

Université de Montréal

Modulation des rythmes de l'hippocampe par les neurones sérotoninergiques du raphé

*Par*

Alice Gravel-Chouinard

Département de Neurosciences, Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en Neurosciences

Avril 2022

© Alice Gravel-Chouinard, 2022



Université de Montréal

Unité académique : Département de Neurosciences, Faculté de Médecine

---

*Ce mémoire intitulé*

**Modulation des rythmes de l'hippocampe par les neurones sérotoninergiques du raphé**

*Présenté par*

**Alice Gravel-Chouinard**

*A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes*

**Numa Dancause**

Président-rapporteur

**Bénédicte Amilhon**

Directeur de recherche

**Jannic Boehm**

Membre du jury



## Résumé

L'hippocampe (HP) peut être divisé en sous-régions distinctes. L'hippocampe dorsal (HPd) est important pour la mémoire spatiale et la navigation, alors que l'hippocampe ventral (HPv) est surtout impliqué dans l'anxiété. Le rythme thêta (5-12Hz) est un des rythmes de l'HP, présent durant l'exploration et le sommeil paradoxal. Il est impliqué dans l'apprentissage, la mémoire et l'anxiété. Le rythme thêta de l'HP est modulé par de nombreuses structures, dont les neurones sérotoninergiques (5-HT) du raphé, un noyau contenant plusieurs populations neuronales et avec de vastes projections. Plusieurs études pharmacologiques et de lésions démontrent un effet désynchronisateur du RM sur le rythme thêta. Les études pharmacologiques et de lésions ont le désavantage d'être peu précises temporellement, et peuvent permettre des mécanismes de compensation ou l'altération des circuits. Le rôle précis des neurones 5-HT dans la modulation du rythme thêta reste donc à établir.

L'hypothèse de mon travail de maîtrise est que les neurones 5-HT du RM affectent les propriétés des rythmes de l'HP. Nous avons combiné des enregistrements de potentiel de champ local dans l'HPv et l'HPd, avec l'activation des neurones 5-HT du RM par optogénétique. Cette activation a été faite lors du sommeil lent, du sommeil paradoxal, ainsi que lors de l'exposition à un environnement nouveau. Dans un second temps, pour tenter d'établir le rôle spécifique des neurones 5-HT envoyant des projections directes à l'HP dans la modulation de l'activité hippocampique, nous avons isolé la voie 5-HT raphé-HP et l'avons activé par optogénétique pendant le sommeil lent et paradoxal.

Nous démontrons que l'activation des neurones 5-HT du RM diminue la fréquence des rythmes de l'HP pendant le sommeil lent, paradoxal, et pendant l'immobilité dans un environnement nouveau. Nous observons lors de l'activation pendant le sommeil lent une augmentation dans l'HPd de la puissance, une mesure reflétant l'amplitude des oscillations, et une diminution dans l'HPv. L'activation des neurones 5-HT projetant à l'HP donne des résultats préliminaires similaires. Nos données démontrent une modulation des rythmes de l'HP par les neurones 5-HT du raphé.

**Mots-clés** : sérotonine, raphé, HP, électrophysiologie, optogénétique



## Abstract

The hippocampus can be divided into two distinct subregions. The dorsal hippocampus is important for spatial memory and navigation, where the ventral hippocampus is implicated in anxiety. Theta rhythms (6-12Hz) are one of many hippocampal rhythms and are present during exploration and rapid eye movement (REM) sleep. They have been implicated in learning, memory and anxiety. Hippocampal theta rhythms are modulated by many structures, including the serotonergic (5-HT) neurons of the raphe, a nuclei with multiple neuronal population and vast projections. Many lesions or pharmacological studies have shown the median raphe to have a desynchronizing effect on theta rhythms. However, lesion and pharmacological studies have poor temporal precision, and the sustained activation can create compensatory mechanisms or circuits alterations. The precise role of 5-HT neurons in theta rhythm modulation remains to be established.

My master's hypothesis was that serotonergic median raphe neurons alter hippocampal rhythms properties. We combined electrophysiological recordings of the dorsal and ventral hippocampus local field potential with optogenetic stimulation of serotonergic median raphe neurons. This activation was done during slow wave sleep, REM sleep and during the exploration of a novel environment. In a second phase, to establish the role of 5-HT neurons directly projecting to the HP in hippocampal rhythm modulation, we isolated the 5-HT raphe-HP pathway and used optogenetic activations during REM and slow wave sleep.

We demonstrated that 5-HT median raphe neurons activation decreases hippocampal rhythm frequency during slow wave sleep, REM sleep, and during immobility in a novel arena. We also observed that 5-HT median raphe neurons activation caused an increase in power, a measure of rhythm amplitude, in the dorsal hippocampus, and a decrease in power in the ventral hippocampus. The activation of 5-HT neurons projecting to the hippocampus had similar preliminary results. We therefore demonstrated the modulation of hippocampal rhythms by the serotonergic neurons of the median raphe.

**Keywords** : serotonin, raphe, hippocampus, electrophysiology, optogenetics





# Table des matières

Résumé.....	5
Abstract .....	7
Table des matières .....	9
Liste des tableaux.....	13
Liste des figures.....	15
Liste des sigles et abréviations .....	17
Remerciements .....	21
1. Introduction.....	23
1.1 L'hippocampe .....	23
1.1.1 Anatomie de l'HP .....	23
1.1.2 Fonctions de l'HP : mémoire et anxiété.....	24
1.1.3 Division dorso-ventrale de l'HP .....	25
1.1.3.1 L'Hippocampe dorsal .....	25
1.1.3.2 L'Hippocampe ventral.....	26
1.1.4 Les rythmes de l'HP .....	27
1.1.4.1 Les rythmes de l'hippocampe et la communication par la cohérence .....	28
1.1.4.2 Définitions des états de vigilance et rythmes associés.....	29
1.1.4.3 Rythme delta .....	30
1.1.4.3.1 Génération et modulation du delta.....	30
1.1.4.3.2 Fonctions du delta .....	31
1.1.4.4 Thêta.....	32
1.1.4.4.1 Génération et modulation du thêta .....	32

1.1.4.4.2 Fonctions du rythme thêta de l'HPd.....	33
1.1.4.4.3 Fonctions du rythme thêta de l'HPv.....	34
1.2 Sérotonine.....	35
1.2.1 Raphé.....	36
1.2.1.1 Sous-divisions du raphé.....	36
1.2.1.2 Projections à l'HP.....	37
1.2.1.3 Patron d'activité des neurones du raphé.....	38
1.2.2 Sérotonine et Sommeil.....	38
1.2.3 Sérotonine et Rythmes thêta.....	40
2. Matériel et Méthodes.....	43
2.1 Souris.....	43
2.2 Injections virales.....	43
2.3 Implantation.....	45
2.4 Enregistrements.....	45
2.5 Analyses.....	47
2.5.1 Sommeil.....	47
2.5.1.1 Traitement des enregistrements.....	47
2.5.1.2 Identification des stades de sommeil.....	48
2.5.1.3 Analyses du LFP.....	48
2.5.1.4 Statistique.....	49
2.5.1.5 Groupes préliminaires.....	49
2.5.2 Exploration.....	49
2.5.2.1 Acquisitions des données.....	49
2.5.2.2 Analyse du LFP.....	49

2.5.2.3 Statistique.....	50
2.6 Histologie.....	50
3. Résultats.....	53
3.1 Activations des neurones sérotoninergiques du RM.....	53
3.1.1 Activation des neurones 5-HT du RM sur les rythmes de l'HP pendant le sommeil....	57
3.1.2 Exploration.....	66
3.2 Activations des neurones sérotoninergiques projetant à l'HP ou des neurones sérotoninergiques projetant à l'HPv.....	70
3.2.1 Sommeil.....	72
4. Discussion.....	77
4.1 Expression de l'opsine ChETA lors de l'injection dans le RM.....	77
4.2 Positionnement de fibres optiques dans le RM.....	78
4.3 Effet du mutant SERT-Cre.....	79
4.4 La stimulation des neurones 5-HT du RM cause une diminution de la fréquence du pic lors du sommeil lent, du sommeil paradoxal, et de l'immobilité dans un environnement nouveau .....	80
4.5 Effet spécifique au sexe de la modulation des neurones 5-HT du RM.....	82
4.6 La stimulation des neurones 5-HT du RM pendant le sommeil lent cause une augmentation de puissance de la bande dans l'HPv, et une diminution de la puissance de la bande dans l'HPd .....	82
4.7 La stimulation des neurones 5-HT du RM pendant l'exploration d'un environnement nouveau ne semble pas affecter la vitesse, ou l'activité de l'HP.....	83
4.8 La stimulation des neurones 5-HT projetant à l'HPv ou projetant l'HP semble avoir des effets similaires à la stimulation des neurones 5-HT du RM.....	85
5. Perspectives.....	86

5.1 Découverte des mécanismes .....	86
5.2 Inhibition .....	86
5.3 Comportement .....	86
6. Conclusion .....	88
Références bibliographiques .....	89

## Liste des tableaux

Tableau 1. – Description des groupes expérimentaux et des injections.....	44
Tableau 2. – Sites d’injections.....	44
Tableau 3. – Coordonnées d’implantations .....	45



## Liste des figures

Figure 1. – Schéma de l’anatomie transversale de l’HP. Les couches sont : couches <i>stratum</i> (st.) <i>oriens</i> (or), st. <i>Pyramidale</i> (ra), st. <i>radiatum</i> (ra) et st. <i>lacunosum-moleculare</i> (lm).....	23
Figure 2. – Schéma de la communication entre les régions du cerveau par la cohérence des rythmes du LFP. Reproduit et modifié de (Womelsdorf and Fries, 2006), avec permission .....	29
Figure 3. – Exemple d’enregistrements de LFP dans l’hippocampe ainsi que du signal électromyographique (EMG) pendant différents états de vigilance. Adapté et modifié de (Nicole et al., 2016)	29
Figure 4. – Expression conditionnelle de ChR2 selon la présence de l’enzyme CRE-recombinase.	44
Figure 5. – Schéma de l’analyse du LFP pendant le sommeil .....	47
Figure 6. – Expression conditionnelle d’une opsine à la GFP par les neurones 5-HT du RM après injection.	55
Figure 7. – Confirmation des sites d’implantations.....	57
Figure 8. – La stimulation des neurones 5-HT du RM pendant le sommeil REM diminue la fréquence du pic et augmente la puissance de la bande des rythmes de l’HPv.....	60
Figure 9. – La stimulation des neurones 5-HT du RM pendant le sommeil REM diminue la fréquence et augmente la puissance de la bande delta des rythmes de l’HPd.....	62
Figure 10. – La stimulation des neurones 5-HT du RM pendant le sommeil SWS diminue la fréquence et augmente la puissance du pic et de la bande du rythme de l’HPv. ....	63
Figure 11. – La stimulation des neurones 5-HT du RM pendant le sommeil SWS diminue la fréquence et diminue la puissance de la bande du rythme de l’HPd. ....	65
Figure 12. – La stimulation des neurones 5-HT du RM ne semble pas changer la vitesse de locomotion des souris, mais diminue la fréquence des rythmes thêta dans l’HPd pendant l’immobilité dans un environnement nouveau. ....	68
Figure 13. – La stimulation des neurones 5-HT du RM ne semble pas changer la fréquence ou la puissance des rythmes de l’HP pendant la locomotion. ....	70

Figure 14. – Expression du virus lors de l'injection spécifique au neurones 5-HT du RM projetant à l'HP ou à l'HPv, et vérification des implantations..... 71

Figure 15. – Figure 13. L'activation des neurones 5-HT du RM projetant à l'HP, et des neurones 5-HT du RM projetant à l'HPv semble diminuer la fréquence du rythme thêta dans l'HPv et dans l'HPd pendant le sommeil paradoxal..... 74

Figure 16. – L'activation des neurones 5-HT du RM projetant à l'HP, et des neurones 5-HT du RM projetant à l'HPv semble diminuer la fréquence du rythme thêta dans l'HPv et dans l'HPd pendant le sommeil lent..... 76



## Liste des sigles et abréviations

5,7-DHT : 5,7-dihydroxytryptamine

5-HT : Sérotonine

CA1 : *Corne d'Ammon 1*

CA3 : *Corne d'Ammon 3*

GABA : Acide gamma-aminobutyrique

GD : Gyrus Dentelé

HP : Hippocampe

HPd : Hippocampe Dorsal

HPv : Hippocampe Ventral

L-5-HTP : L-5-hydroxytryptophane

LFP : *Local Field Potential* ou potentiel de champ local

pCPA : Para-chlorophenylalanine

RD : Raphé Dorsal

RM : Raphé Médian

SL : Sommeil Lent

SM : Septum Médian

VGLUT3 : *Vesicular Glutamate Transporter 3* ou transporteur vésiculaire de glutamate 3



*À Renée et Claude, pour votre support inconditionnel*



## Remerciements

J'aimerais premièrement remercier ma directrice de maîtrise, Bénédicte Amilhon. Je te remercie de m'avoir si bien accueilli dans ton laboratoire, et de m'avoir encouragé à donner le meilleur de moi-même. J'aimerais aussi remercier Guillaume Ducharme d'avoir pris le temps de me former, mais surtout de m'avoir appris à aiguiser mon sens critique. Merci pour toutes les opportunités et les enseignements que vous m'aurez donnés, j'en serai toujours reconnaissante.

J'aimerais aussi remercier les membres de mon comité de parrainage, Numa Dancause et Valérie Mongrain, pour vos judicieux conseils, ainsi que Jannic Boehm, pour l'évaluation de mon mémoire.

Je tiens aussi à remercier tous les membres du laboratoire. Justine, merci d'avoir toujours été là pour m'aider et pour me former – je t'en suis très reconnaissante et je n'aurais pas eu la même maîtrise sans toi. Fiona, tu es un modèle de détermination et de débrouillardise, je suis choyé d'avoir pu passer autant de soirées au laboratoire avec toi, tu m'auras énormément appris. Félix, je suis très contente d'avoir pu faire mon stage et ma maîtrise à tes côtés, je te souhaite le meilleur dans tous tes grands projets. Anne-Sophie, ton arrivée a été un vrai vent de fraîcheur dans le laboratoire – je suis certaine que tu sauras accomplir tout ce que tu désires. Suzanne, même si notre passage simultané aura été bref, je te remercie de toute l'aide que tu m'as offerte. Daphnée, je te remercie pour toute ton travail à mon projet – tu as été un stagiaire de rêve et j'ai beaucoup apprécié travailler à tes côtés.

Merci à mes collègues et amis en neurosciences, Ife, Marie, Dominic, Félix B. et Patrick, pour les distractions pendant les cours par zoom, pour l'encouragement, et pour tous les beaux moments.

Finalement, le plus gros des mercis à mes amis et ma famille. Merci à mes parents, qui m'ont appuyé en encourageant sans limite pendant tout mon parcours scolaire – je ne serais pas ou je suis sans vous et j'en suis extrêmement reconnaissante. Merci à mes colocataires Sandrine et Salomé, et à mes amis, Charlotte, Ariane, Victor et Anastasiya, pour votre écoute, votre compréhension et votre don pour m'encourager et me remonter le moral.



# 1. Introduction

## 1.1 L'hippocampe

L'hippocampe (HP) est une région du cerveau situé sous le lobe temporal médian chez les humains, hautement conservé à travers les mammifères comme les rongeurs, les primates et l'humain. Plusieurs caractéristiques font de l'HP une structure d'intérêt : son importance pour la mémoire, la présence de neurogenèse dans le gyrus dentelé chez l'adulte, la plasticité synaptique présente dans l'arborisation dendritique dense des neurones pyramidaux ou son implication dans l'Alzheimer ainsi que l'épilepsie. Ainsi, l'HP est une des structures les plus étudiées du cerveau. Je décrirai son anatomie, ses fonctions et les rythmes du *Local Field Potential* (LFP) qui peuvent y être enregistrés (Andersen et al., 2006).

### 1.1.1 Anatomie de l'HP

L'HP est divisé en trois zones, communiquant entre elles : le CA1 (CA pour Corne d'Ammon), le CA3 et le gyrus denté (ou GD). Ces zones sont organisées en couches distinctes : le CA1 et le DG sont composés des couches *stratum* (st.) *oriens* (or), *st. pyramidale* (py), *st. radiatum* (ra) et *st. lacunosum-moleculare* (lm). Le CA3 est composé des mêmes couches, auxquelles on peut ajouter la *st. lucidum* (lu) (Figure 1, Schultz and Engelhardt (2014)). L'HP conserve une anatomie interne similaire à travers son axe dorso-ventral.

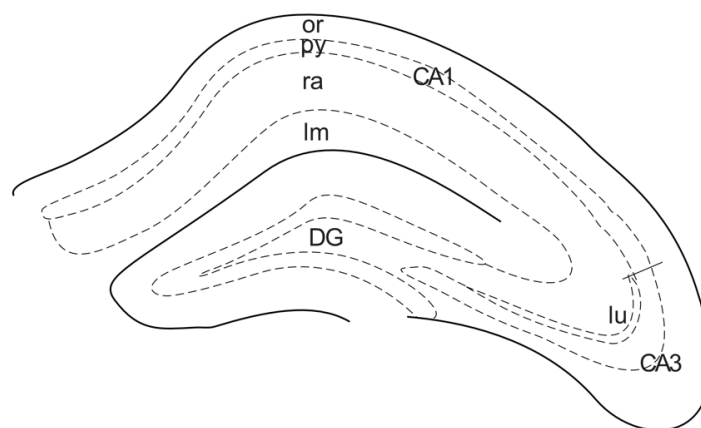


Figure 1. – Schéma de l'anatomie transversale de l'HP. Les couches sont : couches *stratum* (st.) *oriens* (or), *st. Pyramidale* (py), *st. radiatum* (ra) et *st. lacunosum-moleculare* (lm)

### **1.1.2 Fonctions de l'HP : mémoire et anxiété**

Deux fonctions de l'HP ont toujours coexisté, soit son rôle dans la mémoire ou dans les comportements émotionnels. Même si l'anatomie dorso-ventrale uniforme de l'HP pourrait suggérer une fonction unique, on sait aujourd'hui que l'axe dorsal et l'axe ventral de l'HP assurent diverses fonctions.

Dans le modèle classique de la mémoire, les souvenirs sont créés dans l'HP et sont transmis au cortex pendant le sommeil lent (*Slow Wave Sleep*), pour l'intégration à long terme (Squire and Zola-Morgan, 1991; Nadel and Moscovitch, 1997; Eichenbaum, 2000). Le rôle de l'HP dans la mémoire a été proposé après l'étude de cas d'H.M., un patient épileptique réfractaire à la médication, qui s'est fait retirer une large portion de l'HP. Après la chirurgie, H.M. a développé une amnésie antérograde, soit un déficit d'acquisition de souvenirs actuels, sans affecter les souvenirs précédemment acquis (Scoville and Milner, 1957). Des expériences de lésions de l'HP dans des modèles animaux ont permis de confirmer le rôle central de l'HP dans la formation de la mémoire (Salmon et al., 1987; Dillon et al., 2008; Epp et al., 2008).

L'HP est aussi impliqué dans les comportements émotionnels. En 1937, une étude a démontré que le retrait du lobe temporal, de l'amygdale et de l'HP chez les singes causait des modifications profondes de leurs émotions, dont la disparition de la peur et de la colère (Klüver and Bucy, 1937). Une association entre l'HP et les émotions a par la suite été confirmée chez l'humain, où une diminution de volume, une dysfonction ou une altération de la connectivité de l'HP est associée à plusieurs problèmes psychologiques comme les troubles bipolaires, la dépression et le syndrome de stress post-traumatique (Frey et al., 2007; Schuff et al., 2008; Frodl et al., 2010). L'implication de l'HP dans les émotions est aussi due à son rôle dans la régulation hormonale : les lésions de l'HP modifient la réponse hormonale au stress (Fischette et al., 1980; Wilson et al., 1980; Sapolsky et al., 1984; Jacobson and Sapolsky, 1991). À l'opposé, l'élévation des hormones de stress cause des dysfonctions de l'HP, comme une diminution du nombre de neurones pyramidaux (Sapolsky et al., 1985; Issa et al., 1990; McEwen, 1997; Herman et al., 2005). Ainsi, l'HP est impliqué dans deux fonctions – la mémoire et les comportements émotionnels.



### 1.1.3 Division dorso-ventrale de l'HP

Dans une revue de la littérature en 1998, Moser et Moser ont suggéré une division fonctionnelle dorso-ventrale de l'HP en se basant sur trois arguments principaux (Moser and Moser, 1998). Premièrement, même si l'anatomie interne de l'HP est similaire, les afférences et efférences de l'HPd et l'HPv sont distinctes (Andersen et al., 1971). Deuxièmement, la mémoire spatiale nécessite l'HPd, mais pas l'HPv (Hughes, 1965; Moser et al., 1995). Troisièmement, les effets sur la réponse hormonale et comportementale au stress nécessitent l'HPv (Henke, 1990; Herman et al., 1998). Les détails de ces trois arguments seront décrits dans les sections suivantes.

#### 1.1.3.1 L'Hippocampe dorsal

L'HPd reçoit via le cortex entorhinal des informations multisensorielles déjà traitées par les aires associatives (Lavenex and Amaral, 2000; Rolls, 2013). Il envoie des projections à plusieurs aires impliquées dans la navigation et la direction comme le noyau antérieur de thalamus, le noyau mamillaire médial et latéral et le septum latéral (Risold and Swanson, 1996, 1997; Ishizuka, 2001). L'HPd projette vers des aires corticales impliquées dans le traitement de l'information visuelle et de la mémoire, telles que le cortex rétrosplénial et antérieur cingulaire, chez les rongeurs comme chez les singes (Parvizi et al., 2006; Cenquizca and Swanson, 2007; Kobayashi and Amaral, 2007; Roberts et al., 2007). L'HPd est donc connecté à un réseau de régions cérébrales importantes pour la mémoire et l'apprentissage spatial.

L'HPd est surtout impliqué dans la mémoire spatiale, la fonction la plus connue et étudiée de l'HP. Des études ont démontré qu'une lésion de l'HPd, mais pas de l'HPv était suffisante pour causer un déficit de mémoire dans le labyrinthe de Morris (Moser et al., 1995), ainsi que dans un labyrinthe à bras radial (Pothuizen et al., 2004). De plus, l'HPd possède un grand nombre de neurones nommés les cellules de lieu ou *place cells*. Ceux-ci encodent la position de l'animal dans l'espace en déchargeant lorsque l'animal est situé sur un emplacement précis, et permettraient d'établir une carte de son environnement (O'Keefe, 1976; Jung et al., 1994). Récemment, des études chez les humains ont aussi associé la navigation et la mémoire spatiale à l'HP postérieur, l'analogue de l'HPd chez les primates. Par exemple, les chauffeurs de taxi de Londres possèdent plus de matière grise dans l'HP postérieur, mais pas antérieur par rapport à la population générale

(Woollett and Maguire, 2011). Finalement, lors d'un rappel de routes particulièrement complexes, l'activité est augmentée dans l'HP postérieur (Maguire et al., 1997). Ainsi, en étant connectés à des aires importantes pour la mémoire et l'apprentissage spatial et en encodant la position de l'animal dans l'espace grâce aux *place cells*, l'HPd est impliqué dans la mémoire et l'apprentissage spatial.

### 1.1.3.2 L'Hippocampe ventral

L'HPv est entre autres connecté au système limbique. Il partage des connexions réciproques importantes avec l'amygdale (Saunders et al., 1988; Petrovich et al., 2001; Cenquizca and Swanson, 2007), le noyau accumbens (French and Totterdell, 2002; Britt et al., 2012) et le cortex prélimbique et infralimbique, des régions chez les rongeurs qui sont analogues au cortex préfrontal médian de l'homme (Thierry et al., 2000; Hoover and Vertes, 2007). L'HPv est donc connecté au réseau impliqué dans l'expression et la modulation des émotions.

L'HPv a un rôle important dans l'expression de l'anxiété et des émotions. L'HPv est par exemple impliqué dans le conditionnement à la peur. Pendant ces tests, les rongeurs sont exposés à un environnement, avant de recevoir plusieurs présentations simultanées d'un choc et d'un son. Après une période de repos, les rongeurs sont réexposés au son ou à l'environnement dans lequel ils ont été choqués. Le pourcentage de temps passé figé (*freezing*) est calculé, comme mesure de peur, indiquant le rappel de l'association du choc (Estes and Skinner, 1941). L'HPv est connu comme étant impliqué dans le conditionnement par la peur, mais aussi dans les réponses défensives lors de la présence de prédateurs ou d'odeur de prédateurs (Blanchard et al., 1977; Richmond et al., 1999; Zhang et al., 2001; Pentkowski et al., 2006). Les souris avec des lésions dans l'HPv semblent avoir un niveau d'anxiété diminué, puisqu'elles passent plus de temps dans les zones aversives et découvertes de différents tests, comme les bras ouverts d'un labyrinthe en croix surélevée et le centre d'un labyrinthe ouvert (ou *open field*) (Kjelstrup et al., 2002; Weeden et al., 2015). De plus, elles ont moins de défécation et de taux de corticostérone plus bas lors de l'exposition à un labyrinthe ouvert exposé à une forte lumière et donc plus aversif (Kjelstrup et al., 2002). Chez les humains, il a été démontré que l'HP antérieur, l'équivalent de l'HPv, est plus activé lors de l'exposition à un son associé à un choc (Meyer et al., 2019). Les *place cells* de l'HPv sont moins nombreux et semblent encoder l'espace de façon moins précise que ceux de l'HPv

(Jung et al., 1994). Ainsi, par ses connexions réciproques avec les autres régions du système limbique, l'HPv est impliqué dans l'expression des émotions et dans les comportements anxieux.

Il est maintenant accepté que les régions dorsales et ventrales de l'HP possèdent des fonctions, des expressions géniques et des connexions très différentes (Bannerman et al., 2004; Fanselow and Dong, 2010).

#### **1.1.4 Les rythmes de l'HP**

Les rythmes de l'HP sont des oscillations du potentiel électrique du milieu extracellulaire qui peuvent être enregistrés par le potentiel de champ local (ou LFP, pour *local field potential*) (Colgin, 2016). Tous les mouvements ioniques venant de membranes excitables peuvent participer au LFP (Buzsaki et al., 2012). L'activité synaptique est le plus grand contributeur au LFP (Elul, 1971; Lindén et al., 2011), mais d'autres types d'activités y participent, par exemple les courants intrinsèques et l'hyperpolarisation post-décharge des neurones contribuent tous au LFP (Wong et al., 1979; Hotson and Prince, 1980; Llinás, 1988; Buzsaki et al., 2012). Cette activité est considérée par plusieurs comme distincte des potentiels d'actions qui causent des pics rapides dans une bande de fréquence plus élevée, reconnus comme de l'activité unitaire (Herreras, 2016). C'est l'organisation spatiale des neurones et leur synchronie qui permettent l'addition de leur potentiel électrique et qui forment des rythmes périodiques enregistrables.

L'organisation spatiale de l'HP, soit la densité importante de neurones, et l'organisation des dendrites des neurones pyramidaux du CA1 en parallèle est idéale pour la formation de LFP (Colgin, 2016). De plus, l'organisation laminaire de l'hippocampe permet aussi la concentration de courants synaptiques dans certaines couches. Par exemple, les courants post-synaptique excitateurs des afférences du CA3, soit les collatérales de Schaffer, sont concentrées dans la *stratum radiatum*, alors que les afférences du cortex sont concentrées dans la *lacunosum-moleculare* (Andersen et al., 2006). Cette organisation permet la sommation de l'activité synaptique des neurones pyramidaux. En plus de l'organisation spatiale, l'HP possède une population importante d'interneurones qui permettent la synchronisation de l'activité dans l'HP (Cobb et al., 1995). Ainsi, l'HP possède des propriétés anatomiques et électrophysiologiques qui en font l'un des principaux générateurs de l'activité rythmiques dans le LFP.

Plusieurs types de rythmes sont enregistrés dans l'HP et sont définis par leur fréquence, mais cette définition varie selon l'ouvrage étudié. Les définitions que j'utiliserai sont les suivantes : Delta (1-5Hz), Thêta (5-12Hz), Beta (12-30 Hz) et Gamma (30-80Hz). Dans ce mémoire, je me concentrerai sur les rythmes delta et thêta. Les rythmes thêta et delta sont associés à des états comportementaux ou de vigilance spécifique qui seront décrits dans les sections suivantes.

#### 1.1.4.1 Les rythmes de l'hippocampe et la communication par la cohérence

Il est connu que les rythmes de l'HP sont non seulement associés à certaines fonctions, mais qu'ils participent à l'accomplissement de celles-ci. Par exemple, l'inhibition des rythmes thêta pendant le sommeil REM suivant l'apprentissage d'une tâche diminue son rappel le lendemain (Boyce et al., 2016). Certaines hypothèses expliquent la nécessité des rythmes du LFP dans certains comportements, dont la communication par la cohérence (Fries, 2005).

Les rythmes de l'hippocampes définiraient des périodes d'excitabilité accrue, où la communication entre les neurones d'une même région ou de régions distinctes serait optimale, par exemple en favorisant la potentialisation à long terme, ou la *spike-timing dependant plasticity*. Chaque région possède un rythme local avec une phase variable. Pendant les comportements nécessitant la communication entre deux régions, les phases permissives sont alignées pour permettre la potentialisation du signal (Figure 2). Cette synchronisation de rythmes a été observée à travers le cerveau pour une variété de rythmes et comportements. Pendant les tâches nécessitant un choix de parcours selon une alternance apprise, on observe une cohérence augmentée entre le rythme dans l'HP et dans le cortex préfrontal lors des parcours réussis, mais pas lors des parcours erronés, lors de course forcée ou avant que la règle soit bien mémorisée (Jones and Wilson, 2005; Benchenane et al., 2010). Si le choix de parcours est associé à un son, la cohérence entre le striatum et l'HP est augmentée lorsque la tâche est apprise (DeCoteau et al., 2007). Si l'association se fait plutôt avec une odeur, c'est la cohérence entre l'HP et le bulbe olfactif qui est augmentée (Kay, 2005). Ainsi, les rythmes du LFP permettraient d'optimiser la communication entre les régions du cerveau.

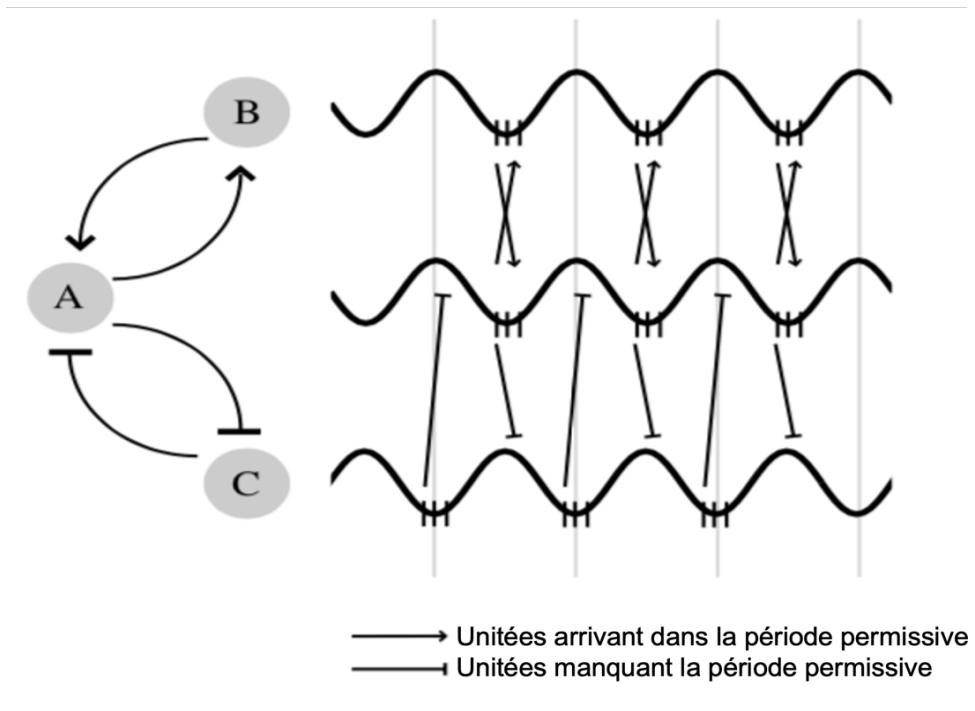


Figure 2. – Schéma de la communication entre les régions du cerveau par la cohérence des rythmes du LFP. Reproduit et modifié de (Womelsdorf and Fries, 2006), avec permission

#### 1.1.4.2 Définitions des états de vigilance et rythmes associés

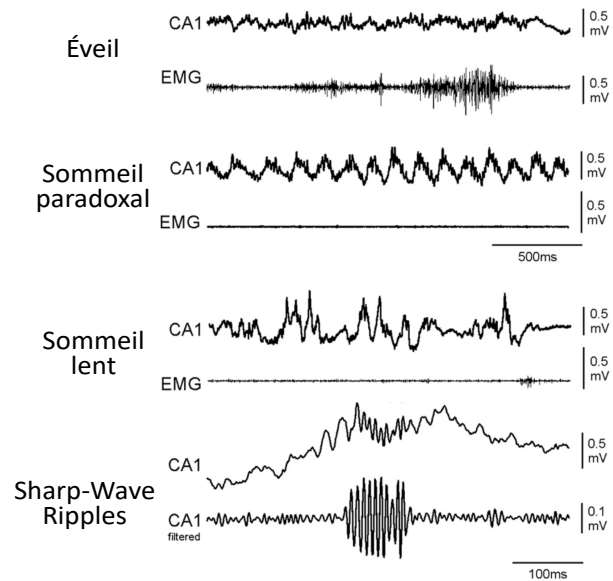


Figure 3. – Exemple d'enregistrements de LFP dans l'hippocampe ainsi que du signal électromyographique (EMG) pendant différents états de vigilance. Adapté et modifié de (Nicole et al., 2016)

Les rythmes de l'HP varient selon les états de vigilance. L'éveil calme est caractérisé par une activité de l'HP comportant surtout des oscillations de basse fréquence et de basse amplitude, ainsi qu'une activité motrice tonique. L'éveil actif est caractérisé par une activité de l'HP synchronisée et de faible amplitude, et de l'activité motrice (Figure 3). Le sommeil lent (ou *slow wave sleep*) est caractérisé par une activité motrice fortement diminuée et une activité de l'HP de haute amplitude, composée surtout de rythme delta. Pendant le sommeil lent, on retrouve aussi des *sharp-wave ripples*, des oscillations courtes et de hautes fréquences (40ms, 150-250Hz). Les *sharp-wave ripples* peuvent être enregistrés directement dans la couche pyramidale (Figure 3). Finalement, le sommeil paradoxal est caractérisé par un mouvement rapide des yeux, une atonie musculaire et la présence de rythmes thêta dans l'HP (Figure 3) (Hutchison and Rathore, 2015). De nombreuses études ont aussi été faites sur des animaux anesthésiés à l'uréthane. Chez ces animaux, on peut entre autres enregistrer les rythmes thêta, mais avec une fréquence plus lente de 4-5Hz (Buzsáki, 2002).

#### 1.1.4.3 Rythme delta

Le rythme delta est l'activité dominante enregistrée dans l'HP pendant le sommeil lent ou l'éveil calme. Ses mécanismes de génération et de modulation, ainsi que ses fonctions seront décrits ici.

##### 1.1.4.3.1 Génération et modulation du delta

La génération du rythme delta de l'HP est peu étudiée, mais il est connu que la circuiterie interne au cortex est suffisante pour la génération de rythmes delta (Steriade et al., 1993). Le rythme delta est modulé par les structures affectant le sommeil, comme les noyaux du rhombencéphale impliqués dans l'alternance de sommeil lent et de sommeil paradoxal (Hayashi et al., 2015), ou par le noyau suprachiasmatique, impliqué dans les rythmes circadiens (Mistlberger et al., 1987). Outre la modulation par d'autres régions du cerveau, les composés pharmacologiques influençant le sommeil lent influencent aussi les rythmes delta (Obal and Krueger, 2003). La privation de sommeil cause aussi une augmentation du rythme delta pendant le sommeil lent lors de la récupération (Mendelson and Bergmann, 1999). Ainsi, le rythme delta est surtout modulé par les manipulations affectant le sommeil.

#### 1.1.4.3.2 Fonctions du delta

Pendant le sommeil lent, on enregistre des rythmes delta dans le cortex comme dans l'hippocampe. On retrouve aussi dans l'hippocampe des *sharp-wave ripples*, qui sont présents simultanément au rythme delta (Todorova and Zugaro, 2019). Le rythme delta a surtout été étudié dans le cortex. On sait que pendant le sommeil lent, les *sharp-wave ripples* de l'HP sont enregistrés juste avant le pic du rythme delta dans le cortex (Maingret et al., 2016; Todorova and Zugaro, 2019). Des études ont pu désynchroniser les *sharp-wave ripples* de l'hippocampe et le rythme delta du cortex, en faisant des stimulations électriques dans le cortex. Lorsque les *sharp-wave ripples* de l'HP sont dissociés du rythme delta du cortex pendant le sommeil suivant l'apprentissage d'une tâche, le rappel de celle-ci a été diminué le lendemain. Ainsi, le rythme delta du cortex ainsi que son association avec les *sharp-wave ripples* de l'HP sont importants pour la mémoire (Maingret et al., 2016; Todorova and Zugaro, 2019). Le rythme delta dans l'HP est moins bien connu. Pendant l'éveil, des études montrent que les rythmes delta et thêta sont des états inversement modulés, soit que la puissance du delta augmente lorsque celle du thêta diminue et vice versa (Furtunato et al., 2020; Schultheiss et al., 2020).

Le rythme delta est important pour la synchronisation de l'activité du système limbique, incluant l'HPv, le cortex préfrontal, l'amygdale basolatérale, l'aire tegmentale ventrale et l'insula. Pendant le conditionnement de peur, la synchronisation entre le rythme delta du cortex préfrontal et de l'amygdale basolatérale est augmentée lors du *freezing*. Lorsqu'une oscillation de 4Hz est générée dans le cortex préfrontal par une stimulation optogénétique, entraînant aussi une oscillation dans l'amygdale, les souris expriment un comportement de peur persistant, mais spécifique au contexte dans lequel elles avaient été stimulées (Karalis et al., 2016). Plusieurs autres études ont démontré une altération des rythmes delta dans le système limbique suite à un stress chez le rongeur, comme entre l'HPv et l'amygdale basolatérale (Vila-Merkle et al., 2021), ou le noyau accumbens et l'HPv, ainsi que le noyau accumbens et l'aire tegmentaire ventrale (Hultman et al., 2018). Chez l'humain, dans une cohorte de patients atteints de syndrome de stress post-traumatique, la diminution de la présence de rythme delta dans l'insula était corrélée à une amélioration des scores cliniques (Jin et al., 2021). Ainsi, le rythme delta serait impliqué dans la communication entre les régions du système limbique.

#### 1.1.4.4 Thêta

Le rythme thêta peut être enregistré lors du SP, mais aussi pendant l'éveil lors de l'exploration, la course ou les comportements anxieux, soit des comportements avec une attention particulière à l'environnement (Colgin, 2016; Barth et al., 2018).

Le rythme thêta a souvent été divisé en deux types, le type 1 étant de fréquence plus élevée (6-9Hz), et présent pendant les comportements volontaires comme la course et l'exploration. Le type 2 a été caractérisé comme étant de fréquence plus basse (4-7Hz), de durée beaucoup plus courte et pendant les comportements plus calmes, comme le toilettage et la consommation de nourriture (Kramis et al., 1975; Sainsbury et al., 1987; Vanderwolf et al., 1988). Cette division a été disputée, entre autres parce que les fréquences de thêta peuvent varier de façon importante pendant un même comportement, par exemple de 4,5 à 9Hz pendant la course (Olvera-Cortés et al., 2002).

##### 1.1.4.4.1 Génération et modulation du thêta

Le rythme thêta est généré par un réseau local dans l'hippocampe. Les cellules en corbeille PV+ de l'hippocampe ont été identifiées comme générateur de rythme thêta, la photoactivation de celles-ci permettant de générer du rythme thêta, en tranches d'HP isolées ou dans des animaux éveillés (Ferguson et al., 2011; Stark et al., 2013; Amilhon et al., 2015). L'HP possède des réseaux locaux permettant la génération de rythmes thêta ; un rythme similaire au rythme thêta est enregistré dans des tranches isolées d'HP après l'application de divers agonistes comme l'agoniste cholinergique carbachol (Konopacki et al., 1987; Konopacki et al., 1988). Le rythme thêta est modulé par plusieurs noyaux, notamment dans le tronc cérébral. Le thêta est modulé par le noyau *reticularis pontis oralis*, dans lequel des neurones ayant une décharge tonique projettent au noyau supramammillaire (Vertes and Kocsis, 1997; Vertes et al., 2004). Il est connu que la stimulation du *noyau reticularis pontis oralis* génère du rythme thêta dans l'HP (Macadar et al., 1974; Bland et al., 1994). Les neurones du noyau supramammillaire qui reçoivent les projections du noyau *reticularis pontis oralis* produisent une décharge rythmique (Vertes and Kocsis, 1997; Vertes et al., 2004). Le noyau supramammillaire modulerait la fréquence du rythme thêta; des injections de procaine dans le supramammillaire réduisent la fréquence de thêta (Kirk and McNaughton, 1993). Le noyau supramammillaire projette au septum médian (SM), qui est



considéré comme le *pacemaker* du rythme thêta. L'inhibition des neurones du septum médian ou la lésion de ses afférences diminue les rythmes thêta, alors que leur stimulation par optogénétique peut entraîner la fréquence des rythmes thêta (Vinogradova, 1995; Vertes and Kocsis, 1997; Quirk et al., 2021). Les neurones du septum médian envoient des décharges rythmiques aux neurones principaux dans l'HP et à certains types d'interneurones, comme les cellules en corbeille PV+ (Vertes and Kocsis, 1997; Vertes et al., 2004). Ainsi, plusieurs noyaux du tronc modulent les rythmes thêta, dont le septum médian, qui envoie des projections à des interneurones inhibiteurs de l'hippocampe impliqués dans la génération des rythmes thêtas.

#### 1.1.4.4.2 Fonctions du rythme thêta de l'HPd

Le rythme thêta de l'HPd, pendant le sommeil paradoxal comme pendant l'éveil, est impliqué dans la mémoire. Une inhibition du rythme thêta, par lésion du septum médian, cause des déficits de la mémoire spatiale (Winson, 1978). Une diminution de fréquence de thêta de l'HP, par lésion du noyau supramammillaire pendant un labyrinthe de Morris est aussi associée à une moins bonne performance (Olvera-Cortés et al., 2004; Gutierrez-Guzman et al., 2012). Les lésions du fornix atténuant le rythme thêta causent des déficiences dans la capacité de modifier les règles précédemment acquises (M'Harzi et al., 1987; Wishaw and Tomie, 1997). Lorsque le rythme thêta dans l'HP est inhibé, en inhibant optogénétiquement les neurones *pacemaker* du septum médian pendant le sommeil paradoxal suivant l'acquisition d'une tâche, le rappel est moins efficace le lendemain (Boyce et al., 2016). De plus, si la fréquence du rythme thêta est entraînée en haut de 10Hz, en stimulant les neurones *pacemaker* du septum médian pendant l'apprentissage d'une tâche spatiale, son rappel est moins efficace (Quirk et al., 2021). Chez l'humain, la puissance de rythme thêta, enregistré par électroencéphalogramme est corrélée à de bonnes performances de la mémoire de travail pendant des tâches de rappel de mots, de son, d'environnements ou d'images (Gevins et al., 1997; Klimesch et al., 2001; Fuentemilla et al., 2010; Sauseng et al., 2010). Ainsi, le rythme thêta de l'HPd, chez l'humain comme chez le rongeur, est impliqué dans les phases d'acquisition et de consolidation de la mémoire.

Le rythme thêta permettrait l'organisation d'informations dans l'HP. Il est connu que la décharge des neurones de lieu est organisée à l'intérieur d'un cycle de thêta. À l'intérieur de chaque cycle, les neurones représentant le lieu qui vient d'être traversé, le lieu actuel, et le lieu futur

déchargent dans cet ordre (O'Keefe and Recce, 1993; Skaggs et al., 1996). Ce rôle dans le traitement d'information de lieu pourrait expliquer que la fréquence de thêta pendant la course est dépendante de la vitesse de l'animal (Whishaw and Vanderwolf, 1973; McFarland et al., 1975), ou plus précisément de son accélération (Kropff et al., 2021). La fréquence du rythme thêta est aussi diminuée lorsqu'un animal est exposé à un environnement nouveau (Jeewajee et al., 2008). Ainsi, le rythme thêta serait impliqué dans l'organisation temporelle de l'information dans l'HPd. Les rythmes de l'HP, en particulier le rythme thêta (4-12Hz), affectent la potentialisation et la dépression à long terme. Dans l'HP, des stimulations aux fréquences de thêta sont utilisées pour éliciter de la potentialisation à long terme (Larson et al., 1986; Capocchi et al., 1992). La plasticité créée semble être dépendante de la phase de thêta pendant laquelle la stimulation a été faite (Hölscher et al., 1997; Hyman et al., 2003; Law and Leung, 2018). Hyman et al. ont démontré que la même stimulation causait de la potentialisation si elle était délivrée lors du pic de l'oscillation, ou de la dépression si elle était délivrée lors du creux (Hyman et al., 2003). Les rythmes de l'HP créent donc des périodes permissives et des périodes inhibitrices.

Comme le rythme delta, le rythme thêta est impliqué dans la synchronisation entre les régions. C'est le rythme thêta qui permet, entre autres, la communication pendant les tâches impliquant le rappel d'une règle. La synchronisation du thêta de l'HP est augmentée avec différentes structures selon la tâche, incluant le cortex préfrontal, le striatum ou le bulbe olfactif (Jones and Wilson, 2005; Kay, 2005; DeCoteau et al., 2007; Benchenane et al., 2010).

#### *1.1.4.4.3 Fonctions du rythme thêta de l'HPv*

Le rythme thêta dans l'HPv est aussi impliqué dans l'anxiété. Plusieurs études ont démontré un lien entre l'anxiété et la puissance des rythmes thêta. La puissance du rythme thêta dans l'HPv est augmentée dans un labyrinthe en croix surélevé par rapport à un labyrinthe ouvert ou un environnement familier (Adhikari et al., 2010). Les souris présentant une délétion du récepteur 5-HT<sub>1A</sub>R, un modèle génétique de souris ayant une anxiété augmentée, ont aussi une augmentation de la puissance du rythme thêta dans le labyrinthe en croix surélevé par rapport à des souris de type sauvage. Cette augmentation de puissance est spécifique au labyrinthe en croix surélevé, et n'est pas présent lorsque les souris sont enregistrées dans leur cage (Gordon et al., 2005). Cornwell et al. ont demandé à des humains de passer deux répétitions d'un labyrinthe de

Morris virtuel, un sécuritaire et un incluant des décharges électriques aléatoires. Ils ont pu démontrer que les niveaux d'anxiété rapportés étaient corrélés avec la puissance du rythme thêta dans l'HP antérieur, alors que la performance au test était corrélée à la puissance du rythme thêta dans l'HP postérieur (Cornwell et al., 2012).

En plus du lien entre l'anxiété et la puissance des rythmes thêta, la fréquence des rythme thêta a aussi été lié à l'anxiété Il est aussi connu que les anxiolytiques affectent les propriétés du rythme thêta, au contraire d'autres médicaments comme les antipsychotiques ou les antidouleurs (McNaughton et al., 2013). L'effet d'un médicament sur le rythme thêta, et plus particulièrement une diminution de fréquence, peut même être utilisé comme prédicteur d'un effet anxiolytique (Engin et al., 2008; Yeung et al., 2012; Yeung et al., 2013). De plus, la synchronisation des fréquence des rythmes thêta du cortex préfrontal et de l'HPv, mais pas de l'HPd sont augmenté dans un environnement aversif comme le labyrinthe en croix surélevé (Adhikari et al., 2010). L'inhibition des projections de l'HPv au cortex préfrontal diminue les comportements anxieux, et la cohérence de la fréquence des rythmes thêta dans un environnement anxieux, mais pas dans leur cage d'hébergement (Padilla-Coreano et al., 2016). À l'opposé, l'activation des projections de l'HPv au cortex préfrontal à 8Hz, mais pas à 2, 4 ou 20Hz, a augmenté les niveaux d'anxiété (Padilla-Coreano et al., 2019). Ainsi, le rythme thêta de l'HPv est impliqué dans l'anxiété; la puissance de thêta est corrélée aux niveaux d'anxiété, la synchronie de la fréquence de l'HPv et du cortex préfrontal module les comportements anxieux et la fréquence des rythmes thêta est modulé par les anxiolytiques.

Ainsi, les rythmes thêta son modulés par plusieurs structures du tronc, donc le septum médian. La fréquence et la puissance du rythme thêta de l'HPv affectent l'expression de l'anxiété. Le rythme thêta pendant le l'éveil et le sommeil est aussi lié à l'acquisition et la consolidation de la mémoire.

## **1.2 Sérotonine**

Les récepteurs sérotoninergiques sont exprimés non seulement à travers le cerveau, mais aussi à travers le reste du corps (Berger et al., 2009). La sérotonine est impliquée dans presque toutes les fonctions physiologiques et une variété de comportements. Elle module plusieurs mécanismes

d'homéostasie du corps, comme le contrôle de la respiration, de la faim, la température ou de la chimioception du CO<sub>2</sub> et dans une variété de maladies comme l'anxiété, la dépression, le Parkinson et l'épilepsie. Outre son implication dans les pathologies, la sérotonine affecte aussi plusieurs caractéristiques normales du cerveau, tels que les rythmes de l'hippocampe (Muller and Cunningham, 2020). Je décrirai les noyaux produisant la sérotonine, leurs fonctions et leurs projections d'intérêt pour mon projet, puis l'impact de la sérotonine sur le sommeil et sur le rythme thêta.

### **1.2.1 Raphé**

Le raphé est un ensemble de noyaux situés dans le bulbe rachidien, le pont et le mésencéphale, projetant à travers toutes les régions du système nerveux et défini comme étant la source de toutes les projections sérotoninergiques du cerveau (Muller and Cunningham, 2020). La présence des neurones 5-HT détermine les noyaux du raphé, mais ils contiennent aussi plusieurs autres populations de neurones, utilisant par exemple la dopamine, le glutamate et l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) comme neurotransmetteur (Jackson et al., 2009; Hale and Lowry, 2011; Matthews et al., 2016). Les neurones 5-HT du raphé forment une population complexe dont les rôles n'ont pas encore été clairement cernés. En particulier, le rôle de la 5-HT dans la modulation des rythmes et des fonctions de l'HP sont un sujet d'étude très actif. Durant ma maîtrise, j'ai focalisé sur les rôles des afférences 5-HT dans la modulation des rythmes de l'HP.

#### **1.2.1.1 Sous-divisions du raphé**

Le raphé, situé dans le rhombencéphale, peut être divisé en deux groupes d'origine génétique distincte : le groupe caudal, qui envoie des projections descendantes au tronc cérébral et à la moelle épinière, et le groupe rostral, qui envoie des projections ascendantes au prosencéphale (Ding et al., 2003). Le groupe rostral peut lui-même être divisé en trois, soit le raphé dorsal (RD) qui possède le plus de neurones, le raphé médian (RM), le noyau B9, et le noyau linéaire caudal, qui possède 10 fois moins de neurones que le RD ou le RM (Hornung, 2003). Je focuserai surtout sur les RD et du RD, les deux sous-noyaux les plus étudiés du raphé. Les noyaux du RM et du RD sont physiquement rapprochés, mais fonctionnellement distincts. Alors que les neurones du RM sont surtout sérotoninergiques, les neurones du RD, en plus de la sérotonine, contiennent des

catécholamines ou des neuropeptides comme la substance P, la neurotensine ou la cholécystokinine (Jennes et al., 1982; Baker et al., 1991; Schiffmann and Vanderhaeghen, 1991). Les neurones sérotoninergiques du RD et du RM ont aussi des propriétés électrophysiologiques différentes, comme des constantes de temps membranaires, des réponses aux autorécepteurs inhibiteurs et des amplitudes d'hyperpolarisation post-décharge différentes (Beck et al., 2004).

Le RD est impliqué dans le circuit du stress et de l'anxiété (Commons et al., 2003; Lowry et al., 2008; Sengupta and Holmes, 2019), incluant les troubles de l'humeur (Commons et al., 2003) et la réponse aux stimuli induisant la panique (Johnson et al., 2005). Le RD serait aussi impliqué dans la motivation (Cho et al., 2021), l'exercice (Greenwood et al., 2003; Greenwood et al., 2005) et la modulation des états de vigilance (Cho et al., 2017; Oikonomou et al., 2019; Venner et al., 2020; Gazea et al., 2021).

Le RM est impliqué dans le contrôle des fonctions biologiques comme la consommation de nourriture et d'eau (Bendotti and Samanin, 1986; Klitenick and Wirtshafter, 1988, 1989; Wirtshafter and Krebs, 1990; Currie and Coscina, 1993) et les rythmes circadiens (Meyer-Bernstein and Morin, 1999; Morin, 1999; Lowry, 2002; Yamakawa and Antle, 2010). Le RM est aussi impliqué dans la modulation du rythme thêta (Maru et al., 1979; Vertes et al., 1994; Crooks et al., 2012). Le RM pourrait aussi être impliqué dans le circuit de la récompense, incluant les comportements de recherche d'alcool (McBride et al., 1999; Lê et al., 2008). Bien que l'anxiété soit parfois associée à une fonction du RD, plusieurs études montrent que le RM jouerait aussi un rôle dans l'anxiété et les expériences négatives (Teissier et al., 2015; Szonyi et al., 2019; Abela et al., 2020)

#### 1.2.1.2 Projections à l'HP

Chez la souris, les projections 5-HT à l'HP proviennent presque exclusivement du RM (Muzerelle et al., 2016). Chez le rat, bien que le RD et le RM projettent à l'HP, c'est le RM qui envoie les projections plus denses (Morin, 1999; Vertes et al., 1999). Les projections du raphé ciblent la couche moléculaire du CA1 et du CA3, et la couche granulaire du GD (Morin and Meyer-Bernstein, 1999; Vertes et al., 1999). Les neurones pyramidaux ainsi que certains interneurons GABA dans l'HPv et l'HPd expriment des récepteurs sérotoninergiques (Freund et al., 1990; Vertes et al., 1999;

Amaral et al., 2007; Berumen et al., 2012). Les interneurons sont différenciellement affectés par la 5-HT. Par exemple, la sérotonine a réduit le potentiel postsynaptique excitateur des interneurons en corbeille exprimant la cholécystokinine, mais pas de ceux exprimant la parvalbumine (Winterer et al., 2011). Les neurones du RM projetant à l'HP ont aussi des collatérales ailleurs dans le cerveau. Par exemple, 8-12% des neurones du MR envoient une projection double à l'HP et au septum médian (McKenna and Vertes, 2001).

#### 1.2.1.3 Patron d'activité des neurones du raphé

La décharge classique des neurones sérotoninergiques est bien connue. Selon les études classiques de décharge des neurones sérotoninergique, dans le RD, elle est à son maximum pendant l'éveil (Jacobs and Fornal, 1991), faible pendant le sommeil lent et absente pendant le sommeil paradoxal (McGinty and Harper, 1976; Trulson and Jacobs, 1979). Elle semble identique dans le RM, à l'exception qu'elle est minimale, mais pas complètement absente pendant le sommeil paradoxal (Rasmussen et al., 1984; Jacobs and Azmitia, 1992a). Il est à noter que plusieurs de ces études n'ont pas fait de vérification de la nature sérotoninergique des neurones, et se sont plutôt fiées à leur activité. D'autres populations déchargeant plutôt selon la phase des rythmes thêta ont été caractérisées dans le RD (Kocsis and Vertes, 1992) et dans le RM (Viana Di Prisco et al., 2002; Kocsis et al., 2006). En plus de ces populations, des neurones sérotoninergiques ayant des patrons de décharges associés à certains comportements ont été identifiés. Des neurones sérotoninergiques du RD répondant à des récompenses ou des punitions (Li et al., 2016), ou déchargeant lors du changement d'une association précédemment apprise (Matias et al., 2017) ont été identifiés. Outre les neurones strictement sérotoninergiques, le RM contient aussi des neurones co-exprimant le transporteur vésiculaire de glutamate de type 3, ou VGLUT3. Ces neurones ont un rythme de décharge hybride, soit plus élevé que les neurones strictement 5-HT, mais plus bas que ceux strictement VGLUT3-positifs (Domonkos et al., 2016).

### 1.2.2 Sérotonine et Sommeil

Il est connu que la sérotonine affecte la régulation du sommeil, mais son effet précis est encore débattu. La sérotonine a initialement été perçue comme étant permissive du sommeil, dans le contexte de la théorie monoaminergique du sommeil (Jouvet, 1972). La diminution de sérotonine

causée par la destruction électrolytique du raphé (Jouvet, 1968) ou l'inhibition de la synthèse de sérotonine par le pCPA (Torda, 1967; Koella, 1968; Mouret et al., 1968; Weitzman et al., 1968) est associée à une insomnie. De plus l'administration locale d'un agoniste du récepteur inhibiteur 5-HT<sub>1A</sub>, le 8-OH-DPAT, favorise l'éveil (Sakai and Crochet, 2001).

La théorie de la sérotonine comme neuromodulateur permissif du sommeil a été mise en doute par plusieurs études démontrant plutôt un rôle inhibiteur. Des études électrophysiologiques ont démontré que la décharge des neurones sérotoninergiques du raphé est maximale à l'éveil, minimale pendant le sommeil lent et presque absente pendant le sommeil paradoxal (McGinty and Harper, 1976; Trulson and Jacobs, 1979; Rasmussen et al., 1984). Cette activité sérotoninergique a été confirmée par microdialyse (Portas et al., 2000), et par fibrophotométrie (Oikonomou et al., 2019). De plus, les agonistes sérotoninergiques augmentent la durée de l'éveil et diminuent la durée du sommeil paradoxal (Monti and Jantos, 2008).

Ainsi, plusieurs études de lésion et pharmacologiques arrivaient à deux résultats opposés. En 2019, Oikonomou et al. ont démontré, avec un mélange d'optogénétique et de chémogénétique, que les neurones sérotoninergiques pouvaient avoir un effet bidirectionnel, soit permissif ou inhibiteur sur le sommeil. Des stimulations toniques du RD réduisaient la durée de l'éveil et augmentaient le sommeil lent, alors que des stimulations en *burst* induisaient l'éveil et réduisaient le sommeil paradoxal et le sommeil lent (Oikonomou et al., 2019). Ces résultats ont été obtenus sur une lignée de souris SERT-Cre *knock-in*, possédant donc une seule copie intacte du gène SERT, le transporteur de la sérotonine. Pour pallier cette limitation, il serait pertinent d'effectuer une confirmation de ces résultats dans un modèle ayant une expression normale de la protéine SERT.

Malgré cette limitation, l'étude d'Oikonomou et al. démontre bien l'avantage de l'optogénétique par rapport aux études pharmacologiques ou de lésion. Bien que ces méthodes apportent des résultats intéressants, leur manque de précision temporelle et la modulation peu spécifique des neurones peuvent mener à une conclusion incomplète ou même dans certains cas erronée. Par exemple, les études utilisant l'inhibiteur de synthèse de sérotonine pCPA ont depuis été attribuées à la thermorégulation plutôt qu'au contrôle du sommeil. Les centres

thermorégulateurs du raphé étaient affectés par le pCPA, et l'éveil serait probablement dû à une augmentation d'activité motrice pour rétablir leur température. L'effet sur le sommeil a été supprimé lorsque les souris ont été maintenues à la thermoneutralité pendant l'administration du pCPA (Buchanan and Richerson, 2010; Murray et al., 2015).

### **1.2.3 Sérotonine et Rythmes thêta**

Une vaste littérature décrit la sérotonine, et plus précisément le RM comme étant désynchronisateur des rythmes thêta. Les stimulations électriques du RM désynchronisent les rythmes de l'HP, chez les animaux anesthésiés (Macadar et al., 1974; Assaf and Miller, 1978; Vertes, 1981) et chez les animaux non anesthésiés (Yamamoto et al., 1979; Peck and Vanderwolf, 1991). Les lésions du RM, mais pas du RD causent un rythme thêta continu et persistant dans le temps (Maru et al., 1979; Yamamoto et al., 1979). Yamamoto et al ont observé la présence de rythme thêta immédiatement après la lésion du RD, mais cet effet s'est rapidement atténué, contrairement à la lésion du RM (Yamamoto et al., 1979). L'effet a été identifié comme sérotoninergique, entre autres parce que les composés diminuant la quantité de 5-HT comme le 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT) ou le pCPA produisent du thêta persistant pendant l'immobilité (Mushiake et al., 1988; Vanderwolf et al., 1989). De plus, l'effet désynchronisateur du RM est bloqué par un prétraitement de pCPA (Assaf and Miller, 1978), et l'effet des lésions du RM est interrompu par l'injection du précurseur de la 5-HT, le L-5-hydroxytryptophan (L-5-HTP) (Yamamoto et al., 1979). De nombreuses études pharmacologiques démontrent aussi que la suppression de l'activité des neurones 5-HT crée un rythme thêta persistant (Kinney et al., 1994; Vertes et al., 1994; Kinney et al., 1995, 1996; Varga et al., 2002; Li et al., 2005).

L'effet désynchronisateur des neurones 5-HT du RM passe très probablement par le septum médian. Une stimulation électrique de basse amplitude dans le RM modifie la décharge des neurones dans le septum médian et abolit le rythme thêta de l'HP. Si le RM est stimulé électriquement, puis inhibé par une injection de lidocaïne, la décharge du septum médian et les rythmes thêta de l'HP sont rétablis (Kitchigina et al., 1999; Vinogradova et al., 1999). Le thêta persistant créé par l'inhibition du RM est aboli par une injection de procaine dans le septum médian (Crooks et al., 2012). Une diminution de 5-HT par lésion à la 5,7-DHT, dans l'HP comme



dans le septum médian augmente la puissance et la fréquence de thêta (Gutiérrez-Guzmán et al., 2011; Gutierrez-Guzman et al., 2017)

Ainsi, une vaste littérature, surtout basée sur des stimulations électriques et des études pharmacologiques ou de lésion, décrit le RM sérotoninergique comme un noyau désynchronisateur des rythmes de l'HP. Certaines limitations sont en revanche associées à ces types d'études. Les stimulations électriques affectent tous les neurones, peu importe le neurotransmetteur qu'ils expriment, et sont donc peu spécifiques. Les études pharmacologiques et de lésion ont une faible résolution temporelle, et altèrent l'activité des neurones de façon soutenue, pouvant laisser place à des mécanismes de compensation ou altérer les circuits. De plus, la plupart des expériences sont effectuées sur des souris anesthésiées, ou pendant l'éveil sans distinction de comportement précis – soit période pendant laquelle le rythme thêta n'est pas nécessairement présent. La décharge des neurones 5-HT est affectée par les états de vigilance, et donc peut être anormalement altérée par l'anesthésie. L'agoniste des récepteurs 5-HT<sub>2C</sub>, le SB-242084, cause par exemple une augmentation de la puissance du rythme thêta pendant l'éveil, mais pas pendant le sommeil paradoxal (Kantor et al., 2005). Ainsi, le lien entre le RM, la 5-HT et les rythmes de l'HP reste à être clarifié et précisé.

Les objectifs de mon travail ont été de déterminer l'effet des neurones 5-HT du RM sur les rythmes de l'HP, soit sur le rythme thêta pendant le sommeil paradoxal, le rythme thêta pendant l'anxiété et pendant l'immobilité dans un environnement nouveau, et sur le rythme delta pendant le sommeil paradoxal.



## 2. Matériel et Méthodes

### 2.1 Souris

Toutes les procédures décrites ont été approuvées par le Comité institutionnel de bonnes pratiques animales en recherche (CIBPAR) du centre de recherche Sainte-Justine, selon les normes du Conseil Canadien de Protection des Animaux. La souche de souris Sert-CRE (MMRRC#031028-UCD), exprimant par un transgène l'enzyme CRE-recombinase dans les neurones sérotoninergiques, a été utilisée. Les souris transgéniques ont été utilisées puisque leur expression de l'enzyme SERT est normale, le gène n'étant pas inséré comme un *knock-in* dans le gène SERT. Les souris Sert-CRE ont été croisées avec des souris C57BL/6 (Jackson Laboratories) pour maintenir une expression hétérozygote. Les souris ont été hébergées dans une salle avec un cycle veille/lumière de 12h:12h, avec les lumières s'ouvrant à 6:30, à une température de 24°C et avec une humidité de 50%. Les souris ont été hébergées seules pour éviter les dommages à l'implant, avec accès *ad libitum* à l'eau et la nourriture.

### 2.2 Injections virales

Des souris de 2-3 mois ont été anesthésiées avec de l'isoflurane à 5%. Les souris ont été placées dans un appareil stéréotaxique, puis maintenues anesthésiées à l'isoflurane 0,5-2%. Une incision a été faite, puis des trous dans le crâne ont été faits avec une perceuse à micromoteur (Stoelting Instruments). Une pipette de micro-injection a été descendue jusqu'au site d'injection, puis le virus a été injecté à un débit de 1nl/s. Les différents groupes expérimentaux et leur virus associés (Tableau 1) et les coordonnées des sites d'injections (Tableau 2) sont décrits dans les tableaux récapitulatifs ci-dessous. Les injections dans l'HP ont été faites bilatéralement. Les injections ont permis l'expression spécifique de l'opsine hChR2<sub>E123T/T159C</sub> (aussi appelé ChETA), une opsine excitatrice, activée par la lumière bleue (Berndt et al., 2011), ou d'un fluorophore contrôle (Figure 4, eYFP).

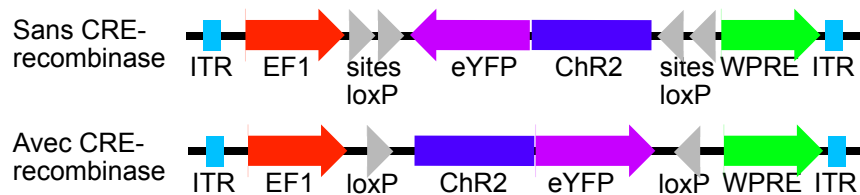


Figure 4. – Expression conditionnelle de ChETA selon la présence de l'enzyme CRE-recombinase.

Projection Visée	Nom de Virus	Site d'injection	Expression	Fournisseur	Titre (GC/ml)	Protéine exprimée	Dilution
5-HT projetant à l'HPv	AAV2/9-Ef1a-DIO	Hippocampe	Rétrograde	Addgene	$3.1 \times 10^{13}$	Opsine	Non dilué
	hChR2 <sub>E123T/T159C</sub> -EYFP	Ventral				ChETA	
5-HT projetant à l'HP	AAV2/9-Ef1a-DIO	Hippocampe	Rétrograde	Addgene	$3.1 \times 10^{13}$	Opsine	Non dilué
	hChR2 <sub>E123T/T159C</sub> -EYFP	Complexe				ChETA	
5-HT du RM	AAVdj-Ef1a-DIO-hChR2 <sub>E123T/T159C</sub> -eYFP	Raphé Médian	Antérograde	Ulaval	$1.3 \times 10^{13}$	Opsine ChETA	1:2 dans solution de Chlorure de sodium 0,9%
5-HT du RM (contrôle)	AAVdj-Ef1a-DIO-eYFP	Raphé médian	Antérograde	Ulaval	$1.8^{13}$	Contrôle eYFP	1:2 dans solution de Chlorure de sodium 0,9%

Tableau 1. – Description des groupes expérimentaux et des injections

Structure visée	Distance antéropostérieure de Bregma (mm)	Distance latérale de Bregma (mm)	Distance Dorsoventrale de Bregma (mm)	Volume injecté	Angle (°)
Hippocampe Ventral	-3,52	+/- 3,25	-4,17 ; -3,47	200ul par site	0
Hippocampe	-3,52	+/- 3,25	-4,17 ; -3,47	300ul par site	0
	-2,3	+/- 1,62	-1,62		0
Raphé Médian	-4,48	-0,04	-4,36	300ul	10

Tableau 2. – Sites d'injections

## 2.3 Implantation

Des implants ont été construits à partir d'électrodes en fil de tungstène de 500µm (AM-systèmes), une électrode en fil d'acier inoxydable de 50µm pour enregistrer l'activité musculaire (AM-systems), d'une mise à terre faite d'un fil soudé à une vis (Antrin Miniature Specialities) et d'un connecteur (Digikey). Une fibre optique a aussi été coupée puis attachée à une ferrule (Thorlab). Une à deux semaines après la chirurgie d'injection, les souris ont été anesthésiées avec de l'isoflurane à 5%. Les souris ont été placées dans un appareil stéréotaxique (Kopf), et maintenues anesthésiées à l'isoflurane 0,5-2%. Une incision a été faite, le crâne a été nettoyé à l'éthanol 100% (VWR) puis des trous ont été faits avec une perceuse à micromoteur (Stoelting Instruments). L'implant et la fibre optique ont été descendus jusqu'aux coordonnées théoriques listées dans le tableau 3, l'EMG a été implanté dans les muscles du trapèze, ou du *trapezius pars cervicalis* et la mise à terre a été placée au-dessus du cervelet. L'implant et la mise à terre ont permis les enregistrements électrophysiologiques, la fibre optique, la stimulation lumineuse, et l'EMG, d'enregistrer l'activité musculaire pour enregistrer l'activité musculaire et discerner les états d'éveils et de sommeil. Deux vis supplémentaires ont été fixées dans le crâne pour améliorer la stabilité et la durabilité de l'implant. L'implant a été fixé au crâne avec du metabound (Patterson Dental) et de l'acrylique dentaire (Patterson Dental). Les souris ont reçu du carprofène (20mg/kg, CDMV) et de la saline (Chlorure de Sodium 0,9%, ICU Medical Canada) pour leur réhydratation et leur récupération.

	Distance rostro-caudale de Bregma (mm)	Distance médiolatérale de Bregma (mm)	Distance dorsoventrale de Bregma (mm)	Angle (°)
Fibre optique	-4,75	0,42	-3,40	7
Électrode HPv (1)	3,08	2,75	4,25	0
Électrode HPv (2)	3,50	3,50	3,00	0
Électrode HPd (3)	2,25	2,25	1,80	0
Électrode HPd (4)	1,58	1,58	1,50	0

Tableau 3. – Coordonnées d'implantations

## 2.4 Enregistrements

Après deux à trois semaines de récupération post-implantation, les souris ont été habituées à la manipulation et la connexion à un *sham headstage* pendant 3-5 jours. Les enregistrements de

*Local Field Potential* (LFP) pendant le sommeil ont été faits dans la cage d'hébergement, entre cinq et quatorze semaines post-injection. Les implants des souris ont été connectés à un *headstage* à 32 canaux (intan), lui-même connecté au système d'acquisition Open Ephys. Les implants des souris ont aussi été connectés au laser par une fibre optique. Le logiciel Open Ephys a permis l'enregistrement des signaux avec une fréquence d'échantillonnage à 5Khz pour les signaux LFP, EMG, et une copie des protocoles de stimulation lumineuse. Le sommeil REM et le SWS ont été identifiés par les signaux de LFP de l'HP et par le signal de l'EMG. Les différents protocoles de stimulation du laser (Doric Lenses) ont été démarrés manuellement. L'intensité du laser a été réglée à 16-19mW au bout de l'implant. Le laser de 450nm a été activé à une fréquence de 6, 8, 10 et 20hz pendant 10 secondes. Les pulses étaient d'une durée de 10ms pour les souris 5-HT du RM projetant à l'HP et à l'HPv, et de 20ms pour les souris 5-HT du RM. Toutes les stimulations ont été précédées d'un enregistrement en *baseline* de 10 secondes. Les stimulations pendant le SWS ont été séparées de 30 secondes pour éviter des stimulations trop rapprochées. Les stimulations pendant le sommeil REM ont été séparées par 10 secondes afin de maximiser le nombre de stimulations malgré la rareté relative du sommeil REM.

Les stimulations pendant la locomotion ont été faites lors de trois ou six expositions de 25 minutes à un *Open Field*. La texture du plancher, les motifs sur les murs et la forme du test ont été changés entre chaque session pour stimuler l'exploration. Un laser de 450nm a été activé par pulse de 20ms, à une fréquence 20hz pendant 10 secondes, en espaçant les stimulations de 20 secondes.

## 2.5 Analyses

### 2.5.1 Sommeil

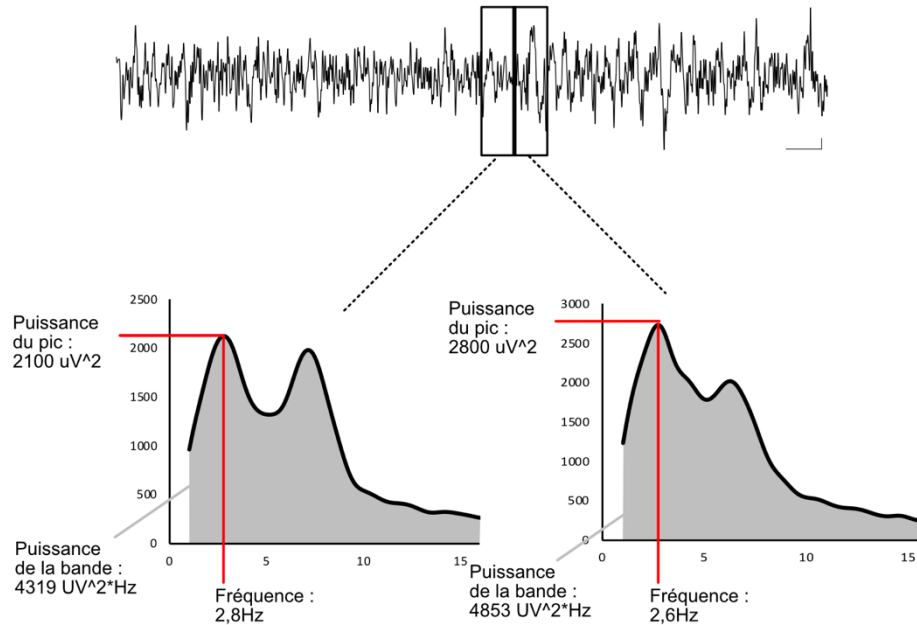


Figure 5. – Schéma de l'analyse du LFP pendant le sommeil

#### 2.5.1.1 Traitement des enregistrements

Les analyses ont été faites avec un pipeline d'analyse Matlab développé au laboratoire par un associé de recherche, Dr Guillaume Ducharme. Les enregistrements de sommeil pour les groupes de souris injectés dans le RM ont été sous-échantillonnés à 1000Hz et filtrés entre 0,5-300Hz. Ce sont les électrodes les plus extrêmes qui ont été analysées, soit l'électrode 1 et l'électrode 4 (Figure 7A). Si une de ces électrodes était mal placée, c'est l'électrode voisine qui était utilisée. Une analyse spectrale entre 1-30Hz avec une fenêtre et un *step* de 1 seconde a été calculée. De cette analyse spectrale, la puissance du pic, la fréquence du pic, et l'aire sous la courbe ont été extraites pour chaque seconde (Figure 5). Le pic (fréquence et puissance) a été détecté à l'intérieur de la bande de fréquence 1-16Hz. La puissance de la bande a été calculée pour la bande 1-16Hz pour tous les enregistrements, et divisée en delta (1-5Hz) et thêta (5-12Hz) pour le sommeil paradoxal.

### 2.5.1.2 Identification des stades de sommeil

Le LFP dans l'HP et l'EMG ont été utilisés pour classer le sommeil en période de 1 seconde comme étant de l'éveil, du sommeil lent, du sommeil REM, ou du sommeil transitoire. Ce classement a été fait manuellement, à l'aveugle par rapport aux périodes de stimulations. Le signal pendant l'éveil a été reconnu par l'activité EMG élevée et une activité dans l'HP de basse amplitude, le sommeil lent par une activité de l'hippocampe d'amplitude plus élevée et le sommeil REM par le rythme thêta dans l'HP. Les périodes contenant plusieurs types de rythmes, ou une transition entre deux périodes ont été marqués comme une période de transition et exclues.

### 2.5.1.3 Analyses du LFP

Les périodes de stimulations ont été automatiquement reconnues et coupées en périodes de 30 secondes (10 secondes de préstimulation, 10 secondes de stimulations, et 10 secondes post-stimulations). Les périodes de stimulation ont été classées selon le stade de sommeil assigné manuellement. Lors de stimulations consécutives pendant le sommeil REM, certaines périodes ont été considérées comme la période post-stimulation d'une stimulation, mais aussi préstimulation pour la suivante. Les périodes marquées comme étant des périodes de transition entre différents stades de sommeil ont été retirées. Les périodes contenant plus de 5 secondes exclues pour le sommeil paradoxal, ou 20 secondes pour le sommeil lent ont été retirées. Pour chaque paramètre, la moyenne de toutes les stimulations à travers le temps a été faite. De l'évolution à travers le temps, une valeur unique par souris a été extraite en moyennant les valeurs des cinq dernières secondes de la période. Les différences de localisations des électrodes par rapport aux couches de l'HP n'induisent pas de biais dans la fréquence des rythmes enregistrés, parce que la fréquence est stable à travers toutes les couches et régions de l'HP. Ainsi, une différence entre la fréquence pendant la stimulation et pendant la baseline, en Hz, a été calculée. La puissance et l'aire sous la courbe sont très dépendant de la couche dans lequel l'électrode est placée, et les valeurs varient donc beaucoup selon les positions d'électrode. Ainsi, c'est une valeur normalisée, soit la valeur pendant la stimulation divisée par la valeur pendant la baseline, qui a été calculée.



#### 2.5.1.4 Statistique

Un test de rang de Mann–Whitney U a été fait pour comparer les animaux ChETA avec les eYFP, avec le logiciel OriginLab. Une correction de comparaisons multiples de Holm-Bonferroni a été appliquée pour les 4 différentes fréquences de stimulation.

#### 2.5.1.5 Groupes préliminaires

Les groupes préliminaires de souris injectées dans l'HP avec un virus rétrograde ont été analysés plus sommairement. Les enregistrements ont été sous-échantillonnés à 1000Hz et filtrés entre 0,5-300Hz. Une analyse spectrale entre 1-15Hz, avec une fenêtre et un step de 1 seconde, utilisant un taper de [1 1] a été calculé. Les périodes de stimulations ont été observées pour confirmer l'état de sommeil de la souris, puis ont été manuellement classées en sommeil lent ou paradoxal. La moyenne de l'analyse spectrale des 10 secondes de préstimulations et des 10 secondes de stimulation a été calculée, puis la puissance et la fréquence du pic ont été extraites. La moyenne de l'analyse spectrale de toutes les stimulations pour chaque fréquence de stimulation de chaque souris a été calculée. Aucun test statistique n'a été fait à cause du nombre d'animaux plus réduits et du manque de souris eYFP.

### 2.5.2 Exploration

#### 2.5.2.1 Acquisitions des données

Les enregistrements de locomotions, faits uniquement sur les souris injectées localement dans le raphé, ont aussi été sous-échantillonnés à 1000Hz, puis filtrés entre 1-3000Hz.

#### 2.5.2.2 Analyse du LFP

Une analyse spectrale entre 1-30Hz, avec une fenêtre et un step de 1 seconde, utilisant un taper de [1 1] a été calculée. De cette analyse spectrale, la puissance du pic, la fréquence du pic, et l'aire sous la courbe de la bande de thêta ont été extraites. Seules les périodes avec un pic défini dans la bande de thêta ont été conservées. La fréquence instantanée du pic dans la bande de thêta a été calculée de façon plus précise en utilisant la transformée de Hilbert, comme décrite dans les méthodes de Kropff (Kropff et al., 2021). La position de la souris, détectée automatiquement par le logiciel d'enregistrement *imetronics*, a été filtrée pour retirer la bande de fréquence de 0-1Hz,

pour lisser la détection de position. Celle-ci a été utilisée pour calculer la vitesse de la souris, comme décrit dans les méthodes de Kropff (Kropff et al., 2021). Les enregistrements ont été révisés pour exclure les périodes de signal contenant des artefacts liés par exemple aux chocs du headstage sur les parois de l'open field, ainsi que les périodes où la détection automatique de position a enregistré une position incorrecte. Les périodes de locomotions avec une vitesse plus élevée que 5cm/s ont été considérées comme du mouvement, et les périodes avec une vitesse de locomotion inférieure à 2,5cm/s ont été considérées comme de l'immobilité. Les stimulations ont été automatiquement détectées, puis les périodes de préstimulation et de stimulations ont été séparées. Pour la distribution des vitesses, la quantité de temps passés à toutes les vitesses a été calculée, normalisée selon le temps total dans l'environnement, puis groupées en classes de 2,5cm/s. Pour les périodes d'immobilité, la différence de fréquence instantanée stimulation-baseline, ainsi que la proportion de la puissance du pic et de la bande ont été calculées, puis moyennées.

#### 2.5.2.3 Statistique

Un test de rang de Mann–Whitney U a été fait pour comparer la fréquence, la puissance du pic et la puissance de la bande entre souris ChETA et eYFP. Pour les périodes de locomotion, des graphiques de la fréquence instantanée, la fréquence du pic, la puissance du pic et l'aire sous la courbe de  $\theta$  en fonction de la vitesse ont été tracés, en utilisant des boîtes de 2,5cm/sec. Pour la baseline et la stimulation de chaque souris, une droite de régression linéaire a été calculée, en pondérant l'équation selon le nombre de valeurs par boîte, avec OriginLab. Les valeurs de pente et d'ordonnées à l'origine ont été extraites, puis la différence entre la stimulation et la baseline de chaque souris a été calculée. Les différences stimulation-baseline ont été comparées entre les ChETA et les eYFP avec un test de rang de Mann–Whitney U.

## 2.6 Histologie

Les souris ont été anesthésiées avec un mélange de Xylazine-Ketamine-Acepromazine (80mg/kg Xylazine (CDMV), 12,5mg/kg Ketamine (CDMV) et 2.5mg/kg Acepromazine (CDMV), dans de la Chlorure de Sodium 0,9% (ICU Medical Canada)), puis leur tissu fixé par une perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde (Sigma) 4% dans du PBS. Les cerveaux ont été extraits, post-

fixés dans du paraformaldéhyde (Sigma) 4% dans du PBS pour 24h, et cryoprotégés dans une solution de sucrose (Sigma) 15% dans du PBS pour 24h. Les cerveaux ont été congelés dans l'O.C.T. (Thermofisher), dans de l'alcool 2-méthylbutane (Fisher Scientific) refroidi avec de la glace sèche. Pour les animaux implantés, des tranches coronales d'HP et de raphé de 16µm ont été tranchées au cryostat (Thermofisher), et montées immédiatement sur lame pour conserver l'ordre des sections. Les coupes ont été incubées dans une solution de blocage PGT (0,45% Gélatine (Sigma) et 0,25% Triton X-100(sigma), dans du PBS) pendant 3x15 minutes, puis incubées pendant 48h à 4°C avec les anticorps primaires suivants : anti-espèce anti-Tph2 (1:2000, Novus Biologicals) et espèce anti-GFP (1:5000, Novus Biologicals) dilués dans du PGT. Les coupes ont ensuite été rincées dans du PGT pendant 45 minutes, puis incubées pendant 2h à température ambiante avec les anticorps secondaires suivants : Espèce Anti-Lapin A488 (1:2000, Life Technologies) et Espèce Anti-Chèvre A555 (1:2000, Life Technologies) dilués dans du PGT. Les lames ont été rincées au PBS, puis montées avec le milieu de montage Fluoromount, contenant le marqueur DAPI (Thermofisher). Pour les animaux utilisés pour les exemples d'expression virale mais n'ayant pas été implantés, ainsi que les comptages de neurones pour la spécificité et l'efficacité du vecteur viral, des tranches coronales de 25 microns ont été faites, et l'immunohistochimie s'est faite sur les coupes flottantes. Le protocole d'immunohistochimie était identique, à l'exception des anticorps utilisés. Les coupes de raphé ont été incubées avec les anticorps espèce anti-Tph2 (1:1000, Frontier Institute) et espèce anti-GFP (1:5000, Novus Biologicals), et les coupes d'HP ont été incubés avec les anticorps espèce anti-SERT (1:1000, Frontier Institute) et espèce anti-GFP (1:2000, Invitrogene). Les mêmes anticorps secondaires ont été utilisés pour toutes les coupes, soit espèce Anti-Poulet A488 (1:2000, Life Technologies) et espèce Anti-Cochon d'Inde A555 (1:2000, Life Technologies) dans du PGT. Les photos ont été prises avec un microscope à fluorescence inversé Leica DMI8, avec une caméra Leica DFC9000 et le logiciel de prise d'image LAS X (Leica). Les placements d'électrodes, le placement de fibre optique et l'expression virale ont été vérifiés pour toutes les souris.



## 3. Résultats

### 3.1 Activations des neurones sérotoninergiques du RM

La combinaison d'un modèle de souris SERT-Cre, soit exprimant l'enzyme CRE-recombinase dans les neurones sérotoninergiques (5-HT), ainsi que d'un virus CRE-dépendant injecté dans le RM (Figure 6A) permet l'expression spécifique de l'opsine ChETA dans les neurones 5-HT du RM. La protéine SERT est le transporteur de la sérotonine, servant à cibler les neurones 5-HT. Une immunohistochimie du raphé d'un animal injecté illustre la localisation de l'opsine ChETA grâce à son couplage au marqueur fluorescent eYFP (vert, Figure 5B). Elle est très majoritairement exprimée par les neurones exprimant aussi la Tph2, une enzyme de synthèse de la 5-HT. La figure 5 illustre que même si la majorité de l'expression se situe dans le noyau du RM, le sous-noyau le plus ventral du raphé dorsal, soit le noyau interfasciculaire du raphé dorsal, exprime aussi l'opsine. Un agrandissement dans le RM montre des corps cellulaires co-exprimant le marqueur sérotoninergique (Tph2, rouge) et le virus (eYFP, vert) (Figure 6C). Comme attendu, dans les régions de projections d'intérêt, soit l'HPd (Figure 6D), l'HPv (Figure 6E) et le septum médian (Figure 6F), une portion des fibres sérotoninergiques (SERT-positives, rouge) expriment aussi le eYFP, couplé au virus (vert). Des souris ont été injectées avec le virus contenant l'opsine ChETA et le marqueur eYFP associé, pour caractériser la spécificité et l'efficacité du virus utilisé. Les neurones exprimant eYFP et/ou la Tph2, un marqueur sérotoninergique, ont été comptés dans les trois sous-noyaux du raphé les plus proches du site d'injection, soit le RM, le noyau interfasciculaire du raphé dorsal ainsi que le noyau B9. La quantification du nombre total de neurones Tph2+ exprimant le eYFP nous a permis de calculer l'efficacité du virus, alors que le nombre de neurones eYFP+ exprimant Tph2 nous a permis de calculer la spécificité. L'expression de l'opsine ChETA couplée à la eYFP après infection par le virus est largement spécifique aux neurones sérotoninergiques : au moins 94% des neurones exprimant eYFP expriment aussi la THP2, marqueur des neurones sérotoninergiques (Figure 6G, droite). L'efficacité est plus variable selon les noyaux, atteignant 29,4% des neurones du RM, contre 11% des neurones du B9 et 27,5% des neurones du noyau interfasciculaire du raphé dorsal (Figure 6G, n=4).

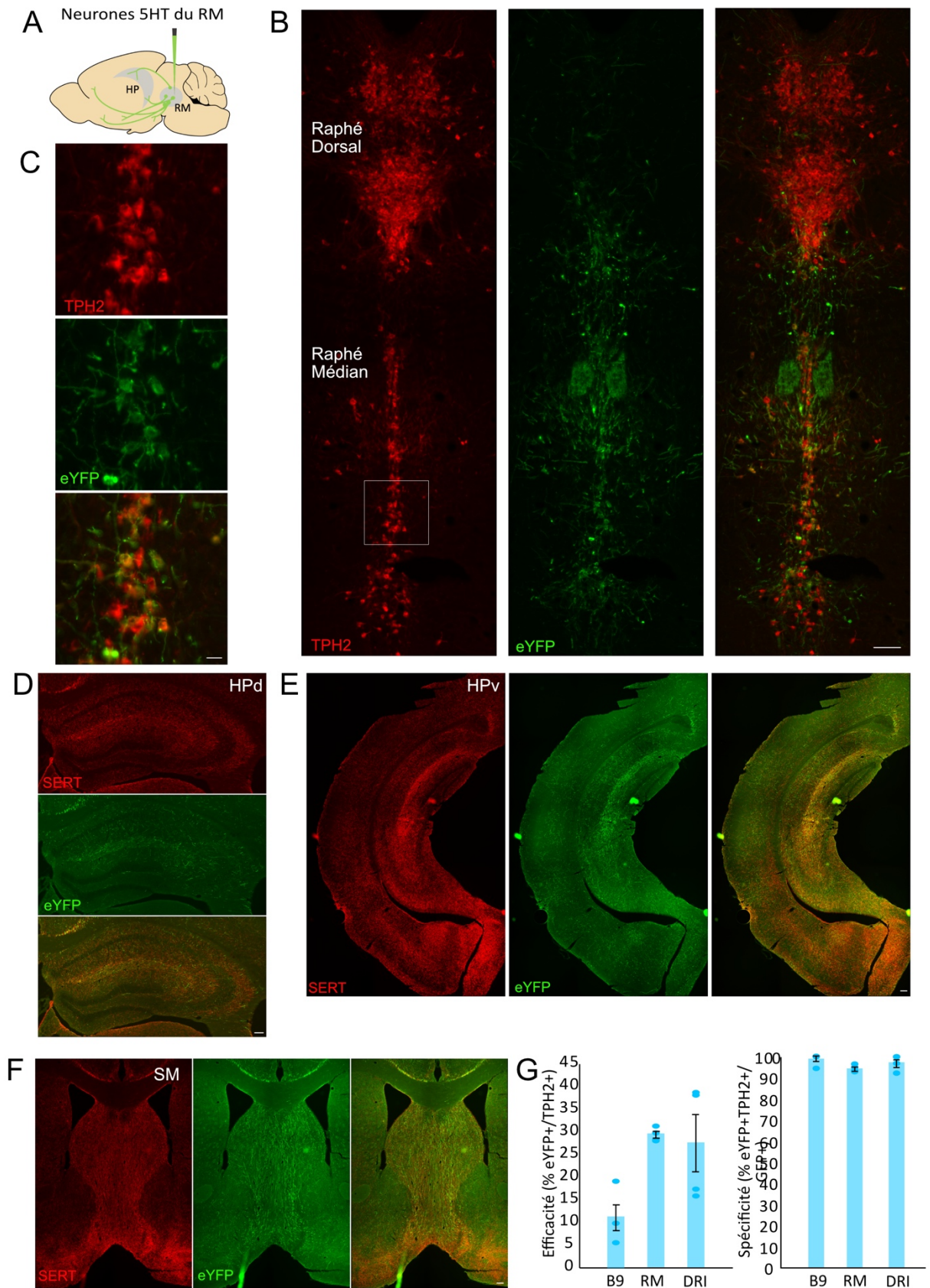


Figure 6. – Expression conditionnelle d’une opsine à la GFP par les neurones 5-HT du RM après injection. (A) Schéma de l’injection virale dans le RM d’une souris SERT-Cre. (B) Exemple d’une section coronale au niveau du raphé, montrant l’expressions du virus (eYFP), comparé aux neurones 5-HT du raphé (Tph2), dans les noyaux du raphé dorsal et médian. Barre d’échelle = 100  $\mu$ m, le carré blanc montre le champ de vision du panneau C. (C) Exemple de corps cellulaires co-exprimant le virus (GFP) et le marqueur sérotoninergique Tph2 dans le RM, révélés par immunohistochimie. Barres d’échelle = 20  $\mu$ m. (D-F) Exemple de sections coronales montrant les fibres 5-HT (SERT) et exprimant le virus (GFP) dans l’HPd (HPd, D), dans l’HPv (E), et dans le septum médian (SM, F), révélées par immunohistochimie. Barres d’échelles = 100  $\mu$ m. (G) Efficacité (%GFP+/Tph2+) et spécificité (%GFP+Tph2+/GFP+) du virus après l’injection dans le RM pour les trois sous-noyaux du raphé les plus rapprochés du site d’injection, soit le noyau B9, le RM et le noyau interfasciculaire du raphé dorsal (DRI). Moyenne + SEM, n=4.

La vérification des sites d’implantations (Figure 7A) des électrodes et fibres optiques a été réalisée systématiquement pour tous les animaux. Le mauvais placement de la fibre optique, des électrodes d’enregistrement et une absence d’expression virale ont été utilisés comme critère d’exclusion. N = 2 animaux ont été exclus sur la base du positionnement de la fibre optique, et N=1 sur la base d’une expression virale insuffisante. La Figure 6A illustre la localisation des fibres optiques pour les animaux qui ont été conservés dans nos analyses (Figure 7B-C). La position des électrodes est bien restreinte à l’HPd (Figure 6D-E) et à l’HPv (Figure 7F-G).

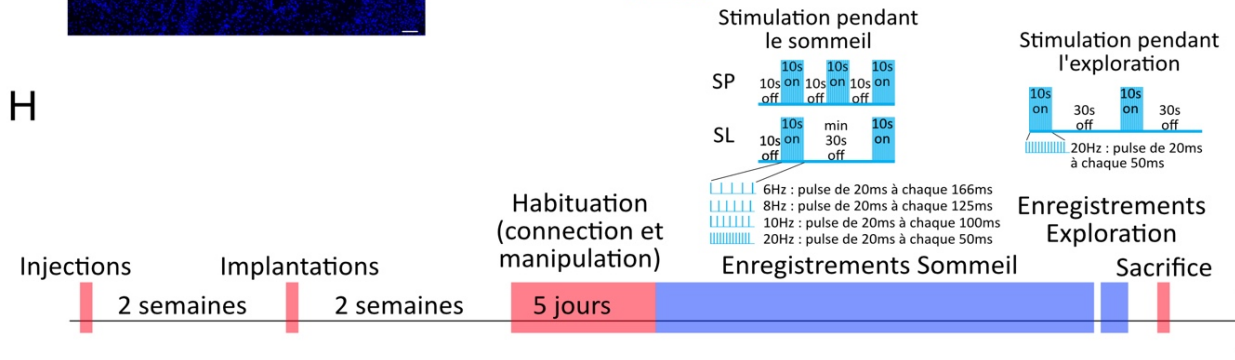
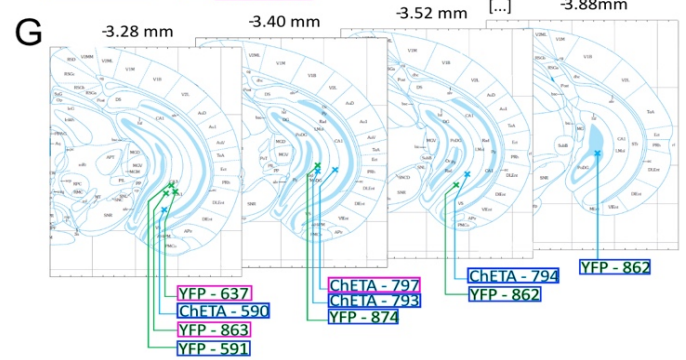
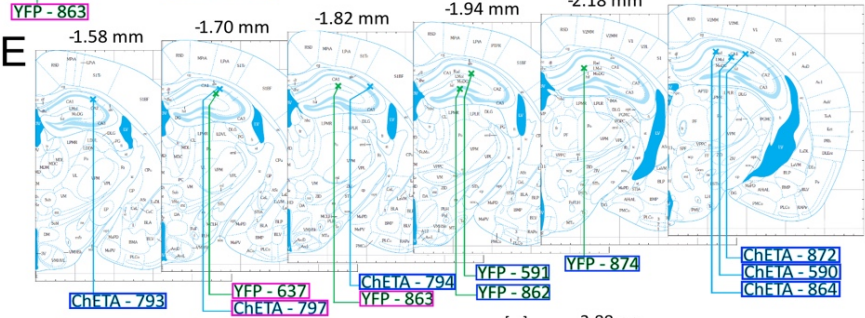
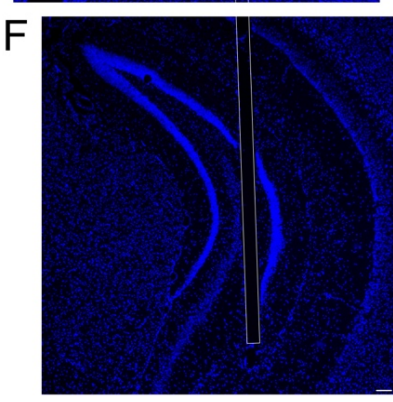
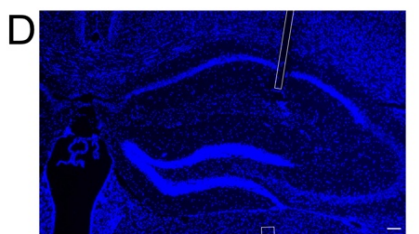
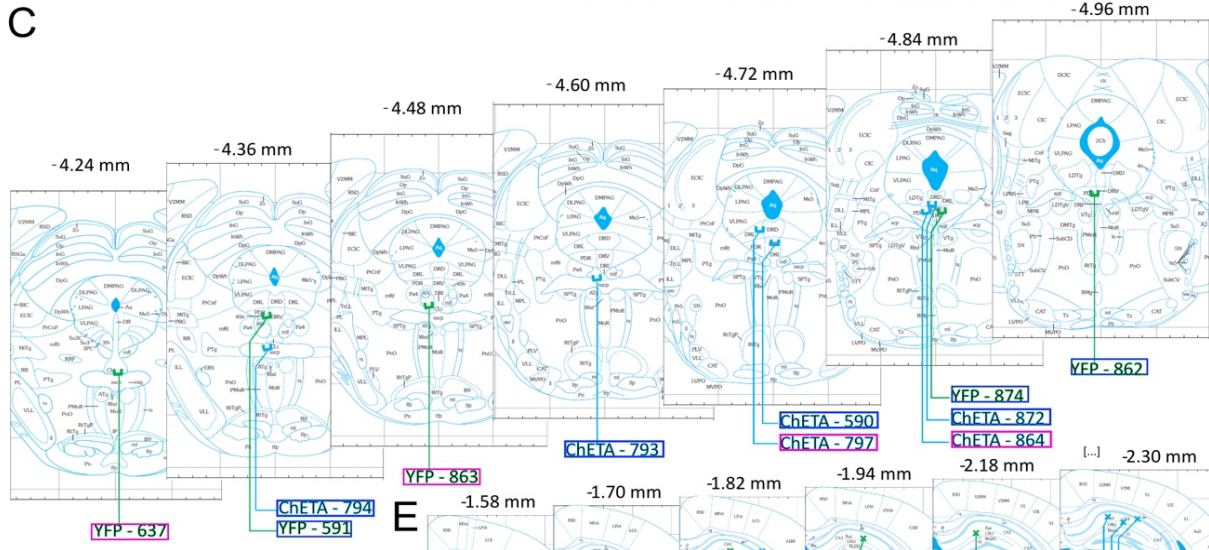
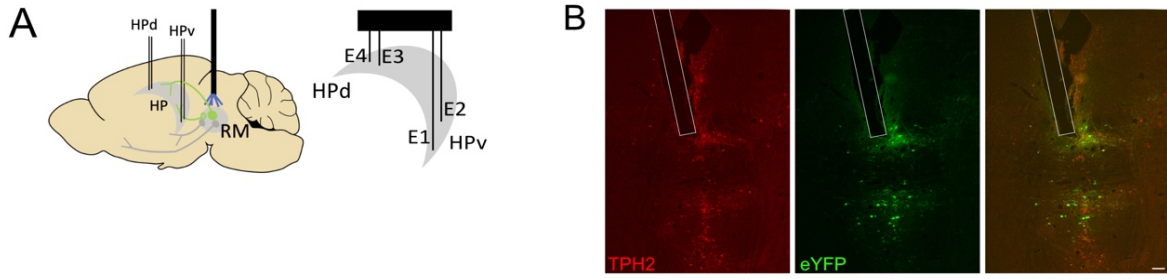




Figure 7. – Confirmation des sites d'implantations. Schéma des sites d'implantations des électrodes dans l'HPd et dans l'HPv, ainsi que de la fibre optique dans le RM. Schéma de l'implant (B) Exemple de trace de fibre optique en section transversale, marqué par immunohistochimie pour la Tph2 dans les neurones sérotoninergiques (Tph2, rouge) et pour l'expression virale (eYFP, vert). Barre d'échelle = 100  $\mu$ m. (C) Sites d'implantations de toutes les fibres optiques pour les souris exprimant l'opsine ChETA (bleu pâle, n=6) et la eYFP (vert, n=5) injectées dans le RM. Les souris femelles sont encadrées en rose, et les mâles en bleu foncé. (D) Exemple de trace d'électrode dans l'HPd, marqué au DAPI. Barre d'échelle = 100  $\mu$ m. (E) Schéma de la localisation de toutes les électrodes utilisées dans l'HPd pour les souris ChETA (bleu pâle, n=6) et eYFP (verts, n=5) injectées dans le RM. (F) et (G), même chose pour les électrodes dans l'HPv. Les niveaux de coupes coronales de cerveau sont adaptées de Paxinos and Franklin (2019). (H) Ligne du temps et protocole détaillé de stimulations par optogénétique.

### **3.1.1 Activation des neurones 5-HT du RM sur les rythmes de l'HP pendant le sommeil**

Nous avons premièrement activé par optogénétique les neurones 5-HT du RM pendant le sommeil paradoxal, à 6Hz, 8Hz, 10Hz et 20Hz (Figure 7H). Il est connu que dans l'HPd, le rythme thêta est d'une puissance plus élevée et est plus constant (Royer et al., 2010). La diversité des fonctions et des rythmes de deux pôles de l'HP nous a poussés à faire nos enregistrements dans les deux régions, pour pouvoir les comparer par la suite. Les résultats de l'HPv seront présentés en HPv (Figure 8), suivi des résultats dans l'HPd (Figure 9). Dans l'HPv, l'exemple de tracé, obtenu chez animal ChETA lors de la stimulation à 8Hz, illustre notre protocole de stimulation, selon lequel le laser est activé environ 10 secondes après le début d'un épisode de SP, reconnaissable par un rythme thêta proéminent. Sur cet exemple d'enregistrement on peut voir une diminution de fréquence du rythme thêta de l'HPv, ainsi qu'une augmentation apparente de l'amplitude en réponse à une stimulation lumineuse (Figure 8A). Le spectrogramme associé, qui analyse de la puissance du LFP entre 1-30 Hz selon la fréquence et à travers le temps, suggère le même effet, soit la diminution de la fréquence du rythme thêta et une augmentation de puissance, une mesure représentative de l'amplitude (Figure 8A). Un exemple d'analyse spectrale pour une souris ChETA confirme ces deux effets, alors que l'analyse de l'animal contrôle ne présente pas de changements majeurs en réponse à la même stimulation lumineuse (Figure 8B). Pour ces deux spectres de puissance, la totalité des stimulations pour une fréquence et un animal ont été

moyennés. Afin de mieux analyser la dynamique de l'effet de l'activation des neurones 5-HT sur les propriétés du rythme thêta, nous avons procédé à une analyse des variations du pic de fréquence (Figure 8C et D), du pic de puissance (Figure 8E et F) et de l'aire sous la courbe (Figure 8G et H) au cours du temps, pour le LFP entre 1-16 Hz. Pour chaque souris et chaque stimulation à une fréquence donnée, 20 à 30 répétitions ont été effectuées et moyennées. Les courbes illustrent la moyenne de  $n = 6$  souris ChETA et  $n = 5$  souris eYFP  $\pm$  SEM. L'activation des neurones 5-HT du RM pendant le sommeil REM diminue la fréquence du pic du rythme de l'HPv, de façon quasi immédiate après le début de la stimulation (Figure 8C). L'effet est similaire aux quatre fréquences de stimulation. La quantification et les statistiques (Figure 8D-F-H-J-L) ont été faites sur une moyenne des cinq dernières secondes, pour quantifier le plateau de l'effet et pas la descente. La diminution de la fréquence du pic était en moyenne de  $-0,81 \pm 0,15$  Hz (Figure 8D). L'analyse de la puissance du pic ne détecte pas de changement significatif (Figure 8E-F), mais la puissance de la bande (1-16Hz) est augmentée pour trois des quatre fréquences de stimulation (Figure 8G-H). Étant donné les deux pics apparents sur l'analyse spectrale (Figure 8B), nous avons divisé la bande en deux, soit la bande delta (1-5Hz) et la bande thêta (5-12Hz). L'augmentation de puissance de la bande reste significative pour les trois fréquences de stimulation pour la bande de delta, avec une augmentation moyenne de  $37,6\% \pm 8,6\%$  (Figure 8I-J), mais pas pour la bande de thêta. Ainsi, l'activation des neurones 5-HT du RM pendant le sommeil REM cause une diminution de la fréquence des rythmes de l'HPv, ainsi qu'une augmentation de la puissance de la bande, surtout due à l'augmentation de puissance des rythmes delta (1-5Hz).

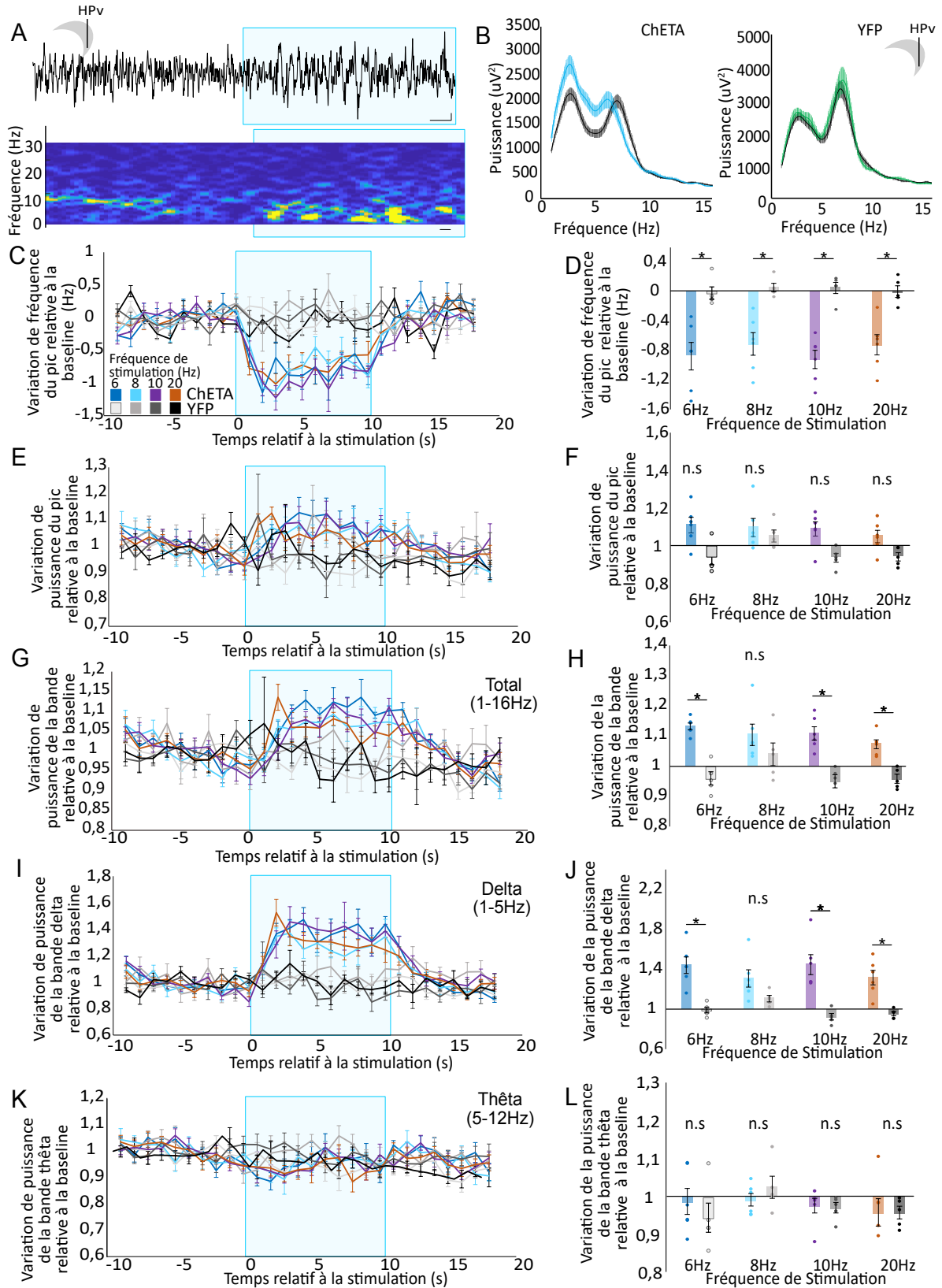


Figure 8. – La stimulation des neurones 5-HT du RM pendant le sommeil REM diminue la fréquence du pic et augmente la puissance de la bande des rythmes de l’HPv. Tracé du rythme LFP de l’HPv pendant le sommeil REM, filtré (0,5-300Hz) et spectrogramme associé montrant le signal avant et pendant la stimulation optogénétique à 10Hz, représentée par un rectangle bleu. Barres d’échelles = 100  $\mu$ V, 0,5 seconde. (B) Exemple d’une analyse spectrale pendant la stimulation à 8Hz pour un animal ChETA (bleu), un animal eYFP (vert), et leurs baselines respectives (noir). Moyenne + SEM. (C) Variation de la fréquence du pic par rapport à la baseline dans le temps, la stimulation est représentée par le rectangle bleu. Moyenne + SEM. (D) Moyenne de la variation de fréquence relative à la baseline des cinq dernières secondes de stimulation, comparaison des ChETA par rapport aux eYFP avec un test de Mann-Whitney U, correction de comparaisons multiples Holm-Bonferroni. \* :  $p < 0,05$ . Moyenne + SEM. (E) et (F), comme (C) et (D) pour la puissance du pic par rapport à la baseline. (G) et (H), comme (C) et (D) pour la puissance de la bande (1-16Hz) par rapport à la baseline. (I) et (J), comme (C) et (D) pour la puissance de la bande delta (1-5Hz) par rapport à la baseline. (K) et (L), comme (C) et (D) pour la puissance de la bande thêta (5-12Hz) par rapport à la baseline. Pour toute la figure, le code de couleur est le suivant : pour les ChETA, 6Hz en bleu foncé, 8Hz en bleu pâle, 10Hz en mauve et 20Hz en orange. Pour les eYFP, 6Hz en gris très pâle, 8Hz en gris moyen, 10Hz en gris et 20Hz en noir.

La figure 9 illustre les mêmes stimulations, soit des neurones 5-HT du RM pendant le sommeil paradoxal, mais dans l’HPd. Le tracé, le spectrogramme et l’analyse spectrale semblent aussi illustrer une diminution de fréquence du rythme thêta pendant la stimulation (Figure 9A-B). Comme dans l’HPv, la diminution de fréquence est rapide après le début de la stimulation, et est similaire aux quatre fréquences de stimulation (Figure 9C). La quantification de la fréquence des oscillations montre aussi une diminution de fréquence d’une amplitude assez similaire à l’HPv, soit de  $-0,72\text{Hz} \pm 0,14\text{ Hz}$  en moyenne (Figure 9D). L’analyse de la puissance du pic et de la puissance de la bande ne détecte pas de changements significatifs de puissance (Figure 9E-F-G-H). La division en deux bandes de fréquences a aussi été effectuée, et comme dans l’HPv, une augmentation de la puissance de la bande delta, mais pas thêta est perçue (Figure 9I-J-K-L). Ainsi, lors de l’activation des neurones 5-HT du RM pendant le sommeil paradoxal, on peut enregistrer une diminution de fréquence significative pour le rythme thêta de l’HPd, ainsi qu’une augmentation de la puissance de la bande delta.

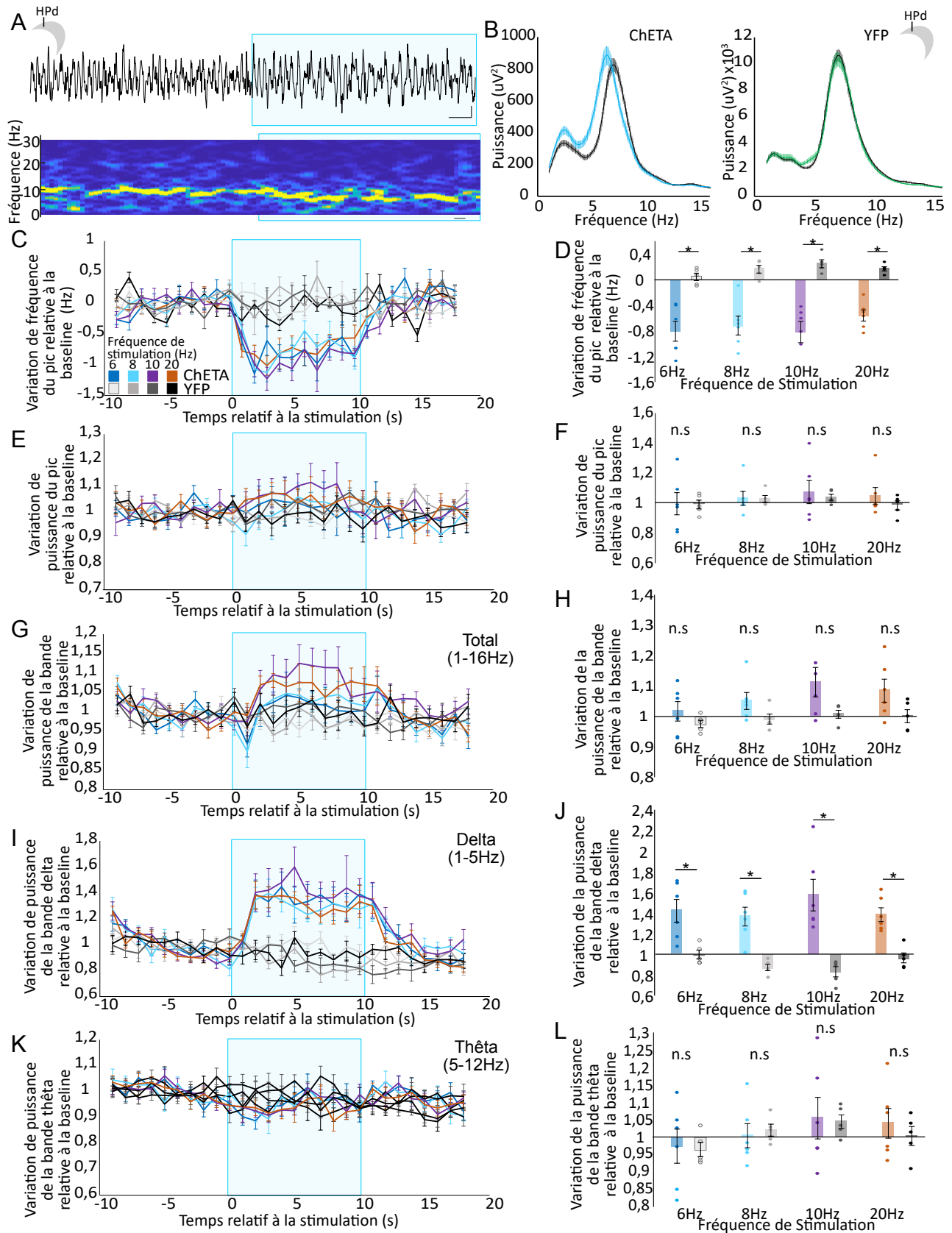


Figure 9. – La stimulation des neurones 5-HT du RM pendant le sommeil REM diminue la fréquence et augmente la puissance de la bande delta des rythmes de l'HPd. Tracé du rythme LFP de l'HPd pendant le sommeil REM, filtré (0,5-300Hz) et spectrogramme associé montrant le signal avant et pendant la stimulation optogénétique à 10Hz, représentée par un rectangle bleu. Barres d'échelles = 100  $\mu$ V, 0,5 seconde. (B) Exemple d'une analyse spectrale pendant la stimulation à 8Hz pour un animal ChETA (bleu), un animal eYFP (vert), et leurs baselines respectives (noir). Moyenne + SEM. (C) Variation de la fréquence du pic par rapport à la baseline dans le temps, la stimulation est représentée par le rectangle bleu. Moyenne + SEM. (D) Moyenne de la variation de fréquence relative à la baseline des cinq dernières secondes de stimulation, comparaison des ChETA par rapport aux eYFP avec un test de Mann-Whitney U, correction de comparaisons multiples Holm-Bonferroni. \* :  $p < 0,05$ . Moyenne + SEM. (E) et (F), comme (C) et (D) pour la puissance du pic par rapport à la baseline. (G) et (H), comme (C) et (D) pour la puissance de la bande (1-16Hz) par rapport à la baseline. (I) et (J), comme (C) et (D) pour la puissance de la bande delta (1-5Hz) par rapport à la baseline. (K) et (L), comme (C) et (D) pour la puissance de la bande thêta (5-12Hz) par rapport à la baseline. Pour toute la figure, le code de couleur est le suivant : pour les ChETA, 6Hz en bleu foncé, 8Hz en bleu pâle, 10Hz en mauve et 20Hz en orange. Pour les eYFP, 6Hz en gris très pâle, 8Hz en gris moyen, 10Hz en gris et 20Hz en noir.

Nous avons ensuite activé les neurones 5-HT du RM pendant le sommeil à ondes lentes. Les rythmes de l'HP sont très différents pendant le sommeil paradoxal et le sommeil lent, où ce sont des rythmes dans la bande delta qui sont prédominants. Le tracé, le spectrogramme et l'analyse spectrale du rythme dans l'HPv pendant le sommeil lent chez un animal ChETA suggèrent une diminution de la fréquence du pic ainsi qu'une augmentation de puissance du pic en réponse à une stimulation de 8Hz (Figure 10A-B). La quantification de la variation de fréquence au cours du temps montre une diminution plus graduelle de la fréquence, qui est similaire pour les quatre fréquences de stimulation (diminution moyenne de  $-0,69\text{Hz} \pm 0,08\text{ Hz}$ , Figure 10C-D). La puissance du pic a été augmentée par la stimulation, d'une façon graduelle, atteignant une augmentation moyenne de  $27,1\% \pm 5,6\%$ , significative pour trois des quatre fréquences de stimulation (Figure 10E-F). Finalement, une augmentation légère de la puissance de la bande, suivant l'augmentation de la puissance du pic, a été observée (Figure 10G). Cette augmentation a atteint une moyenne de  $14,7\% \pm 3,3\%$ , significative pour deux des quatre fréquences de stimulation (Figure 10H). Ainsi, l'activation des neurones 5-HT du RM pendant le sommeil lent a causé une diminution de fréquence et une augmentation de puissance du pic et de la bande du rythme delta de l'HPv.

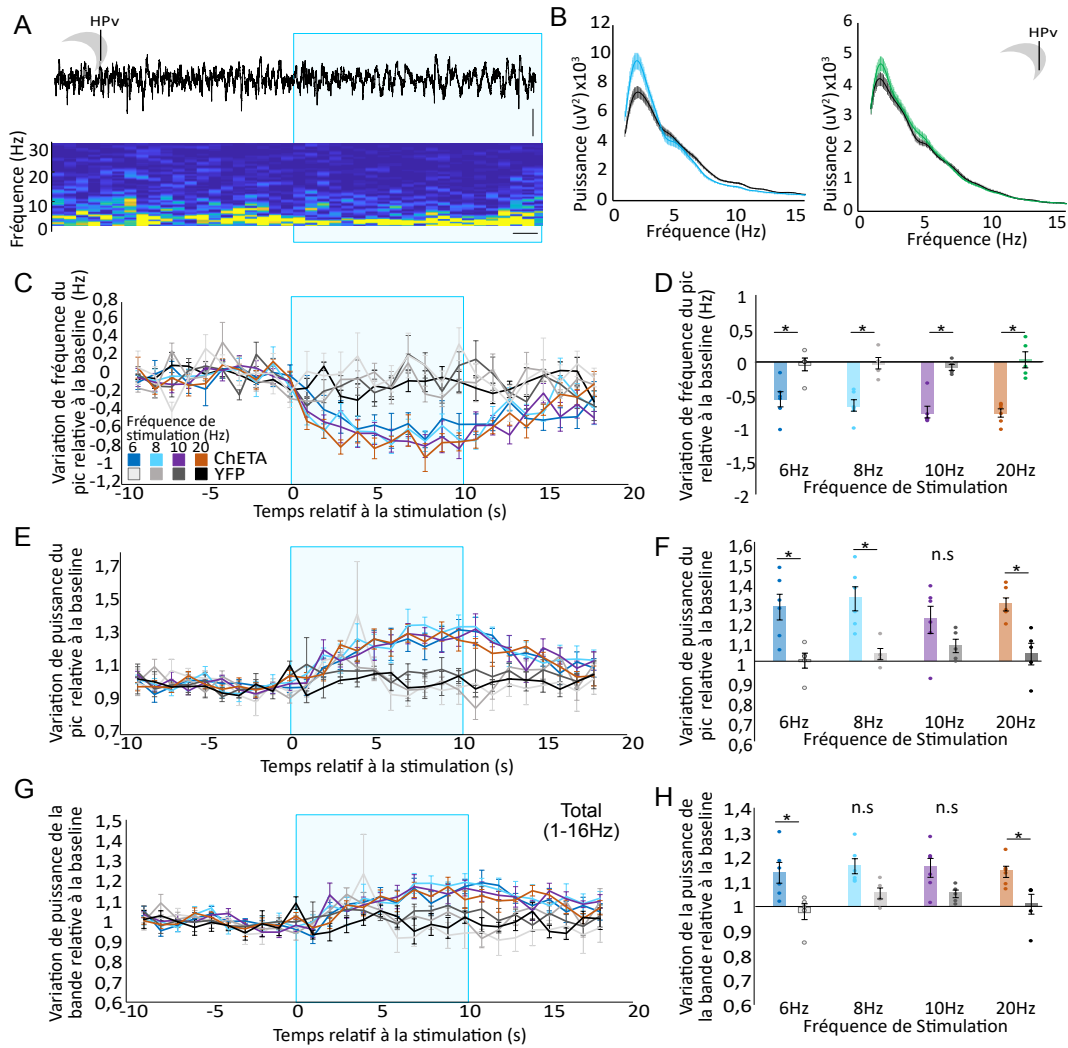


Figure 10. – La stimulation des neurones 5-HT du RM pendant le sommeil SWS diminue la fréquence et augmente la puissance du pic et de la bande du rythme de l’HPv. Tracé du rythme LFP de l’HPv pendant le sommeil lent, filtré (0,5-300Hz) et spectrogramme associé montrant le signal avant et pendant la stimulation optogénétique à 10Hz, représentée par un rectangle bleu. Barres d’échelles = 100  $\mu$ V, 1 seconde. (B) Exemple d’une analyse spectrale pendant la stimulation à 8Hz pour un animal ChETA (bleu), un animal eYFP (vert), et leurs baselines respectives (noir). Moyenne + SEM. (C) Variation de la fréquence du pic par rapport à la baseline dans le temps, la stimulation est représentée par le rectangle bleu. Moyenne + SEM. (D) Moyenne de la variation de fréquence relative à la baseline des cinq dernières secondes de stimulation, comparaison des ChETA par rapport aux eYFP avec un test de Mann-Whitney U, correction de comparaisons multiples Holm-Bonferroni. \* :  $p < 0,05$ . Moyenne + SEM. (E) et (F), comme (C) et (D) pour la puissance du pic par rapport à la baseline. (G) et (H), comme (C) et (D) pour la puissance de la bande (1-16Hz) par rapport à la baseline. Pour toute la figure, le code de couleur est le suivant : pour les ChETA, 6Hz en bleu foncé, 8Hz en bleu pâle, 10Hz en mauve et 20Hz en orange. Pour les eYFP, 6Hz en gris très pâle, 8Hz en gris moyen, 10Hz en gris et 20Hz en noir.

Dans l'HPd, l'activation des neurones 5-HT du RM pendant le sommeil lent semble causer une diminution de puissance, surtout dans les fréquences plus hautes, ainsi que la diminution de fréquence du rythme (Figure 11A-B). La quantification montre une diminution graduelle de fréquence des rythmes de l'HPd. Cette diminution, significative pour seulement une fréquence de stimulation, a aussi atteint une moyenne de  $-0,69\text{Hz} \pm 0,19\text{ Hz}$  (Figure 11C-D). Aucune différence significative n'a été observée dans la puissance du pic (Figure 11E-F). Les souris ChETA comme les eYFP ont une diminution de puissance du pic et de la bande, immédiatement après la stimulation. La puissance de la bande est restée diminuée seulement pour les ChETA. La quantification illustre une diminution significative pour trois des quatre fréquences de stimulation, atteignant une diminution maximale de  $20,2\% \pm 3,7\%$  (Figure 11G-H).

Pour résumer, la stimulation des neurones 5-HT du RM pendant le sommeil paradoxal a causé une diminution de la fréquence dominantes des oscillations et une augmentation de la puissance de la bande dans l'HPv, et une diminution de fréquence et une augmentation de la bande delta (1-5Hz) dans l'HPd. Lors de la stimulation pendant le sommeil paradoxal, nous avons observé une baisse de fréquence, et une augmentation de puissance du pic et de la bande dans l'HPv, ainsi qu'une diminution de fréquence, et une diminution de puissance de la bande de l'HPd.



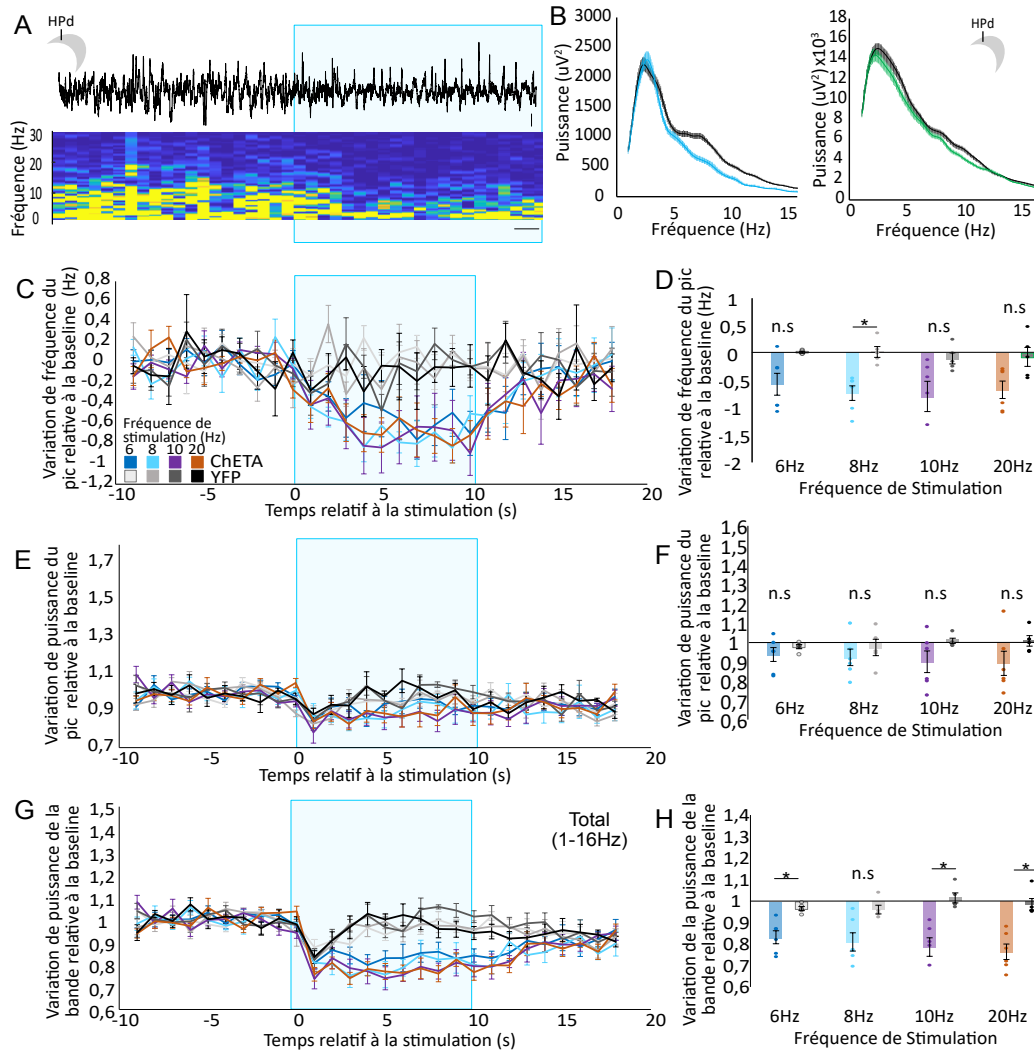


Figure 11. – La stimulation des neurones 5-HT du RM pendant le sommeil SWS diminue la fréquence et diminue la puissance de la bande du rythme de l’HPd. Tracé du rythme LFP de l’HPd pendant le sommeil lent, filtré (0,5-300Hz) et spectrogramme associé montrant le signal avant et pendant la stimulation optogénétique à 10Hz, représentée par un rectangle bleu. Barres d’échelles = 100  $\mu$ V, 1 seconde. (B) Exemple d’une analyse spectrale pendant la stimulation à 8Hz pour un animal ChETA (bleu), un animal eYFP (vert), et leurs baselines respectives (noir). Moyenne + SEM. (C) Variation de la fréquence du pic par rapport à la baseline dans le temps, la stimulation est représentée par le rectangle bleu. Moyenne + SEM. (D) Moyenne de la variation de fréquence relative à la baseline des cinq dernières secondes de stimulation, comparaison des ChETA par rapport aux eYFP avec un test de Mann-Whitney U, correction de comparaisons multiples Holm-Bonferroni. \* :  $p < 0,05$ . Moyenne + SEM. (E) et (F), comme (C) et (D) pour la puissance du pic par rapport à la baseline. (G) et (H), comme (C) et (D) pour la puissance de la bande (1-16Hz) par rapport à la baseline. Pour toute la figure, le code de couleur est le suivant : pour les ChETA, 6Hz en bleu foncé, 8Hz en bleu pâle, 10Hz en mauve et 20Hz en orange. Pour les eYFP, 6Hz en gris très pâle, 8Hz en gris moyen, 10Hz en gris et 20Hz en noir.

### 3.1.2 Exploration

Après les enregistrements de sommeil, nous avons exposé les souris à trois ou six sessions en *Open Field* en changeant le contexte à chaque exposition (murs, planchers et odeur). Les rythmes thêta sont présents pendant plusieurs types de comportements à l'éveil, dont l'exploration d'un environnement nouveau et la locomotion. Certaines études observent un effet différent sur les rythmes thêta pendant l'éveil et pendant le sommeil (Kantor et al., 2005). Nous avons ainsi voulu enregistrer l'effet de la stimulation des neurones 5-HT du RM pendant l'éveil, en plus du sommeil. Pendant la durée complète de l'exploration, des stimulations de 10 secondes à 20Hz ont été faites, espacées de 30 secondes. Nous avons sélectionné des stimulations de 20Hz car en plus d'y avoir un effet, selon les patrons connus de décharge de la sérotonine soit autour de 5Hz, nous allions entraîner l'activité des neurones de façon significative. Nous avons premièrement vérifié si la stimulation changeait la locomotion. La proportion du temps passé immobile ou en exploration ne semble pas changer avec la stimulation chez les ChETA (baseline en noir, stimulation en bleu) ou chez les eYFP (baseline en gris, stimulation en vert) (Figure 12A). Nous avons ensuite sélectionné les périodes d'immobilité, pour évaluer si la stimulation des neurones 5-HT du RM changeait les propriétés des rythmes thêta. Dans l'HPv, la fréquence, la puissance du pic et de la bande ne semblent pas être affectées par la stimulation (Figure 12B-C-D). Dans l'HPd, on peut voir sur l'analyse spectrale une diminution de fréquence (Figure 12E-F). La quantification montre une diminution légère, mais significative de la fréquence du pic du rythme thêta, d'une amplitude de  $-0,09\text{Hz} \pm 0,02 \text{ Hz}$  (Figure 12G). Ainsi, lors de l'immobilité dans un environnement nouveau, la stimulation des neurones 5-HT du RM diminue la fréquence du rythme thêta de l'HPd.

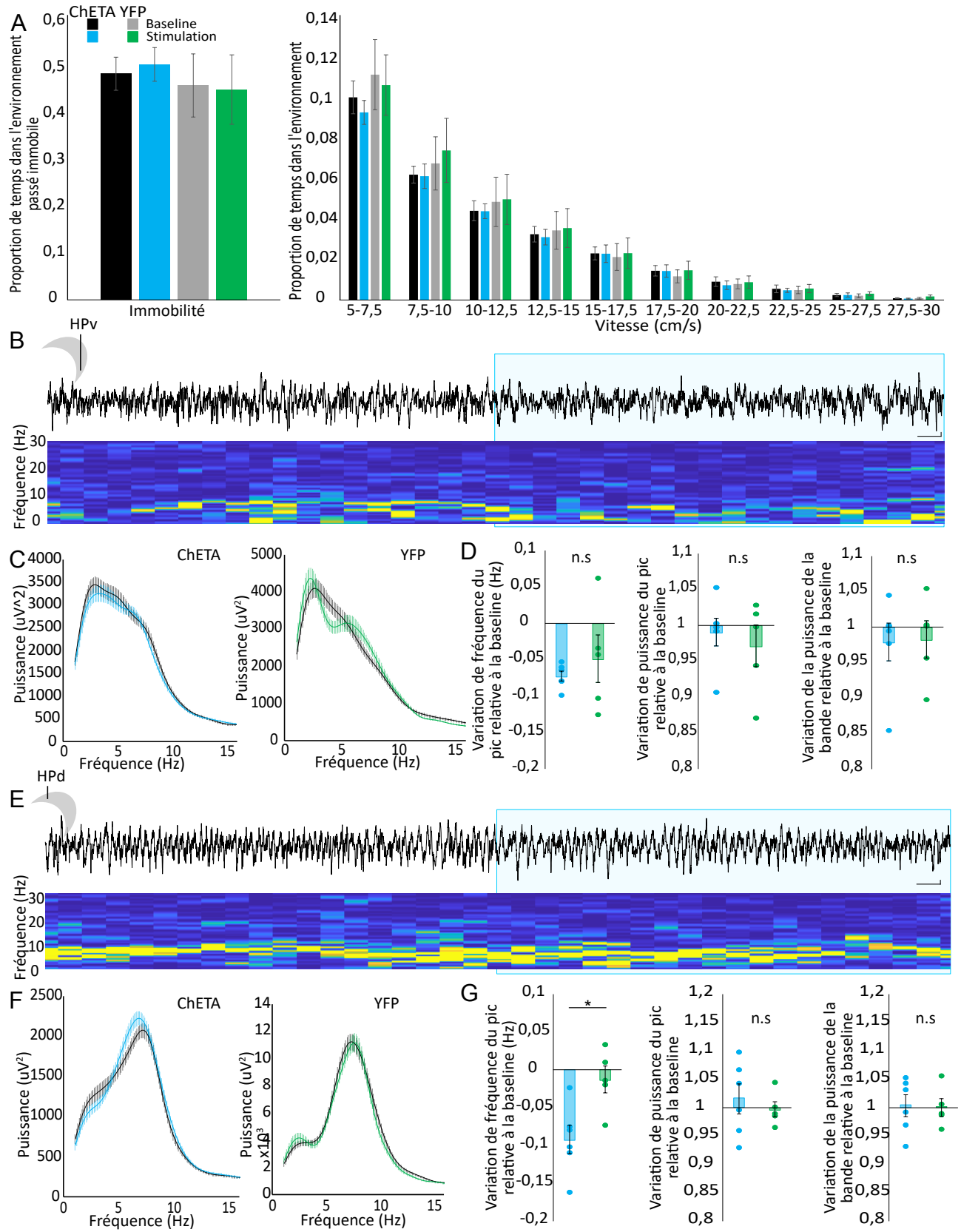


Figure 12. – La stimulation des neurones 5-HT du RM ne semble pas changer la vitesse de locomotion des souris, mais diminue la fréquence des rythmes thêta dans l'HPd pendant l'immobilité dans un environnement nouveau. Proportion du temps dans un environnement nouveau passé immobile (<2,5cm/s), et à différentes vitesses en cm/s. Moyenne + SEM, pour les ChETA (baseline en noir, stimulation en bleu, n=6) et pour les eYFP (baseline en gris, stimulation en vert, n=5). (B) Tracé du rythme LFP de l'HPv pendant l'immobilité, filtré (0,5-300Hz) et spectrogramme, avant et pendant une stimulation représentée par un rectangle bleu. Barres d'échelles = 100  $\mu$ V, 1 seconde. (C) Exemple d'une analyse spectrale dans l'HPv pendant la stimulation pour un animal ChETA (bleu), un animal eYFP (vert), et leurs baseline respectives (noir) pendant l'immobilité. Moyenne + SEM. (D) Quantification de la fréquence, la puissance du pic et la puissance de la bande dans l'HPv pour la stimulation à 20Hz normalisé par rapport à la baseline, pendant l'immobilité. Moyenne + SEM. Test de Mann-Whitney U, correction de comparaisons multiples Holm-Bonferroni. \* :  $p < 0,05$ . (E), (F) et (G) comme (B), (C) et (D), mais pour l'HPd.

Les tracés, les spectrogrammes et les analyses spectrales ne montrent pas d'effet clair dans l'HPv pendant la locomotion (Figure 13A-B). Il est connu qu'existe une relation entre la vitesse de locomotion et les propriétés du rythme thêta de l'HP, soit la fréquence et la puissance. Nous avons donc voulu tester si la stimulation des neurones 5-HT du RM affectait cette relation. La fréquence des rythmes thêta augmente bien en fonction de la vitesse lors de la baseline et la stimulation, pour les eYFP et le ChETA (Figure 13C). Pour quantifier cette relation, nous avons, pour la baseline et la stimulation chez chaque animal, tracé une droite de régression linéaire. La pente et l'ordonnée à l'origine ont été comparées. Cette quantification ne montre pas d'effets significatifs pour la fréquence dans l'HPv (Figure 13D). Nous n'observons pas de relation linéaire entre la vitesse de locomotion et la puissance du rythme thêta dans l'HPv (Figure 13E). La puissance ne semble pas changée par la stimulation des neurones 5-HT du RM (Figure 13F). Dans l'HPd, on semble observer une légère diminution de fréquence dans l'analyse spectrale (Figure 13G-H). La relation linéaire entre la fréquence et la vitesse est présente, mais n'est pas changée significativement par la stimulation des neurones 5-HT du RM (Figure 13I-J). La puissance ne semble pas être affecté par la vitesse ou la stimulation des neurones 5-HT du RM (Figure 13K-L). Ainsi, la stimulation des neurones 5-HT du RM ne semble pas affecter le rythme thêta pendant la locomotion.

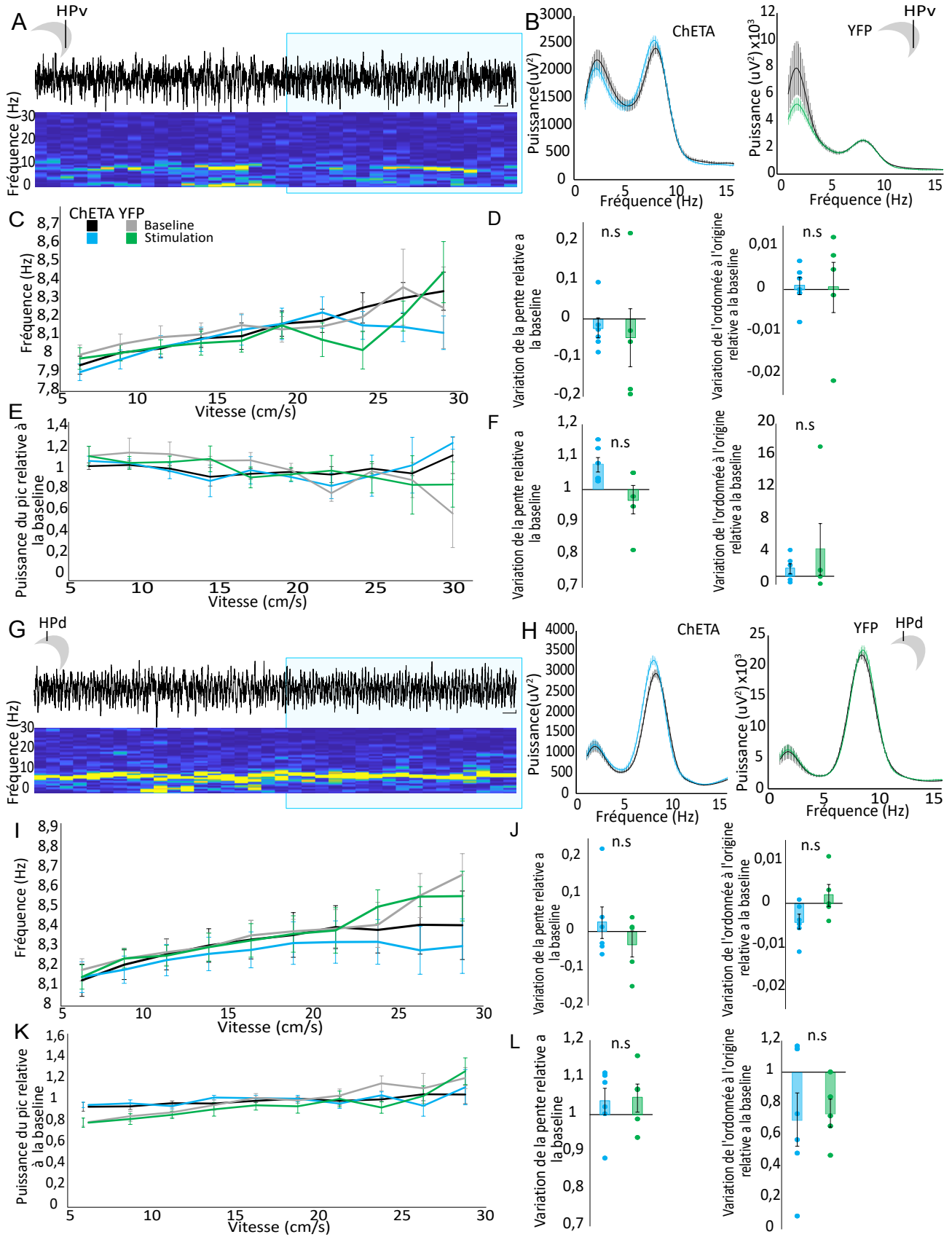


Figure 13. – La stimulation des neurones 5-HT du RM ne semble pas changer la fréquence ou la puissance des rythmes de l'HP pendant la locomotion. (A) Tracé du rythme LFP de l'HPv pendant la locomotion, filtré (0,5-300Hz) et spectrogramme montrant le signal dans l'HPv avant et pendant la stimulation, représentée par un rectangle bleu. Barres d'échelles = 100  $\mu$ V, 1 seconde. (B) Exemple d'une analyse spectrale dans l'HPv pendant la stimulation pour un animal ChETA (bleu), un animal eYFP (vert), et leurs baseline respectives (noir) pendant la locomotion (>5cm/s). Moyenne + SEM. (C) Fréquence du rythme thêta selon la vitesse de locomotion pour les eYFP (baseline en gris, stimulation en vert, n=5) et pour les ChETA (baseline en noir, stimulation en bleu, n=6). Moyenne + SEM. (D) Quantification de la pente et de l'ordonnée à l'origine de la fréquence selon la vitesse, normalisé selon la baseline, pour les animaux ChETA (bleu) et les animaux eYFP (vert), Moyenne + SEM. (E) Puissance du rythme thêta selon la vitesse de locomotion pour les animaux eYFP (baseline en gris, stimulation en vert, n=5) et pour les animaux ChETA (baseline en noir, stimulation en bleu, n=6). Moyenne + SEM. (F) Quantification de la pente et de l'ordonnée à l'origine de la relation puissance-vitesse, normalisé selon la baseline, pour les ChETA (bleu) et les eYFP (vert), Moyenne + SEM. (G), (H), (I), (J), (K) et (L), comme (A), (B), (C), (D), (E) et (F), mais pour l'HPd.

### 3.2 Activations des neurones sérotoninergiques projetant à l'HP ou des neurones sérotoninergiques projetant à l'HPv

Le RM est un noyau avec des projections vastes à travers le cerveau. Pour préciser nos résultats, nous avons ciblé certaines projections du RM à l'aide de virus exprimés de façon rétrograde. L'utilisation combinée de souris SERT-cre et de virus qui permettent l'expression de façon Cre-dépendante de l'opsine ChETA a été utilisé pour cibler les neurones 5-HT. Nous avons fait deux différentes injections pour isoler certaines projections du RM. Nous avons utilisé un virus rétrograde, injecté dans l'HPv pour cibler spécifiquement les neurones 5-HT projetant à l'HPv, puis dans l'HP complet, pour cibler tous les neurones 5-HT projetant à l'HP (Figure 14A). Les injections ciblant l'HPv ont été validés par le travail de maîtrise de Félix Perreault, qui a fait une caractérisation complète de la location des neurones projetant à l'HPv, et de la spécificité du virus. La caractérisation anatomique des neurones projetant à l'HP n'a pas été faite, mais la spécificité du virus est identique, le virus injecté étant le même. Comme attendu, la majorité des neurones exprimant l'opsine ChETA, couplée à la eYFP après injection virale sont situés dans le RM (Figure 14A). La vérification anatomique des animaux implantés montre que certaines fibres optiques, particulièrement les souris injectées dans l'HPv, sont très rostrales dans le raphé (Figure 14B). Les animaux ont été conservés comme données préliminaires, même si elles seront à compléter et consolider avec plus de souris et des placements de fibre optimisés. Les électrodes

utilisées sont toutes dans de l'HPd (Figure 14C) et de l'HPv (Figure 14D). La variabilité de placement des électrodes est aussi plus grande ici, étant donné que ces résultats ont été enregistrés au tout début de ma maîtrise. Malgré cela, les résultats enregistrés sont intéressants et semblent cohérent avec les autres groupes, et donc ont été inclus.

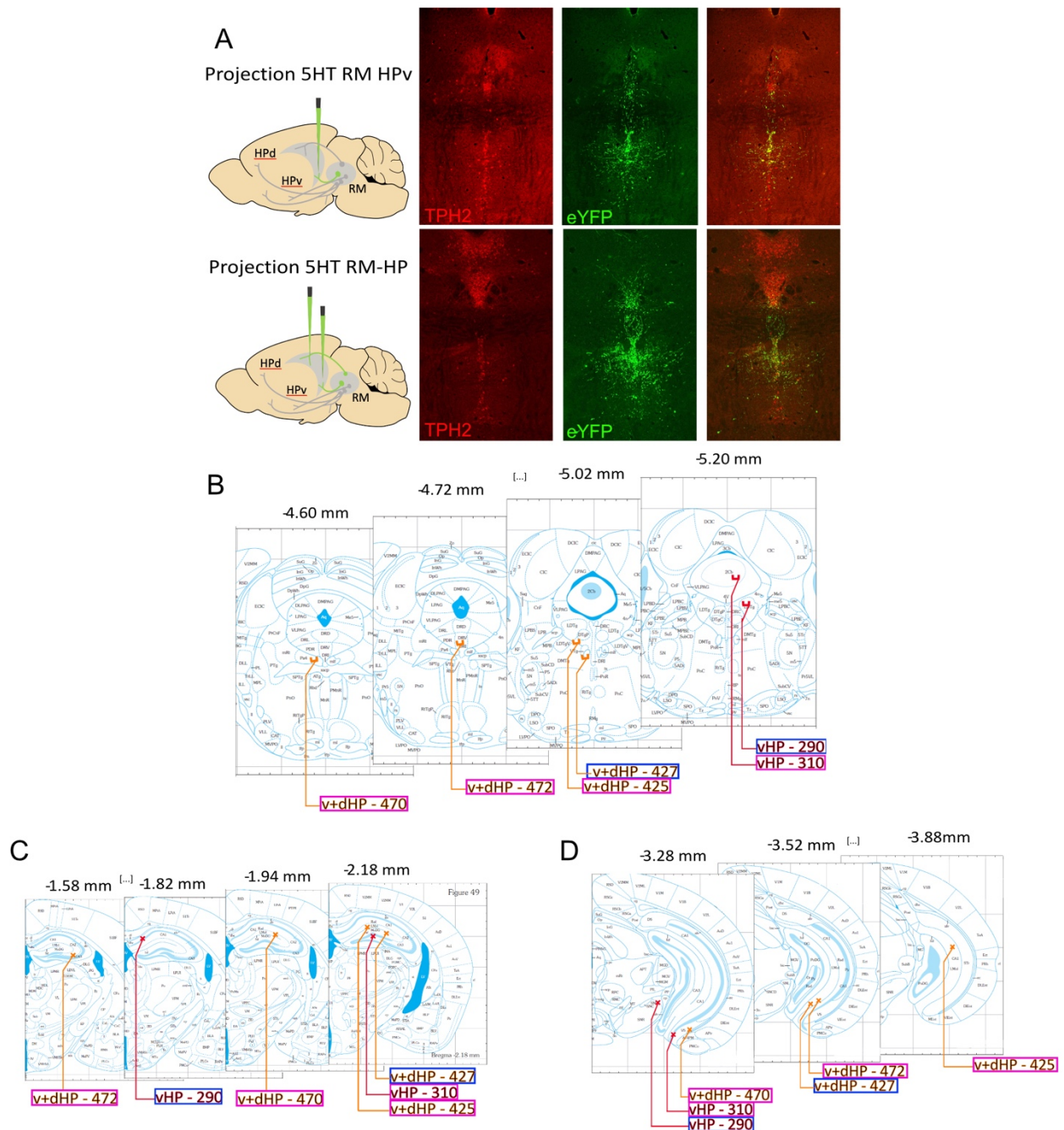


Figure 14. – Expression du virus lors de l'injection spécifique au neurones 5-HT du RM projetant à l'HP ou à l'HPv, et vérification des implantations. Schéma des injections, et exemples d'expressions

de virus (eYFP), comparé aux neurones 5-HT du raphé (Tph2), révélés par immunohistochimie. (B) Sites d'implantations de toutes les fibres optiques pour les souris exprimant l'opsine dans les neurones 5-HT du RM projetant à l'HP (orange, n=4) et projetant à l'HPv (rouge, n=2). Les souris femelles sont encadrées en rose, et les mâles en bleu foncé. (C) Sites d'implantations des électrodes dans l'HPd, et (D) dans l'HPv. Les schémas sont adaptées de Paxinos and Franklin (2019).

### 3.2.1 Sommeil

Nous avons premièrement activé les neurones pendant le sommeil paradoxal. Dans les animaux exprimant l'opsine ChETA dans les neurones 5-HT projetant à l'HPv, les tracés et le spectrogramme suggère une diminution de fréquence des rythmes de l'HPv. (Figure 15B-C, n=2). La quantification semble montrer une diminution de la fréquence pendant la stimulation, atteignant  $-0,77\text{Hz} \pm 0,13\text{Hz}$  pendant la stimulation à 10Hz et 20Hz (Figure 15D). La simulation semble aussi montrer une augmentation de puissance, particulièrement à 20Hz, atteignant  $37,2\% \pm 10,7\%$  (Figure 15D). Les résultats sont assez similaires dans l'HPd, soit une baisse de la fréquence du pic atteignant  $-0,79\text{Hz} \pm 0,24\text{Hz}$  lors de la stimulation à 20Hz, ainsi qu'une augmentation de puissance, cette fois-ci plus légère que dans l'HPv (Figure 15E-F-G). Pour les souris exprimant l'opsine dans les neurones 5-HT projetant à l'HP complet, on observe aussi une diminution de fréquence plus réduite, mais maintenue à travers les fréquences de stimulation dans l'HPv (Figure 15I-J-K). La puissance de rythmes de l'HPv ne semble pas être modifiée (Figure 15K). Dans l'HPd, on peut aussi observer une diminution de la fréquence, mais pas de changement de la puissance (Figure 15L-M-N).



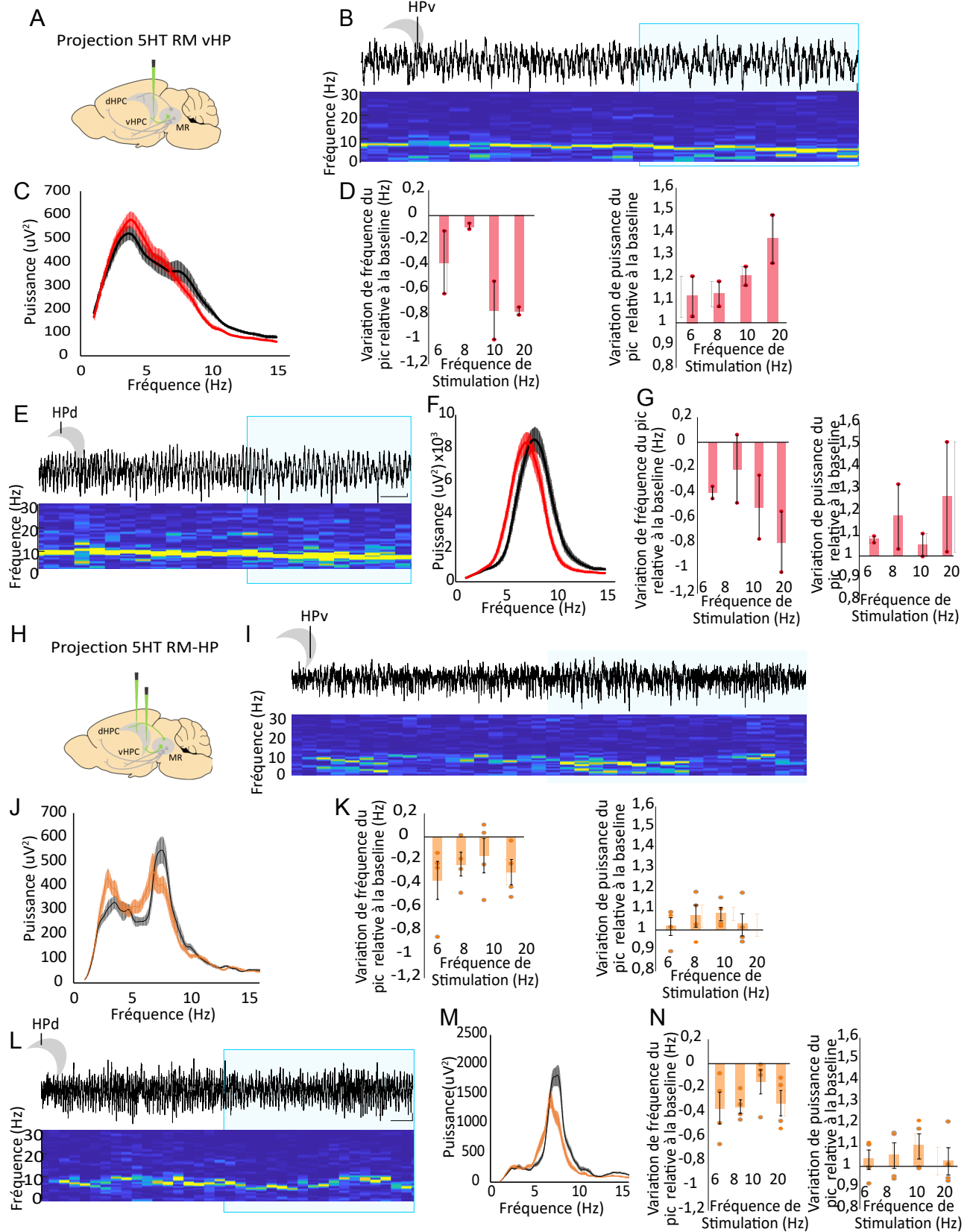


Figure 15. – Figure 13. L'activation des neurones 5-HT du RM projetant à l'HP, et des neurones 5-HT du RM projetant à l'HPv semble diminuer la fréquence du rythme thêta dans l'HPv et dans l'HPd pendant le sommeil paradoxal. Schéma de l'injection visant les neurones 5-HT du RM projetant à l'HPv. (B) Tracé du rythme LFP de l'HPv pendant le sommeil paradoxal, filtré (0,5-300Hz) et spectrogramme associé, avant et pendant la stimulation, représentée par un rectangle bleu. Barres d'échelles = 100  $\mu$ V, 1 seconde. (C) Exemple d'une analyse spectrale dans l'HPv pendant la stimulation pour un animal ChETA (rouge) et sa baseline (noir). Moyenne + SEM. (D) Quantification de la fréquence et de la puissance du rythme de l'HPv, normalisé par rapport à la baseline, pour les quatre fréquences de stimulation. Moyenne + SEM, n=2. (E), (F) et (G), comme (B), (C) et (D) pour les enregistrements dans l'HPd. (H), (I), (J), (K), (L), (M) et (N), comme (A), (B), (C), (D), (E), (F) et (G), mais pour l'injection visant les neurones 5-HT du RM projetant à l'HP complet (orange, n=4).

Nous avons ensuite activé les neurones pendant le sommeil lent. Dans les souris exprimant l'opsine dans les neurones 5-HT projetant à l'HPv, l'activation ne semble pas affecter le rythme dans l'HPv pendant le sommeil lent (Figure 16A-B-C-D). Dans l'HPd, le tracé, le spectrogramme et l'analyse spectrale semblent montrer un résultat similaire aux souris injectées dans le RM, soit une diminution de l'aire sous la courbe, sans affecter la puissance du pic (Figure 16E-F). La quantification de la puissance de la bande n'a pas été faite. La stimulation semble aussi diminuer la fréquence du rythme dans l'HPd pendant le sommeil lent, mais n'affecte pas la puissance du pic (Figure 16G). Chez les souris exprimant l'opsine dans tous les neurones 5-HT projetant à l'HP, l'activation des neurones ne cause pas de changements importants dans l'HPv, à part une diminution légère de puissance (Figure 16I-J). Dans l'HPd, on peut aussi observer une diminution de la puissance de la bande dans le tracé, le spectrogramme et l'analyse spectrale (Figure 16L-M). La quantification montre une diminution de fréquence, mais pas de changement de la puissance du pic (Figure 16N). Il est à noter qu'aucune statistique n'a été faite sur les groupes de souris injectées dans l'HP à cause du nombre trop petit d'animaux, ainsi que du manque de souris contrôles spécifique. Les observations faites sur ces groupes sont plutôt exploratoires et seraient à confirmer sur des cohortes plus complètes et avec des tests statistiques appropriés.

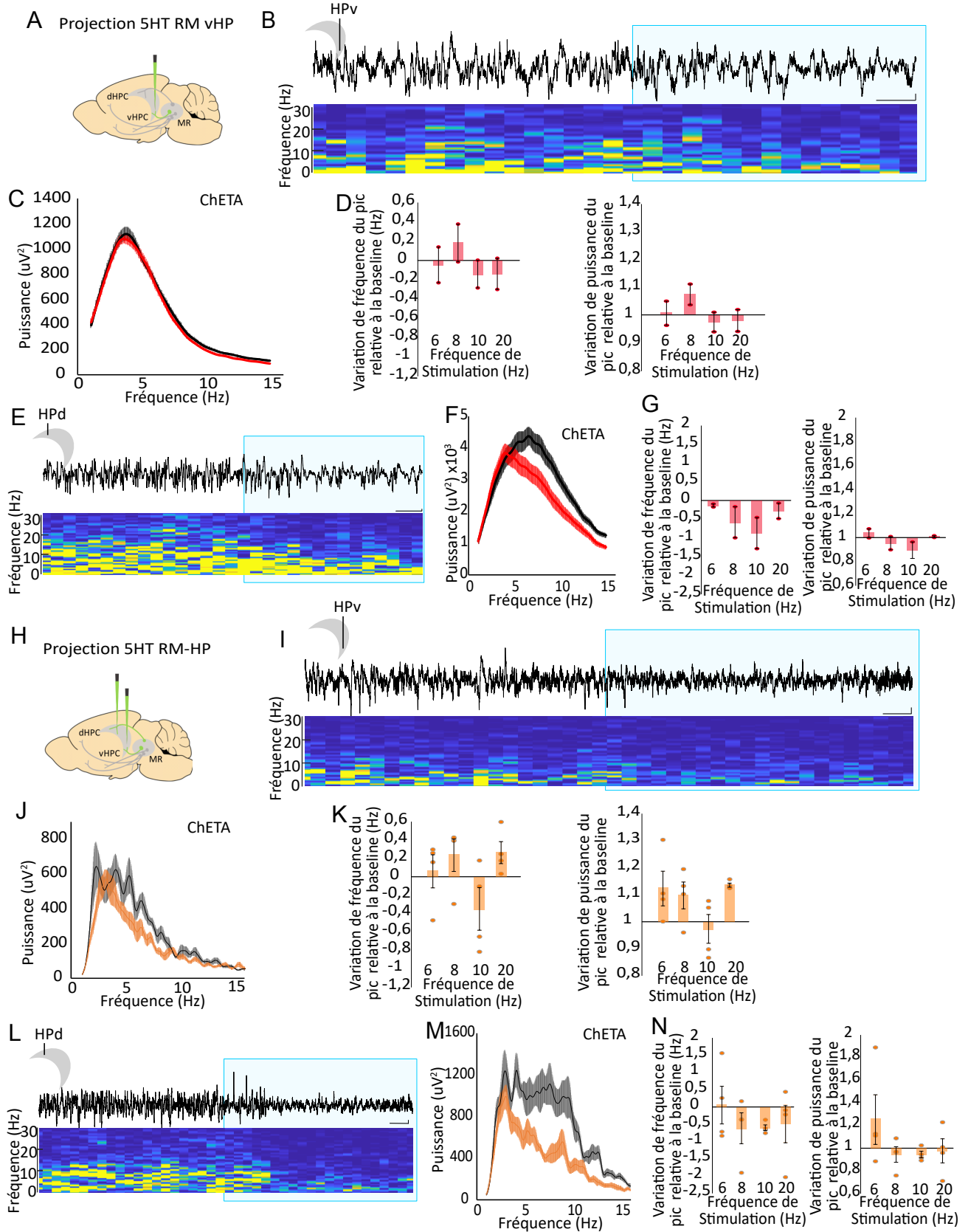


Figure 16. – L'activation des neurones 5-HT du RM projetant à l'HP, et des neurones 5-HT du RM projetant à l'HPv semble diminuer la fréquence du rythme thêta dans l'HPv et dans l'HPd pendant le sommeil lent. (A) Schéma de l'injection visant les neurones 5-HT du RM projetant à l'HPv. (B) Tracé du rythme LFP de l'HPv pendant le sommeil lent, filtré (0,5-300Hz) et spectrogramme montrant le signal dans l'HPv avant et pendant la stimulation, représentée par un rectangle bleu, pendant le sommeil lent. Barres d'échelle = 100  $\mu$ V, 1 seconde. (C) Exemple d'une analyse spectrale dans l'HPv pendant la stimulation pour un animal ChETA (rouge) et sa baseline (noir). Moyenne + SEM. (D) Quantification de la fréquence et de la puissance du rythme de l'HPv, normalisé par rapport à la baseline, pour les quatre fréquences de stimulation. Moyenne + SEM, n=2. (E), (F) et (G), comme (B), (C) et (D) pour les enregistrements dans l'HPd. (H), (I), (J), (K), (L), (M) et (N), comme (A), (B), (C), (D), (E), (F) et (G), mais pour l'injection visant les neurones 5-HT du RM projetant à l'HP complet (orange, n=2).

## 4. Discussion

Nous avons voulu clarifier l'effet des neurones 5-HT du RM sur les rythmes de l'HP pendant le sommeil ainsi que pendant la locomotion et l'exploration d'un environnement nouveau. Nous avons observé une diminution de la fréquence des rythmes de l'HP lors de l'activation des neurones 5-HT du RM lors du sommeil lent, du sommeil paradoxal, ainsi que lors de l'immobilité dans un environnement nouveau. Lors de l'activation des neurones 5-HT du RM pendant le sommeil lent, nous avons aussi observé une augmentation de la puissance du pic dans l'HPv, ainsi qu'une diminution de la puissance de la bande dans l'HPd. Nous ne semblons pas observer d'effet de l'activation des neurones 5-HT du RM pendant la locomotion. Pour tenter de comprendre si cet effet vient des projections directes à l'HP, nous avons isolé les projections des neurones 5-HT à l'HPv, ainsi que les projections des neurones 5-HT à l'HP du reste des projections 5-HT. Nos résultats préliminaires montrent que l'activation de ces deux voies de projection donne des résultats qui semblent similaires à l'activation des neurones 5-HT du RM.

### 4.1 Expression de l'opsine ChETA lors de l'injection dans le RM

Il faut noter qu'une relativement faible proportion des neurones 5-HT du RM, soit 29,4% expriment l'opsine ChETA (Figure 6G), alors que l'injection aurait théoriquement pu atteindre l'ensemble des neurones 5-HT du RM. Cette expression faible semble aussi être observée dans l'HP, où la proportion de fibres 5-HT exprimant l'opsine est assez faible. On sait pourtant que la majorité des fibres 5-HT de l'HP devrait provenir du RM (Muzerelle et al., 2016). Malgré le taux d'expression relativement faible de l'opsine, nous observons des effets significatifs de la stimulation optogénétique sur les rythmes de l'HP. Deux hypothèses émergent de ce résultat : nous avons activé suffisamment de neurones 5-HT du RM pour observer un effet, qui pourrait être augmenté par le ciblage d'un plus grand nombre de neurones 5-HT. Il est aussi possible que nous avons ciblé particulièrement une sous-population de neurones 5-HT qui joue un rôle clé dans la modulation des rythmes de l'HP, et qu'activer plus de neurones 5-HT ne potentialiserait

pas l'effet observé. Affiner les paramètres de notre injection virale pour cibler une plus large population de neurones 5-HT du RM permettrait de trancher entre ces deux hypothèses.

Il est aussi important de mentionner que nous observons une expression non négligeable de l'opsine ChETA de  $27,5\% \pm 6,3\%$  dans le noyau interfasciculaire du raphé dorsal (Figure 6G). Les divisions des sous-noyaux du raphé ont été faites en observant leur distribution anatomique. Depuis, des études morphologiques et développementales semblent montrer que les neurones du noyau interfasciculaire du raphé dorsal seraient en fait plus proches des neurones du RM que de n'importe quel autre type de neurones dans le raphé dorsal (Jacobs and Azmitia, 1992b; Hale and Lowry, 2011). Par ailleurs, le noyau interfasciculaire du raphé dorsal rassemble de nombreux neurones 5-HT qui projettent à l'HP (Figure 14, et données internes du laboratoire). Le noyau du B9 projette très largement à l'HPv, il contient un nombre de neurones très important et est très peu étudié dans la littérature, particulièrement à cause de sa position anatomique, plus latérale et éloigné des autres (Muller and Cunningham, 2020). Une quantification extensive de la localisation des neurones qui projettent à l'HPv a été fait par Félix Perreault, et ils sont principalement retrouvés dans le RM, le B9 et le DRI. La participation de ces neurones à la modulation des rythmes de l'HP lors de la photostimulation de l'opsine ChETA est donc une possibilité à prendre en compte. Activer plus précisément l'une ou l'autre de ces sous-populations neuronales permettra d'affiner la caractérisation fonctionnelle de la voie raphé – HP.

## 4.2 Positionnement de fibres optiques dans le RM

Après validation anatomique des implantations réalisées sur les souris expérimentales, les fibres optiques peuvent sembler dispersées. Toutefois, une expérience du laboratoire publiée dans le mémoire de Félix Perreault a été faite pour illustrer l'étendue de l'effet activateur de la lumière avec les mêmes positions de fibres que celles observées ici. Les expériences ont été faites sur des souris exprimant le contrôle eYFP ou l'opsine ChETA dans les neurones 5-HT projetant à l'HPv. Les souris ont été photostimulées puis sacrifiées 70 minutes plus tard pour permettre l'expression de la protéine *c-fos*, un *immediate early gene* marqueur de l'activité récente des neurones. Un triple marquage immunohistochimique a ensuite été fait pour révéler la présence de *c-fos*, de la Tph2 dans les neurones 5-HT et de la eYFP, seule ou couplée à l'opsine ChETA. Les souris ChETA,

comparées aux souris eYFP, avaient une expression de *c-fos* significativement augmentée dans le RM, mais aussi le raphé dorsal, le noyau interfasciculaire du raphé dorsal, et le noyau B9, et cela pour chaque fibre optique, situé entre 4,36 et 5,02 mm postérieurs de bregma. Ce résultat montre que nos conditions de photostimulation sont suffisantes pour activer largement les neurones 5-HT du raphé, y compris ceux éloignés de la fibre optique.

### 4.3 Effet du mutant SERT-Cre

Le modèle de souris utilisé est un mutant transgénique SERT-Cre. Ainsi, le gène codant pour la CRE est inséré dans un chromosome artificiel bactérien (ou BAC), après le promoteur du gène SERT dès le début de premier exon. Ce gène est inséré aléatoirement dans le génome, dans notre cas dans la partie distale du chromosome 18. Ainsi, aucune atteinte n'est posé au deux copies endogènes de la SERT, en contraste aux mutant *knock-in*. Dans ceux-ci, le gène codant pour Cre est inséré dans une copie endogène du gène SERT, résultant en une disruption de celui-ci. Bien qu'un allèle ne soit pas complètement désactivé dans notre modèle, une baisse de disponibilité des facteurs de transcription pour le promoteur SERT ne peut pas être exclue. La quantité de SERT pourrait donc être réduite, résultant en une baisse de recapture de la 5-HT extracellulaire et une augmentation de sa concentration à la synapse. Les variations génétiques de SERT ont un impact sur certains comportements, comme une réduction des comportements anxieux lors de l'expression augmenté de SERT dans le raphé (Jennings et al., 2006), et donc un variation potentielle de SERT pourrait affecter certains de nos résultats. La quantité de sérotonine ou de SERT produite chez le mutant SERT-Cre n'a pas été évalué, mais il serait intéressant d'estimer celle-ci, par exemple par immunoradiographie, ou plus directement par microdialyse (Amilhon et al., 2010). Cependant, il serait possible que la quantité de SERT varie à travers les lignées des souris selon la génétique, comme il est cas pour d'autres protéines exprimées dans le raphé comme VGLUT3 (Sakae et al., 2019). Ainsi, malgré l'utilisation d'une ligné mutante, l'interprétation de mes données reste pertinente, puisque les conditions contrôles permettent de comparer les résultats dans deux groupes de souris ayant la même quantité de SERT. De plus, chaque résultat est comparé à la baseline dans la même souris. Ainsi, même si les niveaux de 5-HT étaient altéré, nos résultats montrent tout de même une augmentation des niveau de 5-HT par rapport à la baseline.

#### **4.4 La stimulation des neurones 5-HT du RM cause une diminution de la fréquence du pic lors du sommeil lent, du sommeil paradoxal, et de l'immobilité dans un environnement nouveau**

L'effet le plus robuste observé dans l'ensemble de nos expériences est la diminution de la fréquence du pic causée par la stimulation des neurones 5-HT du RM, qui est observable lors du sommeil lent, du sommeil paradoxal, et de l'immobilité dans un environnement nouveau. Cet effet est particulièrement intéressant parce qu'il existe un lien entre le comportement et la fréquence du pic de thêta. Premièrement, il est connu que modifier la fréquence du pic des rythmes thêta pendant une tâche affecte l'apprentissage (M'Harzi et al., 1987; Whishaw and Tomie, 1997; Olvera-Cortés et al., 2004; Gutiérrez-Guzmán et al., 2012; Quirk et al., 2021). Par exemple, Quirk et al ont démontré une diminution de l'apprentissage d'une tâche lors de l'augmentation du pic de la fréquence de thêta à 10Hz. Deuxièmement, les anxiolytiques connus, tel que le diazépam, le triazolam ou le buspirone diminuent la fréquence du pic de thêta, au contraire d'autres médicaments comme les antidouleurs ou les antipsychotiques (Engin et al., 2008; Yeung et al., 2012; McNaughton et al., 2013; Yeung et al., 2013). Finalement, l'activation de la projection sérotoninergique à l'HP, qui dans mes données semble diminuer la fréquence des rythmes thêta, modifie les comportements anxieux selon des données venant du laboratoire, publiées dans le mémoire de Félix Perrault, ainsi que dans des données venant d'ailleurs (Ohmura et al., 2019, 2020). Il est important de noter que dans la littérature, les anxiolytiques sont associé avec une diminution de la fréquence de thêta (Ohmura et al., 2020). À l'inverse, nous observons un effet anxiogène, associé à une diminution de la fréquence de thêta. Ainsi, la fréquence du rythme thêta semble être corrélée à une expression anormale de l'anxiété dans toutes les données.

Il est intéressant de noter que même si en sommeil paradoxal comme en sommeil lent la diminution du pic de la fréquence par la stimulation optogénétique est très similaire, la cinétique de ces diminutions est très différente. Alors qu'en sommeil paradoxal, la diminution maximale de fréquence est atteinte en deux secondes (Figure 8C, 9C), la diminution pendant le sommeil lent est beaucoup plus graduelle, prenant plus de cinq secondes à atteindre le plateau, et le même



temps pour revenir à la normale (Figure 10C, 11C). Cette cinétique complètement différente porte à croire que l'effet n'est pas produit par le même mécanisme. Il est possible que l'effet sur le sommeil lent soit produit, par exemple, en passant par les noyaux de régulation du sommeil du tronc. L'effet pendant le sommeil paradoxal, lui, pourrait être le résultat d'un mécanisme plus direct, par exemple passant par les projections à l'HP ou au septum médian. Il serait aussi possible que les effets passent par différents sous-types de récepteurs sérotoninergiques. Une variété de récepteurs sérotoninergique existe, incluant des récepteurs ionotropes rapides et des récepteurs métabotropes plus lents. La plupart des récepteurs sérotoninergiques sont aussi exprimés dans l'HP (Berumen et al., 2012). Il serait ainsi possible que les effets viennent, par exemple, des récepteurs ionotropes pour l'effet pendant le sommeil paradoxal, et des récepteurs métabotropes pour l'effet pendant le sommeil lent.

Il est intéressant de noter que les effets sur les rythmes de l'HP en sommeil lent et paradoxal, particulièrement la diminution de la fréquence, sont similaires peu importe la fréquence de stimulation (Figure 8C, 9C, 10C et 11C). Les fréquences de stimulation ont été choisies pour rester dans la fréquence de décharge possible des neurones 5-HT, mais aussi parce que des données en *patch clamp* du laboratoire ont déterminé que l'opsine ChETA utilisée suivait fidèlement la fréquence de stimulation jusqu'à une stimulation de 20Hz. Nous voulions tester des fréquences autour du pic normal du rythme de thêta, soit 6Hz, 8Hz et 10Hz, ainsi qu'une fréquence hors de la bande de thêta, soit 20Hz. Il est possible que l'effet ne soit pas fréquence-dépendant, et qu'une stimulation de 6Hz soit suffisante pour arriver à l'effet maximal. Il est aussi possible que les neurones que nous activons ne suivent pas nécessairement les fréquences de stimulations plus élevées *in vivo*. Des expériences dans le laboratoire sont en cours pour caractériser le patron d'activité des neurones 5-HT *in vivo*, en réponse à la stimulation et spontanée. Il s'agit d'expériences d'*optotagging*, au cours desquelles l'activité de neurones du RM est enregistrée, et les neurones exprimant l'opsine ChETA sont repérés par leur réponse à une stimulation lumineuse. Ainsi nous pourrions d'une part mieux caractériser le patron de décharge des neurones 5-HT en réponse à différentes fréquences de photostimulation, et d'autre part, enregistrer et comparer l'activité intrinsèque des neurones 5-HT du RM et de ceux qui projettent à l'HP, dans chaque état de vigilance.

Finalement, nous observons assez systématiquement dans les enregistrements pendant le sommeil paradoxal dans l'HPv, la présence d'un double pic à l'analyse spectrale, soit dans la bande delta et dans la bande thêta (Figure 8B, 10B). Les tracés illustrent bien l'alternance rapide entre des périodes de rythmes plus lentes et plus rapides (Figure 8A, 10A). La présence de deux pics de fréquence assez distincts dans l'HPv pendant le sommeil paradoxal n'a, à ma connaissance, pas été décrite dans la littérature. C'est entre autres parce que les études électrophysiologiques se concentrent très souvent sur l'HPd, plus accessible anatomiquement. La présence de ces deux bandes de fréquences pourrait sous-tendre différents comportements consolidés dans l'HPv, et il serait extrêmement intéressant d'évaluer l'effet comportemental du déplacement de la fréquence du rythme thêta vers le delta par notre stimulation.

#### **4.5 Effet spécifique au sexe de la modulation des neurones 5-HT du RM**

Des résultats du laboratoire, publiés dans le mémoire de Félix Perreault, montrent que l'activation des neurones 5-HT projetant à l'HPv est anxiogénique, mais sur les femelles uniquement et pas les mâles. De plus, on voit dans mes résultats une diminution de fréquence du rythme thêta assez variable. Il serait donc possible que la différence de comportement entre les sexes observé lors de l'activation des neurones 5-HT projetant à l'HPv soit sous-tendue par une altération des rythmes de l'HP différente. Avec un nombre plus élevé d'animaux, il serait très intéressant de comparer les résultats des groupes de souris mâles par rapport aux femelles, et de voir s'il y a aussi une différence de sexe dans la diminution de la fréquence des rythmes thêta.

#### **4.6 La stimulation des neurones 5-HT du RM pendant le sommeil lent cause une augmentation de puissance de la bande dans l'HPv, et une diminution de la puissance de la bande dans l'HPd**

La stimulation des neurones 5-HT du RM pendant le sommeil lent cause des effets opposés sur la puissance de la bande dans les deux pôles de l'HP. Un projet de caractérisation anatomique des projections 5-HT à l'HPv et l'HPd est en cours d'analyse dans le laboratoire par Fiona Henderson, et des résultats très préliminaires indiquent que certains neurones pourraient projeter seulement

à l'HPv ou à l'HPd. Ainsi, si ces résultats sont confirmés, on pourrait expliquer l'effet opposé dans les deux pôles de l'HP par la présence de voies de projections 5-HT-HP au moins partiellement ségrégués.

Il est connu que le sommeil lent, et plus précisément la synchronisation temporelle des différents rythmes comme les rythmes delta et les *sharp wave ripples* est essentielle pour la consolidation de la mémoire (Maingret et al., 2016; Todorova and Zugaro, 2019). Il a été démontré que l'augmentation de la puissance des oscillations du cortex pendant le sommeil lent, en appliquant des stimulations magnétiques transcrâniennes chez une cohorte d'humains, a amélioré le rappel d'une tâche apprise la veille (Marshall et al., 2006).

La sérotonine a aussi un effet important sur la mémoire. Les souris avec une diminution constitutive de 5-HT, les *Pet1KO*, ont une mémoire de reconnaissance très diminuée, mais celle-ci est rétablie si un précurseur de 5-HT est injecté (Fernandez et al., 2017). L'inhibition des neurones 5-HT du RM par optogénétique diminue le rappel d'un objet précédemment reconnu (Fernandez et al., 2017). À l'inverse, l'activation des projections 5-HT dans l'HP par optogénétique augmente la mémoire spatiale (Teixeira et al., 2018).

Ainsi, l'effet des neurones 5-HT du RM sur la puissance des rythmes delta de l'HP, particulièrement l'augmentation de puissance dans l'HPd pendant le sommeil lent pourrait avoir un effet sur la mémoire.

#### **4.7 La stimulation des neurones 5-HT du RM pendant l'exploration d'un environnement nouveau ne semble pas affecter la vitesse, ou l'activité de l'HP**

Dans la littérature, l'effet de la sérotonine sur la locomotion est discuté, mais certaines études montrent que l'activation du noyau du raphé dorsal ainsi que du RM cause une diminution importante de la locomotion (Balázsfi et al., 2017; Correia et al., 2017; Ren et al., 2018). De plus, la désynchronisation du rythme thêta par une stimulation électrique dans le RM a aussi diminué l'activité motrice dans un labyrinthe ouvert (Bland et al., 2016). Des données internes du laboratoire, aussi publiées dans le mémoire de Félix Perreault, montrent que l'activation des

neurones 5-HT projetant à l'HPv diminue la locomotion dans un environnement nouveau (*open field*). Il est ainsi assez particulier que dans le cas de mes expériences, nous n'avons pas observé d'effet sur la vitesse. Une des possibilités est que le nombre de souris contenues dans mes groupes soit trop bas pour tirer des conclusions sur le comportement. Les différences d'expressions virales pourraient aussi expliquer cette différence; les souris exprimant le virus dans les neurones 5-HT projetant à l'HPv ont une expression dans le B9 beaucoup plus élevée, et dans le RM plus élevée. Il serait donc possible que je n'atteigne pas assez de neurones 5-HT du RM pour voir l'effet sur la locomotion.

La relation entre la puissance de thêta et la locomotion, bien que moins étudiée que celle entre la fréquence et la vitesse, est bien établie (Whishaw and Vanderwolf, 1973; Long et al., 2014). Nous ne semblons pas observer cette relation dans nos données. En revanche, dans la plupart de ces études, les auteurs utilisent des techniques d'enregistrement permettant de viser plus spécifiquement une région ou même une couche de l'HP, comme des *array* d'électrodes, ou des électrodes qui peuvent être descendues progressivement dans le cerveau jusqu'à une couche précise. Ils peuvent donc faire des enregistrements avec des localisations d'électrodes plus constantes, et donc des rythmes avec des puissances beaucoup plus stables et reproductibles. Il est possible que nous n'observions pas de relation entre la puissance de thêta et la locomotion à cause de la variabilité des positionnements d'électrodes dans l'HP.

Les enregistrements pendant la locomotion représentent une difficulté technique particulière. Les animaux portent un *headstage* et sont connectés à deux fils différents, soit une fibre optique pour le laser ainsi qu'un câble attaché au *headstage*. Le mouvement des appareils lors de la locomotion pouvait parfois créer du bruit dans le signal. Bien que nous ayons tenté d'exclure tous les moments contaminés par du bruit, il est possible que l'imprécision additionnelle nous ait empêchés de voir un effet. Ce serait particulièrement probable étant donné que la diminution de fréquence observée lors de l'immobilité est légère, soit de 0,1Hz. Pour les prochains enregistrements, un nombre de souris plus élevé, ou une autre technique permettant de faire de la locomotion en fixant la tête de l'animal comme de la réalité virtuelle pourraient être envisagées pour produire des résultats plus clairs.

#### **4.8 La stimulation des neurones 5-HT projetant à l'HPv ou projetant l'HP semble avoir des effets similaires à la stimulation des neurones 5-HT du RM**

Bien que ces groupes soient exploratoires, il est particulièrement intéressant que les groupes exprimant l'opsine seulement dans les neurones 5-HT projetant à l'HP, ou projetant à l'HPv semblent récapituler certains des résultats majeurs des souris injectées dans tous les neurones 5-HT du RM, soit la diminution de fréquence pendant le sommeil paradoxal, et la diminution de l'aire sous la courbe pendant le sommeil lent. Ces groupes indiquent la possibilité d'isoler les effets selon la région de projection, et de préciser notre compréhension de l'effet des neurones 5-HT du RM sur l'HP.

## **5. Perspectives**

### **5.1 Découverte des mécanismes**

L'activation des neurones 5-HT du RM a des effets multiples sur les rythmes de l'HP qui pourraient provenir de mécanismes ou de régions de projections différentes. L'amplitude de la diminution de fréquence varie beaucoup entre le sommeil et l'éveil, et la cinétique de la diminution est très différente entre le sommeil lent et le sommeil paradoxal. De plus, les effets sur la puissance dans l'HPd et dans l'HPv pendant le sommeil lent sont opposés. Ainsi, nous observons plusieurs effets qui semblent venir de mécanismes différents. Il sera pertinent d'évaluer de quelles régions de projections les effets proviennent. Une approche d'injection rétrograde pourra être utilisée en isolant certaines régions de projections ciblées, par exemple le septum médian, l'HPd ou le noyau supramamillaire.

### **5.2 Inhibition**

L'activation des neurones 5-HT permet d'obtenir des effets très intéressants pendant le sommeil et l'exploration, qui serait bien complémentée par des études d'inhibition. Ces études nous permettraient d'évaluer si les effets sont inversés lors de l'inhibition, par exemple si l'inhibition des neurones 5-HT du RM cause une augmentation de fréquence. Ces études pourraient se faire en utilisant l'opsine inhibitrice Arch, une pompe à proton hyperpolarisant les neurones lorsqu'activé par une lumière verte. Nous pourrions répéter les expériences de sommeil et de locomotion, en inhibant les neurones 5-HT du RM, puis en isolant les régions de projections.

### **5.3 Comportement**

Il a été démontré que les rythmes delta et thêta sont corrélés à plusieurs comportements et processus cognitifs, tels que la mémoire et l'anxiété. La littérature, et les travaux de notre laboratoire démontrent l'effet de l'activation ou de l'inhibition des neurones 5-HT projetant à l'HPv sur l'anxiété ou l'effet de la 5-HT sur la mémoire. Il serait intéressant d'étudier le lien entre les altérations des propriétés du LFP et les comportements anxieux lors des manipulations des neurones 5-HT. Pour tester ce lien lors de l'anxiété, une variété de tests peuvent être utilisés,

donc le test d'allées successives, le test en croix surélevée ou le test d'enfouissement de billes. Les tests d'allées successives et en croix surélevée mesurent l'exploration de diverses zones d'un labyrinthe, dont certaines considérées comme aversives et d'autres plus sécuritaires. L'activation optogénétique des neurones serait considérée comme anxiolytique si l'animal explore plus les zones aversives, et comme anxiogène s'il explore plus les zones sécuritaires. Le test d'enfouissement de billes se base sur un comportement considéré comme anxieux, soit que les animaux dans un environnement nouveau auront tendance à enfouir les billes dans leurs litières. Une activation anxiolytique diminuerait le nombre de billes enfouies, et une activation optogénétique anxiogène augmenterait le nombre de billes enfouies. Pour la mémoire, plusieurs protocoles existent aussi, donc des tests de reconnaissance de nouveaux objets, un labyrinthe à bras radiaux, ou un labyrinthe d'eau de Morris. Le test de reconnaissance d'objet habitue les animaux à un objet, puis plus tard, les expose à l'objet déjà connu et un nouvel objet. La proportion du temps passé à observer le nouvel objet par rapport au connu serait indicative de leur rappel. Le labyrinthe à bras radiaux peut permettre plusieurs tests, dont le rappel de certains bras récompensés et d'autres punis. La proportion d'erreurs est indicative du rappel de la tâche. Le labyrinthe d'eau de Morris est un test où la souris doit se rappeler du positionnement d'une plateforme dans une piscine remplie d'eau opaque. La latence à retrouver la plateforme indique le rappel de la tâche. Lors de tous ces tests, des données électrophysiologiques pourraient être recueillies pour corrélérer les changements de rythme thêta et les altérations de comportement.

## 6. Conclusion

En conclusion, les travaux de cette maîtrise auront permis d'approfondir la compréhension de la modulation des rythmes de l'HP par les neurones sérotoninergiques du raphé. Les résultats démontrent que l'activation des neurones 5-HT du RM diminue la fréquence des rythmes de l'HP pendant le sommeil lent, le sommeil paradoxal, et l'immobilité dans un environnement nouveau. L'activation des neurones 5-HT du RM pendant le sommeil lent augmente la puissance du pic dans l'HPd, et diminue la puissance de la bande pendant le sommeil dans l'HPv. L'activation des neurones 5-HT du RM pendant le sommeil REM cause aussi une augmentation de puissance de la bande des rythmes de l'HPv, et une augmentation de puissance de la bande des rythmes delta de l'HPd. L'activation des neurones 5-HT projetant à l'HP semble avoir des effets similaires à l'activation de tous les neurones 5-HT du RM. De futures expériences permettront de dissocier ces effets et d'établir les mécanismes permettant ces modulations. De plus, elles permettront aussi d'évaluer les effets comportementaux, plus particulièrement sur la mémoire et sur l'anxiété, des changements des rythmes de l'HP.



## Références bibliographiques

- Abela AR, Browne CJ, Sargin D, Prevot TD, Ji XD, Li Z, Lambe EK, Fletcher PJ (2020) Median raphe serotonin neurons promote anxiety-like behavior via inputs to the dorsal hippocampus. *Neuropharmacology* 168:107985.
- Adhikari A, Topiwala MA, Gordon JA (2010) Synchronized activity between the ventral hippocampus and the medial prefrontal cortex during anxiety. *Neuron* 65:257-269.
- Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P (2007) The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res* 163:3-22.
- Amilhon B, Huh CY, Manseau F, Ducharme G, Nichol H, Adamantidis A, Williams S (2015) Parvalbumin Interneurons of Hippocampus Tune Population Activity at Theta Frequency. *Neuron* 86:1277-1289.
- Amilhon B, Lepicard È, Renoir T, Mongeau R, Popa D, Poirel O, Miot S, Gras C, Gardier AM, Gallego J, Hamon M, Lanfumey L, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S (2010) VGLUT3 (Vesicular Glutamate Transporter Type 3) Contribution to the Regulation of Serotonergic Transmission and Anxiety. *The Journal of Neuroscience* 30:2198.
- Andersen P, Bliss TV, Skrede KK (1971) Lamellar organization of hippocampal pathways. *Exp Brain Res* 13:222-238.
- Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J (2006) *The hippocampus book*: Oxford university press.
- Assaf SY, Miller JJ (1978) The role of a raphe serotonin system in the control of septal unit activity and hippocampal desynchronization. *Neuroscience* 3:539-550.
- Baker KG, Halliday GM, Hornung JP, Geffen LB, Cotton RG, Törk I (1991) Distribution, morphology and number of monoamine-synthesizing and substance P-containing neurons in the human dorsal raphe nucleus. *Neuroscience* 42:757-775.
- Balázsfi DG, Zelena D, Farkas L, Demeter K, Barna I, Cserép C, Takács VT, Nyíri G, Göloncsér F, Sperlág B (2017) Median raphe region stimulation alone generates remote, but not recent fear memory traces. *PLoS One* 12:e0181264.

- Bannerman DM, Rawlins JN, McHugh SB, Deacon RM, Yee BK, Bast T, Zhang WN, Pothuizen HH, Feldon J (2004) Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 28:273-283.
- Barth AM, Domonkos A, Fernandez-Ruiz A, Freund TF, Varga V (2018) Hippocampal Network Dynamics during Rearing Episodes. *Cell reports* 23:1706-1715.
- Beck SG, Pan YZ, Akanwa AC, Kirby LG (2004) Median and dorsal raphe neurons are not electrophysiologically identical. *J Neurophysiol* 91:994-1005.
- Benchenane K, Peyrache A, Khamassi M, Tierney PL, Gioanni Y, Battaglia FP, Wiener SI (2010) Coherent theta oscillations and reorganization of spike timing in the hippocampal-prefrontal network upon learning. *Neuron* 66:921-936.
- Bendotti C, Samanin R (1986) 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT) elicits eating in free-feeding rats by acting on central serotonin neurons. *Eur J Pharmacol* 121:147-150.
- Berger M, Gray JA, Roth BL (2009) The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med* 60:355-366.
- Berndt A, Schoenenberger P, Mattis J, Tye KM, Deisseroth K, Hegemann P, Oertner TG (2011) High-efficiency channelrhodopsins for fast neuronal stimulation at low light levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:7595-7600.
- Berumen LC, Rodríguez A, Miledi R, García-Alcocer G (2012) Serotonin Receptors in Hippocampus. *The Scientific World Journal* 2012:823493.
- Blanchard DC, Blanchard RJ, Lee EMC, Fukunaga KK (1977) MOVEMENT ARREST AND HIPPOCAMPUS. *Physiological Psychology* 5:331-335.
- Bland BH, Bland CE, MacIver MB (2016) Median raphe stimulation-induced motor inhibition concurrent with suppression of type 1 and type 2 hippocampal theta. *Hippocampus* 26:289-300.
- Bland BH, Oddie SD, Colom LV, Vertes RP (1994) Extrinsic modulation of medial septal cell discharges by the ascending brainstem hippocampal synchronizing pathway. *Hippocampus* 4:649-660.
- Boyce R, Glasgow SD, Williams S, Adamantidis A (2016) Causal evidence for the role of REM sleep theta rhythm in contextual memory consolidation. *Science* 352:812-816.

Britt Jonathan P, Benaliouad F, McDevitt Ross A, Stuber Garret D, Wise Roy A, Bonci A (2012) Synaptic and Behavioral Profile of Multiple Glutamatergic Inputs to the Nucleus Accumbens. *Neuron* 76:790-803.

Buchanan GF, Richerson GB (2010) Central serotonin neurons are required for arousal to CO<sub>2</sub>. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:16354-16359.

Buzsáki G, Anastassiou CA, Koch C (2012) The origin of extracellular fields and currents--EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nat Rev Neurosci* 13:407-420.

Buzsáki G (2002) Theta Oscillations in the Hippocampus. *Neuron* 33:325-340.

Capocchi G, Zampolini M, Larson J (1992) Theta burst stimulation is optimal for induction of LTP at both apical and basal dendritic synapses on hippocampal CA1 neurons. *Brain Res* 591:332-336.

Cenquizca LA, Swanson LW (2007) Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Res Rev* 56:1-26.

Cho JR, Chen X, Kahan A, Robinson JE, Wagenaar DA, Gradinaru V (2021) Dorsal Raphe Dopamine Neurons Signal Motivational Salience Dependent on Internal State, Expectation, and Behavioral Context. *The Journal of Neuroscience* 41:2645.

Cho JR, Treweek JB, Robinson JE, Xiao C, Bremner LR, Greenbaum A, Gradinaru V (2017) Dorsal Raphe Dopamine Neurons Modulate Arousal and Promote Wakefulness by Salient Stimuli. *Neuron* 94:1205-1219.e1208.

Cobb SR, Buhl EH, Halasy K, Paulsen O, Somogyi P (1995) Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature* 378:75-78.

Colgin LL (2016) Rhythms of the hippocampal network. *Nat Rev Neurosci* 17:239-249.

Commons KG, Connolley KR, Valentino RJ (2003) A neurochemically distinct dorsal raphe-limbic circuit with a potential role in affective disorders. *Neuropsychopharmacology* 28:206-215.

Cornwell BR, Arkin N, Overstreet C, Carver FW, Grillon C (2012) Distinct contributions of human hippocampal theta to spatial cognition and anxiety. *Hippocampus* 22:1848-1859.

Correia PA, Lottem E, Banerjee D, Machado AS, Carey MR, Mainen ZF (2017) Transient inhibition and long-term facilitation of locomotion by phasic optogenetic activation of serotonin neurons. *Elife* 6.

- Crooks R, Jackson J, Bland BH (2012) Dissociable pathways facilitate theta and non-theta states in the median raphe--septohippocampal circuit. *Hippocampus* 22:1567-1576.
- Currie PJ, Coscina DV (1993) Diurnal variations in the feeding response to 8-OH-DPAT injected into the dorsal or median raphe. *Neuroreport* 4:1105-1107.
- DeCoteau WE, Thorn C, Gibson DJ, Courtemanche R, Mitra P, Kubota Y, Graybiel AM (2007) Oscillations of local field potentials in the rat dorsal striatum during spontaneous and instructed behaviors. *J Neurophysiol* 97:3800-3805.
- Dillon GM, Qu X, Marcus JN, Dodart JC (2008) Excitotoxic lesions restricted to the dorsal CA1 field of the hippocampus impair spatial memory and extinction learning in C57BL/6 mice. *Neurobiol Learn Mem* 90:426-433.
- Ding YQ, Marklund U, Yuan W, Yin J, Wegman L, Ericson J, Deneris E, Johnson RL, Chen ZF (2003) *Lmx1b* is essential for the development of serotonergic neurons. *Nat Neurosci* 6:933-938.
- Domonkos A, Nikitidou L, Ledri L, Laszlovszky T, Cserep C, Borhegyi Z, Papp E, Nyiri G, Freund TF, Varga V (2016) Divergent in vivo activity of non-serotonergic and serotonergic VGLUT3-neurons in the median raphe region. *J Physiol* 594:3775-3790.
- Eichenbaum H (2000) A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat Rev Neurosci* 1:41-50.
- Elul R (1971) The genesis of the EEG. *Int Rev Neurobiol* 15:227-272.
- Engin E, Stellbrink J, Treit D, Dickson CT (2008) Anxiolytic and antidepressant effects of intracerebroventricularly administered somatostatin: Behavioral and neurophysiological evidence. *Neuroscience* 157:666-676.
- Epp J, Keith JR, Spanswick SC, Stone JC, Prusky GT, Sutherland RJ (2008) Retrograde amnesia for visual memories after hippocampal damage in rats. *Learn Mem* 15:214-221.
- Estes WK, Skinner BF (1941) Some quantitative properties of anxiety. *Journal of Experimental Psychology* 29:390-400.
- Fanselow MS, Dong HW (2010) Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65:7-19.

- Ferguson KA, Huh CYL, Amilhon B, Williams S, Skinner FK (2011) Basket cell contributions to the generation of theta rhythms in model hippocampal CA1 networks. *BMC Neurosci* 12:P305-P305.
- Fernandez SP, Muzerelle A, Scotto-Lomassese S, Barik J, Gruart A, Delgado-García JM, Gaspar P (2017) Constitutive and Acquired Serotonin Deficiency Alters Memory and Hippocampal Synaptic Plasticity. *Neuropsychopharmacology* 42:512-523.
- Fischette CT, Komisaruk BR, Edinger HM, Feder HH, Siegel A (1980) Differential fornix ablations and the circadian rhythmicity of adrenal corticosteroid secretion. *Brain Res* 195:373-387.
- French SJ, Totterdell S (2002) Hippocampal and prefrontal cortical inputs monosynaptically converge with individual projection neurons of the nucleus accumbens. *Journal of Comparative Neurology* 446:151-165.
- Freund TF, Gulyás AI, Acsády L, Göröcs T, Tóth K (1990) Serotonergic control of the hippocampus via local inhibitory interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:8501-8505.
- Frey BN, Andreazza AC, Nery FG, Martins MR, Quevedo J, Soares JC, Kapczinski F (2007) The role of hippocampus in the pathophysiology of bipolar disorder. *Behavioural Pharmacology* 18:419-430.
- Fries P (2005) A mechanism for cognitive dynamics: neuronal communication through neuronal coherence. *Trends in cognitive sciences* 9:474-480.
- Frodl T, Bokde ALW, Scheuerecker J, Lisiecka D, Schoepf V, Hampel H, Möller H-J, Brückmann H, Wiesmann M, Meisenzahl E (2010) Functional Connectivity Bias of the Orbitofrontal Cortex in Drug-Free Patients with Major Depression. *Biological Psychiatry* 67:161-167.
- Fuentemilla L, Penny WD, Cashdollar N, Bunzeck N, Düzel E (2010) Theta-coupled periodic replay in working memory. *Curr Biol* 20:606-612.
- Furtunato AMB, Lobão-Soares B, Tort ABL, Belchior H (2020) Specific Increase of Hippocampal Delta Oscillations Across Consecutive Treadmill Runs. *Front Behav Neurosci* 14:101.
- Gazea M, Furdan S, Sere P, Oesch L, Molnár B, Di Giovanni G, Fenno LE, Ramakrishnan C, Mattis J, Deisseroth K, Dymecki SM, Adamantidis AR, Lőrincz ML (2021) Reciprocal Lateral Hypothalamic and Raphe GABAergic Projections Promote Wakefulness. *The Journal of Neuroscience* 41:4840.

- Gevins A, Smith ME, McEvoy L, Yu D (1997) High-resolution EEG mapping of cortical activation related to working memory: effects of task difficulty, type of processing, and practice. *Cereb Cortex* 7:374-385.
- Gordon JA, Lacefield CO, Kentros CG, Hen R (2005) State-dependent alterations in hippocampal oscillations in serotonin 1A receptor-deficient mice. *J Neurosci* 25:6509-6519.
- Greenwood BN, Foley TE, Day HE, Burhans D, Brooks L, Campeau S, Fleshner M (2005) Wheel running alters serotonin (5-HT) transporter, 5-HT1A, 5-HT1B, and alpha 1b-adrenergic receptor mRNA in the rat raphe nuclei. *Biol Psychiatry* 57:559-568.
- Greenwood BN, Foley TE, Day HE, Campisi J, Hammack SH, Campeau S, Maier SF, Fleshner M (2003) Freewheel running prevents learned helplessness/behavioral depression: role of dorsal raphe serotonergic neurons. *J Neurosci* 23:2889-2898.
- Gutierrez-Guzman BE, Hernandez-Perez JJ, Olvera-Cortes ME (2017) Serotonergic modulation of septo-hippocampal and septo-mammillary theta activity during spatial learning, in the rat. *Behav Brain Res* 319:73-86.
- Gutierrez-Guzman BE, Hernandez-Perez JJ, Lopez-Vazquez MA, Fregozo CS, Guevara MA, Olvera-Cortes ME (2012) Serotonin depletion of supramammillary/posterior hypothalamus nuclei produces place learning deficiencies and alters the concomitant hippocampal theta activity in rats. *Eur J Pharmacol* 682:99-109.
- Gutiérrez-Guzmán BE, Hernández-Pérez JJ, López-Vázquez M, Fregozo CS, Guevara M, Olvera-Cortés ME (2012) Serotonin depletion of supramammillary/posterior hypothalamus nuclei produces place learning deficiencies and alters the concomitant hippocampal theta activity in rats. *Eur J Pharmacol* 682:99-109.
- Gutiérrez-Guzmán BE, Hernández-Pérez JJ, González-Burgos I, Feria-Velásco A, Medina R, Guevara MÁ, López-Vázquez MÁ, Olvera-Cortés ME (2011) Hippocampal serotonin depletion facilitates place learning concurrent with an increase in CA1 high frequency theta activity expression in the rat. *European Journal of Pharmacology* 652:73-81.
- Hale MW, Lowry CA (2011) Functional topography of midbrain and pontine serotonergic systems: implications for synaptic regulation of serotonergic circuits. *Psychopharmacology (Berl)* 213:243-264.

- Hayashi Y, Kashiwagi M, Yasuda K, Ando R, Kanuka M, Sakai K, Itohara S (2015) Cells of a common developmental origin regulate REM/non-REM sleep and wakefulness in mice. *Science* 350:957-961.
- Henke PG (1990) Hippocampal pathway to the amygdala and stress ulcer development. *Brain Res Bull* 25:691-695.
- Herman JP, Dolgas CM, Carlson SL (1998) Ventral subiculum regulates hypothalamo-pituitary-adrenocortical and behavioural responses to cognitive stressors. *Neuroscience* 86:449-459.
- Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H (2005) Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29:1201-1213.
- Herreras O (2016) Local Field Potentials: Myths and Misunderstandings. *Front Neural Circuits* 10:101.
- Hölscher C, Anwyl R, Rowan MJ (1997) Stimulation on the positive phase of hippocampal theta rhythm induces long-term potentiation that can be depotentiated by stimulation on the negative phase in area CA1 in vivo. *J Neurosci* 17:6470-6477.
- Hoover WB, Vertes RP (2007) Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct Funct* 212:149-179.
- Hornung JP (2003) The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J Chem Neuroanat* 26:331-343.
- Hotson JR, Prince DA (1980) A calcium-activated hyperpolarization follows repetitive firing in hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 43:409-419.
- Hughes KR (1965) Dorsal and ventral hippocampus lesions and maze learning: influence of preoperative environment. *Can J Psychol* 19:325-332.
- Hultman R, Ulrich K, Sachs BD, Blount C, Carlson DE, Ndubuizu N, Bagot RC, Parise EM, Vu MT, Gallagher NM, Wang J, Silva AJ, Deisseroth K, Mague SD, Caron MG, Nestler EJ, Carin L, Dzirasa K (2018) Brain-wide Electrical Spatiotemporal Dynamics Encode Depression Vulnerability. *Cell* 173:166-180.e114.

- Hutchison IC, Rathore S (2015) The role of REM sleep theta activity in emotional memory. *Front Psychol* 6:1439.
- Hyman JM, Wyble BP, Goyal V, Rossi CA, Hasselmo ME (2003) Stimulation in hippocampal region CA1 in behaving rats yields long-term potentiation when delivered to the peak of theta and long-term depression when delivered to the trough. *J Neurosci* 23:11725-11731.
- Ishizuka N (2001) Laminar organization of the pyramidal cell layer of the subiculum in the rat. *J Comp Neurol* 435:89-110.
- Issa AM, Rowe W, Gauthier S, Meaney MJ (1990) Hypothalamic-pituitary-adrenal activity in aged, cognitively impaired and cognitively unimpaired rats. *J Neurosci* 10:3247-3254.
- Jackson J, Bland BH, Antle MC (2009) Nonserotonergic projection neurons in the midbrain raphe nuclei contain the vesicular glutamate transporter VGLUT3. *Synapse* 63:31-41.
- Jacobs BL, Fornal CA (1991) Activity of brain serotonergic neurons in the behaving animal. *Pharmacol Rev* 43:563-578.
- Jacobs BL, Azmitia EC (1992a) Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 72:165-229.
- Jacobs BL, Azmitia EC (1992b) Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological Reviews* 72:165-229.
- Jacobson L, Sapolsky R (1991) The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev* 12:118-134.
- Jeewajee A, Lever C, Burton S, O'Keefe J, Burgess N (2008) Environmental novelty is signaled by reduction of the hippocampal theta frequency. *Hippocampus* 18:340-348.
- Jennes L, Stumpf WE, Kalivas PW (1982) Neurotensin: topographical distribution in rat brain by immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 210:211-224.
- Jennings KA, Loder MK, Sheward WJ, Pei Q, Deacon RM, Benson MA, Olverman HJ, Hastie ND, Harmar AJ, Shen S, Sharp T (2006) Increased expression of the 5-HT transporter confers a low-anxiety phenotype linked to decreased 5-HT transmission. *J Neurosci* 26:8955-8964.
- Jin S, Shin C, Han C, Kim Y-K, Lee J, Jeon SW, Lee S-H, Ko Y-H (2021) Changes in Brain Electrical Activity According to Post-traumatic Stress Symptoms in Survivors of the Sewol Ferry



- Disaster: A 1-year Longitudinal Study. *Clinical psychopharmacology and neuroscience : the official scientific journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology* 19:537-544.
- Johnson PL, Hollis JH, Moratalla R, Lightman SL, Lowry CA (2005) Acute hypercarbic gas exposure reveals functionally distinct subpopulations of serotonergic neurons in rats. *J Psychopharmacol* 19:327-341.
- Jones MW, Wilson MA (2005) Theta rhythms coordinate hippocampal-prefrontal interactions in a spatial memory task. *PLoS Biol* 3:e402.
- Jouvet M (1968) Insomnia and decrease of cerebral 5-hydroxytryptamine after destruction of the raphe system in the cat. *Adv Pharmacol* 6:265-279.
- Jouvet M (1972) The role of monoamines and acetylcholine-containing neurons in the regulation of the sleep-waking cycle. *Ergeb Physiol* 64:166-307.
- Jung MW, Wiener SI, McNaughton BL (1994) Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat. *J Neurosci* 14:7347-7356.
- Kantor S, Jakus R, Molnar E, Gyongyosi N, Toth A, Detari L, Bagdy G (2005) Despite similar anxiolytic potential, the 5-hydroxytryptamine 2C receptor antagonist SB-242084 [6-chloro-5-methyl-1-[2-(2-methylpyrid-3-yloxy)-pyrid-5-yl carbamoyl] indoline] and chlordiazepoxide produced differential effects on electroencephalogram power spectra. *J Pharmacol Exp Ther* 315:921-930.
- Karalis N, Dejean C, Chaudun F, Khoder S, Rozeske RR, Wurtz H, Bagur S, Benchenane K, Sirota A, Courtin J, Herry C (2016) 4-Hz oscillations synchronize prefrontal-amygdala circuits during fear behavior. *Nat Neurosci* 19:605-612.
- Kay LM (2005) Theta oscillations and sensorimotor performance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3863-3868.
- Kinney GG, Kocsis B, Vertes RP (1994) Injections of excitatory amino acid antagonists into the median raphe nucleus produce hippocampal theta rhythm in the urethane-anesthetized rat. *Brain Res* 654:96-104.
- Kinney GG, Kocsis B, Vertes RP (1995) Injections of muscimol into the median raphe nucleus produce hippocampal theta rhythm in the urethane anesthetized rat. *Psychopharmacology (Berl)* 120:244-248.

- Kinney GG, Kocsis B, Vertes RP (1996) Medial septal unit firing characteristics following injections of 8-OH-DPAT into the median raphe nucleus. *Brain Res* 708:116-122.
- Kirk IJ, McNaughton N (1993) Mapping the differential effects of procaine on frequency and amplitude of reticularly elicited hippocampal rhythmical slow activity. *Hippocampus* 3:517-525.
- Kitchigina VF, Kudina TA, Kuttyreva EV, Vinogradova OS (1999) Neuronal activity of the septal pacemaker of theta rhythm under the influence of stimulation and blockade of the median raphe nucleus in the awake rabbit. *Neuroscience* 94:453-463.
- Kjelstrup KG, Tuvnes FA, Steffenach HA, Murison R, Moser EI, Moser MB (2002) Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10825-10830.
- Klimesch W, Doppelmayr M, Yonelinas A, Kroll NE, Lazzara M, Röhms D, Gruber W (2001) Theta synchronization during episodic retrieval: neural correlates of conscious awareness. *Brain Res Cogn Brain Res* 12:33-38.
- Klitenick MA, Wirtshafter D (1988) Comparative studies of the ingestive behaviors produced by microinjections of muscimol into the midbrain raphe nuclei of the ventral tegmental area of the rat. *Life Sci* 42:775-782.
- Klitenick MA, Wirtshafter D (1989) Elicitation of feeding, drinking, and gnawing following microinjections of muscimol into the median raphe nucleus of rats. *Behav Neural Biol* 51:436-441.
- Klüver H, Bucy PC (1937) "Psychic blindness" and other symptoms following bilateral temporal lobectomy in Rhesus monkeys. *American Journal of Physiology* 119:352-353.
- Kobayashi Y, Amaral DG (2007) Macaque monkey retrosplenial cortex: III. Cortical efferents. *J Comp Neurol* 502:810-833.
- Kocsis B, Vertes RP (1992) Dorsal raphe neurons: synchronous discharge with the theta rhythm of the hippocampus in the freely behaving rat. *J Neurophysiol* 68:1463-1467.
- Kocsis B, Varga V, Dahan L, Sik A (2006) Serotonergic neuron diversity: identification of raphe neurons with discharges time-locked to the hippocampal theta rhythm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:1059-1064.

Koella WP (1968) Discussion of insomnia and decrease of cerebral 5-hydroxytryptamine after destruction of the raphe system in the cat. *Adv Pharmacol* 6:280-282.

Konopacki J, Bland BH, Roth SH (1988) Evidence that activation of in vitro hippocampal theta rhythm only involves muscarinic receptors. *Brain Res* 455:110-114.

Konopacki J, Maciver MB, Bland BH, Roth SH (1987) Theta in hippocampal slices: relation to synaptic responses of dentate neurons. *Brain Res Bull* 18:25-27.

Kramis R, Vanderwolf CH, Bland BH (1975) Two types of hippocampal rhythmical slow activity in both the rabbit and the rat: relations to behavior and effects of atropine, diethyl ether, urethane, and pentobarbital. *Exp Neurol* 49:58-85.

Kropff E, Carmichael JE, Moser EI, Moser MB (2021) Frequency of theta rhythm is controlled by acceleration, but not speed, in running rats. *Neuron* 109:1029-1039.e1028.

Larson J, Wong D, Lynch G (1986) Patterned stimulation at the theta frequency is optimal for the induction of hippocampal long-term potentiation. *Brain Res* 368:347-350.

Lavenex P, Amaral DG (2000) Hippocampal-neocortical interaction: a hierarchy of associativity. *Hippocampus* 10:420-430.

Law CSH, Leung LS (2018) Long-Term Potentiation and Excitability in the Hippocampus Are Modulated Differently by  $\theta$  Rhythm. *eNeuro* 5.

Lê AD, Funk D, Harding S, Juzysch W, Li Z, Fletcher PJ (2008) Intra-median raphe nucleus (MRN) infusions of muscimol, a GABA-A receptor agonist, reinstate alcohol seeking in rats: role of impulsivity and reward. *Psychopharmacology (Berl)* 195:605-615.

Li S, Varga V, Sik A, Kocsis B (2005) GABAergic control of the ascending input from the median raphe nucleus to the limbic system. *J Neurophysiol* 94:2561-2574.

Li Y, Zhong W, Wang D, Feng Q, Liu Z, Zhou J, Jia C, Hu F, Zeng J, Guo Q, Fu L, Luo M (2016) Serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus encode reward signals. *Nat Commun* 7:10503.

Lindén H, Tetzlaff T, Potjans TC, Pettersen KH, Grün S, Diesmann M, Einevoll GT (2011) Modeling the spatial reach of the LFP. *Neuron* 72:859-872.

Llinás RR (1988) The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science* 242:1654-1664.

Long LL, Hinman JR, Chen C-M, Escabi MA, Chrobak JJ (2014) Theta dynamics in rat: speed and acceleration across the Septotemporal axis. *PLoS one* 9:e97987-e97987.

Lowry CA (2002) Functional subsets of serotonergic neurones: implications for control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Neuroendocrinol* 14:911-923.

Lowry CA, Hale MW, Evans AK, Heerkens J, Staub DR, Gasser PJ, Shekhar A (2008) Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. *Ann N Y Acad Sci* 1148:86-94.

M'Harzi M, Palacios A, Monmaur P, Willig F, Houcine O, Delacour J (1987) Effects of selective lesions of fimbria-fornix on learning set in the rat. *Physiology & Behavior* 40:181-188.

Macadar AW, Chalupa LM, Lindsley DB (1974) Differentiation of brain stem loci which affect hippocampal and neocortical electrical activity. *Exp Neurol* 43:499-514.

Maguire EA, Frackowiak RS, Frith CD (1997) Recalling routes around London: activation of the right hippocampus in taxi drivers. *J Neurosci* 17:7103-7110.

Maingret N, Girardeau G, Todorova R, Goutierre M, Zugaro M (2016) Hippocampo-cortical coupling mediates memory consolidation during sleep. *Nat Neurosci* 19:959-964.

Marshall L, Helgadóttir H, Mölle M, Born J (2006) Boosting slow oscillations during sleep potentiates memory. *Nature* 444:610-613.

Maru E, Takahashi LK, Iwahara S (1979) Effects of median raphe nucleus lesions on hippocampal EEG in the freely moving rat. *Brain Res* 163:223-234.

Matias S, Lottem E, Dugue GP, Mainen ZF (2017) Activity patterns of serotonin neurons underlying cognitive flexibility. *Elife* 6.

Matthews Gillian A, Nieh Edward H, Vander Weele Caitlin M, Halbert Sarah A, Pradhan Roma V, Yosafat Ariella S, Globber Gordon F, Izadmehr Ehsan M, Thomas Rain E, Lacy Gabrielle D, Wildes Craig P, Ungless Mark A, Tye Kay M (2016) Dorsal Raphe Dopamine Neurons Represent the Experience of Social Isolation. *Cell* 164:617-631.

McBride WJ, Murphy JM, Ikemoto S (1999) Localization of brain reinforcement mechanisms: intracranial self-administration and intracranial place-conditioning studies. *Behav Brain Res* 101:129-152.

- McEwen BS (1997) Possible mechanisms for atrophy of the human hippocampus. *Mol Psychiatry* 2:255-262.
- McFarland WL, Teitelbaum H, Hedges EK (1975) Relationship between hippocampal theta activity and running speed in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 88:324-328.
- McGinty DJ, Harper RM (1976) Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats. *Brain Res* 101:569-575.
- McKenna JT, Vertes RP (2001) Collateral projections from the median raphe nucleus to the medial septum and hippocampus. *Brain Res Bull* 54:619-630.
- McNaughton N, Swart C, Neo P, Bates V, Glue P (2013) Anti-anxiety drugs reduce conflict-specific "theta"--a possible human anxiety-specific biomarker. *J Affect Disord* 148:104-111.
- Mendelson WB, Bergmann BM (1999) EEG delta power during sleep in young and old rats. *Neurobiol Aging* 20:669-673.
- Meyer HC, Odriozola P, Cohodes EM, Mandell JD, Li A, Yang R, Hall BS, Haberman JT, Zacharek SJ, Liston C, Lee FS, Gee DG (2019) Ventral hippocampus interacts with prelimbic cortex during inhibition of threat response via learned safety in both mice and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116:26970.
- Meyer-Bernstein EL, Morin LP (1999) Electrical stimulation of the median or dorsal raphe nuclei reduces light-induced FOS protein in the suprachiasmatic nucleus and causes circadian activity rhythm phase shifts. *Neuroscience* 92:267-279.
- Mistlberger RE, Bergmann BM, Rechtschaffen A (1987) Relationships among wake episode lengths, contiguous sleep episode lengths, and electroencephalographic delta waves in rats with suprachiasmatic nuclei lesions. *Sleep* 10:12-24.
- Monti JM, Jantos H (2008) The roles of dopamine and serotonin, and of their receptors, in regulating sleep and waking. In: *Progress in Brain Research* (Di Giovanni G, Di Matteo V, Esposito E, eds), pp 625-646: Elsevier.
- Morin LP (1999) Serotonin and the regulation of mammalian circadian rhythmicity. *Ann Med* 31:12-33.

- Morin LP, Meyer-Bernstein EL (1999) The ascending serotonergic system in the hamster: comparison with projections of the dorsal and median raphe nuclei. *Neuroscience* 91:81-105.
- Moser MB, Moser EI (1998) Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 8:608-619.
- Moser MB, Moser EI, Forrest E, Andersen P, Morris RG (1995) Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9697-9701.
- Mouret J, Bobillier P, Jouvet M (1968) Insomnia following parachlorophenylalanin in the rat. *European Journal of Pharmacology* 5:17-22.
- Muller CP, Cunningham KA (2020) *Handbook of the behavioral neurobiology of serotonin*: Academic Press.
- Murray NM, Buchanan GF, Richerson GB (2015) Insomnia Caused by Serotonin Depletion is Due to Hypothermia. *Sleep* 38:1985-1993.
- Mushiake H, Kodama T, Shima K, Yamamoto M, Nakahama H (1988) Fluctuations in spontaneous discharge of hippocampal theta cells during sleep-waking states and PCPA-induced insomnia. *J Neurophysiol* 60:925-939.
- Muzerelle A, Scotto-Lomassese S, Bernard JF, Soiza-Reilly M, Gaspar P (2016) Conditional anterograde tracing reveals distinct targeting of individual serotonin cell groups (B5-B9) to the forebrain and brainstem. *Brain Struct Funct* 221:535-561.
- Nadel L, Moscovitch M (1997) Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Curr Opin Neurobiol* 7:217-227.
- Nicole O, Hadzibegovic S, Gajda J, Bontempi B, Bem T, Meyrand P (2016) Soluble amyloid beta oligomers block the learning-induced increase in hippocampal sharp wave-ripple rate and impair spatial memory formation. *Sci Rep* 6:22728.
- O'Keefe J (1976) Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Exp Neurol* 51:78-109.
- O'Keefe J, Recce ML (1993) Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus* 3:317-330.
- Obal F, Jr., Krueger JM (2003) Biochemical regulation of non-rapid-eye-movement sleep. *Front Biosci* 8:d520-550.

- Ohmura Y, Tsutsui-Kimura I, Sasamori H, Nebuka M, Nishitani N, Tanaka KF, Yamanaka A, Yoshioka M (2019) Different roles of distinct serotonergic pathways in anxiety-like behavior, antidepressant-like, and anti-impulsive effects. *Neuropharmacology*:107703.
- Ohmura Y, Tsutsui-Kimura I, Sasamori H, Nebuka M, Nishitani N, Tanaka KF, Yamanaka A, Yoshioka M (2020) Different roles of distinct serotonergic pathways in anxiety-like behavior, antidepressant-like, and anti-impulsive effects. *Neuropharmacology* 167:107703.
- Oikonomou G, Altermatt M, Zhang R-w, Coughlin GM, Montz C, Gradinaru V, Prober DA (2019) The Serotonergic Raphe Promote Sleep in Zebrafish and Mice. *Neuron* 103:686-701.e688.
- Olvera-Cortés E, Cervantes M, González-Burgos I (2002) Place-learning, but not cue-learning training, modifies the hippocampal theta rhythm in rats. *Brain Res Bull* 58:261-270.
- Olvera-Cortés E, Guevara MA, González-Burgos I (2004) Increase of the hippocampal theta activity in the Morris water maze reflects learning rather than motor activity. *Brain Research Bulletin* 62:379-384.
- Padilla-Coreano N, Bolkan SS, Pierce GM, Blackman DR, Hardin WD, Garcia-Garcia AL, Spellman TJ, Gordon JA (2016) Direct Ventral Hippocampal-Prefrontal Input Is Required for Anxiety-Related Neural Activity and Behavior. *Neuron* 89:857-866.
- Padilla-Coreano N, Canetta S, Mikofsky RM, Alway E, Passecker J, Myroshnychenko MV, Garcia-Garcia AL, Warren R, Teboul E, Blackman DR, Morton MP, Hupalo S, Tye KM, Kellendonk C, Kupferschmidt DA, Gordon JA (2019) Hippocampal-Prefrontal Theta Transmission Regulates Avoidance Behavior. *Neuron* 104:601-610.e604.
- Parvizi J, Van Hoesen GW, Buckwalter J, Damasio A (2006) Neural connections of the posteromedial cortex in the macaque. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:1563-1568.
- Paxinos G, Franklin KB (2019) Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates: Academic press.
- Peck BK, Vanderwolf CH (1991) Effects of raphe stimulation on hippocampal and neocortical activity and behaviour. *Brain Res* 568:244-252.
- Pentkowski NS, Blanchard DC, Lever C, Litvin Y, Blanchard RJ (2006) Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. *European Journal of Neuroscience* 23:2185-2196.

Petrovich GD, Canteras NS, Swanson LW (2001) Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Res Brain Res Rev* 38:247-289.

Portas CM, Bjorvatn B, Ursin R (2000) Serotonin and the sleep/wake cycle: special emphasis on microdialysis studies. *Prog Neurobiol* 60:13-35.

Pothuizen HH, Zhang WN, Jongen-Rêlo AL, Feldon J, Yee BK (2004) Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. *Eur J Neurosci* 19:705-712.

Quirk CR, Zutshi I, Srikanth S, Fu ML, Devico Marciano N, Wright MK, Parsey DF, Liu S, Siretskiy RE, Huynh TL, Leutgeb JK, Leutgeb S (2021) Precisely timed theta oscillations are selectively required during the encoding phase of memory. *Nat Neurosci*.

Rasmussen K, Heym J, Jacobs BL (1984) Activity of serotonin-containing neurons in nucleus centralis superior of freely moving cats. *Experimental Neurology* 83:302-317.

Ren J, Friedmann D, Xiong J, Liu CD, Ferguson BR, Weerakkody T, DeLoach KE, Ran C, Pun A, Sun Y, Weissbourd B, Neve RL, Huguenard J, Horowitz MA, Luo L (2018) Anatomically Defined and Functionally Distinct Dorsal Raphe Serotonin Sub-systems. *Cell* 175:472-487.e420.

Richmond MA, Yee BK, Pouzet B, Veenman L, Rawlins JNP, 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. *Behavioral Neuroscience* 113:1189-1203.

Risold PY, Swanson LW (1996) Structural evidence for functional domains in the rat hippocampus. *Science* 272:1484-1486.

Risold PY, Swanson LW (1997) Connections of the rat lateral septal complex. *Brain Res Brain Res Rev* 24:115-195.

Roberts AC, Tomic DL, Parkinson CH, Roeling TA, Cutter DJ, Robbins TW, Everitt BJ (2007) Forebrain connectivity of the prefrontal cortex in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*): an anterograde and retrograde tract-tracing study. *J Comp Neurol* 502:86-112.

Rolls ET (2013) The mechanisms for pattern completion and pattern separation in the hippocampus. *Front Syst Neurosci* 7:74.



- Royer S, Sirota A, Patel J, Buzsaki G (2010) Distinct representations and theta dynamics in dorsal and ventral hippocampus. *J Neurosci* 30:1777-1787.
- Sainsbury RS, Heynen A, Montoya CP (1987) Behavioral correlates of hippocampal type 2 theta in the rat. *Physiol Behav* 39:513-519.
- Sakae DY, Ramet L, Henrion A, Poirel O, Jamain S, El Mestikawy S, Daumas S (2019) Differential expression of VGLUT3 in laboratory mouse strains: Impact on drug-induced hyperlocomotion and anxiety-related behaviors. *Genes Brain Behav* 18:e12528.
- Sakai K, Crochet S (2001) Role of dorsal raphe neurons in paradoxical sleep generation in the cat: no evidence for a serotonergic mechanism. *European Journal of Neuroscience* 13:103-112.
- Salmon DP, Zola-Morgan S, Squire LR (1987) Retrograde amnesia following combined hippocampus-amygdala lesions in monkeys. *Psychobiology* 15:37-47.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS (1984) Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:6174-6177.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS (1985) Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: implications for aging. *The Journal of Neuroscience* 5:1222.
- Saunders RC, Rosene DL, Van Hoesen GW (1988) Comparison of the efferents of the amygdala and the hippocampal formation in the rhesus monkey: II. Reciprocal and non-reciprocal connections. *J Comp Neurol* 271:185-207.
- Sauseng P, Griesmayr B, Freunberger R, Klimesch W (2010) Control mechanisms in working memory: a possible function of EEG theta oscillations. *Neurosci Biobehav Rev* 34:1015-1022.
- Schiffmann SN, Vanderhaeghen J-J (1991) Distribution of cells containing mRNA encoding cholecystokinin in the rat central nervous system. *Journal of Comparative Neurology* 304:219-233.
- Schuff N, Neylan TC, Fox-Bosetti S, Lenoci M, Samuelson KW, Studholme C, Kornak J, Marmar CR, Weiner MW (2008) Abnormal N-acetylaspartate in hippocampus and anterior cingulate in posttraumatic stress disorder. *Psychiatry Res* 162:147-157.

- Schultheiss NW, Schlecht M, Jayachandran M, Brooks DR, McGlothan JL, Guilarte TR, Allen TA (2020) Awake delta and theta-rhythmic hippocampal network modes during intermittent locomotor behaviors in the rat. *Behav Neurosci* 134:529-546.
- Schultz C, Engelhardt M (2014) Anatomy of the hippocampal formation. *Front Neurol Neurosci* 34:6-17.
- Scoville WB, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:11-21.
- Sengupta A, Holmes A (2019) A Discrete Dorsal Raphe to Basal Amygdala 5-HT Circuit Calibrates Aversive Memory. *Neuron* 103:489-505.e487.
- Skaggs WE, McNaughton BL, Wilson MA, Barnes CA (1996) Theta phase precession in hippocampal neuronal populations and the compression of temporal sequences. *Hippocampus* 6:149-172.
- Squire LR, Zola-Morgan S (1991) The medial temporal lobe memory system. *Science* 253:1380-1386.
- Stark E, Eichler R, Roux L, Fujisawa S, Rotstein HG, Buzsáki G (2013) Inhibition-induced theta resonance in cortical circuits. *Neuron* 80:1263-1276.
- Steriade M, Nuñez A, Amzica F (1993) Intracellular analysis of relations between the slow (< 1 Hz) neocortical oscillation and other sleep rhythms of the electroencephalogram. *J Neurosci* 13:3266-3283.
- Szonyi A, Zicho K, Barth AM, Gonczi RT, Schlingloff D, Torok B, Sipos E, Major A, Bardoczi Z, Sos KE, Gulyas AI, Varga V, Zelena D, Freund TF, Nyiri G (2019) Median raphe controls acquisition of negative experience in the mouse. *Science* 366.
- Teissier A, Chemiakine A, Inbar B, Bagchi S, Ray RS, Palmiter RD, Dymecki SM, Moore H, Ansorge MS (2015) Activity of Raphe Serotonergic Neurons Controls Emotional Behaviors. *Cell Rep* 13:1965-1976.
- Teixeira CM, Rosen ZB, Suri D, Sun Q, Hersh M, Sargin D, Dincheva I, Morgan AA, Spivack S, Krok AC, Hirschfeld-Stoler T, Lambe EK, Siegelbaum SA, Ansorge MS (2018) Hippocampal 5-HT Input Regulates Memory Formation and Schaffer Collateral Excitation. *Neuron* 98:992-1004.e1004.

- Thierry A-M, Gioanni Y, Dégénétais E, Glowinski J (2000) Hippocampo-prefrontal cortex pathway: Anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus* 10:411-419.
- Todorova R, Zugaro M (2019) Isolated cortical computations during delta waves support memory consolidation. *Science* 366:377-381.
- Torda C (1967) Effect of brain serotonin depletion on sleep in rats. *Brain Research* 6:375-377.
- Trulson ME, Jacobs BL (1979) Raphe unit activity in freely moving cats: Correlation with level of behavioral arousal. *Brain Research* 163:135-150.
- Vanderwolf CH, Leung LW, Baker GB, Stewart DJ (1989) The role of serotonin in the control of cerebral activity: studies with intracerebral 5,7-dihydroxytryptamine. *Brain Res* 504:181-191.
- Vanderwolf CH, Buzsaki G, Cain DP, Cooley RK, Robertson B (1988) Neocortical and hippocampal electrical activity following decapitation in the rat. *Brain Res* 451:340-344.
- Varga V, Sik A, Freund TF, Kocsis B (2002) GABA(B) receptors in the median raphe nucleus: distribution and role in the serotonergic control of hippocampal activity. *Neuroscience* 109:119-132.
- Venner A, Broadhurst RY, Sohn LT, Todd WD, Fuller PM (2020) Selective activation of serotonergic dorsal raphe neurons facilitates sleep through anxiolysis. *Sleep* 43.
- Vertes RP (1981) An analysis of ascending brain stem systems involved in hippocampal synchronization and desynchronization. *J Neurophysiol* 46:1140-1159.
- Vertes RP, Kocsis B (1997) Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience* 81:893-926.
- Vertes RP, Fortin WJ, Crane AM (1999) Projections of the median raphe nucleus in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 407:555-582.
- Vertes RP, Hoover WB, Viana Di Prisco G (2004) Theta rhythm of the hippocampus: subcortical control and functional significance. *Behav Cogn Neurosci Rev* 3:173-200.
- Vertes RP, Kinney GG, Kocsis B, Fortin WJ (1994) Pharmacological suppression of the median raphe nucleus with serotonin<sub>1A</sub> agonists, 8-OH-DPAT and buspirone, produces hippocampal theta rhythm in the rat. *Neuroscience* 60:441-451.

- Viana Di Prisco G, Albo Z, Vertes RP, Kocsis B (2002) Discharge properties of neurons of the median raphe nucleus during hippocampal theta rhythm in the rat. *Exp Brain Res* 145:383-394.
- Vila-Merkle H, González-Martínez A, Campos-Jiménez R, Martínez-Ricós J, Teruel-Martí V, Blasco-Serra A, Lloret A, Celada P, Cervera-Ferri A (2021) The Oscillatory Profile Induced by the Anxiogenic Drug FG-7142 in the Amygdala-Hippocampal Network Is Reversed by Infralimbic Deep Brain Stimulation: Relevance for Mood Disorders. *Biomedicines* 9.
- Vinogradova OS (1995) Expression, control, and probable functional significance of the neuronal theta-rhythm. *Prog Neurobiol* 45:523-583.
- Vinogradova OS, Kitchigina VF, Kudina TA, Zenchenko KI (1999) Spontaneous activity and sensory responses of hippocampal neurons during persistent theta-rhythm evoked by median raphe nucleus blockade in rabbit. *Neuroscience* 94:745-753.
- Weeden CSS, Roberts JM, Kamm AM, Kesner RP (2015) The role of the ventral dentate gyrus in anxiety-based behaviors. *Neurobiology of Learning and Memory* 118:143-149.
- Weitzman ED, Rapport MM, McGregor P, Jacoby J (1968) Sleep Patterns of the Monkey and Brain Serotonin Concentration: Effect of *p*-Chlorophenylalanine. *Science* 160:1361-1363.
- Whishaw IQ, Vanderwolf CH (1973) Hippocampal EEG and behavior: Changes in amplitude and frequency of RSA (theta rhythm) associated with spontaneous and learned movement patterns in rats and cats. *Behavioral Biology* 8:461-484.
- Whishaw IQ, Tomie J-A (1997) Piloting and dead reckoning dissociated by fimbria-fornix lesions in a rat food carrying task. *Behavioural Brain Research* 89:87-97.
- Wilson MM, Greer SE, Greer MA, Roberts L (1980) Hippocampal inhibition of pituitary-adrenocortical function in female rats. *Brain Res* 197:433-441.
- Winson J (1978) Loss of hippocampal theta rhythm results in spatial memory deficit in the rat. *Science* 201:160-163.
- Winterer J, Stempel AV, Dugladze T, Földy C, Maziashvili N, Zivkovic AR, Priller J, Soltesz I, Gloveli T, Schmitz D (2011) Cell-Type-Specific Modulation of Feedback Inhibition by Serotonin in the Hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 31:8464-8475.
- Wirtshafter D, Krebs JC (1990) Control of food intake by kainate/quisqualate receptors in the median raphe nucleus. *Psychopharmacology (Berl)* 101:137-141.

- Womelsdorf T, Fries P (2006) Neuronal coherence during selective attentional processing and sensory-motor integration. *J Physiol Paris* 100:182-193.
- Wong RK, Prince DA, Basbaum AI (1979) Intradendritic recordings from hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:986-990.
- Woollett K, Maguire EA (2011) Acquiring "the Knowledge" of London's layout drives structural brain changes. *Curr Biol* 21:2109-2114.
- Yamakawa GR, Antle MC (2010) Phenotype and function of raphe projections to the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 31:1974-1983.
- Yamamoto T, Watanabe S, Oishi R, Ueki S (1979) Effects of midbrain raphe stimulation and lesion on EEG activity in rats. *Brain Research Bulletin* 4:491-495.
- Yeung M, Treit D, Dickson CT (2012) A critical test of the hippocampal theta model of anxiolytic drug action. *Neuropharmacology* 62:155-160.
- Yeung M, Dickson CT, Treit D (2013) Intrahippocampal infusion of the 5-HT<sub>1A</sub> blocker ZD7288 slows evoked theta rhythm and produces anxiolytic-like effects in the elevated plus maze. *Hippocampus* 23:278-286.
- Zhang 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.



