* 225:327-343.
- Alvarez P, Squire LR (1994) Memory consolidation and the medial temporal lobe: a simple network model. *Proc Natl Acad Sci.* 91:7041-7045
- Amaral DG, Kurz J (1985) An analysis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. *J Comp Neurol* 240:37-59.
- Amaral DG, Witter MP (1989) The three-dimensional organisation of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neurosci.* 31:571-591.
- Amaral DG, Witter MP (1995) The hippocampal formation. In *The rat nervous system*, pp 443-493, Paxinos G (Ed.) Academic Press, San diego
- Amorapanth P, LeDoux JE, Nader K (2000) Different lateral amygdala outputs mediate reactions and actions elicited by a fear-arousing stimulus. *Nat Neurosci* 3:74-79.
- Anagnostaras SG, Maren S, Fanselow MS (1999) Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. *J Neurosci* 19:1106-1114.
- Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM, Sweatt JD (1998) The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci* 1:602-609.
- Azmitia EC, Segal M (1978) An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 179:641-667.
- B**ast T, Zhang WN, Feldon J (2001) Hippocampus and classical fear conditioning. *Hippocampus* 11:828-831.
- Bauer EP, Schafe GE, LeDoux JE (2002) NMDA receptors and L-type voltage-gated calcium channels contribute to long-term potentiation and different components of fear memory formation in the lateral amygdala. *J Neurosci* 22:5239-5249.
- Bechara A, Tranel D, Damasio H, Adolphs R, Rockland C, Damasio AR (1995) Double dissociation of conditioning and declarative knowledge relative to the amygdala and hippocampus in humans. *Science* 269:1115-1118.

- Ben-Ari Y, Ed. (1981) *The amygdaloid Complex*. North Holland: Elsevier
- Berkeley JL, Levey AI (2000) Muscarinic activation of mitogen-activated protein kinase in PC12 cells. *J Neurochem* 75:487-493.
- Berkeley JL, Gomez J, Wess J, Hamilton SE, Nathanson NM, Levey AI (2001) M1 muscarinic acetylcholine receptors activate extracellular signal-regulated kinase in CA1 pyramidal neurons in mouse hippocampal slices. *Mol Cell Neurosci* 18:512-524.
- Blanchard RJ, Blanchard DC (1969) Crouching as an index of fear. *J Comp Physiol Psychol* 67:370-375.
- Bonne O, Grillon C, Vythilingam M, Neumeister A, Charney DS (2004) Adaptive and maladaptive psychobiological responses to severe psychological stress: implications for the discovery of novel pharmacotherapy. *Neurosci Biobehav Rev* 28:65-94.
- Borhegyi Z, Varga V, Szilagy N, Fabo D, Freund TF (2004) Phase segregation of medial septal GABAergic neurons during hippocampal theta activity. *J Neurosci* 24:8470-8479.
- Bourtchouladze R, Abel T, Berman N, Gordon R, Lapidus K, Kandel ER (1998) Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learn Mem* 5:365-374.
- Brady JV, Nauta WJ (1953) Subcortical mechanisms in emotional behavior: affective changes following septal forebrain lesions in the albino rat. *J Comp Physiol Psychol* 46:339-346.
- Breiter HC, Etcoff NL, Whalen PJ, Kennedy WA, Rauch SL, Buckner RL, Strauss MM, Hyman SE, Rosen BR (1996) Response and habituation of the human amygdala during visual processing of facial expression. *Neuron* 17:875-887.
- Broks P, Young AW, Maratos EJ, Coffey PJ, Calder AJ, Isaac CL, Mayes AR, Hodges JR, Montaldi D, Cezayirli E, Roberts N, Hadley D (1998) Face processing impairments after encephalitis: amygdala damage and recognition of fear. *Neuropsychologia* 36:59-70.
- Burwell RD, Amaral DG (1998) Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: interconnectivity and connections with the entorhinal cortex. *J Comp Neurol* 391:293-321.
- Buzáki G (1989) Two-stage model of memory trace formation: A role for 'noisy' brain states. *Neuroscience* 31:551-570.

- Buzáki G, Chen LS, Gage FH (1990) Spatial organisation of physiological activity in the hippocampal region: relevance to memory formation. In *Progress in Brain Research*, Zimmer J, Ottersen OP (Eds.), vol 83, pp. 357-370.
- C**ahill L, Prins B, Weber M, McGaugh JL (1994) Beta-adrenergic activation and memory for emotional events. *Nature* 371:702-704.
- Cahill L, Babinsky R, Markowitsch HJ, McGaugh JL (1995) The amygdala and emotional memory. *Nature* 377:295-296.
- Cahill L, Haier RJ, Fallon J, Alkire MT, Tang C, Keator D, Wu J, McGaugh JL (1996) Amygdala activity at encoding correlated with long-term, free recall of emotional information. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8016-8021.
- Calandreau L, Bongiovanni C, Faget L, Neny M, Jaffard R, Abrous DN, Piazza PV, Desmedt A (2006) Intra-hippocampal infusions of corticosterone either promote or alter memory consolidation depending on the emotional intensity of the aversive experience. *The Society for Neuroscience 36th Annual Meeting*, Atlanta.
- Campeau S, Miserendino MJ, Davis M (1992) Intra-amygdala infusion of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5 blocks acquisition but not expression of fear-potentiated startle to an auditory conditioned stimulus. *Behav Neurosci* 106:569-574.
- Canli T, Zhao Z, Brewer J, Gabrieli JD, Cahill L (2000) Event-related activation in the human amygdala associates with later memory for individual emotional experience. *J Neurosci* 20:RC99.
- Canteras NS, Swanson LW (1992) Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: a PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. *J Comp Neurol* 324:180-194.
- Cho YH, Friedman E, Silva AJ (1999) Ibotenate lesions of the hippocampus impair spatial learning but not contextual fear conditioning in mice. *Behav Brain Res* 98:77-87.
- Chronister RB, White LE (1975) Fiberarchitecture of the hippocampal formation: anatomy, projections, and structural significance. In *The Hippocampus*, vol. 1: Structure and development, Isaacson RL, Pribram KH (Eds.), Plenum Press, New York and London, pp. 9-39
- Cohen NJ, Squire LR (1980) Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. *Science* 210:207-210.

- Costa E, Panula P, Thompson HK, Cheney DL (1983) The transsynaptic regulation of the septal-hippocampal cholinergic neurons. *Life Sci* 32:165-179.
- Cousens G, Otto T (1998) Both pre- and posttraining excitotoxic lesions of the basolateral amygdala abolish the expression of olfactory and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 112:1092-1103.
- D**aumas S, Halley H, Lassalle JM (2004) Disruption of hippocampal CA3 network: effects on episodic-like memory processing in C57BL/6J mice. *Eur J Neurosci*. 20:597-600.
- Daumas S, Halley H, Frances B, Lassalle JM (2005) Encoding, consolidation, and retrieval of contextual memory: differential involvement of dorsal CA3 and CA1 hippocampal subregions. *Learn Mem*. 12:375-82.
- Decker MW, Curzon P, Brioni JD (1995) Influence of separate and combined septal and amygdala lesions on memory, acoustic startle, anxiety, and locomotor activity in rats. *Neurobiol Learn Mem* 64:156-168.
- DeFrance JF, Kitai ST, Shimono T (1973) Electrophysiological analysis of the hippocampal septal projections. II. Functional characteristics. *Exp Brain Res* 17:463-476.
- DeFrance JF, Yoshihara H, Chronister RB (1976) Electrophysiological studies of the septal nuclei: I. The lateral septal region. *Exp Neurol* 53:399-419.
- Desgranges B (2004) Relations fonctionnelles entre le septum latéral et le septum médian/bande diagonale de Broca au cours de deux conditionnements classiques aversifs chez la souris. Mémoire de Master 2.
- Delacour J (1980) Conditionnement et biologie, Ed. Masson, Paris.
- Delacour J (1984) Neurobiologie de l'apprentissage. In *Neurobiologie des comportements*. Delacour J (Ed.), Editions Hermann, Paris, pp 215-257
- Delacour J (1994) Introduction : the memory system of the brain. In *The memory system of the brain*. Delacour, J. (Ed.) World Scientific, Singapore, pp 1-65
- Desmedt A (2000) Analyse fonctionnelle des relations entre le système septo-hippocampique et l complexe amygdalien dans deux types de conditionnement classique aversif chez la souris. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux I.
- Desmedt A, Garcia R, Jaffard R (1998) Differential modulation of changes in hippocampal-septal synaptic excitability by the amygdala as a function of either elemental or contextual fear conditioning in mice. *J Neurosci* 18:480-487.

- Desmedt A, Garcia R, Jaffard R (1999) Vasopressin in the lateral septum promotes elemental conditioning to the detriment of contextual fear conditioning in mice. *Eur J Neurosci* 11:3913-3921.
- Desmedt A, Garcia R, Jaffard R (2003a) An 8-day extensive elemental, but not contextual, fear conditioning potentiates hippocampal-lateral septal synaptic efficacy in mice. *Synapse* 49:270-278.
- Desmedt A, Marighetto A, Garcia R, Jaffard R (2003b) The effects of ibotenic hippocampal lesions on discriminative fear conditioning to context in mice: impairment or facilitation depending on the associative value of a phasic explicit cue. *Eur J Neurosci* 17:1953-1963.
- Desmedt A., Calandreau L., Desgranges B., Marighetto A., Abrous D.N. & Jaffard R. (2005) Different septal-hippocampal relationships contribute to contextual or simple cue fear conditioning. The Society for Neuroscience 35th Annual Meeting, Washington.
- Dolcos F, LaBar KS, Cabeza R (2004) Interaction between the amygdala and the medial temporal lobe memory system predicts better memory for emotional events. *Neuron* 42:855-863.
- Dolorfo CL, Amaral DG (1998) Entorhinal cortex of the rat: topographic organization of the cells of origin of the perforant path projection to the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 398:25-48.
- Donley MP, Schulkin J, Rosen JB (2005) Glucocorticoid receptor antagonism in the basolateral amygdala and ventral hippocampus interferes with long-term memory of contextual fear. *Behav Brain Res* 164:197-205.
- Dragoi G, Carpi D, Recce M, Csicsvari J, Buzsaki G (1999) Interactions between hippocampus and medial septum during sharp waves and theta oscillation in the behaving rat. *J Neurosci* 19:6191-6199.
- Duncan PM (1971) Effect of temporary septal dysfunction on conditioning and performance of fear responses in rats. *J Comp Physiol Psychol* 74:340-348.
- E**ichenbaum H, Mathews P, Cohen NJ (1989a) Further studies of hippocampal representation during odor discrimination learning. *Behav Neurosci* 103:1207-1216.
- Eichenbaum H, Otto T, Cohen NJ (1992) The hippocampus--what does it do? *Behav Neural Biol* 57:2-36.

- Eichenbaum H, Fagan A, Mathews P, Cohen NJ (1988) Hippocampal system dysfunction and odor discrimination learning in rats: impairment or facilitation depending on representational demands. *Behav Neurosci* 102:331-339.
- Eichenbaum H, Wiener SI, Shapiro ML, Cohen NJ (1989b) The organization of spatial coding in the hippocampus: a study of neural ensemble activity. *J Neurosci* 9:2764-2775.
- Eichenbaum H (1994) The hippocampal system and declarative memory in humans and animals: experimental analysis and historical origins. In *Memory systems*. Schacter DL, Tulving E (Eds.), The MIT Press, Cambridge pp. 147-201
- Everitt BJ, Robbins TW (1992) Amygdala-ventral striatal interactions and reward related processes. In *The amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory and Mental Dysfunction*, Aggleton JP (Ed.), Wiley-Liss, New York, pp. 401-429.
- F**anselow MS, Kim JJ (1994) Acquisition of contextual Pavlovian fear conditioning is blocked by application of an NMDA receptor antagonist D,L-2-amino-5-phosphonovaleric acid to the basolateral amygdala. *Behav Neurosci* 108:210-212.
- Fanselow MS, Poulos AM (2005) The neuroscience of mammalian associative learning. *Annu Rev Psychol* 56:207-234.
- Frank JE, Tomaz C (2003) Lateralized impairment of the emotional enhancement of verbal memory patients with amygdala-hippocampal lesion. *Brain Cogn.* 52:223-230.
- Frey S, Bergado-Rosado J, Seidenbecher T, Pape HC, Frey JU (2001) Reinforcement of early long-term potentiation (early-LTP) in dentate gyrus by stimulation of the basolateral amygdala: heterosynaptic induction mechanisms of late-LTP. *J Neurosci* 21:3697-3703.
- G**affan D (1992) Amygdala and the memory of reward. In *The amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory and Mental Dysfunction*, Aggleton JP (Ed.), Wiley-Liss, New York, pp. 471-483.
- Gale GD, Anagnostaras SG, Fanselow MS (2001) Cholinergic modulation of pavlovian fear conditioning: effects of intrahippocampal scopolamine infusion. *Hippocampus* 11:371-376.
- Gallagher M, Kapp BS, Pascoe JP, Rapp PR (1981) A neuropharmacology of amygdaloid systems which contribute to learning and memory. See Ben-Ari 1981, pp. 311-30.
- Gallagher M, Holland PC (1992) Preserved configural learning and spatial learning impairment in rats with hippocampal damage. *Hippocampus* 2:81-88.

- Garcia R, Jaffard R (1992) The hippocampo-septal projection in mice: long-term potentiation in the lateral septum. *Neuroreport* 3:193-196.
- Garcia R, Jaffard R (1993) A comparative study of age-related changes in inhibitory processes and long-term potentiation in the lateral septum of mice. *Brain Res* 620:229-236.
- Garcia R, Jaffard R (1996) Changes in synaptic excitability in the lateral septum associated with contextual and auditory fear conditioning in mice. *Eur J Neurosci* 8:809-815.
- Gasbarri A, Packard MG, Campana E, Pacitti C (1994) Anterograde and retrograde tracing of projections from the ventral tegmental area to the hippocampal formation in the rat. *Brain Res Bull* 33:445-452.
- Gaykema RP, Luiten PG, Nyakas C, Traber J (1990) Cortical projection patterns of the medial septum-diagonal band complex. *J Comp Neurol* 293:103-124.
- Gentile CG, Jarrell TW, Teich A, McCabe PM, Schneiderman N (1986) The role of amygdaloid central nucleus in the retention of differential pavlovian conditioning of bradycardia in rabbits. *Behav Brain Res* 20:263-273.
- Giovannini MG, Mutolo D, Bianchi L, Michelassi A, Pepeu G (1994) NMDA receptor antagonists decrease GABA outflow from the septum and increase acetylcholine outflow from the hippocampus: a microdialysis study. *J Neurosci* 14:1358-1365.
- Gisquet-Verrier P, Dutrieux G, Richer P, Doyere V (1999) Effects of lesions to the hippocampus on contextual fear: evidence for a disruption of freezing and avoidance behavior but not context conditioning. *Behav Neurosci* 113:507-522.
- Gold PE (2004) Coordination of multiple memory systems. *Neurobiol Learn Mem* 82:230-242.
- Good M, Honey RC (1991) Conditioning and contextual retrieval in hippocampal rats. *Behav Neurosci* 105:499-509.
- Goosens KA, Holt W, Maren S (2000) A role for amygdaloid PKA and PKC in the acquisition of long-term conditional fear memories in rats. *Behav Brain Res* 114:145-152.
- Gray JA (1982) *Neuropsychological Theory of anxiety: An investigation of the septal-hippocampal system*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Gray JA, McNaughton N (1983) Comparison between the behavioural effects of septal and hippocampal lesions: a review. *Neurosci Biobehav Rev* 7:119-188.

- Grillon C, Morgan CA, 3rd (1999) Fear-potentiated startle conditioning to explicit and contextual cues in Gulf War veterans with posttraumatic stress disorder. *J Abnorm Psychol* 108:134-142.
- H**all G, Purves D, Bonardi C (1996) Contextual control of conditioned responding in rats with dorsal hippocampal lesions. *Behav Neurosci* 110:933-945.
- Hamann SB, Ely TD, Grafton ST, Kilts CD (1999) Amygdala activity related to enhanced memory for pleasant and aversive stimuli. *Nat Neurosci* 2:289-293.
- Hamann SB, Ely TD, Hoffman JM, Kilts CD (2002) Ecstasy and agony: activation of the human amygdala in positive and negative emotion. *Psychol Sci* 13:135-141.
- Hamilton SE, Nathanson NM (2001) The M1 receptor is required for muscarinic activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in murine cerebral cortical neurons. *J Biol Chem* 276:15850-15853.
- Haring JH, Davis JN (1985) Differential distribution of locus coeruleus projections to the hippocampal formation: anatomical and biochemical evidence. *Brain Res* 325:366-369.
- Herry C, Garcia R (2002) Prefrontal cortex long-term potentiation, but not long-term depression, is associated with the maintenance of extinction of learned fear in mice. *J Neurosci* 22:577-583.
- Herry C, Garcia R (2003) Behavioral and paired-pulse facilitation analyses of long-lasting depression at excitatory synapses in the medial prefrontal cortex in mice. *Behav Brain Res* 146:89-96.
- Hirsh R (1974) The hippocampus and contextual retrieval of information from memory: a theory. *Behav. Biol.* 12:421-444
- Hitchcock J, Davis M (1986) Lesions of the amygdala, but not of the cerebellum or red nucleus, block conditioned fear as measured with the potentiated startle paradigm. *Behav Neurosci* 100:11-22.
- Holland PC, Bouton ME (1999) Hippocampus and context in classical conditioning. *Curr Opin Neurobiol* 9:195-202.
- Honey RC, Good M (1993) Selective hippocampal lesions abolish the contextual specificity of latent inhibition and conditioning. *Behav Neurosci* 107:23-33.
- Hsu EH, Schroeder JP, Packard MG (2002) The amygdala mediates memory consolidation for an amphetamine conditioned place preference. *Behav Brain Res* 129:93-100.

Hull CL (1943) *Principles of Behavior*. Appleton-Century-Crofts, New York.

Ikegaya Y, Saito H, Abe K (1994) Attenuated hippocampal long-term potentiation in basolateral amygdala-lesioned rats. *Brain Res* 656:157-164.

Ikegaya Y, Saito H, Abe K (1995) High-frequency stimulation of the basolateral amygdala facilitates the induction of long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo. *Neurosci Res* 22:203-207.

Ikegaya Y, Nakanishi K, Saito H, Abe K (1997) Amygdala beta-noradrenergic influence on hippocampal long-term potentiation in vivo. *Neuroreport* 8:3143-3146.

Isaacson RL (1974) *The Limbic system*. New York: Plenum Press.

Jacoby LL (1991) A process dissociation framework: separating automatic and intentional uses of memory. *J Mem Language*, 30: 513-541

Jaffard R, Meunier M (1993) Role of the hippocampal formation in learning and memory. *Hippocampus* 3 Spec No:203-217.

Jaffard R, Guillou JL, Desmedt A, Etchamendy N, Marighetto A (2000) Neurobiologie des systèmes de mémoire et de leurs interactions chez l'animal In Eustache F, Lechevallier B, Viader F (Eds.), *Approches méthodologiques en neuropsychologie*, De boccke.

Jakab RL, Leranath C (1995) Septum. In *The rat nervous system*, Paxinos G (Ed.), Academic Press, Inc, pp. 405-442

Jarrard LE (1993) On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behav Neural Biol* 60:9-26.

Jones B, Mishkin M (1972) Limbic lesions and the problem of stimulus--reinforcement associations. *Exp Neurol* 36:362-377.

Kapp BS, Frysinger RC, Gallagher M, Haselton JR (1979) Amygdala central nucleus lesions: effect on heart rate conditioning in the rabbit. *Physiol Behav* 23:1109-1117.

Karst H, Nair S, Velzing E, Rumpff-van Essen L, Slagter E, Shinnick-Gallagher P, Joels M (2002) Glucocorticoids alter calcium conductances and calcium channel subunit expression in basolateral amygdala neurons. *Eur J Neurosci* 16:1083-1089.

- Kamin LJ (1969) Predictability, surprise, attention and conditioning. In Punishment and Aversive behaviour, BA Campbell & RM Church (Eds.), Appleton-Century-Crofts, New York
- Kesner RP, Wilburn MW (1974) A review of electrical stimulation of the brain in context of learning and retention. *Behav Biol* 10:259-293.
- Killcross S, Robbins TW, Everitt BJ (1997) Different types of fear-conditioned behaviour mediated by separate nuclei within amygdala. *Nature* 388:377-380.
- Kilpatrick L, Cahill L (2003) Amygdala modulation of parahippocampal and frontal regions during emotionally influenced memory storage. *Neuroimage* 20:2091-2099.
- Kim JJ, Fanselow MS (1992) Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 256:675-677.
- Kim JJ, Baxter MG (2001) Multiple brain-memory systems: the whole does not equal the sum of its parts. *Trends Neurosci* 24:324-330.
- Kim JJ, Jung MW (2006) Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. *Neurosci Biobehav Rev* 30:188-202.
- King C, Recce M, O'Keefe J (1998) The rhythmicity of cells of the medial septum/diagonal band of Broca in the awake freely moving rat: relationships with behaviour and hippocampal theta. *Eur J Neurosci* 10:464-477.
- Kluver II, Bucy PC (1939) Preliminary analysis of the temporal lobes in monkeys. *Arch Neurol. Psychiatry*, 42:979-1000
- Konorski J (1967) Integrative activity of the brain. University of Chicago Press, Chicago.
- L**aBar KS, LeDoux JE, Spencer DD, Phelps EA (1995) Impaired fear conditioning following unilateral temporal lobectomy in humans. *J Neurosci* 15:6846-6855.
- LaBar KS, Phelps EA (1998) Arousal mediated memory consolidation: role of the temporal lobe in humans. *Psychol. Sci.* 9:490-493.
- LaLumiere RT, Buen TV, McGaugh JL (2003) Post-training intra-basolateral amygdala infusions of norepinephrine enhance consolidation of memory for contextual fear conditioning. *J Neurosci* 23:6754-6758.
- Layton B, Krikorian R (2002) Memory mechanisms in posttraumatic stress disorder. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 14:254-261.
- LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23:155-184.

- LeDoux JE, Farb C, Ruggiero DA (1990) Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. *J Neurosci* 10:1043-1054.
- LeDoux JE, Farb CR, Romanski LM (1991) Overlapping projections to the amygdala and striatum from auditory processing areas of the thalamus and cortex. *Neurosci Lett* 134:139-144.
- Lee H, Kim JJ (1998) Amygdalar NMDA receptors are critical for new fear learning in previously fear-conditioned rats. *J Neurosci* 18:8444-8454.
- Leranth C, Frotscher M (1989) Organization of the septal region in the rat brain: cholinergic-GABAergic interconnections and the termination of hippocampo-septal fibers. *J Comp Neurol* 289:304-314.
- Li XF, Stutzmann GE, LeDoux JE (1996) Convergent but temporally separated inputs to lateral amygdala neurons from the auditory thalamus and auditory cortex use different postsynaptic receptors: in vivo intracellular and extracellular recordings in fear conditioning pathways. *Learn Mem* 3:229-242.
- Liang KC, McGaugh JL (1983) Lesions of the stria terminalis attenuate the amnestic effect of amygdaloid stimulation on avoidance responses. *Brain Res* 274:309-318.
- Linke R, Schwegler H, Boldyreva M (1994) Cholinergic and GABAergic septo-hippocampal projection neurons in mice: a retrograde tracing study combined with double immunocytochemistry for choline acetyltransferase and parvalbumin. *Brain Res* 653:73-80.
- M**ackintosh NJ (1975) A theory of attention. *Psychol Rev*, 72:276-298
- Maren S (1999) Neurotoxic basolateral amygdala lesions impair learning and memory but not the performance of conditional fear in rats. *J Neurosci* 19:8696-8703.
- Maren S (2001) Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci* 24:897-931.
- Maren S (2005) Synaptic mechanisms of associative memory in the amygdala. *Neuron* 47:783-786.
- Maren S, Anagnostaras SG, Fanselow MS (1998) The startled seahorse: is the hippocampus necessary for contextual fear conditioning. *Trend in Cogn. Neurosci*, 2: 39-42.
- Maren S, Fanselow MS (1995) Synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by hippocampal formation stimulation in vivo. *J Neurosci* 15:7548-7564.

- Maren S, Fanselow MS (1996) The amygdala and fear conditioning: has the nut been cracked? *Neuron* 16:237-240.
- Maren S, Aharonov G, Fanselow MS (1997) Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. *Behav Brain Res* 88:261-274.
- Marighetto A, Micheau J, Jaffard R (1993) Relationships between testing-induced alterations of hippocampal cholinergic activity and memory performance on two spatial tasks in mice. *Behav Brain Res* 56:133-144.
- Marighetto A, Micheau J, Jaffard R (1994) Effects of intraseptally injected glutamatergic drugs on hippocampal sodium-dependent high-affinity choline uptake in "naive" and "trained" mice. *Pharmacol Biochem Behav* 49:689-699.
- Marighetto A, Etchamendy N, Touzani K, Torrea CC, Yee BK, Rawlins JN, Jaffard R (1999) Knowing which and knowing what: a potential mouse model for age-related human declarative memory decline. *Eur J Neurosci* 11:3312-3322.
- Marlin NA (1981) Contextual associations in trace conditioning. *Anim Learn & Behav*, 9:4 519-523
- Mattingly BA, Osborne FH, Gotsick JE (1979) Activity changes during a conditioned aversive stimulus in rats with septal lesions. *Physiol Behav* 22:521-525.
- Matus-Amat P, Higgins EA, Barrientos RM, Rudy JW (2004) The role of the dorsal hippocampus in the acquisition and retrieval of context memory representations. *J Neurosci* 24:2431-2439.
- McAlonan GM, Wilkinson LS, Robbins TW, Everitt BJ (1995) The effects of AMPA-induced lesions of the septo-hippocampal cholinergic projection on aversive conditioning to explicit and contextual cues and spatial learning in the water maze. *Eur J Neurosci* 7:281-292.
- McDonald RJ, White NM (1993) A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behav Neurosci*. 107:3-22.
- McDonald RJ, White (1995) Information acquired by the hippocampus interferes with acquisition of the amygdala-based conditioned-cue preference in the rat. *Hippocampus* 5:189-97.
- McGaugh JL (2004) The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Ann rev Neurosci* 27:1-28.
- McGaugh JL, Gold PE (1976) Modulation of memory by electrical stimulation of the brain. In *Neural Mechanisms of Learning and Memory*, Rosenzweig MR, Bennett EL (Eds.), pp. 549-560, Cambridge, MA: MIT Press.

- McGaugh JL, Introini-Collison IB, Nagahara AH (1988) Memory-enhancing effects of posttraining naloxone: involvement of beta-noradrenergic influences in the amygdaloid complex. *Brain Res* 446:37-49.
- McIntyre CK, Marriott LK, Gold PE (2003) Cooperation between memory systems: acetylcholine release in the amygdala correlates positively with performance on a hippocampus-dependent task. *Behav Neurosci* 117:320-326.
- McIntyre CK, Pal SN, Marriott LK, Gold PE (2002) Competition between memory systems: acetylcholine release in the hippocampus correlates negatively with good performance on an amygdala-dependent task. *J Neurosci* 22:1171-1176.
- McNish KA, Gewirtz JC, Davis M (1997) Evidence of contextual fear after lesions of the hippocampus: a disruption of freezing but not fear-potentiated startle. *J Neurosci* 17:9353-9360.
- Menard J, Treit D (1996a) Lateral and medial septal lesions reduce anxiety in the plus-maze and probe-burying tests. *Physiol Behav* 60:845-853.
- Menard J, Treit D (1996b) Does tolerance develop to the anxiolytic effects of septal lesions? *Physiol Behav* 59:311-318.
- Milad MR, Quirk GJ (2002) Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature* 420:70-74.
- Miller RR, Matzel LD (1988) The comparator hypothesis: A response rule for the expression of associations. In *The psychology of Learning and Motivation*, vol. 22, GH Bower (Ed.), Academic Press, San Diego, CA.
- Milner TA, Veznedaroglu E (1993) Serotonin-containing terminals synapse on septohippocampal neurons in the rat. *J Neurosci Res* 36:260-271.
- Milner TA, Kurucz OS, Veznedaroglu E, Pierce JP (1995) Septohippocampal neurons in the rat septal complex have substantial glial coverage and receive direct contacts from noradrenaline terminals. *Brain Res* 670:121-136.
- Miserendino MJ, Sananes CB, Melia KR, Davis M (1990) Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. *Nature* 345:716-718.
- Mishkin M, Malamut B, Bachevalier J (1984) Memories and habits: two neural systems. In Lynch G, McGaugh JL, Weiberger NM (Eds.). *The neurobiology of learning and memory*, New York: The Guilford Press.

- Morris JS, Frith CD, Perrett DI, Rowland D, Young AW, Calder AJ, Dolan RJ (1996) A differential neural response in the human amygdala to fearful and happy facial expressions. *Nature* 383:812-815.
- Morris JS, Friston KJ, Buchel C, Frith CD, Young AW, Calder AJ, Dolan RJ (1998) A neuromodulatory role for the human amygdala in processing emotional facial expressions. *Brain* 121 (Pt 1):47-57.
- Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297:681-683.
- Muller J, Corodimas KP, Fridel Z, LeDoux JE (1997) Functional inactivation of the lateral and basal nuclei of the amygdala by muscimol infusion prevents fear conditioning to an explicit conditioned stimulus and to contextual stimuli. *Behav Neurosci* 111:683-691.
- N**ader K, Majidishad P, Amorapanth P, LeDoux JE (2001) Damage to the lateral and central, but not other, amygdaloid nuclei prevents the acquisition of auditory fear conditioning. *Learn Mem* 8:156-163.
- O**chsner KN, Bunge SA, Gross JJ, Gabrieli JD (2002) Rethinking feelings: an fMRI study of the cognitive regulation of emotion. *J Cogn Neurosci* 14:1215-1229.
- O'Keefe J, Dostrovsky J (1971) The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 34:171-175.
- O'Keefe J, Nadel L (1978) *The hippocampus as a cognitive map*. Clarendon Press, Oxford.
- Olton DS, Becker JT, Hendelman GH (1979) Hippocampus, space and memory. *Behav. Brain Science*, 2: 313-365
- P**ackard MG (1999) Glutamate infused posttraining into the hippocampus or caudate-putamen differentially strengthens place and response learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12881-12886.
- Packard MG, Chen SA (1999) The basolateral amygdala is a co-factor in memory enhancement produced by intrahippocampal glutamate injections. *Psychobiol.* 27:377-85

- Packard MG, Cahill L, McGaugh JL (1994) Amygdala modulation of hippocampal-dependent and caudate nucleus-dependent memory processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8477-8481.
- Pare D (2003) Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. *Prog Neurobiol* 70:409-420.
- Pare D, Smith Y (1993) The intercalated cell masses project to the central and medial nuclei of the amygdala in cats. *Neuroscience* 57:1077-1090.
- Pare D, Quirk GJ, Ledoux JE (2004) New vistas on amygdala networks in conditioned fear. *J Neurophysiol* 92:1-9.
- Pavlov IP (1927) *Conditioned reflex*. Oxford University Press, Oxford.
- Paxinos G, Watson C (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York
- Pesold C, Treit D (1992) Excitotoxic lesions of the septum produce anxiolytic effects in the elevated plus-maze and the shock-probe burying tests. *Physiol Behav* 52:37-47.
- Phelps EA (2004) Human emotion and memory: interactions of the amygdala and hippocampal complex. *Curr Opin Neurobiol* 14:198-202.
- Phelps EA, O'Connor KJ, Gatenby JC, Gore JC, Grillon C, Davis M (2001) Activation of the left amygdala to a cognitive representation of fear. *Nat Neurosci* 4:437-441.
- Phillips RG, LeDoux JE (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 106:274-285.
- Phillips RG, LeDoux JE (1994) Lesions of the dorsal hippocampal formation interfere with background but not foreground contextual fear conditioning. *Learn Mem* 1:34-44.
- Pitkanen A (2000) Connectivity of the rat amygdaloid complex. In *The amygdala. A functional analysis*. Aggleton JP (Ed.) School of Psychology, Cardiff University, UK, pp 31-99
- Pitkanen A, Jolkkonen E, Kempainen S (2000) Anatomic heterogeneity of the rat amygdaloid complex. *Folia Morphol (Warsz)* 59:1-23.
- Pribam KH, Bagshaw M (1953) Further analysis of the temporal lobe syndrome utilizing frontotemporal ablations. *J Comp Neurol*, 99:274-375
- R**aisman G, Cowan WM, Powell TP (1966) An experimental analysis of the efferent projection of the hippocampus. *Brain* 89:83-108.

- Rescorla RA (1968) Probability of shock in the presence and absence of CS in fear conditioning. *J Comp Physiol Psychol* 66:1-5.
- Rescorla RA (1988) Pavlovian conditioning. It's not what you think it is. *Am Psychol* 43:151-160.
- Rescorla RA, Wagner AR (1972) A theory of pavlovian. Variations in the effectiveness of reinforcement and non-reinforcement. In *Classical Conditioning II: Current Research and theory*, AH Black & WF Prosaky (Eds.), Appleton-Century-Crofts, New York.
- Revest JM, Di Blasi F, Kitchener P, Rouge-Pont F, Desmedt A, Turiault M, Tronche F, Piazza PV (2005) The MAPK pathway and Egr-1 mediate stress-related behavioral effects of glucocorticoids. *Nat Neurosci* 8:664-672.
- Roediger HL (1990) Implicit memory: retention without remembering. *Amer Psychologist* 45: 1043-1056
- Rodrigues SM, Schafe GE, LeDoux JE (2004) Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala. *Neuron* 44:75-91.
- Rogan MT, LeDoux JE (1995) LTP is accompanied by commensurate enhancement of auditory-evoked responses in a fear conditioning circuit. *Neuron* 15:127-136.
- Rogan MT, Staubli UV, LeDoux JE (1997) Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature* 390:604-607.
- Rolls ET (1992) Neurophysiology and functions of the primate amygdala. In *The amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory and Mental Dysfunction*, Aggleton JP (Ed.), Wiley-Liss, New York, pp. 143-165.
- Romanski LM, LeDoux JE (1992) Equipotentiality of thalamo-amygdala and thalamo-cortico-amygdala circuits in auditory fear conditioning. *J Neurosci* 12:4501-4509.
- Romanski LM, LeDoux JE (1993) Information cascade from primary auditory cortex to the amygdala: corticocortical and corticoamygdaloid projections of temporal cortex in the rat. *Cereb Cortex* 3:515-532.
- Rosenblum K, Futter M, Jones M, Hulme EC, Bliss TV (2000) ERKI/II regulation by the muscarinic acetylcholine receptors in neurons. *J Neurosci* 20:977-985.
- Royer S, Martina M, Pare D (1999) An inhibitory interface gates impulse traffic between the input and output stations of the amygdala. *J Neurosci* 19:10575-10583.
- Rudy JW, O'Reilly RC (1999) Contextual fear conditioning, conjunctive representations, pattern completion, and the hippocampus. *Behav Neurosci* 113:867-880.
- Rudy JW, Barrientos RM, O'Reilly RC (2002) Hippocampal formation supports conditioning to memory of a context. *Behav Neurosci* 116:530-538.

- Rudy JW, Huff NC, Matus-Amat P (2004) Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. *Neurosci Biobehav Rev* 28:675-685.
- S**acchetti B, Lorenzini CA, Baldi E, Tassoni G, Bucherelli C (1999) Auditory thalamus, dorsal hippocampus, basolateral amygdala, and perirhinal cortex role in the consolidation of conditioned freezing to context and to acoustic conditioned stimulus in the rat. *J Neurosci* 19:9570-9578.
- Schacter DL (1992) Priming and multiple memory systems: Perceptual mechanisms of implicit memory. *J Cogn Neurosci*. 4: 244-256
- Schacter DL, Tulving E (1994) Qu'en est-il de la notion de systèmes mnésiques en 1994 ? In Schacter, DL Tulving E, Solal (Eds) *Systèmes de mémoire chez l'animal et chez l'homme*. Marseille, p 151-204
- Sherry DF, Schacter DL (1987) The evolution of multiple memory systems. *Psychological Rew*, 94: 439-454
- Schaefer SM, Jackson DC, Davidson RJ, Aguirre GK, Kimberg DY, Thompson-Schill SL (2002) Modulation of amygdalar activity by the conscious regulation of negative emotion. *J Cogn Neurosci* 14:913-921.
- Schafe GE, LeDoux JE (2000) Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala. *J Neurosci* 20:RC96.
- Schafe GE, Nadel NV, Sullivan GM, Harris A, LeDoux JE (1999) Memory consolidation for contextual and auditory fear conditioning is dependent on protein synthesis, PKA, and MAP kinase. *Learn Mem* 6:97-110.
- Schroeder JP, Packard MG (2000) Role of dopamine receptor subtypes in the acquisition of a testosterone conditioned place preference in rats. *Neurosci Lett* 282:17-20.
- Scoville WB, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:11-21.
- Selden NR, Everitt BJ, Jarrard LE, Robbins TW (1991) Complementary roles for the amygdala and hippocampus in aversive conditioning to explicit and contextual cues. *Neuroscience* 42:335-350.
- Shinnick-Gallagher P, McKernan MG, Xie J, Zinebi F (2003) L-type voltage-gated calcium channels are involved in the in vivo and in vitro expression of fear conditioning. *Ann N Y Acad Sci* 985:135-149.

- Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S (1998) CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* 21:127-148.
- Slotnick BM, Jarvik ME (1966) Deficits in passive avoidance and fear conditioning in mice with septal lesions. *Science* 154:1207-1208.
- Slotnick BM, Brown DL (1970) Fear conditioning and passive avoidance in mice with septal lesions. *Physiol Behav* 5:1255-1259.
- Smith AP, Stephan KE, Rugg MD, Dolan RJ (2006) Task and content modulate amygdala-hippocampal connectivity in emotional retrieval. *Neuron* 49:631-638.
- Sparks PD, LeDoux JE (1995) Septal lesions potentiate freezing behavior to contextual but not to phasic conditioned stimuli in rats. *Behav Neurosci* 109:184-188.
- Sparks PD, LeDoux JE (2000) The Septal Complex as Seen Through the Context of Fear. In: *The Behavioral Neuroscience of the Septal Region* (Numan R, ed), pp 234-269. New York: Springer-Verlag
- Staiger JF, Nurnberger F (1991) The efferent connections of the lateral septal nucleus in the guinea pig: projections to the diencephalon and brainstem. *Cell Tissue Res* 264:391-413.
- Stiedl O, Birkenfeld K, Palve M, 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.
- Sutherland RJ, Kolb B, Whishaw IQ (1982) Spatial mapping: definitive disruption by hippocampal or medial frontal cortical damage in the rat. *Neurosci Lett* 31:271-276.
- Sutherland RJ, McDonald RJ, Hill CR, Rudy JW (1989) Damage to the hippocampal formation in rats selectively impairs the ability to learn cue relationships. *Behav Neural Biol* 52:331-356.
- Sutherland RJ, Rudy JW (1989) Configural association theory: the contribution of the hippocampus to learning, memory and amnesia. *Psychobiol*, 17:129:144.
- Swanson LW (1992) *Brain Maps: Structure of the Rat Brain*. Elsevier, Amsterdam.
- Swanson LW, Cowan WM (1977) An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J Comp Neurol* 172:49-84.
- Swanson LW, Cowan WM (1979) The connections of the septal region in the rat. *J Comp Neurol* 186:621-655.

- Swanson LW, Risold PY (2000) On the basic architecture of the septal region. In Numan R (Ed.), *The behavioural Neuroscience of the Septal Region*. Springer-Verlag, New-York, 2000, pp 1-14.
- T**ang J, Ko S, Ding HK, Qiu CS, Calejesan AA, Zhuo M (2005) Pavlovian fear memory induced by activation in the anterior cingulate cortex. *Mol Pain* 1:6.
- Taube JS, Muller RU, Ranck JB, Jr. (1990) Head-direction cells recorded from the postsubiculum in freely moving rats. I. Description and quantitative analysis. *J Neurosci* 10:420-435.
- Thomas E (1988) Forebrain mechanisms in the relief of fear : the role of the lateral septum. *Psychobiology*, 16:36-44.
- Thorndike EL (1911) *Animal Intelligence: experimental studies*. New York: Macmillan.
- Tolman EC (1959) Principles of purposive behaviour. In *Psychology: A study of a science*, vol.2, S Koch (Ed.), McGraw-Hill, New York.
- Toth K, Freund TF (1992) Calbindin D28k-containing nonpyramidal cells in the rat hippocampus: their immunoreactivity for GABA and projection to the medial septum. *Neuroscience* 49:793-805.
- Toth K, Borhegyi Z, Freund TF (1993) Postsynaptic targets of GABAergic hippocampal neurons in the medial septum-diagonal band of Broca complex. *J Neurosci* 13:3712-3724.
- Tranel D, Hyman BT (1990) Neuropsychological correlates of bilateral amygdala damage. *Archives of Neurology*, 47:349-355.
- Treit D, Pesold C (1990) Septal lesions inhibit fear reactions in two animal models of anxiolytic drug action. *Physiol Behav* 47:365-371.
- Treit D, Menard J (1997) Dissociations among the anxiolytic effects of septal, hippocampal, and amygdaloid lesions. *Behav Neurosci* 111:653-658.
- Trifilieff P (2006) Etude de l'implication de la voie des MAPK/ERK dans la consolidation du conditionnement de peur: dépendance à la nature de la représentation mnésique. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux I.
- Trifilieff P, Herry C, Vanhoutte P, Caboche J, Desmedt A, Riedel G, Mons N, Micheau J (2006) Foreground contextual fear memory consolidation requires two independent phases of hippocampal ERK/CREB activation. *Learn Mem* 13:349-358.

- Turner BH, Herkenham M (1991) Thalamoamygdaloid projections in the rat: a test of the amygdala's role in sensory processing. *J Comp Neurol* 313:295-325.
- V**an der Linden, M (1994) Neuropsychologie de la mémoire. In *Neuropsychologie humaine*. Seron X, Jeannerod M (Eds.), Mardaga, pp 282-316
- Van den Hooff P, Urban IJ, de Wied D (1989) Vasopressin maintains long-term potentiation in rat lateral septum slices. *Brain Res* 505:181-186.
- Vazdarjanova A, McGaugh JL (1999) Basolateral amygdala is involved in modulating consolidation of memory for classical fear conditioning. *J Neurosci* 19:6615-6622.
- Verney C, Baulac M, Berger B, Alvarez C, Vigny A, Helle KB (1985) Morphological evidence for a dopaminergic terminal field in the hippocampal formation of young and adult rat. *Neuroscience* 14:1039-1052.
- Vouimba RM (1997) Réponses évoquées hippocampo-septales: plasticité associée à l'acquisition des informations spatiales et contextuelles chez la souris. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux I.
- Vouimba RM, Garcia R, Jaffard R (1998) Opposite effects of lateral septal LTP and lateral septal lesions on contextual fear conditioning in mice. *Behav Neurosci* 112:875-884.
- W**arrington EK, Weiskrantz L (1968) New method of testing long-term retention with special reference to amnesic patients. *Nature* 217:972-974.
- Wasserman EA, Miller RR (1997) What's elementary about associative learning? *Annu Rev Psychol* 48:573-607.
- Weeber EJ, Atkins CM, Selcher JC, Varga AW, Mirnikjoo B, Paylor R, Leitges M, Sweatt JD (2000) A role for the beta isoform of protein kinase C in fear conditioning. *J Neurosci* 20:5906-5914.
- Weiskrantz L (1956) Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys. *J Comp Physiol Psychol* 49:381-391.
- Weisskopf MG, Bauer EP, LeDoux JE (1999) L-type voltage-gated calcium channels mediate NMDA-independent associative long-term potentiation at thalamic input synapses to the amygdala. *J Neurosci* 19:10512-10519.
- White NM, McDonald RJ (1993) Acquisition of a spatial conditioned place preference is impaired by amygdala lesions and improved by fornix lesions. *Behav Brain Res* 55:269-81.

- White NM, McDonald RJ (2002) Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol Learn Mem* 77:125-184.
- Wiener SI, Paul CA, Eichenbaum H (1989) Spatial and behavioral correlates of hippocampal neuronal activity. *J Neurosci* 9:2737-2763.
- Wilensky AE, Schafe GE, LeDoux JE (1999) Functional inactivation of the amygdala before but not after auditory fear conditioning prevents memory formation. *J Neurosci* 19:RC48.
- Winocur G, Rawlins JN, Gray JA (1987) The hippocampus and conditioning to contextual cues. *Behav Neurosci* 101:617-625, 742.
- Witter MP, Groenewegen HJ, Lopes da Silva FH, Lohman AHM (1989) Functional organisation of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parhippocampal region. *Progress In Neurobiol*, 33:161-153.
- Wood ER, Dudchenko PA, Eichenbaum H (1999) The global record of memory in hippocampal neuronal activity. *Nature* 397:613-616.
- Y**aniv D, Schafe GE, LeDoux JE, Richter-Levin G (2001) A gradient of plasticity in the amygdala revealed by cortical and subcortical stimulation, in vivo. *Neuroscience* 106:613-620.
- Yaniv D, Desmedt A, Jaffard R, Richter-Levin G (2004) The amygdala and appraisal processes: stimulus and response complexity as an organizing factor. *Brain Res Brain Res Rev* 44:179-186.
- Yokoyama I, Sakai Y, Hatayama Y, Tsuji S, Koyama Y, Baba A, Matsuda T (2003) T-588, a cognitive enhancer, stimulates in vivo phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases in the hippocampus. *Brain Res Cogn Brain Res* 17:522-525.
- Young AW, Hellawell DJ, Van De Wal C, Johnson M (1996) Facial expression processing after amygdalotomy. *Neuropsychologia* 34:31-39.
- Young AW, Aggleton JP, Hellawell DJ, Johnson M, Broks P, Hanley JR (1995) Face processing impairments after amygdalotomy. *Brain* 118 (Pt 1):15-24.
- Young SL, Bohenek DL, Fanselow MS (1994) NMDA processes mediate anterograde amnesia of contextual fear conditioning induced by hippocampal damage: immunization against amnesia by context preexposure. *Behav Neurosci* 108:19-29.

- Z**hang WN, Bast T, Feldon J (2001) The ventral hippocampus and fear conditioning in rats: different anterograde amnesias of fear after infusion of N-methyl-D-aspartate or its noncompetitive antagonist MK-801 into the ventral hippocampus. *Behav Brain Res* 126:159-174.
- Zola-Morgan S, Squire LR (1993) Neuroanatomy of memory. *Annu Rev Neurosci* 16:547-563.
- Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG (1986) Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci* 6:2950-2967.
- Zola-Morgan S, Squire LR, Alvarez-Royo P, Clower RP (1991) Independence of memory functions and emotional behavior: separate contributions of the hippocampal formation and the amygdala. *Hippocampus* 1:207-220.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
