

Université de Montréal

Mécanismes de plasticité synaptique dans l'amygdale
lors de la réactivation de la mémoire de peur auditive chez le rat :
interaction dynamique des récepteurs NMDA et AMPA

par

Cyrinne Ben Mamou

Département de physiologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences neurologiques

Juillet 2008

© Cyrinne Ben Mamou, 2008

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Mécanismes de plasticité synaptique dans l'amygdale
lors de la réactivation de la mémoire de peur auditive chez le rat :
interaction dynamique des récepteurs NMDA et AMPA

présentée par :

Cyrinne Ben Mamou

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Laurent Descarries
président-rapporteur

Vincent Castellucci
directeur de recherche

Karim Nader
codirecteur

Adriana Di Polo
membre du jury

Sheena Josselyn
examinatrice externe

John Kalaska
représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ

La plasticité synaptique est une propriété indispensable à l'acquisition de la mémoire chez toutes les espèces étudiées, des invertébrés aux primates. La formation d'une mémoire débute par une phase de plasticité qui inclut une restructuration synaptique ; ensuite elle se poursuit par la consolidation de ces modifications, contribuant à la mémoire à long terme. Certaines mémoires redeviennent malléables lorsqu'elles sont rappelées. La trace mnésique entre alors dans une nouvelle phase de plasticité, au cours de laquelle certaines composantes de la mémoire peuvent être mises à jour, puis reconsolidées. L'objectif de la présente thèse est d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sont activés lors du rappel d'une mémoire. Nous avons utilisé un modèle de conditionnement Pavlovien, combiné à l'administration d'agents pharmacologiques et à l'analyse quantitative de marqueurs de plasticité synaptique, afin d'étudier la dynamique de la mémoire de peur auditive chez des rats Sprague Dawley. La circuiterie neuronale et les mécanismes associatifs impliqués dans la neurobiologie de cette mémoire sont bien caractérisés, en particulier le rôle des récepteurs glutamatergiques de type NMDA et AMPA dans la plasticité synaptique et la consolidation. Nos résultats démontrent que le retour de la trace mnésique à un état de labilité nécessite l'activation des récepteurs NMDA dans l'amygdale baso-latérale à l'instant même du rappel, alors que les récepteurs AMPA sont requis pour l'expression comportementale de la réponse de peur conditionnée. D'autre part, les résultats identifient le

rappel comme une phase bien plus dynamique que présumée, et suggèrent que l'expression de la peur conditionnée mette en jeu la régulation du trafic des récepteurs AMPA par les récepteurs NMDA. Le présent travail espère contribuer à la compréhension de la neurobiologie fondamentale de la mémoire. De plus, il propose une intégration des résultats aux modèles animaux d'étude des troubles psychologiques conséquents aux mémoires traumatiques chez l'humain, tels que les phobies et les syndromes de stress post-traumatiques.

Mots clés

Conditionnement Pavlovien, mémoire émotionnelle, apprentissage associatif, rappel, reconsolidation, amnésie, anisomycine, trafic de récepteurs.

ABSTRACT

Synaptic plasticity is necessary for the acquisition of memory in all studied species, from invertebrates to primates. Memory formation starts with a phase of plasticity that entails synaptic remodeling; then follows the consolidation of these modifications, which contributes to long-term memory. Some memories return to a malleable state upon retrieval. Consequently, the memory trace enters a new phase of plasticity, during which some memory components are eventually updated, then reconsolidated. The aim of the present thesis was to study the cellular and molecular mechanisms that are engaged during memory retrieval. We used a model of Pavlovian conditioning in Sprague Dawley rats, combined to pharmacological manipulations and quantitative analysis of synaptic plasticity markers, in order to study the dynamics of auditory fear memory. The neuronal circuitry and the associative mechanisms involved in the neurobiology of this memory are well characterized, in particular the role of NMDA and AMPA glutamatergic receptors in synaptic plasticity and consolidation. Our results show that the return of the memory trace to lability requires activation of NMDA receptors in the basolateral amygdala during retrieval, whereas AMPA receptors are necessary for the behavioral expression of the conditioned fear response. Furthermore, the data identify retrieval as being much more dynamic than recognized, and suggest that conditioned fear expression involves NMDA receptor-dependent regulation of AMPA receptors' trafficking. The present

work attempts to advance our understanding of the fundamental neurobiology of memory. In addition, it offers an integrative view of the data with regards to animal modeling of human clinical issues related to traumatic memories, like phobias and post-traumatic stress disorders.

Keywords

Pavlovian conditioning, emotional memory, associative learning, retrieval, reconsolidation, amnesia, anisomycin, receptor trafficking.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	I
MOTS CLÉS	II
ABSTRACT	III
KEYWORDS	IV
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XI
REMERCIEMENTS	XIV
AVANT-PROPOS	XVIII
CHAPITRE I : INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
LA MÉMOIRE: FONCTION BIOLOGIQUE, PERSPECTIVE ADAPTATIVE ET ÉVOLUTIVE.....	1
LA MÉMOIRE : PERSPECTIVE HISTORIQUE DES NEUROSCIENCES COGNITIVES.....	2
DESCRIPTION DE LA DYNAMIQUE DE LA TRACE MNÉSIQUE	5
MODÈLE D'ÉTUDE: LA MÉMOIRE DE PEUR AUDITIVE CHEZ LE RAT	10
<i>Choix du modèle</i>	10
<i>Le conditionnement Pavlovien</i>	11
<i>Neurobiologie de la mémoire de peur auditive</i>	12
HYPOTHÈSES ET PLAN EXPÉRIMENTAL	29
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES DE L'INTRODUCTION GÉNÉRALE	32
CHAPITRE II : PREMIER MANUSCRIT	60
NMDA RECEPTORS ARE CRITICAL FOR UNLEASHING CONSOLIDATED AUDITORY FEAR MEMORIES	60
ABSTRACT	60
INTRODUCTION	60
RESULTS	62
CONCLUSION	64

FIGURE LEGENDS	65
REFERENCES	66
FIGURE 1.....	68
FIGURE 2.....	69
FIGURE 3.....	70
SUPPLEMENTARY NOTES	71
<i>Statistical analysis</i>	72
<i>References for the supplementary notes</i>	74
SUPPLEMENTARY DATA.....	77
<i>Control of drug spread in intra-BLA infusions</i>	77
<i>Methods for the supplementary data</i>	78
<i>References for the supplementary data</i>	81
SUPPLEMENTARY METHODS	83
<i>Subjects</i>	83
<i>Surgery and histology</i>	83
<i>Intra-BLA infusions</i>	83
<i>Behavioral apparatus</i>	84
<i>Behavioral procedures</i>	84
SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS	87
SUPPLEMENTARY FIGURE 1	90
SUPPLEMENTARY FIGURE 2	91
SUPPLEMENTARY FIGURE 3	92
SUPPLEMENTARY FIGURE 4	93
SUPPLEMENTARY FIGURE 5	94
CHAPITRE III : SECOND MANUSCRIT	95
THE DYNAMIC NATURE OF MEMORY RETRIEVAL: ACTIVE NMDAR- REGULATED TRAFFICKING OF AMPARS IN THE AMYGDALA, DURING THE EXPRESSION OF EMOTIONAL MEMORY	95
ABSTRACT	95
INTRODUCTION	96
RESULTS	99
<i>Fear memory expression is blocked by anisomycin</i>	99
<i>Anisomycin blockade of memory expression is accompanied by alteration of post- synaptic GluR1-AMPA trafficking</i>	100

<i>Fear memory expression induces phosphorylation of AMPARs in the BLA</i>	101
<i>NMDAR activation regulates GluR1 phosphorylation during memory retrieval</i>	104
<i>NMDAR activation during retrieval determines the dynamic nature of memory expression</i>	105
DISCUSSION.....	107
METHODS.....	116
<i>Animals</i>	116
<i>Stereotaxic surgery</i>	117
<i>Drug infusion</i>	117
<i>Behavioral procedures</i>	117
<i>BLA tissue collection</i>	118
<i>Co-immunoprecipitation</i>	118
<i>Synaptoneurosome preparation</i>	119
<i>SDS-PAGE and Western blot</i>	119
FIGURE LEGENDS.....	120
REFERENCES.....	123
FIGURE 1.....	136
FIGURE 2.....	137
FIGURE 3.....	138
FIGURE 4.....	139
FIGURE 5.....	140
CHAPITRE IV : DISCUSSION GÉNÉRALE	141
SYNTHÈSE DES RÉSULTATS.....	141
L'IDENTIFICATION DU MÉCANISME D'INDUCTION DE LA LABILITÉ DE LA MÉMOIRE DE PEUR AUDITIVE DANS L'ABL.....	145
<i>Rôle de la composition des rNMDA dans la labilité</i>	146
<i>Rôle des co-agonistes des rNMDA dans la labilité</i>	147
RÔLE DE LA RÉACTIVATION SPONTANÉE DANS LA STABILISATION ET L'INTÉGRATION DE LA MÉMOIRE ?.....	148
LA LABILITÉ DE LA MÉMOIRE : UNE NOTION RELATIVE ?.....	149
MODULATION NORADRÉNERGIQUE DE LA MÉMOIRE DE PEUR.....	152
POSITION DES RAMPAs DANS LA TRACE MNÉSIEQUE.....	154
<i>Les rAMPA jouent-ils un rôle actif dans la plasticité?</i>	154

<i>Trafic des rAMPA = mise à jours de la mémoire?</i>	155
À PROPOS DE DISSOCIATION ENTRE RÉACTIVATION ET EXPRESSION DE LA MÉMOIRE DE PEUR	159
FACTEURS DE SUSCEPTIBILITÉ AU SYNDROME DE STRESS POST-TRAUMATIQUE	161
CONCLUSION	162
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES DE LA DISCUSSION GÉNÉRALE	164

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION ET DISCUSSION GÉNÉRALES

FIGURE 1. REPRESENTATION SCHEMATIQUE VISANT A ILLUSTRER LE LIEN ENTRE LE MOMENT OU UN TRAITEMENT AMNESIANT EST ADMINISTRE ET LE MECANISME AFFECTE 9

FIGURE 2. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES RECEPTEURS NMDA ET AMPA DANS UN COMPARTIMENT POST-SYNAPTIQUE, ILLUSTRANT LE LIEN ENTRE NOS DIFFERENTS RESULTATS RELATIFS A LA DYNAMIQUE DE CES RECEPTEURS, LA PLASTICITE DE LA TRACE MNESIQUE ET L'EXPRESSION DE LA REponse CONDITIONNEE 144

PREMIER MANUSCRIT

FIGURE 1: PRE-REACTIVATION IFENPRODIL INFUSION PREVENTS ANISOMYCIN-INDUCED AMNESIA BUT POST-REACTIVATION IFENPRODIL INFUSION DOES NOT 68

FIGURE 2: PRE-REACTIVATION AP5 INFUSION PREVENTS ANISOMYCIN-INDUCED AMNESIA 69

FIGURE 3: PRE-REACTIVATION CNQX INFUSION BLOCKS THE EXPRESSION OF FREEZING BUT NOT THE INDUCTION OF LABILITY 70

SUPPLEMENTARY FIGURE 1: MODELS OF THE INDUCTION OF PLASTICITY 90

SUPPLEMENTARY FIGURE 2: SCHEMATIC REPRESENTATION OF CANNULA PLACEMENTS FOR ANIMALS INCLUDED IN THE STATISTICAL ANALYSES 91

SUPPLEMENTARY FIGURE 3: EXAMINATION OF DRUG DIFFUSION BY DYE SPREAD 92

SUPPLEMENTARY FIGURE 4: IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF PTZ-INDUCED FOS PROTEIN LEVELS AFTER ANISOMYCIN INFUSION 93

SUPPLEMENTARY FIGURE 5: AUTORADIOGRAPHIC EVALUATION OF PROTEIN SYNTHESIS INHIBITION AFTER INTRA-BLA ANISOMYCIN INFUSION, SHOWING GREATER INHIBITION IN THE TARGET AREA (BLA) THAN THE ADJACENT CE NUCLEUS 94

SECOND MANUSCRIT

FIGURE 1. ANISOMYCIN IMPAIRED EXPRESSION OF AUDITORY FEAR MEMORY.....	136
FIGURE 2. RETRIEVAL OF AUDITORY FEAR MEMORY INDUCED PHOSPHORYLATION OF GLUR1-SER845.....	137
FIGURE 3. THE NMDAR ANTAGONIST IFENPRODIL DECREASED GLUR SER845 PHOSPHORYLATION DURING RETRIEVAL BUT DID NOT AFFECT GLUR1 AMOUNT AT THE PSD ..	138
FIGURE 4. THE NMDAR ANTAGONIST IFENPRODIL RESCUED ANISOMYCIN-INDUCED DECREASE OF POST-SYNAPTIC GLUR1 AND BEHAVIORAL EXPRESSION OF CONDITIONED FEAR	139
FIGURE 5. PROPOSED MODEL FOR NMDAR-REGULATED POST-SYNAPTIC AMPAR DYNAMICS DURING MEMORY RETRIEVAL	140

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

α CaMKII : α Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II

ABL : amygdale basolatérale

AL : amygdale latérale

AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate

AMPA : AMPA receptor

AMPC : Adénosine mono-phosphate cyclique

AP5 : acide D(—)-2-amino-5-phosphonopentanoïque

BLA : basolateral amygdala

Ce : amygdale centrale ; central amygdala

CNQX : 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione

CREB : cAMP response element binding

CS : conditioned stimulus

ERK : extracellular signal-regulated kinase

GABA : gamma-aminobutyric acid

GluR : glutamate receptor subunit

ISP : inhibiteur de synthèse protéique

LTD : long-term depression

LTM : long-term memory

LTP : long-term potentiation

MAGUK : membrane-associated guanylate kinases

MAPK : mitogen-activated protein kinase

NE : norepinéphrine, norepinephrine

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

NMDAR : NMDA receptor

NR : NMDA receptor subunit

PKA : *cAMP-dependent protein kinase*

PKC : protein kinase C

PLT : potentialisation à long terme

PR-LTM : post-reactivation long-term memory

PR-STM : post-reactivation short-term memory

PSD95 : post-synaptic density 95

PSD-MAGUK : post-synaptic density-95-like membrane-associated guanylate kinases

PSI : protein synthesis inhibitor

PTSD : post-traumatic stress disorders

PTZ : pentamethylenetetrazole

rAMPA : récepteur AMPA

RC : réponse conditionnée

rNMDA : récepteur NMDA

SC : stimulus conditionné

Ser : sérine ; serine

SI : stimulus inconditionné

STM : short-term memory

TARP : transmembrane AMPAR regulatory proteins

US : unconditioned stimulus

VGCC : canaux calcium de type L dépendants du potentiel

REMERCIEMENTS

Je sais déjà, avant de les écrire, que ces quelques mots de remerciements ne sauront exprimer l'étendue de ma gratitude aux personnes dont la présence m'a aidé à concrétiser ce projet. Je pourrai encore moins les nommer toutes...

Je remercie Olivier Bosler, pour m'avoir fait confiance et permis d'emprunter les ponts qu'il a bâti entre la Tunisie et la France, puis entre la France et le Québec ; pour son soutien indéfectible, son intégrité, sa rigueur scientifique et son amitié.

Je tiens à remercier également Guy Doucet, ainsi que les membres du Département de pathologie et biologie cellulaire de l'Université de Montréal, les professeurs, le personnel administratif et scientifique et les étudiants, qui m'ont accueillie au début de mon aventure québécoise. À leurs côtés, j'ai trouvé la chance d'apprendre et la liberté de faire des choix. Leur clémence m'aura donné de tracer ma voie, et leur professionnalisme, des moyens pour la suivre.

Ma reconnaissance s'adresse naturellement aux professeurs et aux administrateurs du programme de sciences neurologiques de l'Université de Montréal, pour la qualité de leur engagement auprès des étudiants, leur enseignement passionné et leur encadrement à la fois bienveillant et mobilisateur. Je remercie tout particulièrement Vincent Castellucci pour avoir accepté d'assumer la direction de cette thèse. Son impartialité, son humanité et son expertise m'ont apporté un soutien inestimable et une immense inspiration.

Certaines personnes au Département de psychologie de l'Université McGill, Karim Nader et les membres de son laboratoire m'ont été d'un appui concret ; je les en remercie sincèrement.

Merci aux membres de ma famille, de France et de Tunisie, qui par delà la distance et la divergence de choix, m'offrent constamment leur soutien et

leurs encouragements. Leurs mots sont autant de rappels que ma mémoire égrène.

Enfin, je voudrais exprimer ma gratitude à ces quelques amies et amis, qui savent le prix de ce travail et qui de leur présence, leur écoute, leur tendresse et leur patience, m'ont accompagnée jusqu'ici.

À la mémoire de mon grand-père, Joseph Boutes.

"Living backwards!" Alice repeated in great astonishment. "I never heard of such a thing!"

"But there's one great advantage in it, that one's memory works both ways."

"I'm sure MINE only works one way," Alice remarked. "I can't remember things before they happen."

"It's a poor sort of memory that only works backwards," the Queen remarked.

Lewis Carroll. *Through the Looking Glass.*

AVANT-PROPOS

Traiter de la mémoire est un exercice difficile, car ses définitions varient selon les contextes conceptuels qui sont en l'occurrence nombreux. Une définition courante réfère à la fois à un stockage d'information mais aussi à l'exercice du rappel, c'est-à-dire la propriété de former une représentation mentale consciente d'une expérience passée, autrement dit, se souvenir. Mais, le plus souvent, la mémoire se manifeste de façon inconsciente, incomplète et altérée, ce qui fait du souvenir une notion complexe et remet en question la qualité de l'encodage et de la conservation de l'information. Toutefois, dans une logique adaptationniste, l'infidélité de certaines mémoires n'est pas forcément une défaillance, car la mémoire est avant tout un moteur d'apprentissage qui permet à un organisme d'adopter des comportements adéquats. Or l'adéquation est à son tour une notion toute subjective. En effet, si les mémoires sont constamment remaniées, c'est qu'il est probablement avantageux d'intégrer des expériences parfois contradictoires en des représentations mentales permettant des réponses comportementales adaptées et/ou cohérentes, quitte à ce que la réalité soit falsifiée.

Assurément, le thème de la mémoire est d'une grande complexité. Afin de satisfaire au principe de concision, je devrai omettre de nombreuses notions et références pertinentes, en espérant tout de même fournir les informations nécessaires à la mise en contexte du sujet de cette thèse.

CHAPITRE I : INTRODUCTION GÉNÉRALE

La mémoire: fonction biologique, perspective adaptative et évolutive

L'existence de mémoire chez des créatures aussi primitives (sur le plan phylogénétique) que les bactéries, les phages et les amibes suggère une définition générale de la fonction mnésique comme étant la capacité de former une représentation interne de certaines variables environnementales, de sorte à pouvoir prédire leur occurrence future et à adopter une réponse adaptée (Casadesus and D'Ari, 2002 ; Saigusa et al., 2008). Ainsi, la mémoire augmente la valence écologique, ce qui explique pourquoi cette fonction s'est complexifiée et perfectionnée au cours de l'évolution. Chez les organismes dotés d'un système nerveux, la mémoire représente un moteur très puissant d'apprentissage et d'adaptabilité. Les fonctions cognitives ont une influence déterminante sur les comportements qui orientent l'évolution animale, les principaux étant la sélection de l'habitat, la recherche et la sélection de nourriture, l'évitement des prédateurs, le choix de partenaires reproducteurs, le comportement social et l'aptitude à modifier ces comportements de façon adaptative (Dukas, 2004 ; Sherry, 2006). La mémoire est une des fonctions cognitives qui sous-tendent ces comportements adaptatifs, mais elle est elle-même source de variabilité phénotypique et de plasticité, ce qui la soumet à la pression sélective. La fonction mnésique s'est diversifiée, bricolée et complexifiée au cours de l'évolution, comme n'importe quelle autre fonction biologique. Par conséquent, l'évolution de cette fonction n'est ni linéaire ni universelle. Or, en neurosciences cognitives, les dimensions évolutionniste et éthologique sont le plus souvent laissées de côté. Cette approche réductionniste est consciente et volontaire. Elle est dictée par la nécessité de simplifier le contexte expérimental pour pouvoir poser des hypothèses simples et réalistes à tester, étant donné la complexité des phénomènes cognitifs (Kandel, 2001 ;

Dudai and Carruthers, 2005). Une autre raison de cette approche réductionniste est de nature historique, puisque l'étude expérimentale de la mémoire a été d'abord l'apanage des psychologues et des cliniciens. Vers le milieu du XX^e siècle, les phénomènes psychologiques ont commencé à infiltrer le champ des neurosciences, ce qui a donné naissance aux neurosciences cognitives, où les mécanismes biologiques de la mémoire sont étudiés, mais les animaux sont utilisés comme des modèles, des substrats biologiques sur fond desquels la mémoire est étudiée et non pas des sujets d'étude éthologique. Une discipline récente, la neuroécologie, étudie les fonctions cognitives dans une perspective évolutionniste, mais elle reste controversée (Sherry and Schacter, 1987 ; Bolhuis and Macphail, 2001, 2002 ; Hampton et al., 2002). Dans la présente thèse, la mémoire est abordée selon l'approche réductionniste.

La mémoire : perspective historique des neurosciences cognitives

L'émergence de la mémoire comme objet d'étude dans les sciences cognitives modernes date de la fin du XIX^e siècle. Hermann Ebbinghaus a soumis ses propres facultés mnésiques à une expérimentation rigoureuse afin de déduire de façon expérimentale les premières lois relatives à la dynamique de la mémoire (*in* Lieberman, 2004). À la même époque, Théodule Ribot, dans son ouvrage *Les maladies de la mémoire* (1881), livre une analyse originale, une réflexion éclairée et une perspective visionnaire. Ses travaux ont pavé la voie de la psychologie clinique et expérimentale du XX^e siècle. Ribot s'est basé sur l'observation des pathologies de la mémoire, en particulier l'amnésie, pour extraire les lois qui régissent la fonction mnésique. Sa description du gradient rétrograde de l'amnésie a été déterminante non seulement pour la psychologie clinique, mais aussi pour amorcer la recherche expérimentale étudiant la mémoire chez des modèles animaux. Ainsi, en cas d'amnésie consécutive à un traumatisme, Ribot observait que les mémoires étaient d'autant plus fragiles qu'elles étaient récentes et vice-versa, soulignant le fait que les mémoires se

stabilisent progressivement. En 1900, Müller et Pilznecker (Müller and Pilzecker, 1900) utilisent pour la première fois le terme « consolidation » pour désigner la fenêtre de temps nécessaire à toute mémoire récente avant de devenir stable. Le concept de consolidation fait depuis consensus pour ce qui est de la fragilité initiale de la mémoire. En effet, avant la consolidation, une amnésie expérimentale peut être induite par des moyens aussi divers que les électrochocs, l'hypothermie, ou l'injection systémique ou locale d'inhibiteurs de synthèse protéique, de catécholamines, de toxines et autres agents amnésiants. Ainsi, chez toutes les espèces étudiées, la transition d'une trace mnésique d'un état initial instable à un état fixe nécessite un certain temps, variant de plusieurs minutes ou heures au niveau cellulaire, à plusieurs jours ou années au niveau systémique. Une fois la consolidation terminée, les agents amnésiants restent sans effet, de sorte que la trace mnésique est considérée comme étant fixe.

Une découverte fondamentale a toutefois remis en cause le concept de consolidation tel qu'initialement énoncé. En 1968, une étude utilisant le conditionnement de peur auditive chez le rat démontre qu'une amnésie peut être induite par des chocs électroconvulsifs à condition que la mémoire consolidée soit réactivée juste avant le traitement amnésiant (Misanin et al., 1968). Un nouveau modèle est alors proposé par Donald Lewis, stipulant que la trace mnésique redevienne instable ou labile suite au rappel, nécessitant une nouvelle phase de consolidation (Lewis, 1979). Ce modèle suggère qu'une trace mnésique puisse exister sous 2 états mutuellement exclusifs : actif ou inactif. L'état actif est caractérisé par une labilité attestée par la sensibilité aux agents amnésiants. Il s'agit de la période subséquente à l'acquisition d'une nouvelle mémoire, ou au rappel d'une mémoire consolidée. L'état inactif est défini par une stabilité de la trace mnésique, autrement dit une insensibilité aux traitements amnésiants. Cet état inactif est atteint une fois que la mémoire est consolidée et il est maintenu tant et aussi longtemps qu'elle n'est pas rappelée.

Le modèle de Lewis s'oppose au modèle classique de consolidation entre autres par le fait qu'il ne considère pas la stabilisation de la trace mnésique comme un gradient à accroissement linéaire. Il propose plutôt que la mémoire oscille entre des états de stabilité et de labilité, selon qu'elle est inactive ou active, respectivement. De ce modèle découle le concept de « réactivation » qui désigne le passage de la trace mnésique d'un état inactif à un état actif. Étrangement, le phénomène de reconsolidation découvert en 1968 a eu très peu d'écho pendant une trentaine d'années (Judge and Quartermain, 1982), peut-être parce qu'il a été contesté assez rapidement (Dawson and McGaugh, 1969) et que le dogme de la consolidation était trop fort à l'époque. La propriété de certaines mémoires de retourner à un état de labilité transitoire suite à leur réactivation a été redécouverte par (Przybylski and Sara, 1997) puis par (Nader et al., 2000), ce qui a relancé le concept de reconsolidation et en a fait une thématique de recherche à part entière. Des phénomènes de reconsolidation ont été observés chez de nombreuses espèces, telles que *C. elegans* (Rose and Rankin, 2006), la lymnée (Sangha et al., 2003), le crabe (Pedreira et al., 2002), le mouton (Perrin et al., 2007), l'homme (Forcato et al., 2007 ; Hupbach et al., 2007) et, bien sûr, la souris (Bozon et al., 2003 ; Inda et al., 2005) et le rat (Nader et al., 2000 ; Gruet et al., 2004 ; Lee et al., 2004). De nombreuses études ont tenté de démontrer que la reconsolidation était une récapitulation de la consolidation au niveau moléculaire et parfois au niveau systémique, jusqu'à ce que des différences qualitatives ou quantitatives entre consolidation et reconsolidation soient démontrées dans chaque système analysé (Lee et al., 2004 ; Alberini, 2005 ; von Herten and Giese, 2005). De plus, le concept de reconsolidation est controversé parce qu'une mémoire, aussi « nouvelle » soit-elle, vient toujours se greffer sur un système lui-même façonné par des expériences passées. En ce sens, l'encodage d'une expérience n'est rien de plus qu'une modification physiologique additionnelle, en réponse aux inputs sensoriels. Par ailleurs, le fait que la mémoire soit mesurée sur la base de critères comportementaux, ce qui est une évaluation indirecte, peut donner

l'illusion que la trace soit reconstruite à l'identique lorsque la réponse comportementale reste inchangée après la reconsolidation. Or, le rappel d'une mémoire constitue une expérience en tant que telle, que la réponse comportementale soit modifiée ou pas. Par conséquent, la trace mnésique est potentiellement affectée à chaque rappel. Pour des revues complètes, voir (Dudai, 2004 ; Miller and Sweatt, 2006 ; Riccio et al., 2006 ; Sara and Hars, 2006). Il est désormais clair que la reconsolidation n'est pas une répétition de la consolidation, au sens où l'engramme est toujours affecté par le rappel, même si cela ne se manifeste pas toujours par des changements comportementaux. C'est pour cette raison que certains considèrent la consolidation de l'engramme comme un processus perpétuel, dont il est difficile de déterminer le début et encore moins la fin, rendant le concept de reconsolidation quelque peu superflu. Par contre, au-delà de la controverse autour du concept de reconsolidation, il est communément admis que la réactivation de la mémoire, ou le rappel, constitue un événement déterminant pour le devenir de la trace mnésique. Cet aspect de la dynamique de l'engramme a été longtemps négligé, parce que l'étude des mécanismes d'acquisition et de stabilisation était primordiale. **La présente thèse espère contribuer à une meilleure compréhension de la dynamique du rappel en utilisant un modèle animal de mémoire émotionnelle.**

Description de la dynamique de la trace mnésique

Une des difficultés de l'étude de la dynamique de la mémoire tient à la nature abstraite de celle-ci, puisqu'il ne s'agit pas d'une variable directement observable. En expérimentation animale, la mémoire est attestée par la mesure d'une réaction physiologique et/ou comportementale sans savoir si cela s'accompagne de l'évocation d'un souvenir explicite. De plus, certains changements qualitatifs ne se reflètent pas dans la variable mesurée et peuvent passer inaperçus. C'est pour cette raison, entre autres, qu'il est important de pouvoir étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires de la mémoire, car parfois deux réponses comportementales identiques peuvent émaner de deux

dynamiques moléculaires distinctes de la trace mnésique, tel que l'illustreront les résultats expérimentaux présentés dans cette thèse. Ainsi la signature moléculaire pourrait permettre de distinguer des mémoires qualitativement distinctes, que la réponse comportementale ne permet pas de différencier. Ceci enrichirait notre compréhension des mécanismes neurobiologiques du traitement de l'information, mais comporterait aussi des implications cliniques quant au traitement des déficits cognitifs associés aux maladies neurodégénératives, ainsi que des troubles anxieux rattachés aux mémoires traumatiques, tels les phobies, les syndromes de stress post-traumatique, etc.

La trace mnésique est divisée en plusieurs phases, définies selon un critère temporel (modèle proposé par Atkinson et Shiffrin en 1968*) :

1. La mémoire sensorielle : d'une durée très brève, de l'ordre de millisecondes à quelques secondes au maximum. Elle correspond à l'expérience sensorielle en tant que telle.
2. La mémoire à court terme : de quelques minutes à quelques heures. Elle ne nécessite pas de transcription génique ni de synthèse protéique.
3. La mémoire à long terme : peut durer plusieurs jours ou beaucoup plus longtemps, parfois toute la vie de l'individu. La formation de cette mémoire est altérée par les traitements amnésiants administrés peu de

* Le modèle initial proposait une transition linéaire entre ces 3 formes de mémoire. Cette partie du modèle a été mise en doute depuis, tel qu'il sera expliqué plus loin. Par contre la catégorisation de la mémoire selon le critère temporel reste valide.

temps après l'acquisition. Par contre une fois consolidée, la mémoire à long terme résiste aux agents amnésiants classiques.

Selon Lewis, la trace mnésique se constituerait à la vitesse de l'impulsion neuronale, c'est-à-dire que l'expérience sensorielle suffirait à imprimer une mémoire (Lewis, 1969). Il propose que les mécanismes qui nécessitent un temps plus prolongé servent à mettre en place des indices de rappel pour que la mémoire soit accessible à un temps ultérieur. Étant donné que la trace mnésique passe par des états actifs et inactifs et que des mécanismes distincts entrent en jeu tout au long de la vie de l'engramme, il est important de reconnaître quel mécanisme est affecté par le traitement administré. La figure 1 (p. 9) illustre par des exemples le lien entre le moment de l'administration du traitement pharmacologique, le délai attendu avant le test comportemental et le mécanisme affecté par le traitement.

Aux débuts de la psychologie cognitive, la mémoire était évaluée par la réponse comportementale et non pas par sa nature biochimique. Comme les agents amnésiants étaient administrés juste avant ou après l'acquisition et comme ils bloquaient la mémoire à long terme sans affecter la performance du rappel à court terme, la consolidation a d'abord été considérée comme une stabilisation progressive de la trace à court terme. Il est désormais clair que les mémoires à court et à long terme sont encodées par des traces moléculaires parallèles et distinctes (pour revue voir Sossin, 2008). Par exemple chez l'Aplysie, une facilitation à long terme des synapses reliant les neurones sensoriels et les neurones moteurs de la queue peut être induite en stimulant sélectivement les corps cellulaires des neurones sensoriels avec la sérotonine, sans facilitation synaptique à court terme (Emptage and Carew, 1993). De même chez la souris, la désactivation du gène codant pour la sous-unité GluR1 du récepteur α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate (rAMPA) altère la mémoire spatiale à court terme sans affecter la mémoire à long terme dans un même paradigme expérimental, ce qui démontre que la mémoire à court terme

n'est pas toujours un pré-requis ni un « croquis » indispensable à la mémoire à long terme (Schmitt et al., 2003). Évidemment, le fait que l'on puisse expérimentalement dissocier les traces mnésiques à court et à long termes n'est pas une preuve qu'elles soient réellement indépendantes en condition normale. La question reste à élucider. Pour cela il faudrait identifier la nature moléculaire de chacune de ces traces mnésiques, afin de déterminer si la trace à court terme est convertie en trace stable sur le long terme, ou bien si les deux traces sont des signatures moléculaires distinctes établies indépendamment l'une de l'autre.

En résumé de cette première section, il nous semble important de mieux comprendre la dynamique moléculaire de la trace mnésique, de même que le rôle du rappel dans l'évolution de l'engramme, tant pour connaître les mécanismes neurobiologiques de la mémoire que pour les applications cliniques qui peuvent en découler.

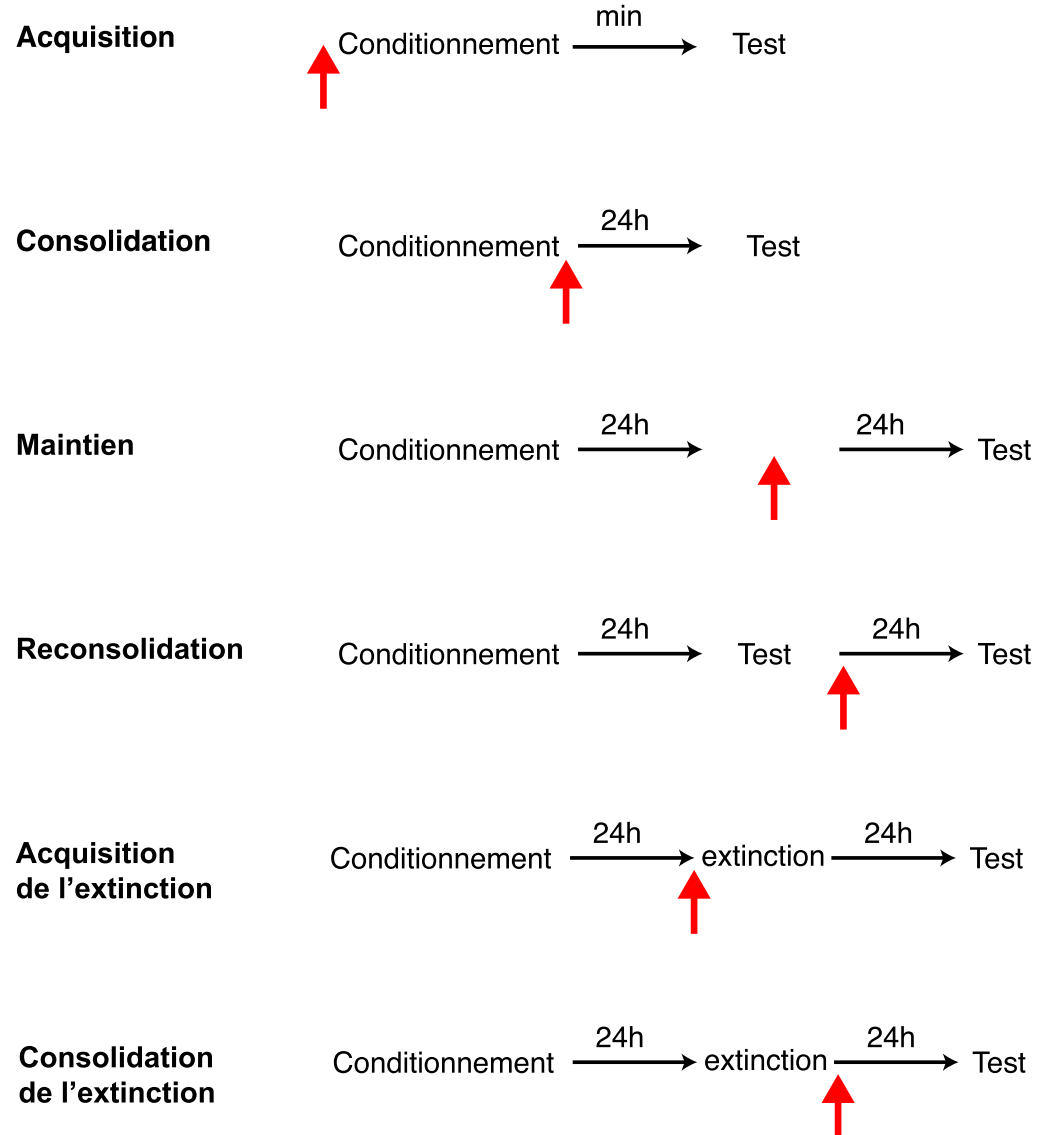


Figure 1. Représentation schématique visant à illustrer le lien entre le moment où un traitement amnésiant est administré et le mécanisme affecté. En utilisant un même modèle comportemental, il est possible d'étudier différentes étapes d'encodage de la mémoire, en variant simplement le moment du traitement (flèche rouge) ainsi que le délai entre le traitement et le test. Si la réponse comportementale durant le test subséquent au traitement est affectée, cela signifie que le traitement a interféré avec un processus qui avait cours entre le moment de l'administration du traitement et le test.

 : traitement

Modèle d'étude: la mémoire de peur auditive chez le rat

Choix du modèle

Un défi majeur est de comprendre comment une expérience est traitée et mémorisée par le système nerveux. Donald Hebb a imaginé un modèle qu'il a nommé assemblage cellulaire, pour conceptualiser l'intégration d'information par les réseaux neuronaux (Hebb, 1949). Ce modèle stipule que la co-activation concomitante et soutenue de deux cellules nerveuses entraîne le renforcement de leurs contacts synaptiques réciproques. Ceci implique que la mémoire soit encodée par un réseau de neurones interconnectés par des synapses qui ont été potentialisées. Du temps de Hebb, il n'y avait pas de substrat biologique pour valider son modèle. La preuve physiologique de mécanismes synaptiques de potentialisation à long terme (PLT) a été apportée par le modèle de Bliss et Lomo (Bliss and Lomo, 1973). Ce modèle a été révélé par la stimulation à haute fréquence des afférences de l'hippocampe, qui entraîne une augmentation durable de la transmission synaptique. Depuis, la plasticité synaptique à long terme, qu'il s'agisse de potentialisation ou de dépression, a été démontrée dans de nombreuses structures, comme étant nécessaire, mais non suffisante, à l'acquisition et au maintien d'une mémoire. L'encodage et le stockage de mémoire impliquent des changements du nombre, de la structure et de la fonction des synapses (Bailey and Kandel, 1993 ; Sutton and Schuman, 2006 ; Derkach et al., 2007 ; Helmstetter et al., 2007). D'autres possibilités incluent des changements de l'excitabilité neuronale intrinsèque, mais il est désormais difficile d'imaginer que les mécanismes mnésiques ne comportent pas de plasticité synaptique. Idéalement, il faudrait pouvoir analyser ces mécanismes cellulaires au sein des structures dont l'implication dans l'encodage et le maintien de mémoire à long terme a été démontrée. Il faudrait également que ces mécanismes de plasticité synaptique puissent être reliés à un comportement. Un des modèles expérimentaux qui répond le mieux à ces critères est le conditionnement associatif de peur.

La peur est une émotion très répandue dans le monde animal. Elle a une forte valeur adaptative, car elle est un signal de danger et provoque une réaction de défense. La peur peut être innée, évoquée par exemple par l'odeur de certains prédateurs, ou bien acquise par apprentissage. Le modèle de peur auditive utilisé dans la présente étude est un exemple de conditionnement Pavlovien, dit aussi conditionnement classique, le paradigme expérimental le plus utilisé pour étudier la mémoire de peur acquise.

Le conditionnement Pavlovien

Le conditionnement Pavlovien est un des phénomènes les plus étudiés de la psychologie moderne (Rescorla, 1988). Dans le domaine des neurosciences, c'est un modèle couramment utilisé pour l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires de la mémoire. Initialement considéré comme un mécanisme régissant les comportements simples ou de premier degré, le conditionnement s'est révélé être à la base de tout apprentissage, puisqu'il consiste à établir des liens associatifs entre des éléments de l'environnement, de sorte à former une représentation interne de ce dernier et à pouvoir prédire efficacement les récurrences éventuelles d'une situation présente. Ainsi, même les phénomènes cognitifs les plus complexes sont régis à la base par des mécanismes associatifs, à la différence qu'ils impliquent des associations plus complexes sur le plan temporel et anatomique qu'un conditionnement Pavlovien classique.

Du conditionnement Pavlovien découle la définition de l'apprentissage, qui serait un changement physiologique et/ou comportemental durable, établi suite à la détection par l'organisme d'une association causale entre au moins deux stimuli contingents mais pas nécessairement contigus. Dans un contexte de conditionnement Pavlovien, l'association se forme entre un stimulus initialement neutre et un stimulus inconditionné (SI) qui a la propriété intrinsèque de déclencher une réaction émotionnelle et comportementale.

L'exposition d'un animal à ces deux stimuli de façon couplée et répétée augmente la probabilité d'association, de sorte que l'exposition au stimulus neutre déclenchera éventuellement la même réaction que le stimulus inconditionné, ou réaction conditionnée (RC). Le stimulus neutre est alors qualifié de stimulus conditionné (SC). Dans les études comportementales utilisant les rongeurs comme modèle, le SC est généralement un stimulus acoustique ou visuel et le SI est un choc électrique délivré par le plancher et donc un stimulus nociceptif perçu par les pattes. La RC comprend un certain nombre de manifestations, telles que le figeage (immobilité) (Fendt and Fanselow, 1999), des réflexes musculaires (sursaut) (Davis et al., 1993), l'émission d'ultrasons de détresse (Kikusui et al., 2003 ; Borta et al., 2006), l'augmentation de la pression artérielle, de la fréquence cardiaque et respiratoire (Borta et al., 2006), l'émission d'urine et de fèces (Godsil et al., 2000).

Ce paradigme expérimental est utilisé pour étudier les mécanismes associatifs de mémoire, mais aussi les mécanismes neurologiques des émotions (LeDoux, 1995). C'est également un modèle animal du syndrome de stress post-traumatique (Bremner et al., 1995), des troubles anxieux et des phobies (Garakani et al., 2006).

Neurobiologie de la mémoire de peur auditive

Le conditionnement de peur est acquis de façon très rapide (une seule exposition à un couplage SC-SI suffit) ; il est persistant, comprend des stimuli et des réponses bien définis, est largement présent dans le règne animal, et implique des circuits neuronaux similaires chez les vertébrés. Pour toutes ces raisons, il a émergé comme un modèle expérimental de choix dans l'étude des mécanismes neurobiologiques de la mémoire (LeDoux, 2000).

Mécanismes associatifs et potentialisation à long terme

Le complexe de l'amygdale basolatérale (ABL), qui comprend les noyaux latéral et latérobasal, est largement reconnu comme nécessaire à l'acquisition d'une mémoire de peur auditive par l'intermédiaire de mécanismes associatifs, ainsi qu'à son stockage et à son expression (LeDoux, 2000 ; Maren, 2001). L'amygdale occupe un rôle central dans la modulation émotionnelle de l'attention et des fonctions cognitives (Pessoa, 2008). Sa connectivité avec le reste du cerveau est très étendue (Aggleton, 2000). Je ne décrirai ici que les connexions pertinentes au conditionnement de peur auditif. Le noyau latéral de l'amygdale (AL) reçoit un input auditif et somatosensoriel représentant le SC et le SI respectivement, en provenance du thalamus (LeDoux et al., 1984, 1990a, 1990b ; Doron and Ledoux, 1999, 2000) et du cortex (Mascagni et al., 1993 ; Romanski and LeDoux, 1993 ; Shi and Cassell, 1997 ; McDonald, 1998). L'information sensorielle est relayée de l'AL vers le noyau central de l'amygdale (Ce) par des projections directes et indirectes (via le noyau basal et les noyaux intercalés) (Paré et al., 1995 ; Pitkanen et al., 1997 ; Royer et al., 1999). Le Ce projette à son tour vers l'hypothalamus et le tronc cérébral pour commander des réponses neuroendocrines et comportementales de peur (LeDoux et al., 1988 ; Davis, 2000). Des enregistrements électrophysiologiques montrent que le conditionnement de peur chez le rat éveillé induit une potentialisation dans l'AL, de façon similaire à la PLT (Rogan et al., 1997). Cependant, des études récentes suggèrent que ce n'est pas seulement le noyau latéral, mais aussi le latérobasal, le médiobasal et même le noyau central qui pourraient abriter des fonctions associatives de façon parallèle (Everitt et al., 2003 ; Paré et al., 2004). Néanmoins, c'est dans l'ABL et particulièrement dans l'AL que les mécanismes associatifs ont été clairement décrits.

Bien que le modèle synaptique de mémoire de peur repose essentiellement sur des mécanismes de plasticité post-synaptique, il est clair que la PLT est exprimée en partie par des modifications présynaptiques dans

l'AL (Huang and Kandel, 1998). La PLT associative dans l'AL peut être soutenue par l'activation de récepteurs N-méthyl-D-aspartate (rNMDA) présynaptiques et par une augmentation de probabilité de décharge présynaptique (Humeau et al., 2003). La plasticité présynaptique de l'AL contribuerait à la mémoire de peur (McKernan and Shinnick-Gallagher, 1997 ; Tsvetkov et al., 2002 ; Apergis-Schoute et al., 2005). Il semblerait que l'induction de la plasticité implique des mécanismes pré- et post-synaptiques, que les connexions entre le thalamus et l'AL soient potentialisées via des mécanismes post-synaptiques (Humeau et al., 2005), alors que les afférences corticales exprimeraient la plasticité par des modifications pré-synaptiques (Huang and Kandel, 1998 ; Humeau et al., 2003).

Les neurones principaux de l'AL sont des neurones pyramidaux recevant des projections glutamatergiques (LeDoux and Farb, 1991 ; Farb et al., 1992). Les épines dendritiques recevant ces terminaisons glutamatergiques contiennent des récepteurs canaux de type AMPA et NMDA (Farb et al., 1995 ; Farb and LeDoux, 1997 ; Farb and Ledoux, 1999). Les récepteurs AMPA et NMDA contribuent aux potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE) évoqués dans les neurones de l'AL en réponse à la stimulation des inputs auditifs présynaptiques (Li et al., 1995 ; Li et al., 1996 ; Weisskopf and LeDoux, 1999). Ceci démontre que les afférences auditives de l'AL possèdent la machinerie nécessaire à la PLT.

Une série d'indices désignent l'AL comme site-clé de plasticité associative impliquée dans la mémoire de peur et donc site critique d'association et de renforcement synaptique entre l'afférence relative au SC et l'efférence qui commande les réponses de peur:

1. Les lésions de l'AL empêchent l'acquisition et l'expression de la mémoire de peur associée à un SC auditif (LeDoux et al., 1990a ; Goosens and Maren, 2001), ce qui démontre que l'AL est une

composante anatomique essentielle du circuit qui sous-tend l'association SC-SI.

2. L'inactivation de l'AL par infusion de muscimol (agoniste de GABA) pendant le conditionnement empêche l'acquisition de la réponse conditionnée (Helmstetter and Bellgowan, 1994 ; Muller et al., 1997), ce qui démontre que cette structure a besoin d'être active pendant le conditionnement pour que la mémoire de peur s'établisse.
3. Les projections relayant le SC auditif et le SI nociceptif convergent sur les mêmes neurones dans l'AL, ce qui signifie que les neurones de l'AL peuvent être un substrat de potentialisation entre les afférences auditives et les neurones efférents de l'AL qui commandent la réponse de peur (Romanski et al., 1993).
4. La réponse évoquée dans l'AL par le SC auditif est augmentée lorsque le SC est couplé avec le SI, ce qui confirme le postulat associatif (Quirk et al., 1995, 1997 ; Collins and Pare, 2000 ; Maren, 2000).
5. L'inhibition de synthèse protéique dans l'ALB empêche la consolidation de la mémoire associative de peur auditive (Schafe and LeDoux, 2000).

En résumé, le conditionnement de peur augmente la réponse des neurones de l'AL au SC et ce, uniquement quand il y a contingence entre SC et SI. La plasticité dans l'AL se développe en même temps que le conditionnement, et elle reflète bien l'association SC-SI et non pas l'expression de la réponse de peur en elle-même (Maren and Quirk, 2004). Les données électrophysiologiques et pharmacologiques suggèrent que des mécanismes de PLT associative se produisent dans l'AL *in vitro* et *in vivo* et que le conditionnement de peur et la PLT dépendent de mécanismes similaires, impliquant l'action combinée des rNMDA et de canaux aux calcium de type L

dépendants du potentiel (VGCC) (Martin et al., 2000 ; Blair et al., 2001 ; Schafe et al., 2001 ; Bauer et al., 2002). Voici le scénario simplifié d'un mécanisme d'induction probable de mémoire de peur associative dans l'ABL (pour des revues originales complètes, voir Martin et al., 2000 ; Blair et al., 2001 ; Schafe et al., 2001 ; Maren and Quirk, 2004 ; Paré et al., 2004 ; Sigurdsson et al., 2007) : lors du conditionnement de peur auditive, l'input sensoriel auditif induirait une libération de glutamate par les terminaisons en contact avec les neurones pyramidaux de l'AL, provoquant des PPSE, mais pas de dépolarisation du neurone post-synaptique, car l'input auditif vers l'amygdale est trop faible (Rainnie et al., 1991 ; Li et al., 1995, 1996 ; Weisskopf and LeDoux, 1999). Le glutamate se lierait aux rNMDA, mais ces derniers ne conduiraient pas de flux calcique à cause du bloc de Mg^{2+} qui ne peut être levé qu'en cas de dépolarisation membranaire. Par contre, l'input sensoriel relayant le SI nociceptif produirait une dépolarisation des neurones post-synaptiques dans l'AL par activation des canaux VGCC (Huang and Kandel, 1998 ; Tsvetkov et al., 2002). Cette dépolarisation se propagerait aux dendrites voisines, dont celles qui reçoivent l'input auditif, provoquant une levée du bloc de Mg^{2+} au niveau des rNMDA. Ces derniers produiraient une entrée massive de Ca^{2+} avec pour conséquence une potentialisation des connexions entre l'input auditif du SC et les neurones post-synaptiques de l'AL qui se projettent à leur tour sur le noyau central (directement et indirectement via le noyau latérobasal) et commandent la réponse de peur activée par le SI (Rizvi et al., 1991 ; Amorapanth et al., 2000). La potentialisation se produit notamment par le biais d'insertion de rAMPA, en particulier de type GluR1 (Rumpel et al., 2005). De ce fait, le SC a désormais la capacité d'activer les neurones de l'ABL, déclenchant la réponse comportementale provoquée par le SI.

Mécanismes moléculaires

La PLT est un des mécanismes nécessaires à l'induction de mémoire, sans pour autant être suffisante (Martin et al., 2000). La PLT est dépendante de l'augmentation de calcium dans le compartiment post-synaptique. Les mécanismes moléculaires ont été les mieux décrits *in vitro* dans les neurones de l'hippocampe et sont moins bien connus dans l'amygdale. Certains mécanismes sont communs aux deux structures, mais d'autres divergent sensiblement (Chapman et al., 2003 ; Lynch, 2004 ; Citri and Malenka, 2008). L'activation des rNMDA dans l'ABL pendant l'acquisition de la mémoire de peur est nécessaire : l'administration d'un antagoniste aux rNMDA avant l'entraînement bloque la formation de la mémoire de peur (Miserendino et al., 1990 ; Campeau et al., 1992 ; Maren, 1996 ; Gewirtz and Davis, 1997 ; Lee and Kim, 1998 ; Walker and Davis, 2000 ; Fendt, 2001 ; Lee et al., 2001 ; Rodrigues et al., 2001 ; Matus-Amat et al., 2007). Le flux de Ca^{2+} active des cascades intracellulaires qui font intervenir des éléments locaux (dendritiques) mais aussi l'activation de facteurs de transcription, la transcription de gènes et la traduction de protéines (Soderling, 2000 ; Mellstrom and Naranjo, 2001). En particulier, dans les dendrites, l'augmentation de Ca^{2+} active la kinase α CaMKII (αCa^{2+} /calmodulin-dependent kinase II) et la PKC (*Protein kinase C*) qui à leur tour vont phosphoryler une série de substrats (Klann et al., 1991 ; Soderling and Derkach, 2000 ; Yamauchi, 2005). De plus, ces deux kinases ont la propriété de s'autophosphoryler, ce qui pourrait être un mécanisme de maintien de la mémoire à court terme (Klann et al., 1991 ; Soderling and Derkach, 2000 ; Yamauchi, 2005). Dans l'amygdale, l'infusion d'un inhibiteur de α CaMKII avant le conditionnement de peur empêche l'acquisition et la formation de mémoire à long terme mais aussi à court terme (Rodrigues et al., 2004). Dans l'hippocampe, un des effets de l'activation de la α CaMKII est notamment la phosphorylation des récepteurs AMPA au résidu sérine831 de la sous-unité GluR1, ce qui augmente leur insertion membranaire et participe à la

potentialisation des synapses (Lee et al., 2000 ; Merrill et al., 2005). Bien que l'effet de l'activation de la α CaMKII sur la phosphorylation de GluR1 dans l'amygdale soit mal connu, il semblerait que la mémoire de peur associative nécessite l'activation de cette kinase dans l'ABL (Moriya et al., 2000 ; Rodrigues et al., 2004). Une autre conséquence de l'influx de Ca^{2+} est l'augmentation intracellulaire d'AMPC et l'activation de kinases telles que la PKA (*cAMP-dependent protein kinase*) et les ERK/MAPK (*extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase*). La PKA va phosphoryler le résidu sérine845 de la sous-unité GluR1 des rAMPA, ce qui régule le trafic des rAMPA (Esteban et al., 2003 ; Man et al., 2007). Par ailleurs, il en résulte une activation du facteur de transcription CREB (*cAMP response element binding*), qui contrôle l'expression de nombreux gènes responsables de modifications structurelles nécessaires à la stabilisation de la mémoire à long terme (Silva et al., 1998 ; Josselyn and Nguyen, 2005). Une des conséquences remarquables de la plasticité synaptique à long terme est le changement durable de la puissance synaptique, grâce à la modification de la composition en rAMPA de la membrane post-synaptique (Malinow and Malenka, 2002 ; Malenka, 2003). Selon de nombreuses études *in vitro*, les synapses seraient potentialisées grâce à l'augmentation de la densité membranaire des rAMPA post-synaptiques, mais aussi par le recrutement accru de rAMPA contenant la sous-unité GluR1, ces derniers ayant une plus grande conductance que les récepteurs contenant les sous-unités GluR2 et GluR3 (Kolleker et al., 2003 ; Malenka et al., 2003 ; Oh et al., 2006 ; Kopec et al., 2007). Des modifications analogues sont observées *in vivo*, au cours de l'apprentissage et de la consolidation de la mémoire de peur : tel que détaillé en pages 21 à 24, l'augmentation de la densité membranaire de GluR1 dans les synapses de l'amygdale est indispensable au conditionnement associatif de peur (Rumpel et al., 2005 ; Yeh et al., 2006 ; Humeau et al., 2007). Enfin, l'activation des récepteurs AMPA est nécessaire à l'expression de la mémoire de peur conditionnée (Davis et al., 1993 ; Kim et al., 1993).

Données relatives à la pharmacologie des rNMDA

Les rNMDA sont activés par le glutamate avec la glycine comme co-agoniste. Le pore du canal est normalement obstrué par l'ion Mg^{2+} , qui est éliminé en cas de dépolarisation, permettant alors le passage du flux de Ca^{2+} . Ces propriétés font des rNMDA des détecteurs de coïncidence d'activité pré- et post-synaptique. L'implication des rNMDA dans la potentialisation synaptique et l'acquisition de mémoire de peur est attestée par le blocage de ces fonctions en cas de traitement de l'ABL avec un antagoniste des rNMDA (Miserendino et al., 1990 ; Campeau et al., 1992 ; Gewirtz and Davis, 1997 ; Walker and Davis, 2000 ; Rodrigues et al., 2001 ; Goosens and Maren, 2004 ; Matus-Amat et al., 2007). De plus, l'inhibition pharmacologique des kinases qui sont couplées aux rNMDA, telles que α CaMKII, ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), PKA et MAPK, empêche l'acquisition de la mémoire de peur, ce qui confirme que l'activation des rNMDA est primordiale (Huang et al., 2000 ; Schafe et al., 2000 ; Rodrigues et al., 2004). Cependant, le choix du type d'antagoniste pour les rNMDA peut influencer les résultats comportementaux, du fait de propriétés pharmacologiques différentes.

Les rNMDA sont des hétéromères de sous-unités NR1, NR2A-NR2D et NR3A-NR3B. Les rNMDA fonctionnels sont formés de l'assemblage de la sous-unité NR1 obligatoire et de sous-unités NR2 et/ou NR3. Dans le cerveau adulte, les rNMDA sont constitués de sous-unités NR1 et NR2. Les synapses thalamo-amygaloïdes sont enrichies en NR2B (Radley et al., 2007). Cette sous-unité contribue à la transmission synaptique et à la PLT dans l'amygdale latérale (Miwa et al., 2008), ce qui suppose un rôle dans la plasticité associative lors du conditionnement de peur auditif. D'ailleurs, les rNMDA de type NR1/NR2B sont impliqués préférentiellement dans la formation de la mémoire de peur (Walker and Davis, 2008). Dans les neurones d'hippocampe *in vivo* et *in vitro*, la sous-unité NR2B est la principale activatrice de ERK qui est une des kinases impliquées dans la plasticité synaptique (Krapivinsky et al., 2003).

Comme il existe un antagoniste spécifique de la sous-unité NR2B — l'ifenprodil- il est possible de cibler spécifiquement la sous-population de rNMDA responsable de la plasticité synaptique (Williams, 2001). L'ifenprodil agit soit en stabilisant la forme inactive du canal (Reynolds and Miller, 1989) soit en modifiant l'ouverture (*gating*) du pore ionique (Legendre and Westbrook, 1991). Cet antagoniste agit bien sur les récepteurs synaptiques dans l'amygdale (Szinyei et al., 2003) et bloque spécifiquement l'acquisition de la mémoire de peur : l'infusion d'ifenprodil dans l'ABL avant le conditionnement bloque la mémoire à court et à long terme, tandis que l'infusion avant le rappel d'une mémoire consolidée n'affecte pas l'expression de la réponse conditionnée (Rodrigues et al., 2001). Nous avons donc utilisé l'ifenprodil dans la présente étude, lorsque nous voulions bloquer les rNMDA responsables de la plasticité synaptique dans l'ABL.

Un autre antagoniste des rNMDA couramment utilisé est l'acide D(—)-2-amino-5-phosphonopentanoïque (AP5). C'est un antagoniste sélectif compétitif des rNMDA, mais il bloque tous les rNMDA indépendamment des sous-unités qui les composent (Watkins and Olverman, 1987). L'effet de l'AP5 sur l'expression de la réponse de peur conditionnée est variable d'une étude à l'autre. Certaines études ont montré un blocage de l'expression de la mémoire de peur sous l'effet de l'AP5 (Maren, 1996 ; Lee and Kim, 1998 ; Fendt, 2001 ; Lee et al., 2001), tandis que d'autres rapportent un effet sélectif de cet antagoniste sur l'acquisition, n'affectant pas l'expression de la réponse de peur (Miserendino et al., 1990 ; Campeau et al., 1992 ; Davis et al., 1993 ; Gewirtz and Davis, 1997 ; Walker and Davis, 2000 ; Matus-Amat et al., 2007). Nous avons utilisé cet antagoniste pour vérifier certains effets obtenus avec l'ifenprodil.

Rôle du trafic des rAMPA de l'ABL dans la mémoire de peur

Comme les rNMDA, les rAMPA sont des récepteurs canaux activés par le glutamate. Ils sont responsables de la majorité de la neurotransmission excitatrice. Ce sont des récepteurs tétramériques constitués de l'assemblage de quatre sous-unités GluR1 à GluR4. La composition en sous-unités détermine les propriétés électrophysiologiques du récepteur. Les sous-unités sont synthétisées soit dans le corps cellulaire, soit localement dans les dendrites. L'acheminement des rAMPA vers les synapses se fait grâce aux TARP (*transmembrane AMPAR regulatory proteins*) (Tomita et al., 2003 ; Ziff, 2007) et leur stabilisation synaptique grâce aux PSD-MAGUK (*post-synaptic density-95-like membrane-associated guanylate kinases*) (Elias et al., 2006). C'est dans les neurones de l'hippocampe que le rôle des rAMPA dans la plasticité synaptique a été le mieux étudié (Malenka, 2003). Généralement, un rAMPA est soit homomérique, soit composé de 2 sortes de sous-unités. La composition des rAMPA est extrêmement variable d'une région anatomique à l'autre, de même qu'elle évolue en fonction du stade développemental. Des études de microscopie électronique en post-enrobage dans l'hippocampe de rat ont montré une corrélation entre le nombre de rAMPA à la densité post-synaptique et la plasticité synaptique à long terme, corroborant le rôle de la redistribution membranaire des rAMPA dans la modification du potentiel synaptique (Moga et al., 2006).

L'antagoniste des rAMPA le plus couramment utilisé est le 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX). C'est un antagoniste sélectif des rAMPA. Le CNQX bloque l'expression de la mémoire de peur conditionnée lorsqu'il est administré avant le rappel (Davis et al., 1993 ; Kim et al., 1993). Nous avons utilisé cet antagoniste dans notre étude.

Une des études les plus informatives sur le rôle des rAMPA dans la potentialisation synaptique dans l'ABL en relation avec la mémoire de peur

auditive est celle de Rumpel et al. (Rumpel et al., 2005). La méthodologie comprend l'infection virale des neurones de l'AL, dans le but d'inoculer un vecteur codant pour divers variants (*constructs*) de la sous-unité GluR1, tagués à la protéine verte fluorescente (*Green Fluorescent Protein*). D'abord, les auteurs de cette étude ont infecté les neurones de l'AL avec un vecteur des sous-unités GluR1 pour biaiser (augmenter) l'expression de récepteurs homomériques. Sachant que les récepteurs homomériques expriment une plus grande rectification de courant, l'incorporation synaptique de ces récepteurs est détectée par une signature électrophysiologique. Après avoir été infectés, les rats ont été conditionnés par association d'un son et d'un choc électrique, puis sacrifiés afin d'étudier les propriétés électrophysiologiques des projections thalamiques vers l'AL. Environ le tiers des neurones de l'AL avaient incorporé les rAMPA homomériques, tel qu'attesté par une plus grande rectification de courant. De plus, une plus grande rectification a été observée dans les amygdales de rats ayant reçu le SC et le SI de façon pairée par comparaison à celles de rats conditionnés de façon non pairée. Ensuite, chez un autre groupe de rats, l'AL a été infectée avec un vecteur exprimant une version tronquée de GluR1, contenant seulement la portion cytoplasmique et jouant le rôle d'un dominant négatif qui entre en compétition avec les GluR1 endogènes, de sorte que ces derniers ne puissent pas participer efficacement à la plasticité synaptique. Malgré des propriétés électrophysiologiques normales, les neurones infectés n'étaient pas capables de maintenir les changements de type PLT induits par le conditionnement associatif. Cet article démontre bien que l'incorporation de récepteurs AMPA contenant la sous-unité GluR1 dans l'AL est nécessaire au maintien de la PLT et au conditionnement de peur auditive.

Une autre étude a démontré le rôle déterminant des rAMPA contenant la sous-unité GluR1 dans l'acquisition et la consolidation du conditionnement de peur : Yeh et al. (2006) ont analysé la cinétique d'expression membranaire de GluR1 par suite du conditionnement de peur. Les rats ont été sacrifiés à divers

intervalles de temps après le conditionnement et les amygdales ont été disséquées pour être soit biotinylées *in vitro* pour marquer les récepteurs présents à la surface membranaire, soit fractionnées pour isoler les synaptoneurosomes. L'analyse par Western blot quantitatif a révélé que les amygdales de rats conditionnés exprimaient une augmentation membranaire et synaptique de GluR1 visible 2 h après le conditionnement et maintenue pendant au moins 24 h. La fraction tissulaire totale de l'amygdale ne démontrait pas de variation significative du niveau de GluR1, donc l'augmentation induite par le conditionnement était restreinte au compartiment synaptique. L'administration bilatérale dans l'ABL d'un antagoniste aux rNMDA, l'acide D(—)-2-amino-5-phosphonopentanoïque (AP5), d'anisomycine ou de l'inhibiteur de la MAP kinase (*mitogen-activated protein kinase*; MAPK) U0126 a aboli l'apprentissage de peur, ainsi que l'augmentation de GluR1 à la surface membranaire et dans les synaptoneurosomes. Yeh et coll. ont également soumis des rats à une inhibition latente, c'est-à-dire à une pré-exposition répétée au SC, qui a la propriété d'empêcher l'apprentissage associatif (Lubow and Moore, 1959). L'inhibition latente a empêché l'augmentation d'expression des GluR1 membranaires et synaptiques. Ensuite, les auteurs de cette étude ont induit une PLT *in vitro* dans l'AL et ont observé 6 h plus tard une augmentation de la densité membranaire de GluR1. Cette augmentation a été abolie en dépotentialisant les synapses par application d'une stimulation de basse fréquence 10 min après l'induction de PLT. Enfin, l'administration d'un inhibiteur du protéasome 30 min avant le conditionnement a augmenté la réponse conditionnée et aussi la densité des GluR1 à la surface membranaire. Les résultats de cette étude illustrent que le couplage SC-SI pendant le conditionnement de peur *in vivo* induit une augmentation des rAMPA membranaires contenant la sous-unité GluR1. Cette augmentation de GluR1 ainsi que l'acquisition de la mémoire de peur nécessitent l'activation des rNMDA au moment du conditionnement. De plus, la consolidation de la mémoire dépend des cascades de signalisation impliquant la MAPK et aussi du

métabolisme protéique, puisque l'anisomycine, un inhibiteur de synthèse protéique, a bloqué la consolidation de la mémoire de peur et l'insertion synaptique de GluR1 sans toutefois affecter la quantité totale de GluR1 dans le tissu. Cette étude confirme que l'acquisition et la consolidation de la mémoire associative de peur induisent une plasticité synaptique initiée par les rNMDA et impliquant un remodelage synaptique, en l'occurrence l'augmentation de la densité membranaire de GluR1.

Très récemment, de nouvelles preuves de l'implication du trafic des rAMPA dans l'acquisition, la consolidation et l'expression de la mémoire de peur associative ont été publiées, notamment le fait que des souris transgéniques GluR1^{-/-} n'étaient pas capables d'acquérir ni de maintenir la mémoire de peur (Humeau et al., 2007). Il s'est avéré impossible d'induire une PLT dans l'ABL en stimulant la voie thalamo-corticale sur des tranches de cerveau issues de ces souris GluR1^{-/-}. De plus, ces souris ne figeaient pas pendant le conditionnement de peur.

En résumé, les récepteurs au glutamate de type NMDA et AMPA occupent une place centrale dans la formation de mémoire de peur auditive. L'activation des rNMDA lors de l'acquisition est nécessaire à l'induction de la plasticité synaptique. Ces récepteurs déclenchent des cascades cellulaires qui aboutissent à la potentialisation des synapses par le biais d'insertion post-synaptique de rAMPA de type GluR1 dans l'ABL. Lors du rappel, l'expression de la réponse conditionnée nécessite l'activation de ces rAMPA. Contrairement aux rNMDA qui ont une double fonction, ionique et métabotrope, les rAMPA sont essentiellement des conducteurs de courant et sont classiquement considérés comme des acteurs passifs de l'expression du potentiel synaptique.

Effet amnésiant des inhibiteurs de synthèse protéique, en particulier l'anisomycine

Les inhibiteurs de synthèse protéique (ISP) ont été, avec les chocs électroconvulsifs et les lésions, un des premiers outils qui ont permis d'étudier la dynamique de la mémoire. Les chocs électro-convulsifs ont été utilisés pendant un temps pour induire des amnésies de façon expérimentale, mais ont été abandonnés (Duncan, 1949 ; Brady, 1952 ; Lewis and Maher, 1965 ; Luttges and McGaugh, 1967 ; Zinkin and Miller, 1967 ; Kohlenberg and Trabasso, 1968 ; Misanin et al., 1968 ; Schneider and Sherman, 1968 ; Dawson and McGaugh, 1969 ; Bohbot et al., 1996). Des agents pharmacologiques de la classe des antibiotiques ont pris le relais. Ayant toutes la propriété d'inhiber la synthèse protéique, l'anisomycine, la puromycine, la rapamycine, l'émétine et la cycloheximide s'avèrent être des agents amnésiants efficaces. Les ISP sont plus spécifiques que les chocs électroconvulsifs, et ils sont réversibles, contrairement aux lésions. L'anisomycine est la plus utilisée, car elle présente la plus grande spécificité et la plus faible toxicité parmi les inhibiteurs de synthèse protéique (Grollman, 1967 ; Squire and Barondes, 1974 ; Flexner and Goodman, 1975 ; Flood et al., 1975a, 1975b ; Bull et al., 1976 ; Davis et al., 1976 ; Squire and Barondes, 1976 ; Dunn and Leibmann, 1977 ; Flood et al., 1977a, 1977b ; Quartermain et al., 1977 ; Davis and Rosenzweig, 1978 ; Flood et al., 1978 ; Davis et al., 1980 ; Flood et al., 1980 ; Grecksch et al., 1980 ; Grecksch and Matthies, 1980 ; Davis and Squire, 1984 ; Castellucci et al., 1986 ; Flood et al., 1986 ; Kameyama et al., 1986 ; Montarolo et al., 1986). L'anisomycine, même en injection systémique, n'affecte pas le comportement locomoteur (Flood et al., 1973). L'effet de l'anisomycine sur la consolidation est proportionnel à la dose utilisée et présente peu de toxicité, contrairement à la cycloheximide (Flood et al., 1973).

Au début, les ISP étaient utilisés pour induire des amnésies de façon expérimentale et détecter les phases de labilité de la trace mnésique. Plus tard, il

a été confirmé que l'encodage normal de la mémoire implique effectivement des changements métaboliques qui incluent la synthèse de certaines protéines nécessaires à la stabilisation de la mémoire (Castellucci et al., 1988 ; Barzilai et al., 1989 ; Satoh et al., 2002 ; McNair et al., 2006 ; Klann and Sweatt, 2008).

Les ISP administrés de façon systémique ou locale vont induire un déficit uniquement si la mémoire est dans une phase active. La consolidation est une phase particulièrement sensible aux ISP, qui abolissent la mémoire à long terme, alors que la mémoire à court terme semble intacte (pour des revues récentes voir Alberini (2008) et Klann and Sweatt (2008). Plus précisément, dans le protocole expérimental que nous avons utilisé, c'est-à-dire lors du conditionnement de peur auditive, l'infusion d'anisomycine dans l'ABL après l'acquisition ou le rappel bloque respectivement la consolidation (Schafe et al., 1999 ; Schafe and LeDoux, 2000 ; Maren et al., 2003) et la reconsolidation (Nader et al., 2000 ; Duvarci and Nader, 2004). D'autres protocoles expérimentaux ont également montré un blocage de la reconsolidation par des ISP (Pedreira et al., 2002 ; Pedreira and Maldonado, 2003 ; Gainutdinova et al., 2005 ; Inda et al., 2005 ; Rossato et al., 2006).

Dans certains paradigmes, les ISP révèlent aussi la propriété d'empêcher la formation de mémoire à long terme lorsqu'appliqués avant l'acquisition, ce qui est distinct d'un blocage de la consolidation. Par exemple, chez l'Aplysie, l'application locale d'anisomycine *pendant* l'entraînement à la sensibilisation du retrait du siphon bloque la formation de mémoire à long terme sans affecter la mémoire à court terme (Castellucci et al., 1989). Le fait que les traitements aux ISP appliqués avant l'acquisition bloquent la formation de mémoire à long terme alors que le traitement administré après l'entraînement ne l'affecte pas, suggère qu'il existe un mécanisme activé lors de l'acquisition et qui initie une forme de plasticité nécessaire à l'établissement d'une mémoire à long terme (Goellet et al., 1986 ; Montarolo et al., 1986 ; Castellucci et al., 1989 ; Bergold et al., 1990). Chez les rongeurs également, l'acquisition de

conditionnements est clairement sensible aux ISP, et d'ailleurs l'amnésie est souvent plus sévère lorsque le traitement est administré avant l'entraînement plutôt qu'après. En résumé, autant chez les invertébrés que les vertébrés, l'acquisition est une période particulièrement sensible à l'anisomycine (Flood et al., 1973 ; Grecksch et al., 1980 ; Grecksch and Matthies, 1980 ; Flood et al., 1986 ; Rosenblum et al., 1993 ; Quevedo et al., 1999 ; Lattal and Abel, 2001 ; Vianna et al., 2001 ; Wanisch et al., 2005).

L'effet des ISP sur l'expression de la réponse conditionnée lors du rappel d'une mémoire consolidée a été très peu étudié. L'injection systémique d'anisomycine 30 min avant le rappel n'a pas affecté l'expression de la peur conditionnée au contexte chez la souris (Bourtchouladze et al., 1998). À notre connaissance, aucune étude n'a examiné l'effet d'un ISP sur le rappel de la mémoire avec des infusions intracérébrales locales. Un des objectifs du présent travail a été d'évaluer l'effet de l'infusion d'anisomycine dans l'ABL sur l'expression de la réponse conditionnée et le trafic des rAMPA, lors du rappel d'une mémoire de peur auditive.

La synthèse de nouvelles protéines n'est évidemment pas le seul mécanisme cellulaire impliqué dans la stabilisation à long terme de la mémoire, ni d'ailleurs le seul effet de l'anisomycine (McGaugh, 2004). L'anisomycine altère la teneur en catécholamines cérébrales chez les rongeurs, mais il n'existe aucune preuve directe démontrant que l'anisomycine affecterait la mémoire par ce biais (Flexner and Goodman, 1975 ; Schweri and Carr, 1982 ; Davis and Squire, 1984 ; Flood et al., 1986 ; Canal et al., 2007). Cependant, la modulation de la mémoire de peur par la norépinéphrine (NE) dans l'ABL est une composante majeure de l'encodage de la peur associative (Liang et al., 1986 ; LeDoux, 2000 ; Davies et al., 2004 ; McGaugh, 2004 ; Berretta, 2005 ; Berlau and McGaugh, 2006). L'amygdale est très densément innervée par des fibres noradrénergiques en provenance du locus coeruleus et du noyau du tractus solitaire, qui reçoivent en retour une innervation réciproque modulatrice de

l'amygdale (Aggleton, 2000 ; Van Bockstaele et al., 2001). La NE diminue l'excitabilité des interneurons inhibiteurs (GABAergiques) de l'ABL et augmente ainsi l'excitabilité des neurones de projection (Tully et al., 2007). La NE dans l'ABL affecte l'acquisition de la mémoire de peur (Canal et al., 2007) et participe à la consolidation de la mémoire (Roosendaal et al., 2006). La reconsolidation est également bloquée par un traitement avec un antagoniste des récepteurs β -adrénergiques dans l'ABL après la réactivation (Debiec and LeDoux, 2006). Les récepteurs adrénérgiques sont couplés à des protéines G qui activent l'adénylyl cyclase, ce qui génère de l'AMPc et active la PKA. Ainsi, les récepteurs adrénérgiques et les rNMDA constituent deux voies d'activation distinctes de la PKA. De plus, la stimulation des récepteurs β -adrénergiques augmenterait le courant calcique lors de l'activation des rNMDA (Gean et al., 1992 ; Huang et al., 1993 ; Raman et al., 1996). Les récepteurs β -adrénergiques se lient avec la PSD95 (*post-synaptic density 95*) à la synapse, ce qui faciliterait leur effet sur les rNMDA et sur la plasticité synaptique (Hu et al., 2000). Des souris transgéniques dont le gène codant pour la dopamine β -hydroxylase a été muté et qui, par conséquent, n'expriment pas de NE, n'ont en apparence pas de déficit de mémoire de peur auditive, même si le rappel de la peur contextuelle est altéré (Murchison et al., 2004). Cette étude remet en question l'implication de la NE dans le rappel de la mémoire de peur auditive. Par contre des souris mutantes pour la monoamine oxydase et qui ont un niveau élevé de NE expriment une réponse comportementale accentuée lors du conditionnement de peur auditive (Kim et al., 1997). Par ailleurs, le couplage des rNMDA et des récepteurs β -adrénergiques converge et co-régule la phosphorylation des rAMPA (Vanhoose and Winder, 2003). En résumé, bien qu'aucune étude n'ait pu démontrer que l'effet de l'anisomycine sur la mémoire soit dû à la perturbation de la signalisation adrénérgique, c'est un mécanisme d'action plausible.

Hypothèses et plan expérimental

Cette thèse porte sur l'étude de mécanismes de plasticité synaptique qui accompagnent le rappel d'une mémoire de peur auditive. Le rappel comprend l'expression d'une réaction comportementale commandée par la mémoire, mais provoque également le retour de cette mémoire à un état actif labile. Nous analysons en particulier le rôle éventuel des récepteurs NMDA et AMPA dans l'induction de ces mécanismes.

L'état actuel des connaissances désigne l'ABL comme substrat anatomique privilégié où l'encodage et le stockage de la mémoire de peur auditive se produisent par le biais de mécanismes de plasticité synaptique associative, entre les afférences auditives et les neurones de projection de l'ABL. Les rNMDA initient la plasticité synaptique en induisant des modifications structurelles, en particulier une augmentation de la fraction membranaire post-synaptique des rAMPA de type GluR1 dans l'ABL, laquelle est nécessaire à la consolidation de la mémoire de peur associative (Rumpel et al., 2005 ; Yeh et al., 2006). La consolidation de la mémoire de peur auditive est bloquée par l'infusion d'anisomycine dans l'ABL. Par ailleurs les rAMPA sont impliqués dans l'expression de la réponse conditionnée lors du rappel, puisqu'un antagoniste des rAMPA bloque l'expression de la réponse de peur (Davis et al., 1993 ; Kim et al., 1993). L'administration d'anisomycine dans l'ABL juste après le rappel bloque la reconsolidation de la mémoire, ce qui démontre que la trace mnésique est réactivée, c'est-à-dire de nouveau instable (Nader et al., 2000). Mais le mécanisme qui induit la labilité et le moment de son induction sont inconnus. Le rappel est un processus durant lequel l'activité nerveuse qui traverse un réseau neuronal crée un patron de décharge qui constitue la mémoire (Martin et al., 2000) et de ce fait, il est souvent considéré comme un mécanisme passif. Notre hypothèse est qu'au contraire, le rappel utiliserait des dispositifs cellulaires non pas statiques mais dynamiques. Nous pensons que le rappel activerait des mécanismes de plasticité synaptique

similaires à l'acquisition de la mémoire. Nous savons que les rNMDA doivent être actifs pendant l'acquisition et qu'il initient la plasticité synaptique permettant la formation de la mémoire. Par analogie, nous pensons que l'activation des rNMDA pendant le rappel serait le mécanisme qui induit la labilité de la trace mnésique. De même, nous pensons que le rappel pourrait être sensible à l'anisomycine, comme cela a été démontré pour l'acquisition. Par ailleurs, comme les modifications post-synaptiques des rAMPA font partie de la trace mnésique mise en place par des mécanismes de plasticité dépendants des rNMDA et de la synthèse de nouvelles protéines, et comme l'activation des rAMPA pendant le rappel est nécessaire à l'expression de la réponse conditionnée, nous désirons évaluer le rôle de l'activation des rAMPA pendant le rappel sur la labilité de la trace mnésique, ainsi que leur sensibilité à l'anisomycine pendant le rappel.

Afin de tester nos hypothèses, nous avons organisé les expériences en deux volets, faisant chacun l'objet d'un manuscrit.

Le premier manuscrit a été publié dans la revue *Nature Neuroscience* en octobre 2006. L'objectif des expériences était d'évaluer le rôle des rNMDA et des rAMPA dans l'induction de la labilité d'une mémoire de peur auditive chez le rat Sprague Dawley. Nous avons utilisé des antagonistes des rNMDA (ifenprodil et AP5) et des rAMPA (CNQX) infusés dans l'ABL avant le rappel, qui est suivi d'une infusion d'anisomycine. Nous avons démontré que l'induction de la labilité dépendait de l'activation des rNMDA pendant le rappel et que l'expression de la réponse conditionnée nécessitait en revanche l'activation des rAMPA.

Le second manuscrit sera soumis à la revue *PLoS ONE*. Nous y avons testé la sensibilité du rappel à l'anisomycine, ainsi que la régulation du trafic des rAMPA par les rNMDA. Les résultats suggèrent que, pendant le rappel de

la mémoire de peur conditionnée, les rAMPA sont sujets à un trafic actif, régulé par les rNMDA, et dont dépend l'expression de la réponse conditionnée.

Références bibliographiques de l'introduction générale

- Aggleton, J.P. (2000). *The Amygdala. A Functional Analysis* (Oxford University Press, USA).
- Alberini, C.M. (2005). Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci* 28, 51-56.
- Alberini, C.M. (2008). The role of protein synthesis during the labile phases of memory: revisiting the skepticism. *Neurobiol Learn Mem* 89, 234-246.
- Amorapanth, P., LeDoux, J.E., and Nader, K. (2000). Different lateral amygdala outputs mediate reactions and actions elicited by a fear-arousing stimulus. *Nat Neurosci* 3, 74-79.
- Apergis-Schoute, A.M., Debiec, J., Doyere, V., LeDoux, J.E., and Schafe, G.E. (2005). Auditory fear conditioning and long-term potentiation in the lateral amygdala require ERK/MAP kinase signaling in the auditory thalamus: a role for presynaptic plasticity in the fear system. *J Neurosci* 25, 5730-5739.
- Bailey, C.H., and Kandel, E.R. (1993). Structural changes accompanying memory storage. *Annu Rev Physiol* 55, 397-426.
- Barzilai, A., Kennedy, T.E., Sweatt, J.D., and Kandel, E.R. (1989). 5-HT modulates protein synthesis and the expression of specific proteins during long-term facilitation in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron* 2, 1577-1586.
- Bauer, E.P., Schafe, G.E., and LeDoux, J.E. (2002). NMDA receptors and L-type voltage-gated calcium channels contribute to long-term potentiation and different components of fear memory formation in the lateral amygdala. *J Neurosci* 22, 5239-5249.

- Bergold, P.J., Sweatt, J.D., Winicov, I., Weiss, K.R., Kandel, E.R., and Schwartz, J.H. (1990). Protein synthesis during acquisition of long-term facilitation is needed for the persistent loss of regulatory subunits of the *Aplysia* cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 3788-3791.
- Berlau, D.J., and McGaugh, J.L. (2006). Enhancement of extinction memory consolidation: the role of the noradrenergic and GABAergic systems within the basolateral amygdala. *Neurobiol Learn Mem* 86, 123-132.
- Berretta, S. (2005). Cortico-amygdala circuits: role in the conditioned stress response. *Stress* 8, 221-232.
- Blair, H.T., Schafe, G.E., Bauer, E.P., Rodrigues, S.M., and LeDoux, J.E. (2001). Synaptic plasticity in the lateral amygdala: a cellular hypothesis of fear conditioning. *Learn Mem* 8, 229-242.
- Bliss, T.V.P., and Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232, 331-356.
- Bohbot, V., Otahal, P., Liu, Z., Nadel, L., and Bures, J. (1996). Electroconvulsive shock and lidocaine reveal rapid consolidation of spatial working memory in the water maze. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 4016-4019.
- Bolhuis, J.J., and Macphail, E.M. (2001). A critique of the neuroecology of learning and memory. *Trends Cogn Sci* 5, 426-433.
- Bolhuis, J.J., and Macphail, E.M. (2002). Everything in neuroecology makes sense in the light of evolution. Response from Bolhuis and Macphail. *Trends Cogn Sci* 6, 7-8.

- Borta, A., Wöhr, M., and Schwarting, R.K. (2006). Rat ultrasonic vocalization in aversively motivated situations and the role of individual differences in anxiety-related behavior. *Behav Brain Res* 166, 271-280.
- Bourtchouladze, R., Abel, T., Berman, N., Gordon, R., Lapidus, K., and Kandel, E.R. (1998). Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learn Mem* 5, 365-374.
- Bozon, B., Davis, S., and Laroche, S. (2003). A requirement for the immediate early gene *zif268* in reconsolidation of recognition memory after retrieval. *Neuron* 40, 695-701.
- Brady, J. (1952). The effects of electroconvulsive shock on a conditioned emotional response: the permanence effect. *J Comp Physiol Psychol* 45, 9-13.
- Bremner, J.D., Krystal, J.H., Southwick, S.M., and Charney, D.S. (1995). Functional neuroanatomical correlates of the effects of stress on memory. *J Traum Stress* 8, 527-553.
- Bull, R., Ferrera, E., and Orrego, F. (1976). Effects of anisomycin on brain protein synthesis and passive avoidance learning in newborn chicks. *J Neurobiol* 7, 37-49.
- Campeau, S., Miserendino, M.J., and Davis, M. (1992). Intra-amygdala infusion of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5 blocks acquisition but not expression of fear-potentiated startle to an auditory conditioned stimulus. *Behav Neurosci* 106, 569-574.
- Canal, C.E., Chang, Q., and Gold, P.E. (2007). Amnesia produced by altered release of neurotransmitters after intraamygdala injections of a protein synthesis inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 12500-12505.

- Casadesus, J., and D'Ari, R. (2002). Memory in bacteria and phage. *Bioessays* 24, 512-518.
- Castellucci, V.F., Blumenfeld, H., Goelet, P., and Kandel, E.R. (1989). Inhibitor of protein synthesis blocks long-term behavioral sensitization in the isolated gill-withdrawal reflex of *Aplysia*. *J Neurobiol* 20, 1-9.
- Castellucci, V.F., Frost, W.N., Goelet, P., Montarolo, P.G., Schacher, S., Morgan, J.A., Blumenfeld, H., and Kandel, E.R. (1986). Cell and molecular analysis of long-term sensitization in *Aplysia*. *J Physiol (Paris)* 81, 349-357.
- Castellucci, V.F., Kennedy, T.E., Kandel, E.R., and Goelet, P. (1988). A quantitative analysis of 2-D gels identifies proteins in which labeling is increased following long-term sensitization in *Aplysia*. *Neuron* 1, 321-328.
- Chapman, P.F., Ramsay, M.F., Krezel, W., and Knevet, S.G. (2003). Synaptic plasticity in the amygdala: comparisons with hippocampus. *Ann N Y Acad Sci* 985, 114-124.
- Citri, A., and Malenka, R.C. (2008). Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33, 18-41.
- Collins, D.R., and Pare, D. (2000). Differential fear conditioning induces reciprocal changes in the sensory responses of lateral amygdala neurons to the CS(+) and CS(-). *Learn Mem* 7, 97-103.
- Davies, M.F., Tsui, J., Flannery, J.A., Li, X., DeLorey, T.M., and Hoffman, B.B. (2004). Activation of alpha2 adrenergic receptors suppresses fear conditioning: expression of c-Fos and phosphorylated CREB in mouse amygdala. *Neuropsychopharmacology* 29, 229-239.

- Davis, H.P., and Rosenzweig, M.R. (1978). Recovery as a function of the degree of amnesia due to protein synthesis inhibition. *Pharmacol Biochem Behav* 8, 701-710.
- Davis, H.P., Rosenzweig, M.R., Bennett, E.L., and Squire, L.R. (1980). Inhibition of cerebral protein synthesis: dissociation of nonspecific effects and amnesic effects. *Behav Neural Biol* 28, 99-104.
- Davis, H.P., Spanis, C.W., and Squire, L.R. (1976). Inhibition of cerebral protein synthesis: performance at different times after passive avoidance training. *Pharmacol Biochem Behav* 4, 13-16.
- Davis, H.P., and Squire, L.R. (1984). Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bul* 96, 518-559.
- Davis, M. (2000). The role of the amygdala in conditioned and unconditioned fear and anxiety. In *The Amygdala. A Functional Analysis*, J.P. Aggleton, ed. (Oxford University Press, USA).
- Davis, M., Falls, W.A., Campeau, S., and Kim, M. (1993). Fear-potentiated startle: a neural and pharmacological analysis. *Behav Brain Res* 58, 175-198.
- Dawson, R., and McGaugh, J. (1969). Electroconvulsive shock effects on a reactivated memory trace: Further examination. *Science* 166, 525-527.
- Debiec, J., and LeDoux, J.E. (2006). Noradrenergic signaling in the amygdala contributes to the reconsolidation of fear memory: treatment implications for PTSD. *Ann N Y Acad Sci* 1071, 521-524.
- Derkach, V.A., Oh, M.C., Guire, E.S., and Soderling, T.R. (2007). Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 8, 101-113.

- Doron, N.N., and Ledoux, J.E. (1999). Organization of projections to the lateral amygdala from auditory and visual areas of the thalamus in the rat. *J Comp Neurol* 412, 383-409.
- Doron, N.N., and Ledoux, J.E. (2000). Cells in the posterior thalamus project to both amygdala and temporal cortex: a quantitative retrograde double-labeling study in the rat. *J Comp Neurol* 425, 257-274.
- Dudai, Y. (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* 55, 51-86.
- Dudai, Y., and Carruthers, M. (2005). The Janus face of Mnemosyne. *Nature* 434, 567.
- Dukas, R. (2004). Evolutionary biology of animal cognition. *Ann Rev Ecol Evol Syst* 35, 347-374
- Duncan, C. (1949). The retroactive effect of electroconvulsive shock. *J Comp Physiol Psychol* 42, 32-44.
- Dunn, A.J., and Leibmann, S. (1977). The amnesic effect of protein synthesis inhibitors is not due to the inhibition of adrenal corticosteroidogenesis. *Behav Biol* 19, 411-416.
- Duvarci, S., and Nader, K. (2004). Characterization of fear memory reconsolidation. *J Neurosci* 24, 9269-9275.
- Elias, G.M., Funke, L., Stein, V., Grant, S.G., Bredt, D.S., and Nicoll, R.A. (2006). Synapse-specific and developmentally regulated targeting of AMPA receptors by a family of MAGUK scaffolding proteins. *Neuron* 52, 307-320.

- Emptage, N.J., and Carew, T.J. (1993). Long-term synaptic facilitation in the absence of short-term facilitation in *Aplysia* neurons. *Science* 262, 253-256.
- Esteban, J.A., Shi, S.H., Wilson, C., Nuriya, M., Huganir, R.L., and Malinow, R. (2003). PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. *Nat Neurosci* 6, 136-143.
- Everitt, B.J., Cardinal, R.N., Parkinson, J.A., and Robbins, T.W. (2003). Appetitive behavior: impact of amygdala-dependent mechanisms of emotional learning. *Ann N Y Acad Sci* 985, 233-250.
- Farb, C., Aoki, C., Milner, T., Kaneko, T., and LeDoux, J. (1992). Glutamate immunoreactive terminals in the lateral amygdaloid nucleus: a possible substrate for emotional memory. *Brain Res* 593, 145-158.
- Farb, C.R., Aoki, C., and Ledoux, J.E. (1995). Differential localization of NMDA and AMPA receptor subunits in the lateral and basal nuclei of the amygdala: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 362, 86-108.
- Farb, C.R., and LeDoux, J.E. (1997). NMDA and AMPA receptors in the lateral nucleus of the amygdala are postsynaptic to auditory thalamic afferents. *Synapse* 27, 106-121.
- Farb, C.R., and Ledoux, J.E. (1999). Afferents from rat temporal cortex synapse on lateral amygdala neurons that express NMDA and AMPA receptors. *Synapse* 33, 218-229.
- Fendt, M. (2001). Injections of the NMDA receptor antagonist aminophosphonopentanoic acid into the lateral nucleus of the amygdala block the expression of fear-potentiated startle and freezing. *J Neurosci* 21, 4111-4115.

- Fendt, M., and Fanselow, M.S. (1999). The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev* 23, 743-760.
- Flexner, L.B., and Goodman, R.H. (1975). Studies on memory: inhibitors of protein synthesis also inhibit catecholamine synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 72, 4660-4663.
- Flood, J.F., Bennett, E.L., Orme, A.E., and Rosenzweig, M.R. (1975a). Effects of protein synthesis inhibition on memory for active avoidance training. *Physiol Behav* 14, 177-184.
- Flood, J.F., Bennett, E.L., Orme, E., and Rosenzweig, M.R. (1975b). Relation of memory formation to controlled amounts of brain protein synthesis. *Physiol Behav* 15, 97-102.
- Flood, J.F., Jarvik, M.E., Bennett, E.L., Orme, A.E., and Rosenzweig, M.R. (1977a). Protein synthesis inhibition and memory for pole jump active avoidance and extinction. *Pharmacol Biochem Behav* 7, 71-77.
- Flood, J.F., Jarvik, M.E., Bennett, E.L., Orme, A.E., and Rosenzweig, M.R. (1977b). The effect of stimulants, depressants, and protein synthesis-inhibition on retention. *Behav Biol* 20, 168-183.
- Flood, J.F., Rosenzweig, M.R., Bennett, E.L., and Orme, A.E. (1973). The influence of duration of protein synthesis inhibition on memory. *Physiol Behav* 10, 555-562.
- Flood, J.F., Smith, G.E., Bennett, E.L., Alberti, M.H., Orme, A.E., and Jarvik, M.E. (1986). Neurochemical and behavioral effects of catecholamine and protein synthesis inhibitors in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 24, 631-645.

- Flood, J.F., Smith, G.E., and Jarvik, M.E. (1980). A comparison of the effects of localized brain administration of catecholamine and protein synthesis inhibitors on memory processing. *Brain Res* 197, 153-165.
- Flood, J.F., Vidal, D., Bennett, E.L., Orme, A.E., Vasquez, S., and Jarvik, M.E. (1978). Memory facilitating and anti-amnesic effects of corticosteroids. *Pharmacol Biochem Behav* 8, 81-87.
- Forcato, C., Burgos, V.L., Argibay, P.F., Molina, V.A., Pedreira, M.E., and Maldonado, H. (2007). Reconsolidation of declarative memory in humans. *Learn Mem* 14, 295-303.
- Gainutdinova, T.H., Tagirova, R.R., Ismailova, A.I., Muranova, L.N., Samarova, E.I., Gainutdinov, K.L., and Balaban, P.M. (2005). Reconsolidation of a context long-term memory in the terrestrial snail requires protein synthesis. *Learn Mem* 12, 620-625.
- Garakani, A., Mathew, S.J., and Charney, D.S. (2006). Neurobiology of anxiety disorders and implications for treatment. *Mt Sinai J Med* 73, 941-949.
- Gean, P.W., Huang, C.C., Lin, J.H., and Tsai, J.J. (1992). Sustained enhancement of NMDA receptor-mediated synaptic potential by isoproterenol in rat amygdalar slices. *Brain Res* 594, 331-334.
- Gewirtz, J.C., and Davis, M. (1997). Second-order fear conditioning prevented by blocking NMDA receptors in amygdala. *Nature* 388, 471-474.
- Godsil, B.P., Quinn, J.J., and Fanselow, M.S. (2000). Body temperature as a conditional response measure for pavlovian fear conditioning. *Learn Mem* 7, 353-356.

- Goelet, P., Castellucci, V.F., Schacher, S., and Kandel, E.R. (1986). The long and the short of long-term memory--a molecular framework. *Nature* 322, 419-422.
- Goosens, K.A., and Maren, S. (2001). Contextual and Auditory Fear Conditioning are Mediated by the Lateral, Basal, and Central Amygdaloid Nuclei in Rats. *Learn Mem* 8, 148-155.
- Goosens, K.A., and Maren, S. (2004). NMDA receptors are essential for the acquisition, but not expression, of conditional fear and associative spike firing in the lateral amygdala. *Eur J Neurosci* 20, 537-548.
- Grecksch, G., and Matthies, H. (1980). Two sensitive periods for the amnesic effect of anisomycin. *Pharmacol Biochem Behav* 12, 663-665.
- Grecksch, G., Ott, T., and Matthies, H. (1980). The effect of intrahippocampally applied anisomycin on the retention of brightness discrimination in rats. *Behav Neural Biol* 29, 281-288.
- Grollman, A.P. (1967). Inhibitors of protein biosynthesis. II. Mode of action of anisomycin. *J Biol Chem* 242, 3226-3233.
- Gruest, N., Richer, P., and Hars, B. (2004). Memory consolidation and reconsolidation in the rat pup require protein synthesis. *J Neurosci* 24, 10488-10492.
- Hampton, R.R., Healy, S.D., Shettleworth, S.J., and Kamil, A.C. (2002). Neuroecologists' are not made of straw. *Trends Cogn Sci* 6, 6-7.
- Hebb, D.O. (1949). *The Organization of Behavior* (New-York : Wiley).
- Helmstetter, F.J., and Bellgowan, P.S. (1994). Effects of muscimol applied to the basolateral amygdala on acquisition and expression of contextual fear conditioning in rats. *Behav Neurosci* 108, 1005-1009.

- Helmstetter, F.J., Parsons, R.G., and Gafford, G.M. (2007). Macromolecular synthesis, distributed synaptic plasticity, and fear conditioning. *Neurobiol Learn Mem.*
- Hu, L.A., Tang, Y., Miller, W.E., Cong, M., Lau, A.G., Lefkowitz, R.J., and Hall, R.A. (2000). beta 1-adrenergic receptor association with PSD-95. Inhibition of receptor internalization and facilitation of beta 1-adrenergic receptor interaction with N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 275, 38659-38666.
- Huang, C.C., Tsai, J.J., and Gean, P.W. (1993). Enhancement of NMDA receptor-mediated synaptic potential by isoproterenol is blocked by Rp-adenosine 3',5'-cyclic monophosphothioate. *Neurosci Lett* 161, 207-210.
- Huang, Y.Y., and Kandel, E.R. (1998). Postsynaptic induction and PKA-dependent expression of LTP in the lateral amygdala. *Neuron* 21, 169-178.
- Huang, Y.Y., Martin, K.C., and Kandel, E.R. (2000). Both protein kinase A and mitogen-activated protein kinase are required in the amygdala for the macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation. *J Neurosci* 20, 6317-6325.
- Humeau, Y., Herry, C., Kemp, N., Shaban, H., Fourcaudot, E., Bissiere, S., and Luthi, A. (2005). Dendritic spine heterogeneity determines afferent-specific Hebbian plasticity in the amygdala. *Neuron* 45, 119-131.
- Humeau, Y., Reisel, D., Johnson, A.W., Borchardt, T., Jensen, V., Gebhardt, C., Bosch, V., Gass, P., Bannerman, D.M., Good, M.A., *et al.* (2007). A pathway-specific function for different AMPA receptor subunits in amygdala long-term potentiation and fear conditioning. *J Neurosci* 27, 10947-10956.

- Humeau, Y., Shaban, H., Bissiere, S., and Luthi, A. (2003). Presynaptic induction of heterosynaptic associative plasticity in the mammalian brain. *Nature* 426, 841-845.
- Hupbach, A., Gomez, R., Hardt, O., and Nadel, L. (2007). Reconsolidation of episodic memories: a subtle reminder triggers integration of new information. *Learn Mem* 14, 47-53.
- Inda, M.C., Delgado-García, J.M., and Carrión, A.M. (2005). Acquisition, consolidation, reconsolidation, and extinction of eyelid conditioning responses require de novo protein synthesis. *J Neurosci* 25, 2070-2080.
- Josselyn, S.A., and Nguyen, P.V. (2005). CREB, synapses and memory disorders: past progress and future challenges. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4, 481-497.
- Judge, M.E., and Quartermain, D. (1982). Characteristics of retrograde amnesia following reactivation of memory in mice. *Physiol Behav* 28, 585-590.
- Kameyama, T., Nabeshima, T., and Kozawa, T. (1986). The antagonistic effects of naloxone on cycloheximide and anisomycin-induced amnesia. *Pharmacol Biochem Behav* 25, 567-572.
- Kandel, E.R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294, 1030-1038.
- Kikusui, T., Nishizawa, D., Takeuchi, Y., and Mori, Y. (2003). Conditioned fear-related ultrasonic vocalizations are emitted as an emotional response. *J Vet Med Sci / Jap Soci Vet Sci* 65, 1299-1305.
- Kim, J.J., Shih, J.C., Chen, K., Chen, L., Bao, S., Maren, S., Anagnostaras, S.G., Fanselow, M.S., De Maeyer, E., Seif, I., and Thompson, R.F. (1997).

Selective enhancement of emotional, but not motor, learning in monoamine oxidase A-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* *94*, 5929-5933.

Kim, M., Campeau, S., Falls, W.A., and Davis, M. (1993). Infusion of the non-NMDA receptor antagonist CNQX into the amygdala blocks the expression of fear-potentiated startle. *Behav Neural Biol* *59*, 5-8.

Klann, E., Chen, S.J., and Sweatt, J.D. (1991). Persistent protein kinase activation in the maintenance phase of long-term potentiation. *J Biol Chem* *266*, 24253-24256.

Klann, E., and Sweatt, J.D. (2008). Altered protein synthesis is a trigger for long-term memory formation. *Neurobiol Learn Mem* *89*, 247-259.

Kohlenberg, R., and Trabasso, T.O.M. (1968). Recovery of a Conditioned Emotional Response after One or Two Electroconvulsive Shocks. *J Comp Physiol Psychol* *65*, 270-273.

Kolleker, A., Zhu, J.J., Schupp, B.J., Qin, Y., Mack, V., Borchardt, T., Kohr, G., Malinow, R., Seeburg, P.H., and Osten, P. (2003). Glutamatergic plasticity by synaptic delivery of GluR-B(long)-containing AMPA receptors. *Neuron* *40*, 1199-1212.

Kopec, C.D., Real, E., Kessels, H.W., and Malinow, R. (2007). GluR1 links structural and functional plasticity at excitatory synapses. *J Neurosci* *27*, 13706-13718.

Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Manasian, Y., Ivanov, A., Tyzio, R., Pellegrino, C., Ben-Ari, Y., Clapham, D.E., and Medina, I. (2003). The NMDA receptor is coupled to the ERK pathway by a direct interaction between NR2B and RasGRF1. *Neuron* *40*, 775-784.

- Lattal, K.M., and Abel, T. (2001). Different requirements for protein synthesis in acquisition and extinction of spatial preferences and context-evoked fear. *J Neurosci* *21*, 5773-5780.
- LeDoux, J.E. (1995). Emotion: clues from the brain. *Annu Rev Psychol* *46*, 209-235.
- LeDoux, J.E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* *23*, 155-184.
- LeDoux, J.E., Cicchetti, P., Xagoraris, A., and Romanski, L.M. (1990a). The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *J Neurosci* *10*, 1062-1069.
- LeDoux, J.E., Farb, C., and Ruggiero, D.A. (1990b). Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. *J Neurosci* *10*, 1043-1054.
- LeDoux, J.E., and Farb, C.R. (1991). Neurons of the acoustic thalamus that project to the amygdala contain glutamate. *Neurosci Lett* *134*, 145-149.
- LeDoux, J.E., Iwata, J., Cicchetti, P., and Reis, D.J. (1988). Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J Neurosci* *8*, 2517-2529.
- LeDoux, J.E., Sakaguchi, A., and Reis, D.J. (1984). Subcortical efferent projections of the medial geniculate nucleus mediate emotional responses conditioned to acoustic stimuli. *J Neurosci* *4*, 683-698.
- Lee, H., and Kim, J.J. (1998). Amygdalar NMDA receptors are critical for new fear learning in previously fear-conditioned rats. *J Neurosci* *18*, 8444-8454.

- Lee, H.J., Choi, J., Brown, T.H., and Kim, J.J. (2001). Amygdalar NMDA receptors are critical for the expression of multiple conditioned fear responses. *J Neurosci* *21*, 4116-4124.
- Lee, H.K., Barbarosie, M., Kameyama, K., Bear, M.F., and Huganir, R.L. (2000). Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature* *405*, 955-959.
- Lee, J.L., Everitt, B.J., and Thomas, K.L. (2004). Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* *304*, 839-843.
- Legendre, P., and Westbrook, G.L. (1991). Ifenprodil blocks N-methyl-D-aspartate receptors by a two-component mechanism. *Mol Pharmacol* *40*, 289-298.
- Lewis, D.J. (1969). Sources of experimental amnesia. *Psychol Rev* *76*, 461-472.
- Lewis, D.J. (1979). Psychobiology of active and inactive memory. *Psychol Bul* *86*, 1054-1083.
- Lewis, D.J., and MAHER, B.A. (1965). Neural consolidation and electroconvulsive shock. *Psychol Rev* *72*, 225-239.
- Li, X.F., Phillips, R., and LeDoux, J.E. (1995). NMDA and non-NMDA receptors contribute to synaptic transmission between the medial geniculate body and the lateral nucleus of the amygdala. *Exp Brain Res* *105*, 87-100.
- Li, X.F., Stutzmann, G.E., and LeDoux, J.E. (1996). Convergent but temporally separated inputs to lateral amygdala neurons from the auditory thalamus and auditory cortex use different postsynaptic receptors: in vivo intracellular and extracellular recordings in fear conditioning pathways. *Learn Mem* *3*, 229-242.

- Liang, K.C., Juler, R.G., and McGaugh, J.L. (1986). Modulating effects of posttraining epinephrine on memory: involvement of the amygdala noradrenergic system. *Brain Res* 368, 125-133.
- Lieberman, D.A. (2004). *Learning and Memory: An Integrative Approach* (Wadsworth Publishing).
- Lubow, R.E., and Moore, A.U. (1959). Latent inhibition: the effect of nonreinforced pre-exposure to the conditional stimulus. *J Comp Psychol* 52, 415-419.
- Luttges, M.W., and McGaugh, J.L. (1967). Permanence of retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock. *Science* 156, 408-410.
- Lynch, M.A. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84, 87-136.
- Malenka, R.C. (2003). Synaptic plasticity and AMPA receptor trafficking. *Ann N Y Acad Sci* 1003, 1-11.
- Malinow, R., and Malenka, R.C. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 25, 103-126.
- Man, H.Y., Sekine-Aizawa, Y., and Huganir, R.L. (2007). Regulation of {alpha}-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor trafficking through PKA phosphorylation of the Glu receptor 1 subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 3579-3584.
- Maren, S. (1996). Synaptic transmission and plasticity in the amygdala. An emerging physiology of fear conditioning circuits. *Mol Neurobiol* 13, 1-22.
- Maren, S. (2000). Auditory fear conditioning increases CS-elicited spike firing in lateral amygdala neurons even after extensive overtraining. *Eur J Neurosci* 12, 4047-4054.

- Maren, S. (2001). Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci* 24, 897-931.
- Maren, S., Ferrario, C.R., Corcoran, K.A., Desmond, T.J., and Frey, K.A. (2003). Protein synthesis in the amygdala, but not the auditory thalamus, is required for consolidation of Pavlovian fear conditioning in rats. *Eur J Neurosci* 18, 3080-3088.
- Maren, S., and Quirk, G.J. (2004). Neuronal signalling of fear memory. *Nat Rev Neurosci* 5, 844-852.
- Martin, S.J., Grimwood, P.D., and Morris, R.G. (2000). Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 23, 649-711.
- Mascagni, F., McDonald, A.J., and Coleman, J.R. (1993). Corticoamygdaloid and corticocortical projections of the rat temporal cortex: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study. *Neuroscience* 57, 697-715.
- Matus-Amat, P., Higgins, E.A., Sprunger, D., Wright-Hardesty, K., and Rudy, J.W. (2007). The role of dorsal hippocampus and basolateral amygdala NMDA receptors in the acquisition and retrieval of context and contextual fear memories. *Behav Neurosci* 121, 721-731.
- McDonald, A.J. (1998). Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol* 55, 257-332.
- McGaugh, J.L. (2004). The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci* 27, 1-28.
- McKernan, M.G., and Shinnick-Gallagher, P. (1997). Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro. *Nature* 390, 607-611.
- McNair, K., Davies, C.H., and Cobb, S.R. (2006). Plasticity-related regulation of the hippocampal proteome. *Eur J Neurosci* 23, 575-580.

- Mellstrom, B., and Naranjo, J.R. (2001). Mechanisms of Ca(2+)-dependent transcription. *Curr Opin Neurobiol* 11, 312-319.
- Merrill, M.A., Chen, Y., Strack, S., and Hell, J.W. (2005). Activity-driven postsynaptic translocation of CaMKII. *Trends Pharmacol Sci* 26, 645-653.
- Miller, C.A., and Sweatt, J.D. (2006). Amnesia or retrieval deficit? Implications of a molecular approach to the question of reconsolidation. *Learn Mem* 13, 498-505.
- Misanin, J., Miller, R., and Lewis, D. (1968). Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science* 160, 203-204.
- Miserendino, M.J., Sananes, C.B., Melia, K.R., and Davis, M. (1990). Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. *Nature* 345, 716-718.
- Miwa, H., Fukaya, M., Watabe, A.M., Watanabe, M., and Manabe, T. (2008). Functional contributions of synaptically localized NR2B subunits of the NMDA receptor to synaptic transmission and long-term potentiation in the adult mouse CNS. *J Physiol* 586, 2539-2550.
- Moga, D.E., Shapiro, M.L., and Morrison, J.H. (2006). Bidirectional redistribution of AMPA but not NMDA receptors after perforant path simulation in the adult rat hippocampus in vivo. *Hippocampus* 16, 990-1003.
- Montarolo, P.G., Goelet, P., Castellucci, V.F., Morgan, J., Kandel, E.R., and Schacher, S. (1986). A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in *Aplysia*. *Science* 234, 1249-1254.

- Moriya, T., Kouzu, Y., Shibata, S., Kadotani, H., Fukunaga, K., Miyamoto, E., and Yoshioka, T. (2000). Close linkage between calcium/calmodulin kinase II alpha/beta and NMDA-2A receptors in the lateral amygdala and significance for retrieval of auditory fear conditioning. *Eur J Neurosci* *12*, 3307-3314.
- Müller, G., and Pilzecker, A. (1900). Experimentelle beitrage zur lehre vom gedachtnis. *Z Psychol Suppl* *1*, 1.
- Muller, J., Corodimas, K., Fridel, Z., and LeDoux, J. (1997). Functional inactivation of the lateral and basal nuclei of the amygdala by muscimol infusion prevents fear conditioning to an explicit CS and to contextual stimuli. *Behav Neurosci* *111*, 683-691.
- Murchison, C.F., Zhang, X.Y., Zhang, W.P., Ouyang, M., Lee, A., and Thomas, S.A. (2004). A distinct role for norepinephrine in memory retrieval. *Cell* *117*, 131-143.
- Nader, K., Schafe, G.E., and Le Doux, J.E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* *406*, 722-726.
- Oh, M.C., Derkach, V.A., Guire, E.S., and Soderling, T.R. (2006). Extrasynaptic membrane trafficking regulated by GluR1 serine 845 phosphorylation primes AMPA receptors for long-term potentiation. *J Biol Chem* *281*, 752-758.
- Paré, D., Quirk, G.J., and Ledoux, J.E. (2004). New vistas on amygdala networks in conditioned fear. *J Neurophysiol* *92*, 1-9.
- Paré, D., Smith, Y., and Paré, J.F. (1995). Intra-amygdaloid projections of the basolateral and basomedial nuclei in the cat: Phaseolus vulgaris-

leucoagglutinin anterograde tracing at the light and electron microscopic level. *Neuroscience* 69, 567-583.

Pedreira, M.E., and Maldonado, H. (2003). Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron* 38, 863-869.

Pedreira, M.E., Perez-Cuesta, L.M., and Maldonado, H. (2002). Reactivation and reconsolidation of long-term memory in the crab *Chasmagnathus*: protein synthesis requirement and mediation by NMDA-type glutamatergic receptors. *J Neurosci* 22, 8305-8311.

Perrin, G., Ferreira, G., Meurisse, M., Verdin, S., Mouly, A.M., and Lévy, F. (2007). Social recognition memory requires protein synthesis after reactivation. *Behav Neurosci* 121, 148-155.

Pessoa, L. (2008). On the relationship between emotion and cognition. *Nat Rev Neurosci* 9, 148-158.

Pitkanen, A., Savander, V., and LeDoux, J.E. (1997). Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci* 20, 517- 523.

Przybylski, J., and Sara, S.J. (1997). Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav Brain Res* 84, 241-246.

Quartermain, D., Freedman, L.S., Botwinick, C.Y., and Gutwein, B.M. (1977). Reversal of cycloheximide-induced amnesia by adrenergic receptor stimulation. *Pharmacol Biochem Behav* 7, 259-267.

Quevedo, J., Vianna, M.R., Roesler, R., de-Paris, F., Izquierdo, I., and Rose, S.P. (1999). Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by

- pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learn Mem* 6, 600-607.
- Quirk, G.J., Armony, J.L., and LeDoux, J.E. (1997). Fear conditioning enhances different temporal components of tone-evoked spike trains in auditory cortex and lateral amygdala. *Neuron* 19, 613-624.
- Quirk, G.J., Reppas, C., and LeDoux, J.E. (1995). Fear conditioning enhances short-latency auditory responses of lateral amygdala neurons: parallel recordings in the freely behaving rat. *Neuron* 15, 1029-1039.
- Radley, J.J., Farb, C.R., He, Y., Janssen, W.G., Rodrigues, S.M., Johnson, L.R., Hof, P.R., LeDoux, J.E., and Morrison, J.H. (2007). Distribution of NMDA and AMPA receptor subunits at thalamo-amygdaloid dendritic spines. *Brain Res* 1134, 87-94.
- Rainnie, D.G., Asprodini, E.K., and Shinnick-Gallagher, P. (1991). Excitatory transmission in the basolateral amygdala. *J Neurophysiol* 66, 986-998.
- Raman, I.M., Tong, G., and Jahr, C.E. (1996). Beta-adrenergic regulation of synaptic NMDA receptors by cAMP-dependent protein kinase. *Neuron* 16, 415-421.
- Rescorla, R.A. (1988). Pavlovian conditioning. It's not what you think it is. *Am Psychol* 43, 151-160.
- Reynolds, I.J., and Miller, R.J. (1989). Ifenprodil is a novel type of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist: interaction with polyamines. *Mol Pharmacol* 36, 758-765.
- Ribot, T. (1883). *Les maladies de la memoire*, 2nd edn (Paris : Librairie Germer Ballière).

- Riccio, D.C., Millin, P.M., and Bogart, A.R. (2006). Reconsolidation: a brief history, a retrieval view, and some recent issues. *Learn Mem* *13*, 536-544.
- Rizvi, T.A., Ennis, M., Behbehani, M.M., and Shipley, M.T. (1991). Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: topography and reciprocity. *J Comp Neurol* *303*, 121-131.
- Rodrigues, S.M., Farb, C.R., Bauer, E.P., LeDoux, J.E., and Schafe, G.E. (2004). Pavlovian fear conditioning regulates Thr286 autophosphorylation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II at lateral amygdala synapses. *J Neurosci* *24*, 3281-3288.
- Rodrigues, S.M., Schafe, G.E., and LeDoux, J.E. (2001). Intra-amygdala blockade of the NR2B subunit of the NMDA receptor disrupts the acquisition but not the expression of fear conditioning. *J Neurosci* *21*, 6889-6896.
- Rogan, M.T., Stäubli, U.V., and LeDoux, J.E. (1997). Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature* *390*, 604-607.
- Romanski, L.M., Clugnet, M.C., Bordi, F., and LeDoux, J.E. (1993). Somatosensory and auditory convergence in the lateral nucleus of the amygdala. *Behav Neurosci* *107*, 444-450.
- Romanski, L.M., and LeDoux, J.E. (1993). Information cascade from primary auditory cortex to the amygdala: corticocortical and corticoamygdaloid projections of temporal cortex in the rat. *Cereb Cortex* *3*, 515-532.
- Roosendaal, B., Hui, G.K., Hui, I.R., Berlau, D.J., McGaugh, J.L., and Weinberger, N.M. (2006). Basolateral amygdala noradrenergic activity

mediates corticosterone-induced enhancement of auditory fear conditioning. *Neurobiol Learn Mem* 86, 249-255.

Rose, J.K., and Rankin, C.H. (2006). Blocking memory reconsolidation reverses memory-associated changes in glutamate receptor expression. *J Neurosci* 26, 11582-11587.

Rosenblum, K., Meiri, N., and Dudai, Y. (1993). Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behav Neural Biol* 59, 49-56.

Rossato, J.I., Bevilaqua, L.R., Medina, J.H., Izquierdo, I., and Cammarota, M. (2006). Retrieval induces hippocampal-dependent reconsolidation of spatial memory. *Learn Mem* 13, 431-440.

Royer, S., Martina, M., and Pare, D. (1999). An inhibitory interface gates impulse traffic between the input and output stations of the amygdala. *J Neurosci* 19, 10575-10583.

Rumpel, S., LeDoux, J., Zador, A., and Malinow, R. (2005). Postsynaptic receptor trafficking underlying a form of associative learning. *Science* 308, 83-88.

Saigusa, T., Tero, A., Nakagaki, T., and Kuramoto, Y. (2008). Amoebae anticipate periodic events. *Phys Rev Lett* 100, 018101.

Sangha, S., Scheibenstock, A., and Lukowiak, K. (2003). Reconsolidation of a long-term memory in *Lymnaea* requires new protein and RNA synthesis and the soma of right pedal dorsal 1. *J Neurosci* 23, 8034-8040.

Sara, S.J., and Hars, B. (2006). In memory of consolidation. *Learn Mem* 13, 515-521.

Satoh, K., Takeuchi, M., Oda, Y., Deguchi-Tawarada, M., Sakamoto, Y., Matsubara, K., Nagasu, T., and Takai, Y. (2002). Identification of activity-

regulated proteins in the postsynaptic density fraction. *Genes Cells* 7, 187-197.

Schafe, G.E., Atkins, C.M., Swank, M.W., Bauer, E.P., Sweatt, J.D., and LeDoux, J.E. (2000). Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning. *J Neurosci* 20, 8177-8187.

Schafe, G.E., and LeDoux, J.E. (2000). Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala. *J Neurosci* 20, RC96.

Schafe, G.E., Nadel, N.V., Sullivan, G.M., Harris, A., and LeDoux, J.E. (1999). Memory consolidation for contextual and auditory fear conditioning is dependent on protein synthesis, PKA, and MAP kinase. *Learn Mem* 6, 97-110.

Schafe, G.E., Nader, K., Blair, H.T., and LeDoux, J.E. (2001). Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. *Trends Neurosci* 24, 540-546.

Schmitt, W.B., Deacon, R.M., Seeburg, P.H., Rawlins, J.N., and Bannerman, D.M. (2003). A within-subjects, within-task demonstration of intact spatial reference memory and impaired spatial working memory in glutamate receptor-A-deficient mice. *J Neurosci* 23, 3953-3959.

Schneider, A.M., and Sherman, W. (1968). Amnesia: a function of the temporal relation of footshock to electroconvulsive shock. *Science* 159, 219-221.

Schweri, M.M., and Carr, L.A. (1982). Effects of amino acid alterations caused by protein synthesis inhibitors on brain monoamine formation. *Neuropharmacology* 21, 839-845.

- Sherry, D.F. (2006). Neuroecology. *Annu Rev Psychol* 57, 167-197.
- Sherry, D.F., and Schacter, D.L. (1987). The evolution of multiple memory systems. *Psychol Rev* 94, 439-454.
- Shi, C.J., and Cassell, M.D. (1997). Cortical, thalamic, and amygdaloid projections of rat temporal cortex. *J Comp Neurol* 382, 153-175.
- Sigurdsson, T., Doyère, V., Cain, C.K., and Ledoux, J.E. (2007). Long-term potentiation in the amygdala: a cellular mechanism of fear learning and memory. *Neuropharmacology* 52, 215-227.
- Silva, A.J., Kogan, J.H., Frankland, P.W., and Kida, S. (1998). CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* 21, 127-148.
- Soderling, T.R. (2000). CaM-kinases: modulators of synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 10, 375-380.
- Soderling, T.R., and Derkach, V.A. (2000). Postsynaptic protein phosphorylation and LTP. *Trends Neurosci* 23, 75-80.
- Sossin, W.S. (2008). Defining memories by their distinct molecular traces. *Trends Neurosci* 31, 170-175.
- Squire, L., and Barondes, S. (1974). Anisomycin, like other inhibitors of cerebral protein synthesis, impairs long-term memory of a discrimination task. *Brain Res* 66, 301-308.
- Squire, L.R., and Barondes, S.H. (1976). Amnesic effect of cycloheximide not due to depletion of a constitutive brain protein with short half-life. *Brain Res* 103, 183-189.
- Sutton, M.A., and Schuman, E.M. (2006). Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory. *Cell* 127, 49-58.

- Szinyei, C., Stork, O., and Pape, H.C. (2003). Contribution of NR2B subunits to synaptic transmission in amygdaloid interneurons. *J Neurosci* *23*, 2549-2556.
- Tomita, S., Chen, L., Kawasaki, Y., Petralia, R.S., Wenthold, R.J., Nicoll, R.A., and Brecht, D.S. (2003). Functional studies and distribution define a family of transmembrane AMPA receptor regulatory proteins. *J Cell Biol* *161*, 805-816.
- Tsvetkov, E., Carlezon, W.A., Benes, F.M., Kandel, E.R., and Bolshakov, V.Y. (2002). Fear conditioning occludes LTP-induced presynaptic enhancement of synaptic transmission in the cortical pathway to the lateral amygdala. *Neuron* *34*, 289-300.
- Tully, K., Li, Y., Tsvetkov, E., and Bolshakov, V.Y. (2007). Norepinephrine enables the induction of associative long-term potentiation at thalamo-amygdala synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* *104*, 14146-14150.
- Van Bockstaele, E.J., Bajic, D., Proudfit, H., and Valentino, R.J. (2001). Topographic architecture of stress-related pathways targeting the noradrenergic locus coeruleus. *Physiol Behav* *73*, 273-283.
- Vanhoose, A.M., and Winder, D.G. (2003). NMDA and beta1-adrenergic receptors differentially signal phosphorylation of glutamate receptor type 1 in area CA1 of hippocampus. *J Neurosci* *23*, 5827-5834.
- Vianna, M.R., Szapiro, G., McGaugh, J.L., Medina, J.H., and Izquierdo, I. (2001). Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 12251-12254.

- von Herten, L.S., and Giese, K.P. (2005). Memory reconsolidation engages only a subset of immediate-early genes induced during consolidation. *J Neurosci* 25, 1935-1942.
- Walker, D.L., and Davis, M. (2000). Involvement of NMDA receptors within the amygdala in short- versus long-term memory for fear conditioning as assessed with fear-potentiated startle. *Behav Neurosci* 114, 1019-1033.
- Walker, D.L., and Davis, M. (2008). Amygdala infusions of an NR2B-selective or an NR2A-preferring NMDA receptor antagonist differentially influence fear conditioning and expression in the fear-potentiated startle test. *Learn Mem* 15, 67-74.
- Wanisch, K., Tang, J., Mederer, A., and Wotjak, C.T. (2005). Trace fear conditioning depends on NMDA receptor activation and protein synthesis within the dorsal hippocampus of mice. *Behav Brain Res* 157, 63-69.
- Watkins, J.C., and Olverman, H.J. (1987). Agonists and antagonists for excitatory amino acid receptors. *Trends Neurosci* 10, 265-272.
- Weisskopf, M.G., and LeDoux, J.E. (1999). Distinct populations of NMDA receptors at subcortical and cortical inputs to principal cells of the lateral amygdala. *J Neurophysiol* 81, 930-934.
- Williams, K. (2001). Ifenprodil, a novel NMDA receptor antagonist: site and mechanism of action. *Curr Drug Targets* 2, 285-298.
- Yamauchi, T. (2005). Neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II--discovery, progress in a quarter of a century, and perspective: implication for learning and memory. *Biol Pharm Bul* 28, 1342-1354.

Yeh, S.H., Mao, S.C., Lin, H.C., and Gean, P.W. (2006). Synaptic expression of glutamate receptor after encoding of fear memory in the rat amygdala. *Mol Pharmacol* 69, 299-308.

Ziff, E.B. (2007). TARPs and the AMPA receptor trafficking paradox. *Neuron* 53, 627-633.

Zinkin, S., and Miller, A.J. (1967). Recovery of memory after amnesia induced by electroconvulsive shock. *Science* 155, 102-104.

CHAPITRE II : PREMIER MANUSCRIT***NATURE NEUROSCIENCE 9, 1237-1239 (2006)*****NMDA RECEPTORS ARE CRITICAL FOR UNLEASHING CONSOLIDATED AUDITORY FEAR MEMORIES**

Cyrinne Ben Mamou, Karine Gamache, and Karim Nader

Psychology Department, McGill University, Montréal (Qc), Canada

Abstract

Memories are dynamic and can change when recalled. The process that returns memories to a labile state during remembering is unclear. We found that NMDA, but not AMPA, receptor antagonists in the amygdala prior to recall prevented the consolidated fear memory from returning to a labile state. These findings suggest that NMDA receptors in the amygdala are critical for transforming a memory from a fixed to a labile state.

Introduction

New memories stabilize and consolidate over time, putatively via a mechanism that depends on protein and mRNA synthesis^{1,2}. It was thought that once consolidated, memories remain in a fixed, stable state that is insensitive to further amnesic challenge. Recently, however, it was shown that reactivation

of a consolidated fear memory can return the memory to a labile state, restabilization from which is thought to require a protein synthesis-dependent mechanism³. This process is called reconsolidation⁴. All reconsolidation experiments involve two processes that are engaged upon reactivation (**Supplementary Fig. 1**). First, the consolidated memory is returned to a labile state, and second, the labile memory is reconsolidated and restabilized. All studies to date have examined the mechanisms mediating restabilization. In contrast, the question of what mechanisms initially cause a consolidated memory to become labile has not been addressed. The clinical implications of this are critical: if targeting the reconsolidation of traumatic memory is ever going to be used as a clinical intervention, then it is essential to understand the mechanisms that induce lability. This will provide control over which memories are returned to a labile state during a therapeutic session. In the absence of literature on this issue, we developed a model in which the neural system acquires new information that initially exists in a labile state and then must undergo consolidation and stabilization (**Supplementary Fig. 1**). The mechanisms involved in learning-induced lability are well documented; therefore, we asked if these mechanisms were also necessary for the induction of reactivation-initiated lability. NMDA and AMPA receptors in the basolateral amygdala (BLA) have been critically implicated in new auditory fear learning⁵⁻⁸. Thus, we asked whether NMDA and AMPA receptors were also critical for the transformation of auditory fear memory in the BLA from a consolidated state to a labile state. If NMDA and AMPA receptors are critical in order for the memory to become labile, then inhibition of these receptors before reactivation should keep the memory in a fixed, stable state. As a result, the memory should remain insensitive to subsequent post-reactivation infusions of the amnesic agent anisomycin: the absence of amnesia would demonstrate that the mechanisms inducing lability have been blocked. In addition, we predicted that inhibition of these receptors after reactivation should not affect anisomycin's ability to impair the memory, because the memory will have

already returned to a labile state by the time these receptor systems are inhibited. This approach is complementary to previous studies of reconsolidation that have used the presence of amnesia to conclude that a necessary mechanism in the restabilization process has been blocked.

Results

Male Sprague Dawley rats received intra-BLA cannula implantations (**Supplementary Fig. 2** and **Supplementary methods**). After recovery, they were trained using an auditory fear conditioning protocol in which reconsolidation is known to be sensitive to anisomycin (ref. 3 and **Supplementary methods**). The day after training, we conducted a reactivation session in which all rats were exposed to a single conditioned stimulus (CS). All procedures were in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care, and were approved by McGill University Animal Care and Use Committee. Consistent with previous findings, pre-reactivation intra-BLA ifenprodil infusions had no effect on the expression of the conditioned freezing response during reactivation⁹ or on subsequent post-reactivation long-term memory (PR-LTM) scores (**Fig 1a,b**). Rats treated first with the vehicle and then with anisomycin showed the typical reconsolidation impairment (ref. 3 and **Fig 1a,b**). As predicted in the hypothesis, although ifenprodil did not affect performance on any test when administered alone in this protocol, it prevented the normal amnesic properties of post-reactivation anisomycin infusions (**Fig. 1a,b**). This negative finding was not due to a putative drug-drug interaction reducing anisomycin effectiveness as an amnesic agent, as the same series of infusions given after reactivation led to amnesia as profound as that in the vehicle-treated group (**Fig. 1c,d**). The fact that ifenprodil alone had no effect on behavior either during reactivation or in the PR-LTM test indicates that ifenprodil on its own does not have any behavioral effects that might confound the interpretation of the impairment found in the group treated first with ifenprodil and then with anisomycin. The finding that ifenprodil protected the

memory from anisomycin's amnesic effects also rules out any nonspecific effects such as amygdala dysfunction or changes in baseline behavior. To further confirm our present result—suggesting that NMDA receptors within the BLA were critical for transforming a consolidated auditory fear memory into a labile state—we tested whether pre-reactivation infusions of a distinct NMDA antagonist, D(-)-2-Amino-5-phosphonovaleric acid (AP5), would have the same effect as ifenprodil. Pre-reactivation infusion of AP5 led to the same pattern of results as that obtained with ifenprodil (**Fig. 2**). AP5 left PR-LTM intact, yet prevented anisomycin's amnesic effect. Taken together, it appears from the above data that NMDA receptor antagonists prevented the consolidated memory from entering a labile state during reactivation. Therefore, the activation of NMDA receptors in the region of the BLA seems to be a critical step that initiates reconsolidation of auditory fear memories. Few studies using systemic injections of NMDA receptor antagonists—for example, in contextual fear memory¹⁰ or odor reward memory¹¹—have reported that NMDA receptor antagonists alone induced amnesia, demonstrating that NMDA receptors are involved in the restabilization of the memory. This is in contrast with our present data that suggested a role of NMDA receptors in the induction of lability, but not in the restabilization of the memory. One possible explanation for these discrepancies is that reconsolidation might rely on dissimilar molecular mechanisms in different learning and memory systems. On the other hand, because systemic injections can produce confounding results, it is important to verify those reports by using central infusions.

The pattern of results we obtained with pre-reactivation infusion of the AMPA receptor antagonist 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) was opposite to that found with infusions of NMDA receptor antagonists (**Fig. 3**). Inhibition of AMPA receptors blocked the expression of conditioned freezing but not the induction of lability. The fact that the group treated first with CNQX and then with anisomycin showed intact post-

reactivation short-term memory (PR-STM) demonstrated that this drug treatment did not compromise the integrity of the memory. The intact PR-STM and impaired PR-LTM shown by both the CNQX-anisomycin and vehicle-anisomycin group indicated that both treatments led to a blockade of reconsolidation, despite the fact that the CNQX-anisomycin group showed greatly reduced reactivation scores. Furthermore, we conducted experiments using a variety of approaches, and the results suggested that the effects were not likely to be due to differential drug diffusion or robust protein synthesis inhibition of neighboring regions (**Supplementary data** and **Supplementary Figs. 3-5**). The finding that CNQX pretreatment did not prevent the induction of lability, an NMDA receptor-dependent process, suggested that NMDA receptors might be functional to some extent even with reduced AMPA currents. Although the exact mechanism mediating this effect is unclear, there are a few plausible explanations (**Supplementary note**).

Conclusion

Together, the present findings demonstrated that NMDA receptors were critical for the induction of lability but not the expression of conditioned freezing. On the other hand, they demonstrated that AMPA receptors were critical for the expression of the conditioned response, but under these conditions, not the induction of lability. Preventing the induction of lability with pre-reactivation drug infusions is a new experimental approach that can be used to study the mechanisms that transform a consolidated memory into a labile one. An understanding of the mechanisms inducing lability is critical if we are to target reconsolidation clinically—for example to treat humans suffering from post-traumatic stress disorders (PTSD). In theory, being able to manipulate memory lability is crucial if we want to control which memories return to a labile state during therapeutic challenge. Lastly, our demonstration that memories can undergo reconsolidation in the absence of their expression, would suggest that it is possible to therapeutically target reconsolidation of

traumatic memories in the absence of any explicit remembering of the traumatic event by the patient. This is clinically useful, as patients do not like remembering and re-experiencing their trauma. These findings provide insight into how reactivation unleashes our memories from a fixed state to one that is amenable to change.

Figure legends

Figure 1: Pre-reactivation ifenprodil infusion prevents anisomycin-induced amnesia but post-reactivation ifenprodil infusion does not. **(a)** Schematic of the experimental design for pre-reactivation ifenprodil infusion. **(b)** Behavioral scores for rats receiving ifenprodil or vehicle before reactivation and anisomycin or vehicle after reactivation. **(c)** Schematic of the experimental design for post-reactivation ifenprodil infusion. The delay between the two infusions was 10 min as in **a**. **(d)** Behavioral scores for rats that received post-reactivation infusions of ifenprodil or vehicle, followed by vehicle or anisomycin. PR-LTM scores indicate similar reconsolidation impairment for all anisomycin-treated rats, regardless of whether they received ifenprodil or vehicle. First and second letter of group names refer to first and second infusions, respectively: I, ifenprodil; V, vehicle; A, anisomycin. Data points represent group means \pm s.e.m.

Figure 2: Pre-reactivation AP5 infusion prevents anisomycin-induced amnesia. **(a)** Schematic of the experimental design. **(b)** Behavioral data for rats that received pre-reactivation AP5 or vehicle and post-reactivation anisomycin or vehicle. Data points represent group means \pm s.e.m.

Figure 3: Pre-reactivation CNQX infusion blocks the expression of freezing but not the induction of lability. **(a)** Schematic of the experimental design. **(b)** Behavioral data showing that rats that receiving CNQX before reactivation and anisomycin after reactivation had impaired reactivation scores and also impaired PR-LTM. Their performance in PR-STM and PR-LTM is

comparable to that in rats administered pre-reactivation vehicle and post-reactivation anisomycin, replicating the reconsolidation deficit. C, CNQX. Data points represent group means \pm s.e.m.

References

1. Dudai, Y. & Morris, R. in *Brain, perception, memory. Advances in Cognitive Sciences* (ed. Bolhuis, J.) (Oxford University Press, Oxford, 2000), pp 149-162.
2. Kandel, E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294, 1030-1038 (2001).
3. Nader, K., Schafe, G.E. & LeDoux, J.E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406, 722-726 (2000).
4. Spear, N. Retrieval of memory in animals. *Psychol Rev* 80, 163-194 (1973).
5. Miserendino, M. J., Sananes, C. B., Melia, K. R. & Davis, M. Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. *Nature* 345, 716-718 (1990).
6. Rodrigues, S. M., Schafe, G. E. & LeDoux, J. E. Intra-amygdala blockade of the NR2B subunit of the NMDA receptor disrupts the acquisition but not the expression of fear conditioning. *J Neurosci* 21, 6889-6896 (2001).
7. Kim, M., Campeau, S., Falls, W. A. & Davis, M. Infusion of the non-NMDA receptor antagonist CNQX into the amygdala blocks the expression fear-potentiated startle. *Behav Neural Biol* 59, 5-8 (1993).

8. Walker, D. L. & Davis, M. The role of amygdala glutamate receptors in fear learning, fear-potentiated startle, and extinction. *Pharmacol Biochem Behav* 71, 379-392 (2002).
9. Rodrigues, S. M., Schafe, G. E. & LeDoux, J. E. Intra-amygdala blockade of the NR2B subunit of the NMDA receptor disrupts the acquisition but not the expression of fear conditioning. *J Neurosci* 21, 6889-6896 (2001).
10. Suzuki, A. et al. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci* 24, 4787-4795 (2004).
11. Przybylski, J. & Sara, S. J. Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav Brain Res* 84, 241-246 (1997).

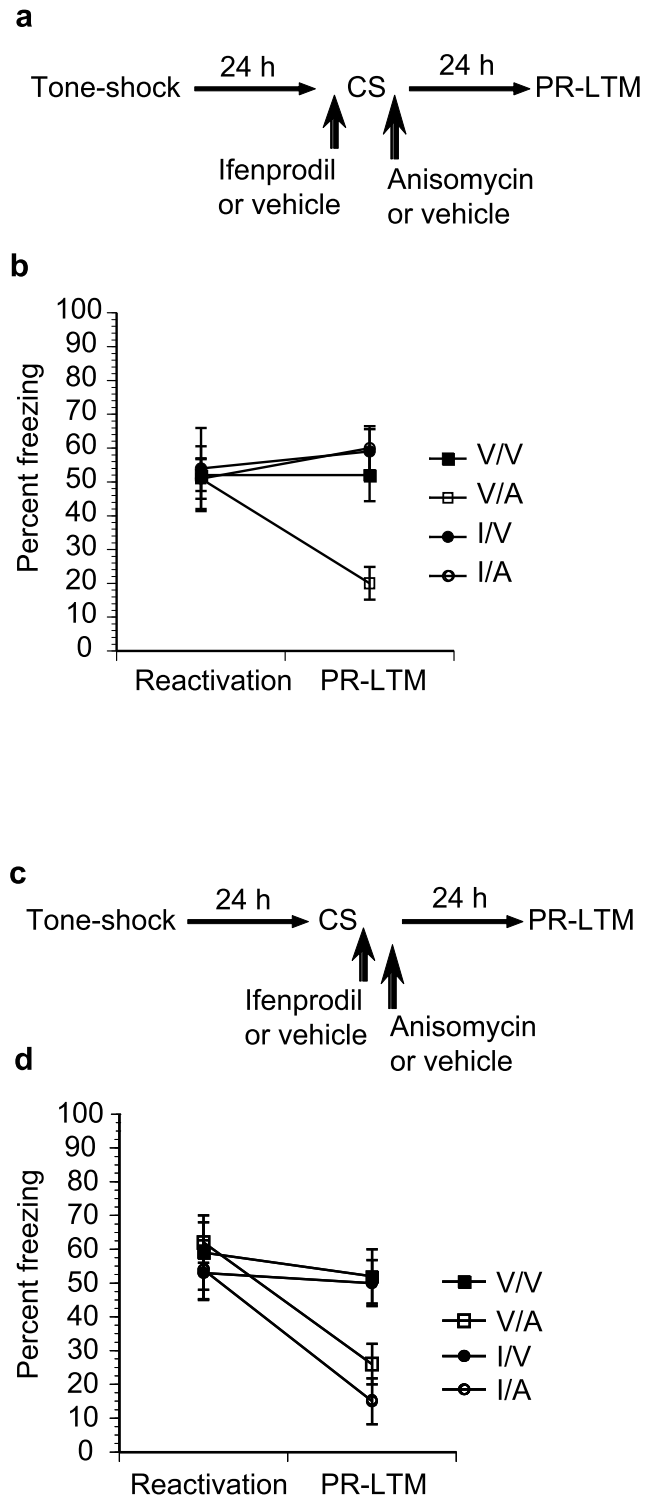
Figure 1

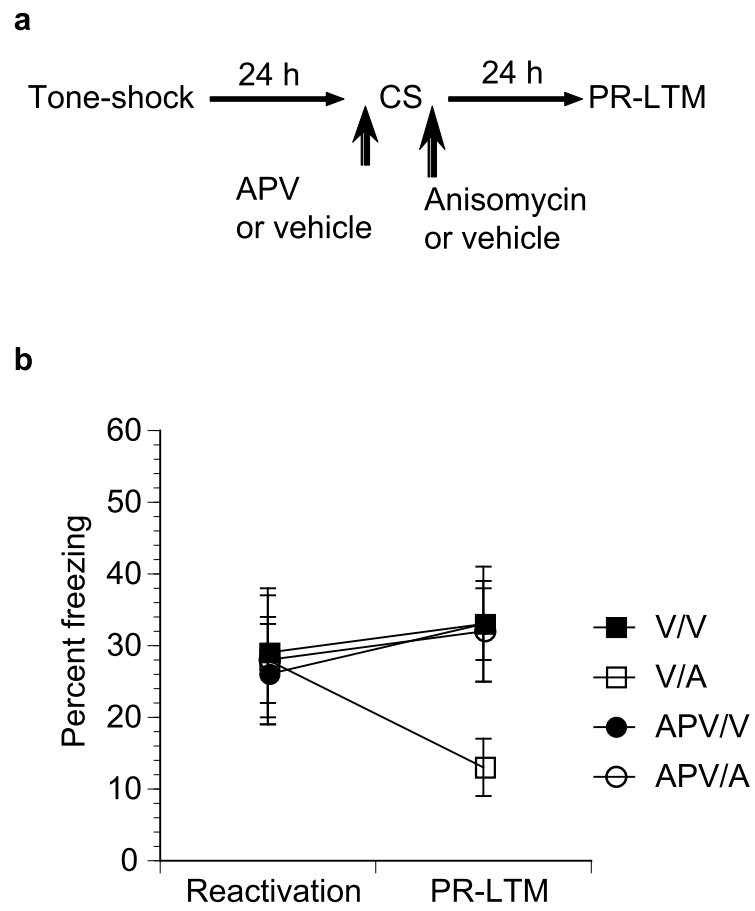
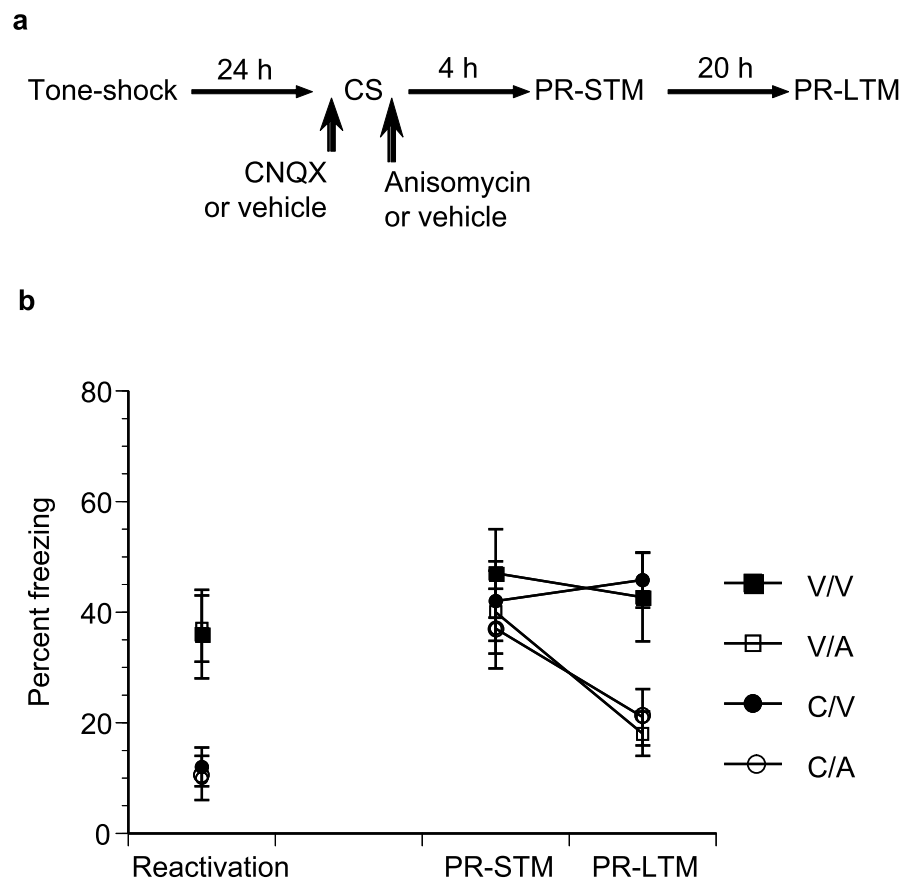
Figure 2

Figure 3

Supplementary notes

The finding that CNQX pretreatment does not prevent the induction of lability, an NMDA receptor dependent process, suggests that NMDA receptors are functional to some extent when AMPA receptor activation is reduced. At a physiological level, this pattern of results might initially seem surprising as AMPA currents are thought to enable NMDA receptor activation by removing the magnesium block¹. Although it is not clear how NMDA receptors function with reduced AMPA currents, there are few possibilities. First, in the projection neurons in the BLA, small NMDA currents are elicited in the absence of AMPA currents^{2,3}, suggesting that under normal physiological conditions, a portion of neurotransmission in this pathway is mediated by NMDA receptors. This current might be responsible for the induction of plasticity. Although this current is modest it could be enhanced by dopamine which is critical in the amygdala for the expression of conditioned fear responses⁴ and is released in the BLA during fear expression⁵. In addition, dopamine can directly increase the excitability of BLA projection neurons in the absence of AMPA and NMDA currents by inhibiting an outward K⁺ current⁶. Alternatively, since BLA neurons are under strong local inhibition⁷, if the local inhibitory tone of inter-neurons is reduced, this may cause the projection neurons to become sufficiently depolarized to remove the magnesium block. Dopamine release during reactivation could also contribute to this decrease in interneuron tone as it has been shown to decrease inhibitory neurotransmission in the amygdala⁸. Lastly, a novel Ca⁺⁺ and Na⁺ independent signaling pathway has been recently identified when NMDA and mGluR5 receptors are co-activated and subsequently activate ERK1/2 and cAMP response element-binding protein (CREB)⁹, which are both necessary for reconsolidation of auditory fear conditioning^{10,11}. Given that NMDA and mGluR5 receptors are critical for fear conditioning^{12,13}, it is possible that they are co-activated during reactivation, and in the absence of Ca⁺⁺ signaling,

engage many of the molecular mechanisms necessary for reconsolidation. In order to further confirm the findings obtained with our pharmacological approach it would be interesting to analyze memory lability in transgenic animals carrying inducible knock-in NMDA receptors. The genetic and molecular approach can then be brought to bear on the molecular mechanisms involved in this presumed NMDA receptor-dependent induction of lability.

Statistical analysis

All rats received pre-reactivation infusions of either ifenprodil (1 μg per 0.25 μl per side), a selective antagonist of the NR2B subunit of NMDA receptors, or its vehicle. After reactivation, animals received a bilateral infusion of ACSF (0.25 μl per side) or anisomycin (62.5 μg per 0.25 μl per side) into the BLA. A repeated measures ANOVA comparing the scores of the 4 groups over Test periods (reactivation and PR-LTM) revealed a significant interaction ($F(3, 32) = 4, P < 0.05$). Post-Hoc comparisons confirmed that only group vehicle/anisomycin showed significantly impaired freezing during PR-LTM tests compared to their performance during reactivation ($P < 0.05$). All other groups had comparable behavior during reactivation and PR-LTM tests (P 's > 0.05). These findings show that ifenprodil did not have any effect on the expression of conditioned freezing on its own but prevented the memory from being impaired by anisomycin challenge.

In contrast, post-reactivation had no effect on the induction of reconsolidation (Figure 1B). An ANOVA demonstrated a significant interaction between Group and Test Period (reactivation and PR-LTM) ($F(3, 40) = 6, P < 0.05$). Post-hoc analyses demonstrated that both groups vehicle/anisomycin and ifenprodil/anisomycin showed significantly lower performance during the PR-LTM test compared to reactivation (P 's < 0.05), whereas the other groups had comparable reactivation and PR-LTM scores

(P 's > 0.05). Groups vehicle/anisomycin and ifenprodil/anisomycin had comparable scores for both reactivation and PR-LTM sessions (P 's > 0.05).

We verified the effects of pre-reactivation ifenprodil with the NMDA receptor antagonist AP5 (2.5 μ g per 0.5 μ l), which has been shown to block the acquisition of fear conditioning¹⁴. A repeated measures ANOVA comparing the scores of the 4 groups over Test periods (reactivation and PR-LTM) revealed a significant interaction ($F(3, 26) = 5.9, P < 0.05$). Post-hoc comparisons revealed that only group vehicle /anisomycin was significantly impaired in its PR-LTM test compared to reactivation ($P < 0.05$); all other groups had comparable reactivation and PR-LTM scores ($P > 0.05$).

The role of AMPA receptors in the induction of plasticity was tested using the same protocol as in Experiment 1, with the addition of a PR-STM test (Supplementary methods and Figure 3A). Animals received pre-reactivation infusions of CNQX (2.5 μ g per 0.25 μ l per side), which block the expression of fear potentiated startle over a 30 min retention test¹⁵, or its vehicle. A one way ANOVA comparing reactivation scores across groups revealed a significant main effect of group ($F(3, 60) = 7, P < 0.05$), with post-hoc analyses demonstrating that groups CNQX/vehicle and CNQX/anisomycin showed lower reactivation scores than the groups that received vehicle (Figure 3b; P 's < 0.05). A repeated measures ANOVA comparing the groups across Test Period (PR-STM and PR-LTM) revealed a significant interaction ($F(3, 60) = 3, P < 0.05$). Post-hoc analyses revealed that all groups had comparable PR-STM scores (P 's > 0.05) indicating that the drug combination did not compromise long term amygdala function. Groups vehicle/vehicle and CNQX/vehicle showed comparable freezing during their PR-STM and PR-LTM tests (P 's > 0.05). CNQX/anisomycin and vehicle /anisomycin groups were both significantly lower in their PR-LTM scores than their PR-STM scores (P 's < 0.05) demonstrating a time-dependent memory impairment. These findings demonstrate that CNQX impaired the expression of conditioned responding

during reactivation, but this did not prevent the memory from returning to a labile state.

References for the supplementary notes

1. Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A. & Prochiantz, A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307, 462-465 (1984).
2. Weisskopf, M. G. & LeDoux, J. E. Distinct populations of NMDA receptors at subcortical and cortical inputs to principal cells of the lateral amygdala. *J Neurophysiol* 81, 930-934 (1999).
3. Rainnie, D. G., Asprodini, E. K. & Shinnick-Gallagher, P. Excitatory transmission in the basolateral amygdala. *J Neurophysiol* 66, 986-998 (1991).
4. Lamont, E. W. & Kokkinidis, L. Infusion of the dopamine D1 receptor antagonist SCH 23390 into the amygdala blocks fear expression in a potentiated startle paradigm. *Brain Res* 795, 128-136 (1998).
5. Suzuki, T., Ishigooka, J., Watanabe, S. & Miyaoka, H. Enhancement of delayed release of dopamine in the amygdala induced by conditioned fear stress in methamphetamine-sensitized rats. *Eur J Pharmacol* 435, 59-65 (2002).
6. Kroner, S., Rosenkranz, J. A., Grace, A. A. & Barrionuevo, G. Dopamine modulates excitability of basolateral amygdala neurons in vitro. *J Neurophysiol* 93, 1598-1610 (2005).
7. McDonald, A. J. Immunohistochemical identification of gamma-aminobutyric acid-containing neurons in the rat basolateral amygdala. *Neurosci Lett* 53, 203-207 (1985).

8. Loretan, K., Bissiere, S. & Luthi, A. Dopaminergic modulation of spontaneous inhibitory network activity in the lateral amygdala. *Neuropharmacology* 47, 631-639 (2004).
9. Yang, L. et al. A Novel Ca²⁺-independent signaling pathway to extracellular signal-regulated protein kinase by coactivation of NMDA receptors and metabotropic glutamate receptor 5 in neurons. *J Neurosci* 24, 10846-10857 (2004).
10. Kida, S. et al. CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nat Neurosci* 5, 348-355 (2002).
11. Duvarci, S., Nader, K. & Ledoux, J. E. Activation of extracellular signal-regulated kinase- mitogen-activated protein kinase cascade in the amygdala is required for memory reconsolidation of auditory fear conditioning. *Eur J Neurosci* 21, 283-289 (2005).
12. Rodrigues, S. M., Bauer, E. P., Farb, C. R., Schafe, G. E. & LeDoux, J. E. The group I metabotropic glutamate receptor mGluR5 is required for fear memory formation and long-term potentiation in the lateral amygdala. *J Neurosci* 22, 5219-5229 (2002).
13. Rodrigues, S. M., Schafe, G. E. & LeDoux, J. E. Intra-amygdala blockade of the NR2B subunit of the NMDA receptor disrupts the acquisition but not the expression of fear conditioning. *J Neurosci* 21, 6889-6896 (2001).
14. Miserendino, M. J., Sananes, C. B., Melia, K. R. & Davis, M. Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. *Nature* 345, 716-718 (1990).

15. Kim, M., Campeau, S., Falls, W. A. & Davis, M. Infusion of the non-NMDA receptor antagonist CNQX into the amygdala blocks the expression fear-potentiated startle. *Behav Neural Biol* 59, 5-8 (1993).

Supplementary data

Control of drug spread in intra-BLA infusions

Although we targeted the BLA, it is always possible that the effects were mediated by sites distal to the BLA because of uncontrolled drug diffusion. First, the differential effects of CNQX and ifenprodil could possibly be due to differential diffusion of the 2 drugs. This was not the case however, since ifenprodil and CNQX had similar diffusion patterns measured in 3 different axes centered on the tip of the injector (Supplementary Fig. 3): both groups in each experiment overlap across all angles. In all comparisons (Repeated measure ANOVA on drug treatment over distance) there was no significant interactions for any of the 3 angles F 's < 1 . This demonstrates that there is no differential diffusion between ifenprodil and CNQX. Thus the reported effects cannot be attributed to CNQX and ifenprodil exhibiting differential diffusions.

Next, we asked if there was significant inhibition of protein synthesis in the central amygdala (Ce). In order to analyze the area of functional inhibition by anisomycin, we stimulated the brain, to induce a high expression of the immediate early gene *c-fos*. Pentylentetrazol (PTZ)-induced seizure has been previously shown to significantly induce *c-fos* gene and Fos protein expression, in many brain regions, including the amygdala and hippocampus¹. We used this approach to enhance the overall Fos protein level, and against this high Fos background, we measured the anatomical extent and the effectiveness of the anisomycin infused in the BLA. Animals received an intra-BLA vehicle infusion in one hemisphere and anisomycin in the other hemisphere, allowing within-animal comparisons. One hour later, Fos expression was decreased in the BLA by approximately 50 % ($t(8) = 10$ $P < 0.05$) and in the Ce by 18 % ($t(8) = 5$, $P < 0.05$; Supplementary Fig. 4). This suggests that anisomycin infused in the BLA does not massively affect Fos protein levels in the Ce.

In order to further assess the extent of protein synthesis inhibition due to anisomycin local infusion, we used an autoradiographic technique based on the incorporation of a radiolabeled amino acid into newly synthesized proteins, as previously described². Inhibition of protein synthesis by anisomycin in the region of the BLA was approximately 50% of controls ($n = 12$ sections from 3 animals ; $t(22) = 10, P < 0.05$). In contrast, inhibition of protein synthesis in the region of Ce was only approximately 20% ($t(22) = 5, P < 0.05$; Supplementary Fig. 5). These values are consistent with the immunohistochemical analyses above.

Our results suggest that although anisomycin causes some degree of protein synthesis inhibition in other areas of the brain, such as the Ce, the level of inhibition is not very substantial, ranging from 18 to 20%, a level typically considered far too low to induce amnesia³. In further support of the view that the Ce is not critical for these effects is the fact that lesions of the Ce have no effect on the acquisition of fear⁴⁻⁶. However, we cannot completely rule out the contribution of Ce in the observed effects until a complete study comparing intra-Ce and intra-BLA drug infusions will specifically address the role of each nucleus in freezing expression and induction of lability. The one other area that is most likely to show high protein synthesis inhibition is the striatum, because it is positioned dorsal to the amygdala and drugs will always diffuse back up a cannula track. However, we have already performed tests to see if infusions of anisomycin, dorsal to the amygdala, block reconsolidation and found no effect⁷. Thus, anisomycin is not acting dorsal to the amygdala either. In conclusion, it is most likely that the drug effects reported here are due to an action in the BLA.

Methods for the supplementary data

Dye spread

In order to compare the spread of CNQX and ifenprodil, Neutral red dye (62.5 μg per μl), was added to the solutions of interest. The infusions were

of the exact compound and parameters used in the behavioral studies. In order to visualize the spread of the drug in single infusions, a first group of rats received an intra-BLA infusion of CNQX+dye (2.5 μg per 0.25 μl per side) in one hemisphere and ifenprodil+dye (1 μg per 0.25 μl per side) in the contralateral BLA. To visualize the spread of the receptor antagonists in double infusions, a second group received an infusion of ifenprodil+dye in one BLA and CNQX+dye in the contralateral side, followed with bilateral infusion of anisomycin 10 min later. A third group was administered the identical treatment, with the difference that dye was added to the anisomycin solution to test the spread of anisomycin solution in double infusions. Animals were sacrificed 10 min after the last infusion and their brains were cut in 50 μm coronal sections and slide-mounted for histological evaluation of dye diffusion. The optical intensity of the dye was taken along 3 different axes, 1- along axis of cannula penetration into the BLA, 2- 60 degrees from that axis, and 3- 120 degrees from cannula axis. Data were acquired for 1250 μm on both sides of the tip of the cannula. The data were analyzed at every 100 μm with a repeated measures ANOVA comparing drug treatment by distance from the cannula center for each angle.

PTZ-induced seizure and Fos immunohistochemistry

We performed immunohistochemical evaluation of anisomycin's inhibition of an activity-induced protein, Fos. Each animal received vehicle in one BLA and anisomycin in the contralateral BLA. Rats were then systemically administered PTZ (Pentamethylenetetrazole, Sigma-Aldrich, 50 mg per kg) 10 minutes after the last infusion and returned to their home cages to be monitored for seizure¹. Rats were transcardially perfused one hour later with 200 ml PBS (pH 7.4), followed with 400 ml 4% PFA in 0.1 M PB (pH 7.4). Brains were removed and post-fixed overnight in the same fixative and then processed for Fos immunohistochemistry using a standard protocol⁸. Brains were cut into 50

µm-thick free floating sections on a vibrating microtome (Leica Microsystems). Sections were treated for 20 min with 0.3 % H₂O₂ in PBS, then washed in PBS, incubated for 1 hour with blocking solution (2 % normal serum, 2 % BSA, 0.5 % Triton X-100, in PBS) and then incubated overnight with the primary antibody at room temperature (anti-Fos, Oncogene). After 3 washes in PBS, tissue sections were incubated for 2 hr with the biotinylated secondary antibody (Vector Laboratories). After 3 washes in PBS, sections were incubated for 2 hr in avidin-biotin-peroxidase complex (ABC Elite kit, Vector Laboratories). Peroxidase was revealed by incubating sections for 2 min with 3-3'-diaminobenzidine (Sigma-Aldrich ; 0.5 mg per ml) and 0.002 % H₂O₂ in PBS. Sections were then mounted on glass slides, dehydrated in ethanol solutions and toluene, and coverslipped (DPX Mountant, Fluka). The specificity of the signal was attested in control experiments by the absence of signal when the primary antibody was omitted. Sections were examined at the microscope (Model IX81, Olympus, Japan) equipped with a CCD monochrome camera (Model ICX-285, Sony, Japan) and labeled cells were counted in the BLA and Ce using the Image Pro Plus software (Mediacybernetics) by observers blind to the origin of the sections. The background levels were set such that only unequivocally positive, darkly stained cells were counted. Anisomycin-induced inhibition of Fos expression in the BLA and Ce was assessed by comparing the number of Fos-positive nuclei in the anisomycin-infused BLA vs. vehicle-infused ones.

Autoradiographic estimation of protein synthesis inhibition

We evaluated anisomycin-induced protein synthesis inhibition using autoradiographic quantification of radiolabeled-leucine incorporation. Rats received intra-amygdala infusion of anisomycin in one hemisphere (62.5 µg per 0.50 µl Saline), and vehicle in the contralateral amygdala. Ten minutes later, rats were systemically injected with L-[1-¹⁴C]-Leucine (100 µCi per kg, GE Healthcare), administered through the jugular vein, under deep anesthesia. Rats were decapitated 60 minutes later ; their brains were rapidly removed and

frozen on dry ice. Brains were cut on a cryostat, and 30 μm sections were collected on microscope slides and dried on a hot plate. These slides were apposed for 5 days to a Phosphor Screen (GE Healthcare) that was subsequently scanned with a Storm Scanner (GE Healthcare). The data were quantified using ImageQuant software (Amersham Biosciences).

References for the supplementary data

1. Del Bel, E. A., Silveira, M. C., Graeff, F. G., Garcia-Cairasco, N. & Guimaraes, F. S. Differential expression of c-fos mRNA and Fos protein in the rat brain after restraint stress or pentylentetrazol-induced seizures. *Cell Mol Neurobiol* 18, 339-346 (1998).
2. Maren, S., Ferrario, C. R., Corcoran, K. A., Desmond, T. J. & Frey, K. A. Protein synthesis in the amygdala, but not the auditory thalamus, is required for consolidation of Pavlovian fear conditioning in rats. *Eur J Neurosci* 18, 3080-3088 (2003).
3. Rosenblum, K., Meiri, N. & Dudai, Y. Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behav Neural Biol* 59, 49-56 (1993).
4. Amorapanth, P., LeDoux, J. E. & Nader, K. Different lateral amygdala outputs mediate reactions and actions elicited by a fear-arousing stimulus. *Nat Neurosci* 3, 74-79 (2000).
5. Killcross, S., Robbins, T. W. & Everitt, B. J. Different types of fear-conditioned behaviour mediated by separate nuclei within amygdala. *Nature* 388, 377-380 (1997).
6. Koo, J. W., Han, J. S. & Kim, J. J. Selective neurotoxic lesions of basolateral and central nuclei of the amygdala produce differential effects on fear conditioning. *J Neurosci* 24, 7654-7662 (2004).

7. Duvarci, S., Mamou, C. B. & Nader, K. Extinction is not a sufficient condition to prevent fear memories from undergoing reconsolidation in the basolateral amygdala. *Eur J Neurosci* 24, 249-260 (2006).
8. Schafe, G. E. et al. Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning [In Process Citation]. *J Neurosci* 20, 8177-8187 (2000).

Supplementary methods

Subjects

Subjects were adult male Sprague-Dawley rats from Charles River Laboratories. Rats were housed individually in plastic Nalgene cages and maintained on a 12/12 h light/dark cycle. Food and water were provided *ad libitum*. All procedures were in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines, and were approved by McGill University Animal Care and Use Committee.

Surgery and histology

Under deep anesthesia (3.33 mg per kg xylazine ; 55.55 mg per kg ketamine ; 0.27 mg per kg medetomidine hydrochloride), rats were implanted bilaterally with 22-gauge stainless steel cannulas into the lateral amygdala. Coordinates were 3.0 mm posterior to bregma, 5.3 mm lateral to the midline and 8.0 mm ventral to the skull surface. Rats were given at least 5 days to recover before experimental procedures. At the end of the experiment, animals were transcardially perfused with 4 % formalin solution and their brains sectioned at 50 μ m thickness. The sections were stained using cresyl violet and examined by light microscopy for cannula penetration into the BLA. Animals that did not have bilaterally placed cannulas in the BLA were excluded from the statistical analyses.

Intra-BLA infusions

Drugs were infused slowly using an infusion pump into the BLA at 0.25 μ l per min. Following drug infusion, injectors were left in place for an additional minute to allow diffusion of the drug away from the cannula tip. Anisomycin (Sigma-Aldrich) was dissolved in equimolar HCl, diluted with ACSF and adjusted to pH 7.4 with NaOH. The dose of anisomycin was 62.5

μg per $0.25 \mu\text{l}$ per side. This is the lowest dose that is effective against both consolidation and reconsolidation^{1,2}. Furthermore, it is only effective at blocking reconsolidation when injected into, but not dorsal to the BLA³. Ifenprodil (Sigma-Aldrich) was dissolved in 0.1 M PB, 0.1 % tartaric acid. The infused dose was $1 \mu\text{g}$ per $0.25 \mu\text{l}$ per side. CNQX (Sigma-Aldrich) was dissolved in DMSO and infused at $2.5 \mu\text{g}$ per $0.25 \mu\text{l}$ per side which has been shown to block the expression of fear potentiated startle⁴. AP5 was dissolved in saline (0.9 % NaCl) and injected at $2.5 \mu\text{g}$ per $0.5 \mu\text{l}$ per side.

Behavioral apparatus

Conditioning and tone testing were conducted in different chambers (Med-Associates). Rats were conditioned in a Plexiglas rodent conditioning chamber (chamber A), brightly lit by 3 house lights and containing a metal grid floor. In order to minimize context generalization with the conditioning chamber during auditory fear memory reactivation, for tone testing, rats were placed in a distinct chamber (chamber B) containing a single dim house light, black and white striped wall panels and a white plexiglass floor wiped with peppermint scent. A micro-video camera was mounted at the top of the chambers to record behavior for analysis. Freezing behavior was scored with Freeze-View software (Actimetrics) by an experimenter blind to the experimental origin of the rats.

Behavioral procedures

Rats were placed in chamber A and after a 5 min acclimatizing period, they were given a single conditioning trial consisting of a 30 s presentation of a 5 kHz, 75 dB tone (CS) that co-terminated with a 2.0 mA, 1 s foot-shock (US). Rats were then returned to their home cages. To reactivate the memory, 24 h later, rats were placed in chamber B and given a single 30 s-CS presentation. At this time point, the memory has already completed cellular consolidation¹. In

some experiments animals received a post-reactivation short-term memory (PR-STM) test 4 h after reactivation that entailed 3 non-reinforced tone presentations. All animals received post-reactivation long-term memory (PR-LTM) tests 24 h after reactivation which consisted of 3 non-reinforced tone presentations.

Typically, PR-STM tests are performed to test for specificity of behavioral impairment. In experiment 1 and 2 no PR-STM was performed as we predicted a rescue from amnesia. A rescue of the impairment shows the drug's actions are specific. In experiment 3, a PR-STM was included because we were concerned that DMSO and anisomycin treatments might lead to a non-specific effect which would appear as impaired behavior during the reactivation and PR-STM tests. Therefore, in order to have an internal control for the potential impairment of PR-LTM, we included a PR-STM test. A non-specific effect would lead to impairment in the PR-STM, whereas an impairment specific to reconsolidation would be accompanied by intact PR-STM.

Experiment 1

A first set of animals received pre-reactivation ifenprodil or vehicle infusions: Rats were infused with either ifenprodil (1 μg per 0.25 μl per side) or vehicle 5-10 min prior to memory reactivation. Ifenprodil, at the above dose, only blocks the acquisition but not the expression of auditory fear conditioning⁵. Immediately after reactivation, animals received a second infusion of either ACSF or anisomycin (62.5 μg per 0.25 μl per side). Animals were then returned to their home cage and received a PR-LTM test 24 h later. This generated 4 groups where the first and second word refers to pre- and post-reactivation infusions, respectively: vehicle/vehicle ($n = 10$), vehicle/anisomycin ($n = 10$), ifenprodil/vehicle ($n = 9$), ifenprodil/anisomycin ($n = 6$).

The second set of animals received no pre-reactivation infusions: Rats received the identical treatment as described above ; however, both infusions were performed after reactivation. Immediately after reactivation animals received an infusion of ifenprodil (1 μg per 0.25 μl per side) or its vehicle. The interval between ifenprodil and anisomycin infusions was kept the same as experiment 1 to control for any possible drug–drug interaction. Therefore, there was a 10-15 minute delay before the animals received their second infusion of either anisomycin or ACSF. We have found that reconsolidation of auditory fear memories in the BLA are still sensitive to anisomycin well beyond the 15 min delay imposed here between reactivation and infusions³. Animals were then returned to their home cage and received a PR-LTM test 24 h later. This created 4 groups where the first and second word refers to first and second infusions, respectively: vehicle/vehicle ($n = 9$), vehicle/anisomycin ($n = 12$), ifenprodil/vehicle ($n = 10$), ifenprodil/anisomycin ($n = 12$).

Experiment 2

Rats were infused with either AP5 (2.5 μg per 0.5 μl) or vehicle 5-10 min prior to memory reactivation. AP5, at the above dose, only blocks the acquisition of auditory fear conditioning. Because AP5 can also block the expression of freezing, we used a dose on the lower end of the dose-response curve in order to avoid impairments in the expression of auditory fear conditioning. Immediately after reactivation, animals received a second infusion of either ACSF or anisomycin (62.5 μg per 0.25 μl per side). Animals were then returned to their home cage and received a PR-LTM test 24 h later. This created 4 groups where the first and second word refers to pre- and post-reactivation infusions, respectively: vehicle/vehicle ($n = 7$), vehicle/anisomycin ($n = 9$), AP5/vehicle ($n = 7$), AP5/anisomycin ($n = 6$).

Experiment 3

Rats were infused with either CNQX (2.5 μg per 0.25 μl per side) or its vehicle 5-10 min prior to memory reactivation. Immediately after reactivation, animals received a second infusion of either ACSF or anisomycin (62.5 μg per 0.25 μl per side). Animals were then returned to their home cage and received a PR-STM test 4 h later and a PR-LTM test 24 h after reactivation. This created 4 groups where the first and second word refers to pre- and post-reactivation infusions, respectively: vehicle/vehicle ($n = 14$), vehicle/anisomycin ($n = 18$), CNQX/vehicle ($n = 17$), CNQX/anisomycin ($n = 15$).

Supplementary figure legends

Supplementary Figure 1: Models of the induction of plasticity. (a) Schematic describing the events that are initiated when a consolidated memory that is in an inactive memory state is reactivated. Initially the memory returns to a labile state (called an active memory state) from which it is restabilized by reconsolidation and once again becomes an inactive memory. (b) Schematic describing the events induced by new learning. New learning induces plasticity: the structural modifications in a neural system are initially labile and have to be stabilized over time by a consolidation process.

Supplementary Figure 2: Schematic representation of cannula placements for animals included in the statistical analyses. Schematic sections of the amygdala are shown at four different rostral \pm caudal planes. The numbers represent the posterior coordinate from bregma. Abbreviations ; L, lateral nucleus ; B, basal nucleus ; C, central nucleus.

Supplementary Figure 3: Examination of drug diffusion by dye spread. (a,b,c) Optical density of the stained area is represented along the cannula axis (left column), 60 degrees (middle column) and 120 degrees (right column) from the cannula axis. The broken vertical line represents the cannula

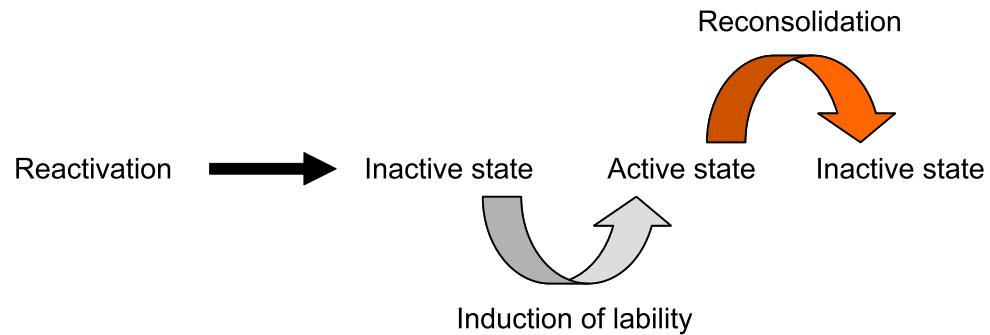
axis. The full lines on each side of the broken line represent the boundary of the BLA along the axis considered. (a) Optical density for ifenprodil and CNQX-infused BLA 7 min after the infusions, which was the time between drug infusion and reactivation in the behavioral experiments. (b) Optical density in BLA receiving a first infusion of ifenprodil+dye or CNQX+dye followed by anisomycin. (c) Optical density in BLA after an infusion of receptor antagonist (ifenprodil or CNQX), followed by an infusion of anisomycin+dye. (d) Bright field photomicrograph of a brain section showing the spread of the ifenprodil+dye solution and the 3 axes along which the analysis was performed. Abbreviations: I, ifenprodil; C, CNQX; A, anisomycin.

Supplementary Figure 4: Immunohistochemical analysis of PTZ-induced Fos protein levels after anisomycin infusion: immunoreactivity to Fos in vehicle (a) and anisomycin (b) -infused rats illustrate the extent of anisomycin protein synthesis inhibition. High magnification image of Fos immunoreactivity in the BLA (c, e) and the Ce (d, f) in vehicle and anisomycin infused rats, respectively. (g) Quantitative analysis of Fos immunoreactivity showing a significant protein synthesis inhibition in the BLA of anisomycin infused animals compared to control levels. Arrowheads represent the injector tip. BLA: basolateral amygdala; Ce: central amygdala; ROI: region of interest.

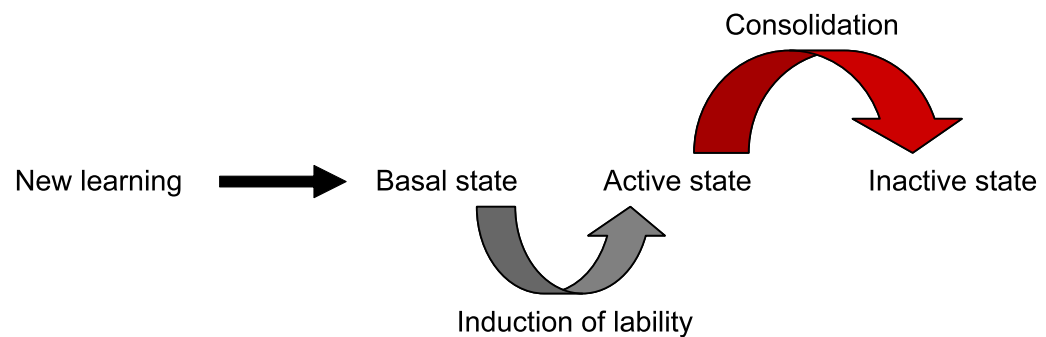
Supplementary Figure 5: Autoradiographic evaluation of protein synthesis inhibition after intra-BLA anisomycin infusion, showing greater inhibition in the target area (BLA) than the adjacent Ce nucleus. (a) Autoradiogram of a coronal section superimposed with the corresponding diagram of the atlas brain (Paxinos and Watson): the quantification of regions corresponding to the BLA and the Ce is shown in (c). (b) Same autoradiogram as in (a), but without diagram. (c) Graphic representation of autoradiogram analysis illustrating ¹⁴C-Leucine incorporation into newly synthesised proteins

in BLA and Ce nuclei, 60 minutes after intra-BLA anisomycin or vehicle infusion.

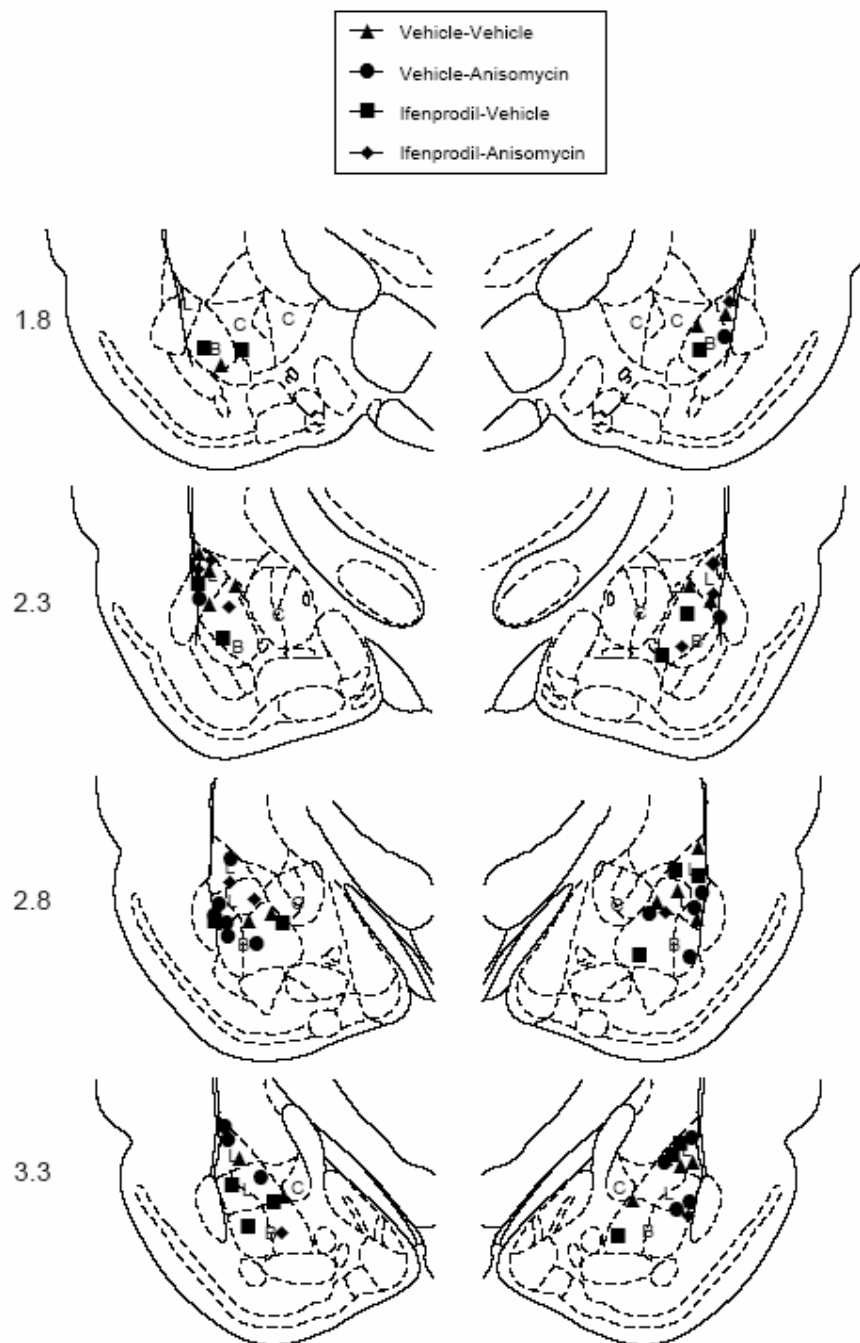
a



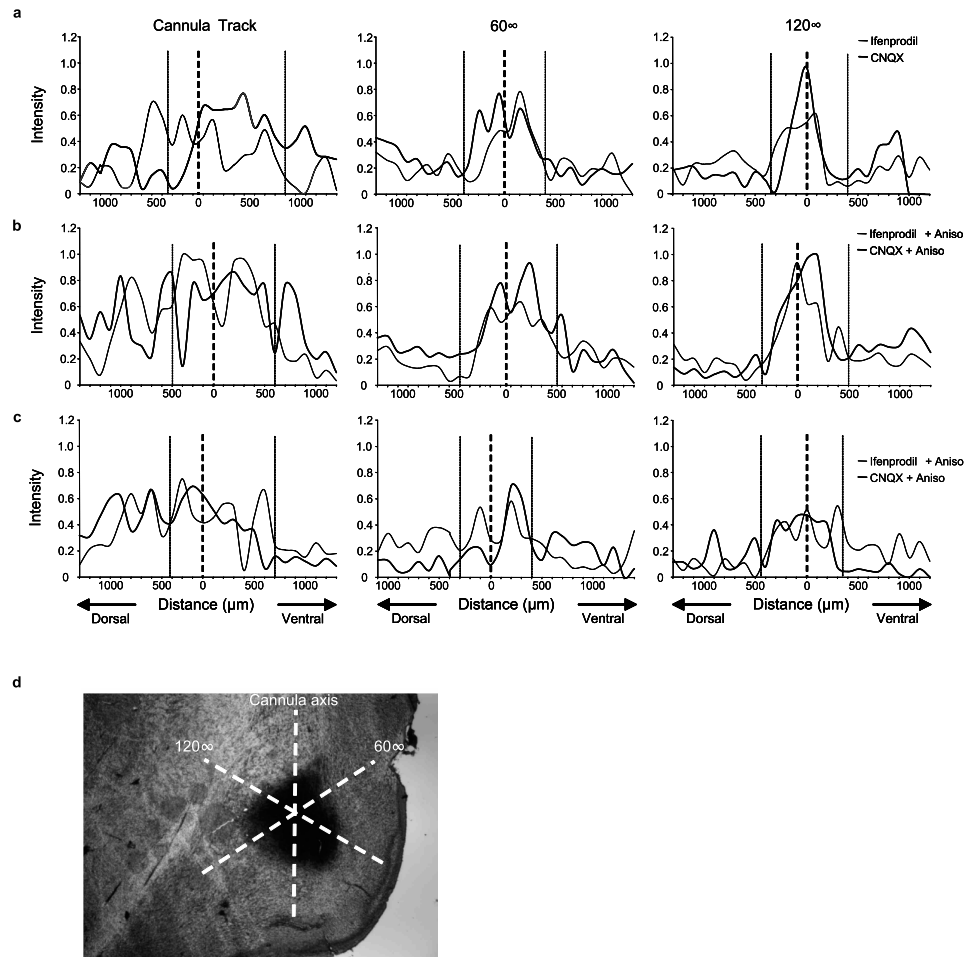
b



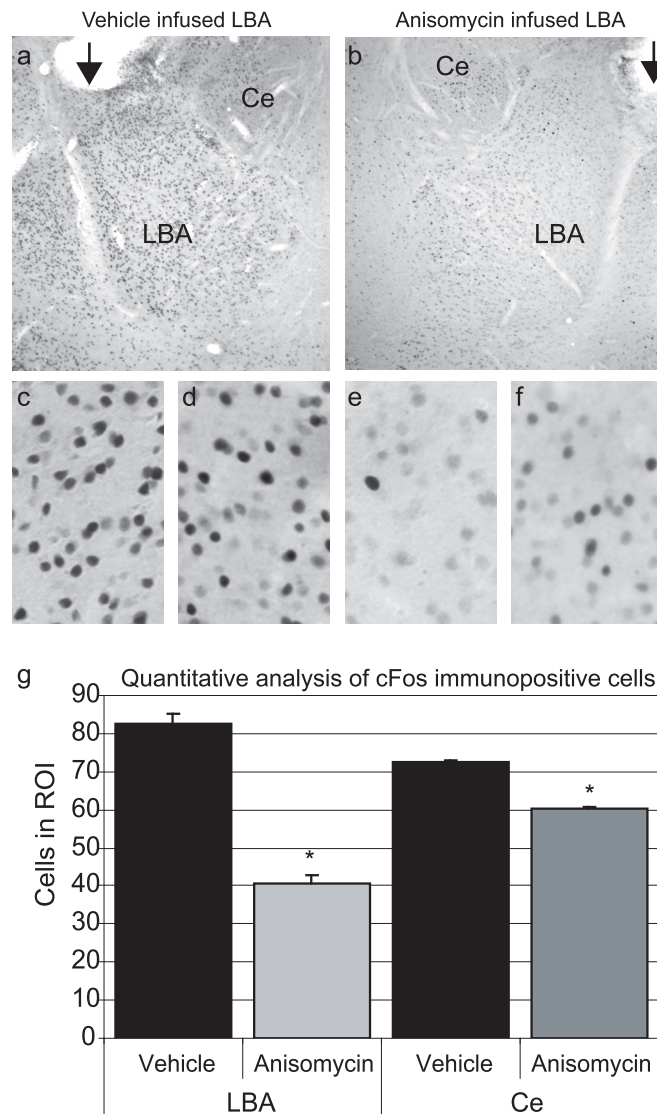
Supplementary Figure1: Models of the induction of plasticity. (a) Schematic describing the events that are initiated when a consolidated memory that is in an inactive memory state, is reactivated. Initially the memory returns to a labile state (called an active memory state) from which it is restabilized by reconsolidation and once again becomes an inactive memory. (b) Schematic describing the events induced by new learning. New learning induces plasticity: the structural modifications in a neural system are initially labile and have to be stabilized over time by a consolidation process.



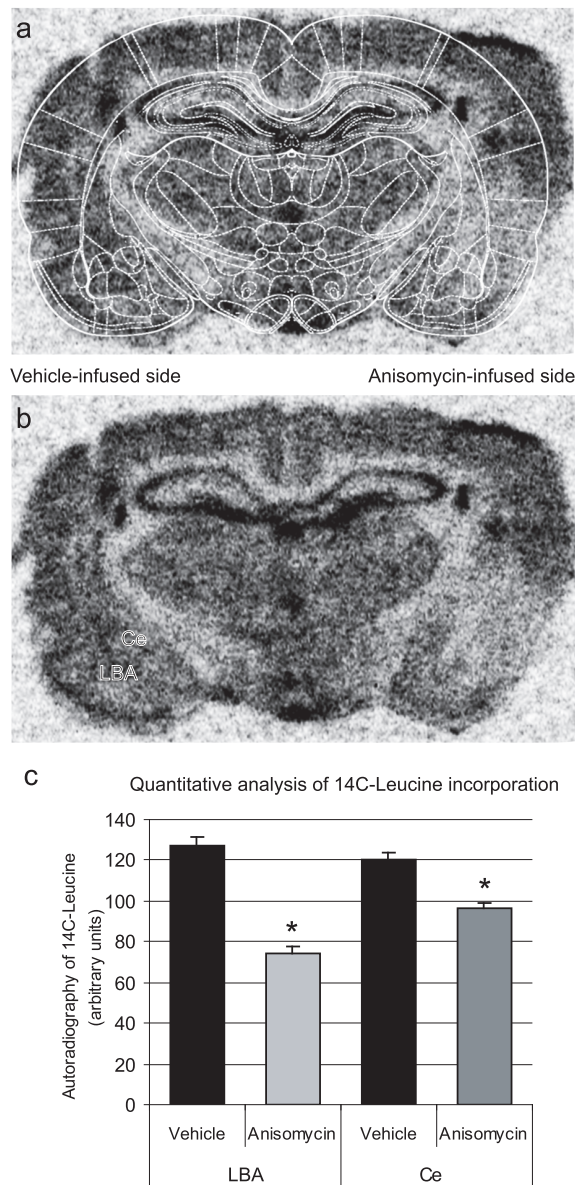
Supplementary Figure 2: Schematic representation of cannula placements of animals included in the statistical analyses. Schematic sections of the amygdala are shown at four different rostral \pm caudal planes. The numbers represent the posterior coordinate from bregma. Abbreviations; L, lateral nucleus; B, basal nucleus; C, central nucleus.



Supplementary Figure 3: Examination of drug diffusion by dye spread. (a,b,c) Optical density of the stained area is represented along the cannula axis (left column), 60° (middle column) and 120° (right column) from the cannula axis. The broken vertical line represents the cannula axis. The full lines on each side of the broken line represent the boundary of the LBA along the axis considered. (a) Optical density for ifenprodil and CNQX-infused LBA 7 min after the infusions, which was the time between drug infusion and reactivation in the behavioral experiments. (b) Optical density in LBA receiving a first infusion of ifenprodil+ dye or CNQX+dye followed by anisomycin. (c) Optical density in LBA after an infusion of receptor antagonist (ifenprodil or CNQX), followed by an infusion of anisomycin+dye. (d) Bright field photomicrograph of a brain section showing the spread of the ifenprodil+dye solution and the 3 axis along which the analysis was performed. Abbreviations: I-ifenprodil; C, CNQX; A, anisomycin.



Supplementary Figure 4: Immunohistochemical analysis of PTZ-induced Fos protein levels after anisomycin infusion: immunoreactivity to Fos in vehicle (a) and anisomycin (b) infused rats illustrate the extent of anisomycin protein synthesis inhibition. High magnification image of Fos immunoreactivity in the LBA (c, e) and the Ce (d, f) in vehicle and anisomycin infused rats, respectively. (g) Quantitative analysis of Fos immunoreactivity showing a significant protein synthesis inhibition in the LBA of anisomycin infused animals compared to control levels. Arrowheads represent the injector tip. LBA: basolateral amygdala; Ce: central amygdala; ROI: region of interest.



Supplementary Figure 5: Autoradiographic evaluation of protein synthesis inhibition after intra-LBA anisomycin infusion, showing greater inhibition in the target area (LBA) than the adjacent Ce nucleus. (a) Autoradiogram of a coronal section superimposed with the corresponding diagram of the atlas brain (Paxinos and Watson); the quantification of regions corresponding to the LBA and the Ce is shown in (c). (b) Same autoradiogram as in (a), but without diagram. (c) Graphic representation of autoradiogram analysis illustrating ¹⁴C-Leucine incorporation into newly synthesised proteins in LBA and Ce nuclei, 60 minutes after intra-LBA anisomycin or vehicle infusion.

CHAPITRE III : SECOND MANUSCRIT

(EN PRÉPARATION POUR SOUMISSION À LA REVUE *PLOS ONE*)

THE DYNAMIC NATURE OF MEMORY RETRIEVAL: ACTIVE NMDAR-REGULATED TRAFFICKING OF AMPA_RS IN THE AMYGDALA, DURING THE EXPRESSION OF EMOTIONAL MEMORY

Cyrinne Ben Mamou ^{1,2} and Karim Nader ²

¹ Groupe de Recherche FRSQ sur le Système Nerveux Central, Faculty of Medicine, Université de Montréal ; ² Psychology Department, McGill University, Montréal (Qc), Canada

Abstract

Memory traces are initially labile. They become stable through a protein synthesis-dependent process termed consolidation. Upon retrieval, some memories are reactivated and return to a labile state. Therefore, they need to reconsolidate in order to reach stability again. Most studies have focused on memory dynamics during stabilization processes, referring at retrieval as a passive read-out of a memory trace. In the present study, we evaluated the dynamic nature of retrieval, using auditory fear conditioning in Sprague Dawley rats. We found that pre-retrieval anisomycin infusion into basolateral amygdala (BLA) blocked expression of the conditioned fear response. In addition, our data revealed a differential regulation of AMPAR phosphorylation

and post-synaptic trafficking, depending on whether NMDAR were active or blocked with ifenprodil during retrieval. Interestingly, ifenprodil rescued anisomycin-mediated deficit on fear expression and GluR1 level in BLA fractions. We conclude that memory retrieval involves mechanisms that are more dynamic than generally appreciated.

Introduction

Memory can be viewed as an internal representation of the external world, constructed by an organism based on its perception. The environment being in constant flux, memories are susceptible to be updated, integrating present experiences and preparing for the future (Schacter and Addis 2007). For the last century, the concept of consolidation has fundamentally contributed to our understanding of memory dynamics and has shaped the frameworks of experimental studies (Dudai 2004). Cellular consolidation theory states that a recently acquired memory is labile and needs protein synthesis-dependent stabilization in order to be retrievable on the long-term. During the consolidation time-window, memory is sensitive to amnesic treatments, but once consolidated, it becomes much more resistant to amnesic challenge. In some circumstances however, retrieval of a consolidated memory elicits a phase of lability necessitating a new round of protein synthesis-dependent stabilization, during which experimental induction of amnesia is again possible. This property gave rise to the concept of reconsolidation (Misanin et al. 1968) and has been extensively studied since its re-discovery, almost a decade ago (Nader et al. 2000). Strikingly, consolidation and reconsolidation studies have mainly focused on the long-term stabilization of the memory, relegating retrieval to the passive read-out of a memory trace and leaving unexplored an essential element of memory dynamics (Dudai 2006 ; Miller and Sweatt 2006). In reality, retrieval should be recognized as a learning experience on its own, during which knowledge is acquired on the background of the past (Sara 2000).

Confirming Lewis' statement that "*fixation of any item of information occurs with almost the speed of a neural impulse*" (Lewis 1976), several studies have shown that protein synthesis inhibitors (PSI) administered before training impaired acquisition in *Aplysia* and mice (Flood et al. 1986 ; Castellucci et al. 1989 ; Bergold et al. 1990). In Lewis model, acquisition is the crucial time point during which memory is formed. Similarly, retrieval is theoretically a dynamic process that might be sensitive to PSIs (Lewis 1976). Given the scarcity of empirical evidence (Lee et al. 2008), we started to investigate the dynamic properties of retrieval in the present study, using a paradigm of auditory fear conditioning in rats.

The basolateral amygdala is a major anatomical locus of associative auditory fear memory (Maren and Quirk 2004 ; Schafe et al. 2005). In the last years, *in vivo* LTP-like modifications in the amygdala have been proven to be necessary for associative fear acquisition and long-term memory (LTM). In particular, GluR1-containing AMPAR post-synaptic insertion was shown to mediate plasticity during fear conditioning (Rumpel et al. 2005) in an NMDAR and protein synthesis-dependent fashion (Yeh et al. 2006). In addition, GluR1^{-/-} mutant mice not only fail to express LTP in thalamic inputs to the lateral amygdala, but also show impairment in contextual and auditory fear learning (Humeau et al. 2007). More specifically, these GluR1^{-/-} mice exhibited a lack of freezing during fear conditioning. A possible interpretation is that acquisition requires immediate synaptic trafficking of GluR1-containing AMPARs. Alternatively, this behavioral deficit might be due to altered synaptic signaling or other GluR1-dependent synaptic plasticity mechanisms. The idea of very rapid synaptic plasticity is also relevant to the dentate gyrus where LTP induced immediate GluR1 post-synaptic insertion in awake adult rats (Williams et al. 2007). Therefore, AMPAR trafficking during acquisition might be part of the molecular mechanism supporting early encoding of new information. On the other hand, amygdalar AMPAR activation during retrieval is necessary for

expression of the conditioned response (Bianchin et al. 1993 ; Kim et al. 1993). Overall, it seems that trafficking of AMPAR contributes to the dynamic reshaping of synapses during acquisition, that AMPAR post-synaptic composition is an important component of the long-term memory trace and that behavioral expression of memory requires AMPAR activity during retrieval. We predict that, similar to acquisition, retrieval of fear memory might induce active trafficking of AMPAR at the post-synaptic membrane in the BLA.

The prevailing model of synaptic plasticity assigns to AMPAR an effector role, while NMDARs are considered a plasticity trigger with regulatory properties (Malenka 2003 ; Citri and Malenka 2008). In a previous study (Ben Mamou et al. 2006), we identified 2 distinct functions of NMDARs and AMPARs during the retrieval of a consolidated auditory fear memory in the BLA: NMDAR activation was necessary to induce lability of the memory, whereas AMPAR activation was needed for the expression of the conditioned response. Since NMDARs seem to trigger plasticity during retrieval and since AMPAR post-synaptic trafficking might be a mechanism to encode new information, we propose that NMDARs could regulate trafficking of AMPARs during retrieval. In theory, it is a mechanism that could possibly participate in updating the memory trace.

In summary, the present study aimed at evaluating the dynamic nature of memory retrieval. In order to do so, we trained rats with an auditory fear associative protocol and we measured behavioral performance during a retention test preceded by a basolateral amygdala (BLA) infusion of the PSI anisomycin. In an attempt to correlate behavioral performance during retrieval and AMPAR trafficking, we analyzed post-synaptic composition and biochemical changes of AMPARs in the BLA during retrieval. Lastly, we evaluated the possible contribution of NMDARs in the regulation of AMPAR trafficking during retrieval of auditory fear memory by analyzing behavioral

expression and AMPAR post-synaptic composition under pharmacological blockade of NMDARs.

Results

Fear memory expression is blocked by anisomycin

Anisomycin has been extensively used for over 40 years in a variety of behavioral paradigms across species to identify the time windows during which memory traces are active and undergoing dynamic processes. In order to evaluate the dynamic nature of retrieval, we conditioned rats with an auditory fear paradigm and we tested them for LTM retention under anisomycin treatment. Animals were trained with 5 pairings of a tone (conditioned stimulus: CS) and a footshock (unconditioned stimulus: US) in context A (see method section). Twenty-four hours later, rats received BLA infusion of the protein synthesis inhibitor (PSI) anisomycin or vehicle. Rats were tested in context B, with a single CS exposure. The percentage of time animals froze to the tone was taken as a measure of expression of the conditioned fear response. Rats were tested 10 min and 3 h after BLA infusion of anisomycin ($n = 8$) or vehicle ($n = 8$). Repeated measures ANOVA revealed a significant main effect of drug treatment ($F_{(1, 14)} = 36.689$, $p < 0.001$), a significant main effect of time ($F_{(1, 14)} = 47.159$, $p < 0.001$) and a significant interaction effect ($F_{(1, 14)} = 90.052$, $p < 0.001$). Post-hoc t-test analysis showed that 10 min after infusion, freezing to CS was significantly lower in anisomycin-treated rats compared to vehicle group (18.62 ± 3.32 % for anisomycin group, 75.52 ± 4.80 % for vehicle group, $p < 0.001$). There was no difference between anisomycin and vehicle group 3 h after infusion (respectively 64.66 ± 4.73 % and 68.14 ± 2.98 %, $p = 0.54$) (Fig. 1a). These results show that memory expression was sensitive to anisomycin, when infused 10 min before an LTM test, suggesting that anisomycin was interfering with amygdalar mechanism(s) mediating the behavioral expression of conditioned fear. The fact that the behavioral

impairment was no longer observed 3 h later confirmed that anisomycin did not inflict damage to the tissue.

Anisomycin blockade of memory expression is accompanied by alteration of post-synaptic GluR1-AMPA trafficking

AMPA activation in the BLA during retrieval is known to be necessary for the behavioral expression of the conditioned response (Bianchin et al. 1993 ; Kim et al. 1993 ; Ben Mamou et al. 2006). Therefore, we asked whether the anisomycin blockade of fear memory expression in the present study could be related to alteration of AMPAR synaptic trafficking in the BLA. First, we wanted to replicate recently published data showing that fear associative conditioning induced post-synaptic incorporation of GluR1-containing AMPARs in the BLA that was critical for memory acquisition and maintenance (Rumpel et al. 2005 ; Yeh et al. 2006 ; Humeau et al. 2007). Rats were trained with 5 pairings of CS-US and sacrificed 24 h later. BLA synaptoneuroosomes were analyzed with Western blots and revealed a significant increase of GluR1 protein level in fear-conditioned rats ($154.11 \pm 11.45 \%$, $n = 8$) compared to naïve ones ($100 \pm 9.14 \%$, $n = 10$) ($F_{(1, 16)} = 13.989$, $p = 0.0017$) (Fig. 1b). These data confirmed that our paradigm of auditory fear conditioning induced a synaptic increase of GluR1-containing AMPARs in the BLA that was detectable 24 h after training, which is our retrieval time point. In order to test whether pre-retrieval anisomycin treatment affected AMPAR trafficking, we analyzed BLA GluR1 synaptic content in drug-infused rats sacrificed immediately after retrieval session. Rats were trained and 24 h later they were infused with anisomycin or vehicle ($n = 12$ per group), exposed to CS 10 min later and sacrificed immediately. Identical to the first data set, anisomycin caused impairment in freezing to the tone (data not shown). GluR1 protein level remained unaffected by anisomycin treatment in BLA synaptoneuroosomes (Anisomycin group: $98.76 \pm 10.12 \%$, vehicle group: $100 \pm 9.50 \%$, $F_{(1, 22)} = 0.0079$ $p = 0.93$) (Fig. 1c) indicating that inhibition of

protein synthesis during the 10 minutes preceding retrieval had no incidence on total synaptic GluR1 protein level. Then we wanted to analyze the GluR1 fraction that was bound to the active part of the synapse. AMPARs are anchored to the post-synaptic density by binding to PSD95 via stargazin (Chetkovich et al. 2002 ; Choi et al. 2002 ; El-Husseini et al. 2002 ; Colledge et al. 2003 ; Bingol and Schuman 2004 ; Ehrlich and Malinow 2004 ; Bats et al. 2007). Therefore, we immunoprecipitated BLA samples with PSD95 antibody and quantified GluR1 protein amount in these fractions. Western blots of PSD95 co-immunoprecipitates showed a significant decrease of GluR1 in the anisomycin-treated rats compared to vehicle controls (Anisomycin group: 27.80 ± 3.32 %, $n = 13$, vehicle group: 100 ± 11.80 %, $n = 11$, $F_{(1, 22)} = 40.042$, $p < 0.001$) (Fig. 1d). In summary, these data suggested that anisomycin did not alter the total amount of GluR1 within 10 min of infusion. However, it caused GluR1 to decrease in the post-synaptic density. The data support the possibility that the anisomycin behavioral blockade of memory expression might be related to alteration of AMPAR post-synaptic membrane levels. Thus, under normal conditions, memory expression might involve an active mechanism that promotes translocation from extra-synaptic to synaptic sites or stabilization of AMPAR at the post-synaptic membrane. In summary, retrieval might trigger a dynamic “anisomycin-sensitive” AMPAR post-synaptic trafficking.

Fear memory expression induces phosphorylation of AMPARs in the BLA

In vitro studies have extensively examined the biochemistry of AMPAR trafficking, but very little is known about AMPAR regulated-trafficking at the time of memory expression in behaving animals in the BLA. In an attempt to unveil the dynamics of AMPARs during retrieval of auditory fear memory, we analyzed BLA samples from rats sacrificed immediately following LTM retrieval. In order to isolate the biochemical changes induced by memory retrieval from the ones related to normal encoding of long-term memory trace, we trained rats with 5 CS-US pairings and we divided them into 3 groups upon

LTM retrieval test (Fig. 2a). The first group consisted in trained animals that were exposed to testing chamber without playing CS and sacrificed immediately (labeled NR for “Non-Retrieved”). This group served as a control baseline. The second animal group served to evaluate the effect of memory retrieval on GluR1 biochemistry and was labeled R for “Retrieved”. Animals in the R group were sacrificed immediately after the CS in order to capture as much as possible the effect of retrieval on GluR1 dynamics. The third group underwent the same procedure, except that rats were returned to their home-cages after the CS and sacrificed 10 minutes later (R+10 min). The reason for this group was to follow the kinetics of retrieval-induced modifications. BLA tissue samples were fractionated either into synaptoneuroosomes or into PSD95 co-immunoprecipitates. Quantitative Western blots were performed for GluR1 subunit as well as phospho-Ser831 and phospho-Ser845 GluR1. These 2 GluR1 serine residues are phosphorylated by CaMKII and PKA respectively and tightly regulate GluR1-containing AMPAR trafficking in and out of synapses (Derkach et al. 2007). One way ANOVA revealed a significant group effect for total GluR1 in synaptoneuroosomes (NR: 100 ± 9.88 %, R: 120.98 ± 11.52 , R+10 min: 79.68 ± 8.62 %, $F_{(2, 30)} = 4.2008$, $p = 0.024$, $n = 11$ per group). Post-hoc Tukey test showed no significant difference in GluR1 amounts between NR and R ($p = 0.31$) and also no significant difference between NR and R+10 min ($p = 0.34$) (Fig. 2b). However, the 40 % difference between R and R+10 min was significant ($p = 0.018$) indicating a decrease of total GluR1 in synaptoneuroosomes 10 min after retrieval (Fig. 2b). In PSD95 co-immunoprecipitates, GluR1 showed no significant difference across groups (NR: 100 ± 10.57 %, R: 93.11 ± 12.37 %, R+10 min: 89.80 ± 9.62 %, $F_{(2, 27)} = 0.22678$, $p = 0.79$, $n = 10$ per group) (Fig. 2c). Phospho-Ser831 levels were not significantly affected across groups in synaptoneuroosomes (NR: 100 ± 10.72 %, R: 97.63 ± 9.73 %, R+10 min: 127.15 ± 13.47 %, $F_{(2, 30)} = 2.0627$, $p = 0.14$) (Fig. 2b) and in PSD95 co-immunoprecipitates (NR: 100 ± 11.50 %, R: 105.50 ± 13.10 %, R+10 min: 72.73 ± 5.82 %, $F_{(2, 27)} = 2.7333$, $p = 0.082$) (Fig 2c).

Analysis of phospho-Ser845 GluR1 levels in synaptoneurosomes revealed a significant effect (NR: 100 ± 13.86 %, R: 244.79 ± 23.29 %, R+10 min: 214.14 ± 30.93 %, $F_{(2, 30)} = 10.324$, $p = 0.00039$) (Fig. 2b). Post-hoc Tukey test showed a significant difference between NR and R ($p < 0.001$) and between NR and R+10 min ($p = 0.0054$), but not between R and R+10 min groups ($p = 0.63$). Also in PSD95 co-immunoprecipitates, Ser845 phosphorylation varied significantly among groups (NR: 100 ± 6.50 %, R: 162.68 ± 15.21 %, R+10 min: 109.50 ± 9.94 %, $F_{(2, 27)} = 9.1917$, $p < 0.001$), such that a post-hoc Tukey test revealed significant differences between NR and R ($p = 0.0014$), between R and R+10 min ($p = 0.0062$) but not between NR and R+10 min conditions ($p = 0.81$) (Fig. 2c).

Taken together, the data reveal that GluR1 dynamics might have distinct properties in the synapse as a whole and in the PSD95 complex that contains the active pool of AMPARs. In fact, although total GluR1 amount was stable at the PSD95 complex regardless to whether memory was retrieved or not, in synaptoneurosomes there was a slight non significant increase of GluR1 during retrieval, followed by a significant decrease 10 min later, suggesting activity-dependent endocytosis and/or degradation (Ehlers 2003 ; Lee et al. 2008). Similarly, Ser845 phosphorylation was increased during retrieval in the PSD95 complex, but then returned to baseline 10 min later, suggesting that only during activity were post-synaptic GluR1 phosphorylated. At the synaptoneurosome scale, phosphorylation of Ser845 was increased not only during retrieval, but also was maintained to significant high level 10 min later, suggesting increased trafficking during retrieval and phosphorylation of extra-synaptic pools of receptors for at least 10 min after memory expression. Overall these results suggested active trafficking of GluR1-containing AMPARs during auditory fear memory expression.

NMDAR activation regulates GluR1 phosphorylation during memory retrieval

Our observation of Ser845 GluR1 phosphorylation at the time of memory retrieval is consistent with the hypothesis that GluR1-containing AMPAR trafficking might be dynamically regulated during memory expression. Numerous studies identified the phosphorylation state of Ser845-GluR1 as a key regulatory element in bidirectional trafficking of AMPARs in and out of membranes (Lee et al. 2000 ; Derkach et al. 2007 ; Serulle et al. 2007). NMDARs play a major regulatory function in AMPAR phosphorylation and trafficking (Heynen et al. 2000 ; Vanhoose and Winder 2003 ; Oh et al. 2006 ; Man et al. 2007). Consequently, we sought to test whether the phosphorylation of Ser845-GluR1 that we observed during fear memory retrieval was regulated downstream of NMDAR activation. In order to do so, we administered the NMDAR antagonist ifenprodil (n = 9) or vehicle (n = 8) into the BLA of rats 10 min before LTM retrieval and we sacrificed the rats immediately after retrieval (Fig. 3a). We used a dose of ifenprodil that prevents the memory from becoming labile during retrieval, but spares the expression of the conditioned response (Ben Mamou et al. 2006). Similar to this previous study, BLA ifenprodil infusion 10 min before retrieval did not affect the amount of freezing to CS ($F_{(1, 15)} = 0.043$, $p = 0.83$) (Fig. 3b). The amount of GluR1 protein in PSD95 co-immunoprecipitates was not affected by ifenprodil treatment (Ifenprodil: 87.68 ± 9.02 %, vehicle: 100 ± 14.77 %, $F_{(1, 15)} = 0.53$, $p = 0.47$), however, phosphorylation of Ser845 was significantly decreased by ifenprodil compared to vehicle (Ifenprodil: 46.69 ± 6.62 %, vehicle: 100 ± 12.34 %, $F_{(1, 15)} = 15.44$, $p = 0.0013$) (Fig. 3c). This finding suggests that NMDAR activation during retrieval influenced AMPAR phosphorylation state. However, the ifenprodil-induced decrease of Ser845 phosphorylation did not cause any significant change in the level of GluR1 in the PSD95 complex. Therefore, although AMPAR phosphorylation -and possibly trafficking-

seemed to be differentially regulated depending on whether the plasticity-switch NMDAR was active or inactive, the net level of post-synaptic GluR1 was not affected and consistently, the conditioned response was normally expressed.

NMDAR activation during retrieval determines the dynamic nature of memory expression

In a previous study, we found that pre-retrieval ifenprodil infusion protected the memory from post-retrieval anisomycin amnesic effect, whereas post-retrieval co-infusion of ifenprodil and anisomycin blocked memory reconsolidation (Ben Mamou et al. 2006). We concluded that NMDARs needed to be active during retrieval in order for the memory to become labile and sensitive to post-retrieval anisomycin challenge. The present finding that AMPARs are phosphorylated during retrieval in an NMDAR-regulated fashion suggested to us that perhaps one mechanism by which NMDARs render the memory trace labile, was by affecting AMPAR trafficking during retrieval. If it is true that AMPAR composition is a post-synaptic effector of experience-driven NMDAR-dependent plasticity that is reshaped upon retrieval, then we predict that pre-retrieval NMDAR inactivation would abolish the dynamic trafficking of AMPARs and transform retrieval into a passive read-out of AMPARs previously inserted at the synapse. Experimentally, it implies that pre-retrieval administration of ifenprodil together with anisomycin would prevent GluR1 post-synaptic decrease and rescue the behavioral expression of the conditioned fear response (freezing to CS). If on the contrary, AMPAR trafficking during retrieval is independent of NMDARs, or if anisomycin blockade of expression is a non-specific effect that it is not causally correlated to an active dynamic mechanism of memory plasticity, then ifenprodil will not rescue anisomycin decrease of GluR1 post-synaptic level and behavioral expression. Rats were trained with 5 CS-US and 24 h later they were administered BLA infusion of either vehicle, anisomycin, ifenprodil or cocktail

(anisomycin + ifenprodil) 10 min before LTM retrieval (Fig. 4a). ANOVA revealed a significant effect of treatment on freezing to the CS (Vehicle: 66.81 ± 2.32 %, anisomycin: 15.14 ± 1.60 %, ifenprodil: 59.59 ± 3.63 %, cocktail: 50.16 ± 3.29 %, $F_{(3, 92)} = 65.508$, $p < 0.001$, $n = 24$ per group) (Fig. 4b). A post-hoc Tukey test showed no significant difference in freezing during retrieval between vehicle and ifenprodil group ($p = 0.27$) or ifenprodil and cocktail group ($p = 0.092$). However, behavioral expression of fear was significantly higher in vehicle group compared to cocktail groups ($p < 0.001$). Anisomycin treatment resulted in significantly impaired freezing compared to all 3 other conditions ($p < 0.001$).

Importantly, freezing to CS in cocktail group was significantly higher than in anisomycin group, meaning that ifenprodil rescued the anisomycin blockade of memory expression (Fig. 4b). We analyzed GluR1 protein amounts in BLA samples from those animals. We found no significant effect of pre-retrieval drug administration on GluR1 protein amount in synaptoneurosomes ($F_{(3, 44)} = 1.7540$, $p = 0.169$). However, there was a group effect on phospho-Ser845 GluR1 in synaptoneurosomes (Vehicle: 100 ± 9.60 %, anisomycin: 99.53 ± 15.17 %, ifenprodil: 53.82 ± 6.81 %, cocktail: 60.19 ± 9.49 %, $F_{(3, 44)} = 5.37$, $p = 0.00307$). Post-hoc Tukey test revealed that phospho-Ser845 was significantly lower in ifenprodil compared to vehicle ($p = 0.019$) and anisomycin ($p = 0.021$) but not different from cocktail ($p = 0.97$). Ser845 phosphorylation was also greatly lower in cocktail group compared to vehicle and anisomycin, but the difference did not reach statistical significance ($p = 0.059$ and 0.055 respectively). In PSD95 co-immunoprecipitates, GluR1 amount was significantly affected by drug condition (Vehicle: 100 ± 9.62 %, anisomycin: 28.13 ± 4.05 %, ifenprodil: 77.79 ± 5.56 %, cocktail: 76.27 ± 5.56 %, $F_{(3, 44)} = 15.538$, $p < 0.001$) (Fig. 4c). Post-hoc Tukey test revealed that GluR1 level was not significantly different between vehicle, ifenprodil and cocktail groups (vehicle vs. ifenprodil: $p = 0.18$, vehicle vs. cocktail: $p = 0.14$

and ifenprodil vs. cocktail: $p = 0.99$). However, anisomycin treatment caused again a decrease in post-synaptic GluR1 that was significantly different from all 3 other drug conditions (all $p < 0.001$). The amount of GluR1 Ser845 phosphorylation in PSD95 co-immunoprecipitates was significantly affected by drug condition (Vehicle: 100 ± 11.80 %, anisomycin: 47.77 ± 6.39 %, ifenprodil: $39.61 \pm$ %, cocktail: 41.88 ± 3.82 %, $F_{(3, 44)} = 15.414$, $p < 0.001$). Post-hoc Tukey test showed that vehicle condition exhibited significantly high phospho-Ser845 compared to anisomycin, ifenprodil and cocktail (all 3 $p < 0.001$) (Fig. 4c).

Taken together, the data showed in figure 4 indicates that a cocktail of ifenprodil and anisomycin administered to rats caused a decrease of Ser845 phosphorylation, but no alteration in GluR1 post-synaptic amount nor impairment in behavioral expression of learned fear. This finding confirms that the behavioral impairment of anisomycin could be rescued if the “plasticity switch” NMDAR was off, demonstrating that under normal conditions, memory retrieval activated dynamic mechanisms of AMPAR trafficking. We suspect that the function of these mechanisms might be related to lability and update of the memory trace, but additional experiments will be necessary in order to better characterize the molecular mechanisms of retrieval and identify their consequences on memory encoding.

Discussion

In the present study, we have started to investigate the dynamic nature of memory retrieval in rats trained with auditory fear conditioning. We demonstrated that the behavioral expression of a conditioned auditory fear response was impaired by anisomycin infusion in the BLA 10 min prior to a retention test. We confirmed previous findings that auditory fear memory induced synaptic incorporation of GluR1-containing AMPARs in the BLA. Then we showed that one consequence of pre-test anisomycin treatment was a

decrease of GluR1 subunits in the PSD95 complex, which could account for the behavioral deficit. We further analyzed AMPAR biochemical changes during memory expression and we observed a transient phosphorylation of Ser845-GluR1 during retrieval in the PSD95 complex. This phosphorylation was NMDAR-dependent, suggesting NMDAR-regulated trafficking of AMPARs during memory expression. Finally, we found that NMDAR blockade made memory expression insensitive to anisomycin challenge, consistent with NMDARs acting as a molecular trigger for the dynamic aspect of memory retrieval.

Perhaps the most intriguing finding of the present study is the fact that a protein synthesis inhibitor (PSI) impaired performance of a consolidated memory when infused 10 min before a retention test. To our knowledge, there is no such report in the literature. Systemic anisomycin injection didn't interfere with retrieval in mice (Bourtchouladze et al. 1998). PSIs induced a transient deficit in the snail during a retention test, but only on the second test after treatment (Solntseva et al. 2007). We were unable to find reports evaluating PSI effects on retrieval with central infusion in rodents, maybe because it is generally considered a simple read-out of memory. However, numerous studies have shown behavioral impairment with pre-acquisition PSI administration, illustrating the dynamic molecular nature of acquisition. For example in *Aplysia*, pre-acquisition PSI application blocks LTM but post-acquisition treatment doesn't, showing that LTM requires the activation of cellular mechanisms during acquisition (Goelet et al. 1986 ; Montarolo et al. 1986 ; Castellucci et al. 1989 ; Bergold et al. 1990). Similarly, training is a critical dynamic time-window in rodents. Systemic injection of anisomycin is more effective in producing amnesia in rats when given 15 minutes before training than 2h after (Flood et al. 1973) or 2 h before (Flood et al. 1986). With central infusions also, anisomycin induced amnesia in various behavioral paradigms, when infused few minutes before training but not at certain time-points after,

underlining acquisition as a crucial anisomycin-sensitive episode (Grecksch and Matthies 1980 ; Grecksch et al. 1980 ; Rosenblum et al. 1993 ; Quevedo et al. 1999 ; Lattal and Abel 2001 ; Vianna et al. 2001 ; Wanisch et al. 2005). In summary, our present study provides evidence that similar to acquisition, memory retrieval is a dynamic anisomycin-sensitive phase.

In the field of cognitive neuroscience, anisomycin is classically used as a PSI, although it also activates p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Törocsik and Szeberényi 2000) and alters norepinephrin (NE) levels (Flexner and Goodman 1975 ; Canal et al. 2007). p38 MAPK and NE signaling pathways are important regulatory mechanisms involved in synaptic plasticity and memory (Bolshakov et al. 2000 ; Guan et al. 2003 ; McGaugh 2004 ; Ahmed et al. 2006 ; Hu et al. 2007 ; Izumi et al. 2008). Both p38 MAPK activation and NE signaling are upstream regulators of cellular pathways that control protein translation (Takeda and Ichijo 2002 ; Klann et al. 2004 ; Gelinás and Nguyen 2005 ; Chenal and Pellerin 2007 ; Gelinás et al. 2007). In addition, alteration of specific protein synthesis patterns has been shown to be a trigger for long-term memory encoding, with techniques other than PSI administration (for a recent review, see Klann and Sweatt, 2008). Therefore, we do believe that protein synthesis alteration is a mechanism involved in memory stabilization and we consider anisomycin as a valuable tool to study memory dynamics. In fact, studies using PSIs have considerably contributed to our understanding of learning and memory dynamics for over 40 years. In the present study however, given the brief time lapse between anisomycin infusion and the observed behavioral effect, we cannot confidently assume that the experimental deficit is a downstream effect of a protein synthesis-dependent mechanism. We are currently performing additional studies in order to better characterize the mechanism mediating the anisomycin blockade of memory expression. In the meantime, we hope that the present demonstration of the dynamic nature of retrieval will contribute to the regained interest of the field in this critical “*rite*

of passage of the engram” that constitutes retrieval (Dudai and Eisenberg 2004).

Protein synthesis is quickly and robustly inhibited immediately after anisomycin infusion (Grecksch et al. 1980 ; Rosenblum et al. 1993). If the present anisomycin blockade of performance is due to protein synthesis inhibition, then the candidate protein(s) must have a high turnover in order to be considerably affected within 10 minutes. Perhaps the behavioral impairment observed in our experiment is due to loss of a short-lived protein that needs to be continuously synthesized to ensure normal AMPAR trafficking and expression of the conditioned response. Since regulation of AMPAR trafficking is a complex phenomenon (Greger and Esteban 2007), the candidate molecules are numerous. However, because the anisomycin deficit was rescued with ifenprodil, it is reasonable to conclude that, if anisomycin effect was mediated by its protein synthesis inhibition properties, then the function of the concerned protein is downstream of an NMDAR regulated-pathway.

Another plausible explanation for anisomycin-induced deficit of memory expression is alteration of noradrenergic signaling. Since its first use as an amnesic agent, systemic anisomycin treatment has been known to modify catecholamine metabolism and release in the brain (Flexner et al. 1973 ; Flexner and Goodman 1975). A recent demonstration that BLA anisomycin infusion affects NE levels (Canal et al. 2007) could also reinforce the interpretation of altered noradrenergic signaling as a mechanism mediating our finding. In addition, NE can modulate Ser845-GluR1 phosphorylation in live animals during contextual fear conditioning (Hu et al. 2007). On the other hand, NMDARs and β -adrenergic receptors co-regulate PKA activity and its downstream phosphorylation of Ser845-GluR1, and NMDAR activity plays a dominant role in this regulation (Vanhoose and Winder 2003 ; Bloomer et al. 2008). Therefore this interpretation is also coherent with our rescue of anisomycin effect with NMDAR antagonist ifenprodil.

An interesting alternative that could explain the rapid effect on memory expression is anisomycin-mediated activation of p38 MAPK (Shifrin and Anderson 1999 ; Töröcsik and Szeberényi 2000 ; Takeda and Ichijo 2002 ; Xiong et al. 2006). This kinase is involved in LTD (Bolshakov et al. 2000 ; Guan et al. 2003) and more specifically, it induces AMPAR endocytosis (Huang et al. 2004 ; Krapivinsky et al. 2004 ; Zhu et al. 2005 ; Rumbaugh et al. 2006). Also, p38 MAPK-mediated AMPAR endocytosis is dependent on NMDAR activation (Zhu et al. 2002 ; Krapivinsky et al. 2004 ; Waxman and Lynch 2005 ; Li et al. 2006), which makes this interpretation consistent with ifenprodil rescue of anisomycin effect in the present study. This perspective is attractive because it highlights how the complex regulated balance of kinases and phosphatases at the synapse can rapidly integrate cellular signaling into AMPAR trafficking (Esteban 2003 ; Henley 2003 ; Waxman and Lynch 2005 ; Izumi et al. 2008).

Until recently, post-synaptic AMPAR changes underlying synaptic plasticity were observed minutes or hours after *in vitro* LTP induction or *in vivo* learning (reviewed in Malinow and Malenka, 2002). Perhaps the fact that synaptic plasticity and LTM involve mechanisms that require minutes, hours or days to be achieved, overshadowed the property of instantly integrating experiences into molecular changes. Very rapid plasticity-related AMPAR post-synaptic modifications started to be apprehended in recent studies. Contextual fear conditioning can immediately increase phosphorylation of GluR1 at Ser831 in the hippocampus in an NMDAR-dependent fashion (Shukla et al. 2007). A strain of mutant mice lacking GluR1 subunits is unable to acquire and express contextual and auditory fear conditioning and most importantly it doesn't exhibit the typical fear behavior (freezing) during training (Humeau et al. 2007). Besides, blockade of AMPAR endocytosis can impair within-session extinction (Dalton et al. 2007), consistent with the hypothesis that retrieval could involve trafficking of receptors that is necessary to modify the behavioral

response and adapt to current stimuli. A very recent study demonstrated that contextual fear retrieval was a dynamic mechanism that involves ubiquitination and degradation of post-synaptic proteins in the hippocampus (Lee et al. 2008). Altogether, evidence is accumulating to suggest that AMPAR trafficking is activated during learning and that it is necessary to form or update a memory trace. Similarly, our data supports the idea that AMPAR trafficking is activated during retrieval, and confirms that retrieval is a dynamic process (Lewis 1976 ; Dudai 2006 ; Miller and Sweatt 2006 ; Lee et al. 2008).

Based on *in vitro* studies that are indispensable to understand synaptic dynamics, we know that AMPAR trafficking is the result of complex orchestration of several cellular signaling pathways. Transmembrane AMPAR regulatory proteins (TARPs) and scaffolding proteins determine whether AMPARs are anchored to the sub-membrane cytoskeleton or mobile at the membrane surface. The phosphorylation state of AMPARs and their interactions with TARPs orient their movements between synaptic and extra-synaptic pools in an activity-regulated fashion (Tomita et al. 2004 ; Fukata et al. 2005 ; Bats et al. 2007). In particular, AMPARs are stabilized at the PSD via stargazin interaction with PSD95. During activity-dependent synaptic plasticity, PKA and NMDAR activation regulate stargazin binding to PSD95 and promote AMPAR trafficking (Chen et al. 2000 ; Chetkovich et al. 2002 ; Choi et al. 2002 ; Tomita et al. 2005). AMPARs are known to continuously and constitutively cycle at the synapse. Unlike confocal microscopy or membrane biotinylation that measure the dynamics of a population of receptors, single-unit AMPAR tracking allows a precise evaluation of their dynamics. In fact, single AMPARs appear to be much more dynamic than populations of receptors (Ehlers et al. 2007 ; Yersin et al. 2007). Under basal conditions, cultured hippocampal neurons exhibit 40% of GluR1 and 25% of PSD95 exchange with pools from the rest of the cell within 5 min (Sharma et al. 2006), whereas stargazin synaptic mobility rate is 25% every 30 s (Bats et al. 2007)

and actin filaments turnover with a half-life of 44 s in dendrites (Star et al. 2002). On the other hand, lateral diffusion of AMPARs at dendritic surface occurs in the order of seconds (Adesnik et al. 2005 ; Bats et al. 2007). In the absence of activity, the release of the interaction with TARPs causes dispersion of AMPARs away from the synapse by lateral diffusion, following a free Brownian movement, with an average lateral diffusion speed of $0.042 \mu^2 \cdot s^{-1}$ for GluR1 receptors (Bats et al. 2007). Therefore, post-synaptic elements critical for synaptic signaling and memory encoding are extremely mobile, which confers synapses a high potential for rapid plasticity. In addition, AMPA stimulation induces strong internalization of AMPARs in a proteasome-dependent way, such that application of a proteasome inhibitor 2.5 to 20 min before stimulation blocks AMPAR internalization (Patrick et al. 2003). These dynamic properties of AMPARs are coherent with the perspective of increased AMPAR trafficking during memory retrieval suggested by our results. In fact, our finding of post-synaptic Ser845-GluR1 phosphorylation confirms that LTP-like biochemical mechanisms occur during retrieval of auditory fear memory. It provides further evidence that *in vitro* LTP receptor dynamics are reliable models for learning-related synaptic plasticity mechanisms *in vivo* (Atkins et al. 1998 ; Hall et al. 2000 ; Whitlock et al. 2006 ; Havekes et al. 2007 ; Hu et al. 2007 ; Humeau et al. 2007 ; Shukla et al. 2007). We didn't observe any phosphorylation change in CaMKII target site Ser831, another important regulatory site determining GluR1 trafficking. This doesn't mean that Ser831 is not affected or actively involved in GluR1 trafficking during retrieval. It rather indicates that the net ratio between phosphorylation and dephosphorylation was not significantly modified or detectable in our conditions. Interestingly, (Rodrigues et al. 2004) showed that a CaMKII inhibitor infused in the BLA before retrieval of an auditory fear memory did not impair the expression of freezing. If CaMKII is not involved in retrieval, it might explain why Ser831 phosphorylation was not detected in our experiment.

The methodology we used doesn't allow determining precisely how Ser845-GluR1 phosphorylation affects receptor trafficking during retrieval, i.e. whether it is driving GluR1-containing receptors in or out of the post-synaptic membrane. However, several studies have found a correlation between Ser845 phosphorylation and GluR1 synaptic insertion. PKA-mediated phosphorylation of Ser845-GluR1 was shown to be necessary for synaptic incorporation of AMPAR and LTP in vitro expression in rat hippocampal slices (Esteban et al. 2003). More specifically, Ser845 phosphorylation correlates to AMPARs exocytosis and synaptic translocation (Ehlers 2000 ; Groc et al. 2004 ; Gao et al. 2006 ; Oh et al. 2006 ; Cotman et al. 2007). It seems that Ser845 phosphorylation primes AMPARs to extrasynaptic pools from where they can rapidly translocate to synaptic sites in an activity dependent fashion, suggesting that extrasynaptic receptors might be rapidly recruited during activity-driven plasticity (Groc et al. 2004 ; Oh et al. 2006). This also could explain why we found that the Ser845 phosphorylation increase was maintained in the synaptoneurosome, 10 min after memory expression, whereas it returned to baseline in the PSD95 co-immunoprecipitates: perhaps extrasynaptic GluR1 stayed phosphorylated following synaptic activity induced by retrieval. On the other hand, LTP and emotional stress can also increase phosphorylation of GluR1 at Ser845 and Ser831 in the hippocampus (Hu et al. 2007). Consistently, in behaving animals, Ser845-GluR1 was selectively enhanced in the hippocampus during the acquisition phase of reversal training in a Y-maze (Havekes et al. 2007). In summary, our finding of Ser845 phosphorylation during retrieval is a good indicator of activated trafficking, however, additional experimentation will be needed to understand more precisely the role of Ser845 in AMPAR dynamics and fear memory encoding in live animals.

As downstream effectors of synaptic plasticity, AMPARs are important components of the molecular memory trace (Mao et al. 2006 ; Jiang et al.

2007). The present study does not identify the mechanism by which their trafficking is affected by anisomycin. Nevertheless, the fact that anisomycin altered both the behavioral expression of fear conditioned response and a molecular component of the memory trace, i.e. GluR1 post-synaptic levels, suggests a correlation between these two anisomycin effects. Also, it confirms previous findings that AMPAR activation is necessary for the expression of memory (Bianchin et al. 1993 ; Kim et al. 1993 ; Ben Mamou et al. 2006). Most importantly, the fact that ifenprodil altered GluR1 phosphorylation and rescued anisomycin impairment suggests that AMPAR mobility is differentially regulated depending on whether NMDARs are active or inactive during retrieval. This interpretation is supported by recent *in vitro* observation that NMDAR activity modifies the elastic properties of the membrane, resulting in different patterns of AMPAR surface dynamics determined by NMDAR activity state (Yersin et al. 2007). Similar to our finding, the NMDAR antagonist AP-5 blocked phosphorylation of GluR1 during activation of AMPARs in cultured cortical neurons (Ehlers 2000). Interestingly, (Ehlers 2000) also showed that NMDAR activation was necessary to induce the activity-dependent acceleration of AMPARs and that NMDAR antagonist AP-5 can reduce AMPAR endocytosis below control levels. These properties could explain our present finding that ifenprodil rescued anisomycin decrease of GluR1 in the PSD complex by slowing down activity-induced AMPAR endocytosis.

Based on the dynamic properties described above together with the present report, we speculate that synaptic activity during memory retrieval might induce NMDAR-dependent accelerated trafficking of AMPARs and their activity-dependent re-organization. At the functional level, it would allow a reshaping of the interactome underlying memory. In a previous study, we found that pre-retrieval NMDAR blockade made the memory insensitive to post-retrieval anisomycin challenge (Ben Mamou et al. 2006). This suggests that

under normal conditions, NMDAR activation during retrieval acts as a lability switch. Here we found that NMDAR activation induced AMPAR phosphorylation and ifenprodil affected the sensitivity of AMPAR trafficking to anisomycin during retrieval. Consequently, we suspect NMDAR-dependent phosphorylation of AMPARs to be a possible biochemical signature of memory lability. Mechanistically, this interpretation implies 2 distinct AMPAR dynamics depending on whether the lability switch is on or off. When it is on, i.e. NMDAR are activated, AMPAR trafficking is accelerated, participating in synaptic plasticity. When the lability switch is off, AMPAR only are active and they stay fixed at the synapse, therefore retrieval becomes a simple read-out of the memory trace (Fig 5).

The present study will hopefully contribute to our understanding of memory retrieval dynamics. In future studies, we wish to further characterize molecular mechanisms involved in memory retrieval. Also, we would like to investigate the reciprocal influence of previously acquired memory and new experience. In order to do so, we need to understand which molecular mechanisms activated during retrieval are part of the mnemonic trace conditioned by past experiences and which ones are engaged into encoding of new experience. It will be interesting to link molecular mechanisms activated during retrieval with their long-term effect on the memory trace and the resulting behavioral response.

Methods

Animals

Male Sprague-Dawley rats were purchased from Charles River (Canada) and housed in individual plastic cages with free access to water and food. An artificial diurnal cycle was applied, LD 12:12, the light phase starting at 7:00 a.m. All procedures were approved by McGill animal care committee and complied with the Canadian Council for Animal Care guidelines.

Stereotaxic surgery

In the experiments involving BLA infusions, permanent cannulas aiming at the BLA were implanted to the animals. Rats weighing approximately 300 g were deeply anaesthetized with an intra-peritoneal injection of cocktail containing Ketamine (55 mg per kg), Xylazine (3 mg per kg) and Medetomidine hydrochloride (0.3 mg per kg). Stainless steel 22-gauge cannulas were bilaterally implanted, aiming at the following coordinates: 3.0 mm caudal to Bregma, 5.3 mm lateral to the midline and 8.0 mm ventral to the skull surface. Cannulas were securely fixed with dental cement. Anesthesia was reversed with Antisedan (0.3 mg per kg). Analgesic treatment was administered intra-muscularly (buprenorphine, 0.02 mg per kg). Rats were monitored daily during a recovery period of 1 week, at the end of which the behavioral experiment started.

Drug infusion

Drugs were infused into the BLA using 23-gauge injectors connected to a Hamilton syringe via a 20-gauge plastic tube. A mini-pump (model, brand) controlled the infusion volume and speed. All drug dilutions were adjusted such that a total volume of 0.5 μ l was infused at the rate of 0.25 μ l per min per side. Injectors were left in place for an additional minute to ensure proper drug diffusion into the BLA. Infusions were performed simultaneously in both sides of the brain. Anisomycin (125 μ g per μ l) and ifenprodil (2 μ g per μ l) were purchased from Sigma-Aldrich, Canada.

Behavioral procedures

Two distinct sets of conditioning boxes were used: context A was used to train the animals and generate the fear memory, whereas context B was used to test the retention for the auditory component of the memory. Context A consisted in brightly lit plexiglass boxes (Medcare Associates) with transparent

walls and stainless steel grid-floors, enclosed with a soundproof chamber. Context B was also soundproof and composed of dimly lit plexiglass boxes (Medcare) with black and white-stripped walls and a white plastic floor wiped with peppermint-scented water. Rats were habituated to context B for 20 minutes on 3 consecutive days. On the fourth day, rats were trained in context A, where they received 5 pairings of a conditioned stimulus (CS: 20 s, 5 kHz, 75 dB-tone) co-terminating with an unconditioned stimulus (US: 0.5 s, 1.5 mA-foot-shock). The training session lasted 15 minutes, then rats were returned to their home cages. They were tested 24 hours later for auditory fear LTM retention in context B: after 2 minutes exposure to the box, the tone (CS) was played during 30 s. Digital cameras recorded the animal behavior. Percentage time freezing to the tone was scored using Freeze View program (Actimetric) and double-checked visually by an operator blind to the experimental condition of the animals. Freezing behavior was the conditioned response taken as a measure of fear memory retention.

BLA tissue collection

Rats were sacrificed by live decapitation immediately after the tone test or 10 min later, depending on the experimental groups. Brains were rapidly collected and frozen on dry ice. They were stored in a -80 °C freezer until further use to prevent alteration. For BLA tissue collection, brains were sliced in the coronal plane at -20 °C using a cryostat (Microm Instrumentation, Germany), until the frontal part of the BLA was reached. BLA tissue from each animal was punched with a 0.5 μ hollow needle and collected individually into ice-cold homogenizing buffer. Samples were immediately processed for co-immunoprecipitation or synpatoneurosome separation as described below.

Co-immunoprecipitation

BLA tissue was collected as described above and homogenized in a glass/glass homogenizer in ice-cold lysis buffer (Roche, Mississauga, ON)

supplemented with phosphatase inhibitor cocktails I and II (Sigma-Aldrich) and Complete protease inhibitors (Roche). All following procedures were conducted at 4°C with head-over-tail mixing. Samples were pre-cleaned with protein G-agarose beads (Roche), then incubated with 5 µg of PSD95 antibody (Chemicon, Temecula, CA) for 1 h and finally overnight with protein G-agarose beads. Immunoprecipitates were isolated by running the samples through a series of centrifugations and washes according to manufacturer's instructions (Roche IP-kit). Samples were boiled for 10 min in Laemmli buffer containing 5 % β-mercapthoethanol. Denatured proteins were analyzed with SDS-PAGE and Western blot.

Synaptoneurosome preparation

BLA tissue was homogenized using a Teflon/glass tissue homogenizer, in ice-cold buffer (10 mM HEPES ; 1mM EDTA ; 2 mM EGTA) supplemented with Complete protease inhibitors (Roche applied science) and phosphatase inhibitor cocktails I and II (Sigma-Aldrich). Homogenates were passed through two 100 µm-mesh nylon filters, then through a 5 µm-pore filter (Millipore). Filtered samples were centrifuged at 3600 g for 10 min at 4°C. Pellets were resuspended in 20 µl boiling 1 % SDS, boiled for 10 min and analyzed by SDS-PAGE and Western blot.

SDS-PAGE and Western blot

Immunoprecipitates or synaptoneurosome from individual animal samples were separated on SDS-polyacrylamide gels along with a molecular weight marker (BioRad, Hercules, CA), and transferred onto PVDF membranes (Bio-rad). The membranes were pre-incubated for 1 h in blocking solution (0.1 % Tween 20 and 5% BSA in Tris Buffered Saline (TBS)), and incubated overnight at 4 °C with a specific primary antibody. After TBS washes, membranes were incubated with the appropriate fluorescent secondary antibody (Alexa-648 anti-mouse or anti-rabbit secondary antibody, Molecular Probes).

The membranes were scanned with a Storm laser scanner (Storm 860, Amersham Biosciences) and the signals quantified using image analysis software (ImageQuant, Amersham Biosciences). GE Healthcare.

Primary antibodies used to detect GluR1, phosphoSer831-GluR1, phosphoSer845-GluR1, actin, PSD95 were from Chemicon.

Figure legends

Figure 1

Anisomycin impaired expression of auditory fear memory. (a) Rats were trained, 24 h later they received BLA infusion and they were tested 10 min later. Animals that received anisomycin failed to behaviorally express the learnt fear response 10 min after infusion compared to vehicle-infused controls. Both groups performed intact behavior 3 h later. (b) Rats were trained and sacrificed 24 h later. Quantitative Western blot of BLA synaptoneurosomes showed that auditory fear conditioning induced a synaptic increase of GluR1 protein level, confirming previous findings. (c-d) Rats were trained, 24 h later they received BLA infusion of anisomycin or vehicle, then 10 min later they were tested for retrieval and sacrificed immediately. Quantitative Western blot of synaptoneurosomes showed that GluR1 protein level were not affected by anisomycin infusion 10 min before memory retrieval (c). Quantitative Western blot of PSD95 co-immunoprecipitates showed reduced GluR1 level in anisomycin-treated rats compared to controls (d). Statistical significance: **p < 0.01, ***p < 0.001.

Figure 2

Retrieval of auditory fear memory induced phosphorylation of GluR1-Ser845. (a) Rats were trained, 24 h later they were divided into 3 groups: NR animals were sacrificed without retrieving the conditioned memory ; R animals performed retrieval test and were sacrificed immediately ; R+10 min rats

performed retrieval test, were returned to their home-cages for 10 min, then sacrificed. (b-c) Quantitative Western blots of BLA samples from animal groups described in (a). GluR1 protein level slightly decreased in synaptoneurosome fractions 10 min after retrieval (b), but remained stable in PSD95 co-immunoprecipitates (c). Ser831 phosphorylation overall was not significantly affected. Ser845 phosphorylation was greatly increased in R group (b-c) and was maintained at a high level in synaptoneurosome fractions in R+10 min (b), whereas returned to baseline in PSD95 co-immunoprecipitates from R+10 min rats (c). Statistical significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 3

The NMDAR antagonist ifenprodil decreased GluR Ser845 phosphorylation during retrieval but did not affect GluR1 amount at the PSD. (a) Rats were trained, 24 h later they received BLA infusion of ifenprodil or vehicle. They were tested 10 min after infusion and sacrificed immediately. (b) Ifenprodil did not affect the amount of freezing to the CS 10 min after infusion. (c) Ifenprodil did not affect the amount of total GluR1 in the PSD95 immunoprecipitates, but it decreased the amount of Ser845 phosphorylation during retrieval. Statistical significance: ** $p < 0.01$.

Figure 4

The NMDAR antagonist ifenprodil rescued anisomycin-induced decrease of post-synaptic GluR1 and behavioral expression of conditioned fear. (a) Rats were trained, 24 h later they received BLA infusion of either vehicle, anisomycin, ifenprodil or cocktail (anisomycin + ifenprodil). They were tested 10 min after infusion and sacrificed immediately. (b) Behavioral performance during retention test. Only anisomycin-treated rats showed significant impairment during retrieval of the conditioned response. When co-infused with anisomycin, ifenprodil rescued the behavioral deficit. (c-d) Quantitative Western blots of BLA synaptoneurosome and PSD95 co-immunoprecipitation.

Ifenprodil rescued GluR1 level in PSD95 co-immunoprecipitates when co-infused with anisomycin. Ifenprodil reduced Ser845 phosphorylation in both fractions. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Figure 5.

Proposed model for NMDAR-regulated post-synaptic AMPAR dynamics during memory retrieval. (a) Auditory fear conditioning increases GluR1-containing post-synaptic AMPARs. Behavioral fear memory expression requires active AMPAR in the BLA. Also, under normal conditions, retrieval induced an NMDAR-dependent phosphorylation of GluR1-Ser845, likely activating AMPAR trafficking. (b) Synaptic translocation or stabilization of GluR1-containing receptors to the PSD fraction might be anisomycin-sensitive, resulting in decreased post-synaptic GluR1 and failure of behavioral memory expression in anisomycin-treated rats. (c) By reducing Ser845 phosphorylation, NMDAR antagonist ifenprodil might slow down AMPAR mobility resulting in more stable post-synaptic GluR1 pool. (d) Under ifenprodil treatment, GluR1 mobility might be decreased, therefore the need for active translocation or stabilizing mechanism is no longer required, which makes anisomycin ineffective at impairing memory expression when co-infused with ifenprodil.

References

- Adesnik H, Nicoll RA, England PM (2005) Photoinactivation of native AMPA receptors reveals their real-time trafficking. *Neuron* 48: 977-985.
- Ahmed T, Frey JU, Korz V (2006) Long-term effects of brief acute stress on cellular signaling and hippocampal LTP. *J Neurosci* 26: 3951-3958.
- Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM, Sweatt JD (1998) The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci* 1: 602-609.
- Bats C, Groc L, Choquet D (2007) The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking. *Neuron* 53: 719-734.
- Ben Mamou C, Gamache K, Nader K (2006) NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories. *Nat Neurosci* 9: 1237-1239.
- Bergold PJ, Sweatt JD, Winicov I, Weiss KR, Kandel ER et al. (1990) Protein synthesis during acquisition of long-term facilitation is needed for the persistent loss of regulatory subunits of the Aplysia cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3788-3791.
- Bianchin M, Walz R, Ruschel AC, Zanatta MS, Da Silva RC et al. (1993) Memory expression is blocked by the infusion of CNQX into the hippocampus and/or the amygdala up to 20 days after training. *Behav Neural Biol* 59: 83-86.
- Bingol B, Schuman EM (2004) A proteasome-sensitive connection between PSD-95 and GluR1 endocytosis. *Neuropharmacology* 47: 755-763.

- Bloomer WA, VanDongen HM, VanDongen AM (2008) Arc/Arg3.1 translation is controlled by convergent N-methyl-D-aspartate and Gs-coupled receptor signaling pathways. *J Biol Chem* 283: 582-592.
- Bolshakov VY, Carboni L, Cobb MH, Siegelbaum SA, Belardetti F (2000) Dual MAP kinase pathways mediate opposing forms of long-term plasticity at CA3-CA1 synapses. *Nat Neurosci* 3: 1107-1112.
- Bourtchouladze R, Abel T, Berman N, Gordon R, Lapidus K et al. (1998) Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learn Mem* 5: 365-374.
- Canal CE, Chang Q, Gold PE (2007) Amnesia produced by altered release of neurotransmitters after intraamygdala injections of a protein synthesis inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 12500-12505.
- Castellucci VF, Blumenfeld H, Goelet P, Kandel ER (1989) Inhibitor of protein synthesis blocks long-term behavioral sensitization in the isolated gill-withdrawal reflex of *Aplysia*. *J Neurobiol* 20: 1-9.
- Chen L, Chetkovich DM, Petralia RS, Sweeney NT, Kawasaki Y et al. (2000) Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature* 408: 936-943.
- Chen J, Pellerin L (2007) Noradrenaline enhances the expression of the neuronal monocarboxylate transporter MCT2 by translational activation via stimulation of PI3K/Akt and the mTOR/S6K pathway. *J Neurochem* 102: 389-397.
- Chetkovich DM, Chen L, Stocker TJ, Nicoll RA, Brecht DS (2002) Phosphorylation of the postsynaptic density-95 (PSD-95)/discs large/zona

occludens-1 binding site of stargazin regulates binding to PSD-95 and synaptic targeting of AMPA receptors. *J Neurosci* 22: 5791-5796.

Choi J, Ko J, Park E, Lee JR, Yoon J et al. (2002) Phosphorylation of stargazin by protein kinase A regulates its interaction with PSD-95. *J Biol Chem* 277: 12359-12363.

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

Colledge M, Snyder EM, Crozier RA, Soderling JA, Jin Y et al. (2003) Ubiquitination regulates PSD-95 degradation and AMPA receptor surface expression. *Neuron* 40: 595-607.

Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA (2007) Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci* 30: 464-472.

Dalton GL, Wang YT, Floresco SB, Phillips AG (2008) Disruption of AMPA receptor endocytosis impairs the extinction, but not acquisition of learned fear. *Neuropsychopharmacology* 33: 2416-2426.

Derkach VA, Oh MC, Guire ES, Soderling TR (2007) Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 8: 101-113.

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

Dudai Y (2006) Reconsolidation: the advantage of being refocused. *Curr Opin Neurobiol* 16: 174-178.

Dudai Y, Eisenberg M (2004) Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron* 44: 93-100.

- Ehlers MD (2000) Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron* 28: 511-525.
- Ehlers MD (2003) Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nat Neurosci* 6: 231-242.
- Ehlers MD, Heine M, Groc L, Lee MC, Choquet D (2007) Diffusional trapping of GluR1 AMPA receptors by input-specific synaptic activity. *Neuron* 54: 447-460.
- Ehrlich I, Malinow R (2004) Postsynaptic density 95 controls AMPA receptor incorporation during long-term potentiation and experience-driven synaptic plasticity. *J Neurosci* 24: 916-927.
- El-Husseini Ael-D, Schnell E, Dakoji S, Sweeney N, Zhou Q et al. (2002) Synaptic strength regulated by palmitate cycling on PSD-95. *Cell* 108: 849-863.
- Esteban JA (2003) AMPA receptor trafficking: a road map for synaptic plasticity. *Mol Interv* 3: 375-385.
- Esteban JA, Shi SH, Wilson C, Nuriya M, Huganir RL et al. (2003) PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. *Nat Neurosci* 6: 136-143.
- Flexner LB, Goodman RH (1975) Studies on memory: inhibitors of protein synthesis also inhibit catecholamine synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 4660-4663.
- Flexner LB, Serota RG, Goodman RH (1973) Cycloheximide and acetoxycycloheximide: inhibition of tyrosine hydroxylase activity and amnestic effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 354-356.

- Flood JF, Rosenzweig MR, Bennett EL, Orme AE (1973) The influence of duration of protein synthesis inhibition on memory. *Physiol Behav* 10: 555-562.
- Flood JF, Smith GE, Bennett EL, Alberti MH, Orme AE et al. (1986) Neurochemical and behavioral effects of catecholamine and protein synthesis inhibitors in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 24: 631-645.
- Fukata Y, Tzingounis AV, Trinidad JC, Fukata M, Burlingame AL et al. (2005) Molecular constituents of neuronal AMPA receptors. *J Cell Biol* 169: 399-404.
- Gao C, Sun X, Wolf ME (2006) Activation of D1 dopamine receptors increases surface expression of AMPA receptors and facilitates their synaptic incorporation in cultured hippocampal neurons. *J Neurochem* 98: 1664-1677.
- Gelinas JN, Nguyen PV (2005) Beta-adrenergic receptor activation facilitates induction of a protein synthesis-dependent late phase of long-term potentiation. *J Neurosci* 25: 3294-3303.
- Gelinas JN, Banko JL, Hou L, Sonenberg N, Weeber EJ et al. (2007) ERK and mTOR Signaling Couple beta-Adrenergic Receptors to Translation Initiation Machinery to Gate Induction of Protein Synthesis-dependent Long-term Potentiation. *J Biol Chem* 282: 27527-27535.
- Goelet P, Castellucci VF, Schacher S, Kandel ER (1986) The long and the short of long-term memory--a molecular framework. *Nature* 322: 419-422.
- Grecksch G, Matthies H (1980) Two sensitive periods for the amnesic effect of anisomycin. *Pharmacol Biochem Behav* 12: 663-665.

- Grecksch G, Ott T, Matthies H (1980) The effect of intrahippocampally applied anisomycin on the retention of brightness discrimination in rats. *Behav Neural Biol* 29: 281-288.
- Greger IH, Esteban JA (2007) AMPA receptor biogenesis and trafficking. *Curr Opin Neurobiol* 17: 289-297.
- Groc L, Heine M, Cognet L, Brickley K, Stephenson FA et al. (2004) Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nat Neurosci* 7: 695-696.
- Guan Z, Kim JH, Lomvardas S, Holick K, Xu S et al. (2003) p38 MAP kinase mediates both short-term and long-term synaptic depression in aplysia. *J Neurosci* 23: 7317-7325.
- Hall J, Thomas KL, Everitt BJ (2000) Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nat Neurosci* 3: 533-535.
- Havekes R, Timmer M, Van der Zee EA (2007) Regional differences in hippocampal PKA immunoreactivity after training and reversal training in a spatial Y-maze task. *Hippocampus* 17: 338-348.
- Henley JM (2003) Proteins interactions implicated in AMPA receptor trafficking: a clear destination and an improving route map. *Neurosci Res* 45: 243-254.
- Heynen AJ, Quinlan EM, Bae DC, Bear MF (2000) Bidirectional, activity-dependent regulation of glutamate receptors in the adult hippocampus in vivo. *Neuron* 28: 527-536.

- Hu H, Real E, Takamiya K, Kang MG, LeDoux J et al. (2007) Emotion enhances learning via norepinephrine regulation of AMPA-receptor trafficking. *Cell* 131: 160-173.
- Huang CC, You JL, Wu MY, Hsu KS (2004) Rap1-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation facilitates AMPA receptor trafficking via the GDI.Rab5 complex. Potential role in (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine-induced long term depression. *J Biol Chem* 279: 12286-12292.
- Humeau Y, Reisel D, Johnson AW, Borchardt T, Jensen V et al. (2007) A pathway-specific function for different AMPA receptor subunits in amygdala long-term potentiation and fear conditioning. *J Neurosci* 27: 10947-10956.
- Izumi Y, Tokuda K, Zorumski CF (2008) Long-term potentiation inhibition by low-level N-methyl-D-aspartate receptor activation involves calcineurin, nitric oxide, and p38 mitogen-activated protein kinase. *Hippocampus* 18: 258-265.
- Jiang J, Suppiramaniam V, Wooten MW (2007) Posttranslational modifications and receptor-associated proteins in AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Neurosignals* 15: 266-282.
- Kim M, Campeau S, Falls WA, Davis M (1993) Infusion of the non-NMDA receptor antagonist CNQX into the amygdala blocks the expression fear-potentiated startle. *Behav and Neural Biol* 59: 5-8.
- Klann E, Sweatt JD (2008) Altered protein synthesis is a trigger for long-term memory formation. *Neurobiol Learn Mem* 89: 247-259.
- Klann E, Antion MD, Banko JL, Hou L (2004) Synaptic plasticity and translation initiation. *Learn Mem* 11: 365-372.

- Krapivinsky G, Medina I, Krapivinsky L, Gapon S, Clapham DE (2004) SynGAP-MUPP1-CaMKII synaptic complexes regulate p38 MAP kinase activity and NMDA receptor-dependent synaptic AMPA receptor potentiation. *Neuron* 43: 563-574.
- Lattal KM, Abel T (2001) Different requirements for protein synthesis in acquisition and extinction of spatial preferences and context-evoked fear. *J Neurosci* 21: 5773-5780.
- Lee HK, Barbarosie M, Kameyama K, Bear MF, Huganir RL (2000) Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature* 405: 955-959.
- Lee SH, Choi JH, Lee N, Lee HR, Kim JI et al. (2008) Synaptic protein degradation underlies destabilization of retrieved fear memory. *Science* 319: 1253-1256.
- Lewis DJ (1976) A cognitive approach to experimental amnesia. *The American journal of psychology* 89: 51-80.
- Li S, Tian X, Hartley DM, Feig LA (2006) Distinct roles for Ras-guanine nucleotide-releasing factor 1 (Ras-GRF1) and Ras-GRF2 in the induction of long-term potentiation and long-term depression. *J Neurosci* 26: 1721-1729.
- Malenka RC (2003) Synaptic plasticity and AMPA receptor trafficking. *Ann N Y Acad Sci* 1003: 1-11.
- Malinow R, Malenka RC (2002) AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 25: 103-126.
- Man HY, Sekine-Aizawa Y, Huganir RL (2007) Regulation of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor trafficking through

- PKA phosphorylation of the Glu receptor 1 subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 3579-3584.
- Mao SC, Hsiao YH, Gean PW (2006) Extinction training in conjunction with a partial agonist of the glycine site on the NMDA receptor erases memory trace. *J Neurosci* 26: 8892-8899.
- Maren S, Quirk GJ (2004) Neuronal signalling of fear memory. *Nat Rev Neurosci* 5: 844-852.
- McGaugh JL (2004) The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci* 27: 1-28.
- Miller CA, Sweatt JD (2006) Amnesia or retrieval deficit? Implications of a molecular approach to the question of reconsolidation. *Learn Mem* 13: 498-505.
- Misanin J, Miller R, Lewis D (1968) Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science* 160: 203-204.
- Montarolo PG, Goelet P, Castellucci VF, Morgan J, Kandel ER et al. (1986) A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in *Aplysia*. *Science* 234: 1249-1254.
- Nader K, Schafe GE, Le Doux JE (2000) Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406: 722-726.
- Oh MC, Derkach VA, Guire ES, Soderling TR (2006) Extrasynaptic membrane trafficking regulated by GluR1 serine 845 phosphorylation primes AMPA receptors for long-term potentiation. *J Biol Chem* 281: 752-758.

- Patrick GN, Bingol B, Weld HA, Schuman EM (2003) Ubiquitin-mediated proteasome activity is required for agonist-induced endocytosis of GluRs. *Curr Biol* 13: 2073-2081.
- Quevedo J, Vianna MR, Roesler R, de-Paris F, Izquierdo I et al. (1999) Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learn Mem* 6: 600-607.
- Rodrigues SM, Farb CR, Bauer EP, LeDoux JE, Schafe GE (2004) Pavlovian fear conditioning regulates Thr286 autophosphorylation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II at lateral amygdala synapses. *J Neurosci* 24: 3281-3288.
- Rosenblum K, Meiri N, Dudai Y (1993) Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behav Neural Biol* 59: 49-56.
- Rumbaugh G, Adams JP, Kim JH, Huganir RL (2006) SynGAP regulates synaptic strength and mitogen-activated protein kinases in cultured neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 4344-4351.
- Rumpel S, LeDoux J, Zador A, Malinow R (2005) Postsynaptic receptor trafficking underlying a form of associative learning. *Science* 308: 83-88.
- Sara SJ (2000) Strengthening the shaky trace through retrieval. *Nat Rev Neurosci* 1: 212-213.
- Schacter DL, Addis DR (2007) The cognitive neuroscience of constructive memory: remembering the past and imagining the future. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 362: 773-786.

- Schafe GE, Doyère V, LeDoux JE (2005) Tracking the fear engram: the lateral amygdala is an essential locus of fear memory storage. *J Neurosci* 25: 10010-10014.
- Serulle Y, Zhang S, Ninan I, Puzzo D, McCarthy M et al. (2007) A GluR1-cGKII Interaction Regulates AMPA Receptor Trafficking. *Neuron* 56: 670-688.
- Sharma K, Fong DK, Craig AM (2006) Postsynaptic protein mobility in dendritic spines: long-term regulation by synaptic NMDA receptor activation. *Mol Cell Neurosci* 31: 702-712.
- Shifrin VI, Anderson P (1999) Trichothecene mycotoxins trigger a ribotoxic stress response that activates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase and induces apoptosis. *J Biol Chem* 274: 13985-13992.
- Shukla K, Kim J, Blundell J, Powell CM (2007) Learning-induced glutamate receptor phosphorylation resembles that induced by long term potentiation. *J Biol Chem* 282: 18100-18107.
- Solntseva SV, Nikitin VP, Kozyrev SA, Shevelkin AV, Lagutin AV et al. (2007) Effects of protein synthesis inhibitors during reactivation of associative memory in the common snail induces reversible and irreversible amnesia. *Neurosci Behav Physiol* 37: 921-928.
- Star EN, Kwiatkowski DJ, Murthy VN (2002) Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nat Neurosci* 5: 239-246.
- Takeda K, Ichijo H (2002) Neuronal p38 MAPK signalling: an emerging regulator of cell fate and function in the nervous system. *Genes Cells* 7: 1099-1111.

- Tomita S, Fukata M, Nicoll RA, Brecht DS (2004) Dynamic interaction of stargazin-like TARPs with cycling AMPA receptors at synapses. *Science* 303: 1508-1511.
- Tomita S, Stein V, Stocker TJ, Nicoll RA, Brecht DS (2005) Bidirectional synaptic plasticity regulated by phosphorylation of stargazin-like TARPs. *Neuron* 45: 269-277.
- Töröcsik B, Szeberényi J (2000) Anisomycin uses multiple mechanisms to stimulate mitogen-activated protein kinases and gene expression and to inhibit neuronal differentiation in PC12 pheochromocytoma cells. *Eur J Neurosci* 12: 527-532.
- Vanhoose AM, Winder DG (2003) NMDA and beta1-adrenergic receptors differentially signal phosphorylation of glutamate receptor type 1 in area CA1 of hippocampus. *J Neurosci* 23: 5827-5834.
- Vianna MR, Szapiro G, McGaugh JL, Medina JH, Izquierdo I (2001) Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 12251-12254.
- Wanisch K, Tang J, Mederer A, Wotjak CT (2005) Trace fear conditioning depends on NMDA receptor activation and protein synthesis within the dorsal hippocampus of mice. *Behav Brain Res* 157: 63-69.
- Waxman EA, Lynch DR (2005) N-methyl-D-aspartate receptor subtype mediated bidirectional control of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 280: 29322-29333.
- Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF (2006) Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313: 1093-1097.

- Williams JM, Guévremont D, Mason-Parker SE, Luxmanan C, Tate WP et al. (2007) Differential trafficking of AMPA and NMDA receptors during long-term potentiation in awake adult animals. *J Neurosci* 27: 14171-14178.
- Xiong W, Kojic LZ, Zhang L, Prasad SS, Douglas R et al. (2006) Anisomycin activates p38 MAP kinase to induce LTD in mouse primary visual cortex. *Brain Res* 1085: 68-76.
- Yeh SH, Mao SC, Lin HC, Gean PW (2006) Synaptic expression of glutamate receptor after encoding of fear memory in the rat amygdala. *Mol Pharmacol* 69: 299-308.
- Yersin A, Hirling H, Kasas S, Roduit C, Kulangara K et al. (2007) Elastic properties of the cell surface and trafficking of single AMPA receptors in living hippocampal neurons. *Biophys J* 92: 4482-4489.
- Zhu JJ, Qin Y, Zhao M, Van Aelst L, Malinow R (2002) Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell* 110: 443-455.
- Zhu Y, Pak D, Qin Y, McCormack SG, Kim MJ et al. (2005) Rap2-JNK removes synaptic AMPA receptors during depotentiation. *Neuron* 46: 905-916.

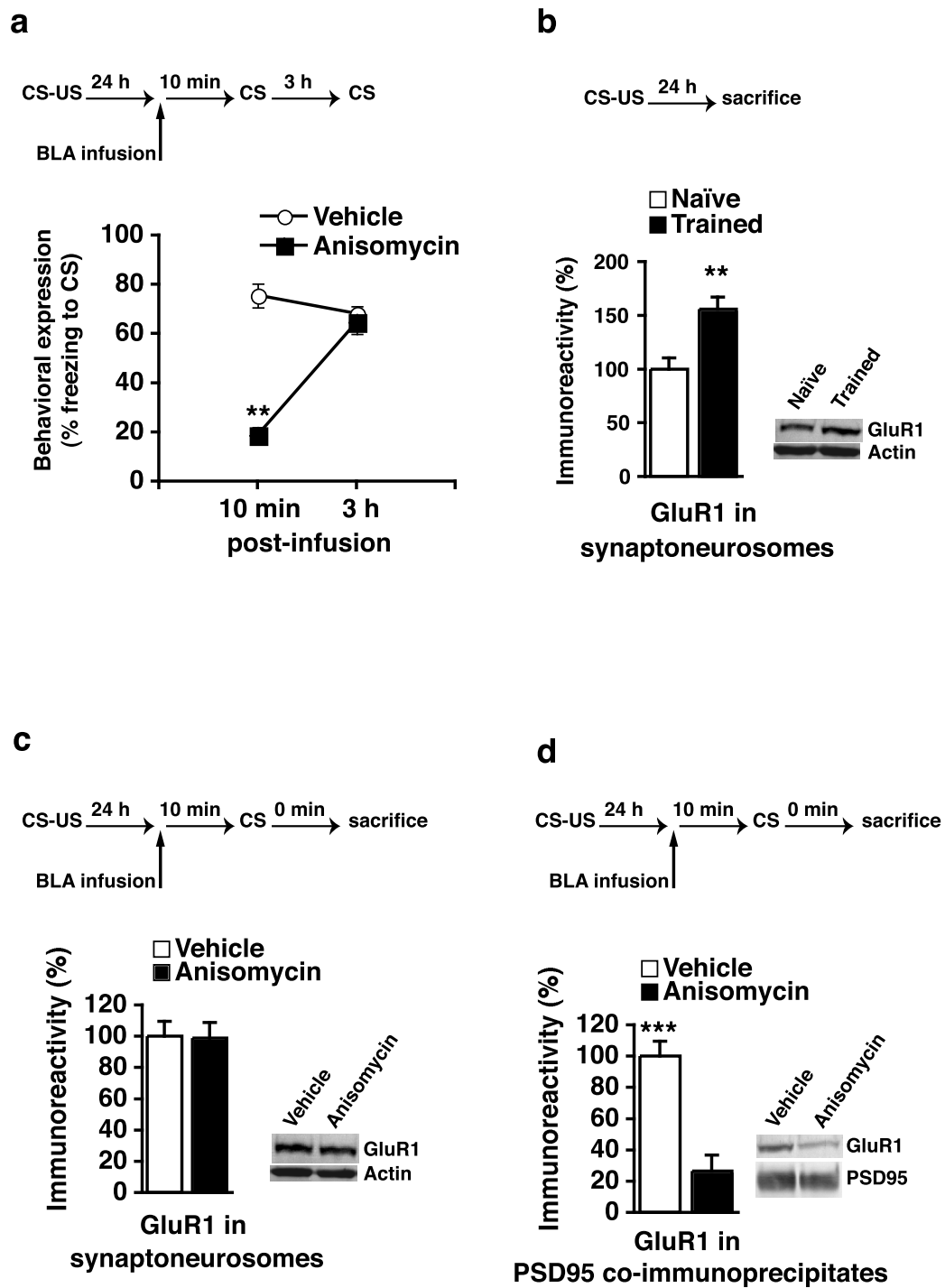
Figure 1

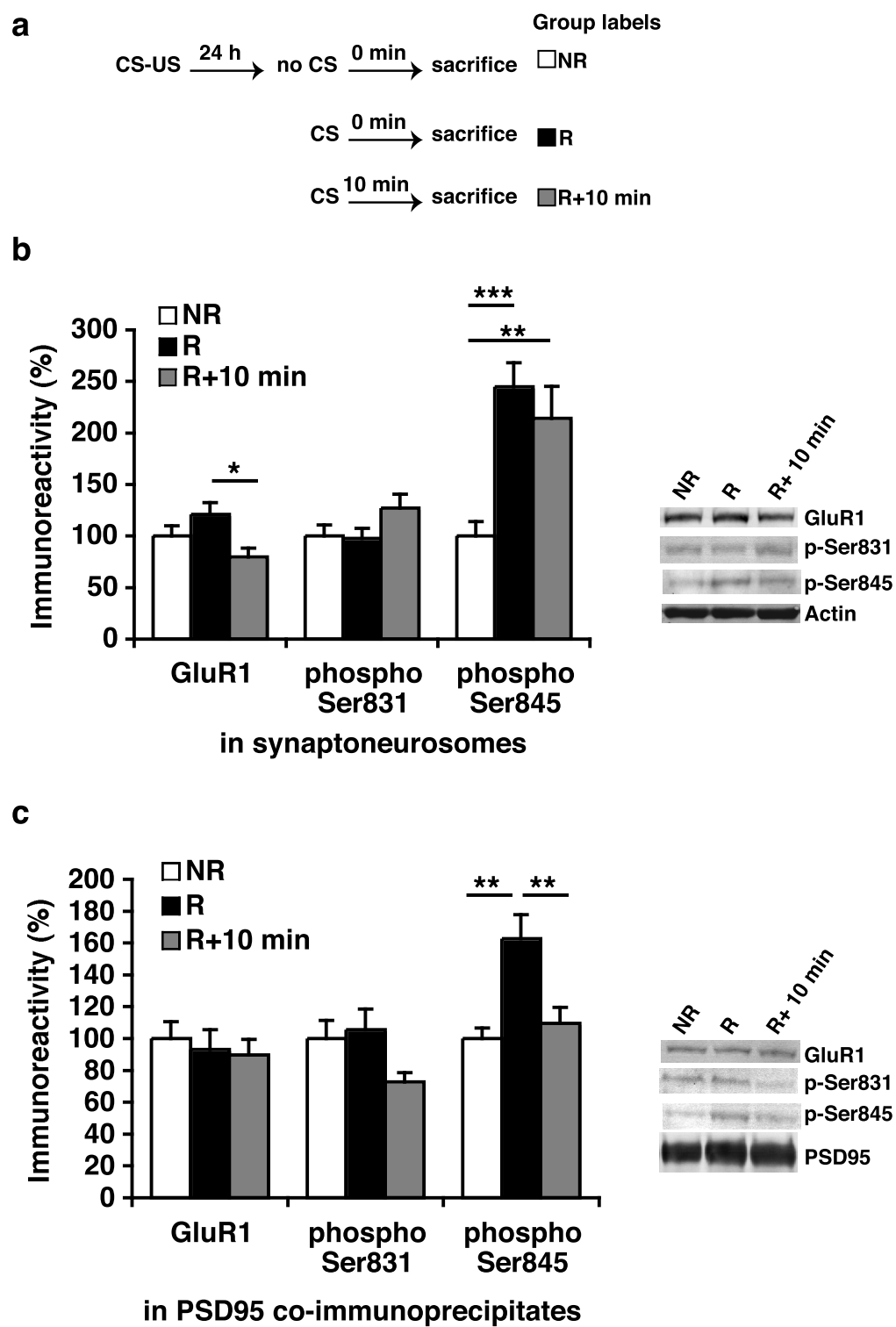
Figure 2

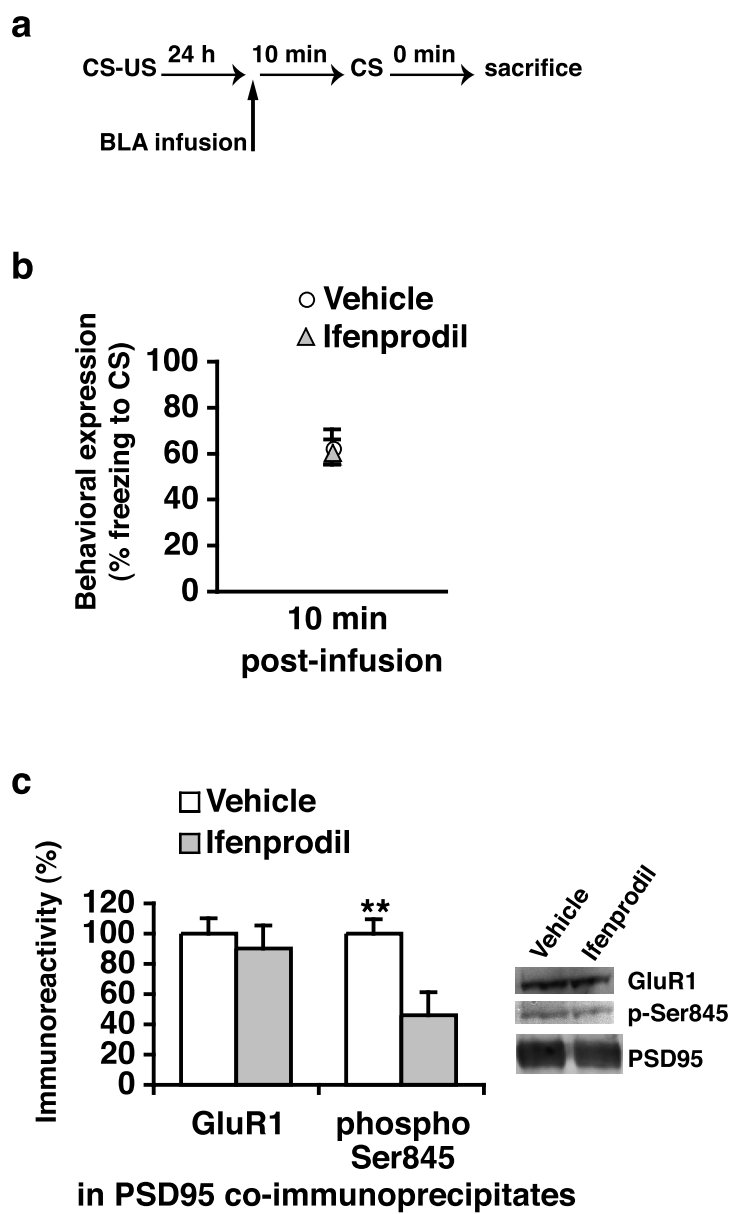
Figure 3

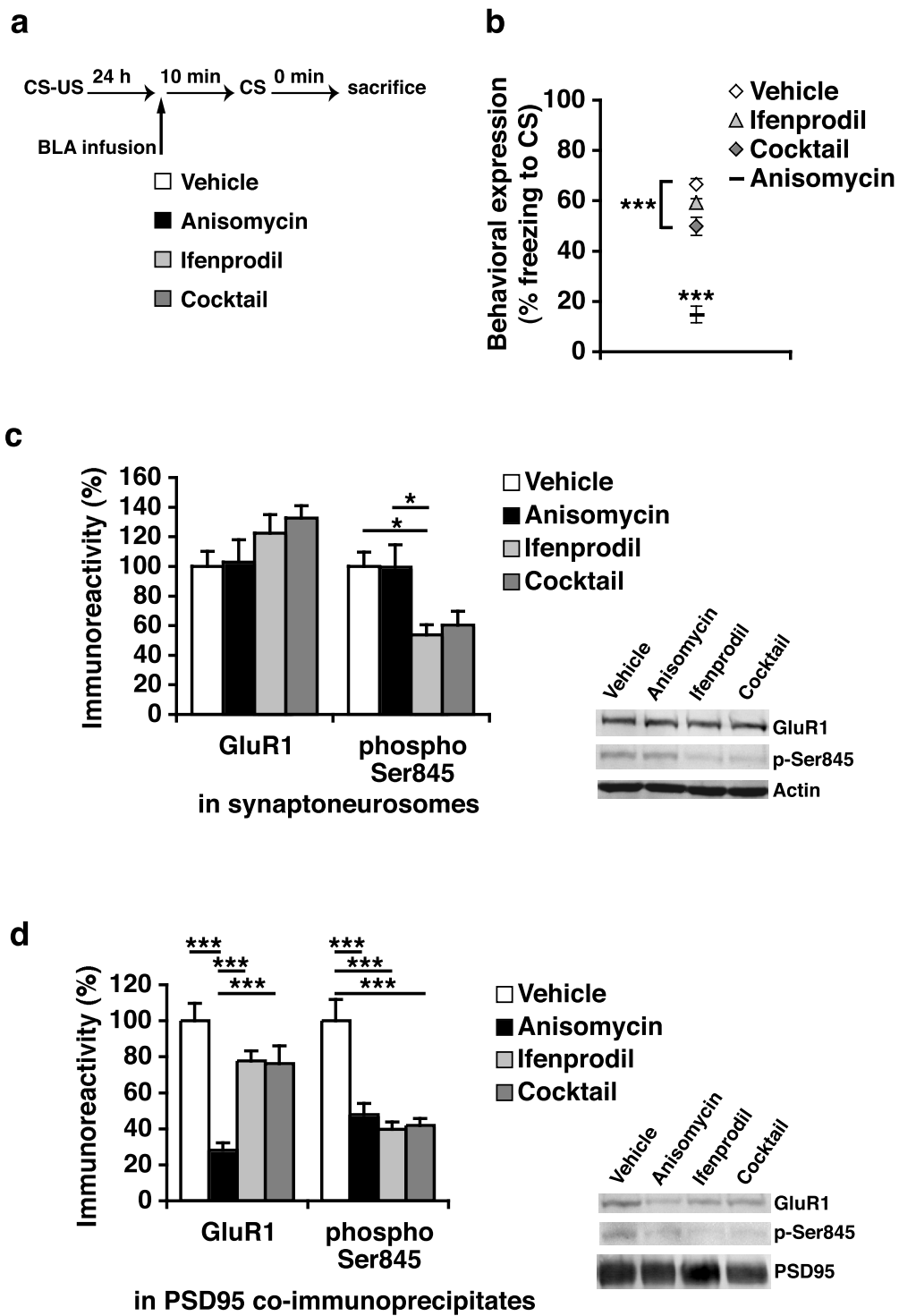
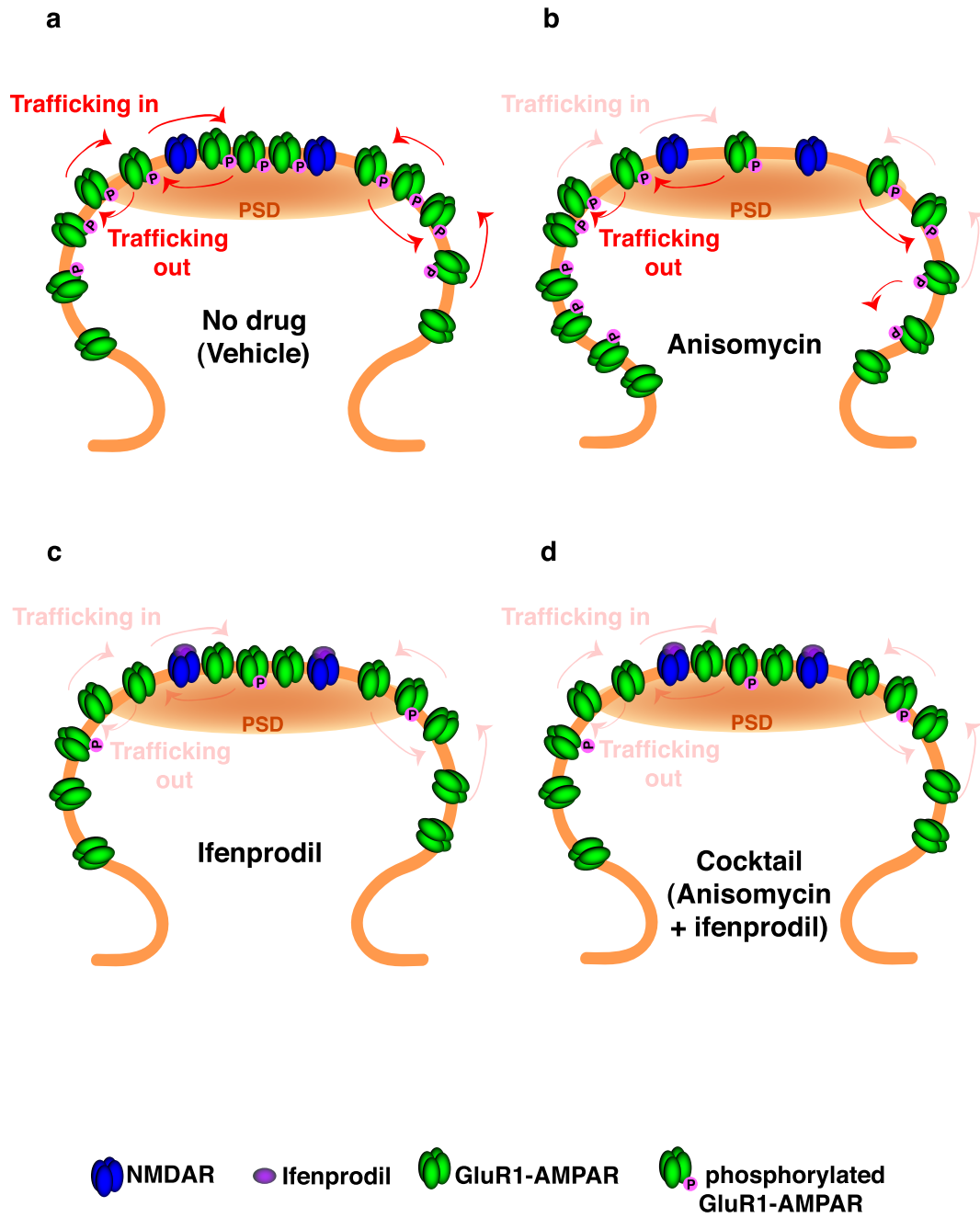
Figure 4

Figure 5

CHAPITRE IV : DISCUSSION GÉNÉRALE

Synthèse des résultats

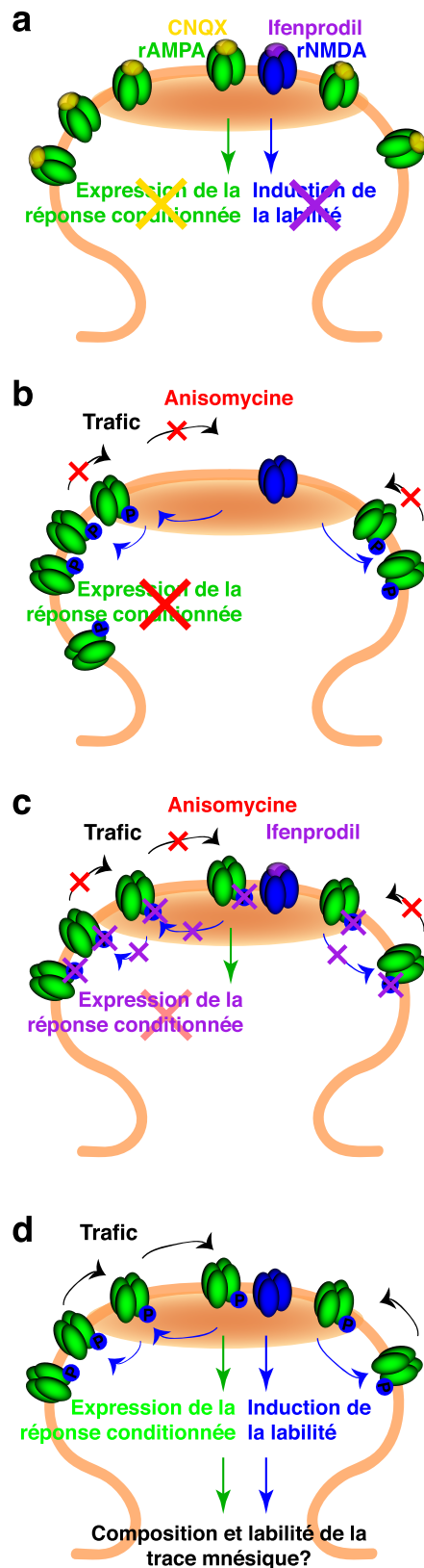
L'objectif de cette thèse était d'étudier la dynamique du rappel d'une mémoire de peur auditive chez le rat Sprague Dawley. Jusqu'à présent, la capacité de la trace mnésique à retourner à un état de labilité par suite du rappel avait été étudiée principalement en rapport avec la restabilisation de la mémoire à long terme, c'est-à-dire la reconsolidation. Nous avons tenté d'explorer certains des mécanismes de plasticité sous-jacents aux manifestations comportementales de la mémoire, et plus particulièrement le rôle des récepteurs NMDA et AMPA de l'amygdale baso-latérale (ABL), lors du rappel d'une mémoire de peur auditive.

Les données présentées dans les 2 manuscrits appuient l'hypothèse de l'activation de mécanismes de plasticité synaptique pendant le rappel de la mémoire. Dans le premier manuscrit, nous avons identifié des fonctions distinctes des récepteurs NMDA et AMPA lors du rappel. En infusant dans l'ABL un antagoniste spécifique de l'un ou l'autre type de récepteurs *avant* le rappel et l'agent amnésiant anisomycine *après* le rappel, nous avons pu évaluer d'une part, le rôle de l'activation de ces récepteurs sur l'expression de la réponse conditionnée pendant le rappel, et d'autre part l'effet de leur activation pendant le rappel sur la sensibilité de la mémoire à l'anisomycine et donc sur l'induction de la labilité. Les résultats suggèrent que les récepteurs NMDA induisent la labilité de la mémoire au moment du rappel, alors que les récepteurs AMPA seraient responsables de l'expression de la réponse conditionnée découlant de cette mémoire. Nous avons démontré que ces deux caractéristiques (induction de la labilité et expression de la réponse conditionnée) pouvaient, sous contrainte pharmacologique, se manifester indépendamment l'une de l'autre.

Le deuxième manuscrit montre que le rappel de la mémoire de peur auditive met en jeu des mécanismes dynamiques impliqués dans l'expression de la réponse comportementale. L'infusion d'anisomycine, juste avant le rappel, bloque l'expression de la peur acquise, en diminuant la fraction post-synaptique des rAMPA-GluR1 dans l'ABL. D'autre part, le rappel active la phosphorylation de GluR1 au résidu Ser845 de façon dépendante des rNMDA, ce qui possiblement accélérerait le trafic des rAMPA-GluR1 de la membrane post-synaptique. D'ailleurs, la co-infusion d'un antagoniste des rNMDA en même temps que l'anisomycine restaure l'expression de la réponse comportementale et rétablit le niveau post-synaptique de GluR1, ce qui suggère que le trafic des rAMPA soit activé et régulé par les rNMDA lors du rappel d'une mémoire de peur auditive.

Dans leur ensemble, les résultats expérimentaux présentés dans cette thèse suggèrent que le rappel de la mémoire de peur auditive soit une phase dynamique au cours de laquelle les rNMDA induisent la labilité de la trace mnésique, phosphorylent et activent le trafic des rAMPA contenant la sous-unité GluR1 (Figure 2, p. 144). De plus, bien que la réponse de peur puisse être exprimée via l'activation des rAMPA même lorsque les rNMDA sont bloqués, la phosphorylation et le trafic des rAMPA semblent être régulés différemment selon le niveau d'activité des rNMDA. Ceci concorde avec des données récentes relatives au trafic des rAMPA *in vitro*. En effet, Ehlers (2000) a mis en évidence un mouvement continu d'exocytose et d'endocytose des rAMPA à la membrane post-synaptique, suivant un cycle de trafic dont la cinétique est accélérée par l'activation des rNMDA. Récemment, il a été confirmé que la mobilité post-synaptique de GluR1 dépendait du niveau d'activité synaptique (Ehlers et al., 2007). Selon le niveau d'activation des rNMDA, de PKA et des phosphatases, les rAMPA sont soit réinsérés dans le cycle de trafic, soit acheminés vers les endosomes et les lysosomes pour y être dégradés (Ehlers, 2000). Par ailleurs, la stimulation de neurones en culture avec l'AMPA induit

une forte internalisation des rAMPA, de façon dépendante du protéasome. Si ce dernier est bloqué par un inhibiteur appliqué 2 à 20 minutes avant la stimulation, l'internalisation des rAMPA est inhibée (Patrick et al., 2003). De même, des inhibiteurs du protéasome empêchent l'internalisation des rAMPA induite par les rNMDA (Colledge et al., 2003). Cet effet est corroboré par une étude *in vivo* démontrant que le rappel d'une mémoire de peur induit une ubiquitination et une dégradation de protéines post-synaptiques sous contrôle du protéasome (Lee et al., 2008). En résumé, le trafic des rAMPA semble accéléré sous contrôle des rNMDA pendant l'expression de la mémoire de peur auditive, avec pour fonctionnalité éventuelle la mise à jour de la trace mnésique (Figure 2, p. 144).



Représentation schématique des récepteurs NMDA et AMPA dans un compartiment post-synaptique, illustrant le lien entre nos différents résultats relatifs à la dynamique de ces récepteurs, la plasticité de la trace mnésique et l'expression de la réponse conditionnée.

Le premier manuscrit a mis en évidence que, lors du rappel de la mémoire de peur auditive, les rAMPA de l'ABL permettaient l'expression de la réponse comportementale, alors que les rNMDA induisaient le retour de la mémoire à un état labile (a).

Le second manuscrit a montré que l'anisomycine infusée dans l'ABL avant le rappel diminuait le niveau de GluR1 dans le complexe associé à la densité post-synaptique et empêchait l'expression de la peur conditionnée (b). De plus, le rappel a induit une phosphorylation de Ser845GluR1. Le blocage des rNMDA a inhibé cette phosphorylation et a annulé l'effet de l'anisomycine (c), rétablissant le niveau post-synaptique de GluR1 et l'expression du comportement.

Le modèle de synthèse illustre la phosphorylation de GluR1 induite par les rNMDA lors du rappel et pose deux questions principales (d): cette phosphorylation est-elle déterminante pour l'induction de la labilité ? Puisque le trafic des rAMPA semble accéléré sous l'action des rNMDA, ce trafic a-t-il une influence sur la trace mnésique à long terme ?

Voici une revue plus détaillée des perspectives inspirées des résultats expérimentaux du présent travail:

L'identification du mécanisme d'induction de la labilité de la mémoire de peur auditive dans l'ABL

Nous avons montré que l'activation des rNMDA était nécessaire pour que la trace mnésique redevienne instable et malléable. De plus, nous avons déterminé que c'est au moment du rappel que l'induction de la labilité se produit, et non pas après. Dans une optique clinique, cette connaissance permettra d'affiner et d'augmenter l'efficacité des approches thérapeutiques pour les troubles comportementaux liés aux expériences traumatiques. En effet, une avenue de recherche clinique se base sur le concept de reconsolidation comme modèle fondamental pour la compréhension des mémoires traumatiques et de leurs traitements potentiels. L'objectif étant de diminuer l'intensité des émotions associées à la mémoire de l'évènement traumatisant et l'anxiété qui en découle, l'administration de bêtabloquants juste après l'évocation explicite du souvenir par le patient s'avère parfois efficace à bloquer la reconsolidation de la composante émotionnelle de la mémoire. Ainsi, des résultats prometteurs ont été obtenus en traitant au propranolol des personnes souffrant de syndrome de stress post-traumatique (Brunet et al., 2008). D'ailleurs, le propranolol bloque la reconsolidation de la mémoire de peur auditive chez le rat (Przybylski et al., 1999 ; Debiec and Ledoux, 2004, 2006). Cependant, chez certains patients, les bêtabloquants sont sans effet et la charge émotionnelle associée au souvenir traumatique est très résistante aux psycho- et aux pharmacothérapies. Dans ce cas, le problème pourrait être lié non pas à l'échec du blocage de la reconsolidation des émotions, mais plutôt à une trop grande fixité du substrat biologique de cette mémoire, de sorte qu'elle ne retourne pas à un état malléable. Même chez le rat, la propriété de la trace mnésique d'être réactivée, c'est-à-dire de redevenir labile suite au rappel n'est pas absolue. Elle dépend de paramètres tels que l'intensité du conditionnement,

la durée de l'exposition au SC lors du rappel et l'âge de la mémoire (Debiec et al., 2002 ; Nader, 2003 ; Suzuki et al., 2004). Par conséquent, il est très important de comprendre la cinétique et la biochimie des mécanismes d'induction de la labilité. Savoir que l'activation des rNMDA au moment du rappel est nécessaire à la réactivation de la mémoire est une avancée qui permet d'envisager une facilitation de la plasticité en augmentant l'activation des rNMDA en cas de mémoires « verrouillées ». La question qui se pose immédiatement est celle de comprendre comment les rNMDA commandent le maintien d'une plasticité potentielle de la mémoire, ou au contraire le blocage de cette propriété.

Rôle de la composition des rNMDA dans la labilité

Une première hypothèse est que le nombre de récepteurs synaptiques et la composition en sous-unités des rNMDA détermine le niveau de plasticité potentielle de la synapse. En particulier, nous savons que la sous-unité NR2B favorise la plasticité synaptique et par conséquent, la régulation à la baisse des rNMDA contenant cette sous-unité pourrait être un mécanisme de « verrouillage » qui rendrait la réactivation de la mémoire plus difficile. D'ailleurs, l'activation des rNMDA contenant NR2B est nécessaire à l'acquisition de l'extinction (Sotres-Bayon et al., 2007), ce qui démontre bien que l'activation de ce type de récepteur induit une plasticité nécessaire à la modification de la trace réactivée. Des souris transgéniques surexprimant la sous-unité NR2B manifestent une réponse de peur accrue et une extinction accélérée par comparaison aux souris de souche sauvage (Tang et al., 1999). De plus, les rNMDA-NR2B modulent l'expression membranaire de GluR1, une composante de la trace mnésique, dans les neurones de l'hippocampe (Kim et al., 2005). Enfin, la composition des rNMDA en sous-unités NR2A et NR2B est modifiée dans l'amygdale au cours du conditionnement de peur (Zinebi et al., 2003). En conclusion, il nous semble pertinent d'envisager l'hypothèse que la composition post-synaptique des rNMDA puisse être un facteur déterminant

pour le retour de la mémoire à un état actif labile lors du rappel. En d'autres termes, des mécanismes apparentés à la métaplasticité pourraient être à la base de cette propriété que possèdent certaines mémoires de rester plastiques et d'être modifiées par l'expérience à l'échelle synaptique (Pérez-Otaño and Ehlers, 2005). Une façon d'explorer cette hypothèse serait d'analyser la composition en sous-unités NR2A et NR2B des rNMDA synaptiques dans l'amygdale de rats conditionnés avec des protocoles d'intensités diverses et d'analyser le lien entre le ratio NR2A :NR2B et le degré de labilité de la mémoire lors du rappel, déterminé par la force du conditionnement ou la modalité du rappel. En complément des marquages biochimiques et des outils pharmacologiques, une étude de la composition synaptique, en microscopie électronique, des récepteurs NMDA et AMPA permettrait de mieux comprendre le rôle des variations qualitatives et quantitatives de ces récepteurs en fonction de leur localisation précise au cours des diverses phases de la mémoire.

Rôle des co-agonistes des rNMDA dans la labilité

Une deuxième voie à explorer pour moduler l'induction de la labilité par les rNMDA concerne les co-agonistes qui régulent l'activation de ces récepteurs (Sheinin et al., 2001 ; Panatier et al., 2006 ; Bains and Oliet, 2007 ; Duffy et al., 2008). Par exemple, la D-cycloserine a un effet facilitateur sur l'extinction de la mémoire de peur conditionnée, et a effectivement été utilisée chez l'humain comme complément aux thérapies d'exposition pour le traitement des phobies (Richardson et al., 2004 ; Garakani et al., 2006 ; Mao et al., 2006 ; Norberg et al., 2008). Le mécanisme par lequel la D-cycloserine exerce un effet facilitateur sur l'extinction est mal connu. Récemment, Mao et al. (2008) ont analysé son effet *in vitro*, montrant une facilitation de la dépotentialisation synaptique, accompagnée par l'endocytose des rAMPA. À la lueur de nos résultats désignant les rNMDA comme des inducteurs de la labilité, nous pouvons supposer que le co-agoniste D-cycloserine accentue la

labilité et donc la malléabilité de la mémoire. Explorer les voies de signalisations activées par les rNMDA lors de la réactivation de la mémoire, sous traitement à la D-cycloserine, permettrait de vérifier cette hypothèse et éventuellement d'identifier les cascades moléculaires qui sont directement liées à la labilité de la trace mnésique. En effet, il se pourrait que certaines voies de signalisation activées lors du rappel de la mémoire et qui ont été rattachées à la reconsolidation, soient en fait impliquées dans la déstabilisation et même à la dégradation de la trace préexistante.

Rôle de la réactivation spontanée dans la stabilisation et l'intégration de la mémoire ?

Pour ce qui est de la compréhension des mécanismes fondamentaux de la neurobiologie de la mémoire, les résultats du premier manuscrit ou le fait que l'expression comportementale de la peur conditionnée soit dissociable du rappel et du retour de la trace mnésique à l'état actif, témoigne que même chez les animaux, l'évocation spontanée d'une mémoire puisse être un mécanisme impliqué dans le processus de consolidation. De fait, des antagonistes des rNMDA bloquent la consolidation et la reconsolidation de certains apprentissages lorsqu'administrés après l'entraînement ou le rappel, sans que l'on en comprenne le mécanisme (Przybylski and Sara, 1997 ; de Lima et al., 2005 ; McDonald et al., 2005). Nos résultats ayant montré que la réactivation nécessitait l'activation des rNMDA, l'effet de leurs antagonistes sur la formation de mémoire à long terme pourrait être expliqué par un effet d'inhibition de la réactivation spontanée. Durant les heures ou les jours qui suivent l'acquisition ou le rappel, la réactivation spontanée de la mémoire pourrait être un mécanisme nécessaire à l'intégration de l'information (Sutherland and McNaughton, 2000). Les travaux sur le rôle du sommeil dans la consolidation et la reconsolidation semblent confirmer que la mémoire soit réactivée et stabilisée pendant cette phase (Stickgold and Walker, 2005). Par contre, une réactivation pendant l'état de veille est difficile à démontrer chez les

animaux (Shimizu et al., 2000 ; Day and Morris, 2001). De même que chez l'humain, les mémoires que nous évoquons souvent sont celles dont nous nous souvenons le mieux, il est envisageable que le rappel spontané constitue un mécanisme fondamental de formation de mémoire à long terme (Sara, 2000). L'identification des voies de signalisation spécifiquement impliquées dans la réactivation de la mémoire permettra de mieux définir la dynamique de la trace mnésique au cours de la consolidation et de la reconsolidation.

La labilité de la mémoire : une notion relative ?

Tel que détaillé dans l'introduction, une trace mnésique est définie comme étant active ou inactive en fonction de l'effet sur la mémoire à long terme d'un traitement amnésiant, classiquement, un inhibiteur de synthèse protéique (Lewis, 1979 ; Nader, 2003). Une mémoire consolidée et non réactivée est donc stable, insensible à l'anisomyicine, malgré le remplacement continu des molécules qui constituent son substrat biologique (Dudai, 2002). Nos résultats relatifs au blocage de l'expression de la réponse conditionnée sous l'effet de l'infusion d'anisomyicine dans l'amygdale avant le rappel illustrent que la trace mnésique peut être sensible aux traitements amnésiants, même en dehors des fenêtres d'instabilité décrites par la théorie de la consolidation. Nous ignorons par quel mécanisme l'anisomyicine empêche l'expression de la réponse conditionnée, si ce n'est que le déficit est accompagné d'une diminution de la fraction post-synaptique de GluR1. Tel que mentionné dans la discussion du second manuscrit, trois possibilités se présentent :

- a. Étant donné que la synthèse protéique, dans les dendrites, est contrôlée par les rNMDA, il est tout à fait plausible que l'effet de l'anisomyicine sur le rappel de la mémoire s'explique par ses propriétés d'inhibition de synthèse protéique (Sutton et al., 2004, 2006 ; Sutton and Schuman, 2006). L'anisomyicine pourrait affecter le niveau d'expression d'une protéine nécessaire à l'acheminement des GluR1 vers la synapse ou à leur

ancrage synaptique. La durée de vie de cette protéine serait suffisamment courte pour que son niveau d'expression soit affecté au bout de dix minutes d'inhibition de la traduction. Une étude protéomique, soit l'analyse du niveau d'expression des protéines synaptiques affectées par l'anisomyicine, permettrait de vérifier cette possibilité (Castellucci et al., 1988 ; Satoh et al., 2002 ; McNair et al., 2006). Si une ou plusieurs protéines candidates étaient identifiées, le blocage spécifique de ces protéines permettrait de vérifier si elles sont effectivement impliquées dans le trafic ou la stabilisation synaptique des GluR1 et l'expression de la réponse conditionnée.

- b. L'anisomyicine pourrait affecter la signalisation noradrénergique, perturbant ainsi le rappel de la mémoire (Canal et al., 2007). Quoiqu'une souche de souris transgénique déficiente en NE ne manifeste pas de défaillance dans l'expression de la mémoire de peur auditive (Murchison et al., 2004), la régulation noradrénergique du conditionnement de peur et de la plasticité synaptique associative dans l'ABL, ainsi que l'effet de l'anisomyicine sur le niveau des catécholamines en font une piste intéressante à explorer (Ellis, 1985 ; Barros et al., 2001 ; Debiec and LeDoux, 2006 ; Roozendaal et al., 2006). La NE régule la phosphorylation et l'insertion synaptique de GluR1 dans l'hippocampe lors du conditionnement de peur contextuelle (Hu et al., 2007). Puisque l'infusion locale d'anisomyicine dans l'ABL augmente massivement le niveau de NE (Canal et al., 2007), une manière simple de vérifier si cela pourrait expliquer la diminution du niveau de GluR1 post-synaptique et le blocage de l'expression de la réponse conditionnée, serait de tenter de reproduire l'effet de l'anisomyicine avec une infusion de NE. Le cas échéant, la co-infusion de propranolol et d'anisomyicine fournirait un test de vérification additionnel. Il serait alors intéressant d'étudier la dynamique du rappel d'une mémoire de peur sous traitement

bêtabloquant, ainsi que les conséquences sur la mémoire à long terme, afin de dégager les modalités de modulation de la NE sur l'expression de la mémoire de peur associative.

- c. Notre dernière hypothèse concerne l'internalisation des rAMPA par le biais de la p38 MAPK, qui est activée par l'anisomycine (Törocsik and Szeberényi, 2000). Xiong et al. (2006) ont montré que l'anisomycine induisait une dépression à long terme dans des tranches de cortex visuel *in vitro*, par un mécanisme dépendant des rNMDA et impliquant l'endocytose des rAMPA. Cet effet était aboli par un inhibiteur de la p38 MAPK. Par ailleurs, l'activation de la p38 MAPK a été identifiée comme un mécanisme d'inhibition de la PLT dépendante des rNMDA dans l'hippocampe (Izumi et al., 2008), ce qui confirme que cette kinase participe à un mécanisme plausible de dépression synaptique. Enfin, le blocage de l'endocytose des rAMPA empêche l'acquisition de l'extinction, démontrant que l'internalisation immédiate des rAMPA est un mécanisme de dépression synaptique impliqué dans la régulation de la réponse comportementale de la mémoire de peur (Dalton et al., 2008). La co-infusion d'un inhibiteur de p38 MAPK en même temps que l'anisomycine permettrait de vérifier si cette kinase est à la base du mécanisme expliquant le blocage de l'expression de la peur acquise par l'anisomycine.

Le mécanisme par lequel l'anisomycine perturbe le niveau de GluR1 post-synaptique et empêche l'expression de la réponse conditionnée reste à identifier. Toujours est-il que l'anisomycine a induit une amnésie, ne serait-ce que temporaire, et qui est provoquée à un moment où la mémoire est sensée être inactive, donc insensible à l'anisomycine. De façon similaire, des travaux récents ont montré une amnésie permanente pour des mémoires associatives après traitement local avec un peptide qui bloque la kinase PKMz (Pastalkova et al., 2006 ; Friedman et al., 2007 ; Shema et al., 2007). Le traitement étant

appliqué après la consolidation et sans même réactiver la mémoire, selon la définition classique, la trace mnésique serait inactive. Pourtant, ce traitement bloque spécifiquement la mémoire associative et n'occasionne aucune lésion. Par conséquent, la notion classique, voulant que la mémoire soit fixe tant que non réactivée, devrait être nuancée. La mémoire traverse probablement des états dynamiques de sensibilité variable, si bien que la notion de stabilité est à définir non plus en termes absolus, mais plutôt en relation avec l'intensité du traitement (durée de la réactivation ou dose de la substance déstabilisante ou amnésiante), le moment du traitement et l'intervalle de temps entre le traitement et le test comportemental. C'est l'interaction de ces trois paramètres, et non pas un état absolu de fixité ou d'instabilité, qui détermine la malléabilité de la trace mnésique.

Modulation noradrénergique de la mémoire de peur

La NE a un rôle prépondérant dans la modulation des mémoires émotionnelles (McGaugh, 2004 ; Hurlermann, 2006). Le propranolol, un bêtabloquant, interfère efficacement avec la reconsolidation de la mémoire de peur auditive chez le rat (Debiec and Ledoux, 2004, 2006) et permet même d'atténuer les symptômes physiologiques de stress chez des personnes souffrant de syndrome de stress post-traumatique (Brunet et al., 2008). Il existe néanmoins une grande variabilité interindividuelle dans la réponse au stress et aux traitements, si bien que l'approche normative mène à une impasse. En effet, l'efficacité des bêtabloquants à traiter le stress lié aux mémoires traumatiques est très inégale, et il devient de plus en plus clair que la prise en compte du profil de réactivité au stress des individus est indispensable (Orr et al., 2002 ; Pitman et al., 2002 ; Glannon, 2006 ; Yehuda and LeDoux, 2007). De même que chez l'humain, des facteurs développementaux, familiaux et sociaux programment la (patho)physiologie du stress, les rats présentent également d'importantes différences phénotypiques interindividuelles ; pourtant ceci est rarement pris en considération. Récemment, Bush et al. (2007) se sont

intéressés aux profils individuels de réactivité et de récupération de rats Sprague Dawley, après un conditionnement de peur auditive, mettant en évidence deux phénotypes distincts. De notre côté, nous avons tenté de reproduire les expériences de Debiec et Ledoux qui consistent à bloquer la reconsolidation de la peur auditive par injection systémique de propranolol après la réactivation d'une mémoire de peur auditive (Debiec and Ledoux, 2004, 2006). À l'échelle moléculaire, nous savons que les récepteurs bêta-adrénergiques modulent la fonction des rNMDA, en particulier le flux de Ca^{2+} (Gean et al., 1992 ; Raman et al., 1996). Conséquemment, les cascades moléculaires activées par le Ca^{2+} sont co-régulées par les rNMDA et les récepteurs adrénergiques (Vanhoose and Winder, 2003). Une voie de convergence de ces récepteurs est l'activation de kinases et de phosphatases qui régulent le trafic et la composition synaptique des rAMPA (Snyder et al., 2005 ; Smith et al., 2006 ; Vanhoose et al., 2006 ; Horne and Dell'Acqua, 2007 ; Man et al., 2007 ; Bloomer et al., 2008). Étant donné que l'acquisition et la consolidation de la mémoire de peur auditive nécessitent l'insertion post-synaptique de GluR1 dans l'ABL (Rumpel et al., 2005 ; Yeh et al., 2006), notre objectif était de déterminer si le blocage de la reconsolidation par le propranolol serait accompagné d'un retour de l'expression de GluR1 au niveau de base. Malgré plusieurs tentatives*, nous n'avons jamais obtenu la diminution de la réaction de peur conditionnée décrite par Debiec et Ledoux (2004, 2006). Au contraire, nous avons observé une généralisation de la peur au contexte dans lequel la mémoire était réactivée, alors que ce contexte n'a jamais été associé directement au choc électrique. Ceci confirme bien que le même protocole

* Données préliminaires et non publiées.

expérimental peut engendrer des résultats différents pour des raisons difficilement contrôlables (environnement physique, expérimentateur, génotype, régulation épigénétique, etc...) (Crabbe et al., 1999 ; Chesler et al., 2002a, 2002b ; Lewejohann et al., 2006). Par ailleurs, cet effet de généralisation que nous avons observé suggère que le propranolol puisse moduler l'anxiété à la hausse dans certaines circonstances, confirmant qu'il n'est pas anodin d'administrer des bêtabloquants à des personnes en état de choc ou de stress élevé, car les résultats peuvent aller à l'encontre de l'effet escompté et aggraver des situations déjà dramatiques, sans compter les questions d'ordre éthique que ces traitements soulèvent (Giles, 2005 ; Glannon, 2006). Il est donc primordial d'approfondir davantage la recherche sur la neurobiologie et la physiologie de la réactivation des mémoires émotionnelles. La généralisation de la réaction de peur au nouveau contexte chez les rats traités au propranolol pourrait découler d'un transfert des indices de rappel vers le nouveau contexte par suite de la réactivation de la mémoire (Briggs et al., 2007). Par conséquent, ces résultats, bien que préliminaires et non publiés, confirment que la signalisation noradrénergique serait un mécanisme cellulaire par le biais duquel les mémoires émotionnelles sont modifiées pour intégrer de nouvelles informations, tant au niveau cellulaire que systémique (Zhang et al., 2005).

Position des rAMPA dans la trace mnésique

Les rAMPA jouent-ils un rôle actif dans la plasticité?

La conception dominante considère les rAMPA comme des effecteurs passifs : des récepteurs canaux traversés par un courant électrique, qui induisent une dépolarisation membranaire mais pas de transduction de signaux. Pourtant, les rAMPA-GluR1 homomériques, perméables au calcium, stimulent des cascades intracellulaires impliquées dans la PLT, activant notamment la MAPK, la PKA et CREB (Perkinton et al., 1999 ; Huettner, 2003 ; Rao et al., 2006 ; Rao and Finkbeiner, 2007). Les rAMPA régulent également le gène

d'expression précoce *Arc* qui est impliqué dans la plasticité à long terme (Rao et al., 2006). En conséquence, l'activation des rAMPA lors du rappel pourrait avoir un rôle important dans la modification de la trace mnésique dont ils sont une composante essentielle. Les résultats du premier manuscrit semblent *a priori* confirmer un rôle d'effecteurs passifs des rAMPA, puisque leur blocage pendant le rappel n'empêche pas l'inhibition de la reconsolidation par l'anisomycine. Cependant, bien que le retour à la labilité se soit produit indépendamment des rAMPA, dans nos conditions, le rappel n'était pas de nature à modifier la réponse conditionnée. Ainsi, il serait intéressant de tester l'effet de l'antagoniste des rAMPA CNQX, infusé avant des sessions de rappel prolongées, qui induisent normalement l'extinction de la réponse conditionnée. Étant donné que l'extinction semble mettre en jeu des mécanismes de dépression synaptique nécessitant l'internalisation des rAMPA (Dalton et al., 2008), la question est de savoir si les rAMPA ont besoin d'être actifs pour que l'extinction soit acquise. Le fait qu'un potentiateur des rAMPA accélère l'acquisition et l'extinction semble suggérer que le degré d'activation de ces récepteurs pendant l'entraînement et le rappel influence effectivement la plasticité (Rogan et al., 1997 ; Zushida et al., 2007). Aussi, l'acquisition d'une mémoire spatiale nécessite autant l'activation des rAMPA que des rNMDA dans l'hippocampe (Day et al., 2003). Par conséquent, il se pourrait que les rAMPA jouent un rôle prépondérant dans la formation et la modification de leur propre signature synaptique, bien qu'ils ne soient pas eux-mêmes les inducteurs de la plasticité. L'interaction réciproque des récepteurs AMPA et NMDA pourrait donc être la clé de la mise à jour de la mémoire.

Trafic des rAMPA = mise à jours de la mémoire?

Jusqu'à présent, le modèle de plasticité synaptique de la mémoire proposait que les modifications de la composition synaptique des rAMPA se produisent plusieurs minutes à plusieurs heures après l'entraînement de la PLT *in vitro* (Malenka, 2003 ; Shepherd and Huganir, 2007) ou de l'apprentissage *in*

in vivo (Rumpel et al., 2005 ; Yeh et al., 2006). Les nouvelles technologies de marquage et d'imagerie, permettant le suivi de récepteurs individuels dans des cellules *in vitro*, dévoilent une très grande mobilité des rAMPA. Dans les dendrites, lorsque les récepteurs AMPA ne sont pas stabilisés par un ancrage aux MAGUK (*membrane-associated guanylate kinase*) et aux TARP (*transmembrane AMPA receptor regulatory protein*) (Elias and Nicoll, 2007 ; Ziff, 2007), ils suivent un mouvement libre de type Brownien (Ashby et al., 2006 ; Groc and Choquet, 2006 ; Schuss et al., 2007). La phosphorylation et la déphosphorylation rapides des rAMPA régulent leur interaction avec ces molécules d'ancrage et déterminent leur vitesse de trafic (Cotman et al., 2007). Ainsi, la diffusion en surface des récepteurs AMPA est réduite quand ils sont associés à la PSD95, qui les stabilise via stargazine (Bats et al., 2007). La phosphorylation de stargazine par la PKA régule son interaction avec PSD95 et par conséquent le trafic synaptique des rAMPA (Chetkovich et al., 2002 ; Choi et al., 2002). L'interaction PSD95-stargazine a un effet sur l'immobilisation des récepteurs AMPA, mais pas sur le coefficient de diffusion de la population mobile. En effet, les mutations affectant l'interaction de PSD95 et stargazine font augmenter la fraction mobile des récepteurs sans affecter leur coefficient de diffusion : les récepteurs quittent l'espace synaptique par dispersion latérale.

La vitesse moyenne de diffusion membranaire latérale d'un récepteur GluR1 est de $0.042 \mu^2 \cdot s^{-1}$ (Bats et al., 2007). La taille de la zone active de la synapse est en moyenne de $0.051 \mu^2$ pour des neurones d'hippocampe en culture (Murthy et al., 2001), de sorte qu'un récepteur est capable de parcourir l'espace de la synapse en une seconde en moyenne. À l'avenir, la cinétique du trafic des récepteurs synaptiques impliqués dans la PLT pourrait se révéler beaucoup plus rapide que les estimations actuelles. Des modifications synaptiques extrêmement rapides sont difficilement détectables car le « flux synaptique net » n'est pas forcément affecté, de sorte que l'accélération du trafic des récepteurs ne peut être observée dans des études *in vivo*. Jusqu'à très

récemment, elle n'était même pas détectable *in vitro*, puisque les méthodologies utilisées mesuraient le mouvement de populations de récepteurs.

Dernièrement, des souris transgéniques GluR1^{-/-} se sont avérées incapables non seulement de former une mémoire de peur associative, mais aussi d'exprimer la réponse de peur pendant le conditionnement (Humeau et al., 2007). Il semble donc que l'incorporation synaptique des rAMPA soit effectivement activée pendant l'entraînement. Nos résultats concernant la phosphorylation de Ser845-GluR1 lors du rappel sont intéressants mais difficiles à interpréter. Ils indiquent que les rAMPA-GluR1 sont, au moment de la réactivation, activement régulés par les rNMDA. Néanmoins, il est difficile de définir la conséquence fonctionnelle de cette interaction par rapport à l'encodage de la mémoire. Et pourtant, il est très tentant d'envisager un lien entre les résultats des deux manuscrits. Car si le premier a montré que certaines fonctions des récepteurs NMDA et AMPA pouvaient être dissociées (pharmacologiquement), le second dévoile l'existence d'une interaction dynamique entre ces 2 voies d'activation synaptiques. Puisque les rNMDA induisent la phosphorylation des rAMPA pendant le rappel, mais que cette interaction n'est nécessaire, ni à l'expression de la réponse conditionnée, ni à l'induction de la labilité, alors quelle est la fonction de la phosphorylation de Ser845-GluR1 lors du rappel? Sachant que cette phosphorylation est due à la PKA (Roche et al., 1996), il est particulièrement intéressant de constater que cette kinase est nécessaire à la consolidation de la mémoire de peur auditive, et que son inhibition ou le blocage de son ancrage synaptique facilitent l'extinction de la mémoire (Schafe and LeDoux, 2000 ; Moita et al., 2002 ; Isiegas et al., 2006 ; Nijholt et al., 2008). Certaines études ont montré que l'activation de la PKA pendant l'acquisition et lors de la première phase de consolidation était importante pour la formation de mémoire à long terme, alors que la mémoire à court terme serait indépendante de PKA (Goosens et al., 2000 ; Huang et al., 2000 ; Nijholt et al., 2008). Et pourtant la PKA est activée

dès l'acquisition et le rappel. Ehlers (2000) et Man et al. (2007) ont montré *in vitro* que les rNMDA induisent l'endocytose des rAMPA et que l'activation de PKA empêchait cette endocytose. La phosphorylation de Ser845GluR1 augmente l'exocytose et réduit l'endocytose des rAMPA (Man et al., 2007). Ceci justifierait le fait que l'activation de PKA avant le rappel augmente la réponse de peur, et que son inhibition bloque la reconsolidation (Tronson et al., 2006). Le niveau d'activation de PKA au moment du rappel serait donc corrélé à l'amplitude de la réponse comportementale immédiate, mais aurait aussi des répercussions à long terme. Afin de comprendre la signification fonctionnelle de la phosphorylation de Ser845-GluR1 que nous avons observée pendant le rappel, il faudrait analyser l'effet de l'hyperactivation ou de l'inhibition de PKA lors du rappel, sur la phosphorylation de Ser845-GluR1 et l'expression immédiate de la mémoire, ainsi que les changements à long terme du niveau d'expression synaptique de GluR1 et de la réponse conditionnée. Plus précisément, si la phosphorylation de Ser845-GluR1 lors du rappel est nécessaire à l'induction de la labilité, alors l'infusion d'un inhibiteur de PKA avant le rappel devrait rendre l'infusion post-rappel d'anisomyicine inefficace à bloquer la reconsolidation, mimant l'effet de l'ifenprodil obtenu dans le premier manuscrit. Inversement, un activateur de PKA pourrait accentuer la labilité, autrement dit, accentuer la réactivation de conditionnements de forte intensité, dont les mémoires sont normalement moins malléables. Enfin, les rAMPA seraient-ils phosphorylés, et leur trafic activé, dans des conditions de surentraînement où la mémoire n'est pas réactivée par le rappel, c'est-à-dire lorsqu'elle est seulement exprimée sans redevenir labile? En conclusion, notre étude pourrait contribuer à l'élaboration de modèles d'étude des mécanismes cellulaires contrôlant la mise à jour de la mémoire. Nous pensons que l'actualisation de la trace mnésique se produit par le biais de l'interaction des récepteurs NMDA et AMPA lors du rappel. Une façon de tester cette hypothèse serait de combiner la manipulation pharmacologique de ces récepteurs au cours du rappel avec des protocoles d'entraînement amenant des mises à jour de la

mémoire qui soient accompagnées de changements notables de la réponse comportementale, tels que le conditionnement de second ordre et l'extinction (Falls et al., 1992 ; Maren and Quirk, 2004 ; Briggs et al., 2007). Le fait que la facilitation de l'extinction par la D-cycloserine, co-agoniste des rNMDA, soit contrecarrée par un inhibiteur de protéasome qui réduit l'internalisation de GluR1, confirme que l'interaction de ces 2 classes de récepteurs *in vivo*, pendant le rappel de la mémoire, est un mécanisme intéressant à explorer (Lee et al., 2008 ; Mao et al., 2008).

À propos de dissociation entre réactivation et expression de la mémoire de peur

Dans le premier manuscrit, nous avons confirmé que l'activation des rAMPA était nécessaire à l'expression de la réponse conditionnée. Par contre, nous avons démontré que la mémoire redevenait labile même si les rAMPA étaient bloqués pharmacologiquement. Cette propriété ouvre une voie à une approche thérapeutique séduisante, celle de dispenser les personnes souffrant de traumatismes sévères de vivre des émotions négatives intenses pendant les séances thérapeutiques ou lors de résurgences spontanées (Southwick et al., 1999). Bien qu'il ne soit pas de notre ressort de décider s'il est souhaitable de développer des traitements pharmacologiques à cette fin, nous pouvons souligner qu'il est biologiquement possible de dissocier la réactivation d'une mémoire et le vécu explicite des émotions (Glannon, 2006). Par ailleurs, il est légitime de se demander si un mécanisme cellulaire de nature similaire puisse être impliqué dans les dissociations « naturelles » à la base de certains types de développement affectif et de nombreux troubles psychologiques. Ces dissociations sont considérées comme un mécanisme de défense qui provoque une amnésie partielle ou totale pour des événements traumatisants (Counts, 1990 ; Spiegel, 1997). Cependant, ces mémoires sont bel et bien encodées, sauf que le sujet n'en a pas le souvenir (amnésie dissociative), ou bien le souvenir est fragmentaire. Les personnes sujettes à la dissociation souffrent de troubles

psychologiques et de comportements dysfonctionnels souvent sévères. Le mécanisme neurobiologique de ces dissociations est mal connu (Frewen and Lanius, 2006). Il est intéressant de noter que les personnes souffrant de mémoires dissociatives sont prédisposées à développer un syndrome de stress post-traumatique, confirmant un rapprochement possible entre le modèle animal de mémoire de peur associative utilisé ici et les troubles dissociatifs chez l'humain (Spiegel, 1997 ; van der Hart et al., 2005 ; Bryant, 2007). De plus, la signalisation glutamatergique dans l'amygdale semble impliquée dans les phénomènes de dissociation et de syndrome de stress post-traumatique (Heresco-Levy and Javitt, 1998 ; Chambers et al., 1999 ; Friedman, 2002). Par conséquent, nous pensons que l'approfondissement des mécanismes d'action des récepteurs NMDA et AMPA dans l'amygdale du rat, lors du rappel et de la réactivation de la mémoire de peur conditionnée, permettrait de mieux comprendre la neurobiologie de la dissociation et des troubles anxieux tels que le syndrome de stress post-traumatique chez l'humain. Toutefois, pour appréhender les différents profils de réactivité au stress chez les humains avec des modèles animaux, il serait utile d'étudier la dynamique du rappel de façon comparative chez plusieurs souches de rats, afin de tenir compte des facteurs génétiques et épigénétiques (Francis et al., 1999 ; Bielajew et al., 2002 ; Faraday, 2002 ; Conti and Printz, 2003 ; Konkle et al., 2003 ; Faraday et al., 2005 ; Seckl and Meaney, 2006). En outre, il faudrait intégrer des variables telles que le degré d'enrichissement environnemental, l'intensité des contacts sociaux, le type de stress (chronique/ aigu), car la programmation de la réactivité au stress est façonnée par l'interaction de facteurs génétiques et environnementaux (Meaney et al., 1991 ; Bielajew et al., 2002 ; Konkle et al., 2003 ; Seckl and Meaney, 2006).

Facteurs de susceptibilité au syndrome de stress post-traumatique

Depuis une dizaine d'années, l'effet des contacts maternels périnataux et de l'enrichissement environnemental sur la programmation de la réactivité au stress chez l'adulte a été modélisée avec succès chez la souris, permettant de comprendre le lien entre les facteurs épigénétiques et la programmation de l'axe adrénalo-hypothalamo-hypophysaire (Meaney, 2001 ; Meaney et al., 2007). Ces études ont principalement étudié l'impact des soins maternels sur le comportement exploratoire et la capacité d'apprentissage en situation de stress modéré (comme l'exposition à un nouvel environnement ou la piscine de Morris), montrant que ces facultés étaient diminuées chez les rongeurs ayant connu un développement précoce caractérisé par des contacts maternels appauvris (Caldji et al., 1998 ; Francis et al., 1999 ; Meaney, 2001 ; Bredy et al., 2004a ; Borta et al., 2006). Par contre, face à un stress sévère (conditionnement de peur), certaines études montrent que la réactivité est plus prononcée chez les rats ayant grandi dans un environnement pauvre en contacts maternels et/ou sociaux (Champagne et al., 2008), alors que d'autres suggèrent que l'enrichissement environnemental entraînerait une réponse accrue au conditionnement de peur contextuel et auditif (Tang et al., 2001 ; Barbelivien et al., 2006). Toutefois, pour modéliser le syndrome de stress post-traumatique, il est plus pertinent d'étudier la malléabilité de la mémoire traumatique et la récupération après le conditionnement de peur acquise, plutôt que l'amplitude de la réponse juste après l'entraînement. À cet égard, Woodcock et Richardson (2000) ont montré que l'extinction de la mémoire de peur contextuelle était plus rapide chez des rats s'étant développés dans un environnement enrichi. En outre, les conditions de vie chez les sujets adultes sont des paramètres importants qui devraient être pris en considération en tant que facteurs de résilience éventuels dans l'évaluation des profils de réactivité aux traumatismes (Charuvastra and Cloitre, 2008). Dans notre laboratoire, par exemple, les rats

sont maintenus dans des cages individuelles, sans aucun enrichissement environnemental ni social, alors qu'ils vivent en groupes au laboratoire Charles River qui nous les procure. Les rats étant des animaux sociaux, il est fort probable que la réactivité au conditionnement de peur et la dynamique de la mémoire afficheraient des variations, en fonction des conditions d'habitat de nos rats. Alors, la dynamique de la mémoire de peur, y compris les mécanismes moléculaires, pourraient refléter les sensibilités différentes au stress, en corrélation avec l'environnement des animaux. D'ailleurs, l'enrichissement environnemental augmente de façon rapide, significative et durable le niveau d'expression des rNMDA et de la sous-unité GluR1 des rAMPA dans le cerveau de souris, ce qui démontre que ces marqueurs de plasticité synaptique sont des corrélats biochimiques valides pour l'étude des mécanismes moléculaires des mémoires émotionnelles (Bredy et al., 2004b ; Tang et al., 2001). En résumé, bien que tout indique qu'un environnement périnatal et des soins maternels appauvris puissent être un facteur de susceptibilité aux syndromes de stress post-traumatique, les mécanismes en sont extrêmement complexes et relativement peu explorés à l'aide de modèles animaux. L'étude approfondie des mécanismes de labilité, de reconsolidation et d'extinction chez des animaux en prenant compte de l'environnement « affectif » précoce et de l'enrichissement environnemental, apportera certainement un éclairage nouveau sur la neurobiologie des mémoires émotionnelles et traumatiques. En analysant les mécanismes de plasticité et le degré de malléabilité de la mémoire traumatique sous divers profils, il sera plus aisé de comprendre la complexité et les variations interindividuelles des troubles anxieux chez l'humain et de les traiter efficacement.

Conclusion

En prenant pour modèle la mémoire de peur auditive, le présent travail aura contribué à la compréhension des mécanismes de plasticité synaptique impliquant les récepteurs NMDA et AMPA de l'amygdale basolatérale dans

l'expression de la réponse de peur conditionnée et l'induction de la labilité lors du rappel de la mémoire émotionnelle. Outre le fait de nous instruire sur la neurobiologie de la mémoire et de l'apprentissage, l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires de plasticité synaptique régissant l'encodage et l'expression de la mémoire émotionnelle peut nous renseigner sur l'adaptabilité des fonctions cognitives, sur les bases biologiques de l'identité individuelle, sur les mécanismes des troubles psychologiques liés aux mémoires traumatiques et ceux des déficits cognitifs qui accompagnent les maladies neurologiques.

Références bibliographiques de la discussion générale

- Ashby, M.C., Maier, S.R., Nishimune, A., and Henley, J.M. (2006). Lateral diffusion drives constitutive exchange of AMPA receptors at dendritic spines and is regulated by spine morphology. *J Neurosci* 26, 7046-7055.
- Bains, J.S., and Oliet, S.H. (2007). Glia: they make your memories stick! *Trends Neurosci* 30, 417-424.
- Barbelivien, A., Herbeaux, K., Oberling, P., Kelche, C., Galani, R., and Majchrzak, M. (2006). Environmental enrichment increases responding to contextual cues but decreases overall conditioned fear in the rat. *Behav Brain Res* 169, 231-238.
- Barros, D.M., Mello e Souza, T., De David, T., Choi, H., Aguzzoli, A., Madche, C., Ardenghi, P., Medina, J.H., and Izquierdo, I. (2001). Simultaneous modulation of retrieval by dopaminergic D(1), beta-noradrenergic, serotonergic-1A and cholinergic muscarinic receptors in cortical structures of the rat. *Behav Brain Res* 124, 1-7.
- Bats, C., Groc, L., and Choquet, D. (2007). The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking. *Neuron* 53, 719-734.
- Bielajew, C., Konkle, A.T., and Merali, Z. (2002). The effects of chronic mild stress on male Sprague-Dawley and Long Evans rats: I. Biochemical and physiological analyses. *Behav Brain Res* 136, 583-592.
- Bloomer WA, VanDongen HM, VanDongen AM (2008) Arc/Arg3.1 translation is controlled by convergent N-methyl-D-aspartate and Gs-coupled receptor signaling pathways. *J Biol Chem* 283: 582-592.

- Borta, A., Wöhr, M., and Schwarting, R.K. (2006). Rat ultrasonic vocalization in aversively motivated situations and the role of individual differences in anxiety-related behavior. *Behav Brain Res* 166, 271-280.
- Bredy, T.W., Lee, A.W., Meaney, M.J., and Brown, R.E. (2004a). Effect of neonatal handling and paternal care on offspring cognitive development in the monogamous California mouse (*Peromyscus californicus*). *Horm Behav* 46, 30-38.
- Bredy, T.W., Zhang, T.Y., Grant, R.J., Diorio, J., and Meaney, M.J. (2004b). Peripubertal environmental enrichment reverses the effects of maternal care on hippocampal development and glutamate receptor subunit expression. *Eur J Neurosci* 20, 1355-1362.
- Briggs, J.F., Fitz, K.I., and Riccio, D.C. (2007). Transfer of memory retrieval cues in rats. *Psychon Bul Rev* 14, 495-499.
- Brunet, A., Orr, S.P., Tremblay, J., Robertson, K., Nader, K., and Pitman, R.K. (2008). Effect of post-retrieval propranolol on psychophysiologic responding during subsequent script-driven traumatic imagery in post-traumatic stress disorder. *J Psychiatr Res* 42, 503-506.
- Bryant, R.A. (2007). Does dissociation further our understanding of PTSD? *J Anxiety Dis* 21, 183-191.
- Bush, D.E., Sotres-Bayon, F., and Ledoux, J.E. (2007). Individual differences in fear: isolating fear reactivity and fear recovery phenotypes. *J Traum Stress* 20, 413-422.
- Caldji, C., Tannenbaum, B., Sharma, S., Francis, D., Plotsky, P.M., and Meaney, M.J. (1998). Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 5335-5340.

- Canal, C.E., Chang, Q., and Gold, P.E. (2007). Amnesia produced by altered release of neurotransmitters after intraamygdala injections of a protein synthesis inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 12500-12505.
- Castellucci, V.F., Kennedy, T.E., Kandel, E.R., and Goelet, P. (1988). A quantitative analysis of 2-D gels identifies proteins in which labeling is increased following long-term sensitization in *Aplysia*. *Neuron* 1, 321-328.
- Chambers, R.A., Bremner, J.D., Moghaddam, B., Southwick, S.M., Charney, D.S., and Krystal, J.H. (1999). Glutamate and post-traumatic stress disorder: toward a psychobiology of dissociation. *Semin Clin Neuropsychiatry* 4, 274-281.
- Champagne, D.L., Bagot, R.C., van Hasselt, F., Ramakers, G., Meaney, M.J., de Kloet, E.R., Joels, M., and Krugers, H. (2008). Maternal care and hippocampal plasticity: evidence for experience-dependent structural plasticity, altered synaptic functioning, and differential responsiveness to glucocorticoids and stress. *J Neurosci* 28, 6037-6045.
- Charuvastra, A., and Cloitre, M. (2008). Social bonds and posttraumatic stress disorder. *Annu Rev Psychol* 59, 301-328.
- Chesler, E.J., Wilson, S.G., Lariviere, W.R., Rodriguez-Zas, S.L., and Mogil, J.S. (2002a). Identification and ranking of genetic and laboratory environment factors influencing a behavioral trait, thermal nociception, via computational analysis of a large data archive. *Neurosci Biobehav Rev* 26, 907-923.
- Chesler, E.J., Wilson, S.G., Lariviere, W.R., Rodriguez-Zas, S.L., and Mogil, J.S. (2002b). Influences of laboratory environment on behavior. *Nat Neurosci* 5, 1101-1102.

- Chetkovich, D.M., Chen, L., Stocker, T.J., Nicoll, R.A., and Brecht, D.S. (2002). Phosphorylation of the postsynaptic density-95 (PSD-95)/discs large/zona occludens-1 binding site of stargazin regulates binding to PSD-95 and synaptic targeting of AMPA receptors. *J Neurosci* 22, 5791-5796.
- Choi, J., Ko, J., Park, E., Lee, J.R., Yoon, J., Lim, S., and Kim, E. (2002). Phosphorylation of stargazin by protein kinase A regulates its interaction with PSD-95. *J Biol Chem* 277, 12359-12363.
- Colledge, M., Snyder, E.M., Crozier, R.A., Soderling, J.A., Jin, Y., Langeberg, L.K., Lu, H., Bear, M.F., and Scott, J.D. (2003). Ubiquitination regulates PSD-95 degradation and AMPA receptor surface expression. *Neuron* 40, 595-607.
- Conti, L.H., and Printz, M.P. (2003). Rat strain-dependent effects of repeated stress on the acoustic startle response. *Behav Brain Res* 144, 11-18.
- Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA (2007) Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci* 30: 464-472.
- Counts, R.M. (1990). The concept of dissociation. *J Amer Acad Psychoanal* 18, 460-479.
- Crabbe, J.C., Wahlsten, D., and Dudek, B.C. (1999). Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. *Science* 284, 1670-1672.
- Dalton GL, Wang YT, Floresco SB, Phillips AG (2008) Disruption of AMPA receptor endocytosis impairs the extinction, but not acquisition of learned fear. *Neuropsychopharmacology* 33: 2416-2426.

- Day, M., Langston, R., and Morris, R.G. (2003). Glutamate-receptor-mediated encoding and retrieval of paired-associate learning. *Nature* 424, 205-209.
- Day, M., and Morris, R.G. (2001). Memory consolidation and NMDA receptors: discrepancy between genetic and pharmacological approaches. *Science* 293, 755.
- de Lima, M.N., Laranja, D.C., Bromberg, E., Roesler, R., and Schroder, N. (2005). Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behav Brain Res* 156, 139-143.
- Debiec, J., and Ledoux, J.E. (2004). Disruption of reconsolidation but not consolidation of auditory fear conditioning by noradrenergic blockade in the amygdala. *Neuroscience* 129, 267-272.
- Debiec, J., and LeDoux, J.E. (2006). Noradrenergic signaling in the amygdala contributes to the reconsolidation of fear memory: treatment implications for PTSD. *Ann N Y Acad Sci* 1071, 521-524.
- Debiec, J., LeDoux, J.E., and Nader, K. (2002). Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron* 36, 527-538.
- Dudai, Y. (2002). Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Curr Opin Neurobiol* 12, 211-216.
- Duffy, S., Labrie, V., and Roder, J.C. (2008). D-serine augments NMDA-NR2B receptor-dependent hippocampal long-term depression and spatial reversal learning. *Neuropsychopharmacology* 33, 1004-1018.
- Ehlers, M.D. (2000). Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron* 28, 511-525.

- Ehlers, M.D., Heine, M., Groc, L., Lee, M.C., and Choquet, D. (2007). Diffusional trapping of GluR1 AMPA receptors by input-specific synaptic activity. *Neuron* 54, 447-460.
- Elias, G.M., and Nicoll, R.A. (2007). Synaptic trafficking of glutamate receptors by MAGUK scaffolding proteins. *Trends Cell Biol* 17, 343-352.
- Ellis, M.E. (1985). Amygdala norepinephrine involved in two separate long-term memory retrieval processes. *Brain Res* 342, 191-195.
- Falls, W.A., Miserendino, M.J., and Davis, M. (1992). Extinction of fear-potentiated startle: blockade by infusion of an NMDA antagonist into the amygdala. *J Neurosci* 12, 854-863.
- Faraday, M.M. (2002). Rat sex and strain differences in responses to stress. *Physiol Behav* 75, 507-522.
- Faraday, M.M., Blakeman, K.H., and Grunberg, N.E. (2005). Strain and sex alter effects of stress and nicotine on feeding, body weight, and HPA axis hormones. *Pharmacol Biochem Behav* 80, 577-589.
- Francis, D., Diorio, J., Liu, D., and Meaney, M.J. (1999). Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science* 286, 1155-1158.
- Frewen, P.A., and Lanius, R.A. (2006). Neurobiology of dissociation: unity and disunity in mind-body-brain. *Psychiatr Clin North Am* 29, 113-128, ix.
- Friedman, E.L., Yin, J.C., Landry, C.F., and Kelley, A.E. (2007). Involvement of amygdaloid protein kinase M ζ in cued conditioning. *Ann Meet Soc Neurosci* (San Diego, CA).
- Friedman, M.J. (2002). Future pharmacotherapy for post-traumatic stress disorder: prevention and treatment. *Psychiatr Clin North Am* 25, 427-441.

- Garakani, A., Mathew, S.J., and Charney, D.S. (2006). Neurobiology of anxiety disorders and implications for treatment. *Mt Sinai J Med* 73, 941-949.
- Gean, P.W., Huang, C.C., Lin, J.H., and Tsai, J.J. (1992). Sustained enhancement of NMDA receptor-mediated synaptic potential by isoproterenol in rat amygdalar slices. *Brain Res* 594, 331-334.
- Giles, J. (2005). Beta-blockers tackle memories of horror. *Nature* 436, 448-449.
- Glannon, W. (2006). Psychopharmacology and memory. *J Med Ethics* 32, 74-78.
- Goosens, K.A., Holt, W., and Maren, S. (2000). A role for amygdaloid PKA and PKC in the acquisition of long-term conditional fear memories in rats. *Behav Brain Res* 114, 145-152.
- Groc, L., and Choquet, D. (2006). AMPA and NMDA glutamate receptor trafficking: multiple roads for reaching and leaving the synapse. *Cell Tissue Res* 326, 423-438.
- Heresco-Levy, U., and Javitt, D.C. (1998). The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-mediated neurotransmission in the pathophysiology and therapeutics of psychiatric syndromes. *Eur Neuropsychopharm* 8, 141-152.
- Horne, E.A., and Dell'Acqua, M.L. (2007). Phospholipase C is required for changes in postsynaptic structure and function associated with NMDA receptor-dependent long-term depression. *J Neurosci* 27, 3523-3534.
- Hu, H., Real, E., Takamiya, K., Kang, M.G., LeDoux, J., Huganir, R.L., and Malinow, R. (2007). Emotion enhances learning via norepinephrine regulation of AMPA-receptor trafficking. *Cell* 131, 160-173.
- Huang, Y.Y., Martin, K.C., and Kandel, E.R. (2000). Both protein kinase A and mitogen-activated protein kinase are required in the amygdala for the

- macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation. *J Neurosci* 20, 6317-6325.
- Huettner, J. (2003). Spine-tingling excitement from glutamate receptors. *Science's STKE* 2003, 53pe-53.
- Humeau, Y., Reisel, D., Johnson, A.W., Borchardt, T., Jensen, V., Gebhardt, C., Bosch, V., Gass, P., Bannerman, D.M., Good, M.A., et al. (2007). A pathway-specific function for different AMPA receptor subunits in amygdala long-term potentiation and fear conditioning. *J Neurosci* 27, 10947-10956.
- Hurlemann, R. (2006). Noradrenergic control of emotion-induced amnesia and hypermnesia. *Rev Neurosci* 17, 525-532.
- Isiegas, C., Park, A., Kandel, E.R., Abel, T., and Lattal, K.M. (2006). Transgenic inhibition of neuronal protein kinase A activity facilitates fear extinction. *J Neurosci* 26, 12700-12707.
- Izumi Y, Tokuda K, Zorumski CF (2008) Long-term potentiation inhibition by low-level N-methyl-D-aspartate receptor activation involves calcineurin, nitric oxide, and p38 mitogen-activated protein kinase. *Hippocampus* 18: 258-265.
- Kim, M.J., Dunah, A.W., Wang, Y.T., and Sheng, M. (2005). Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking. *Neuron* 46, 745-760.
- Konkle, A.T., Baker, S.L., Kentner, A.C., Barbagallo, L.S., Merali, Z., and Bielajew, C. (2003). Evaluation of the effects of chronic mild stressors on hedonic and physiological responses: sex and strain compared. *Brain Res* 992, 227-238.

- Lee, S.H., Choi, J.H., Lee, N., Lee, H.R., Kim, J.I., Yu, N.K., Choi, S.L., Lee, S.H., Kim, H., and Kaang, B.K. (2008). Synaptic protein degradation underlies destabilization of retrieved fear memory. *Science* 319, 1253-1256.
- Lewejohann, L., Reinhard, C., Schrewe, A., Brandewiede, J., Haemisch, A., Görtz, N., Schachner, M., and Sachser, N. (2006). Environmental bias? Effects of housing conditions, laboratory environment and experimenter on behavioral tests. *Genes Brain Behav* 5, 64-72.
- Lewis, D.J. (1979). Psychobiology of active and inactive memory. *Psychol Bul* 86, 1054-1083.
- Malenka, R.C. (2003). Synaptic plasticity and AMPA receptor trafficking. *Ann N Y Acad Sci* 1003, 1-11.
- Man, H.Y., Sekine-Aizawa, Y., and Huganir, R.L. (2007). Regulation of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor trafficking through PKA phosphorylation of the Glu receptor 1 subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 3579-3584.
- Mao, S.C., Hsiao, Y.H., and Gean, P.W. (2006). Extinction training in conjunction with a partial agonist of the glycine site on the NMDA receptor erases memory trace. *J Neurosci* 26, 8892-8899.
- Mao, S.C., Lin, H.C., and Gean, P.W. (2008). Augmentation of fear extinction by D-cycloserine is blocked by proteasome inhibitors. *Neuropsychopharmacology* 1-11.
- Maren, S., and Quirk, G.J. (2004). Neuronal signalling of fear memory. *Nat Rev Neurosci* 5, 844-852.

- McDonald, R.J., Hong, N.S., Craig, L.A., Holahan, M.R., Louis, M., and Muller, R.U. (2005). NMDA-receptor blockade by CPP impairs post-training consolidation of a rapidly acquired spatial representation in rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 22, 1201-1213.
- McGaugh, J.L. (2004). The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci* 27, 1-28.
- McNair, K., Davies, C.H., and Cobb, S.R. (2006). Plasticity-related regulation of the hippocampal proteome. *Eur J Neurosci* 23, 575-580.
- Meaney, M.J. (2001). Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci* 24, 1161-1192.
- Meaney, M.J., Aitken, D.H., Bhatnagar, S., and Sapolsky, R.M. (1991). Postnatal handling attenuates certain neuroendocrine, anatomical, and cognitive dysfunctions associated with aging in female rats. *Neurobiol Aging* 12, 31-38.
- Meaney, M.J., Szyf, M., and Seckl, J.R. (2007). Epigenetic mechanisms of perinatal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function and health. *Trends Mol Med* 13, 269-277.
- Moita, M.A., Lamprecht, R., Nader, K., and LeDoux, J.E. (2002). A-kinase anchoring proteins in amygdala are involved in auditory fear memory. *Nat Neurosci* 5, 837-838.
- Murchison, C.F., Zhang, X.Y., Zhang, W.P., Ouyang, M., Lee, A., and Thomas, S.A. (2004). A distinct role for norepinephrine in memory retrieval. *Cell* 117, 131-143.

- Murthy, V.N., Schikorski, T., Stevens, C.F., and Zhu, Y. (2001). Inactivity produces increases in neurotransmitter release and synapse size. *Neuron* 32, 673-682.
- Nader, K. (2003). Memory traces unbound. *Trends Neurosci* 26, 65-72.
- Nijholt, I.M., Ostroveanu, A., Scheper, W.A., Penke, B., Luiten, P.G., Van der Zee, E.A., and Eisel, U.L. (2008). Inhibition of PKA anchoring to A-kinase anchoring proteins impairs consolidation and facilitates extinction of contextual fear memories. *Neurobiol Learn Mem* 90, 223-229.
- Norberg, M.M., Krystal, J.H., and Tolin, D.F. (2008). A meta-analysis of d-cycloserine and the facilitation of fear extinction and exposure therapy. *Biol Psychiatry* 63, 1118-1126.
- Orr, S.P., Metzger, L.J., and Pitman, R.K. (2002). Psychophysiology of post-traumatic stress disorder. *Psychiatr Clin North Am* 25, 271-293.
- Panatier, A., Theodosis, D.T., Mothet, J.P., Touquet, B., Pollegioni, L., Poulain, D.A., and Oliet, S.H. (2006). Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* 125, 775-784.
- Pastalkova, E., Serrano, P., Pinkhasova, D., Wallace, E., Fenton, A.A., and Sacktor, T.C. (2006). Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science* 313, 1141-1144.
- Patrick, G.N., Bingol, B., Weld, H.A., and Schuman, E.M. (2003). Ubiquitin-mediated proteasome activity is required for agonist-induced endocytosis of GluRs. *Curr Biol* 13, 2073-2081.
- Pérez-Otaño, I., and Ehlers, M.D. (2005). Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking. *Trends Neurosci* 28, 229-238.

- Perkinton, M.S., Sihra, T.S., and Williams, R.J. (1999). Ca²⁺-permeable AMPA receptors induce phosphorylation of cAMP response element-binding protein through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent stimulation of the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in neurons. *J Neurosci* 19, 5861-5874.
- Pitman, R.K., Sanders, K.M., Zusman, R.M., Healy, A.R., Cheema, F., Lasko, N.B., Cahill, L., and Orr, S.P. (2002). Pilot study of secondary prevention of posttraumatic stress disorder with propranolol. *Biol Psychiatry* 51, 189-192.
- Przybylski, J., Roulet, P., and Sara, S.J. (1999). Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: role of beta adrenergic receptors. *J Neurosci* 19, 6623-6628.
- Przybylski, J., and Sara, S.J. (1997). Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav Brain Res* 84, 241-246.
- Raman, I.M., Tong, G., and Jahr, C.E. (1996). Beta-adrenergic regulation of synaptic NMDA receptors by cAMP-dependent protein kinase. *Neuron* 16, 415-421.
- Rao, V.R., and Finkbeiner, S. (2007). NMDA and AMPA receptors: old channels, new tricks. *Trends Neurosci* 30, 284-291.
- Rao, V.R., Pintchovski, S.A., Chin, J., Peebles, C.L., Mitra, S., and Finkbeiner, S. (2006). AMPA receptors regulate transcription of the plasticity-related immediate-early gene *Arc*. *Nat Neurosci* 9, 887-895.
- Richardson, R., Ledgerwood, L., and Cranney, J. (2004). Facilitation of fear extinction by D-cycloserine: theoretical and clinical implications. *Learn Mem* 11, 510-516.

- Roche, K.W., O'Brien, R.J., Mammen, A.L., Bernhardt, J., and Huganir, R.L. (1996). Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA receptor GluR1 subunit. *Neuron* 16, 1179-1188.
- Rogan, M.T., Staubli, U.V., and LeDoux, J.E. (1997). AMPA receptor facilitation accelerates fear learning without altering the level of conditioned fear acquired. *J Neurosci* 17, 5928-5935.
- Roosendaal, B., Hui, G.K., Hui, I.R., Berlau, D.J., McGaugh, J.L., and Weinberger, N.M. (2006). Basolateral amygdala noradrenergic activity mediates corticosterone-induced enhancement of auditory fear conditioning. *Neurobiol Learn Mem* 86, 249-255.
- Rumpel, S., LeDoux, J., Zador, A., and Malinow, R. (2005). Postsynaptic receptor trafficking underlying a form of associative learning. *Science* 308, 83-88.
- Sara, S.J. (2000). Strengthening the shaky trace through retrieval. *Nat Rev Neurosci* 1, 212-213.
- Satoh, K., Takeuchi, M., Oda, Y., Deguchi-Tawarada, M., Sakamoto, Y., Matsubara, K., Nagasu, T., and Takai, Y. (2002). Identification of activity-regulated proteins in the postsynaptic density fraction. *Genes Cells* 7, 187-197.
- Schafe, G.E., and LeDoux, J.E. (2000). Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala. *J Neurosci* 20, RC96.
- Schuss, Z., Singer, A., and Holcman, D. (2007). The narrow escape problem for diffusion in cellular microdomains. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 16098-16103.

- Seckl, J.R., and Meaney, M.J. (2006). Glucocorticoid "programming" and PTSD risk. *Ann N Y Acad Sci* 1071, 351-378.
- Sheinin, A., Shavit, S., and Benveniste, M. (2001). Subunit specificity and mechanism of action of NMDA partial agonist D-cycloserine. *Neuropharmacology* 41, 151-158.
- Shema, R., Sacktor, T.C., and Dudai, Y. (2007). Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM zeta. *Science* 317, 951-953.
- Shepherd, J.D., and Huganir, R.L. (2007). The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 613-643.
- Shimizu, E., Tang, Y.P., Rampon, C., and Tsien, J.Z. (2000). NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science* 290, 1170-1174.
- Smith, K.E., Gibson, E.S., and Dell'Acqua, M.L. (2006). cAMP-dependent protein kinase postsynaptic localization regulated by NMDA receptor activation through translocation of an A-kinase anchoring protein scaffold protein. *J Neurosci* 26, 2391-2402.
- Snyder, E.M., Colledge, M., Crozier, R.A., Chen, W.S., Scott, J.D., and Bear, M.F. (2005). Role for A kinase-anchoring proteins (AKAPS) in glutamate receptor trafficking and long term synaptic depression. *J Biol Chem* 280, 16962-16968.
- Sotres-Bayon, F., Bush, D.E., and LeDoux, J.E. (2007). Acquisition of fear extinction requires activation of NR2B-containing NMDA receptors in the lateral amygdala. *Neuropsychopharmacology* 32, 1929-1940.

- Southwick, S.M., Paige, S., Morgan, C.A., Bremner, J.D., Krystal, J.H., and Charney, D.S. (1999). Neurotransmitter alterations in PTSD: catecholamines and serotonin. *Sem Clin Neuropsychiat* 4, 242-248.
- Spiegel, D. (1997). Trauma, dissociation, and memory. *Ann N Y Acad Sci* 821, 225-237.
- Stickgold, R., and Walker, M.P. (2005). Memory consolidation and reconsolidation: what is the role of sleep? *Trends Neurosci* 28, 408-415.
- Sutherland, G.R., and McNaughton, B. (2000). Memory trace reactivation in hippocampal and neocortical neuronal ensembles. *Curr Opin Neurobiol* 10, 180-186.
- Sutton, M.A., Ito, H.T., Cressy, P., Kempf, C., Woo, J.C., and Schuman, E.M. (2006). Miniature neurotransmission stabilizes synaptic function via tonic suppression of local dendritic protein synthesis. *Cell* 125, 785-799.
- Sutton, M.A., and Schuman, E.M. (2006). Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory. *Cell* 127, 49-58.
- Sutton, M.A., Wall, N.R., Aakalu, G.N., and Schuman, E.M. (2004). Regulation of dendritic protein synthesis by miniature synaptic events. *Science* 304, 1979-1983.
- Suzuki, A., Josselyn, S.A., Frankland, P.W., Masushige, S., Silva, A.J., and Kida, S. (2004). Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci* 24, 4787-4795.
- Tang, Y.P., Shimizu, E., Dube, G.R., Rampon, C., Kerchner, G.A., Zhuo, M., Liu, G., and Tsien, J.Z. (1999). Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 401, 63-69.

- Tang, Y.P., Wang, H., Feng, R., Kyin, M., and Tsien, J.Z. (2001). Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology* 41, 779-790.
- Törocsik, B., and Szeberényi, J. (2000). Anisomycin uses multiple mechanisms to stimulate mitogen-activated protein kinases and gene expression and to inhibit neuronal differentiation in PC12 pheochromocytoma cells. *Eur J Neurosci* 12, 527-532.
- Tronson, N.C., Wiseman, S.L., Olausson, P., and Taylor, J.R. (2006). Bidirectional behavioral plasticity of memory reconsolidation depends on amygdalar protein kinase A. *Nat Neurosci* 9, 167-169.
- van der Hart, O., Nijenhuis, E.R., and Steele, K. (2005). Dissociation: An insufficiently recognized major feature of complex posttraumatic stress disorder. *J Traum Stress* 18, 413-423.
- Vanhooose, A.M., Clements, J.M., and Winder, D.G. (2006). Novel blockade of protein kinase A-mediated phosphorylation of AMPA receptors. *J Neurosci* 26, 1138-1145.
- Vanhooose, A.M., and Winder, D.G. (2003). NMDA and beta1-adrenergic receptors differentially signal phosphorylation of glutamate receptor type 1 in area CA1 of hippocampus. *J Neurosci* 23, 5827-5834.
- Woodcock, E.A., and Richardson, R. (2000). Effects of multisensory environmental stimulation on contextual conditioning in the developing rat. *Neurobiol Learn Mem* 74, 89-104.
- Xiong, W., Kojic, L.Z., Zhang, L., Prasad, S.S., Douglas, R., Wang, Y., and Cynader, M.S. (2006). Anisomycin activates p38 MAP kinase to induce LTD in mouse primary visual cortex. *Brain Res* 1085, 68-76.

- Yeh, S.H., Mao, S.C., Lin, H.C., and Gean, P.W. (2006). Synaptic expression of glutamate receptor after encoding of fear memory in the rat amygdala. *Mol Pharmacol* 69, 299-308.
- Yehuda, R., and LeDoux, J. (2007). Response variation following trauma: a translational neuroscience approach to understanding PTSD. *Neuron* 56, 19-32.
- Zhang, W.P., Guzowski, J.F., and Thomas, S.A. (2005). Mapping neuronal activation and the influence of adrenergic signaling during contextual memory retrieval. *Learn Mem* 12, 239-247.
- Ziff, E.B. (2007). TARPs and the AMPA receptor trafficking paradox. *Neuron* 53, 627-633.
- Zinebi, F., Xie, J., Liu, J., Russell, R.T., Gallagher, J.P., McKernan, M.G., and Shinnick-Gallagher, P. (2003). NMDA currents and receptor protein are downregulated in the amygdala during maintenance of fear memory. *J Neurosci* 23, 10283-10291.
- Zushida, K., Sakurai, M., Wada, K., and Sekiguchi, M. (2007). Facilitation of extinction learning for contextual fear memory by PEPA: a potentiator of AMPA receptors. *J Neurosci* 27, 158-166.