

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX 2

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES, TECHNOLOGIE, SANTE
SPÉCIALITÉ NEUROSCIENCES

Par Alice Shaam AL ABED

**IMPACT DIFFERENTIEL DE L'ŒSTRADIOL SUR LA
FONCTION MNESIQUE SELON L'ÂGE ET LE TYPE DE
MEMOIRE**

Sous la direction de : Catherine BENNETAU-PELISSERO

Soutenue le 20 Décembre 2013

Membres du jury :

Mr Jacques MICHEAU (Pr, CNRS UMR 5287)	Président
Mr Bernard FRANCES (Pr, CNRS UMR 5169)	Rapporteur
Mr Gaël MALLERET (CR, CNRS UMR 5292)	Rapporteur
Mme Nicole EL-MASSIOUI (CR, CNRS 8195)	Examineur
Mme Aline MARIGHETTO (CR, INSERM U862)	Examineur
Mme Catherine BENNETAU (Pr, INSERM U862)	Directeur de thèse

AVANT-PROPOS

Le travail de recherche présenté dans cette thèse a été effectué au sein du NeuroCentre Magendie (INSERM U862) pour être présenté à et en vue de l'obtention d'un Doctorat de l'Université de Bordeaux 2. La direction scientifique a été effectuée par les Drs Catherine BENNETAU-PELISSERO (Pr) et Aline MARIGHETTO (CR). L'ensemble de ces études fait l'objet d'une publication en préparation, de quatre communications affichées et de trois communications orales.

▪ Publication en préparation

Al Abed S, Sellami A, Brayda-Bruno L, Lamothe V, Nogues X, Bennetau C, Potier M, Marighetto
Too Much Memory Is Not Good For Memory: the Case of Estradiol

▪ Communications affichées

Al Abed, S; Sellami, A; Brayda-Bruno, L; Lamothe, V; Potier-Georges, M; Bennetau, C; Noguès, X; Marighetto, A. **Fos imaging of age-dependent effect of estradiol on working memory.** 11th Meeting of French Society for Neuroscience, May 2013 Lyon, France.

Brayda-Bruno, L; Al Abed, S; Lamothe, V; Potier-Georges, M; Bonnet, C; Bennetau, C; Marighetto, A. **Estradiol effect on trace fear conditioning.** 3rd symposium of NeuroCenter Magendie, September 2012, Bordeaux, France.

Al Abed S., Potier M., Brayda-Bruno L., Lamothe V., Bennetau-Pelissero C., Marighetto A. **Estrogens in aging-related impairments of memory function.** 4th symposium of GDR 2905 NeuroMem, March 2012, Cargèse, France.

Al Abed S., Potier M., Brayda-Bruno L., Lamothe V., Bennetau-Pelissero C., Marighetto A. **Estrogens in aging-related impairments of memory function.** 4th FINNePS symposium, March 2012, Aussois, France.

▪ Communications orales

Fos imaging of age-dependent effect of estradiol on working memory. Hottopic, NeuroCenter Magendie, April 2013

Differential effects of estradiol on long term and short term memories. Data Blitz, 4th symposium of GDR 2905 NeuroMem, March 2012, Cargèse, France.

Estrogens in aging-related impairments of memory function. Hottopic, NeuroCenter Magendie, October 2011

REMERCIEMENTS

Je pensais en avoir fini avec le syndrome de la page blanche et voilà que la traditionnelle partie des remerciements se rappelle à moi. Ces 3 années auront été certainement les plus formatrices qui soient. Tant professionnellement que personnellement. 3 années qui resteront particulières à beaucoup d'égards.

Tout d'abord, un mot pour mes parents, qui m'ont supportée pendant ces 3 années dans tous les sens du terme ! Même si vous avez tendance à penser qu'on ne le sait pas, vous êtes les meilleurs parents du monde. Promis, un jour je couperai le cordon (signé Tanguette). Et puisque je ne gagnerai probablement jamais d'Oscar, alors Papa, je te remercie pour ton chromosome X, parce que j'aurais détesté être un garçon ! [Voilà Lamia, chose promise chose due!]. Alors mes chers parents, merci. Merci pour la vie, merci pour les qualités de cœur, l'ouverture d'esprit, la force, les rires, les bêtises, la Syrie, Teillots et tout ce que j'oublie. Je vous aime plus que je ne saurais l'exprimer.

Mon cher grand-père et cet amour retrouvé. Mon havre de paix c'est Condat et c'est grâce à toi.

Ma grande sœur, la source de toutes mes inspirations. Celle qui m'a tout inculqué et grâce à qui j'ai suivi cette voie. Tu es celle qui incarne l'originalité et qui me permet de ne jamais tomber dans la normalité. [Merci de m'avoir empêchée d'écouter la musique pourrie des années 90 !]

Mon grand frère. Que dire ? J'ai encore du mal à exprimer l'émotion que m'a procuré le regard que tu as posé sur moi à partir du 20 décembre 2013. Du bonheur de t'avoir trouvé, l'admiration pour toutes les qualités que tu as.

Merci à vous tous, vous avez fait ce que je suis, vous êtes mes piliers.

Hamid, merci d'avoir été là dans jusqu'au bout, dans les moments importants ; il n'y a que ça qui compte et j'espère que l'on se soutiendra pendant des décennies <3.

Frédoue, tu sais que je ne serais rien sans toi. Je n'aurais jamais tenu sans les fous-rires, les jager-bombs, les discussions couchées sur le tapis rouge, les abris-bus, les pâtes au fromage, les wombats, les soupes chinoises, les bouts de vie sur les dessus de verre et les ola dans les amphis. Je n'ai pas de mots suffisamment intenses pour exprimer ce que je ressens pour toi. Tellement heureuse que la vie nous ait à nouveau réunies.

Christelle, je culpabilise encore de t'avoir fait peur ! Merci de m'avoir laissé une seconde chance, d'avoir ce soleil dans tes yeux, cette douceur de chaque instant et ton humour. Merci de m'avoir laissée pleurer dans tes bras ! Je ne désespère pas qu'on soit un jour roommates dans une beach

house @ LA. Peut-être qu'on y fera des neurosciences (promis je m'occuperai des sacrifices), ou une ligne de vêtements ou du typex pour french manucure. I love you more than the centripetal force!

Laura ! Loloooo, merci pour ton rire, pour tes accents, tes coupes de cheveux, ton aide dans les derniers moments et ton inconditionnelle gentillesse.

Azza. Maitre-fouetteur (se). Vidéos improbables que toi seule peut connaître. Dès que je m'énerve dans une conversation, je t'entends me dire « mais pourquoi tu t'énerves ? » ahah ! Vraiment merci merci merci de toute l'aide que tu m'as apporté dans cette dernière année ! Je n'aurais jamais pu le faire sans toi. Merci pour ton rire, Merci pour tout !

Mylène, Laurent et Val, merci pour tout ce que vous m'avez appris. Promis j'essaierai d'être moins bordélique (je sais, ça va être dur !). Val, ton langage fleuri ; Laurent, ton flegme à tout épreuve ; Mylène, tes phrases cultes (quelle est la question ? Le mieux et l'ennemi du bien -- phrase à la laquelle je pense en mettant mon eyeliner le matin !!). Merci encore à vous trois de toute l'aide que vous m'avez apporté durant ces 3 années.

Cathy, merci de m'avoir choisie comme étudiante, cela fut sans conteste le début d'une aventure. Mon parcours sera à jamais conditionné par ces 3 années.

Aline, il est difficile de résumer en quelque ligne ce que je voudrais vous dire. Merci pour les dimanches au radial, les apéros de fins de journées éprouvantes, les discussions scientifiques ou pas, le vin de glace, votre accueil, vos qualités de cœur et votre soutien à toute épreuve. Merci Merci Merci.

Merci également aux autres membres de l'équipe, Aline D, Xavier, Nicole (si si Nicole tu fais partie de l'équipe !), pour les discussions, votre disponibilité, votre gentillesse et vos conseils. Vous avez définitivement rendu cette expérience encore plus enrichissante !

Enfin, merci aux membres du jury, Bernard, Gaël, Nicole et Jacques, de m'avoir accompagnée dans cette dernière étape. Je serai éternellement reconnaissante de votre regard bienveillant au début de ma soutenance qui a permis de diminuer la peur que je ressentais. Vous avez fait que cette soutenance est finalement un bon souvenir (ce qui était loin d'être acquis). Merci encore, j'espère que nos interactions se poursuivront tout au long de mon parcours.

Une dernière fois, merci à vous tous de m'avoir accompagnée dans les meilleurs moments comme dans les pires. Je n'aurais jamais pu survivre à cette thèse sans vous et je vous en serai toujours reconnaissante.

RÉSUMÉ

L'œstradiol (E2) représente une cible thérapeutique potentielle contre le déclin de la mémoire associé au vieillissement. En effet, l'E2 favorise des mécanismes de plasticité synaptique, altérés par le vieillissement, censés sous-tendre la rétention mnésique (LTP) alors qu'il s'oppose à un mécanisme potentiel de l'oubli (LTD). Cependant, la littérature, principalement basée sur les effets de suppléments en E2 chez la femme ménopausée ou chez la femelle jeune ovariectomisée, révèle un tableau plus complexe, qui invite à reconsidérer les relations entre E2 et mémoire. Dans ce contexte, le but de mon travail de thèse était d'améliorer notre compréhension des effets mnésiques d'une supplémentation en E2. L'existence d'une production d'E2 chez le mâle, possiblement diminuée par l'âge comme chez la femelle, pose la question, peu abordée jusqu'ici, de l'intérêt d'une supplémentation contre le vieillissement mnésique chez le mâle. Partant de là et de l'hypothèse générale que l'effet mnésique d'une supplémentation en E2 devrait être dépendant 1/du niveau d'E2 endogène, lui-même lié à l'âge du sujet, et 2/du type de mémoire considéré, nous avons étudié, chez la souris mâle, jeune et âgée, les effets d'une exposition chronique par l'eau de boisson. Nous avons combiné l'approche comportementale, en ciblant les formes de mémoire les plus dégradées par le vieillissement, à des analyses neurobiologiques, en ciblant 1/le niveau des systèmes (imagerie Fos des structures cérébrales activées par la tâche mnésique et de leur connectivité fonctionnelle) et 2/ le niveau cellulaire/moléculaire (densité et morphologie des épines, ARNm des récepteurs à l'E2, et expression de protéines synaptiques).

Nos résultats comportementaux montrent que l'E2 prolonge la rétention mnésique mais que selon l'âge du sujet et la forme de mémoire mise en jeu par la tâche, cet effet « promnésiant » ne se traduit pas forcément par une amélioration de la performance. Le 1^{er} chapitre, consacré au modèle âgé, montre que la supplémentation réduit les déficits de la mémoire à long-terme dite « déclarative/relationnelle » et « hippocampe-dépendante » en améliorant la capacité à relier des événements séparés dans le temps. En revanche, cette supplémentation reste sans effet sur le déficit sévère observé dans une tâche de mémoire à court-terme/de travail qui sollicite non seulement la rétention, mais aussi la gestion des interférences. Au plan neurobiologique, la supplémentation a des effets bénéfiques sur le champ CA1 hippocampique : elle restaure son « activabilité » par l'apprentissage et restaure un profil plus dynamique de la morphologie des épines dendritiques. Toutefois, elle ne normalise pas la connectivité fonctionnelle entre structures qui caractérise la mise en jeu d'une forme de mémoire donnée.

Le 2^{ème} chapitre, consacré au modèle jeune, montre qu'une exposition chronique à l'E2 peut avoir des effets délétères sur la fonction mnésique normale. En effet, si un prolongement de la rétention mnésique peut avoir des effets bénéfiques sur la mémoire à long-terme, il peut paradoxalement s'avérer dommageable sur la mémoire à court-terme/de travail en aggravant les effets d'interférence. Précisément, l'E2 améliore la capacité de relier des événements distants et permet ainsi la formation d'une *mémoire à long-terme relationnelle* pour un éloignement temporel des événements qui empêche normalement la formation de cette mémoire. Dans la tâche de mémoire à court-terme, en augmentant la durée de rétention mnésique des informations successives, l'E2 provoque une surcharge mnésique et une dégradation due aux interférences de la performance. Cet effet s'accompagne d'une altération fonctionnelle centrée sur le gyrus denté hippocampique.

Notre travail confirme l'intérêt thérapeutique de l'E2 dans le contexte du vieillissement mnésique et permet d'en préciser les limites. En montrant l'effet mnésique paradoxal d'une exposition chronique à l'E2 sur le modèle jeune, ce travail invite aussi à considérer davantage les conséquences d'une exposition croissante aux composés œstrogénique de l'environnement sur la santé publique.

ABSTRACT

Estradiol (E2) is a potential therapeutic target against age-related memory decline. Indeed, E2 promotes synaptic plasticity processes impaired in aging and thought to underlie mnemonic retention (LTP), but prevents a potential forgetting mechanism (LTD). However, the literature, mainly based on effects of supplementation of E2 in post-menopausal women or in ovariectomized young females, reveals a much more complex picture, leading to reconsider the relationships between E2 and memory. In this context, the aim of my PhD work was to improve our understanding of the mnemonic effects of a supplementation of E2. The discovery of an E2 production in males, potentially decreasing in aging just as in females, questions the interest of an E2 supplementation against memory aging in males. Starting from there and the general hypothesis that the mnemonic effect of an E2 supplementation should depend 1/ on endogenous level of E2, depending itself on the age of the subject, and 2/ on the type of memory studied, we investigated the effects of a chronic E2 exposure in drinking water. We combined a behavioral approach, targeting the most vulnerable-to-aging memories, with neurobiological analyses, studying 1/ the structural level (Fos imaging of cerebral structures activated by the memory task and their functional connectivity) and 2/ the molecular/cellular level (morphology and dendritic spine density, estrogens receptor mRNA and two synaptic protein expression).

Our behavioral results show that E2 prolongs mnemonic retention but, in accordance with our hypotheses, but depending on the age of the subject and the type of memory involved in the task, this promnesic effect does not necessarily induce an improved performance. The first chapter, dedicated to aged animals, shows that the E2 supplementation reduces hippocampal-dependent memory deficits called declarative memory, by improving the capacity to link temporally distant event. However, the supplementation had no effect on the severe deficits of short-term/working memory which solicits not only retention but also the organization of learned information and forgetting to avoid interference. At the neurobiological level, E2 demonstrated beneficial effects on the CA1 hippocampal subfield. Namely, E2 restored its learning-induced activability (Fos activation) as well as a more dynamic profile of dendritic spine morphology. However, E2 did not re-established normal activity levels (younger) either in the hippocampus or in the other studied structures. E2 also did not normalize functional connectivity between the structures involved in the formation of a given memory.

The second chapter, dedicated to young animals, demonstrated that a chronic exposition to E2 can induce deleterious effects on regular mnemonic function. Indeed, if the prolongation of mnemonic retention can have beneficial effects on long-term memory, it could paradoxically be deleterious on working memory by aggravating interference effects. Precisely, E2 improves the capacity to temporally link distant events, hence allows the formation of a *relational long-term memory* in conditions normally avoiding such formation. In the short-term memory task, by increasing retention duration of successive information, E2 induces a mnemonic overload and degradation of performance caused by interference. This effect was associated with a functional alteration centered on dentate gyrus.

Our work confirms the therapeutic interest of E2 in the context of mnemonic aging and allows pinpointing its limits. By showing the paradoxical mnemonic effect of a chronic E2 exposition on the young model, this work also invites to carefully consider the consequences of a growing exposition to environmental estrogenic compounds on public health.

SOMMAIRE

REVUE DE LITTERATURE **18**

I. ŒSTRADIOL ET MECANISMES CEREBRAUX **20**

A. ŒSTRADIOL : DESCRIPTION, PRODUCTION, RECEPTEURS **20**

1. DEFINITION **20**
2. SYNTHÈSE DE L'ŒSTRADIOL **20**
3. RECEPTEURS AUX ŒSTROGENES **24**

B. ŒSTRADIOL ET PLASTICITE SYNAPTIQUE **33**

1. TRANSMISSION SYNAPTIQUE DANS UNE SYNAPSE GLUTAMATERGIQUE **34**
2. PLASTICITE SYNAPTIQUE **39**
3. INFLUENCE DE L'ŒSTRADIOL SUR LA PLASTICITE SYNAPTIQUE **47**
4. MECANISMES MNESQUES ALTERES PAR LE VIEILLISSEMENT **51**

II. ŒSTRADIOL ET MEMOIRE **56**

A. LA MEMOIRE EST UNE FONCTION POLYMORPHE : LES DIFFERENTS TYPES DE MEMOIRES **56**

1. SYSTEMES DE MEMOIRES **56**
2. EFFET DU VIEILLISSEMENT SUR LA FONCTION MNESIQUE ET ALTERATIONS SYSTEMIQUES ASSOCIEES. **62**

B. EFFETS DE L'ŒSTRADIOL SUR LA FONCTION MNESIQUE **65**

1. DONNEES CHEZ L'ANIMAL **65**
2. DONNEES CHEZ L'HUMAIN **67**

PROBLEMATIQUE **74**

I. PRINCIPAUX OBSTACLES A LA COMPREHENSION DES EFFETS D'UNE SUPPLEMENTATION EN E2 **77**

A. LES MODELES D'ETUDE **77**

B. LES DIFFERENTES FORMES DE MEMOIRE **78**

C. LES DIFFERENTS NIVEAUX D'ANALYSE NEUROBIOLOGIQUE	80
---	----

II. HYPOTHESES GENERALES SUR LES EFFETS DE L'E2 ET PLAN DES EXPERIENCES

81

CHAPTER 1: IMPACT OF ESTRADIOL ON AGE-RELATED DEFICITS OF MEMORY

86

I. BEHAVIORAL EFFECTS

88

A. EFFECT OF ESTRADIOL ON LONG-TERM MEMORY/DECLARATIVE MEMORY

88

1. THE MODEL OF PREFERENTIAL DECLINE IN DECLARATIVE MEMORY IN AGED MICE 88
2. DOSE-RELATED EFFECTS OF ESTRADIOL 93
3. E2 IMPROVES THE AGING-RELATED DECLINE IN TEMPORAL BINDING 99
4. CONCLUSIONS RELATIVE TO LONG-TERM MEMORY 103

B. SHORT-TERM/WORKING MEMORY

103

1. THE MODEL OF AGING-RELATED DEGRADATION IN SHORT-TERM/WORKING MEMORY (WM) IN MICE 104
2. E2 HAS NO EFFECT AGAINST THE AGE-RELATED DEFICIT IN WM 108

II. NEUROBIOLOGICAL EFFECTS OF E2 SUPPLEMENTATION IN AGED MICE

111

A. FOS IMAGING OF E2 EFFECTS AT THE SYSTEM LEVEL

111

1. INTRODUCTION 111
2. PROTOCOL 113
3. RESULTS 114
4. CONCLUSIONS ON THE SYSTEM LEVEL 120

B. EFFECTS OF E2 SUPPLEMENTATION ON THE AGED HIPPOCAMPUS: CA1 DENDRITIC SPINE DENSITY AND MORPHOLOGY

121

III. DISSECTING THE MECHANISMS: WHICH ER MEDIATES THE EFFECTS OF E2 ON THE AGE-RELATED DEFICIT OF DECLARATIVE MEMORY?

122

A. BEHAVIORAL RESULTS

122

B. mRNA EXPRESSION OF ERS	124
C. EFFECTS OF E2 AND THE AGONISTS ON THE EXPRESSION OF KEY PLASTICITY PROTEINS	125
<u>IV. DISCUSSION</u>	<u>127</u>
<u>V. MATERIAL AND METHODS</u>	<u>135</u>
<u>CHAPTER 2: TOO MUCH MEMORY IS NOT GOOD FOR MEMORY: THE CASE OF ESTRADIOL</u>	<u>148</u>
<u>DISCUSSION GENERALE</u>	<u>180</u>
<u>I. L'E2 PROLONGE LA RETENTION MNESIQUE CE QUI N'EST PAS TOUJOURS BENEFIQUE A LA MEMOIRE</u>	<u>182</u>
<u>II. EFFETS MNESIQUES ET EFFETS SUR LA PLASTICITE SYNAPTIQUE</u>	<u>184</u>
<u>III. LES EFFETS NEUROBIOLOGIQUES OBSERVES DE LA SUPPLEMENTATION EN E2</u>	<u>185</u>
<u>IV. HYPOTHESES SUR LE MECANISME D'ACTION DE L'E2 SUR LA FONCTION MNESIQUE</u>	<u>187</u>
<u>REFERENCES</u>	<u>192</u>

Au-delà de leurs effets sur les fonctions de reproduction, il est maintenant connu que les œstrogènes, dont le plus puissant est l'œstradiol (E2), affectent également la fonction mnésique. Chez la femme, l'arrêt progressif de la production des hormones sexuelles au cours de la ménopause a été associé au déclin mnésique lié à l'âge. Cette découverte a donné lieu au développement de traitements hormonaux substitutifs principalement composés d'œstrogènes. Cependant, leur efficacité sur le déclin mnésique lié à l'âge, bien que prometteuse, reste controversée. En effet, si les effets bénéfiques des traitements de substitution sur les troubles et les pathologies de la ménopause sont avérés, ceux sur le déclin mnésique lié au vieillissement restent à éclaircir.

Etant donné que la population âgée, à la fois dans les pays développés et en voie de développement, ne cesse de croître, il devient urgent de développer des stratégies thérapeutiques afin de limiter le déclin mnésique lié à l'âge. A cet effet, les phyto-œstrogènes seraient de bons candidats. En effet, ces substances, contenues dans les plantes, sont très diverses et présentent des homologies de structures avec les œstrogènes. Ainsi, il existe potentiellement dans la nature des phyto-œstrogènes reproduisant les effets bénéfiques des œstrogènes sans exercer les effets négatifs tels que la prolifération de cellules cancéreuses mammaires et l'altération de la sphère cardio-vasculaire.

En revanche, il existe, dans les pays développés, une augmentation de la consommation de phyto-œstrogènes via notamment le soja. Les perturbations que peuvent entraîner cette surconsommation sont largement négligées. Etant donné qu'un nombre croissant d'études montre que les hormones sexuelles joueraient un rôle dans la mémoire de l'adulte y compris chez les hommes, une surconsommation de phyto-œstrogènes chez des sujets jeunes, qui ne présentent pas de déficit de mémoire, pourrait déréguler la fonction mnésique.

Ce travail de thèse se propose de comprendre, chez des souris mâles jeunes et âgées, les effets d'une supplémentation nutritionnelle en E2 sur la fonction mnésique afin 1/d'envisager, dans le futur, des pistes thérapeutiques de lutte contre le déclin mnésique lié à l'âge et 2/ de mettre en garde contre un éventuel effet délétère des œstrogènes ingérés en excès à l'âge adulte.

Avant de détailler les objectifs spécifiques de recherche, nous tenterons dans la revue de littérature de ce manuscrit de présenter les éléments bibliographiques principaux qui, de près ou de loin, ont fondé ce travail de thèse.

La première partie porte sur la description de l'E2 et des mécanismes de base de la fonction mnésique qu'il affecte à savoir la plasticité synaptique. Il s'agit là de présenter les cibles de l'E2 permettant de mieux comprendre les effets de l'E2 sur la mémoire. La seconde partie concerne les relations entre E2, mécanismes psychologiques de la mémoire et vieillissement mnésique. Nous tenterons de détailler les divers effets de l'E2 sur cette fonction complexe qu'est la mémoire, en considérant à la fois les travaux faits chez l'animal mais aussi chez l'humain. Les données de l'imagerie fonctionnelle chez l'Homme y seront également considérées, notre objectif de recherche se situant aussi à l'échelle systémique, peu considérée chez l'animal jusqu'ici.

Revue de littérature

I. ŒSTRADIOL ET MECANISMES CEREBRAUX

Dans les tissus des mammifères, les œstrogènes exercent des effets biologiques essentiels à la manifestation d'un grand nombre de processus physiologiques. Ces effets sont véhiculés par des récepteurs spécifiques, membranaires ou nucléaires, exprimés au niveau de nombreux tissus cibles, notamment au niveau du cerveau. D'autre part, même si l'action des œstrogènes est principalement associée à la reproduction, leur influence dans la plasticité synaptique a également été établie.

A. Œstradiol : Description, Production, Récepteurs

1. Définition

Les œstrogènes sont des hormones stéroïdes principalement synthétisées dans les ovaires et les testicules mais aussi dans d'autres tissus ; au niveau périphérique comme les glandes surrénales ou le tissu adipeux et au niveau central. La classe des œstrogènes comprend trois membres majeurs : l'œstrone (E1), le 17β -œstradiol (œstradiol ou E2) et l'œstriol (E3) ; parmi ceux-ci, l'E2 (Figure 1) est le plus puissant et également l'hormone prédominante au niveau périphérique chez la femme pré-ménopausée.

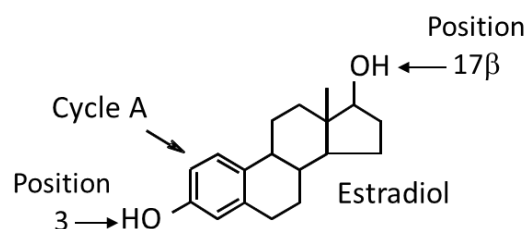


Figure 1 : Structure de l'œstradiol

2. Synthèse de l'œstradiol

a) *Au niveau périphérique*

les cellules endocrines gonadotropes de l'adénohypophyse : la FSH (Folliculo Stimulating Hormone) et la LH (Luteinizing Hormone). La FSH et la LH, stimulent l'ovaire ; mobilisent les réserves en cholestérol, induisent l'expression des enzymes nécessaires à la production d'œstrogènes, augmentent la synthèse de testostérone et facilitent l'aromatisation de la testostérone en E2 dans les cellules de la granulosa. Les œstrogènes dont l'E2, véhiculés par la circulation sanguine, agissent au niveau de divers organes cibles, notamment ceux impliqués dans la fonction de reproduction. De plus, comme tout stéroïde, les œstrogènes contrôlent leur propre synthèse, en agissant de façon rétroactive au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse (Leung & Armstrong 1980).

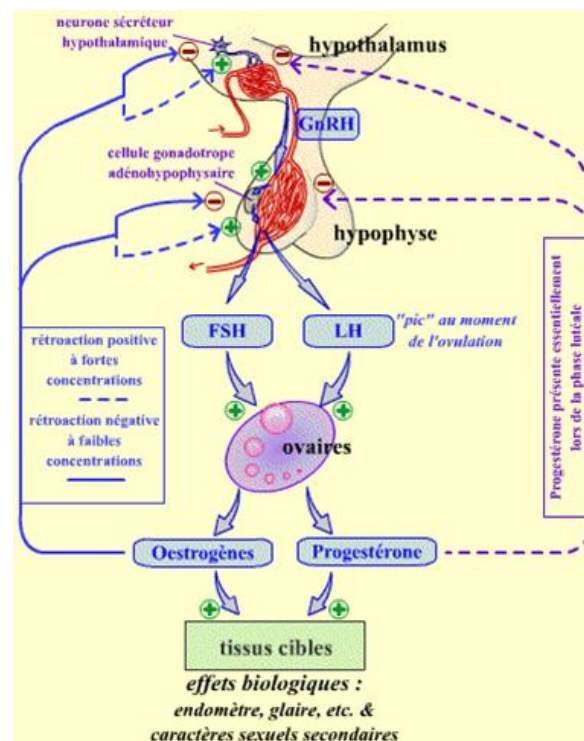


Figure 3 : Schéma du contrôle de la sécrétion d'œstradiol et de la progestérone sous l'effet du contrôle hypothalamo-hypophysaire_d'après Furelaud et Calvino snv.jussieu.fr
Voir texte pour détails

Chez la femme pré-ménopausée, les concentrations circulantes d'E2 varient en fonction du cycle ovarien, d'environ 0,36 nM pendant la phase folliculaire jusqu'à 2,80 nM au moment de l'ovulation. Lors d'une grossesse, la concentration d'E2 peut atteindre 70 nM, grâce à la production placentaire. Après la ménopause, ces concentrations chutent pour atteindre des

concentrations équivalentes à celles trouvées chez l'homme, de l'ordre de 0,04 à 0,21 nM (Table 1, Chambliss & Shaul 2002).

Chez les rongeurs, au cours du cycle ovarien ou œstrien, qui dure de 4 à 6 jours, la concentration en E2 augmente jusqu'à la phase de proestrus puis chute abruptement. Le jour suivant, pendant la phase d'œstrus, la concentration en E2 circulant est très basse. Les niveaux remontent progressivement jusqu'au proestrus du cycle suivant (Evans & Long 1922).

Table 1 : Taux circulant en œstradiol

Sexe	Stade	Concentration Œstradiol pg/mL	Concentration Œstradiol nM/mL
Femme	Metestrus	10 to 20 pg/mL	36 to 72 pM
	Proestrus	500 to 600 pg/mL	2 to 4 nM
	Gestation	> 30 ng/mL	> 110 nM
	Ménopause	< 40 pg /mL	< 200 pM
Homme		< 50 pg/mL	< 200 pM

b) *Au niveau central*

L'E2 étant une hormone lipophile, capable de franchir la barrière hémato encéphalique, l'existence d'une synthèse centrale d'E2 a longtemps été ignorée. La découverte de la stéroïdogénèse centrale provient surtout de la mise en évidence de la présence d'enzymes de production des neurostéroïdes dans les neurones (Hojo et al. 2008; Azcoitia et al. 2011) mais également dans les astrocytes. Contrairement à l'E2 produit par les ovaires, qui est majoritairement relargué dans la circulation sanguine, celui synthétisé au niveau central agit principalement localement, de manière paracrine ou intracrine. Ainsi, on distingue les neurostéroïdes, hormones produites par le cerveau, des stéroïdes neuroactifs, qui sont produits en périphérie mais exerce une action sur les structures cérébrales. La synthèse centrale d'E2 ne concerne pas uniquement les aires impliquées dans la reproduction, elle est également

active dans d'autres territoires cérébraux dont l'hippocampe. Il est également important de noter que celle-ci existe à la fois chez les femelles et chez les mâles, qui expriment tous deux les enzymes nécessaires à la synthèse d'E2 et notamment l'aromatase. Plutôt qu'influencée par les gonades, la production centrale d'E2 est dépendante de l'activité neuronale (Mukai et al. 2010; Mukai et al. 2007).

Très récemment, une technique de spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase liquide a été développée afin de mesurer les concentrations en hormones stéroïdes dans le cerveau. Ces études montrent que chez la femelle, les taux hippocampiques seraient corrélés avec les taux circulants. Chez les mâles, les taux hippocampiques seraient supérieurs aux taux circulants et supérieurs à ceux des femelles (Hojo et al. 2009).

Les œstrogènes ont de nombreuses cibles. De par leur caractère lipophile, ils peuvent traverser la membrane plasmique et se lier spécifiquement à des protéines membranaires ou intracellulaires, provoquant ainsi une réponse œstrogène-dépendante. Dans de nombreux cas, cette réponse nécessite une liaison avec des protéines particulières, les Récepteurs aux Œstrogènes (ER).

3. Récepteurs aux œstrogènes

a) *Présentation générale*

Il existe plusieurs sous-types d'ER. Historiquement, il a d'abord été découvert deux protéines, capable de lier spécifiquement l'E2 : ER α (Toft & Gorski 1966) et, bien plus tard, ER β (Kuiper et al. 1996). Ces ER dits « classiques » appartiennent à la super famille des récepteurs nucléaires, à laquelle est rattachée une très large variété de facteurs de transcription ligand-dépendants tels que le récepteur à la progestérone, aux androgènes, aux hormones thyroïdiennes, aux minéralocorticoïdes, aux glucocorticoïdes ou encore à l'acide rétinoïque (Committee 1999; Germain et al. 2006).

ER α et ER β présentent une forte homologie de séquence et une structure conservée qui comprend : un domaine N-terminal A/B responsable de la fonction de trans-activation (AF1) ; un domaine C, constitué de deux structures en doigts de zinc qui se lient à l'ADN ; un domaine D, région charnière qui permet la translocation du récepteur vers le noyau ; enfin un domaine E/F qui permet la liaison avec le ligand ainsi qu'une région de régulation de la transcription (AF2). Les deux isoformes, malgré le peu de similitudes qui existent entre leur domaine E/F, lient l'E2 avec une affinité similaire. Ces récepteurs sous-tendraient préférentiellement la voie de signalisation génomique (lente) liée à l'E2. Plus tard, il a été montré que les deux sous types d'ER pouvaient également être palmitoylés afin d'être ancrés à la membrane plasmique (Levin 2005; Milner et al. 2001). Ces récepteurs membranaires (mER) s'associent avec des récepteurs aux facteurs de croissance ou des récepteurs couplés à des protéines G pour activer des cascades de kinases (Spencer-Segal et al. 2012).

L'E2 régule à la fois l'expression des ER nucléaires et des mER. En effet, chez la femelle, leurs niveaux d'ARNm varient en fonction du taux d'œstrogènes au cours du cycle. Parallèlement, l'E2 diminue l'expression des protéines ER α et ER β cytosoliques. Même si, les processus responsables de cette régulation sont peu connus, il est probable que des mécanismes post-transcriptionnels soient impliqués. De plus, l'E2 pourrait moduler l'expression des ER en contrôlant leur dégradation. En effet, l'E2 augmente transitoirement l'ubiquitinylation des ER intracellulaires (Nirmala & Thampan 1995). D'autre part, un traitement à l'E2 induit l'internalisation dans les 5 à 60 min des mER, de la même façon que pour tout récepteur membranaire qui est désensibilisé en présence de son ligand (Karthikeyan & Thampan 1996; Dominguez et al. 2009).

Très récemment, il a été découvert deux nouveaux récepteurs capables de lier l'E2 et de véhiculer la signalisation membranaire. Tout d'abord GPER1 (anciennement dénommé GPR30) est un récepteur de la famille des récepteurs à la Rhodopsine à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine G. D'abord identifié et caractérisé dans une lignée de cellules cancéreuses du sein, son immuno-réactivité a ensuite été détectée dans le cerveau de mammifères, y compris dans l'hippocampe. GPER1 possède à son extrémité C-terminale un domaine Class I, PDZ (Post-Synaptic Density-95 (PSD-95)/Disc Large Tumor Suppressor (Dlg1)/Zonula Occludens (ZO)-1). Le

domaine PDZ permet l'ancrage aux protéines d'échafaudage possédant un site de liaison aux domaines PDZ, au sein de la PSD des synapses glutamatergiques (Levin 2009). GPER1 transmet l'activation induite par l'E2 de protéines G appartenant à différentes cascades intra cellulaires telles que PI3K, ou la signalisation calcique (Revankar et al. 2005).

Le plus atypique des ER est ER-X. Ce récepteur, apparenté à ER α , est encore très peu caractérisé. Il semble être un récepteur membranaire associé aux protéines cavéolines et activerait la voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) par le 17 α -œstradiol (Toran-Allerand 2004).

b) *Voies de signalisation associées à l'œstradiol*

Comme le suggère la diversité des ER, l'E2 peut induire un grand nombre de voies de signalisation intracellulaires. Il en existe deux grands types : 1/ les voies de signalisation génomiques qui sont des voies de signalisation lentes résultant dans la modulation de l'expression de gènes cibles, 2/ l'activation de cascades de signalisation via la phosphorylation de kinases, cette voie membranaire sous-tend les effets rapides de l'E2. Il faut noter que certaines de ces voies membranaires aboutissent à l'activation de facteurs de transcription tels que CREB (C-AMP Response Element-Binding protein) qui induisent une expression génomique ; on revient alors à une signalisation lente (Figure 4).

(1) Voies de signalisation génomique

Les voies de signalisation génomiques sont responsables des effets à long terme de l'E2 en activant l'expression de gènes cibles. Ces voies vont donc sous-tendre des transformations durables (pour revue : Micevych & Dominguez, 2009).

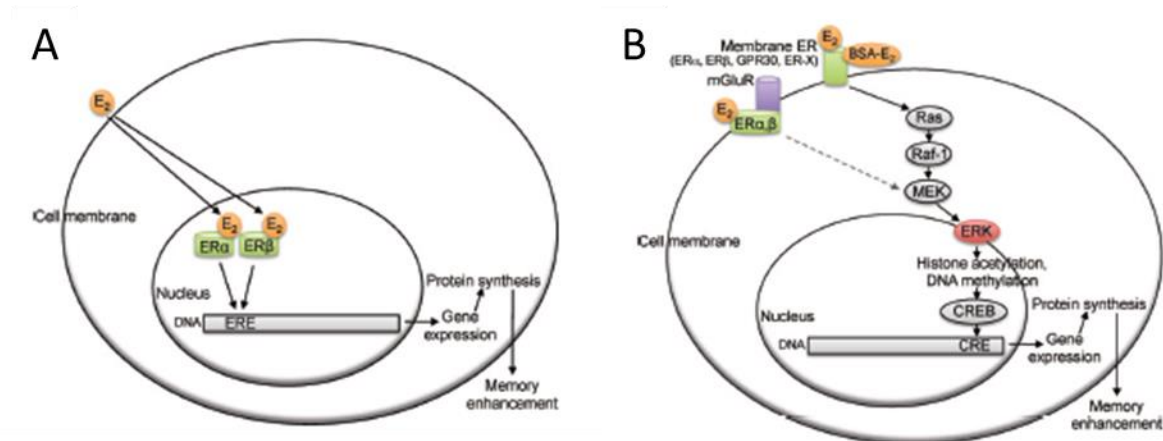


Figure 4 : Voies de signalisation de l'E2.

Diagrammes illustrant la voie génomique canonique **(A)** et la voie génomique non-canonique **(B)** (adapté de Karyn M Frick, 2012). Pour les détails voir texte.

- Voies de signalisation canoniques (Pathway 1A, Figure 4)

En l'absence de ligand, les ER classiques (*i.e.* ER α et ER β), sont à l'état de monomères dans le cytoplasme des cellules. Ils sont liés à des protéines chaperonnes qui les protègent de la dégradation. Ces protéines sont des "Heat Shock Protein" Hsp90 et Hsp70. La liaison de l'E2 au récepteur chaperonné induit une modification de sa conformation qui le détache de ses Hsp. Ceci démasque un domaine de dimérisation et d'adressage nucléaire. Les ER vont ainsi former des homo- ou hétéro-dimères puis être transloqués vers le noyau. Les ER se lient ensuite à une séquence palindromique spécifique de promoteurs cibles : les "Estrogen Response Elements" (ERE) et recrutent la machinerie de transcription ainsi que divers co-facteurs afin de moduler l'expression de gènes cibles.

- Voies de signalisation non canoniques (Pathway 1B, Figure 4)

Cependant, il existe également une voie de modulation de l'expression des gènes qui ne dépend pas des ERE. En effet, une fois transloqué au noyau, le ER peut également interagir avec des facteurs de transcription tels que AP-1 (Activator Protein-1) ou Sp-1 (Specificity protein-1) qui vont ensuite se fixer sur leurs propres sites de liaison à l'ADN (Levin 2005).

De plus, l'E2 peut également stimuler la production de seconds messagers tels que l'AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique) ou le GMPc (Guanosine MonoPhosphate cyclique),

l'activation de protéines kinases ou phosphatases ainsi que de flux calciques (Pedram et al. 2006). L'activation de la voie MAPK/ERK (Extracellular signal-Regulated kinases) conduit à l'activation par phosphorylation de CREB qui va induire l'expression de gènes cibles ; cette voie est impliquée dans la formation des épines dendritiques induite par l'E2 ainsi que dans l'expression de protéines synaptiques (Spencer et al. 2008).

(2) Voies de signalisation membranaires (Pathway 2, Figure 4)

Les voies de signalisation membranaires via les mER sont responsables des effets rapides de l'E2 en activant notamment des cascades de kinases. Ces voies sous-tendent des transformations rapides et transitoires qui modulent la structure et fonction de protéines préexistantes.

De la même façon que les ER cytoplasmiques, en l'absence d'E2, les mER sont à l'état de monomères mais forment rapidement des homo- ou hétéro-dimères en présence de composés œstrogéniques. Ils sont ensuite transloqués à la membrane, dans des cavéoles, grâce à l'interaction avec la protéine Caveolin-1. L'ancrage des récepteurs à la membrane est permis grâce à leur palmitoylation (Levin 2009; Marino et al. 2006). La formation des dimères est requise pour l'association des mER avec la sous-unité $G\alpha$ des petites protéines G hétérotrimériques et probablement aussi les sous-unités $G\beta\gamma$. Cette association, au sein de cavéoles, entraîne des réarrangements structuraux inconnus qui stimulent l'activation des protéines G (Levin 2009) puis des kinases telles que la PI3K (Phosphatidyl Inositide 3-Kinases) ou les MAPK. La voie de signalisation associée à la PI3K/PKB (Protein Kinase B) est impliquée dans les effets de l'E2 sur la synaptogénèse, que ce soit en termes de densité ou de morphologie des épines.

La grande diversité d'actions associées à l'E2 permet de pointer du doigt l'éventail d'actions potentielles de l'E2 dans le cerveau. De plus, il est vraisemblable que ces diverses voies de signalisation fonctionnent de façon concomitante et intégrée (Spencer et al. 2008).

c) *Distribution des ER dans le cerveau*

Les divers types d'ER sont tous présents dans le cerveau de façon différentielle dans les structures cérébrales. Ils sont bien évidemment exprimés en majorité dans les structures

impliquées dans le comportement sexuel ainsi que la régulation de la production des hormones sexuelles, c'est-à dire l'hypophyse, l'hypothalamus et BNST (Bed Nucleus of Stria Terminalis). Ici, nous nous attacherons à détailler la distribution des ER au sein des structures impliquées dans la fonction mnésique et notamment l'hippocampe.

(1) Anatomie cérébrale de l'hippocampe (Figure 5)

Position et cytoarchitecture de l'hippocampe

Le lobe temporal médian se compose d'une structure centrale, la formation hippocampique et des cortex périrhinal et parahippocampique qui constituent les principales voies d'entrée des informations provenant des aires associatives néocorticales. La formation hippocampique se décompose en quatre régions distinctes : le gyrus denté, les Champs Ammoniques que sont le CA3, le CA2 et le CA1, le subiculum et le cortex entorhinal. La position tridimensionnelle de la formation hippocampique dans le cerveau est complexe. Elle « apparaît grossièrement comme une structure allongée dont l'axe long (dit septotemporal) s'étend, avec une forme de C, du noyau septal basal en rostro-dorsal, par-dessus et devant le diencephale, jusqu'au lobe temporal en caudo ventral » (Amaral & Witter 1989). Il s'agit d'une structure sous-corticale du système limbique qui est située à la croisée des structures néocorticales et diencephaliques.

Sur le plan cytoarchitectural, le gyrus denté comprend trois couches. La couche moléculaire est principalement constituée des dendrites des cellules granulaires, de terminaisons axoniques provenant de différentes sources et d'interneurones GABAergiques (Gamma-AminoButyric Acid). La couche granulaire est constituée principalement de cellules granulaires et de neurones GABAergiques et contrôle les sorties du gyrus denté. Enfin, la couche polymorphe (ou hilus) comprend une grande variété de types cellulaires. Les différents champs de la corne d'Ammon présentent également une organisation en couche. On distingue une couche principale de cellules pyramidales, en dessous de laquelle se trouve le stratum oriens, relativement dépourvu de cellules mais qui contient les dendrites basales des neurones pyramidaux. Au-dessus des cellules pyramidales du CA3 se trouve le stratum lucidum qui est occupé par les axones des fibres mossues issues du gyrus denté. Superficiellement au stratum lucidum du CA3 et immédiatement au-dessus des cellules pyramidales du CA2 et CA1 se trouve le stratum radiatum qui contient les

dendrites apicales. Il est défini comme étant une région dans laquelle se font les connections auto-associatives (récurrentes) CA3-CA3, ainsi que les connexions collatérales CA3-CA1 des fibres de Schaffer.

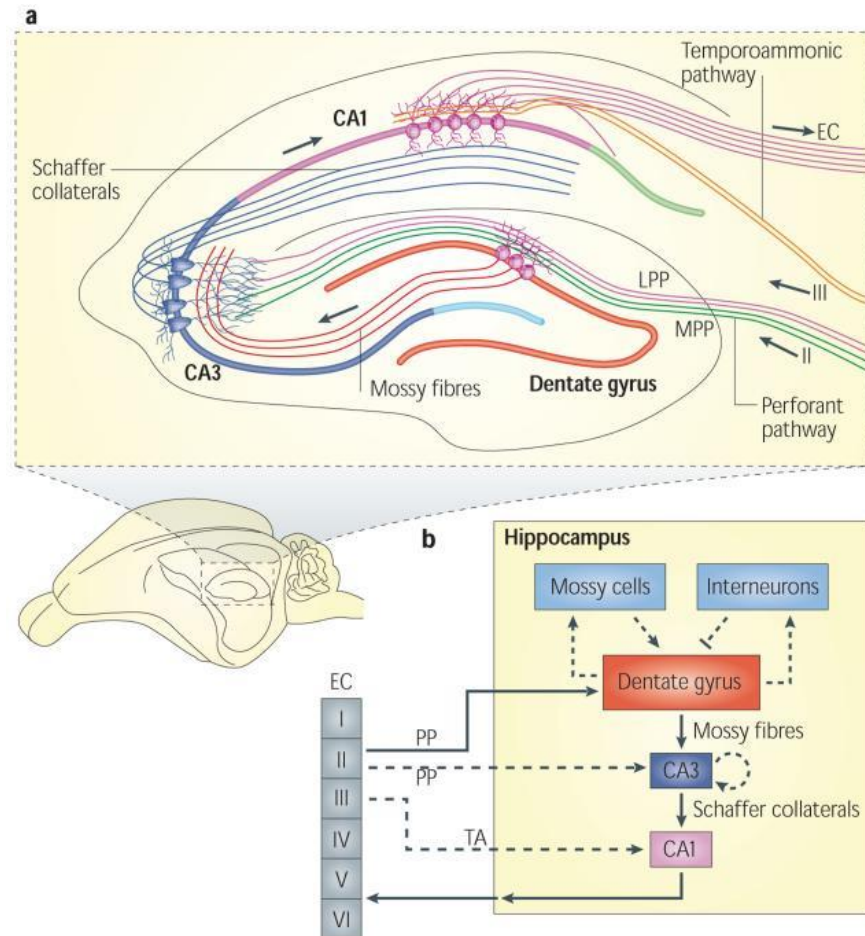


Figure 5 : Anatomie et circuit tri-synaptique de l'hippocampe.

a/ illustration de la circuiterie de l'hippocampe. **b/** diagramme du réseau neuronal de l'hippocampe. La voie d'entrée principale de la formation hippocampique est le cortex entorhinal (EC) dont les neurones, via la voie perforante (PP), font synapse avec les cellules granulaires du gyrus denté. Ces derniers, via les fibres moussues (FM), projettent sur la couche pyramidale de la région CA3. Les neurones pyramidaux du CA3 vont à leur tour projeter sur les cellules pyramidaux du CA1, via les collatérales de Schaffer. La voie de sortie du circuit est le subiculum. La conduction du signal au sein de ce circuit est unidirectionnelle (Deng et al. 2013).

Les connexions intra-hippocampiques : le circuit tri-synaptique

L'organisation cellulaire et de la connectivité intrinsèque de l'hippocampe fut initialement décrite par le neuroanatomiste Ramón Y Cajal en 1911. Les cellules granulaires du gyrus denté

reçoivent des entrées du cortex entorhinal et projettent sur les cellules du CA3 via les fibres moussues. Le CA3 projette à son tour sur les cellules pyramidales du CA1 via les collatérales de Schaffer. En plus de ce système, des connexions locales sont régies par de nombreux interneurons auxquelles s'ajoutent des connexions CA3-CA3 via des fibres récurrentes (Figure 5). De nombreux auteurs ont d'ailleurs signalé l'importance fonctionnelle de ces projections récurrentes du CA3, notamment dans le « pattern completion » ou l'acquisition rapide d'informations (Rolls & Kesner 2006). Enfin, il faut ajouter des projections directes du cortex entorhinal sur le CA3 et le CA1. Le CA1 est par ailleurs la seule région du circuit à projeter directement en retour sur le cortex entorhinal.

Les connexions extrinsèques à l'hippocampe

Les afférences :

Comme nous l'avons vu précédemment, la grande majorité des afférences corticales passe par le cortex entorhinal qui reçoit lui-même des projections des cortex périrhinal, piriforme, insulaire, rétrospécial, préfrontal, ainsi que du bulbe olfactif. L'ensemble de l'hippocampe reçoit des projections issues du septum médian. Cette voie septo-hippocampique est majoritairement cholinergique, mais présente également des projections GABAergiques. L'hippocampe reçoit également des projections noradrénergiques provenant du locus coeruleus, sérotoninergiques provenant des noyaux du raphé et dopaminergiques provenant de l'aire tegmentale ventrale. De manière plus spécifique, le CA1 reçoit des afférences thalamiques et amygdaliennes (noyau basolatéral).

Les efférences :

Le subiculum est l'une des principales voies de sortie de la formation hippocampique. Il projette sur différentes aires corticales comme les cortex préfrontal médian, orbitofrontal, infralimbique, prélimbique, rétrospécial et entorhinal. La région septale et les corps mammillaires constituent les régions sous-corticales recevant le plus de projections hippocampiques. Enfin l'hippocampe projette également sur les noyaux et bulbes olfactifs, le noyau accumbens, l'hypothalamus et l'amygdale (Amaral & Witter 1989).

En résumé, la position centrale de la formation hippocampique dans le cerveau, ainsi que ses connexions extrinsèques avec des structures telles que l'amygdale et le cortex préfrontal laissent à penser que cette structure pourrait jouer un rôle d'intégrateur, de lien entre les différents systèmes de mémoire que nous décrirons plus loin (II-B-1).

(2) Distribution des Récepteurs à l'œstradiol

ER α et ER β sont exprimés dans le cortex cérébral, l'hippocampe, le cerveau antéro-basal et l'amygdale aussi bien chez la souris, le rat, le primate que chez l'homme. La souris étant le modèle d'étude de ce travail de thèse, nous nous attacherons à décrire la distribution des ER dans les structures cérébrales de la souris.

- ER α est le récepteur qui prédomine dans l'hippocampe que ce soit au niveau ventral ou dorsal (Mitra et al. 2003). Il est présent à la fois dans le cytoplasme des neurones pyramidaux du CA1 où il agit en tant que récepteur aux hormones stéroïdes classique mais aussi dans les épines dendritiques où il active des cascades de signalisation (Bi et al. 2001; Gibbs 1999). ER α est également présent dans les neurones pyramidaux de CA3, au niveau des boutons pré-synaptiques et des épines dendritiques, ainsi que dans le cytoplasme des interneurones GABA-ergiques (Adams et al. 2002; Ogiue-Ikeda et al. 2008; Hart et al. 2001). Dans le cerveau antéro basal, ER α colocalise avec les neurones cholinergiques où ils sont accumulés au niveau des terminaisons avec des vésicules synaptiques (Towart et al. 2003). Dans l'amygdale, ER α est exprimé dans les régions médiale, corticale, amygdalo-hippocampique et dans le noyau central (Frick 2008). Dans le cortex, l'ARNm de ER α est très faiblement détecté dans les couches IV et V.

- Dans l'hippocampe, ER β est beaucoup moins exprimé que ER α (Mitra et al. 2003). Il est surtout présent dans les épines dendritiques et les astrocytes et au niveau de sites extranucléaires (Smith et al. 2009; Frick 2008). ER β est également exprimé dans l'amygdale, tout comme ER α . En revanche, l'ARNm de ER β est très fortement exprimé dans tout le cortex et plus particulièrement dans les cortex pariétal, frontal et entorhinal.

- Malgré le peu de données disponibles à ce jour à propos de GPER1, il a été démontré que celui-ci était exprimé dans l'hippocampe. Sa protéine a été identifiée dans les neurones, au niveau de la membrane plasmique, du réticulum endoplasmique et des compartiments pré- et post-synaptique (Akama et al. 2013).

Bien qu'aucune étude n'est spécifiquement examiné l'effet de l'âge chez la souris sur les patrons d'expression des ER dans l'hippocampe, il apparait que dans le cortex, le vieillissement induit une diminution de l'expression d'ER β (Thakur & Sharma 2006). Ces résultats sont à prendre avec précaution puisque la spécificité de l'anticorps contre ER β est remise en question. En revanche, chez la ratte âgée, il y a une diminution de l'expression des ER α et ER β putativement corrélée avec la diminution de la production d'E2 périphérique, suggérant que l'E2 joue un rôle dans la préservation de l'expression des ER (Smith et al. 2009; Adams et al. 2002).

L'ensemble des données démontrent que les ER sont présents dans les aires cérébrales critiques pour l'apprentissage et la mémoire. La présence de ces récepteurs mais aussi de l'aromatase qui intervient dans la production locale d'E2 devrait avoir une signification fonctionnelle. Cette distribution va donc permettre aux œstrogènes de moduler le fonctionnement de ces régions ainsi que les processus mnésiques qu'ils sous-tendent. De plus, l'imbrication des divers sites d'expression des ER suggère une coordination complexe entre les ER pour induire les effets rapides et lents de la signalisation induite par l'E2. A cela il faut rajouter que les ER et l'aromatase sont aussi exprimés dans les cellules gliales où l'E2 semble avoir un rôle majeur dans la neuroprotection. Le vieillissement des structures cérébrales pourrait, entre-autre, être une conséquence de la diminution de la production d'E2 dans ces cellules. Cette diminution bien que largement envisagée, n'est à ce jour pas démontrée.

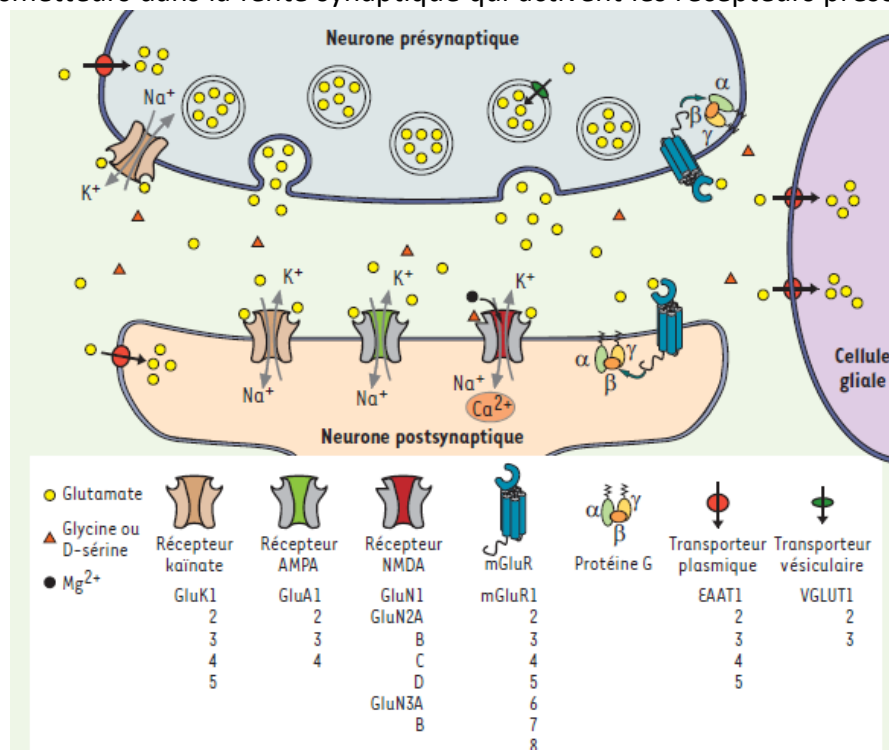
B. Œstradiol et plasticité synaptique

Le cerveau est constitué d'à peu près 100 milliards de neurones et 1 000 milliards de cellules gliales. Un neurone, même s'il varie dans sa taille et sa complexité, est toujours formé d'un corps cellulaire ou soma, d'un axone unique et de plusieurs dendrites. La fonction des dendrites est de recevoir l'information via des excroissances de la membrane plasmique appelées épines

dendritiques. La fonction de l'axone, le prolongement cellulaire le plus long, est de transmettre l'influx nerveux depuis le segment initial jusqu'à la terminaison synaptique. Le segment initial possède des propriétés morphologiques uniques : il contient un grand nombre de canaux calciques qui permettent le déclenchement du signal nerveux. Dans cette zone, les potentiels d'action sont générés puis transmis tout au long de l'axone pour finalement envahir la terminaison synaptique et déclencher l'activité synaptique.

1. Transmission synaptique dans une synapse glutamatergique

La communication entre les neurones se produit dans une zone hautement spécialisée appelée synapse où l'information est transmise du neurone pré-synaptique vers le neurone post synaptique. En général, les synapses excitatrices sont construites entre un axone et une épine dendritique (synapses axodendritiques), alors que les synapses inhibitrices se forment plutôt sur le corps cellulaire (synapses axosomatiques). Si le signal est propagé de façon électrique un sein d'un neurone, il est en revanche transmis soit électriquement soit chimiquement au neurone post synaptique. Au sein d'une synapse excitatrice, le mode de transmission synaptique le plus fréquent est la synapse chimique. La transmission du signal passe alors par la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique qui activent les récepteurs présents sur le versant



post synaptique. Le plus souvent, les synapses inhibitrices libèrent du GABA et les synapses excitatrices du glutamate.

Figure 6 : Récepteurs Glutamatergiques (Gielen 2010)

Le glutamate est un acide aminé dont les propriétés excitatrices dans le système nerveux ont été démontrées il y a 50 ans (CURTIS & WATKINS 1960). Après sa libération par les vésicules du bouton synaptique, le glutamate peut activer deux types de récepteurs : des récepteurs métabotropiques et des récepteurs ionotropiques.

(1) Récepteurs glutamatergiques

Les récepteurs métabotropiques au glutamate sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires (Figure 6). Il existe 8 isoformes (mGluR1 à mGluR8) et la liaison avec le glutamate provoque un changement de leur conformation et l'activation de différentes protéines G.

Il existe trois types de récepteurs ionotropiques qui sont classés selon leur sélectivité aux agonistes et antagonistes du glutamate: les récepteurs Kaïnate (GluKR), les récepteurs α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA, GluAR) et les récepteurs N-Methyl-D-aspartic acid (NMDA, GluNR) (Watkins & Evans 1981)

Les GluNR et GluAR possèdent 4 larges sous-unités transmembranaires formant un canal ionique central. De la même famille que les GluKR, ils présentent une similarité dans leur architecture : un domaine N-terminal extracellulaire (ATD), un domaine extracellulaire de liaison au ligand (LBD), un domaine transmembranaire (TMD) composé de 4 domaines transmembranaires (M1 à M4), une boucle extracellulaire qui va former le pore, et enfin un domaine C-terminal intracellulaire (Cull-Candy & Leszkiewicz 2004).

- Le GluKR est un canal perméable au potassium, au sodium et au calcium. Composé de 5 sous-unités GluK1 à GluK5, il joue un rôle dans la régulation synaptique et l'excitabilité neuronale (Pinheiro & Mulle 2006; Coussen 2009).
- Les GluNR forment des tétramères composés de deux sous-unités GluN1 obligatoires qui lient deux sous-unités pouvant être une combinaison entre des sous-unités GluN2 (GluN2A, GluN2B, GluN2C et GluN2D) et/ou GluN3 (GluN3A et GluN3B). La sous-unité GluN1 possède un site de fixation pour le co-agoniste (la glycine ou la D-Sérine) alors que la sous-unité GluN2 lie le glutamate. La sous-unité GluN3 est capable de lier le glutamate et sa présence diminue l'activité du récepteur (Das et al. 1998).

La sous-unité GluN1 est exprimée dans tous les neurones glutamatergiques et à tous les stades (Monyer et al. 1994). En revanche, la localisation des ARNm de GluN2 diffère au cours du développement, en fonction de la sous-unité. GluN2B est fortement exprimée dans le cortex, l'hippocampe et le cervelet et GluN2D est surtout exprimée dans le diencephale, le mésencéphale et la moelle épinière. Au cours de la première semaine après la naissance, leur expression commence à décroître, remplacée peu à peu par les sous-unités GluN2A dans l'hippocampe et le cortex et GluN2C dans le cervelet. Sans toutefois disparaître, l'expression de GluN2B et GluN2D va nettement diminuer chez l'adulte, alors que GluN2A et GluN2C deviendront les sous-unités les plus exprimées (Monyer et al. 1994; Petralia et al. 1994). Le changement d'expression de GluN2A et GluN2B a lieu tant au niveau de la production de l'ARNm que de l'expression de protéine. L'activité est un régulateur clé du changement de population des sous-unités des GluNR. Par exemple, la liaison du glutamate aux GluNR va augmenter le recrutement des récepteurs contenant la sous-unité GluN2A à la synapse sans affecter les récepteurs contenant la sous-unité GluN2B (Yashiro & Philpot 2008). L'expression des récepteurs GluNR précède celle des récepteurs GluAR dans une grande majorité des synapses excitatrices glutamatergiques (Petralia & Wenthold 1999). Ces synapses incapables de produire des courants postsynaptiques de type GluAR, sont dites «silencieuses», les GluNR étant bloqués par un ion Mg^{2+} (voir plus bas).

Il est bien établi que la composition en sous-unités GluN2A ou GluN2B du récepteur détermine ses propriétés biophysiques (Erreger et al. 2005). De plus, bien que les deux sous-unités soient exprimées dans toute la synapse, GluN2B est préférentiellement dans l'extra-synapse alors que GluN2A est préférentiellement dans la synapse (Kollen et al. 2008; Tovar & Westbrook 1999; Stocca & Vicini 1998).

- Les GluAR sont également composés de 4 sous-unités (GluA1 à GluA4). Ces sous-unités vont s'associer pour donner au récepteur des propriétés distinctes. Bien qu'ayant beaucoup de similarité entre elles, les sous-unités des GluAR diffèrent au niveau de leur séquence intracellulaire C-terminale. Cette différence va engendrer des interactions spécifiques avec des partenaires protéiques et moduler de façon différentielle leur trafic en impliquant des voies distinctes entre les différents GluAR dans l'export vers la synapse (Shi et al. 2001). En effet, les récepteurs GluA2-GluA3 sont sous l'influence d'un échange continu avec le compartiment synaptique. Par contre, les récepteurs GluA1 sont ajoutés à la synapse de manière ponctuelle dépendant de l'activité à l'aide de protéines à domaine PDZ. Leur addition à la synapse a lieu pendant le processus de LTP (Long Term Potentiation) (Hayashi et al. 2000). Bien qu'étant synthétisés et assemblés par la voie courante du réticulum endoplasmique, il a également été montré une synthèse locale de ces récepteurs au niveau des compartiments de biosynthèse présent dans les épines dendritiques (Ju et al. 2004).

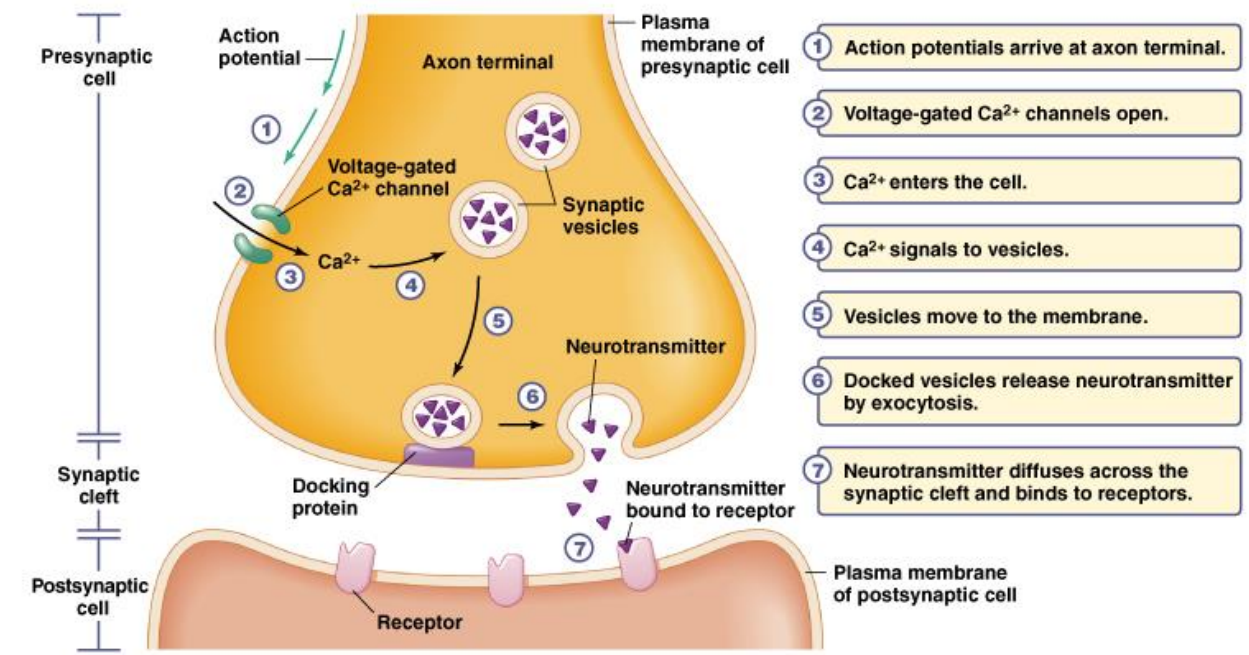


Figure 7 : Transmission synaptique dans une synapse chimique

(2) Mécanismes impliqués la transmission glutamatergique basale

Lors d'une transmission synaptique (Figure 7), les vésicules synaptiques contenant le glutamate trafiquent au niveau de la zone active. La dépolarisation de la terminaison pré-synaptique, à une bouffée de potentiel d'action, entraîne une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire. Cette augmentation donne lieu à la fusion des vésicules avec la membrane pré-synaptique, libérant ainsi le glutamate dans la fente synaptique. Le versant post-synaptique des synapses glutamatergiques, c'est-à-dire l'épine dendritique, présente un éventail de récepteurs du glutamate, dont les GluAR et GluNR. Ils sont associés à un grand nombre de protéines d'échafaudage et de protéines de signalisation qui forment ensemble la PSD (McAllister 2007). Le GluAR est important pour l'excitabilité cellulaire. En effet, c'est lui qui conduit la plupart du courant ionique quand le neurone est à son potentiel de repos. Le GluNR est décrit comme un détecteur de coïncidence capable de repérer à la fois des événements pré-synaptiques et post-synaptiques. En effet, il présente les propriétés d'un canal cationique voltage-dépendant et est inhibé par un bloc Magnésium (Mg^{2+}) au potentiel de repos. Lorsque la membrane post-synaptique est suffisamment dépolarisée grâce à l'activation des GluAR, le Mg^{2+} est relâché et les

GluNR sont activés. Ils vont alors laisser entrer par leur canal des ions Na^+ et Ca^{2+} dans le neurone post-synaptique. L'augmentation de la perméabilité en calcium dans la membrane post-synaptique permet l'activation de nombreuses voies de signalisation.

2. Plasticité synaptique

Une des caractéristiques majeures du cerveau est sa capacité à être plastique. La plasticité synaptique regroupe différents mécanismes affectant soit la morphologie neuronale soit l'efficacité de la transmission synaptique. Ces mécanismes sont capables de moduler le transfert des informations à long terme et de façon dépendante de l'activité. Si la plasticité peut également faire référence à la capacité des circuits neuronaux de subir des réorganisations fonctionnelles en réponse à une activité préalable, ici nous n'aborderons que la plasticité au niveau neuronal.

a) *Plasticité de la transmission synaptique dans une synapse glutamatergique*

Il existe deux grandes formes de plasticité synaptique au niveau des synapses glutamatergiques : la potentialisation à long terme (LTP) et la dépression à long terme (LTD). La LTP et la LTD sont deux phénomènes induits artificiellement et utilisés pour mettre en évidence des modifications de longue durée permises par les propriétés des synapses. Ayant été découvertes dans un premier temps dans l'hippocampe, la LTP et la LTD ont d'abord été présumées comme étant des mécanismes cellulaires uniquement liés à l'apprentissage et la mémoire. Depuis, il a été montré que la plasticité synaptique est une propriété de base dans une synapse excitatrice. Ces deux phénomènes vont dépendre du niveau d'augmentation du calcium intracellulaire ainsi que de la durée de cette augmentation (Yang et al. 1999). Une forte augmentation du Calcium intracellulaire induit l'activation des voies de signalisation associées à la LTP, alors qu'une faible augmentation induit une LTD.

Lors de l'induction de la LTP, la large augmentation du calcium intracellulaire entraîne l'activation de protéine kinases : la Protéine Kinase C (PKC), la Calmoduline Kinase II (CaMKII) et la Protéine Kinase A (PKA). La phosphorylation de protéines cibles va notamment induire l'augmentation de l'activité des GluAR, résultant dans l'amélioration de l'efficacité de la transmission synaptique. Lors de l'induction de la LTD, la modeste augmentation du calcium

intracellulaire active une cascade de phosphatases dont la Calcineurine (CaN) et les Protéines Phosphatases 1 (PP1), 2A (PP2A) et 2B (PP2B). La déphosphorylation de protéines cibles induite par ces phosphatases diminue l'efficacité synaptique.

LTP et LTD peuvent être activée par 3 sources de calcium : les GluNR, les Canaux Calciques Voltage Dépendant (VDCC) et les Stocks Calciques Intracellulaires (ICS ; Figure 8). Il faut souligner que toutes ces sources contribuent de façon concomitante à la plasticité synaptique.

(1) Potentialisation à Long Terme

On peut distinguer deux types de LTP : la LTP dépendantes des GluNR (GluNR-LTP) et la LTP indépendante des GluNR et dont l'induction est due à l'activation des VDCC (VDCC-LTP) (Foster 2012; Teyler et al. 1994)

- La GluNR-LTP peut se mesurer classiquement au niveau de la synapse CA3-CA1 entre les collatérales de Schaeffer et les dendrites des neurones du CA1. Elle est induite par une stimulation haute fréquence (Bliss & Collingridge 1993) et induit des modifications morphologiques et fonctionnelles de la synapse. La forte augmentation du calcium intracellulaire induit notamment l'activation de la CaMKII, une protéine kinase à faible affinité pour le calcium (Malenka et al. 1989; Lisman et al. 2002). L'activation de la CaMKII permet la phosphorylation des GluAR et ainsi favorise leur réinsertion à la membrane (Lüthi et al. 2004). Il a aussi été montré que la LTP entraînait une insertion rapide de GluN2A à la membrane.

Ainsi, la GluNR-LTP requiert l'activation des GluNR pour son induction et l'augmentation de l'activité des GluAR pour son expression et son maintien (Nicoll & Malenka 1999; Stanton 1996; Lisman 2003)

- La VDCC-LTP est induite lors de stimulation de forte intensité. Le calcium entrant par ces canaux, et plus particulièrement ceux de type L, va alors se fixer sur les récepteurs à la Ryanodine (RyR) qui permettent de libérer le calcium contenu dans les ICS. Ce stock de calcium peut également être libéré suite à l'activation du Récepteur à l'Inositol 3 Phosphate (IP3R) par les mGluR (Foster 2012).

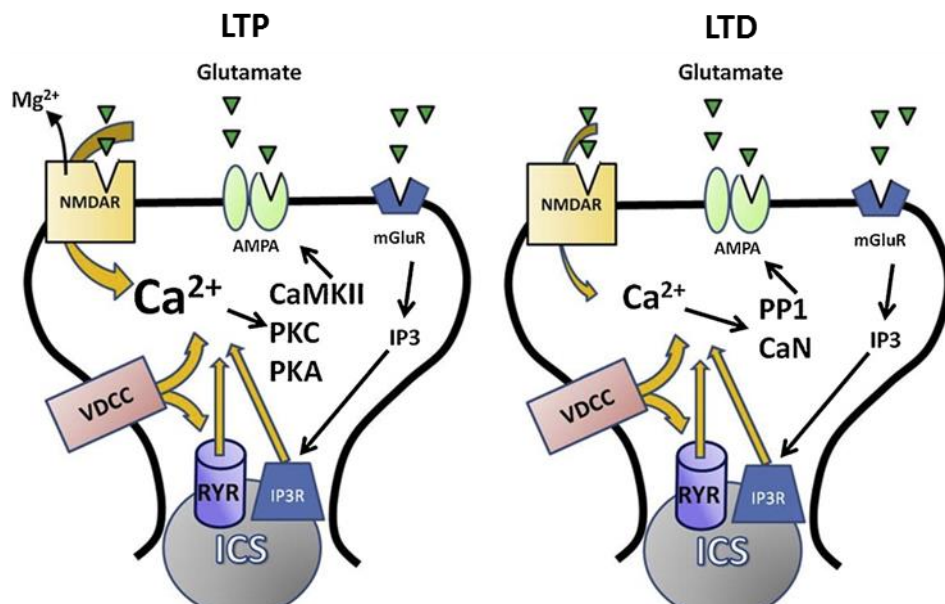


Figure 8 : Schéma des différentes sources de Calcium lors de la LTP et de la LTD (Foster 2012). Pour détails voir texte.

La LTP peut se diviser en deux phases qui font appel à des processus cellulaires distincts; La LTP précoce (early-LTP ; e-LTP) et la LTP tardive (late-LTP; l-LTP). La e-LTP dure environ 2-3h et n'implique pas la synthèse de nouvelles protéines, mais plutôt des modifications post-traductionnelles de protéines préexistantes. De plus, la forte activation des GluNR et l'augmentation rapide du Calcium intracellulaire déclenche l'activation à court terme de plusieurs enzymes, induisant une transmission synaptique plus efficace. La l-LTP implique la synthèse de nouvelles protéines dans le neurone post-synaptique. La signalisation au noyau dépend de nombreuses protéines telles que la PKA ou les MAPK/ERK, qui vont activer des facteurs de transcription clés dont CREB et les « immediate early genes » c-Fos et Zif268.

Il est généralement admis que les protéines nouvellement synthétisées sont plutôt des protéines du cytosquelette. Ces protéines contribuent à l'aspect morphologique/structural de la plasticité synaptique en sous-tendant le remodelage des épines potentialisées ainsi que la formation de nouvelles synapses. Les changements fonctionnels et structuraux à long terme des synapses contribueraient à la consolidation de la mémoire à long terme (Hölscher 1997; Whitlock et al. 2006; Kemp & Manahan-Vaughan 2007).

(2) Dépression à Long Terme

L'induction de la LTD se fait lors d'une faible stimulation qui ne libère dans le neurone qu'une quantité limitée de calcium. L'expression de la LTD passe par l'activation de protéines phosphatases à haute affinité pour le calcium dont CaN et PP1 (Mulkey et al. 1994; Mulkey et al. 1993). La déphosphorylation des GluAR par les phosphatases durant ce phénomène entraîne également leur internalisation, contribuant d'autant plus à la diminution de l'efficacité synaptique (Malenka & Bear 2004; Brown et al. 2005; Stanton 1996).

En termes de récepteurs, il est généralement admis qu'il existe une dissociation entre les différents GluNR quant à leur rôle dans la plasticité synaptique. C'est-à-dire que l'activation des GluN2A induirait la LTP alors les GluN2B seraient responsables de l'induction de la LTD (Massey et al. 2004). Cependant, une étude montre que les mécanismes seraient d'une plus grande complexité, à savoir que l'activation des GluN2A pourrait aussi conduire à une LTD, le tout sous le contrôle des GluN2B extra-synaptiques (Kollen et al. 2008).

S'il l'on compare les mécanismes de LTP et de LTD, on peut se rendre compte que ces mécanismes ont un même signal d'entrée, le calcium, et que les voies de signalisation associées sont en compétition les unes avec les autres. En effet, les voies de signalisation de la LTP, une fois activées, inhibent celles de la LTD et inversement. Ceci suggère une balance entre l'induction de la LTP et de la LTD. Comme nous le verrons plus tard, la régulation fine de cette balance est cruciale au bon fonctionnement mnésique.

b) *Epines dendritiques*

Une épine dendritique est une zone hautement spécialisée qui forme une excroissance à partir de la dendrite. Les épines sont composées de sous-domaines hautement spécialisés qui exercent diverses fonctions dans la transmission et la plasticité synaptique. En face du versant pré-synaptique, se trouve la PSD, qui est un épaississement de la membrane dense aux électrons. La PSD est composée d'un éventail de protéine d'échafaudage et de protéine de signalisation diverses. Les épines contiennent également des domaines d'endocytose et d'exocytose et sont composées d'un cytosquelette de filaments d'actine. Formées à partir d'une longue excroissance appelée filopode, les épines évoluent en une grande variété de formes et de tailles. Sur la base d'études anatomiques liées à la taille du cou et la forme de la tête, elles ont été classifiées en épines fines, stubby ou mushroom. Plus les épines sont matures et plus elles présentent un cou fin et une large tête (Bosch & Hayashi 2012). Les épines mushrooms sont des épines matures, extrêmement stables *in vivo* et caractérisées par une large densité post synaptique et un grand nombre de GluAR. (Kasai et al. 2003; Holtmaat et al. 2005; Matsuzaki et al. 2001). En revanche, les épines fines, présentent un niveau de recyclage très important, très peu de GluAR mais beaucoup de GluNR. Ce sont des épines immatures qui peuvent se stabiliser en épines matures (Noguchi et al. 2005; Matsuzaki et al. 2001).

Parmi les différentes protéines d'échafaudage, qui lient le cytosquelette d'actine aux protéines impliquées dans la signalisation, la protéine la plus présente est PSD-95. PSD-95 interagit avec les protéines membranaires et régule leur localisation au sein de la synapse. PSD-95 joue également un rôle fonctionnel dans la transmission synaptique puisqu'elle régulerait les propriétés des récepteurs du glutamate et serait impliquée dans la maturation des épines lors de la plasticité synaptique (El-Husseini et al. 2000).

Les épines sont extrêmement dynamiques et sont les cibles principales des modifications ayant lieu lors de la plasticité synaptique (Figure 9). En effet, il existe une corrélation positive entre le volume de la tête de l'épine, l'aire de la PSD, le nombre de GluAR et la force de la transmission synaptique. De plus, l'induction d'une LTP entraîne une augmentation de la largeur des épines dendritiques et de la PSD ainsi que la genèse de nouvelles épines et la partition d'épines ou de PSD en deux nouvelles synapses fonctionnelles. Inversement, l'induction d'une LTD induit une dépolymérisation de l'actine et un rétrécissement des épines voire une perte d'épine (Bosch & Hayashi 2012; Segal 2005; Zhou et al. 2004).

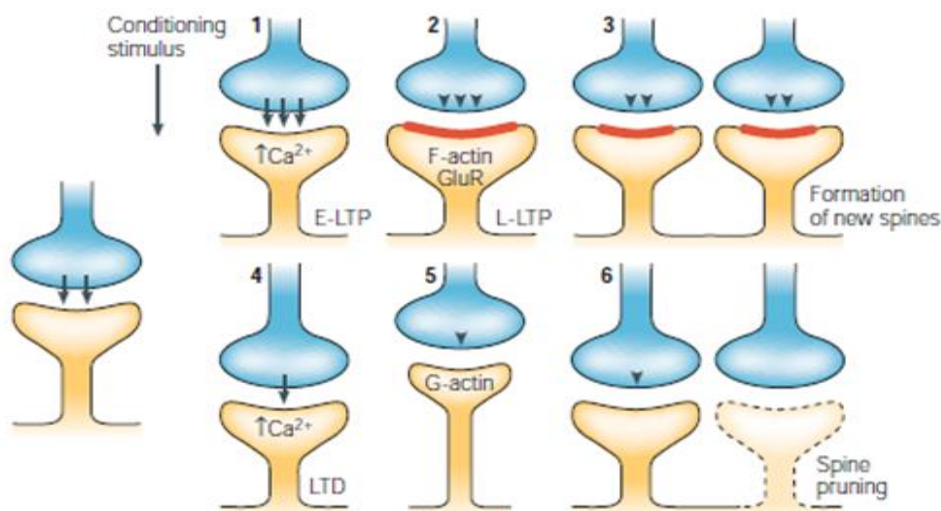


Figure 9 : Plasticité des épines suite à une LTP ou un LTD (Segal 2005)

c) Neurogénèse

La neurogénèse adulte ou néoneurogénèse est les processus de génération, migration, maturation de nouveaux neurones qui s'intègrent dans des circuits préexistants après la fin du développement fœtal. Dans la plupart des mammifères, la neurogénèse adulte ne semble se produire que dans le bulbe olfactif et le gyrus denté de l'hippocampe. Ici, seule la néoneurogénèse se produisant dans le Gyrus Denté sera développée.

Les nouveaux neurones sont générés tout au long de la vie à partir d'une population de cellules en division appelées progéniteurs cellulaires ou cellules souches. Deux critères sont typiquement utilisés pour définir une cellule souche : 1/ la capacité de se régénérer et 2/ la capacité de donner naissance à de multiples types cellulaires distincts. Les progéniteurs isolés du cerveau adultes sont classifiés comme cellules « multipotentes » puisqu'elles peuvent différencier dans les trois principales lignées cellulaires du système nerveux : les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes.

Il existe deux régions neurogéniques dans le cerveau adultes où les progéniteurs donnent naissance à de nouveaux neurones dans des conditions physiologiques : 1/ la zone sub-ventriculaire des ventricules latéraux (SVZ), où les progéniteurs génèrent des cellules qui migrent vers le bulbe olfactif, et 2/ la zone sub-granulaire (SGZ) du gyrus denté où les nouvelles cellules granulaires sont intégrées dans le réseau local de neurones. Dans ces deux régions, plusieurs types de progéniteurs en division ont été identifiés. Les cellules de « Type-1 » (ou cellules B dans la SVZ) sont similaires aux cellules gliales radiaires observées lors du développement, et présentent une morphologie et physiologie semblables à celles des astrocytes. Bien qu'elles résident dans la SGZ, leurs prolongements s'étendent jusque dans la couche moléculaire du gyrus denté. Ces cellules sont relativement quiescentes. En revanche, les cellules de « Type-2 » (ou cellules C dans la SVZ) présentent une très forte activité de prolifération mais sont petites et circulaires. L'hypothèse actuelle est que ces cellules de Type-2 pourraient donner naissance à des cellules de « Type-3 » (ou cellules A dans la SVZ) représentant des neuroblastes dédiés à la lignée neuronale.

Maturation des néoneurones dans le Gyrus Denté

La néoneurogénèse se différencie de la neurogénèse du développement par le fait que les nouveaux neurones doivent s'intégrer dans un réseau de neurones établi et fonctionnel. Les progéniteurs locaux de la SGZ subissent une différenciation neuronale et peuvent migrer dans la couche granulaire. Quoi qu'il en soit, l'ensemble du processus de néoneurogénèse reste entièrement confiné au sein du gyrus denté. La vitesse de maturation dépend probablement de l'expérience et varie entre les neurones.

1. GABA Local : (moins d'1 semaine d'âge) Les neurones immatures présentent une croissance de neurites qui est souvent non polarisée vers la couche moléculaire. Ils présentent peu ou pas de synapses mais sont toniquement activés par le GABA ambiant qui est dépolarisant.

2. GABA synaptique : (1 à 2 semaines d'âge) Les dendrites commencent à s'étendre vers la couche moléculaire, mais ne présentent pas encore d'épines, et les axones peuvent être observés dans le hyle. Des inputs synaptiques GABA provenant des inter-neurones locaux sont observés et sont toujours excitateurs. Aucun input glutamatergique n'est observé mais des potentiels d'action immatures peuvent être produits si les neurones sont stimulés directement.

3. Formation des épines et croissance des axones : (2 semaines d'âge) Vers 16 jours, le GABA devient inhibiteur et les neurones commencent à développer des épines dendritiques dans la couche moléculaire pour former des synapses avec les fibres provenant du cortex enthorinal latéral. A 17 jours, les néo-axones forment des connections fonctionnelles sur des neurones de l'hyle en aval et sur les cellules pyramidales de CA3.

4. Neurones fonctionnellement immatures : (de 3 semaines à 2 mois) la formation des épines est graduelle avec des neurones augmentant progressivement leurs connections et arborisation dendritique. Les fibres moussues continuent à mûrir, avec des boutons sur les neurones de CA3 qui grossissent considérablement avant 28 jours. Les neurones présentent encore des propriétés physiologiques uniques, dont une LTP augmentée et médiée par les récepteurs GluN2b, ainsi que des résistance, capacitance et potentiel de repos différents.

5. Neurones matures : (>2 mois) Les neurones deviennent indifférenciable physiologiquement des neurones préexistants.

Sélection et survie neuronales

Un des aspects critiques de la néoneurogenèse est le processus de sélection. Si un grand nombre de neurones naît dans le bulbe olfactif et dans le gyrus denté, seule une fraction de ces cellules survient. Dans le gyrus denté, environ la moitié des néoneurones meurt dans les 2 semaines après leur naissance.

Rôle des néoneurones

Dans l'hippocampe, l'âge auquel sont générés les néoneurones ainsi que leur stade de maturation déterminent leur mode d'activation au sein du réseau de neurones et par conséquent, leur fonction dans l'apprentissage et la mémoire. En effet, les neurones issus du développement embryonnaire sont activés dans un nouvel environnement alors que les néoneurones sont cruciaux à la résolution de problèmes spatiaux, comme l'apprentissage d'un

nouveau paradigme expérimental. Ces différences pourraient s'expliquer par leurs propriétés électrophysiologiques distinctes.

La néoneurogénèse est cruciale à la formation de certains types de mémoire chez le rat, telles que le conditionnement de trace et l'apprentissage spatiale en piscine de Morris. L'activation de neurogénèse permet d'améliorer la performance des animaux et inversement, l'apprentissage spatial permet d'augmenter la néoneurogénèse. D'autre part, de récentes études ont montré que la néoneurogénèse serait impliquée dans le « pattern separation », c'est-à-dire la capacité à distinguer deux expériences très similaires.

3. Influence de l'œstradiol sur la plasticité synaptique

a) *LTP/LTD*

▪ **LTP**

Il y a plus de 40 ans, il a été montré que les œstrogènes modulaient la plasticité synaptique dans le système nerveux. Dans une étude princeps, il a été noté une diminution du seuil d'activation des crises hippocampiques chez des ratte durant le proestrus, la phase du cycle où les œstrogènes sont en concentration maximale (Terasawa & Timiras 1968). Chez la ratte, la réactivité de l'hippocampe est corrélée avec la concentration en œstrogènes. Ainsi, l'amplitude la LTP est maximale lorsque les concentrations en œstrogènes sont au plus haut, c'est-à-dire lors du proestrus (Warren et al. 1995). Chez l'Homme, l'activité électrique dans le tissu nerveux est modifiée au cours du cycle et positivement corrélé avec les variations en œstrogènes (Bäckström 1976).

Dans une première série d'expérience, les réponses de champs extracellulaires monosynaptiques ont été mesurées, dans le CA1 de l'hippocampe, sur coupe de cerveaux de rat. Chez les mâles, l'application de 100pM d'E2 dans le milieu induit l'augmentation rapide de la réponse de champs évoquée par la stimulation des afférences des neurones pyramidaux de CA1. Ce fut la première démonstration que des concentrations picomolaires d'E2 pouvaient accroître la transmission synaptique glutamatergique dans l'hippocampe (Teyler et al. 1980). Depuis, d'autres ont montré que l'E2 augmentait l'excitabilité de l'hippocampe chez la ratte (Kim et al.

2006; Scharfman & MacLusky 2006) qui serait sous-tendue par une augmentation des réponses médiées par les GluAR mais pas par les GluNR (Wong & Moss 1992). L'E2 démontre également une capacité à renforcer la LTP *in vivo* chez le rat éveillé (Córdoba Montoya & Carrer 1997), ainsi que sur coupe d'hippocampe en culture (Foy et al. 1999).

D'autre part, les œstrogènes atténuent les effets délétère sur la LTP causées par le blocage des récepteurs NMDA (Gureviciene et al. 2003) et la LTP serait plus forte lorsque les niveaux d'œstrogènes sont hauts (Warren et al. 1995). Enfin, l'ovariectomie décroît la liaison au récepteur NMDA, effet abolit par un traitement à l'E2 (Cyr, Thibault, et al. 2001). Ainsi, une situation de fort niveau en œstrogènes produit des conditions conduisant à l'augmentation de l'excitation synaptique de l'hippocampe, probablement contribuant aux effets positifs de l'E2 sur la mémoire hippocampo-dépendante (Davis et al. 2005).

Bien que les mécanismes de l'action de l'E2 sur l'hippocampe ne soient pas entièrement décryptés, il est vraisemblable qu'ils passent par l'activation des ER α et ER β , ainsi que des mER (Foy et al. 2008).

▪ LTD

Les études qui ont été conduites sur l'effet de l'E2 sur la LTD sont bien moindres que celles sur la LTP. De plus, les conclusions de ces études se contredisent. Par exemple, certaines études montrent que l'E2 renforce la LTD (Desmond et al. 2000; Zamani et al. 2000; Day & Good 2005; Mukai et al. 2007) alors que certaines montrent que l'E2 diminue la LTD (Córdoba Montoya & Carrer 1997; Good et al. 1999; Sharrow et al. 2002). Cependant, la plupart de ces études ont été faites *in vitro* sur tranches de cerveau. Les études faites *in vivo*, soit en corrélant les taux circulants en E2 et la plasticité synaptique, soit avec des injections d'E2, montrent un effet de l'E2 en faveur de la LTP dans la balance (Córdoba Montoya & Carrer 1997; Good et al. 1999; Sharrow et al. 2002).

Comme nous l'avons déjà mentionné, la direction de la plasticité synaptique dépend de la quantité de Ca²⁺ qui rentre dans le neurone post-synaptique lors d'une stimulation. L'E2 entraîne l'augmentation rapide de l'influx calcique dans les neurones hippocampaux, que ce soit dans le

noyau, le cytoplasme ou encore les dendrites (Zhao et al. 2005). Il est ainsi possible que les effets de l'E2 sur la plasticité synaptique soient sous-tendus par la modification de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire.

b) *Épines dendritiques*

En 1990, Gould et collaborateurs (Gould et al. 1990) ont été les premiers à montrer qu'une supplémentation exogène d'E2 induisait l'augmentation de la densité des épines dendritiques dans le CA1 de l'hippocampe. Ils ont également montré que lors du cycle ovarien des femelles, il y avait une augmentation de 20 à 30% du nombre d'épines durant le proestrus, c'est-à-dire la phase du cycle où la concentration en E2 est la plus élevée (Woolley & McEwen 1990). Depuis ces résultats ont été confirmés par de nombreuses études chez le rat et le singe (Bi et al. 2001). En revanche, la plupart des études sur les effets de l'E2 sur la morphologie des épines ont été menées chez le rat. Étant donné que la souris est le modèle d'étude dans ce travail de thèse, nous nous attacherons à décrire les effets de l'E2 sur la morphologie des épines dendritiques chez la souris.

Contrairement à son effet chez la ratte, l'E2 n'augmente pas de façon générale la densité des épines dendritiques dans le stratum radiatum du CA1 chez des souris ovariectomisées. En revanche, l'E2 augmente le nombre d'épines de type « mushroom » dans le CA1 (Li et al. 2004). Il a également été montré qu'un traitement à l'E2 permettait de corriger la diminution d'épaisseur de la PSD induite par une ovariectomie dans les neurones pyramidaux. Plus précisément, chez les souris ovariectomisées, l'E2 augmente l'expression de protéines synaptiques telles que PSD-95, la syntaxine ou la spinofiline, et ce, dans tous les champs hippocampiques. Enfin, l'E2 augmente également le nombre de vésicules pré-synaptiques dans le CA1 (Xu & Zhang 2006). Ceci suggère que l'E2 pourrait réguler la maturation des épines ainsi que la fonction synaptique sans affecter la densité en épine *per se*. Au niveau moléculaire, nous avons évoqué précédemment que l'E2 activait la voie PI3K/PKB, et donc les voies de polymérisation de l'actine. Étant donné que la polymérisation de l'actine permet l'élargissement de l'épine et ainsi sa maturation en mushroom, l'augmentation de la densité des épines induite par l'E2 pourrait se faire via cette activation.

Il a été montré chez la ratte ovariectomisée que l'E2 et les GluNR étaient fortement impliqués dans la formation de la synapse. En effet, l'augmentation de la densité en épines dendritiques s'accompagne également d'un accroissement de l'expression des GluNR et des réponses médiées par les GluNR (Woolley et al. 1997). De plus, l'application d'antagonistes du GluNR tel que le D-2-amino-5-phosphonovalérate (APV) empêche la prolifération des épines dendritiques induite par l'application d'E2 (Woolley & Mcewen 1994).

c) *Neurogénèse*

Parmi les rats n'ayant pas subi de gonadectomie, les femelles en proestrus présentent plus de prolifération cellulaire que les males (Tanapat et al. 1999). La prolifération cellulaire est aussi plus importante chez les femelles en proestrus que celles en estrus ou en diestrus, suggérant que des niveaux élevés d'œstrogènes ou de progestines augmenteraient la neurogénèse chez les femelles (Tanapat et al. 1999). Cette notion est également étayée par l'observation que l'ovariectomie réduit de façon significative la prolifération cellulaire et augmente le nombre de cellules pyknotiques en dégénérescence (Tanapat et al. 2005). L'apport exogène d'E2 module la neurogénèse dans le gyrus denté en régulant la prolifération cellulaire, ces effets varient néanmoins en fonction de la dose, le genre, l'âge ou la durée de l'ovariectomie. De manière générale, une seule exposition brève à l'E2 augmente transitoirement la prolifération cellulaire dans le gyrus denté de rattes ovariectomisées (Banar et al. 2001). Au-delà de la prolifération cellulaire, quelques rapports indiquent que de apports aigues ou chronique en E2 augmentent également la survie cellulaire et réduisent le nombre de cellules pyknotiques en dégénérescence (McClure et al. 2013). D'autre part, ERa et ERb semblent médiés les effets de l'E2 sur la neurogénèse hippocampique puisque la simple injection de leur agoniste permet d'augmenter la prolifération cellulaire chez des rattes ovariectomisées (Mazzucco et al. 2006).

Enfin, l'ovariectomie à long-terme réduit la neurogénèse et empêche un traitement estrogénique aigue d'augmenter la prolifération cellulaire (Tanapat et al. 2005), ce qui est cohérent avec l'effet délétère de l'ovariectomie à long-terme sur la LTP et la mémoire (Smith et al. 2010).

▪ Chez les mâles

Contrairement aux effets bénéfiques de l'E2 sur la neurogénèse chez les ratte, un traitement aigu en E2 chez les males n'augmente pas la prolifération cellulaire. La castration chez le rat male réduit significativement la survie des cellules âgées de 30 jours, mais n'affecte pas la prolifération. Contrairement aux effets chez la ratte, ni l'E2 ou l'E2-benzoate n'augmente la prolifération ou la survie cellulaire chez les mâles castrés que ce soit chez le rat ou la souris (Spritzer & Galea 2007; Zhang et al. 2010; Barker & Galea 2008). En revanche, des traitements chroniques ou aigus en testostérone augmentent la néoneurogénèse de façon androgène receptor dépendant chez des rats castrés (Spritzer & Galea 2007; Hamson et al. 2013). En revanche, il a été montré chez la souris male que la survie cellulaire était augmentée par un traitement à la progestérone mais pas à la testostérone. D'autre part, les effets de la progestérone sont bloqués par les inhibiteurs d'ERK et de la PI3K (Zhang et al. 2010), suggérant un rôle important des voies rapides de signalisation intra-cellulaires. Ainsi, ces résultats montrent un rôle important des androgènes et de la progestérone, mais pas des estrogènes, dans la néoneurogénèse hippocampique.

4. Mécanismes mnésiques altérés par le vieillissement

a) *Épines dendritiques*

Des modifications dans la densité des épines dendritiques ont été rapportées dans certaines régions chez des sujets âgés. Précisément, ces altérations ont été observées dans le cortex moteur chez l'Homme (Nakamura et al., 1985), le cortex préfrontal chez le macaque (Duan et al., 2003) et la sous-région CA1 de l'hippocampe chez la souris. Concernant cette dernière région, il est à noter que l'apprentissage spatial en piscine de Morris entraine une augmentation de la densité d'épines dendritiques chez le rat mâle jeune (Moser et al., 1994) et que la diminution des épines dendritiques basales chez les individus âgés corrèle avec leurs déficits d'apprentissage spatial (von Bohlen und Halbach et al., 2006).

Il apparait que chez les animaux âgés, l'E2 n'a pas le même effet que chez les animaux jeunes. En effet, si un traitement à l'E2 entraîne une augmentation de la densité des épines dendritiques dans le CA1 chez une jeune ratte ovariectomisée, ce n'est pas le cas chez une ratte âgée ovariectomisée (Adams, Shah, et al. 2001). En revanche, le nombre d'épines dendritiques sur les neurones granulaires du DG est augmenté par l'E2 chez des rattes âgées ovariectomisées (Miranda et al. 1999). A notre connaissance, il n'existe pas d'étude chez la souris femelle ou male ayant étudié les effets d'une supplémentation en E2 sur les altérations induites par le vieillissement en termes d'épines dendritiques.

b) *LTP/LTD*

Au cours du vieillissement, s'il n'y a généralement pas d'altération des mécanismes d'expression, ni de modifications de l'amplitude de la LTP ou de la LTD, leurs seuils d'induction sont en revanche déplacés (Foster 1999). En effet, le seuil d'induction de la LTP augmente avec l'âge, de telle sorte qu'afin d'obtenir une même amplitude de réponse, une stimulation accrue est nécessaire. Dans le même temps, le seuil de déclenchement de la LTD est abaissé chez les animaux âgés, facilitant son induction (Burke & Barnes 2006). Ces données montrent ainsi que chez l'animal âgé, la balance LTP/LTD est altérée, et ce, au détriment de la LTP.

L'hypothèse d'une dérégulation calcique sous-tendant les altérations de plasticité liées à l'âge a été avancée (Foster 1999; Foster & Norris 1997). En effet, une transition vers d'autres sources de calcium que celle provenant des GluNR pourrait contribuer aux modifications de seuil d'induction de la plasticité synaptique. Au cours du vieillissement, l'activité des GluNR décroît et la proportion du calcium provenant des VDCC et ICS augmente dans la région CA1 de l'hippocampe. De plus, contrairement à la GluNR-LTP, la VDCC-LTP a tendance à être accrue chez les animaux âgés (Boric et al. 2008; Robillard et al. 2011). Il existe deux mécanismes qui contribuent à la diminution liée à l'âge de la GluNR-LTP :

- La diminution de la fonctionnalité des GluNR : dans de nombreuses régions cérébrales, y compris l'hippocampe, l'affinité de liaison du glutamate aux GluNR diminue. Cependant, il est possible que des modifications dans l'état fonctionnel des récepteurs ainsi que la

régulation de leur activité expliquent la diminution de la capacité de liaison des ligands au récepteurs, et ainsi la diminution de la fonctionnalité des GluNR (Magnusson et al. 2010).

- L'augmentation de l'inhibition active des GluNR par les VDCC et l'ICS via les variations du potentiel de membrane. Le relargage du calcium depuis les ICS ou l'influx calcique au travers des VDCC active des canaux potassiques calcium dépendants à faible conductance (canaux SK). Cette activation entraîne la sortie d'ions potassium et ainsi une hyperpolarisation des dendrites, inhibant les GluNR via le bloc Mg^{2+} (Kumar & Foster 2004).

En ce qui concerne la LTD, qui est facilitée chez l'animal âgé, il existe également une transition d'une GluNR-LTD vers une VDCC-LTD (Ahmed et al. 2011; Norris et al. 1996; Kumar & Foster 2005).

L'ensemble des données concernant les modifications liées à l'âge de la balance LTP/LTD suggèrent que l'altération de la plasticité synaptique au cours du vieillissement sous-tendrait les déficits mnésiques chez les sujets âgés (pour revue : Foster 2013).

Il existe peu d'études concernant l'effet de l'E2 sur la plasticité synaptique chez l'animal âgé. En électrophysiologie, il a été montré que la LTD, induite sur tranche de cerveau par stimulation électrique, était supprimée après ajout d'E2 (Vouimba et al. 2000). En revanche, un certain nombre d'études ont examiné l'effet de l'E2 sur les protéines de la plasticité synaptique. Tout d'abord, l'E2 affecte les GluNR. Il a été notamment montré que chez les rattes âgées ovariectomisées, l'E2 induit l'augmentation du nombre de GluN1 par synapse (Adams, Morrison, et al. 2001; Gazzaley et al. 1996). De plus, si l'E2 n'a pas d'effet sur l'expression de GluN2A et GluN2B chez les rattes âgées, il restaure le nombre de GluN2B dans la partie extra-synaptique se traduisant par un profil d'expression plus « jeune ». De plus, ce profil serait responsable du maintien d'une bonne fonction cognitive (Adams et al. 2004; Tang et al. 1999). Il a également été montré que l'E2 activait CREB et CamKII, deux protéines responsable de la LTP (Spencer et al. 2008). Ainsi, l'ensemble de ces données suggère que l'E2 chez les animaux âgés favorise l'induction de la LTP au détriment de la LTD.

L'ensemble de ces données suggèrent que l'E2 induit un déplacement de la balance LTP/LTD vers la LTP chez les animaux âgés. Cette normalisation pourrait en partie sous-tendre les effets bénéfiques de l'E2 sur le vieillissement cérébral et aider à préserver la fonction hippocampique au cours du vieillissement.

c) *Synapses*

Le vieillissement s'accompagne d'une modification de la densité des synapses et des épines dendritiques, mais qui ne semble pas concerner l'intégralité du cerveau. Tout d'abord, les synapses voient leur nombre diminuer avec l'âge. Une étude de microscopie électronique montre que chez le rat âgé on observe une diminution de 27% du nombre de synapses axo-dendritiques dans le gyrus denté en comparaison avec des jeunes rats (Bondareff and Geinisman, 1976). De plus, il a été montré que des déficits de mémoire spatiale seraient reliés à une réduction des synapses entre cellules granulaires et voie perforante (Geinisman et al., 1986).

De la même façon que pour les épines dendritiques, la supplémentation en E2 chez des rattees âgées ovariectomisées n'augmente pas dans le CA1 le nombre de synapses comme c'est le cas chez les jeunes rattees ovariectomisées (Adams, Shah, et al. 2001). En revanche, si les synapses sont moins nombreuses, l'E2 entraîne une augmentation du nombre de GluNR présents au niveau synaptique. Cette augmentation pourrait sous-tendre les effets bénéfiques de l'E2 sur la fonction hippocampique (Adams 2003)

d) *Neurogénèse*

La neurogénèse adulte décroît avec l'âge dans l'hippocampe à la fois chez l'Homme et l'animal (Kuhn et al. 1996; Gould 1999; Eriksson et al. 1998; Jonathan R Epp et al. 2013; Jonathan R. Epp et al. 2013). Chez la ratte, la neurogénèse décline dès le milieu de l'âge adulte (10-12 mois) puis se stabilise, puisque les niveaux de neurogénèse sont identiques chez des rongeurs de 27 mois et de 10-12 mois, que ce soit chez les mâles ou chez les femelles (Rao et al. 2005; Rao et al. 2006). La diminution de la neurogénèse avec l'âge est largement due à la diminution du nombre de

précurseurs en division, conduisant à une diminution de la prolifération cellulaire (Olariu et al. 2007).

Il est à noter que les œstrogènes semblent réguler différemment la neurogénèse en fonction de l'âge de la ratte. Une forte dose aigue de 17β -œstradiol ou d'œstradiol benzoate (10 μ g) augmente la prolifération cellulaire chez de jeunes femelles mais pas chez des femelles plus âgées (10-12 mois) (Tanapat et al. 1999; Barha et al. 2009; Chiba et al. 2007; Barha & Galea 2011) . En revanche, une autre étude a montré qu'une dose chronique d'œstradiol (150 μ g) augmentait la prolifération cellulaire chez la ratte âgée (22 mois). Ces études suggèrent que l'hippocampe devient insensible à des doses aiguës d'estradiol chez la ratte âgées. En ce qui concerne les mâles, le potentiel impact des œstrogènes sur la neurogénèse des sujets âgés reste à déterminer.

II. ŒSTRADIOL ET MEMOIRE

Comme nous l'avons montré dans le chapitre précédant, l'E2 affecte les mécanismes de base de la plasticité synaptique, supposés sous-tendre les processus d'apprentissage et de mémoire. Dans ce chapitre, nous ferons un état des lieux des études faites chez l'animal puis chez l'Homme, concernant les effets de l'E2 sur la cognition.

A. La mémoire est une fonction polymorphe : les différents types de mémoires

Les effets de l'E2 sur la cognition sont très divers. Afin de comprendre ces données complexes, il convient de prendre en compte l'aspect polymorphe de la mémoire. En effet, la mémoire peut être subdivisée en sous-types de mémoire, qui dépendent de territoires cérébraux distincts. Ainsi, les effets de l'E2 dépendent de la tâche mnésique concernée et du territoire cérébral sur lequel elles reposent. Cependant, il est vraisemblable que l'action de l'E2 résulte de l'interaction entre les diverses régions cérébrales telles que le striatum, l'hippocampe, le basal forebrain et le cortex pré-frontal.

1. Systèmes de mémoires

Les études chez l'Homme et chez l'animal ont montré que la mémoire n'est pas une entité unitaire mais un ensemble de modules de stockage appelés systèmes. Chaque système de mémoire se définit à la fois par la nature et la durée de rétention des informations qu'il stocke, ainsi que par la manière dont ces informations sont traitées et par les structures cérébrales impliquées dans ce traitement. Il est communément admis que la mémoire se divise en deux grandes catégories : la mémoire à long terme et la mémoire à court terme.

a) *La Mémoire à long terme*

La mémoire à long terme (MLT, Figure 10) permet le stockage et la conservation d'informations à long terme (Atkinson & Shiffrin, 1968 ; Baddeley 2000).

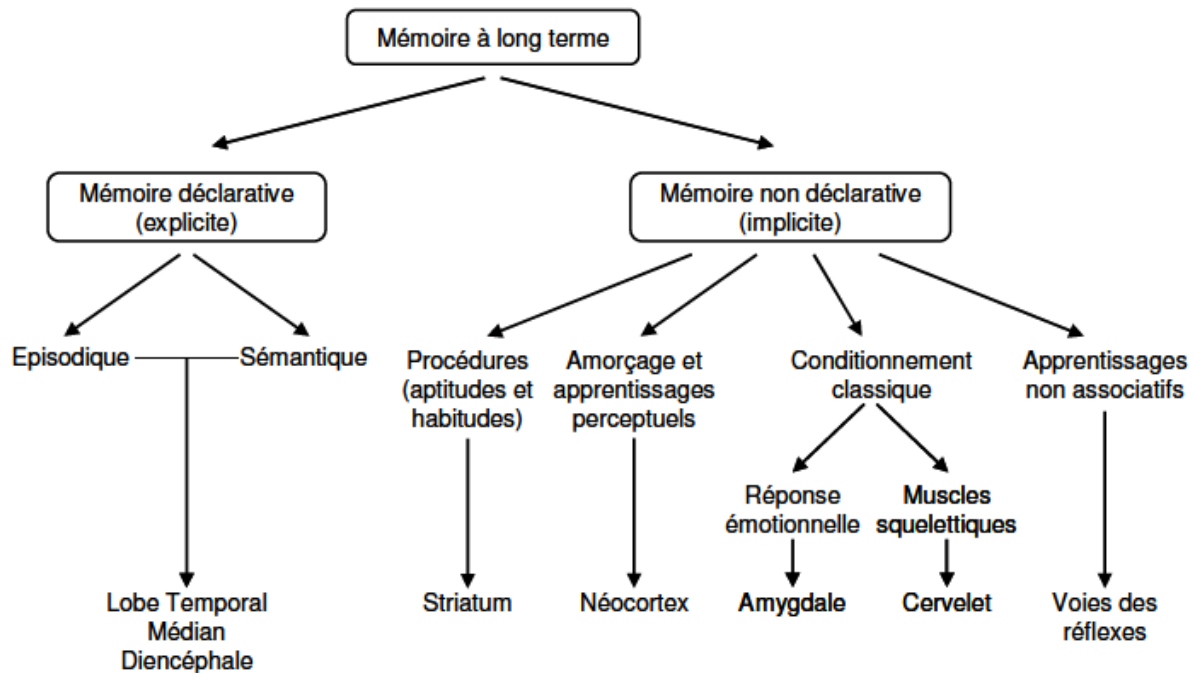


Figure 10 : Taxonomie des systèmes de mémoire à long terme (Squire 2004)

Cette dichotomie a été effectuée sur la base des caractéristiques opérantes et du type d'informations traitées par chaque système, ainsi que des structures qui les sous-tendent.

Si plusieurs modèles existent aujourd'hui pour proposer des dissociations au sein de la MLT, ils convergent vers une dissociation entre (1) une mémoire explicite ou déclarative qui est constituée de faits et de connaissances générales directement accessibles à la conscience et verbalisables et (2) une mémoire implicite, procédurale ou non-déclarative qui se réfère à des apprentissages dont le contenu n'est pas accessible à la conscience (Squire & Zola 1998; Squire & Zola 1996).

▪ La mémoire déclarative

La mémoire déclarative humaine nous permet de nous souvenir consciemment des faits, des événements et des expériences vécues. Son contenu est verbalisable.

Elle comprend deux sous-catégories. La mémoire épisodique se réfère à la formation et la conservation de souvenirs autobiographiques, d'événements hautement indexés dans l'espace, le temps mais aussi émotionnellement. La mémoire sémantique regroupe l'ensemble des connaissances générales du sujet (Tulving 1984; Squire et al. 1993). Seule la mémoire épisodique

(Tulving 2002) implique une expérience de reviviscence du contexte d'encodage, une prise de conscience phénoménologique de soi, tandis que la mémoire sémantique implique un sentiment de savoir sans souvenir conscient associé.

Dans le modèle proposé par Squire en 1993, ces deux types de mémoires dépendraient du lobe temporal médian. En réalité il apparaît que la formation de souvenirs en mémoire épisodique requiert l'intégrité fonctionnelle de l'hippocampe et du cortex frontal. Il y aurait ainsi un va et vient permanent entre l'hippocampe et les structures corticales pour chacune des informations traitées. Selon la littérature, cet ensemble de structures servirait de support à la formation et la récupération d'informations en mémoire épisodique (Eichenbaum 2000; Kalpouzos et al. 2010; Ranganath & Ritchey 2012).

Le réseau cortical de la mémoire sémantique reposerait sur des régions néocorticales spécialisées (couleurs, son, mots etc...) qui seraient connectées à des zones de convergence principalement localisées dans le lobe temporal latéral antérieur. Ces zones de convergences pourraient représenter différentes catégories sémantiques (Patterson et al. 2007).

▪ **La mémoire non déclarative**

Par opposition à la mémoire déclarative, la mémoire non déclarative est une forme de mémoire non verbalisable, non consciente, on parle de mémoire implicite. La mémoire non déclarative change nos comportements (mémoire procédurale, conditionnement classique) ou nos perceptions (e.g. vitesse et/ou précision dans l'identification d'un stimulus) sans que nous soyons conscients de la cause de ces changements ; elle est préservée dans le syndrome amnésique et son fonctionnement dépend, en grande partie, de structures telles que le néocortex, le striatum, l'amygdale ou le cervelet, régions cérébrales différentes de celles impliquées dans la mémoire déclarative.

b) *La Mémoire à court terme / mémoire de travail*

La mémoire à court terme (MCT), fait référence à un type de mémoire qui permet de maintenir et de réutiliser une quantité limitée d'informations de façon très temporaire, jusqu'à ce qu'elle soit oubliée ou au contraire intégrée en mémoire à long terme, de façon stable et potentiellement permanente.

La notion de mémoire à court terme a ensuite été profondément renouvelée par le concept de mémoire de travail (MDT), introduit par Baddeley et Hitch (1974). Cette composante de la mémoire à court terme, est quant à elle classiquement définie comme un système à capacité limitée, permettant de maintenir temporairement des informations et les manipuler pendant la réalisation d'une tâche de compréhension, de raisonnement ou de résolution de problème.

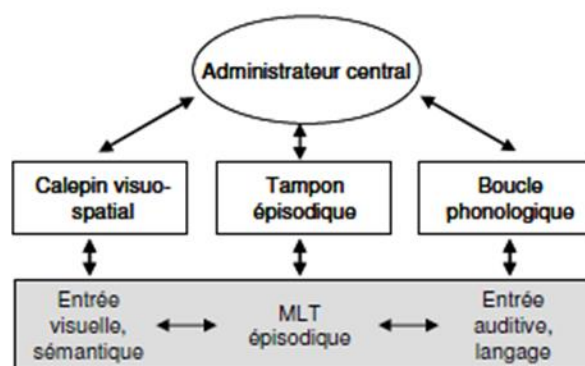


Figure 11 : Le modèle de mémoire de travail d'A. Baddeley.

La surface grisée représente des systèmes cognitifs « cristallisés » capables d'accumuler des connaissances à long terme. Les surfaces non grisées représentent des capacités « fluides » (comme l'attention et le stockage temporaire) qui ne sont pas modifiées par l'apprentissage (d'après Baddeley 2000). MLT : mémoire à long terme.

Elle comprend plusieurs sous-systèmes (Figure 11) : 1/ l'administrateur central qui sélectionne, coordonne et contrôle les opérations du traitement de l'information ainsi que la surveillance ou la gestion des ressources attentionnelles. 2/ deux systèmes esclaves : la boucle phonologique qui manipule les informations sonores, et constitue un espace d'auto-répétition mentale et le calepin visuo-spatial qui manipule les informations visuelles et spatiales.

Au niveau neurobiologique, l'administrateur central serait dépendant du cortex frontal et les systèmes esclaves impliqueraient des aires cérébrales dépendantes du type d'information traitée (cortex inférotemporal, cortex pariétal et cortex postérieur). La MDT dépendrait de l'intégrité fonctionnelle du cortex frontal (Gisquet-Verrier & Delatour 2006; pour revue, Baddeley 2000).

Le tampon épisodique est le quatrième sous-système introduit en 2000 par Baddeley. C'est un système de stockage de l'information à capacité limitée qui permettrait de lier et d'associer (i.e, binding) les informations provenant des systèmes esclaves ainsi que des sites de stockage de l'information à long terme dans le but de former des représentations épisodiques unitaires (Guillaume et al. 2009). Le tampon épisodique est impliqué dans la réalisation de nombreuses tâches cognitives et entretient des relations complexes avec les systèmes de mémoire à long terme.

L'imagerie cérébrale est un moyen permettant de « voir notre esprit ». Plusieurs techniques ont été développées dans le but d'étudier de façon non invasive notre cerveau lorsque nous sommes en train de « penser ». Basées sur la détection de la consommation d'oxygène, ces approches permettent d'observer les variations d'activité des régions cérébrales au cours d'une tâche. Ces approches sont également utilisées afin de caractériser les modifications d'activité cérébrales survenant au cours du vieillissement afin de les relier aux déficits mnésiques constatés.

Les études d'imagerie cérébrale proposent pour certaines que les fonctions du buffer épisodique seraient sous tendues par le cortex préfrontal (Baddeley 2000). Parallèlement, des études plus récentes montrent que le lobe temporal médian et en particulier l'hippocampe serait impliqué dans des tâches de mémoire de travail (Schon et al. 2009) dès lors que des associations entre items provenant de différentes sources seraient requises (Davachi & Wagner 2002; Berlingeri et al. 2008; Piekema et al. 2010; Piekema et al. 2009).

c) *La théorie du fonctionnement multiple et parallèle des systèmes (Multiple Parallel Memory Systems, MPMS)*

Les travaux de White et McDonald (2002), qui synthétisent les données obtenues chez l'animal quant aux interactions pouvant exister entre systèmes, ont conduit à l'établissement de la théorie du fonctionnement multiple et parallèle des systèmes de mémoire (« Multiple Parallel Memory Systems » ou MPMS). Sans exclure la présence d'autres structures, les auteurs se concentrent sur trois systèmes principaux :

- Le système hippocampique traite les associations stimulus-stimulus. L'hippocampe est indispensable à l'encodage d'informations nécessaires à l'établissement de cartes cognitives spatiales et est capable d'associer ces cartes spatiales à des événements particuliers (notamment à des récompenses) survenant dans cet environnement. L'état affectif lié à l'administration d'une récompense ou d'une punition n'est intégré par l'hippocampe que comme un stimulus faisant partie de l'ensemble des représentations relationnelles entre les stimuli.
- Le système striatal associe simplement un stimulus à une réponse motrice (association stimulus-réponse). La contiguïté entre le stimulus et le renforcement est cruciale lors de l'établissement de l'association. Cependant, l'entraînement aboutira à une réponse inconsciente et habituelle et, au fur et à mesure de l'apprentissage, l'absence de renforcement ne perturbera plus l'expression du comportement.
- Le système amygdalien encode les associations stimulus-renforcement, positif ou négatif. L'amygdale met en relation un état affectif à un instant *t* avec des événements se produisant au même moment. Ici, le renforcement est capital puisque s'il est absent, le comportement s'éteindra.

Selon la théorie MPMS (White & McDonald 2002), chacun des trois systèmes décrits reçoit des informations similaires mais les traite selon des mécanismes opératoires différents. Ces systèmes sont activés en même temps et fonctionnent en parallèle au début d'un apprentissage pour permettre l'encodage des items selon les trois modes d'associations. La sélection du système prépondérant pour la réponse se fera ensuite par évaluation de la pertinence du type

d'association afin d'exprimer un comportement adapté. Chaque situation d'apprentissage serait alors caractérisée par une configuration particulière d'activité au sein de ces trois systèmes.

Même si leur théorie n'est pas incompatible avec la notion de dichotomie entre systèmes de mémoire, White et McDonald évoquent la possibilité d'interactions entre ces systèmes. Bien qu'ayant des compétences distinctes, ces derniers ne sont pas indépendants et peuvent interagir en coopération ou en compétition. La connectivité anatomique directe ou indirecte existant entre les trois structures évoquées au-dessus et la présence de structures de plus haut niveau (notamment le cortex préfrontal) recevant des projections de ces différents systèmes confortent cette hypothèse.

2. Effet du vieillissement sur la fonction mnésique et altérations systémiques associées.

Le vieillissement correspond à l'ensemble des processus physiologiques et psychologiques qui modifient la structure et les fonctions de l'organisme à partir de l'âge mûr. Il est la résultante des effets intriqués de facteurs génétiques (vieillesse intrinsèque) et de facteurs environnementaux auxquels est soumis l'organisme tout au long de sa vie. Le cerveau, est particulièrement sensible aux effets du vieillissement. Parmi les atteintes cérébrales, la mémoire sous sa forme déclarative est une fonction particulièrement touchée. Ce déficit serait la résultante d'altérations multiples aboutissant à une perturbation du fonctionnement hippocampique, principal substrat neurobiologique de la mémoire déclarative.

a) *La mémoire déclarative*

D'une manière générale, la composante épisodique de la mémoire déclarative se révèle particulièrement affectée par le vieillissement normal, la composante sémantique étant relativement épargnée (Grady & Craik 2000; Hedden & Gabrieli 2004). Ainsi, les événements autobiographiques récents sont moins bien mémorisés chez les personnes âgées (Piolino et al. 2002). Ces dernières sont également très affectées dans leur capacité à se rappeler

consciemment des souvenirs d'évènements passés, et en particulier du contexte dans lequel ils ont eu lieu. Elles présentent des difficultés dans l'association des événements entre eux (Naveh-Benjamin 2000) et dans l'association des différentes informations composant un événement afin d'en construire une représentation cohérente (Chalfonte & Johnson 1996).

Parmi les composantes épargnées par le vieillissement, on peut citer la mémoire de reconnaissance (Nyberg et al. 2012; Piolino et al. 2002). Les personnes âgées seraient peu affectées dans la reconnaissance d'objets ou de personnes basée sur l'impression de familiarité (Grady & Craik 2000).

De plus, les différentes étapes de la mémoire déclarative ne sont pas altérées avec la même intensité. Les processus de rappel s'avèrent moins altérés que les processus d'encodage (Friedman et al. 2007). Les défauts d'encodage ont pu être rapprochés d'une altération de l'activité hippocampique (Grady et al. 1995; Geinisman et al. 1995), et préfrontale (Cabeza et al. 2002).

Au niveau systémique, il a été montré que les sujets âgés présentaient une moindre activation des régions impliquées dans le fonctionnement de la mémoire épisodique, à savoir la formation hippocampique et le PFC (Prefrontal Cortex) (Grady et al. 1995). Les données récentes sur l'activation cérébrale, mettent également en évidence une sous activation au niveau du lobe temporal médian ainsi qu'une réduction de l'activité du cortex frontal gauche chez les adultes âgés notamment lors de l'encodage d'informations épisodiques (Craik et Jennings, 1992, cité dans (Marigetto et al. 1999; Daselaar et al. 2006; pour revue Cabeza 2008).

b) *La mémoire non déclarative*

Les formes de mémoire non-déclaratives se révèlent globalement peu atteintes au cours du vieillissement. La mémoire procédurale n'est que très peu affectée (Churchill et al., 2003), de même que l'amorçage (Bergerbest et al., 2009), même si certains déficits dus à des problèmes attentionnels ont été rapportés (Geraci and Barnhardt, ; Kennedy et al., 2007). Enfin, la mémoire émotionnelle est qualitativement modifiée par le vieillissement. Les sujets âgés montrent une préférence accrue pour les stimuli positifs par rapport aux individus jeunes (Leigland et al. 2004),

ainsi qu'un meilleur souvenir des visages montrant des émotions positives que des visages dégageant des émotions négatives (Mather & Carstensen 2003).

c) *La mémoire à court terme/de travail*

L'altération de la mémoire de travail est l'une des caractéristiques principales du vieillissement normal et comprend deux dimensions essentielles, la capacité de maintien et celle d'organisation des informations. Même si des déficits de maintien ont pu être montrés, c'est essentiellement dans ses aspects organisationnels que la mémoire de travail est affectée au cours du vieillissement. En effet, le rappel des informations se trouve particulièrement altéré lorsque l'on perturbe l'individu en lui fournissant d'autres informations, interférentes (Grady and Craik, 2000; Hedden and Gabrieli, 2004). Cette sensibilité des individus âgés aux interférences est l'une des raisons de leurs performances réduites dans les tests de mémoire de travail (Zacks et al. 1999; Braver & West 2008).

Sur le plan neurobiologique, l'altération de la mémoire de travail serait liée au dysfonctionnement du cortex frontal qui présente également une atrophie au cours du vieillissement. Les différences observées entre les sujets jeunes et âgés concernent principalement les régions préfrontales dorso-latérales. Ces régions sont recrutées notamment dans les tâches nécessitant la manipulation d'item, ou lorsque la charge d'information en mémoire de travail est importante. En parallèle, les sujets âgés se différencient des sujets jeunes par une augmentation de l'activité neuronale dans le cortex préfrontal dorsal gauche (pour revue, Rajah & D'Esposito 2005). Cette augmentation pourrait représenter un mécanisme compensatoire de la part des sujets âgés résultant du fonctionnement réduit de leur cortex préfrontal droit. Mais ce phénomène n'a pas été retrouvé dans toutes les études. En effet, dans des tâches d'empan verbal et spatial, (Reuter-Lorenz & al 2000, cité dans Collette & Van der Linden 2005) observent chez les sujets âgés une activation bilatérale au sein du cortex préfrontal dorsolatéral pour les deux types de tâches alors que les sujets jeunes activent préférentiellement le cortex préfrontal dorsolatéral gauche pour la tâche verbale et son homologue droit pour la tâche spatiale.

B. Effets de l'œstradiol sur la fonction mnésique

1. Données chez l'animal

Comme nous l'avons abordé dans le chapitre précédent, l'E2 module le fonctionnement des neurones notamment dans l'hippocampe. Brièvement, l'E2 augmente la densité des épines dendritiques ainsi que la LTP dans le CA1 et favorise la neurogénèse hippocampique. Ainsi, l'E2 régule de multiple aspects de la morphologie et du fonctionnement hippocampique, critiques à la mémoire à long-terme et chez les femelles, il a été montré que l'E2 influençait la mémoire via son action sur les neurones (Wise et al. 2001; Spencer et al. 2008). Chez l'animal, les données concernant les effets mnésiques de l'E2 ont essentiellement été recueillies sur des femelles jeunes ou âgées mais bien souvent ovariectomisées. Il n'existe que très peu de données chez les mâles et notamment chez les mâles au cours du vieillissement.

Les données montrant la pertinence physiologique des effets de l'E2 découlent d'études sur de jeunes femelles rongeurs ou singes au cours du cycle ovarien. Il a été montré que les performances dans des tâches hippocampe-dépendantes variaient au cours du cycle ovarien. Bien qu'une corrélation positive entre de hauts niveaux d'E2 et la formation de la mémoire hippocampique ait été rapportée dans de nombreuses études, cette association n'est pas toujours observée. Ainsi, chez la souris, la mémoire spatiale en piscine de Morris ou en reconnaissance d'objet est améliorée au cours du proestrus en comparaison l'œstrus (Frick & Berger-Sweeney 2001). De plus, les rattes en phase de proestrus utilisent préférentiellement une stratégie dépendante de l'hippocampe alors qu'en œstrus choisissent une stratégie dépendante du striatum pour résoudre une tâche en labyrinthe en croix (Korol 2004). En revanche, certaines études ont montré des effets inverses, c'est-à-dire un effet négatif sur la mémoire spatiale en piscine de Morris (Pompili et al. 2010) ou pas d'effet des fluctuations hormonales sur les performances en mémoire spatiale en piscine de Morris, mémoire de référence en labyrinthe radiaire, reconnaissance sociale, ou reconnaissance d'objet (Frye 1995; Warren & Juraska 1997; Berry et al. 1997). L'étude des relations entre les fluctuations en E2 et la mémoire est rendue difficile par la courte durée du cycle (4-6 jours) associée à des changements très rapides des niveaux circulants en hormones sexuelles. Afin de palier à cette difficulté, la majorité des études

a été faite chez des femelles rongeurs ovariectomisées traitées à l'E2 de façon chronique ou aiguë, administré au niveau systémique ou cérébral.

Les effets des œstrogènes sur la mémoire dépendent de la tâche de mémoire ainsi que sur les territoires cérébraux auxquels sont associées ces tâches. Ainsi, l'E2 améliore la mémoire hippocampo-dépendante chez les femelles rats et souris jeunes et âgées (Korol & Kolo 2002; Li et al. 2004; Luine et al. 1998; Sandstrom & Williams 2004). En effet, un traitement à l'E2 d'au moins 48h augmente les performances dans des tâches de mémoire spatiale, de reconnaissance d'objet, de reconnaissance sociale, d'évitement passif et de conditionnement « eyeblink ». Cependant, toutes les études ne rapportent pas un effet positif sur la mémoire dépendante de l'hippocampe (Galea et al. 2001). La comparaison des diverses études suggèrent que les effets bénéfiques de l'E2 dépendent de nombreux éléments du protocole expérimental dont la dose, l'âge des animaux au début du traitement, la durée et le type de traitement, la durée de la déprivation en hormones avant le début du traitement, le type de mémoire testée et la difficulté de la tâche (Pour revue : Frick 2009b). D'autre part, l'E2 améliore la consolidation de la mémoire spatiale, puisque un traitement à l'E2 chez des ratte ovariectomisées administré après l'entraînement améliore également les performances en piscine de Morris, dans une tâche de placement d'objet et en reconnaissance d'objet (Packard & Teather 1997; Fan et al. 2010; Fernandez et al. 2008; Lewis et al. 2008)

Outre les effets sur les mémoires dépendantes de l'hippocampe, il a également été montré qu'une supplémentation en E2 affectait d'autres types de mémoires. L'E2 détériore les performances dans des tâches dépendantes du striatum et diminue l'utilisation de la stratégie procédurale dans un labyrinthe en croix. améliore les performances dans des tâches dépendantes du PFC notamment en mémoire de travail spatiale ou non, chez les ratte jeunes et âgées ovariectomisées (Gibbs 1999; Luine & Rodriguez 1994; Korol 2004; Davis et al. 2005). Chez des ratte, alors que l'E2.

Chez le mâle, l'E2 améliore l'apprentissage et la mémoire dépendants de l'hippocampe chez des souris âgées femelles et mâles (Frye et al. 2005). L'E2 exerce également un effet positif sur la prévention ainsi que la récupération des fonctions après des dommages suite aux ischémies

(Garcia-Segura et al. 1999; Yang et al. 2003). En revanche l'E2 n'a pas d'effets sur la détérioration des performances en labyrinthe en T après gonadectomie chez des rats âgés (Kritzer et al. 2001) et seule la testostérone – et non l'E2 – normalise la densité des dendrites après gonadectomie (Leranth et al. 2003).

2. Données chez l'Humain

▪ Chez la femme

Les études cliniques ont montré que les performances cognitives chez les femmes déclinaient suite à la carence endogène en E2 de la ménopause. L'effet bénéfique de l'E2 sur les mécanismes de base de l'apprentissage et de la mémoire suggère que le déclin mnésique lié à l'âge pourrait être contrecarré par des Traitements Hormonaux Substitutifs (THS) (Sherwin 1988). Cependant, des rapports publiés suite à la grande étude épidémiologique Woman's Health Initiative (WHI) ont remis en question les effets bénéfiques de la supplémentation en E2 après la ménopause. La WHI a avait initialement été mise en place pour tester les effets bénéfiques vasculaire du Traitement Hormonal Substitutif américain qui est basé sur des estrogènes conjugués d'origine équine (extrait de l'urine de jument) additionné ou non de progestagènes. Cette étude a montré ce que l'on savait déjà sur les cancers du sein *i.e.* que le risque augmentait avec la prise du traitement, mais il a aussi montré une augmentation des risques vasculaires globalement et des AVC en particulier. L'étude a été arrêtée au bout de 8 années de suivi alors qu'elle aurait dû durer 20 ans. Une étude ancillaire à la WHI a été menée sur les performances mnésiques : la WHIM. Elle a montré qu'en plus de n'avoir aucun effet sur la prévention du déclin mnésique lié à l'âge chez les femmes ménopausées, le traitement à l'E2 induisait une légère augmentation du risque de déficits mnésique ainsi que des démences (Rapp et al. 2003; Shumaker et al. 2003; Shumaker et al. 2004). Une étude complémentaire a également démontré que ce même traitement avait un effet délétère sur la mémoire verbale et n'avait – entre autre – pas d'effet sur des tests d'attention, la mémoire de travail, les capacités spatiales et la dépression (Resnick et al. 2006). Ces résultats sont en franc désaccord avec les résultats précédemment obtenus montrant que la perte d'hormones ovariennes induisait un risque accru de maladie d'Alzheimer et qu'un traitement œstrogénique réduisait ce risque. De plus, l'E2 réduit les déficits dans différents types

de mémoire chez des femmes ménopausées atteintes ou non de la maladie d'Alzheimer (pour revue voir Karyn M Frick, 2009a).

Les divergences entre les résultats obtenus dans l'étude du WHI et ceux attendus peuvent être expliquées par le fait que la WHI a utilisé des œstrogènes équin conjugués c'est-à-dire des œstrogènes (œstradiol, œstrone et œstriol) en mélange, chacun étant glucurono- ou sulfo-conjugué. Il se pourrait que cette combinaison d'hormones ne soit pas totalement capable de stimuler les mécanismes requis pour l'amélioration de la mémoire. Les effets délétères de cette étude doivent aussi être mis en relation avec une augmentation du risque thrombo-embolique caractérisé par une augmentation des pathologies cardiaques et des accidents vasculaires cérébraux. Certains auteurs pensent donc que la déficience mnésique des femmes de la WHI est plutôt secondaire à un problème vasculaire. De plus, la population était en surpoids à plus de 70% ce qui est aussi un facteur de risque vasculaire. Elles ont-elles aussi montrés une augmentation du risque des cancers du sein mais n'ont pas montré d'effet délétère sur la sphère vasculaire. Aucune donnée n'est hélas disponible sur la mémoire sur les cohortes de ces deux études.

Par ailleurs, le WHI a étudié des femmes qui étaient ménopausées depuis 10 voire 20 ans avant le début de la supplémentation, ce qui peut également être impliqué dans la nature des résultats observés. Il est maintenant clair que plus la durée entre l'arrêt de la production d'hormones endogènes et le début de la supplémentation est court et meilleurs seront les effets du traitement. Cette théorie est appelée le « healthy cell bias » de l'action des œstrogènes, et considère que les œstrogènes pourraient uniquement avoir des effets bénéfiques si les structures cérébrales sont intactes. En revanche, si les cellules sont déjà endommagées par une « hypo-œstrogénicité », l'effet des œstrogènes sera alors délétère (Adams, Shah, et al. 2001; Spencer et al. 2008; Frick 2008). Ceci implique qu'il existe une fenêtre critique de sensibilité aux œstrogènes après la ménopause, avant que les effets à long-terme de l'hypo-œstrogénicité ne deviennent irréversibles.

Chez la femme adulte, il existe également des variations de performances mnésiques au cours du cycle menstruel. Ainsi, il a été rapporté que la mémoire de travail verbale était améliorée pendant la période du cycle où les taux d'œstrogènes sont les plus forts (Hampson & Morley

2013). D'autre part, une majorité d'études ont montré un effet positif d'un traitement œstrogénique sur la cognition (Sherwin 2003). Notamment, l'utilisation d'E2 chez des femmes ménopausées est associée avec une amélioration de la mémoire de travail, de la mémoire verbale, et des fonctions visuospatiales (pour revue : Conrad & Bimonte-Nelson, 2010; Frick, 2009b, 2012).

▪ Chez l'homme

Lors du vieillissement, il existe chez la femme une ménopause qui se traduit par l'arrêt progressif de la production des hormones sexuelles, dont l'E2. En revanche, la diminution de la production des androgènes chez l'homme est beaucoup plus ignorée. Pourtant, il existe un déclin des taux de testostérone chez les hommes âgés et à 80 ans, 50% des hommes présentent un hypogonadisme, c'est-à-dire des taux de testostérone en dessous de 325ng/dL (Davidson et al. 1983; Vermeulen et al. 1991). La production totale d'E2 chez l'homme a été estimée à 35-45µg par jour, produit à 15-20% par les testicules (MacDonald et al. 1979; Hogervorst et al. 2004; Hogervorst 2013; Hijazi & Cunningham 2005). Les tissus adipeux viscéraux qui augmentent généralement avec l'âge chez l'homme sont responsables d'environ 40% de la production d'œstradiol (Gautier et al. 2013).

Puisque l'E2 est métabolisée à partir de la testostérone par l'aromatase, y compris dans le cerveau (Liu et al. 2007), il est probable qu'une diminution de sa production entraîne une diminution des niveaux d'E2. De plus, il se pourrait que la diminution des taux de testostérone chez les hommes âgés contribue au déclin mnésique lié à l'âge (pour revue Janowsky 2006).

Des taux bas de testostérone chez des hommes âgés ont été associés à une mauvaise mémoire verbale et spatiale et une supplémentation en testostérone améliore cette dernière. De plus, un bas niveau de testostérone serait un facteur de risque pour la maladie d'Alzheimer (Moffat, 2005). Cependant, ce dernier point est débattu, d'autres études n'ayant pas retrouvé ces associations. D'autre part, une supplémentation en testostérone augmente les performances en mémoire de travail – dans les tâches impliquant le lobe frontal – et la connaissance spatiale (Cherrier 2005, pour revue Janowsky 2006). Certaines études mentionnent que ce n'est pas la

testostérone en tant que telle qui est responsable de ces effets mnésiques mais que c'est plutôt l'E2 en tant que métabolite de la testostérone qui est l'inducteur secondaire de ces effets (Janowsky 2006).

L'effet de l'E2 sur le cerveau masculin est assez peu étudié. Chez l'homme, l'E2 améliore la mémoire déclarative (Cherrier 2005) et la mémoire épisodique (Janowsky 2006) mais détériore la mémoire de travail (Janowsky et al. 2000). Ces résultats montrent que l'E2 pourrait être une source de renforcement de la cognition chez l'homme mais ces effets pourraient se réduire à certains processus mnésiques dépendants de systèmes cérébraux particuliers.

Ces données montrent que chez le mâle, comme chez la femelle, l'E2 exercerait un effet protecteur contre le vieillissement uniquement sur la fonction hippocampique (Janowsky 2006).

- Etudes d'imagerie chez l'Homme et l'animal

Un petit nombre d'étude a examiné en IRM fonctionnelle (fMRI) l'effet de l'E2 sur les activités cérébrales. En effet, la première s'est intéressait à la mémoire de travail (Shaywitz et al. 1999). La prise d'œstrogènes était associée chez des femmes ménopausées à une augmentation d'activation du lobe pariétal inférieur notamment lors des processus de stockage verbal. L'activation du gyrus frontal supérieur droit était augmentée lors des processus de rappel et de l'hémisphère gauche lors des processus d'encodage. Les performances cognitives étaient identiques avec ou sans œstrogènes. La deuxième étude a montré un effet positif des œstrogènes sur les régions temporo-pariétales (Stevens et al. 2005). Cette étude qui utilise un paradigme d'attention sélective (odd-ball task) montre en fait qu'il existe une différence à la fois dans le sens de l'hyper-activation et de l'hypo-activation dans une variété de régions corticales et sous corticales avec la prise au long cours (trois ans) d'une très faible dose d'œstrogènes. La troisième étude (Joffe et al. 2006) a évalué des femmes en ménopause, traitées par un patch d'œstradiol transdermique délivrant 50 mg par jour durant 12 semaines. L'fMRI a montré un surcroît net d'activité au niveau frontal inférieur durant un test de mémoire de travail verbale. Cette augmentation de capacité fonctionnelle du cortex préfrontal sous traitement œstrogénique pourrait être secondaire à son action sérotoninergique (Kugaya et al. 2003).

Chez l'animal, très peu d'étude se focalise sur l'étude des effets de l'E2 sur les activités cérébrales. Une étude a fait le parallèle entre la ratte et la femme sur les capacités d'extinction de la mémoire de peur (Zeidan et al. 2011). Chez la femme, la variation d'E2 au cours du cycle modulait la réactivité du PFC et de l'amygdale. Chez la ratte, l'administration de l'agoniste d'ER α induit l'augmentation de l'activité dans le PFC et la réduction de l'activité dans l'Amygdale. Une autre étude a également montré une amélioration de la reconnaissance d'objet associée à une augmentation de l'activité du lobe temporal chez des rattes ovariectomisées recevant de l'E2 (Fonseca et al. 2013).

Problématique

Un des problèmes majeurs du vieillissement normal et pathologique est la détérioration des fonctions cognitives et en particulier de la mémoire. Etant donné que la population de plus de 65 ans ne cesse d'augmenter, il devient urgent de développer des stratégies thérapeutiques afin d'atténuer le déclin mnésique lié à l'âge.

A cet effet, comme nous venons de le voir dans la revue de littérature, l'E2 semble être un bon candidat car les voies de signalisation associées pourraient exercer des effets bénéfiques et protecteurs contre le vieillissement cérébral. En particulier, l'E2 affecte les mécanismes de plasticité synaptique altérés par le vieillissement et supposés sous-tendre les processus d'apprentissage et de mémoire (Whitlock et al. 2006; Hölscher 1997; Massey & Bashir 2007). Dans l'hippocampe, l'E2 augmente la densité des épines dendritiques totales (chez la ratte) ou celles des épines fines (chez la souris) dans le CA1 et modifie la balance LTP/LTD en faveur de la LTP (Gould et al. 1990; Spencer et al. 2008; Foy et al. 1999; Córdoba Montoya & Carrer 1997; Warren et al. 1995; Grassi et al. 2011; Vouimba et al. 2000; Shiroma et al. 2005). Une supplémentation en E2 pourrait de ce fait s'opposer aux effets mnésiques du vieillissement.

Cependant, la littérature révèle que les effets de l'E2 sur la mémoire sont loin d'être homogènes et l'E2 n'induit pas nécessairement un effet positif (pour revue : Frick, 2009). Pour aider la recherche de cibles thérapeutiques, il est donc nécessaire de mieux comprendre les effets d'une supplémentation en E2 sur la mémoire.

Pour atteindre cet objectif, qui est celui de mon travail de thèse, nous avons tenté d'identifier les facteurs potentiellement responsables de l'hétérogénéité des effets de l'E2 dans la littérature et qui donc limitent notre compréhension des relations entre l'E2 et la mémoire. Nous avons relevé deux facteurs à contrôler : le type de mémoire considéré et l'âge du sujet.

I. PRINCIPAUX OBSTACLES A LA COMPREHENSION DES EFFETS D'UNE SUPPLEMENTATION EN E2

A. Les modèles d'étude

La grande majorité des études concernant les effets potentiels de l'E2 contre le vieillissement ont été faites chez les femmes péri- ou post-ménopausées et chez les rongeurs femelles ovariectomisées.

La première limite de ces études est donc que l'implication de l'E2 dans la fonction mnésique chez le mâle a été largement négligée. Pourtant il y a une production cérébrale d'E2 chez les mâles par aromatisation de la testostérone et selon certaines études le taux hippocampique d'E2 serait même plus élevé chez les mâles que chez les femelles. Ces dosages d'E2 sont à considérer avec précaution, les concentrations étant tellement faibles qu'une évaluation fiable est incertaine. Néanmoins, on peut s'attendre à ce que, comme chez la femelle, les taux d'E2 cérébraux diminuent avec l'âge. Donc, la question du rôle potentiel de l'E2 dans les déficits mnésiques liés à l'âge se pose aussi chez les mâles.

D'autre part, la plupart des études faites chez la femelle rongeur utilisent l'ovariectomie, ce qui n'est pas un bon modèle de ménopause puisque abrupt alors que la ménopause est un phénomène progressif qui dure plusieurs années chez la femme. En outre, l'ovariectomie est le plus souvent réalisée chez des femelles jeunes et on ne peut pas considérer qu'un cerveau jeune réagisse de la même façon à une supplémentation qu'un cerveau âgé.

Enfin, si l'on peut s'attendre à des effets plutôt bénéfiques d'une supplémentation en E2 chez des femelles ovariectomisées ou âgées, parce qu'elle vise à rétablir des niveaux diminués, une supplémentation chez des sujets jeunes normaux au contraire, en élevant la concentration en E2 au-delà d'un niveau optimal, pourrait avoir des effets délétères. Compte tenu du niveau croissant d'exposition de la population à des composés œstrogéniques présents dans l'environnement comme certains pesticides, ou phytoestrogènes dans la nourriture, la compréhension des effets d'une exposition chronique à l'E2 sur la population normale s'avère nécessaire. Encore trop peu

d'études ont exploré les possibles effets délétères d'une supplémentation en E2 sur la fonction mnésique chez le sujet jeune adulte.

- **Notre modèle d'étude**

L'analyse de la littérature nous a conduits à étudier les effets mnésiques d'une supplémentation chronique en E2 (via l'eau de boisson) chez la souris mâle jeune adulte et âgée.

Le modèle souris est celui qui a été choisi par l'équipe. Outre l'expertise acquise depuis de nombreuses années, le choix de ce modèle repose sur le fait qu'une grande variété de modèles transgéniques existe chez cette espèce. De tels modèles sont particulièrement utiles dans l'étude du vieillissement pathologique comme la maladie d'Alzheimer. Tous les paradigmes comportementaux développés par notre équipe ont donc été faits chez la souris.

Le modèle de supplémentation chez la souris âgée vise à mieux comprendre l'intérêt de l'E2 pour lutter contre le vieillissement de la fonction mnésique (Chapitre I). Le modèle « jeune » permettra d'étudier les conséquences potentielles d'une exposition environnementale chronique sur la fonction mnésique normale (Chapitre II).

B. Les différentes formes de mémoire

Comme nous l'avons déjà mentionné, la mémoire est une fonction polymorphe. Elle se subdivise en sous-types de mémoire, qui reposent sur des systèmes cérébraux au moins partiellement distincts. L'expression des récepteurs aux estrogènes étant très hétérogène entre les régions cérébrales essentielles aux différentes mémoires, l'hétérogénéité des effets mnésiques de l'E2 rapportés dans la littérature peut être liée à la diversité des mémoires mises en jeu entre les différentes tâches utilisées.

Classiquement, on distingue la *mémoire à court-terme/de travail* de la *mémoire à long terme*, elle-même subdivisée en *mémoire déclarative et non déclarative*. Les mémoires à court-terme et

déclarative sont particulièrement détériorées dans le vieillissement. Ces détériorations liées à l'âge sont respectivement associées à des altérations préfrontales et hippocampiques.

Les données de la littérature sont globalement en faveur d'une influence positive de l'E2 sur la mémoire à long-terme déclarative et certaines d'entre elles (Korol 2004; Davis et al. 2005) laissent penser que l'E2 favoriserait la mise en jeu du système sous-tendant la mémoire déclarative (centré sur l'hippocampe), au détriment de ceux qui sous-tendent les mémoires non déclaratives, procédurale (système centré sur le striatum) et émotionnelle (système centré sur l'amygdale). La littérature est plus hétérogène concernant la mémoire de travail (Pompili et al. 2012). Comme argumenté ci-dessous, des effets différentiels de l'E2 entre mémoires à long-terme et à court-terme pourraient être liés à ses effets sur la plasticité synaptique.

En premier lieu, on peut penser que les mémoires déclarative et à court-terme/de travail diffèrent dans leur demande en rétention et oubli. En effet, même s'il a pu être proposé qu'un oubli actif soit nécessaire à la mémoire à long-terme (Nadel & Hardt 2011), il est généralement admis que la mémoire à long-terme nécessite surtout de retenir. En revanche, « ne pas retenir au-delà du nécessaire » est une composante majeure de la mémoire de travail, donc l'oubli des informations pourrait être une demande de cette mémoire au même titre que celle de les retenir temporairement. Un défaut d'oubli en mémoire à court terme pourrait entraîner une surcharge mnésique et interférer sur l'acquisition de nouvelles informations.

Par ailleurs, la dépression à long-terme LTD (ainsi que la dé-potentialisation) a été proposée comme mécanisme potentiel de l'oubli (Tsumoto 1993), au même titre que la LTP est considérée comme mécanisme de la rétention. Même si l'idée que la LTD sous-tend l'oubli est discutée (Kemp & Manahan-Vaughan 2007), le modèle selon lequel un équilibre entre LTP et LTD serait à la base d'un équilibre entre rétention mnésique et oubli, est largement admis.

Si l'on suit le modèle LTP/LTD, compte tenu des effets de l'E2 rapportés dans la littérature sur la plasticité synaptique hippocampique, i.e. des effets facilitant l'induction de LTP et défavorables à l'induction de LTD, on s'attend à ce que l'E2 augmente la rétention mnésique et réduise l'oubli. Le modèle permettrait donc d'expliquer que les effets d'une supplémentation en E2 soient

généralement bénéfiques sur la mémoire à long-terme et plus mitigés sur la mémoire à court-terme/de travail, qui demande de retenir mais aussi d'oublier. Notre travail visera tester la validité de ces hypothèses.

- ***Notre étude chez la souris***

L'analyse de la littérature nous conduit à penser que les effets d'une même supplémentation chronique en E2 pourraient être différents sur la mémoire à long-terme et sur la mémoire à court-terme. Les protocoles comportementaux choisis pour étudier la mémoire à long-terme permettent de modéliser l'équivalent de la mémoire déclarative humaine, dite mémoire relationnelle/déclarative et/ou mémoire hippocampe-dépendante chez l'animal. La tâche retenue pour la mémoire à court-terme vise à étudier la rétention sur des délais variables, d'informations changeantes et répétitives qui créent des interférences, faisant ainsi varier la double demande de rétention mnésique et d'oubli.

C. Les différents niveaux d'analyse neurobiologique

Afin de mieux comprendre un processus mnésique, il est nécessaire d'en comprendre les mécanismes neurobiologiques de base, que ce soit dans une perspective de recherche de fondamentale ou pour aider la recherche thérapeutique.

Chez l'Homme, parce que la recherche des mécanismes de base de la mémoire est limitée par la nécessité d'être non-invasive, le niveau d'étude neurobiologique le plus poussé est celui des structures et systèmes. Le développement des techniques d'imagerie fonctionnelle permet d'étudier le fonctionnement du cerveau lors d'une tâche mnésique, en renseignant sur les différentes structures cérébrales impliquées. Ces techniques permettent de voir comment l'activité des structures varie lors de tâches comportementales et comment les structures se coordonnent, i.e. quelle connectivité fonctionnelle existe entre elles pendant la tâche. Ainsi, un certain nombre d'études ont montré que le niveau d'E2 circulant influence l'activité fonctionnelle des systèmes cérébraux mis en jeu par des tâches de mémoire (mémoire de travail : Shaywitz et al. 1999 ; mémoire verbale : Joffe et al., 2006 ; pour revue : Maki & Resnick, 2001)

Chez l'animal, en revanche, le niveau des structures et systèmes est peu étudié (Pleil et al. 2011; Fonseca et al. 2013; Zeidan et al. 2011) ; la grande majorité des connaissances relatives aux effets neurobiologiques de l'E2 concernent les niveaux synaptique/cellulaire et moléculaire, ce qui rend la transposition à l'Homme peu aisée. Une meilleure compréhension des effets de l'E2 à l'échelle des systèmes/structures pourrait aider à relier les effets observés chez l'Homme à cette même échelle, aux mécanismes cellulaire et moléculaires décrits chez l'animal.

En résumé, une meilleure compréhension des effets de l'E2 sur la fonction mnésique requiert d'intégrer les différents niveaux de connaissance, et un chaînon manquant pourrait être la connaissance insuffisante du niveau des structures/systèmes chez l'animal

Dans notre étude chez la souris : Après avoir étudié les effets comportementaux d'une supplémentation en E2, nous chercherons les corrélats neurobiologiques des effets obtenus à l'échelle des structures et systèmes, puis à celle des cellules et molécules.

II. HYPOTHESES GENERALES SUR LES EFFETS DE L'E2 ET PLAN DES EXPERIENCES

A partir des principales données de la littérature que nous venons de récapituler, notre *hypothèse générale* est que les effets mnésiques d'une supplémentation chronique en E2 chez la souris mâle vont varier en fonction de l'âge du sujet, et du type de mémoire considéré.

Concernant l'âge, nous partons du postulat que les taux d'E2 cérébraux diminuent au cours du vieillissement. Comme nous l'avons vu, cette idée n'est pas sans fondement mais à ce jour, elle n'est pas confirmée par des dosages cérébraux. Partant du postulat qu'il existe un déclin lié à l'âge, nous nous attendons à ce que la supplémentation réduise certains déficits mnésiques de la souris âgée, en tendant à normaliser les taux cérébraux d'E2. En revanche, chez l'animal jeune, en augmentant les taux d'E2 au-delà du niveau normal, la supplémentation pourrait avoir à des effets mnésiques plus hétérogènes, et possiblement délétères sur certaines composantes de la mémoire.

Concernant les différentes formes de mémoire, notre hypothèse basée sur le fait que l'E2 peut affecter la balance LTP/LTD en faveur de la LTP, est que la supplémentation devrait avoir des effets bénéfiques sur la rétention mnésique, en particulier sur la rétention à long-terme, mais peut-être aussi sur la rétention à court-terme. Ces effets devraient se traduire par une amélioration de la mémoire à long-terme, en particulier de celle qui dépend de l'hippocampe, et qui est particulièrement affectée par le vieillissement. En revanche, l'amélioration de la rétention, et donc la réduction de l'oubli provoquée par l'E2, pourrait ne pas avoir d'effet sur la mémoire de travail qui demande aussi d'oublier, voire même la perturber si la rétention est trop augmentée.

Afin de tester ces hypothèses, nous comparerons les effets de la supplémentation en E2 dans deux tâches en labyrinthe radiaire, qui ne diffèrent que par le type de mémoire engagé :

1/ *une tâche de mémoire à long-terme*, qui permet d'évaluer la rétention à long-terme d'informations invariantes, et qui dissocie l'expression de la mémoire relationnelle/déclarative, hippocampo-dépendante, de l'expression de la mémoire non déclarative. Dans cette tâche, le vieillissement, comme la lésion/inactivation de l'hippocampe, entraînent un déficit sélectif de mémoire relationnelle/déclarative (Etchamendy et al. 2003; Mingaud et al. 2007; Mingaud et al. 2008; Marighetto et al. 2011).

2/ *une tâche de mémoire à court-terme/de travail*, hippocampo-dépendante qui permet d'évaluer la rétention à court-terme d'informations variantes, dans des conditions d'interférence importante nécessitant d'oublier au fur et à mesure. Dans cette tâche, les souris âgées présentent un déficit de performance dû à la double dégradation de la *capacité de rétention* et de la capacité à gérer les interférences, i.e. ou *capacité d'organisation*. La lésion hippocampique réduit de façon tellement drastique la capacité de rétention que la capacité d'organisation ne peut plus être évaluée (Marighetto et al. 2011).

Selon nos hypothèses, dans la tâche de mémoire à long-terme en labyrinthe radiaire, la supplémentation en E2 devrait réduire le déficit de mémoire relationnelle/déclarative chez la souris âgée et tendre à accroître cette mémoire à long-terme chez la souris jeune. A l'inverse, l'expression de la mémoire non déclarative devrait rester inchangée chez la souris jeune, et être

plutôt réduite chez la souris âgée (qui pourrait utiliser davantage que la souris jeune cette forme de mémoire dans la condition placebo).

Dans la tâche de mémoire à court-terme, la supplémentation pourrait prolonger la rétention à court-terme des informations (ralentir l'oubli) et de ce fait accroître la demande organisationnelle de la tâche. Comme nous n'attendons pas d'amélioration de la capacité d'organisation par l'E2, l'accroissement de la rétention mnésique ne devrait pas suffire à supprimer le déficit de performance lié à l'âge dans cette tâche. Chez les animaux jeunes, le ralentissement de l'oubli pourrait entraîner une surcharge mnésique aboutissant à une diminution de la performance, en dépit d'une rétention accrue.

Les tâches comportementales choisies différencient la mémorisation d'informations variantes qui requiert rétention et oubli, et celle d'informations invariantes qui ne demande que rétention, nous permettant ainsi de tester nos hypothèses. En outre, ces tâches modélisent les déficits mnésiques liés à l'âge les plus importants, celui qui porte sur la mémoire déclarative et celui qui concerne la mémoire de travail. Ces tâches présentent également l'avantage majeur d'avoir été adaptées à l'Homme, révélant les mêmes déficits chez les sujets âgés (Etchamendy et al. 2012; Marighetto et al. 2011) et permettant potentiellement de transposer à l'Homme les résultats obtenus au cours de nos travaux.

Les travaux récents de l'équipe montrent que le déficit lié à l'âge de mémoire relationnelle/déclarative est secondaire à une réduction de la capacité à relier en mémoire des événements espacés par un bref intervalle temporel, ou « *temporal binding* ». De ce fait, nous utiliserons également un test de *conditionnement de trace* qui évalue précisément la capacité de mémorisation à long-terme d'une association entre événements séparés par un bref intervalle (un son et un choc électrique). Ce test a révélé une dégradation de cette mémoire associative chez les souris âgées (Brayda-Bruno et al, en prep.). Selon nos hypothèses, le déficit lié à l'âge devrait être réduit par la supplémentation en E2. Cette dernière pourrait en outre prolonger la capacité de binding temporel des animaux jeunes, et permettre ainsi la formation d'une mémoire

de trace dans une condition de long intervalle (entre le son et le choc), pour lequel les animaux (placebo) ne sont plus capables de mémoriser l'association.

Au plan neurobiologique, nous nous attendons tout d'abord à ce que les effets comportementaux de la supplémentation soient associés à des modifications de l'activité neurofonctionnelle des structures cérébrales recrutées par chacune des tâches mnésiques. Pour le vérifier, nous mesurerons *l'activation de la protéine Fos* induite par ces tâches dans les structures essentielles aux différentes formes de mémoire. Au niveau des systèmes, nous analyserons également la *connectivité fonctionnelle entre les structures* (corrélations entre les niveaux de Fos), provoquée par chacune des tâches (Boucard et al. 2009). Les travaux de l'équipe ont montré que le déficit lié à l'âge de mémoire relationnelle/déclarative est associé à un déficit d'activation de l'hippocampe et du cortex préfrontal (Touzani et al, 2003 ; Mingaud et al, 2008 ; Brayda-Bruno et al, en préparation) alors que le déficit de mémoire de travail est associé à des sur-activations de ces mêmes régions (Marighetto et al, 2011). La connectivité fonctionnelle n'a pas encore été étudiée ; nous nous attendons à ce qu'elle soit également dépendante de la tâche, et altérée par le vieillissement. Enfin, nous nous attendons à ce que les effets bénéfiques de la supplémentation sur les déficits mnésiques des animaux âgés s'accompagnent d'une normalisation des activations cérébrales et de la connectivité fonctionnelle, et que les éventuels effets délétères chez l'animal jeune soient associés à une dérégulation des activations et de la connectivité fonctionnelle.

Dans les régions cérébrales identifiées comme sensibles à la supplémentation en E2, nous étudierons ensuite l'effet de l'E2 sur la densité et la morphologie des épines dendritiques. Au niveau moléculaire, nous examinerons l'effet de l'E2 l'expression de deux protéines-clé de la synapse, à savoir PSD-95 et GluA1.

Dans une première expérience comportementale portant sur la mémoire à long-terme en labyrinthe radiaire, et incluant une expérience préliminaire d'actimétrie pour évaluer d'éventuels effets aspécifiques de la supplémentation, un effet dose de l'E2 a été réalisé. Pour toutes les

expériences suivantes, seule la dose efficace contre le déficit mnésique lié à l'âge dans la 1ère expérience, a été utilisée.

Pour chacune des expériences réalisées, des souris jeunes et âgées ont été soumises à une supplémentation en E2 par l'eau de boisson pendant 2 semaines avant le début des manipulations (groupes E2 vs groupes placebo). Les résultats relatifs aux effets de la supplémentation sur le déficit lié à l'âge seront tous rapportés dans le chapitre 1. Dans ce cas, seul le groupe jeune placebo sera inclus, comme témoin de l'effet de l'âge. Les résultats les plus significatifs concernant les effets de la supplémentation chez les animaux jeunes seront rapportés au chapitre 2, sous format d'article en préparation.

Chapter 1: Impact of estradiol on age-related deficits of memory

I. BEHAVIORAL EFFECTS

A. Effect of estradiol on long-term memory/declarative memory

1. The model of preferential decline in declarative memory in aged mice

As we discussed in the introduction, declarative memory (DM) is the conscious and verbally expressible memory of every day facts and events, and is one major form of long-term memory that is highly affected by aging. The major problem regarding the study of this memory in animals is its modeling. Indeed, DM is a strictly human memory, based on language. To study this memory in mice, our team has developed a radial-maze task which is based on the relational theory proposed by Howard Eichenbaum and Neil J. Cohen (Cohen 1984).

a) *The relational theory*

According to the relational theory, beside consciousness and verbalization, DM is characterized by its flexibility and this fundamental flexibility property relies on a specific mnemonic representation called “relational representation”. DM is flexible because it can be used in novel or changed situations, as illustrated by the capability to compare and contrast information acquired separately to solve a novel problem (Squire et al. 1984). Flexibility would rely on a relational mnemonic representation which includes major elements of past experiences and all possible links between these elements (Eichenbaum et al. 1988; Eichenbaum et al. 1989). Such mnemonic representation is inserted in a network of links and associations that allows the reactivation of memories in a variety of contexts, and thereby a flexible use of the memory. In contrast, non-DM such as procedural memory are not flexible, reflect skills acquired by repetition that do not allow adaptation to a new situation. Non-DM relies on isolated representations which can only be reactivated in the specific context of learning.

Functional integrity of the hippocampus is essential for DM, because this structure would sustain the relational processing of information which is necessary for characteristic flexibility of DM expression (Eichenbaum 1992). Several lesion studies have shown that animals with hippocampal damage can learn new information under certain circumstances, but they are

impaired in the flexible use of learnt information (Eichenbaum et al., 1988, 1989; Bunsey and Eichenbaum, 1996). Hippocampal intrinsic synaptic properties would allow the formation of associative representations as well as a sequential organization of these representations leading to relational representations (Wallenstein et al. 1998; Ergorul & Eichenbaum 2004; Levy 1996).

b) *The radial-maze model*

Based on the relational theory, Marighetto et al. have designed a simple radial-maze discrimination learning task in two stages, to assess flexible and hippocampus-dependent memory in mice (Figure 1, for more details see Material and Method). In this task, aged mice as well as young mice with hippocampal damage are capable to learn which arms always contain food and which ones never contain any food (stage 1, acquisition). However, the same mice failed in using the acquired information in the flexibility test (stage 2), when the situation is modified by just changing the manner of presenting the arms. Thus, aged mice display a selective deficit in the expression of flexible and hippocampus-dependent memory, i.e. in relational/declarative memory (R/DM). This deficit is a model for the preferential decline in DM occurring in aging (Etchamendy et al., 2001; Etchamendy et al., 2003; Marighetto et al., 1999; Marighetto et al., 2000; Mingaud et al., 2007).

The R/DM task for mice was successfully translated to human subjects through the use of virtual radial-maze. Validating the mouse model, the same selective deficit in flexible memory expression was observed in aged humans and in young adults with reduced hippocampal activity: these subjects were capable to learn the information about reward locations in stage 1 but they failed to use this information in the flexibility probe in stage 2 (Etchamendy et al. 2012).

c) *Two versions of the R/DM radial maze task*

In the first version, stage 1 consists in acquisition of 3 pairs (each pair is made with one baited arm and one non-baited arm) and in stage 2, 2 pairs are recombined into novel pairing (again with one baited and one non-baited arm). In the second version, stage 1 consists in acquisition of 6 arms one by one, successively, following a Go/NoGo discrimination learning procedure (only one

arm is accessible in each trial) and in stage 2 flexibility of memory is tested by presenting the same arms by pairs (one baited, one non-baited). Whichever the task version, the location of food in the maze does not change between Stage 1 and Stage 2, only the manner of presenting the arms is manipulated to test flexibility.

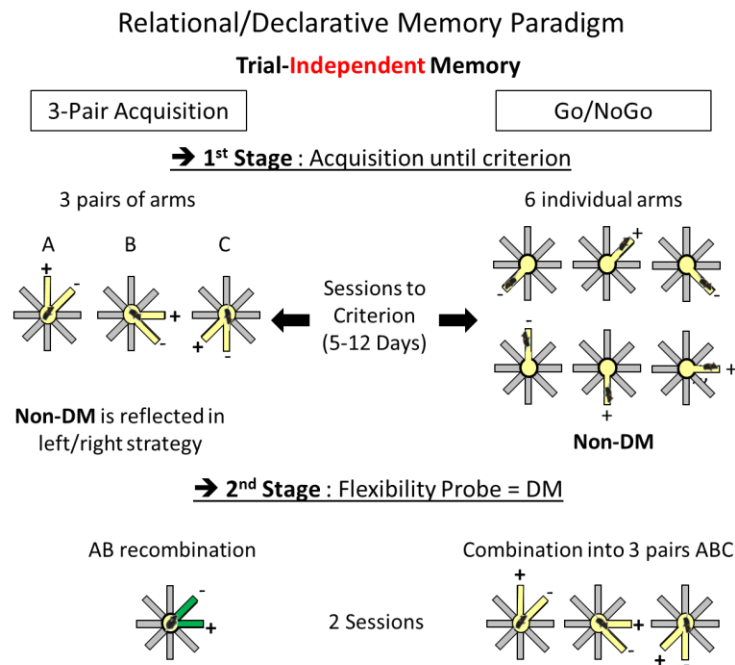


Figure 12: Relational/Declarative memory task design (for details see the text)

Each version has its own advantages and disadvantages.

The main advantage of the Go/NoGo version is that aged mice behaved exactly as young mice in stage 1, and they are all capable to learn the Go/NoGo discrimination task. In the 3-pair version, aged mice usually need more training to acquire the initial 3-pair discrimination task, and around one third of aged mice are not capable to learn it. Because mice which cannot learn the task in stage 1 are rejected from further testing, and cannot be tested in the flexibility probe in stage 2, the 3-pair version of task requires more aged mice than the Go/NoGo version. For this reason, the Go/NoGo version was more often used in previous studies in mice than the 3-pair version.

However, the 3-pair version has two main advantages. First, this version was the only one to be successfully adapted to human subjects, hence allowing direct comparison between mice and

humans. Second, this pair-discrimination learning procedure enables some evaluation of underlying strategies of acquisition in stage 1, while the Go/NoGo version doesn't.

Indeed, spatial discrimination learning in the radial maze can rely on at least two different kinds of cognitive processes (White & McDonald 2002):

- building a spatial map based on relationships among surrounding cues , also called allocentric strategy; it is a “relational/declarative” strategy, based on the hippocampus;

- using a cue-based egocentric strategy, e.g. “turn left or turn right when facing a particular cue in the environment”, which is a non-relational strategy. “Turn left /right”, i.e. response-reward associations may be based on the striatum, “Go to a particular cue”, i.e. cue-reward association may be based on the amygdala. Indirect evaluation of contribution of “turn left/right” strategy by measuring the differential in amount of “left responses” and of “right responses” can be done in the 3-pair discrimination learning, but not in the Go/NoGo discrimination task.

Based on these considerations, in the first experiment, we chose to use the 3-pair version to evaluate E2 effects on different components of long-term memory. Having found that the supplementation selectively restored the aging-related deficit in relational/declarative memory (R/DM) expression, a second experiment was aimed at comparing the effect of E2 to those of preferential agonists of ER α or ER β (see Ø III). For this experiment we chose to use the Go/NoGo version to reduce the number of needed mice.

d) *Which form of memory is evaluated in stage 1 and in stage 2*

Whatever the task version used, our team has shown that young mice exhibit flexible memory expression in stage 2 while aged mice don't. Therefore, the two stages of the tasks do not evaluate the same component of long-term memory. Stage 2 assesses purely R/DM expression. In contrast, acquisition in stage 1, whichever the version (Go/NoGo or 3-pair) is more ambiguous as it can rely on either relational/hippocampus dependent learning or non-relational/non-hippocampus dependent learning.

The hippocampus is not obligatory required to learn the task in stage 1, but only hippocampus-dependent learning leads to flexible memory expression. Indeed, it was shown that inactivating the hippocampus through local infusion of lidocaine before each training session of stage 1, spared the acquisition of the Go/NoGo task, but resulted in a subsequent impairment in the flexibility test in stage 2 similar to the one previously seen in young mice with permanent hippocampal lesion and in aged mice (Mingaud et al, 2007). Furthermore, Fos imaging of brain activities in the Go/NoGo discrimination learning phase showed that the hippocampus was activated by learning in sham controls whereas Fos expression was enhanced in the striatum in lidocaine-injected mice. Hence, the Go/NoGo task can be learnt by recruiting the hippocampus or by recruiting the striatum when the hippocampus is disrupted, but “hippocampus-independent” learning is not flexible. It was more recently demonstrated that the aging-related deficit in flexible memory expression was linked to a defect in learning-induced hippocampal activation in stage 1, and more specifically to a defect in CA1 activation (Brayda-Bruno et al., in preparation).

Hippocampus-dependent learning in stage 1 is relational and the age-related deficit in flexible memory is due to a specific defect in relational processing of temporally distant events, i.e. temporal binding. This conclusion is based on results of an experiment in which the temporal separation between successive information acquired in stage 1 was manipulated by varying the inter-trial interval from 0 to 60 seconds (Brayda-Bruno et al, in preparation). When trained under learning conditions which minimized the demand on temporal binding (0-5 sec. inter-trial intervals), aged mice exhibited normal memory flexibility in stage 2, they performed as efficiently as young mice the flexibility probe. The age-related deficit in flexible memory expression was seen only when the temporal separation between successive trials in stage 1 was prolonged above 10 seconds, corresponding to our standard training procedure (in which the inter-trial interval is 20 sec.). Thus, the aging-related deficit in R/DM is secondary to reduction of temporal binding capability.

Temporal binding necessary for R/DM is sustained by CA1 whose activation is disrupted in aging. Indeed, analysis of brain structure activities using Fos imaging further showed that

learning-induced activation of hippocampal CA1 was dependent on the temporal binding demand in young mice (seen only for 20 sec.-inter-trial intervals) and this delay-dependent activation of CA1 was absent in aged mice. Finally, the same “delay-dependent” deficit in flexible memory expression as the one seen in aged mice was found in young mice with selective knock-out of NMDA receptors in hippocampal CA1: they were impaired in the flexibility probe in stage 2 when trained under the 20 sec-inter-trial interval condition in stage 1, but they performed as well as their controls in stage 2 when trained under the 0 sec.-inter-trial interval condition in stage 1.

In conclusion, aged mice trained in our radial arm maze procedure under standard training conditions (i.e. with a 20 sec. interval between successive trials in stage 1) exhibit an impairment in the formation of flexible long-term memory, i.e. R/DM, with normal acquisition of non-R/DM. This selective R/DM impairment is likely to be due to functional alteration of NMDA-dependent activity in CA1, which induces a reduction in the capability to bridge brief temporal gaps in memory and thereby prevents relational processing of learning events separated by more than several seconds.

2. Dose-related effects of estradiol

a) *Protocol*

To study the effects of chronic E2 exposure on the age-related deficit in R/DM, independent groups of young (2,5-3,5 months) and aged (21-23 months) mice were given with placebo, E2 at 0.25µM, 0.5µM and 1µM in drinking water 2 weeks before the beginning of experiments. To measure potential effects of E2 on another behavioral function that is altered by aging, we measured nycthemeral variation of locomotor activity in automated activity cages before the radial maze experiment. The results are presented below in Ø I-c.

The full experiment was done as detailed in Figure 2.

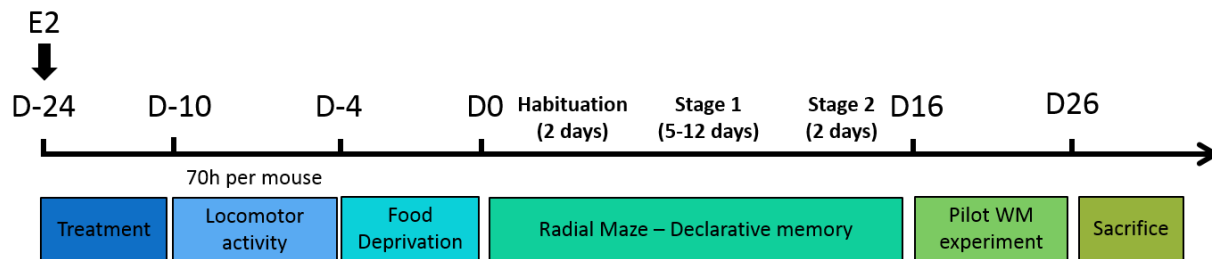


Figure 2: Timeline of the R/DM experiment:

D-24: Beginning of treatment which lasted until sacrifice of the animals

D-10-4: Nycthemeral variation of locomotor activity: 70h in activity cages. Measures of total run distance during the first hour in cages as an index of exploratory behavior, and then by hour during two days as an index of locomotor activity.

D-3: Beginning of partial and progressive food deprivation. Animals are weight each day until the end of behavioral experiments to adjust the amount of food given to each mouse to maintain it at about 10-12% of its free-feeding weight

D0 to D1: Habituation to the radial maze consisting in freely moving in the maze until having visited all 8 arms and consumed all 8 pellets. The door of each visited arm is closed when the mouse is visiting another arm. Time taken to finish the session was recorded, and mice failing to habituate in less than 15 min in the second day were given a supplementary session, and rejected if failing again to visit all 8 arms and collect the 8 pellets in less than 15min

D1 to D6 minimum and to D12 maximum: Stage 1, the discrimination learning task consisting in acquisition of 3 pairs. Each mouse was attributed 6 adjacent arms combined into pairs A, B and C as shown in Figure 1. Each daily session was composed of 20 trials of alternate presentations of pairs A, B and C with an inter-trial interval of 20 sec. At beginning of each trial, the two arms of one pair were opened simultaneously and the mouse required making a choice. As soon as the mouse entered the final portion of an arm, the door of the non-chosen arm was closed. The door of the chosen arm was closed as soon as the mouse was back on the central platform.

The 2 days that followed reaching of criterions: Stage 2, same as stage 1 with the 3 pairs that follow: *Pair AB* made by the recombination of the right arm of pair A and the left arm of pair B. *Pair AB* represents the critical test of flexibility (recombined familiar arms); *Pair C* which is a “unchanged learnt control” pair; *Pair N*: a totally novel pair of unfamiliar arms (that were not used in stage 1) as an “unlearnt control” pair.

For the memory experiment, the radial maze was a fully automated elevated platform from which radiate 8 open arms. The memory procedure consisting in the 3-pair version of the R/DM task, was identical to the one described in detailed in Marighetto et al., 1999. Training in the 3-pair discrimination learning task was performed until the mouse reached the acquisition criterion (when the mean correct responses over the 3 pairs was above 75 % as mean over last two sessions + the mean correct responses for each pair was above 62%). Mice that failed reaching the criterion

within 12 sessions were rejected from further experiment. Mice that reached the criterion were submitted to Stage 2 testing starting on the following day. For each session of Stage 1 and Stage 2, percentage of correct responses for each pair was recorded.

b) *E2 can rescue the age-related deficit of R/DM expression at the 1 μ M dose*

In stage 1, young animals learnt the 3-pair discrimination faster than aged animals and E2 has no effect on the acquisition speed of aged mice that could reach the acquisition criterion. In these learner mice, as shown in Figure 3A, the acquisition stage lasted 7 days for the young group while it lasted 10 days for the aged placebo group (*Age in placebo "learners"*: $F_{1,19} = 7.33$; $p = 0.014$), and about the same in E2-treated groups (*Treatment in aged "learners"*: $F_{3,25} = 1.73$; $p > 0.18$). In the "learners", the learning curves were similar among the groups in the final sessions before reaching the criterion, and the level of performance reached in the final session was also equivalent (see in Figure 3B : *Age in placebo* and *Treatment in aged ns* in all cases).

In stage 1, however, some aged mice failed to reach the acquisition criterion within 12 days of training and the proportion of such "no-learners" was dose-dependently increased by E2: the higher was the dose, the bigger was the number of aged mice that did not reach the criterion (see Figure 3C). Thus, about one third of aged mice treated with the dose of 1 μ M of E2 failed to learn the 3-pair discrimination task.

We analyzed underlying learning strategy in the final sessions. Namely the performance differential [mean % correct for pairs A + B (both rewarded on the left side) minus - mean % correct for pair C (rewarded on the right side)], reflects the use of an "egocentric" strategy consisting in turning left where the food is more frequently located (60% vs. 40%, due to the fact that pairs A and B are presented 6 times each within a session, while pair C is presented 8 times by session). We found that E2 reduced the use of this egocentric strategy in "no learners" and at the dose of 1 μ M (Figure 3D. *Treatment x Criterion*: $F_{1,28} = 3.13$; $p = 0.041$).

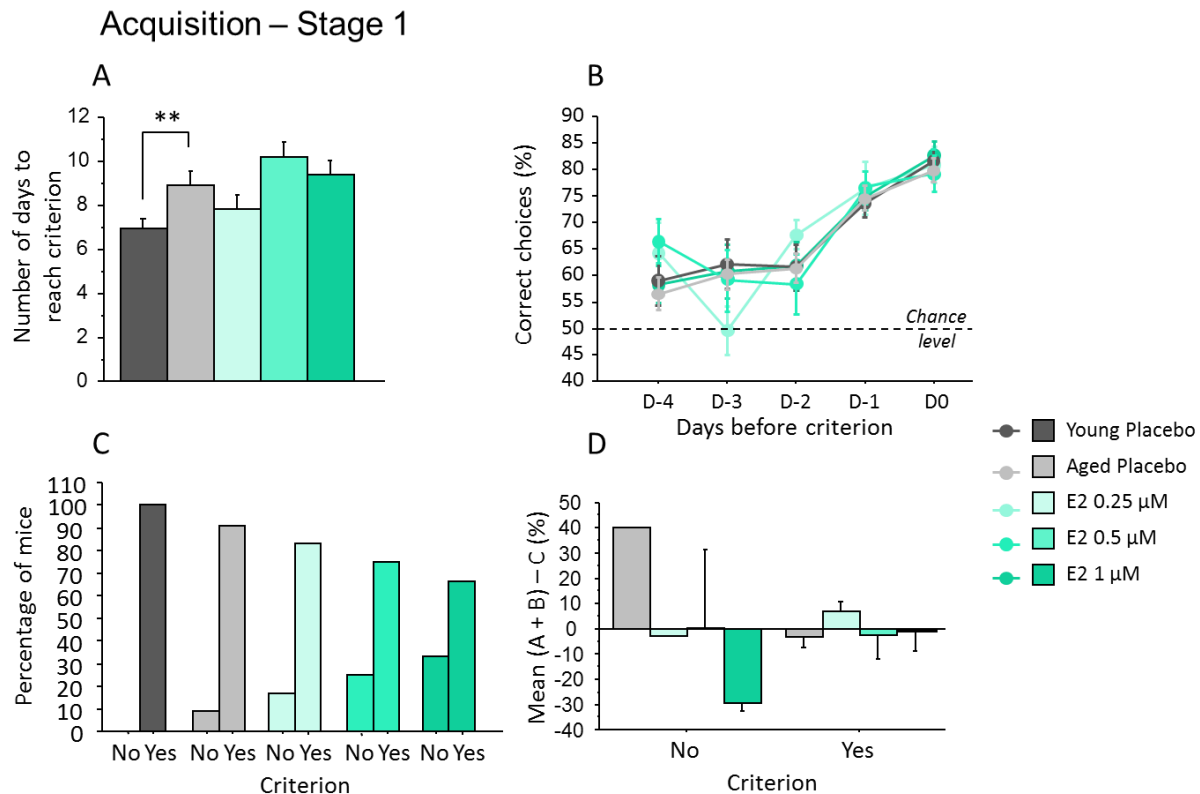


Figure 3: Performance in stage 1 of the R/DM task

A/ Number of days to reach criterion. **B/** Mean performance (percentage of correct choices) during the last 5 days of training before reaching the criterion. **C/** Percentage of mice that reached criterion. **D/** Analysis of “egocentric” learning strategy in aged mice by comparing the performance on the two pairs left-baited (pairs A and B) and on the pair right-baited (Pair C). Positive value means “egocentric” strategy; **: $p < 0.01$. Data presented as mean $\pm$ SEM.

Mice that reached the criterion: Young placebo: $n=11$; Aged Placebo: $n=10$; Aged E2 0.25μM: $n=5$; Aged E2 0.5μM: $n=6$; Aged E2 1 μM: $n=8$.

Mice that failed to reach the criterion: Young placebo: $n=0$; Aged Placebo: $n=1$; Aged E2 0.25μM: $n=1$; Aged E2 0.5μM: $n=2$; Aged E2 1μM: $n=4$.

Only mice that had reached the acquisition criterion were submitted to stage 2.

In the critical flexibility test of R/DM (i.e. the recombined pair AB), E2 improved performance in aged mice in a dose-dependent manner. As previously shown, aged placebo mice performed at chance level in this test, and significantly lower than young mice (*Age in placebo*: $F_{1,19}=9.115$; $p=0.0071$). The two lowest doses (0.25μM and 0.5μM) non-significantly improved the

performance up to 65% and 68% of correct answers, respectively. Only the highest dose (1 μ M) rescued the aged-induced deficit and restored performance similar to young mice (*Placebo vs. 1 μ M in aged: p=0.031; Figure 4*).

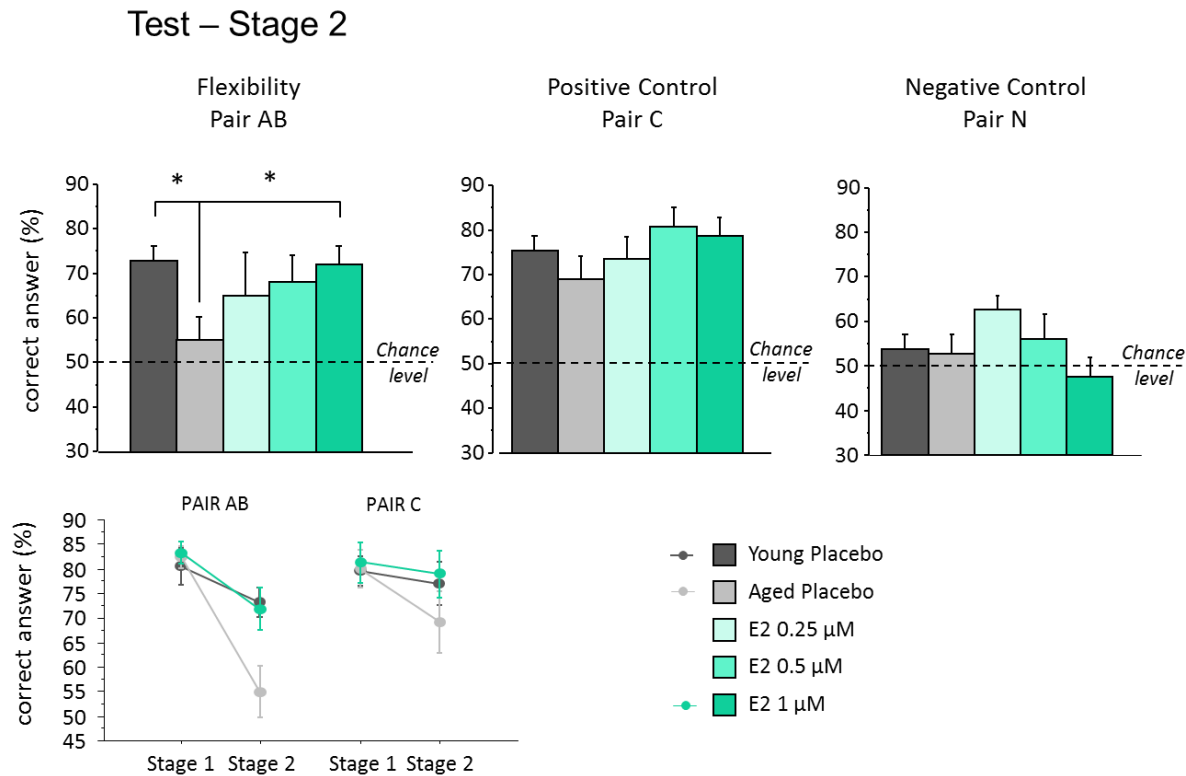


Figure 4: Performance during the flexibility test (Stage 2)

Upper panel: Percentage of correct responses for each pair. **Bottom panel:** Evolution of performance between the last day of acquisition (Stage 1: reaching of criterion) and the first day of testing (stage 2), for the pairs AB and C (percentage of correct choices).

*: $p < 0.05$. Data presented as mean $\pm$ SEM.

Young placebo: $n=11$; Aged Placebo: $n=10$; Aged E2 0.25 μ M: $n=5$; Aged E2 0.5 μ M: $n=6$; Aged E2 1 μ M: $n=8$.

Two control pairs were also tested during stage 2. Pair C, the unchanged pair acquired during stage1, is the “learnt” control, and the new pair (N) is the “unlearnt” control in which mice are supposed to perform at chance level. The E2 treatment had no significant effect on performance

in these control pairs even though it tended to enhance performance on pair C at the two higher doses (Figure 4).

Overall, the evolution of performance from the end of stage 1 to stage 2 was significantly improved by E2 at 1 μ M, which made this evolution very similar to that seen in young adult (Figure 4 - bottom panel; In aged groups: *Treatment effect*: $F_{1,16}=4.9$; $p=0.042$).

To conclude, here we showed that E2 at the dose of 1 μ M rescued the age-related deficit in R/DM without improving learning ability. In fact, the efficient dose against R/DM degradation in aged mice even tended to impair initial learning of 3 pairs in the sense that fewer aged mice were capable to learn the task. This tendency effect is likely to be due to an alteration of underlying learning strategies since E2 was found to reduce the use of “egocentric” strategy in no-learner mice.

Given that only the highest dose of E2 exerted significant beneficial effect against the age-related deficit of long-term R/DM, we only studied the effect of this dose in the following memory experiments.

c) *E2 does not normalize the aging-related reduction of locomotor activity at the memory active dose*

To examine whether E2 effects could be extended to another behavioral function than memory, we studied locomotor activity during 2.5 days in activity cages. For the first half day, we analyzed only activity during the first hour of exposure to the cages, as an index of exploratory behavior. For the following two days, we analyzed the mean activity during the light/day period and the dark/night period (of 12 hours each). Because results were similar for the different measures of activity recorded by the (Imetronic) system (distance in the front part (where food and drink is), distance in the back, total distance and rearing) we chose to present only the total run distance (Figure 5).

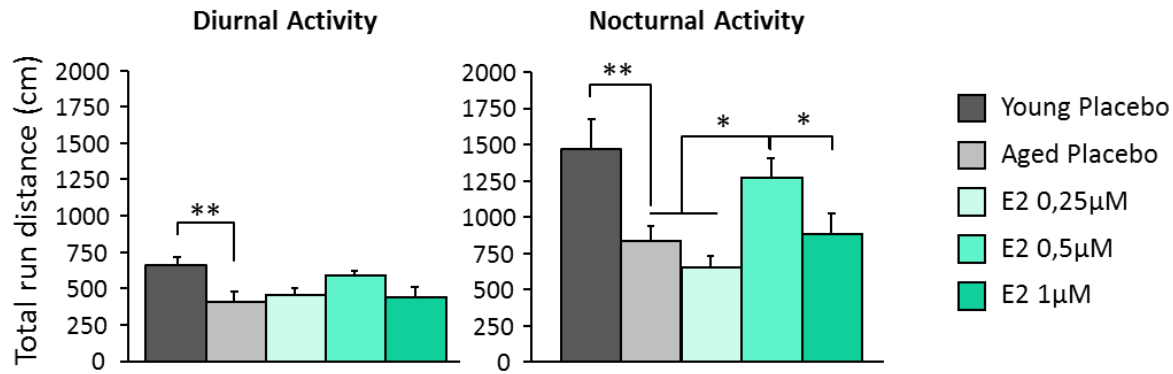


Figure 5: Locomotor activity. For detail see text.

** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$. Data presented as mean $\pm$ SEM. Young placebo: $n=11$; Aged Placebo: $n=11$; Aged E2 0.25µM: $n=7$; Aged E2 0.5µM: $n=8$; Aged E2 0.25µM: $n=13$.

We found that exploratory activity during the first hour of exposure to the cages (not shown), as well as both regular diurnal and nocturnal activities was significantly lower in aged mice than in young controls ($p=0.080$ and $p=0.064$, respectively). E2 had no effect on exploratory activity (not shown), whatever the dose, and it significantly augmented nocturnal regular activity at the intermediate dose (0.5µM) only ($p < 0.05$ vs. all aged groups), but not at the highest dose (1 µM) which was efficient against the long-term memory deficit.

3. E2 improves the aging-related decline in temporal binding

a) *Why studying temporal binding?*

The capability to link temporally distant events, called temporal binding is believed to be fundamental for the formation of relational representation underlying DM. As explained above (part IA-1), the team has recently shown that the aging-related impairment in R/DM was due to a reduction in temporal binding. Namely, aged mice fail in the critical (“recombined”) test of R/DM flexibility in stage 2 of our radial-maze task, only when they are trained, in stage 1, under our standard condition in which a waiting time (Inter-Trial Interval, ITI) of 20 seconds separates the successive presentations of individual pairs. When aged mice were trained with no temporal separation between successive pairs in stage 1 (0 sec.-ITI learning condition), they performed as well as young mice in the flexibility probe in stage 2 (Brayda-Bruno et al, in preparation).

We showed in the previous experiment that E2 at the dose of 1 μ M rescued the age-related deficit of R/DM. In other words, this means that E2-treated aged mice demonstrated flexible expression of memory even though they learnt the 3-pair discrimination task under the 20 sec.-ITI condition, for which aged placebo mice are impaired in relating individual pair experiences, and therefore in forming flexible memory. Hence, the beneficial effect of E2 on mnemonic flexibility might be due to the rescue of temporal binding capacity.

To support this view, we ran another experiment aimed at demonstrating beneficial effects of the same E2 treatment on temporal binding in aged mice, using another test of temporal associative memory, a trace fear conditioning paradigm. Trace fear conditioning is known to rely on the hippocampus, especially on hippocampal CA1 and local NMDA receptors (Misane et al. 2005), and trace conditioning impairment in aged rats has been related to alteration of biophysical properties of CA1 synapses (McEchron et al. 2001)

b) *Protocol of the trace fear conditioning experiment*

After two weeks of treatment through drinking water, placebo- and E2 (1 μ M)-treated aged mice were submitted to a session of tone-fear conditioning during which 3 deliveries of a tone (30 sec-duration, 85 decibels) were always followed by delivery of an electric foot-shock (0.3 mA) after a time interval (the trace) of either 20 sec. or 40 sec. depending on the groups. 24 hours later, we evaluated whether a long-term memory of the tone-shock association was formed despite the temporal separation of the tone and the shock during conditioning. For this, we measured the fear response (freezing) elicited by the tone alone (2 min. duration) delivered in a different context (tone test). We also evaluated (2 hours later) the fear response elicited by reexposure to the conditioning context alone (context test). In the context test, we first submitted the mice for 2min to the conditioning context in which the grid was hidden (“without grid”). Mice were then submitted to the complete conditioning context (“with grid”). The final number of subjects was 12 by condition of trace and treatment.

c) Results

Fear response to the tone: Regarding acquisition of conditioning, we analyzed the evolution of %freezing across the 3 deliveries of the tone, and found no effect of the supplementation (data not shown). All groups displayed significantly increasing fear response to the tone across repetitions (repeated measures: $p < 0.0001$ in each group from 30% for the 1st tone to 50-65% for the last 3rd tone) and the final levels of freezing were also similar among the conditions.

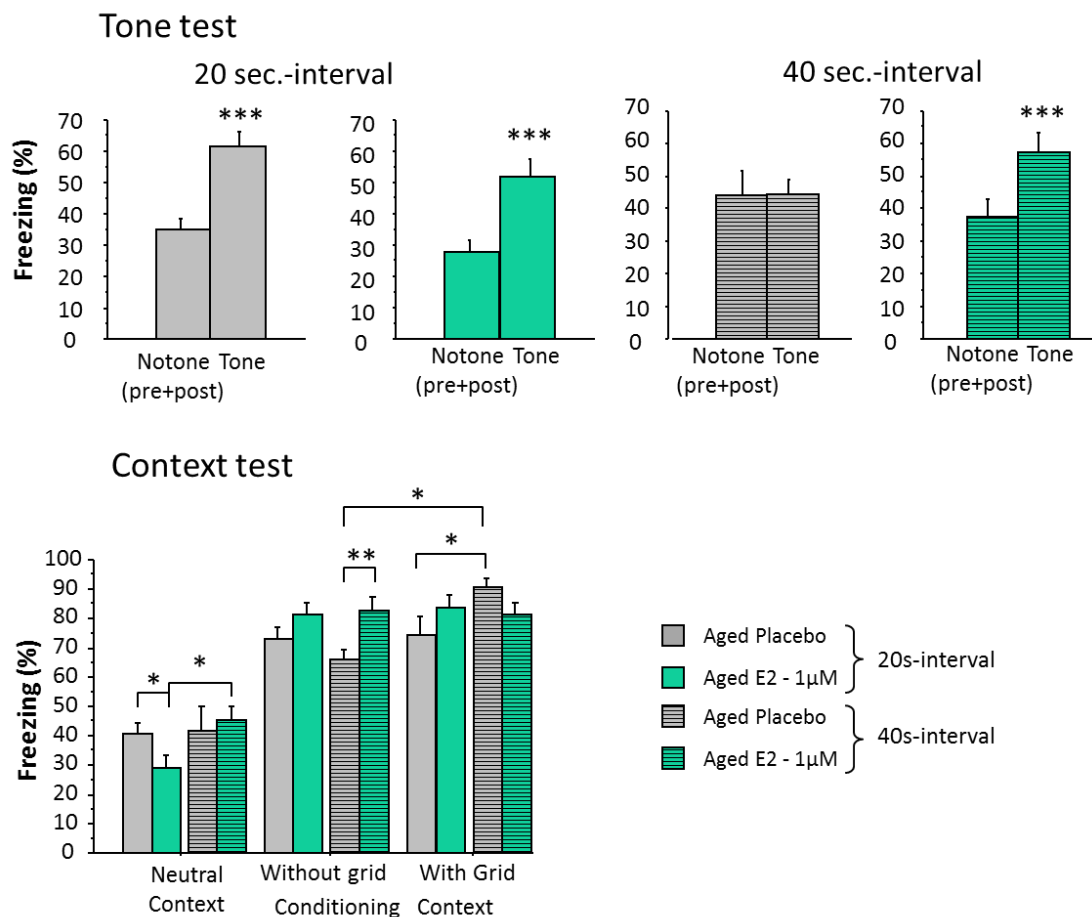


Figure 6: Trace fear conditioning performance

Percentage of freezing during the tone test (upper panel) and the context test (bottom panel) for placebo-(grey) and E2-(green) treated mice for the 20sec-interval (plain) and 40sec-interval (horizontal stripes). $n=10$ for all groups. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$. Data presented as mean $\pm$ SEM

Regarding the tone test, we analyzed the evolution of freezing without tone (2 min. before & last min. after tone) and with tone (Figure 6; upper panel). We found that placebo aged mice exhibited a conditioned fear response to the tone when trained under the condition of 20 sec.-

interval between the tone and the shock (*no-tone vs tone repeated measures*: $p=0.0002$), but not when trained with a trace interval of 40 sec. (*no-tone vs tone repeated measures*: $p>0.95$). In contrast, E2-treated aged mice showed a conditioned fear response to the tone for the two trace interval conditions (*no-tone vs tone repeated measures*: $p<0.0001$ in both cases) even though the freezing differential between *no-tone* and *tone* tended to be smaller in the group trained with the longer interval. There was a significant effect of treatment in the 40 sec. condition only (*Freezing Evolution x Treatment*: $F_{1,19}= 11,12$; $p=0.0035$ for 40 sec.-interval, $p>0.67$ for 20 sec.-interval).

These results demonstrate that, in aged mice, the E2 treatment had beneficial effect against the age-related decline in long-term temporal associative memory. E2 enhanced the capacity to relate temporally distant events in memory, i.e. temporal binding, by prolonging the time interval across which two stimuli can be linked.

Fear response to the context: We analyzed the evolution of freezing induced by the neutral context (2min. before tone in the tone test) vs. the conditioning context without grid and with grid. As shown in Figure 6 (bottom panel), we found that all groups discriminated between the neutral and conditioning context as they all exhibited more freezing to the conditioning context, whether with or without grid. Nevertheless, animals did not respond exactly the same to the three contexts as a function of their treatment and interval conditions.

In placebo-treated mice, we found that only the fear response to the conditioning context without grid was different between the two interval conditions. Namely, the group trained with a 20 sec. interval was insensitive to the presence/absence of the grid whereas, the group trained with 40 sec.-interval exhibited less freezing (no grid: *interval effect* $p=0.0008$) to the conditioning context in the absence of grid.

In contrast, E2-treated mice reacted as much to the conditioning context without grid than to the context with grid, whichever their trace interval condition. These animals behaved differently between the two interval- conditions only with respect to the neutral context: freezing to the neutral context was higher for the group trained with the longer interval ($p=0.043$).

In summary, when conditioning to the tone diminished, due to prolonging intervals between the tone and the shock, placebo mice exhibited more conditioning to another salient cue, the grid (more cue-conditioning), while E2-treated mice did not. These E2-treated mice (trained under the 40 sec.-interval condition) likely became more conditioned to surrounding cues that are common to the conditioning cage and the neutral one, as their freezing to neutral context increased.

4. Conclusions relative to long-term memory

So far, our behavioral results support the conclusion that E2 supplementation at the dose of 1 μ M in drinking water alleviates the age-related impairment in the relational/declarative component of long-term memory, possibly through the restoration of temporal binding capacity. This beneficial effect might be specific of R/DM because the same treatment had no visible effect on the aging-related changes of locomotor activity, and did not seem to enhance non-relational forms of long-term memory (like egocentric learning in the radial maze, or cue (grid)-conditioning in fear conditioning). Altogether, results obtained in trace fear conditioning add to those obtained in the radial-maze model to suggest that the balance between different long-term memory systems, possibly recruited by learning, might be altered by E2 to the benefit of the hippocampus-dependent, R/DM system.

B. Short-term/working memory

As already explained in introduction, we decided to study the effects of E2 supplementation on short-term/working memory for two main reasons:

- This form of memory is highly sensitive to aging, probably the memory that degrades the most and the earliest during aging
- This form of memory may require forgetting as much as retention. Since known cellular effects of E2 on LTP/LTD balance are believed to promote mnemonic retention and prevent forgetting, we expect that E2 supplementation might not be as beneficial to short-

term/working memory as to long-term memory, since preventing forgetting may increase interference in short-term memory and paradoxically impair it.

-

1. The model of aging-related degradation in short-term/working memory (WM) in mice

a) *Modeling WM in animals*

Like for DM memory, modeling WM in animals turns out to be difficult.

In humans WM refers to two principal components: the short-term maintenance of online information and the organization of this information (reducing interference). Because WM is an “active state”, unlike long-term memory, it has limited capacity and is therefore highly sensitive to interference. Because WM deterioration has consequences on almost all kinds of cognitive abilities, WM is intensively explored and conceptualized in humans (Baddeley 1996; Baddeley et al. 1999; Repovs & Baddeley 2006; Bunge et al. 2000). Unfortunately, this conceptualization has no good correspondence in animals.

In animals, WM refers to “trial-dependent” memory, i.e. memory of varying information, a definition which has no implication for an “active state”, and therefore no implication for “limited capacity”. Consequently, the WM tasks that are the most commonly used in animals neglect the issue of interference and crucial organizational component of WM. WM is not only about maintaining temporary information; managing interference is also essential because interference prevent retention. Unlike classical paradigms used to study WM (e.g. T-maze), the radial-maze task used in our experiment was specifically designed to capture both components of WM: temporary retention of varying information and organization/management of interference.

b) *The radial-maze task of short-term/WM*

The WM radial-maze task resembles the R/DM task in its material structure but it taxes the capability to retain changing (trial-dependent) information over intervals varying from several

seconds to several minutes, and the capability to organize this information to reduce interference between successive trials.

Like for the R/DM task, 6 arms of the maze are combined into 3-pairs, but unlike the R/DM task, the reward location within each pair varies between trials according to an alternating rule: the food is always in the arm that the mouse did not visit in the previous trial with the same pair. The learning rule is based on the natural behavior of mice that is alternation. The mouse must remember which arm was visited in one specific trial until the next trial with the same pair in order to alternate its choice, and so on. The task therefore taxes temporary retention capability, but also organizational capability to reduce interference produced by the trials with concurrent pairs as well as by the repetition of trials with each pair.

In this task, the difficulty level is not the same across the successive trials of a training session. As illustrated in Figure 7, the difficulty of one specific trial n depends of two factors:

- 1°) *the amount of interposed concurrent pairs since last trial with the same pair that we call "Retention Interval" (RI).* These intervening trials between $n-1$ and n increase the retention

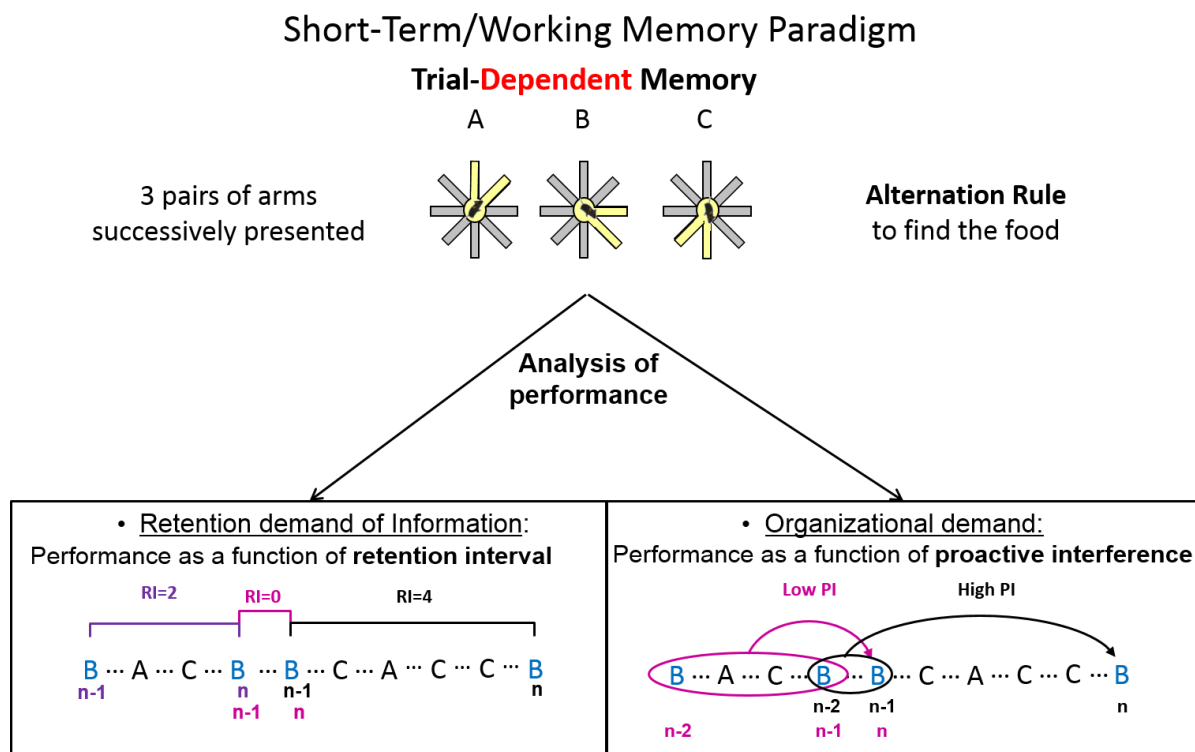


Figure 7: Short-Term/Working Memory Paradigm. For details see text.

demand by prolonging the time between $n-1$ and n and amount of potential interference by concurrent pairs.

To evaluate retention capacity, performance is analyzed as a function of RI, varying from 0 to 4; this analysis provides us the forgetting curve of each group.

- 2°) *the amount of intervening trials between $n-1$ and its preceding trial with the same pair, $n-2$, affecting potential interference between the two.* Indeed, to succeed in n trial the subject must alternate on the basis of $n-1$ and not confound $n-1$ with its preceding trial, $n-2$. The risk of such potential interference by $n-2$, which is called *Proactive Interference (PI)*, theoretically depends on the distance (i.e. amount of interposed trials) between $n-1$ and $n-2$, the shorter the distance, the bigger PI.

To evaluate the PI effect, performance is analyzed as a function of number of intervening pairs between $n-2$ and $n-1$. PI is high when this number is small; PI is low when this number is big.

Previous experiments have shown that, as expected, young mice perform clearly better than aged mice in the task. Furthermore, in young mice, performance is modulated by RI and by PI in the expected direction: performance diminishes as RI (distance between $n-1$ and n) increases, and also as PI increases (distance between $n-2$ and $n-1$ diminishes). However in aged mice, the modulation of performance by PI is rarely seen.

Unlike young mice, aged ones exhibit no sensitivity to proactive interference likely because they forget more. This interpretation is supported by an experiment in which the duration of the inter-trial interval ITI was manipulated (Marighetto et al. 2011). Independent groups of young and aged mice were trained in the WM task under 0, 10 or 20 sec.-ITI conditions. It was found that the age-related decrease in performance was maximized under the intermediate interval (10 sec.) and attenuated under the longer interval condition (20 sec). This “paradoxical” facilitation of performance seen in aged mice by prolonging the ITI, i.e. by increasing the retention demand, can be explained by the fact that, as retention becomes more difficult, forgetting increases and interference diminishes. Thus, aged mice would not remember successive arm visit long enough to suffer from interference under the long (20 sec.) ITI condition, and would therefore perform

the task almost as well as young mice, which do remember enough to be disturbed by interference. In contrast, with a shorter ITI, interference could occur more frequently in aged mice, explaining that their performance diminishes and their impairment relative to young mice is bigger. The same paradoxical facilitating effect of prolonging ITI duration was found in aged humans submitted to the virtual radial-maze version of the WM task (Marighetto et al. 2011). Interestingly, genetic deletion of hippocampal (DG) neurogenesis, known to impair mnemonic retention was previously found to produce also a “paradoxical” facilitation of WM performance under learning conditions of high interference (Saxe et al. 2007).

In our WM task, the duration of the ITI affects retention demand and organizational demand in an opposite direction: the longer the inter-trial intervals, the higher the retention demand, and the lower the organizational demand. In other words, the retention demand and the organizational demand do not vary independently, and a treatment which affects the retention capability will consecutively alter the organisational demand. For example, young mice with hippocampal lesion were found to suffer a tremendous acceleration of forgetting in this WM task: their performance was fully normal (above 80% correct) for the shorter RI (0 interposed trials between n-1 and n) but dropped to chance level as soon as 1 concurrent pair or 20 sec.-inter-trial interval was interposed. Logically, these mice demonstrated no sensitivity at all to PI (Marighetto et al. 2011).

Because we expected that E2 supplementation in aged mice would improve retention/reduce forgetting but would not improve organization we needed to study the effect of E2 on both retention and organizational components of WM. Therefore present experiment was run under the intermediate (10 sec.-) ITI condition.

2. E2 has no effect against the age-related deficit in WM

a) Protocol

After two weeks of pretreatment through drinking water which lasted until sacrifice of the animals, placebo-treated young mice (n=13); placebo- and E2-treated aged mice (n=13, and n=12 respectively) were submitted to 18 training sessions in the WM task (Figure 8).

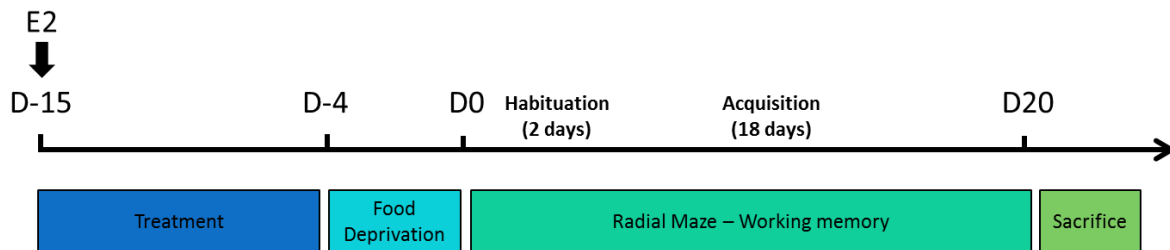


Figure 8: Timeline of the Short-Term/Working Memory experiment

b) Results

As shown in Figure 9A, % correct responses increased across 3-session blocks in all groups (*Block Repeated measures*: $p < 0.001$ for each group). Nevertheless, performance of the aged groups remained below the young group (in placebo *Age* effect: $F_{1,23} = 20.43$; $p = 0.0002$; *Block Repeated measures*: $F_{5,115} = 13.37$; $p < 0.0001$; *Age X Block*: $p > 0.14$ ns. in aged mice, *Treatment and Treatment X block* : ns); E2 has no effect on the age-related impairment.

Performance in the final sessions was expressed as a function of retention interval RI (Figure 9B) and as a function of proactive interference (Figure 9C). As shown in Figure 9B, while performance diminished as RI increased in all groups, the forgetting curve of the aged placebo-treated group was not parallel to the young group's one. While the young curve progressively diminished from 90% to 65% correct as RI increased, the aged group's performance was already lower for the minimal RI and reached the minimal performance of young mice as soon as intermediate RI (in placebo *Age* effect: $F_{1,23} = 6.848$; $p = 0.015$; *RI Repeated measures*: $F_{4,92} = 19.557$;

$p < 0.0001$; $Age \times RI$: $p > 0.07$ ns). The forgetting curve of E2-treated aged mice was identical to that of placebo-treated aged group (in aged mice: *Treatment* effect: $p > 0.38$ ns; *RI repeated measures*: $p < 0.0001$, *Treatment $\times$ RI*: $p > 0.62$ ns). Analysis of proactive interference effect showed that unlike the performance of young mice, the performance of placebo-treated aged mice was not modulated by potential variation of PI (in placebo *Age $\times$ PI*: $p = 0.065$ ns). Again, E2-treated mice did not significantly differ from the placebo condition (in aged mice, *Treatment $\times$ PI*: $p > 0.18$).

In conclusion, the E2 supplementation which restored the aging-related deficit in long-term R/DM failed to improve Short-Term/Working Memory.

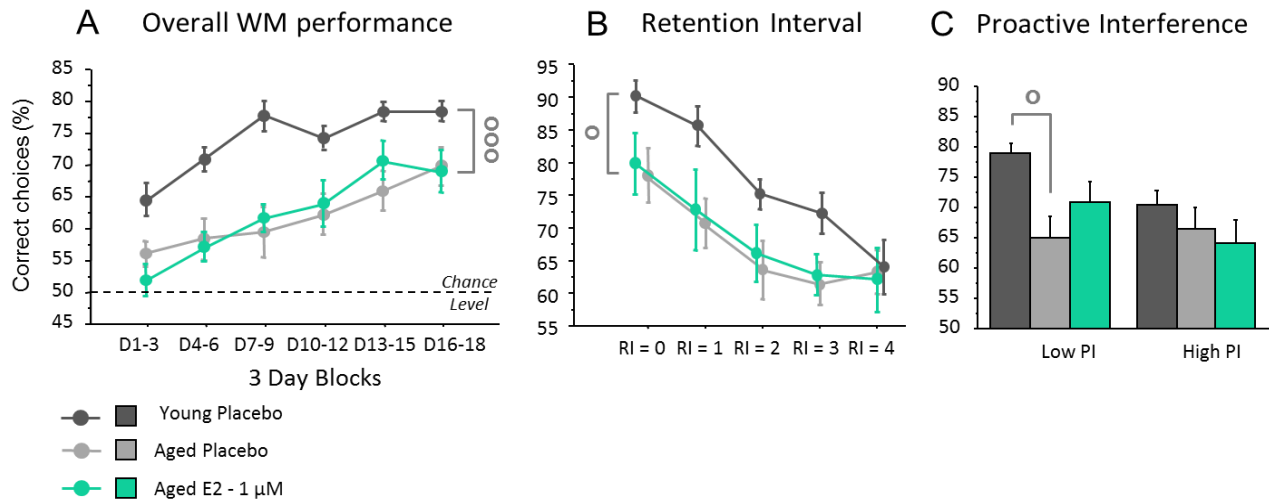


Figure 9: WM performance

A/ Overall performance per block of 3 days. **B/** Performance as a function of retention interval. **B/** Performance as a function of proactive interference. ○: age effect, $p < 0.05$. Data presented as mean $\pm$ SEM. Young placebo: $n = 13$; Aged Placebo: $n = 13$; Aged E2 1 μ M: $n = 12$.

Conclusions on the behavioral effects of E2 supplementation in aged mice

In aged mice, chronic E2 supplementation through drinking water at the dose of 1 μ M was found to have beneficial impact on performance in two tasks of long-term memory, flexible R/DM in the radial-maze task, and temporal associative memory in the trace fear conditioning test, i.e. two forms of relational memory relying on the hippocampus. This beneficial effect of E2 was not generalized to non-relational long-term memory, as contribution of non-R/DM forms seemed to be reduced in the two tests used. Namely, egocentric learning in the radial maze task and cue (grid)-conditioning in trace fear conditioning tended to be attenuated.

The same E2 supplementation failed to normalize the age-related reduction in locomotor activity in activity cages.

Finally, the E2 supplementation was totally ineffective against the aging-related impairment seen in another radial-maze task sensitive to hippocampal damage but assessing Short-Term/Working Memory of varying information with demand on both retention and organization capabilities.

As a whole, the potential benefit of E2 supplementation in aged mice appeared to concern very selectively “hippocampus-dependent” long-term memory.

II. NEUROBIOLOGICAL EFFECTS OF E2 SUPPLEMENTATION IN AGED MICE

To explain the behavioral effects of E2 supplementation we attempted to identify the neurobiological correlates of these effects at different levels of brain function.

We started with the system level for two main reasons. First, as explained in introduction, this level of analysis is rarely explored in animal studies and therefore is a missing link between molecular/cellular and behavioral effects of E2. Second, in agreement with our expectations, our behavioral results demonstrated that E2 supplementation effects clearly differed as a function of the form of memory concerned. Hence, we could expect differential effects of the supplementation on the different neural systems that are believed to sustain one specific form of memory or another.

Namely, based on behavioral effects just described above, we hypothesized that the supplementation should:

- Restore the age-related alteration of brain activities in neural systems underlying relational/declarative long-term memory but not in those sustaining short-term/WM.
- Enhance activities of the relational/declarative memory system but reduce those of non-relational forms of long-term memory.

A. Fos imaging of E2 effects at the system level

1. Introduction

To image brain activity associated with a specific task, we chose to use immunohistochemical detection of Fos protein expression. Indeed, expression of the immediate early gene c-fos is considered as an indicator of neuronal activation (Guzowski et al. 2001). Even though this marker of neuronal activation may not be as “ubiquitary” and “general” as we would like it to be, it is currently used to map brain systems recruited by a task and it has been used by the team since

more than ten years to identify functional alterations within memory systems associated with memory degradation in aging.

Regarding long-term memory, as already mentioned, an ensemble of previous studies by the team (Etchamendy et al. 2001; Etchamendy et al. 2003; Etchamendy et al. 2012; Mingaud et al. 2008; Mingaud et al. 2007) has provided strong evidence that the selective impairment of R/DM seen in aged mice is likely to be due to the lack of functional activation of the hippocampus during learning (stage 1 of the radial maze task), especially to the lack of CA1 activation (Brayda-Bruno et al, in preparation). Hence, we expect that the E2 supplementation will normalize functional activity of the hippocampus, and especially will restore CA1 Fos activation induced by training in stage 1 of the R/DM task (3-pair discrimination learning).

The neurobiological bases of the aging-related impairment seen in the radial-maze task of short-term/WM have been less investigated. As already mentioned though, we know that functional integrity of the hippocampus is also required to perform this task (Marighetto et al. 2011). However, Fos imaging studies so far have shown that the aging-related impairment in WM, unlike the relational DM impairment, is associated with hyper-activation of the hippocampus (especially of CA3 and DG) and prefrontal cortex (Marighetto et al. 2011). Our hypothesis is that E2 supplementation will not normalize these hyper-activations, at least will not totally restore hippocampal and prefrontal hyperactivities.

Finally, based on Fos measures, we will investigate the effects of the E2 supplementation on functional connectivity among brain structures involved in memory. Indeed, recent investigations by the team on how the different structures work together, have shown that analyses of such functional coordination among structures, called “functional connectivity” can reveal changes in brain function that functional (Fos) activation alone do not show. For example while the levels of hippocampal and amygdalar activation in young mice were found to be similar between a spatial (“hippocampus-dependent”) learning task and a cue-learning (“amygdala-dependent”) task, the analyses of functional connectivity revealed that the functional relations between the hippocampus, amygdala and other brain structures were clearly different between the two tasks (Boucard et al. 2009). Also, analyses of functional connectivity plus functional activity revealed a

clear impact of partial and memory-ineffective lesion of the septo-hippocampal cholinergic pathway on other brain structures. The results suggest very early role of cholinergic neuron degeneration in pathological aging (Brayda-Bruno et al. 2013). Based on these observations, we expected that long-term memory and short-term/WM would induce different connectivity patterns among the hippocampus, prefrontal cortex, striatum and amygdala. We also expected that aging would alter these connectivity patterns, and that E2 supplementation would tend to normalize functional connectivity associated with long-term memory but not WM.

2. Protocol

To test our hypotheses, we performed Fos immunohistochemistry in young placebo-treated mice, aged placebo-treated mice and aged-E2 treated mice following training in the radial-maze either in the initial 3-Pair acquisition phase of long-term memory task or in the WM task. These “learning groups” were compared to two control conditions:

- 1) home-cage “naïve” mice, that provided the basal level of Fos expression in resting condition, i.e. the “pre-training state” for each of the young placebo-, aged placebo- and aged E2-treated groups
- 2) treadmill trained mice (again of each of the conditions young placebo, aged placebo and aged E2) representing a control of activity induced by “no-learning” training to examine to what extent age- or E2-related changes in brain activity are specific of learning.

After 2 weeks of treatment through drinking water, young placebo, aged placebo and aged E2-treated mice were divided into 3 behavioral conditions: naïve, treadmill or radial-maze long-term memory (LTM). The animals of the radial maze short-term/WM condition (WM) were those of the behavioral experiment described above. All groups were submitted to partial food deprivation before the beginning of behavioral training. Naïve mice were maintained without any training in their home cage; Treadmill mice were submitted to daily sessions of treadmill in parallel to, and for the same amount of time as the groups submitted to training in the radial-maze task of long-term memory (LTM). These LTM and Treadmill animals were sacrificed for Fos immunochemistry 90min after the beginning of the 3rd training session in the 3-pair discrimination

learning task (stage 1 of the long-term R/DM task). The WM group and Naïve mice were both killed after the last of WM testing (18th session).

The density of Fos-positive cells was counted in the CA1, CA3 and DG subfields of the hippocampus, prelimbic (PrL) and infra-limbic (IL) parts of the prefrontal cortex, dorso-medial and dorso-lateral parts of the striatum (DMS and DLS), and lateral and baso-lateral amygdala (LA and BLA). The levels of Fos expression in the different structures as well as the matrices of between-structure correlations were analyzed to compare functional activations and functional connectivity between the different behavioral conditions and the different groups of age or treatment. The final number of subjects by group was 7-14.

Due to technical problems, half of the experiment on long-term memory had to be re-done from the beginning, and counting is still in progress for DLS, LA and BLA. For this reason, these results are not presented.

3. Results

a) *Fos activation*

Fos results relative to the naïve condition (Figure 10) showed that aging in placebo condition did not significantly alter basal activity among studied structures, only a tendency to increase was found in CA3 (*Age effect*: $p > 0.08$ ns). In contrast, E2 supplementation significantly diminished basal activity in three structures: hippocampal CA1 (*Treatment effect*: $p = 0.015$), CA3 ($p = 0.042$) and in DMS ($p = 0.01$). *Results relative to the treadmill groups* (Figure 11) showed that treadmill training enhanced Fos levels relative to naïve controls in numerous structures in both young and aged placebo-treated groups but not in aged E2-treated mice. In the treadmill condition, aging reduced the activation observed in IL but enhanced Fos levels in the DG. In contrast, E2 supplementation tended to decrease Fos levels relative to the aged-placebo condition in all structures. This diminution was statistically significant for each structure (*Treatment effect* in treadmill: all p -values < 0.046) except for PrL and CA1 (*Treatment effect*

$p>0.08$ for the two structures). Thus, the E2 treatment in aged mice produced a generalized reduction of Fos activations induced by the “no-learning” training in memory systems, whereas aging by itself produced only discrete functional alterations in this training condition.

Results relative to the two learning conditions offered a different picture (Figure 12). First, aging was associated with significant reduction or increase of Fos levels depending on the structure and memory concerned. Second, E2 supplementation produced significant reduction of Fos levels only in CA3 for the WM condition (*Treatment effect*: $p=0.019$), and in DMS for the LTM condition (*Treatment effect*: $p=0.02$; Figure 12A).

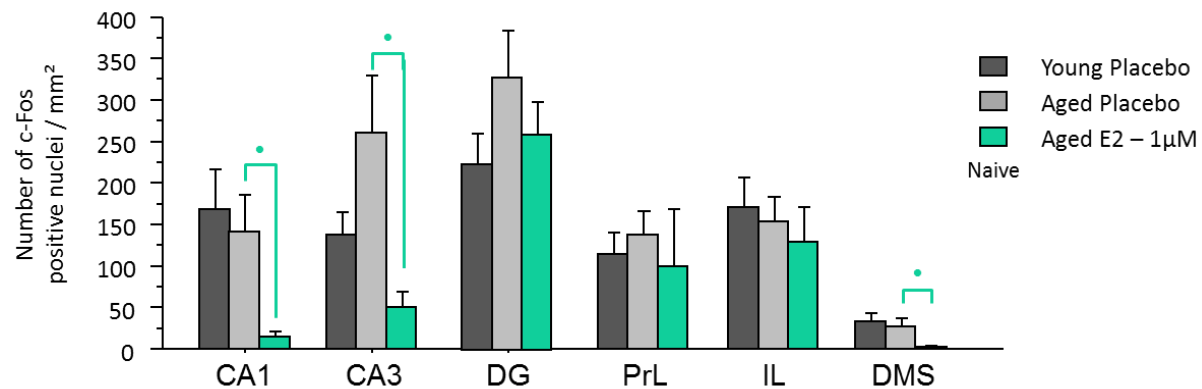


Figure 10: Number of Fos immuno-positive cells/mm² in Naive mice

DG=Dentate Gyrus; PrL=Pre-Limbic PFC; IL= Infra-Limbic PFC; DMS=Dorsal striatum.

• represents the E2 effect in aged mice, $p<0.05$. Data presented as mean $\pm$ SEM

In the placebo condition, LTM acquisition (stage 1 of the R/DM task) produced significant Fos increases relative to basal (naïve) levels in all hippocampal subfields, prefrontal areas and DMS in the young group but these activations were absent for the hippocampal and prefrontal areas in the aged group (*Age effect in LTM* $p<0.05$ for CA1, IL, PrL; Figure 12A-B). In contrast, aging preserved Fos activations induced by the WM task in CA3, prefrontal cortex and DMS, and even amplified WM activations in DG (*Age effect in WM*: $p<0.05$). Briefly, aging resulted in hippocampal (CA1) and prefrontal Fos hypo-activations under LTM training but in DG hyper-activation under WM training.

In the aged groups trained in LTM task, E2 did not re-establish young adult levels of hippocampal activity but it nevertheless alleviated the age-related defect of CA1 activation. Indeed, E2 supplementation did not increase Fos levels in comparison to the aged-placebo condition in any of the studied structures, whatever the memory involved (Figure 12A). However, in aged E2-treated mice, like in young mice, LTM-induced activations (relative to basal Fos levels) were observed in hippocampal CA1 ($p=0.0008$) and CA3 ($p=0.0046$) but not in the DG and prefrontal cortex (Figure 12B).

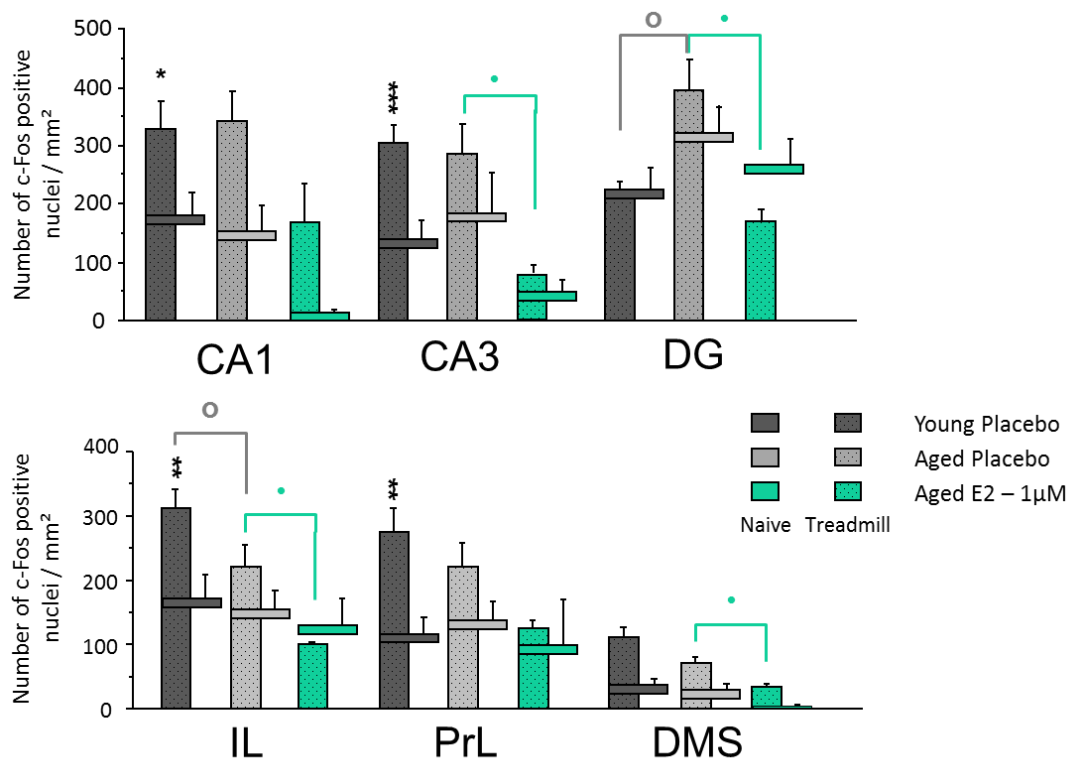


Figure 13: Number of Fos immuno-positive cells/mm² in Treadmill and Naive mice

Naive mice in plain flat histograms and treadmill mice in dotted histograms

○: age effect in placebo mice, $p<0.05$; ●: E2 effect in aged mice, $p<0.05$; *: activation induced by the locomotor task, $p<0.05$; ** $p<0.01$. Data presented as mean $\pm$ SEM.

In the aged groups trained in the WM task, E2 had no effect on the hyperactivation of DG. Fos levels measured in the E2-treated group were increased relative to basal (naïve) condition. Also, those levels were at least as high as those measured in the aged placebo group, in prefrontal and hippocampal structures except in CA3, where Fos levels, despite being increased by the task, remained significantly lower than in the young placebo group.

In conclusion, in learning conditions, the E2 supplementation did not reduced Fos activities all over memory systems as it did in the “no-learning” training condition. The treatment restored the age-related defect of CA1 and CA3 activation by LTM acquisition but did not normalize the age-related hyperactivation of DG induced by WM testing.

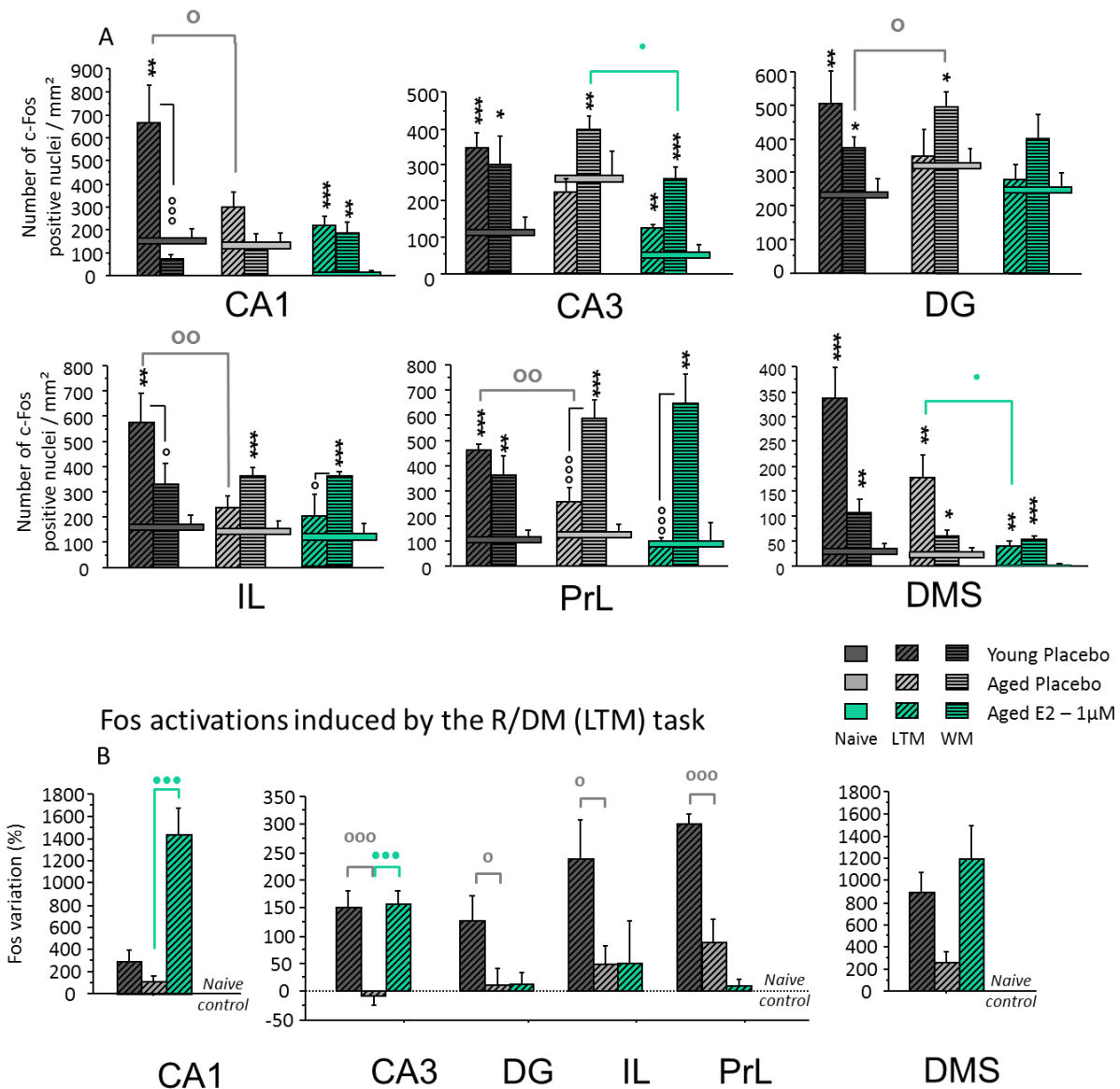


Figure 12: Fos imaging of the two radial-maze tasks: LTM acquisition (stage 1 of R/DM) and WM.
A: Number of Fos immuno-positive cells/mm² in CA1, CA3, DG, IL, PrL, DMS. Levels of activation of Naive mice are represented by plain rectangles, LTM mice by diagonal stripped histograms and WM mice by horizontal stripped histograms **B:** percentage of Fos variation from basal level (Naive mice) induced by the LTM acquisition task. Data presented as mean $\pm$ SEM.

b) *Functional connectivity*

To complement analyses of Fos activities, we analyzed the functional coordination among structures reflected in between-structure correlations of Fos levels, and called functional connectivity. Namely, the matrices of between-structure correlations within each group were submitted to statistical analyses developed by Xavier Nogues (Boucard, Marchand, & Noguès, 2007, cf details in the method section) to determine whether functional connectivity was different between the different behavioral and age or treatment conditions.

As already mentioned above, for technical problems, Fos counting is still in process for striatal and amygdalar regions of the LTM, Treadmill and Naïve groups. Hence, the statistical analyses of functional connectivity relative to these groups have not been done yet. Only the statistical comparison of functional connectivity in the groups trained in the WM task has been completed. Thus, aging decreased functional connectivity triggered by WM among hippocampal DG (and CA3), prefronto-striatal circuits and other memory-related structures (like LA, BLA, DLS, CA1). E2 supplementation failed to normalize the age-related loss in functional connectivity induced by WM.

Correlation matrices of the LTM, WM, and naïve groups are represented in Figure 13. In the young groups, it seems that the functional structuration of studied structures was different between the basal state and the learning conditions. There was less correlations in the naïve group than in the LTM and WM ones. Matrices of the two learning conditions looked different too, as there were more correlations for the WM task than for the LTM one, and all correlations were positive for WM whereas some were negative correlations for LTM.

Between-structure correlation matrices in the WM visually show that functional coordination among structures was different between the young and aged placebo groups. Namely all positive correlations, which concerned the DG, CA3, prefrontal cortex and DMS in the young group, disappeared in the aged group, and they remained invisible in the E2-treated aged group. Statistical analyses confirmed that the young matrix was different from the aged one ($p=0.050$ for Md and $p=0.027$ for ED).

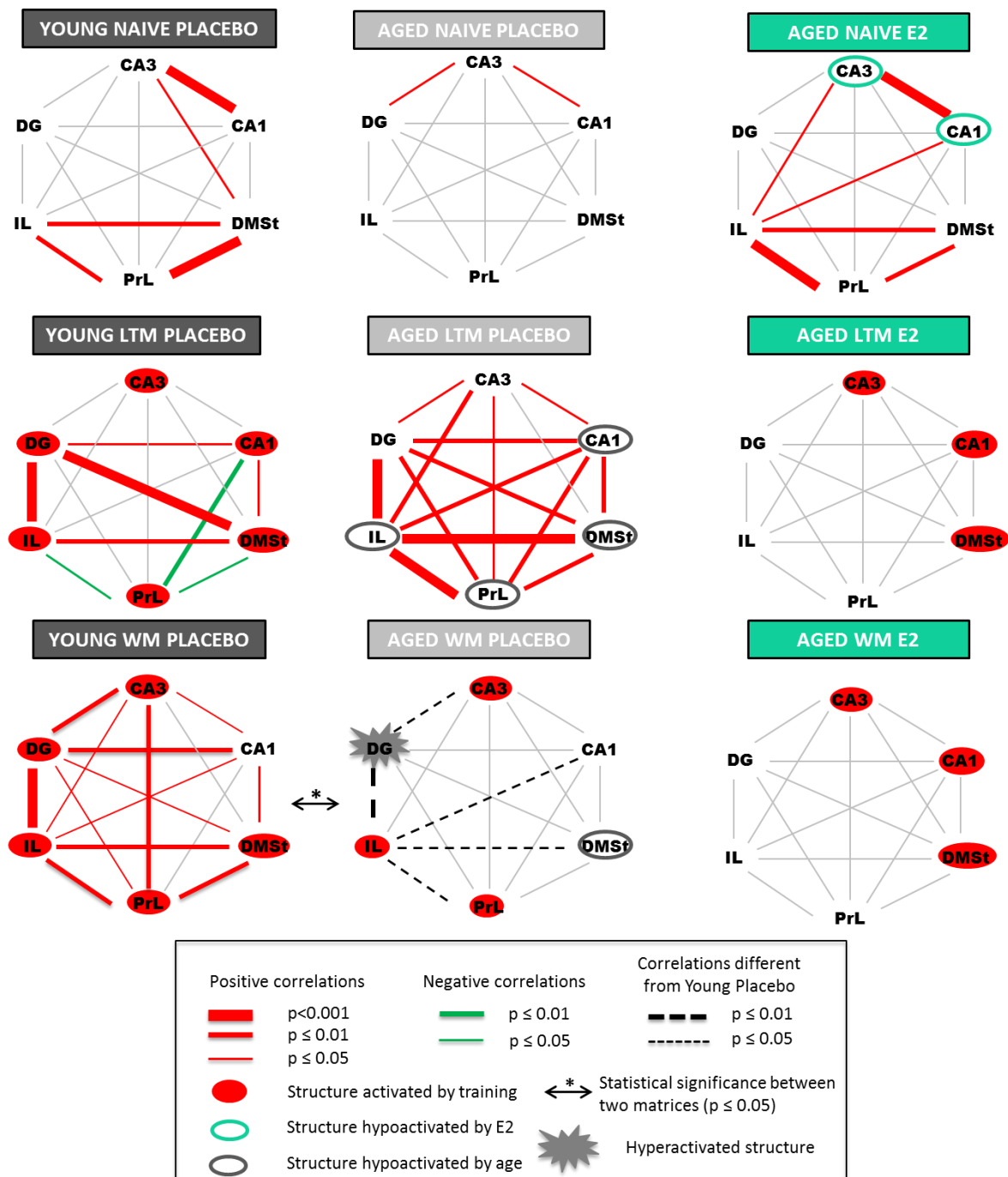


Figure 13: Functional connectivity in naive, LTM and WM mice

The Figure recapitulates statistically significant inter-structure correlations within the matrix of each group (positive correlations in red, negatives in green), as well the correlations significantly different ($p < 0.05$) from the young WM placebo mice group in the aged WM placebo mice matrix (black dotted lines). The grey lines illustrate every possible correlation. The statistical significance of each correlation is represented by its line width: thin when $p < 0.05$, medium when $p < 0.01$ and thick when $p \geq 0.001$. The statistical comparison of correlation matrices by the method developed by Boucard et al. (bootstrap test, cf Methods and materials) confirmed the visual impression that the correlation matrix of the young WM placebo mice

group was statistically different from that of aged WM placebo mice group (*: $p < 0.05$). Abbreviations: CA1, CA3, DG: subfields of dorsal hippocampus;; DMSt: dorsomedial striatum.

In placebo conditions, aging altered the memory-dependent structuration of between-structure relationships but visibly in a different manner between LTM and WM. Indeed, while all positive correlations seen in the young WM matrix disappeared in aged mice (as already said above), in the LTM condition, the matrix of aged mice contained more correlations than the young one. Furthermore, all the correlations were positive in the aged LTM matrix while there were negative correlations in the young matrix. Thus, it seems that aging decreased functional connectivity triggered by WM, such that the brain appeared to remain more or less in the “basal state” of functional connectivity, whereas in the LTM condition, learning would trigger in aged mice a functional connectivity differing from the one seen in young mice.

Unexpectedly, E2 supplementation did not seem to normalize functional connectivity triggered by LTM acquisition. It appeared that there was almost no correlation at all between structures in the matrices of the aged E2-treated mice, whichever their behavioral condition.

In conclusion, although the functional connectivity results must be taken cautiously as they are still uncompleted, they completed our conclusions based on Fos activity results on two points. First, they would further demonstrate that aging results in functional alterations of memory systems in a manner that clearly depends on which form (s) of memory is (are) engaged by the task. Second, E2 supplementation failed to normalize functional activity and connectivity within memory systems, even in the learning conditions in which it restored the age-related behavioral deficit.

4. Conclusions on the system level

It appears that most areas involved in memory are more or less recruited by learning, whatever the task, but their recruitment is adjusted according to the task, both in terms of levels of activity of each structure and of coordination within an ensemble of structures. Aging is clearly associated with a de-regulation of functional organization of memory systems triggered by a learning task. The selective beneficial effect of E2 supplementation against the aging-related impairment in relational/declarative long-term memory which critically depends on hippocampal

CA1 activity, was found to be, as expected, associated with a beneficial effect on CA1 (and CA3) capability to increase its activity when forming long-term memory. Also as expected, this beneficial effect was not observed in all regions and was selective of CA1 and CA3. However, E2 was far to normalize hippocampal activity and apparently failed to restore the age-related alterations in functional connectivity.

B. Effects of E2 supplementation on the aged hippocampus: CA1 dendritic spine density and morphology

It is known that E2 can influence dendritic spine density and morphology in particular in CA1. To examine whether the beneficial effect of E2 on the age-related deficit of R/DM could be through dendritic spines, we used the Golgi technique. Because CA1 is critical to temporal binding capacity and was found to be sensitive to the E2 supplementation, we studied the effect of E2 on this structure. After a complete training in the R/DM task, we analyzed the density and the morphology of CA1 dendritic spines in young placebo, aged placebo- and E2-treated mice.

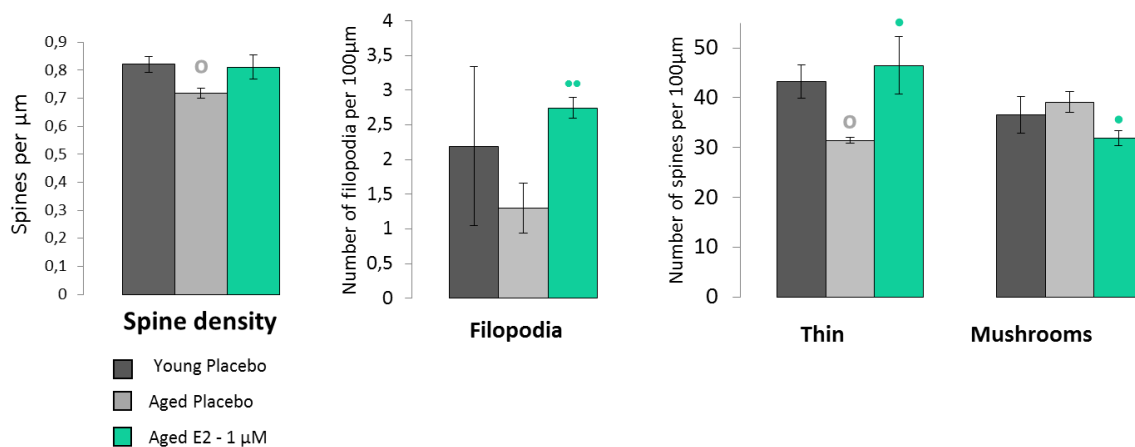


Figure 14: Effect of age and E2 on dendritic spine density and morphology

Results are expressed as the number of filopodia/spines per 100µm

○: age effect in placebo mice, $p < 0.05$; ●: E2 effect in aged mice, $p < 0.05$, ●● $p < 0.01$. Data presented as mean $\pm$ SEM.

First, aging induced a decrease in dendritic spine density (Age: $F_{1,6}=10.617$; $p=0.0173$), which tended to be normalized by E2 ($p > 0.05$, Figure 14). We studied the effect of age and E2 on

filopodia, long and highly dynamic protrusions that are precursors of spines. While there was no effect of age, probably because of the large variability, E2 induced a significant increase in filopodia density (*Treatment*: $F_{1,6}=15.922$; $p=0.0072$). Regarding spine morphology, we studied thin long spines, which are dynamic and immature spines and mushroom spines, which are stable, small and mature spines. While age significantly decreased thin spine density (*Age*: $F_{1,6}=12.022$; $p=0.0133$), it had no effect on mushroom spine density. On the other hand, the E2 treatment induced a significant increase of thin spine density and a significant decrease of mushroom spine density (*Treatment*: $F_{1,6}=6.953$; $p=0.0387$ - $F_{1,6}=7.762$; $p=0.0317$, respectively).

Taken as a whole, these data suggest that aging results in an imbalance between the immature and mature spines, as it induced a decrease of thin spines, and that E2, by increasing the thin spine density, restores a more dynamic profile of spine morphology. This effect could underlie the beneficial effect of E2 on the age-related deficit of declarative memory.

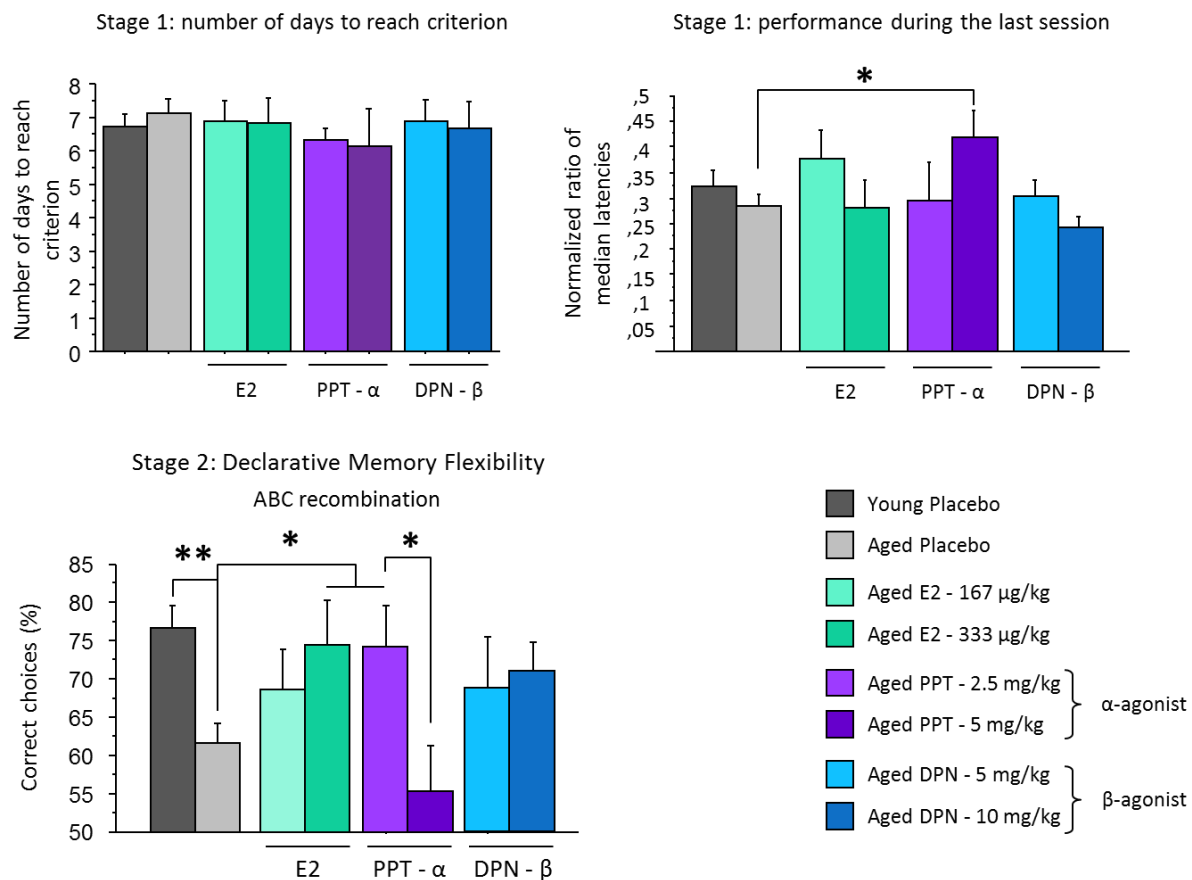
III. DISSECTING THE MECHANISMS: WHICH ER MEDIATES THE EFFECTS OF E2 ON THE AGE-RELATED DEFICIT OF DECLARATIVE MEMORY?

A. Behavioral results

As we previously showed (ø I-2b), E2 was found to reduce the proportion of aged mice capable to learn the 3-pair discrimination task, we then decided to use the other version of the R/DM task, *i.e.* the Go/NoGo version. To assess the specific role of each ER subtype and because there was no specific antagonists of ER subtypes, we used two agonists: 1,3,5-Tris(4-hydroxyphenyl)-4-propyl-1H-pyrazole (PPT) is an α ER-agonist; 2,3-Bis(4-hydroxyphenyl)propionitrile (DPN) is a β ER-agonist.

In aged mice, we compared two doses of each agonist, two-doses of E2 and placebo conditions. Doses of each compound were chosen on the basis of literature (Phan et al. 2011). A

group of young mice treated with placebo was also included. Treatments were injected subcutaneously each day, starting 5 days before submitting them to the R/DM task and then 1h



before radial-maze training.

Figure 15: Effect of E2 and the ER α and ER β agonist on the R/DM performance

Upper left panel: number of days to reach criterion; **Upper right panel:** performance during the last session of training (Stage 1) expressed by the normalized ratio of median latencies between the baited arms vs. the non-baited arms; **Bottom panel:** performance during the flexibility test (Stage 2) expressed by the mean performance (percentage of correct choices) on pairs A, B and C. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$. Data presented as mean $\pm$ SEM.

In stage 1, almost all mice learnt the Go/NoGo task and there was no between-group difference in the amount of training required to reach the acquisition criterion. However the higher dose of PPT enhanced the final level of Go/NoGo discrimination as measured by the latency ratio (latency to enter baited arms vs. latency to enter non-baited arms). This ratio evaluate the mouse's willingness to enter baited arms, hence the level of acquisition. This ratio also reflects

the quality of non-declarative memory, which is formed during the first stage of the Go/No-Go version of the R/DM task.

In the critical test of R/DM flexibility in stage 2, E2 at the higher dose (333 µg/kg) and PPT at the lower dose (2.5 mg/kg) completely rescued the aging-related deficit of R/DM (*Age in Placebo*: $F_{1,33}=10.083$; $p=0.0032$) as these two groups performed significantly better than the placebo one (*Treatment E2*: $F_{1,12}=4.414$; $p=0.0467$; *Treatment PPT*: $F_{1,18}=5.790$; $p=0.0271$). The lowest dose of E2 and the two doses of DPN non-significantly improved performance of aged mice relative to the placebo condition, while the higher dose of PPT tended to impair it (Figure 15).

In summary, only the lowest dose of PPT was able to replicate the beneficial effects of E2 against the aging-related deficit of R/DM. However, the role of the α ER subtype is not so clear because the higher dose of PPT tended to aggravate the R/DM deficit, while enhancing the final performance in acquisition. Finally, the beneficial tendency seen with the DPN agonist suggests that present results should be completed by testing the effects of other doses.

B. mRNA expression of ERs

To better understand our results regarding the ER subtype responsible for the effect of E2 on R/DM, we measured mRNA expression of each subtype in each hippocampal subfield in young and aged mice (Figure 16). We compared the mRNA expression of ER α , ER β and GPER1 in young and aged mice. The mRNA expression of ER α was the highest in CA1, intermediate in CA3 and the weakest in DG. Furthermore, there was a significant increase of the expression induced by age in CA1 and CA3 but not in DG. ER β mRNA expression was the highest in CA3 compared to CA1 and DG and no significant effect of age was found. Regarding GPER1, no difference in mRNA expression across hippocampal subfields or effect of age was found (not shown). The number of cycle needed to amplify the three cDNA suggests that ER α is the most expressed ER mRNA subtype in the hippocampus.

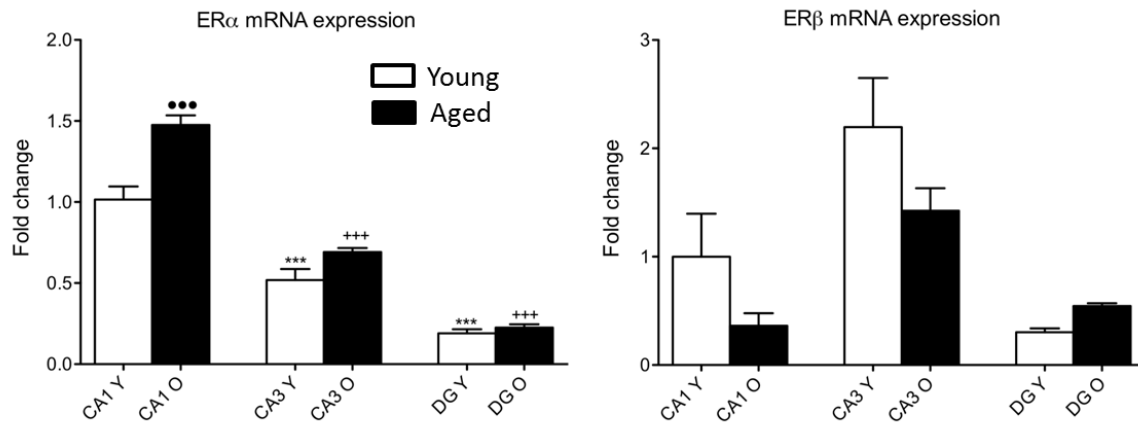


Figure 16: Effect of age on the expression of ERα and ERβ mRNAs

●●●: effect of age in CA1, $p < 0.001$, ***: CA3 or DG vs. CA1 in young mice, $p < 0.001$; +++: CA3 or DG vs. CA1 in aged mice, $p < 0.001$. Results are represented as a fold change vs. young placebo in CA1 (mean $\pm$ SEM). Y: Young, O: Old.

Adding the facts that 1/CA1 is critical to the formation of DM, 2/ in CA1, ERα mRNA expression is increased in aged mice, and 3/ ERα agonist seems to replicate the beneficial effect of E2 on the age-related deficit of DM, it appears that ERα might be responsible for the effects of E2 in our paradigm, but additional experiments must be conducted to confirm this hypothesis.

C. Effects of E2 and the agonists on the expression of key plasticity proteins

We first looked at the effect of aging on the expression of key plasticity proteins, GluA1 and PSD-95, in the whole hippocampus. Both expressions significantly decreased in aged mice and E2 had no effect on either GluA1 or PSD-95 expressions (Figure 17).

Regarding the ER agonists, at the lowest dose, they both rescued the aging-induced deficit of GluA1 and PSD-95 in hippocampus and both highest doses showed no effect on either protein expression (not shown). In an attempt to distinguish between the two agonists at the molecular level, we investigated how they affect PSD-95 and GluA1 expressions in PFC and striatum. Here again, the two agonists had the same effect whether in PFC or striatum: they both induced a decrease of the expression of PSD-95 and GluA1. In the PFC, there was no effect of age or E2 on

GluA1 or PSD-95. In the striatum, age induced a decrease of GluA1 expression, which was normalized by E2; there was no effect of age and E2 on PSD-95 expression.

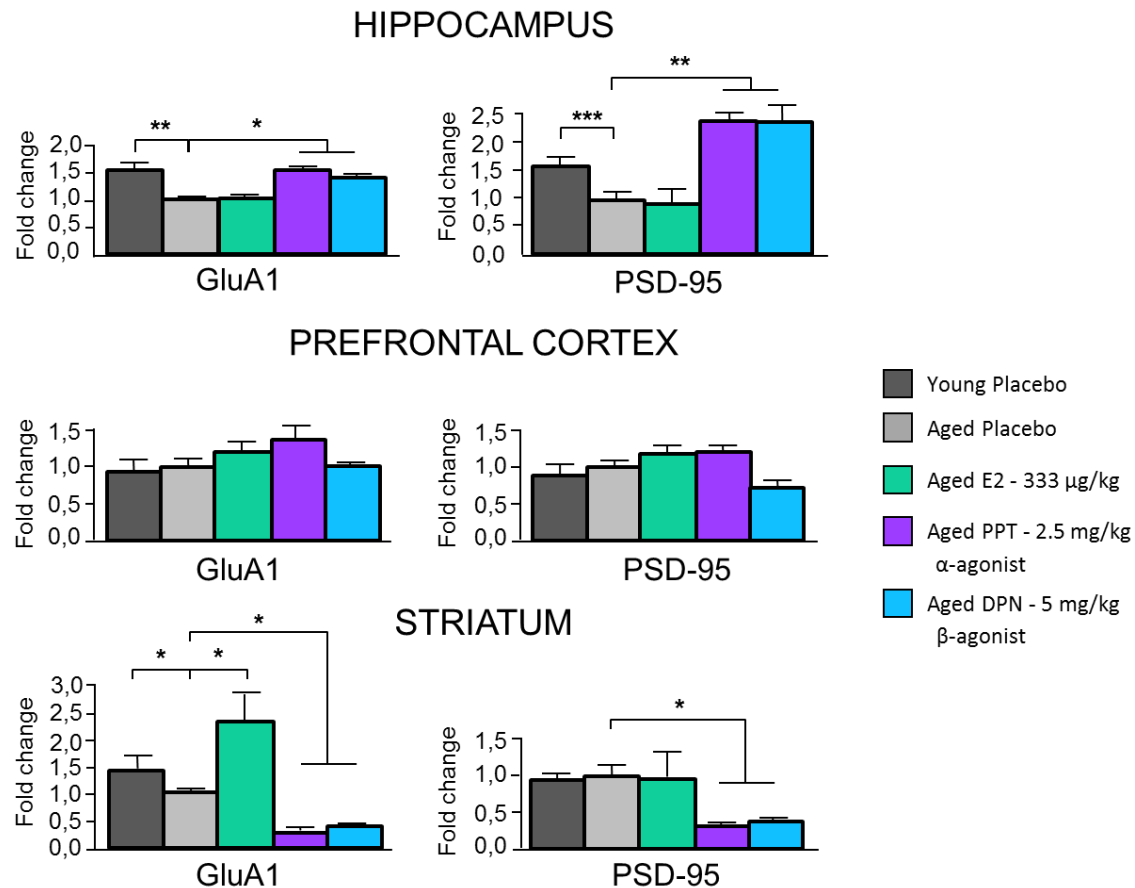


Figure 17: Western-blot analysis of PSD-95 and GluA1 expression in hippocampus, PFC and striatum

Results are represented as a fold change vs. Aged placebo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Data presented as mean $\pm$ SEM

Our results further demonstrate the complexity of the pathways triggered by E2 and the agonists. Indeed, while behavioral studies showed that only the ER α agonist (PPT) at 2.5mg/kg produced the same effect as E2 (Figure 15), the western blot analysis suggested that the two treatments did not trigger the same pathway (Figure 17). The beneficial effect of E2 on R/DM appears to be independent of the expression of hippocampal GluA1 and PSD-95, while the beneficial effect of PPT could be through the normalization of their expression.

IV. DISCUSSION

The work presented in the present chapter was aimed at improving our understanding of potential therapeutic interest of E2 against aging-related degradation of memory function. At the behavioral level, the results are in line with our hypotheses. We found that, in aged male mice, an oral E2 supplementation can have beneficial effects on hippocampus-dependent, relational/declarative components of long-term memory but not on short-term/WM when temporary retention *and* organization/forgetting are needed. At the brain level, the results only partly support our hypotheses. As expected, the beneficial effect against the age-related R/DM deficit was associated with beneficial impact on hippocampal function, in particular on CA1 responsiveness to memory testing and CA1 spine morphology. However, the supplementation was far to restore age-related alterations of functional activities within memory systems to normal (young adult) levels, whether in the hippocampus or elsewhere. Finally, our attempt to identify which ER subtype, and which synaptic protein might be involved in the memory effect was inconclusive.

- **Behavioral level: E2 rescues the age-related deficit in relational/declarative memory and improves temporal binding capacities**

The major result of this work is that E2 supplementation rescued the age-related impairment of R/DM in a dose dependent manner, further demonstrating the potential therapeutic interest of E2 against memory decline in aging (Frick 2012; Frick 2008). This finding complements existing literature on several aspects.

First, the present result shows that E2 supplementation can be beneficial to senescent memory also in males. This finding supports the suggestion that cerebral E2 availability declines in aging and that this decline plays a role in the degradation of memory. Although we cannot affirm that hippocampal levels are directly involved in the present effect, this view is in agreement with previous reports of high hippocampal levels of E2 in young male (Hojo et al. 2009) and age-

related decline in hippocampal aromatase activity, the last step in E2 production (Chambers et al. 1991)

Second, taken together with the enhancement of trace associative memory in the fear conditioning test, present beneficial effect on R/DM expression suggests that E2 restores the age-related deficit in capability to relate discontinuous events, i.e. temporal binding, which might be responsible for the degradation of episodic memory. Indeed, temporal binding is an important process in forming relational representation of specific conjunction of events underlying episodic memory (what happened where and when). It has been shown that aging reduces temporal binding capability (Kaczorowski et al. 2012; Cuppini et al. 2006), and as already mentioned, our team recently showed that this reduction was responsible for the R/DM impairment seen in aged mice (Brayda-Bruno, in preparation). Young adult mice can temporally bind two separate events up to 40 sec.-intervals (Brayda-Bruno, in preparation; Misane et al., 2005). In our paradigm, aged mice displayed a memory of the tone-shock association up to 20 sec.-interval between the two stimuli, but not beyond, and the E2 supplementation prolonged their temporal binding capability. This result is consistent with previous studies that showed positive correlation between circulating E2 and associative memory in a trace eye-blink conditioning, in comparing ovariectomized animals with and without E2 supplementation (Leuner et al. 2003), and in comparing young females and males (Dalla et al. 2009). Thus, our present study adds to previous knowledge to strongly suggest that E2 supplementation can restore one of the most important mnemonic functions that declines in aging, through the improvement of temporal binding capability.

However, E2 displayed seemingly “paradoxical” effect on the acquisition of the R/DM task. Indeed, while it restored the age-related impairment in R/DM expression as revealed by the flexibility probe in stage 2, E2 impaired the acquisition of the task in certain subjects, as it dose-dependently increased the proportion of “no-learner” mice that failed to reach the acquisition criterion. As already explained, previous work from the lab has shown that the acquisition task in stage 1 is ambiguous, as it can be learnt in different manners, i.e. with or without the recruitment of the hippocampus, but only “hippocampus-dependent” learning leads to flexible memory

expression in stage 2. Interestingly, the no-learner E2-treated mice also exhibited less use of an egocentric response strategy (that likely relies on the striatum) than no-learner placebo mice. Thus, it seems that E2 may promote hippocampus-dependent learning at the expense of alternative like striatum-based learning. E2 effect on response- vs. place- learning strategy was previously studied in ovariectomized rats (Davis et al. 2005; Zurkovsky et al. 2006). The results indicated that E2 can indeed trigger a spatial learning strategy by a direct effect on the hippocampus. Similarly, in female rats, preferential learning strategies were shown to evolve during the hormonal cycle with preference for place-learning when circulating E2 was high and for response learning when E2 was at its lowest (Korol 2004).

Taken together with these previous studies, present findings therefore suggest that, in aged animals, which normally preferentially use an egocentric strategy because the hippocampus is altered (Barnes et al. 1980), E2 would promote a shift toward an allocentric , “hippocampus-dependent “, and flexible learning strategy, preventing response learning. This suggestion is consistent with our Fos activation experiment showing that E2 improves the activation induced by the task in the hippocampus and decreased overall striatal activity. Overall, normal “hippocampus-dependent” learning would be restored in a majority of aged mice (the “learners”) but not in about one third of the aged population (the “no learners”) in which insufficient restoration of hippocampal function in the absence alternative strategy would prevent successful learning.

One possible explanation for such seemingly opposite effects of E2 supplementation among two populations of aged mice resides in the “healthy cell bias” hypothesis. This hypothesis states that E2 could only rescue the lack of estrogens in aged subject if the cell had not already been deteriorated by “hypo-estrogenism”. Within this view, the “no-learner” mice would have suffered more from low E2 availability than the “learners”, and they could represent a model of “pathological aging” (Gallagher & Rapp 1997). This suggestion is similar to that made previously on involvement of E2 diminution in Alzheimer’s disease development (Honjo et al. 2003).

- **E2 supplementation has no effect on the age-related deficit of working memory**

We found no effect of E2 against the age-related degradation of short-term memory assessed by our radial-maze task, which taxes temporary retention and organization/forgetting of varying information. This finding may seem inconsistent with the literature, because many studies have shown an improvement of WM after an E2 treatment (Bimonte & Denenberg, 1999; Conrad & Bimonte-Nelson, 2010; Gibbs, 2000; Luine & Rodriguez, 1994 ; rev in Pompili et al., 2012). Beside the fact that most of previous studies were done in females, the discrepancies between previous work and ours might be explained by the behavioral paradigm. Indeed, unlike our WM model, the tasks used previously did not assess organizational demand because they did not add interference in the paradigm. It is known that coping with interference is highly vulnerable to aging (Grady and Craik, 2000; Hedden and Gabrieli, 2004) hence, it is an important parameter to take into account when testing WM. The heterogeneity among WM tasks regarding interference may partly account also for the heterogeneity existing among previous studies as some of them suggested that there no relation between E2 and WM (for review: Henderson & Popat, 2011).

Thus, the lack of WM effect of E2 in our task might be explained by the fact that the treatment would not improve organizational aspects of WM. The fact that we did not found any improvement of the retention component either was unexpected as the literature suggests that short-term retention can be enhanced by E2 and we found beneficial effect of the treatment on trace memory retention. Inefficacy of E2 to improve temporary retention in our WM study might be explained by the fact that we used a learning condition (10 sec.-inter-trial interval) that maximizes concomitantly retention and organizational demands (as shown in a previous experiment by Marighetto et al, 2011). Under such learning condition, enhancing retention capacity concomitantly increases interference; hence beneficial effect on retention might have been masked by high interference. If such was the case, we should be able to demonstrate beneficial effects of E2 in the same radial-maze task, by reducing interference and increasing retention demand through the prolongation of inter-trial intervals.

Whatever might be the case, present findings highlight one important limitation of the therapeutic interest of E2 supplementation given that, in every-day life, memory function implies

much more than long-term storage of information. Our radial maze task of short-term memory can be viewed as model of “everyday life memory” as, our daily activities require to temporarily remember information, which is varying all the time *e.g.* “where did I park my car this morning?” This information is relevant until I get my car back, and then it becomes irrelevant and potentially confusing with memories of next placements of my car. Thus, forgetting and organizing information in memory to avoid interference from previous learning is also an important component of memory function, although much less studied than the remembering component, in particular regarding potential sensitivity to E2.

- **System level and morphological level: E2 tends to normalize CA1 activity**

At the system level, the beneficial effect against the age-related R/DM deficit was accompanied by restoration of hippocampal CA1 and CA3 responsiveness to the task. Indeed, Fos levels in these two fields were increased by LTM testing relative to basal levels, in E2-treated aged mice and young mice while not in placebo aged mice. In contrast, the treatment did not restore the age-related defects of Fos activation by the LTM task seen in the DG and PFC. Knowing that CA1 sustains temporal binding function (Huerta et al, 1999), such selective effect on CA1-CA3 hypoactivation provides further evidence that the age-related deficit in R/DM comes from functional alteration of CA1 (Brayda-Bruno et al, in prep.). Present beneficial effect of E2 is in line with a previous study that showed similar restoration of hippocampal functional activation induced by a DM task in peri-menopausal women treated with E2 (Maki et al. 2011). Even if Fos levels were still lower than those seen in young mice, the treatment may have induced a more dynamic state of the hippocampus, explaining its increased reactivity to the task and the mnemonic effect.

However, E2 was not totally without effects on Fos activity measured in other memory-related areas. In line with its lack of influence on the performance in the WM task, the supplementation did not significantly change Fos activities related to WM testing, and in particular failed to normalized the task-induced overactivation in DG. In contrast, the treatment was found to significantly reduce basal activity in CA1, CA3 as well as in the DG where activity was reduced

whichever the behavioral condition. Besides, even though such global reduction of DMS activity is in line with above-discussed behavioral evidence for E2 capability to induce a shift toward hippocampus-based learning strategies, it was rather unexpected given that ERs are supposed to be poorly expressed in the striatum (Mitra et al. 2003). Also unexpected was the finding that the supplementation prevented the activations induced by the treadmill training and reduced activities related to this no-learning training in all studied structures except CA1 and PRL. Finally, at the level of system coordination, the supplementation apparently failed to restore age-related alterations of functional connectivity, whichever the task. The treatment globally disrupted functional coordination as almost all between-structure correlations disappeared in E2-treated mice, whichever the behavioral condition.

As a whole, present Fos findings suggest that E2 supplementation has a global impact on memory systems, such that structures' reactivity to environmental stimulations and how the structures work together is modified. Future analyses in other brain areas are necessary to determine to what extent such global alteration of functional activity is restricted to memory systems or not.

At the morphological level, E2 supplementation also normalized the morphological profile of dendritic spines in CA1 and resulted in a more dynamic state of pyramidal neurons. It is known that, in female rats, E2 increases dendritic spine density in CA1 (Gould et al. 1990; Woolley & McEwen 1990; Smith et al. 2009; Murakami et al. 2006). These findings were among the first evidence suggesting that E2 could affect memory function. However, we did not replicate this result: E2 did not increase dendritic spine density. This finding is consistent with studies showing that in mice, E2 does not exert exactly the same effects as in rats and does not increase dendritic spine density (McEwen 2002). However, it also has been shown that E2 could affect dendritic spine morphology by increasing mushroom-shaped spines in ovariectomized young mice (Woolley & McEwen 1992; Li et al. 2004). In our results, after a DM task, aged E2-treated mice displayed a normalization of dendritic spine morphology profile but this effect was toward an increase of thin spines and filopodia, hence toward a more dynamic state. Again, these discrepancies can be explained by differences in age, gender and species between previous

studies and ours. To the best of our knowledge, there is no study in aged male mice for us to compare to, but one study using male rats slices showed an increase of thin spines after an application of E2 (Mukai et al. 2007). Here, morphological data of CA1 dendritic spines support an effect of E2 to normalize CA1 function, the very hippocampal subfield critical to R/DM formation.

- **ER α activation replicates the beneficial effects of E2 on R/DM**

In the literature, it is still of debate which ER subtype mediates the effects of E2. We studied the effect of two commonly used agonists that are PPT (α -agonist) and DPN (β -agonist) in aged mice and compared their effect to that of E2. Only ER α agonist replicated the beneficial effect of E2 on R/DM. A role of ER α in the beneficial effect of E2 was consistent with the mRNA expression of each subtype within the hippocampus. In CA1, which is critical to R/DM expression, ER α was more expressed than in the other subfields and also more expressed than ER β which was only weakly expressed in the whole hippocampus. Furthermore, ER α expression was increased in aged animal, suggesting a preferential role for this subtype. Moreover, we currently have an experiment in progress (data not shown) which confirms that ER α is more expressed than ER β in CA1 and indicates that in CA3, ER β is significantly reduced in aged animals. We have to take into account the fact that we measured mRNAs, whose expression can differ from the related proteins. However, a previous study also demonstrated predominance of ER α in mouse hippocampus by studying protein expression (Mitra et al. 2003).

Our results are not entirely consistent with the literature. Indeed, most of the studies found that ER β was responsible for the effect of E2 on hippocampus-dependent memory. In particular, the ER β agonist has been shown to improve reference memory in the Morris Water Maze (Rhodes & Frye 2006). Furthermore, mice lacking ER β (bERKO) displayed impaired performance in a fear conditioning paradigm and spatial deficits in a Morris Water Maze task (Day et al. 2005).

These discrepancies can be explained by the species used, since most of the study used ovariectomized rats. It is known that the distribution of each subtype in hippocampus is not

exactly the same in rats and mice. In rats, ER α is very sparsely expressed and ER β is the predominant subtype (Shughrue et al. 1997). This is not the case in mice, in which ER α is the predominant subtype (Mitra et al. 2003). Nevertheless, similar results regarding the preferential involvement of ER β rather than ER α have also been found in ER β knock-out mice, suggesting that species may not be the only explanation for the differences between previous experiments and ours.

We also measured key plasticity protein expression (i.e. PSD-95 and GluA1) in the hippocampus, PFC and Striatum of treated mice. We did not find any difference between the effects of the two agonists on the expression of PSD-95 in any structure. Furthermore, both agonists normalized age-related hippocampal hypo-expression of GluA1 and PSD95 but E2 failed to do so, suggesting that the beneficial effect on memory may not be through the expression of these proteins. Yet, it was found in a previous study (Morissette et al. 2008) that only PPT exerted the same beneficial effect as E2 on synaptic markers. But again, ovariectomized rats were used in this study, possibly explaining the difference with ours.

Among possible explanation of present lack of conclusive results, we have to take into account that present western blot analyses were done on the whole hippocampus. Missing hippocampal subfield selectivity can explain apparently contradictory findings. Also, one cannot be sure that the differences in protein expression actually affect synaptic function; even if a protein is over-expressed, it doesn't necessary result in an increase of this particular protein at the synapse.

Clearly, further experiments are needed to confirm that in our paradigm, ER α is responsible for the beneficial effect of E2 on the age-related decline of R/DM. In particular, we will try to confirm that, like E2 the ER α agonist at its efficiency dose on R/DM, enhances temporal binding using the trace fear conditioning paradigm.

V. MATERIAL AND METHODS

Relational/Declarative memory task – 3-pair acquisition: dose effect of E2 on the age-related deficit in R/DM

Animals

Studies were conducted using male C57/BL6 mice (Charles River, L'Arbresle, France). The animals were divided in two groups: young adults (4 months; n=11) and Aged (20 months; n=42). From their arrival, mice were collectively caged in animal standardized room conditions under a 12:12 light:dark cycle, and *ad libitum* food and water. 25 days before the beginning of experimentations, mice were caged in small groups (4-7 mice per group) and put under treatment. 10-7 days before the beginning of the experiments, mice were caged separately and placed in an actimeter (IMETRONIC- Pessac- France). Finally, mice were submitted to a partial food deprivation (85-90% of their free feeding weight) throughout the duration of training.

Treatments

Mice were supplemented with 17 β -Estradiol (E2; Sigma-Aldrich E8875) in drinking water. Aged mice were divided in four treatment groups: placebo (water 2% Propanediol-1,2 (Prolabo, PG); Aged n=11), 0,25 μ M E2 2% PG (Aged n=7), 0.5 μ M E2 2% PG (Aged n=12), 1 μ M E2 2% PG (Aged n=12). Young mice (n=11) received placebo solution. From the beginning of the treatment, the food was replaced by a soybean-less food (Harlan Teklad Global Diet; Harlan Laboratories Inc, Indianapolis, Indiana, USA). Treatments lasted until animals were killed. We checked that all mice approximately drank the same amount of water ($\approx$ 4mL).

Apparatus

For memory testing, we used an open 8-arm radial maze made of grey Plexiglas, automatized by videotracking (IMETRONIC- Pessac- France). The diameter of the central platform is 30 cm and the arms are 55 cm long by 10 cm large. Each arm is equipped with a door at its entrance and a food-pellet delivering system at its end. The doors are individually controlled (raised up or dropped down) by the computerized system which also controls pellets availability in the food tray at the end of each arm individually, according to the schedule of the task. The maze is placed in an empty room (next to the computer room) containing visual cues to enable spatial discrimination.

Behavioral Procedure (Figure 1)

During the entire procedure, animals were submitted to one daily session.

Prior to memory testing, animals were habituated to the apparatus over a period of two days. Each day, animals were allowed to move freely in the radial maze. To complete the session, mice had to visit each arm until its end.

Stage 1: Acquisition of 3-pair discriminations

The acquisition task consisted in learning the position of the food within the maze. Indeed, each animal was assigned three adjacent pairs of arms (pairs A, B and C). In each pair, only one arm was baited. The experiment is designed in a way that the left arms of the pairs A and B are baited while the right arm of the pair C is. In each trial, the subject was confronted with access to a pair (either of pairs A, B and C). A choice was considered to be made when the subject had reached the food well of an arm; this also triggered the closure of the door to the alternative arm. The trial was finished as soon as the subject returned to the central platform. The subject was then confined to the central platform for 20s before the next discrimination trial began: this constituted the Inter-Trial Interval (ITI). Each daily session consisted of 20 consecutive trials comprising alternate presentations of pairs A, B and C according to a pseudo-random sequence.

A mouse was considered to reach criterion performance when its overall choice accuracy was at or above 75% over two consecutive sessions given that performance in each of the three discrimination choices were at least 62% correct. The test task began the following day when criterion performance was reached.

Stage 2: Flexibility probe of R/DM

In the test task, the position of the food in the maze did not change, but R/DM expression was assessed by changing the way of presenting the arms. Indeed, in place of the pairs A and B, a pair AB was submitted to the mouse. The AB pair consisted in the combination of the two adjacent arms of the pairs A and B. It was the critical test of flexibility. Two other pairs were used in control trials: the pair C that remained unchanged (“unchanged learnt control”, and pair N (=new) made of the two arms non-used in acquisition (“unlearnt control”).

Choice accuracy was measured as the percentage of correct responses for each pair.

Trace fear conditioning task

Animals

Studies were conducted using male C57/BL6 mice (Charles River, L'Arbresle, France). The animals were aged mice (22 months; n = 48). From their arrival, mice were collectively caged in animal standardized room conditions under a 12:12 light:dark cycle, and *ad libitum* food and water.

Treatments

Mice were supplemented with 17 β -Estradiol (E2; Sigma-Aldrich E8875) in drinking water for two weeks prior to behavioral experiment. Aged mice were divided in two treatment groups: Placebo (water 2% PG; Aged n=24) and 1 μ ME2 2% PG (Aged n=24). From the beginning of the treatment, the food was replaced by a soybean-less food (LASQCdiet®, Rod18, Rad, LASvendi, Pagenstr, Germany). Treatments lasted until animals sacrifice.

Apparatus

Fear conditioning behavior was performed in a Plexiglas conditioning chamber (30 x 24 x 22 cm), in a brightness of 100 lux, given access to the different visual-spatial cues in the experimental room. The floor of the chamber consisted of stainless-steel rods connected to a shock generator (Imetronic, Pessac, France).

Trace fear conditioning procedure

The box was cleaned with 70% ethanol before each trial.

During acquisition of conditioning, each animal received 3 pairings of a tone (85 dB, 1 kHz, 30 s) and a footshock (0.3 mA, 50 Hz, 1 s). The two stimuli were separated by a trace interval of 20 or 40 sec, depending of the group.

All mice were submitted 24 hour later to two memory retention tests:

- Tone test: Mice were re-exposed to the tone alone in a dark and modified chamber [2min pre-tone, 2min tone and 2min post-tone].
- Context test: 2 hours later, mice were reexposed to the conditioning chamber alone, 2 min with the grid hidden, and 2 min. with grid visible

Animals were continuously recorded on videotape for off-line scoring of freezing by an observer blind of experimental groups. Freezing is defined as a lack of all movement except for

respiratory-related movements. Fear response to the tone was measured by the evolution of percentage of freezing time during the tone compared to before (0-2min) and 1 min after tone delivery (NoTone vs. Tone). Fear response to the context was measured by evolution of %time freezing in neutral context (modified chamber before the tone) vs conditioning context without and with the grid.

Working memory task – effect of E2 on the aging-related deficit in short-term/WM

Animals

Studies were conducted using male C57/BL6 mice (Charles River, L'Arbresle, France). The animals were young placebo (12 weeks; n=12) and aged mice (20 months; n = 25). From their arrival, mice were collectively caged in animal standardized room conditions under a 12:12 light:dark cycle, and *ad libitum* food and water. Two weeks before the beginning of experimentations, mice were caged in small groups (4-7 mice per group) and put under treatment. 8 days before the experiments, mice were caged singly submitted to a partial food deprivation (85-90% of their free feeding weight) throughout the duration of training.

Treatments

Mice were supplemented with 17 β -Estradiol (E2; Sigma-Aldrich E8875) in drinking water. Aged mice were divided into two treatment groups: placebo (water 2% PG; n=13) and 1 μ M E2 2% PG (n=12). Young mice (n=12) received placebo solution. From the beginning of the treatment, the food was replaced by a soybean-less food (LASQCdiet®, Rod18, Rad, LASvendi, Pagenstr, Germany). Treatments lasted until animals sacrifice.

Working memory task

The task assesses short term memory of varying information. As in the previous R/DM task, each animal were assigned three adjacent pair of arms that are presented repeatedly but, unlike the previous task, the food location changes according to an alternation rule between successive trials. The task relies on the natural alternation behavior of mice. Indeed, the baited arm of each pair is the one that the mouse did not visit during the previous trial.

The baited arm changed depending on the mouse's choice at the previous trial. In each trial, the subject was confronted with access to a pair (either of pairs A, B and C). A choice was considered to be made when the subject had reached the food well of an arm; this also triggered the closure of the door to the alternative arm. The trial was finished as soon as the subject returned to the central platform. Then, either the next trial began immediately or the subject was confined to the central platform for 10s before the next discrimination trial began: this constituted the ITI. Each daily session consisted of 20 consecutive trials comprising alternate presentations of pairs A, B and C according to a pseudo-random sequence. The training lasted 18 days.

Relational/Declarative memory task – Go/NoGo acquisition: ER agonists

Experiment

Animals

Studies were conducted using male C57/BL6 mice (Charles River, L'Arbresle, France). The animals were divided in two groups: young placebo (3 to 5 months; n = 13) and Aged (19 to 24 months; n=57). From their arrival, mice were collectively caged in animal standardized room conditions under a 12:12 light:dark cycle, and *ad libitum* food and water. 2 weeks before the experiments, mice were caged singly and their food was replaced by a soybean-free food (Harlan Teklad Global Diet; Harlan Laboratories Inc, Indianapolis, Indiana, USA). Finally, mice were submitted to a partial food deprivation (85-90% of their free feeding weight) throughout the duration of training.

Treatments

Mice were daily injected subcutaneously with 17 β -Estradiol (E2; Sigma-Aldrich E2758), 1,3,5-Tris(4-hydroxyphenyl)-4-propyl-1H-pyrazole (PPT, ER α agonist, Sigma H6036), or 2,3-Bis(4-hydroxyphenyl)propionitrile (DPN, ER β agonist, H5915). Aged mice were divided into 8 treatment groups: Placebo (NaCl 2.5% DMSO; n=16), E2 167 μ g/kg (n=8), E2 333 μ g/kg (n=6), PPT 2.5 mg/kg (n=6) PPT 5mg/kg (n=7) DPN 5mg/kg (n=8) DPN 10mg/kg (n=6). Young mice (n=13) received placebo solution.

Apparatus

For memory testing, we used an open 8-arm radial maze made of grey Plexiglas, automatized by videotracking (IMETRONIC, Pessac, France). The diameter of the central platform is 30 cm and the arms are 55 cm long by 10 cm large. Each arm is equipped with a door at its entrance and a food-pellet delivering system at its end. The doors are individually controlled (raised up or dropped down) by the computerized system which also controls pellets availability in the food tray at the end of each arm individually, according to the schedule of the task. The maze is placed in an empty room (next to the computer room) containing visual cues to enable spatial discrimination.

Behavioral Procedure

Prior to memory testing, animals were habituated to the apparatus over a period of two days. Each day, animals were allowed to move freely in the radial maze. To complete the session, mice had to visit each arm until its end.

The first stage is the acquisition task. It consisted in learning the position of the food within the maze in Go/noGo manner. Each arm was presented one by one, three arms were baited and mice had to learn which contained food and which one did not. The trial was finished as soon as the mouse returned to the central platform. The mouse was then confined to the central platform for 20s before the next discrimination trial began: this constituted the ITI. Each daily session consisted of 24 consecutive trials comprising alternate presentations of each arm (each arm was presented 6 times) according to a pseudo-random sequence until the criterion was reached.

A mouse was considered to reach criterion performance when its latency to enter in each unbaited arm was 30% longer than the latency to enter in baited arms and when the overall latency of the last two days of training was 50% longer in unbaited arms compared to baited ones. The test task began the following day when a mouse had attained criterion performance.

The second stage is the flexibility test in which the declarative memory is assessed by changing the way of presenting the arms. Indeed, adjacent arms were recombined into 3 pairs, without changing the position of the food. Plus, the two non-used arms of the acquisition task became pair N (=new), used as a control.

Choice accuracy was measured as the percentage of correct responses

C-Fos Immunohistochemistry

Animals

Studies were conducted using male C57/BL6 mice (Charles River, L'Arbresle, France). The animals were young mice (12 to 16 weeks $n = 40$) and aged mice (22 months; $n = 48$). From their arrival, mice were collectively caged in animal standardized room conditions under a 12:12 light:dark cycle, and *ad libitum* food and water.

Treatments

Mice were supplemented with 17β -Estradiol (E2; Sigma-Aldrich E8875) in drinking water for two weeks prior to behavioral experiment (DM or WM task). Aged mice were divided in two treatment groups: Placebo (water 2% PG; Aged $n=24$) and $1\mu\text{M}$ E2 2% PG (Aged $n=24$). Young mice ($n = 40$) received placebo solution. From the beginning of the treatment, the food was replaced by a soybean-less food (LASQCDiet®, Rod18, Rad, LASvendi, Pagenstr, Germany). Treatments lasted until animals sacrifice.

A neuroimaging approach based on the activity-dependent expression of the C-Fos protein is used to map changes in brain structures involved in specific memory tasks (Guzowski et al. 2001). Mice were killed for C-Fos immunohistochemistry 90 minutes (1) after the beginning of the 3rd day of acquisition stage for mice which performed R/DM and (2) after the 18th day of WM task. Session was limited to 20 minute-total time. Naive and Treadmill mice were sacrificed in parallel of behavior mice. Each mouse was sacrificed by lethal i.p injection of pentobarbital (250mg/kg). The final number of mice per group was 7-14 mice.

Then, they were perfused with 4% paraformaldehyde in a 0.1 M phosphate buffer (PB), pH7.4. Brains were removed, postfixed overnight, and then sectioned on a vibratome (50 μm). Sections were stored in a cryoprotective solution (30% glycerol/30% ethylene glycol/25% PB 0.1M/15% H_2O) until proceeded for immunodetection of C-Fos protein. Free-floating sections were rinsed in PBS (PB with 0.9% NaCl), and incubated in PBS with 0.5% H_2O_2 for 30 min and then in a blocking solution containing 1% bovine serum albumin (BSA), 3% goat serum (GS), and 0.2% Triton X-100 in PBS. Sections were incubated with the rabbit polyclonal antibody anti-c-C-Fos (1:5.000; #D1508; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) in a PBS-BSA-GS-Triton X-100 solution during 48h at 4°C. After extensive washes in PBS, sections were incubated with the biotinylated goat

anti-rabbit IgG (1:2.000; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) in a PBS-BSA-GS-Triton X-100 solution for 2 h at room temperature. Sections were then incubated in avidin–biotinylated horseradish peroxidase complex (ABC, Vectastain Elite kit, Vector Laboratories) for 2 h at room temperature. Then, sections were rinsed, the peroxidase reaction end product was visualized in 0.05M PB containing 0.025% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma) and 0.03% H₂O₂. Finally, sections were mounted on gelatin-coated glass slides, dehydrated through a graded series of ethanol, cleared in toluene, and coverslipped with Eukitt mounting medium.

For each animal, the number of c-Fos-immunoreactive neurons was counted bilaterally using three to four sections. The number of positive nuclei was quantified using an Olympus BX50 microscope equipped with a computerized imaging analysis system (Visiolab 2000 version 4.50; Biocom, Paris, France). Density of c-Fos immunopositive cells was counted among critical areas for long-term memory formation [CA1, CA3, and dentate gyrus (DG) of the dorsal hippocampus and prefrontal cortex (PFC) regarding relational/declarative memory; the dorso-medial (Str-DM) and dorso-lateral striatum (Str-DL) regarding procedural memory and amygdala (White et McDonald, 2002). Results were expressed as the mean number of positive cells per mm².

Western Blot

Mice from the agonist experiment were sacrificed by disrupting the vertebrae the day after the end of the behavioral task. Hippocampi were then harvested and rapidly frozen in dry ice. Hippocampi were homogenized in cold lysis buffer (20 mmol/l Tris, 140 mmol/l NaCl, 3 mmol/l EDTA, 10 mmol/l NaF, 10 mmol/l Na pyrophosphate, 2 mmol/l NaVO₄, 10% glycerol, pH 7.4, 1% Triton X-100, aprotinin, leupeptin, and PMSF). In experiment 2, hippocampi were homogenized in cold lysis buffer, and then centrifuged to grossly separate neuron nuclei and dendrites. Samples were analyzed by electrophoresis through 6% (GluA1), 8% (PSD-95), and 10% (m-Dia2) polyacrylamide gels and electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes. After 1h incubation at room temperature in Tris-buffered saline, 5% milk, or 1% milk plus 1% BSA and 0.05% Tween-20, the blots were exposed to antibodies recognizing GluA1, PSD-95 or Formin antibody overnight at 4°C. The primary antibodies were revealed using the corresponding mice

or rabbit peroxidase–conjugated secondary antibodies (1/2000) for 1 h. Peroxidase activity was detected using the Santa Cruz chemiluminescence kit.

Microdissection, mRNA Extraction and RT-qPCR

Mice from the trace fear conditioning experiment were sacrificed two weeks after the experiment by disrupting the vertebrae. The brain was cut in half and the brain blocks containing the hippocampus were then rapidly frozen on dry ice and stored at -80°C until sectioning was done. Briefly, the frozen brain was mounted onto Tissue-Tek[®] OCT compound on a chuck and the brain was placed in a Leica CM3050S cryostat (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) for twenty minutes to equilibrate the brain with a chamber temperature (CT) of -20°C and an object temperature (OT) of -18°C . Six, 50 μm thick sections of the hippocampus region were cut and placed on polyethylene naphthalate (PEN) Membrane Frame slides (Carl Zeiss, Munich, Germany) under RNAase-free conditions.

The slides were immediately placed on dry ice and stained on the same day using. Briefly, slides were transferred from dry ice into ice-cold 95% ethanol for 40 sec and incubated in 75% ethanol for 30 sec and in 50% ethanol for 30 sec. Specimens were briefly stained in 1% cresyl violet solution. Tissue sections were dehydrated through 50% ethanol (30 sec), 75% ethanol (30 sec), 95% ethanol (30 sec), followed by two 40 sec incubation in anhydrous 100% ethanol. Slides were dried for 5 min at RT.

Immediately after dehydration LCM was performed using a PALM MicroBeam microdissection system version 4.8 equipped with a P.A.L.M. RoboSoftware (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried, Germany). Microdissection Of CA1, CA3 and DG was performed at 5X magnification. Samples were collected in adhesives caps (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried, Germany).

To limit RNA degradation, samples were collected for up to 40 minutes per slide, after which the LCM caps were placed on a sterile microcentrifuge tube containing 350 μl of lysis buffer. The samples were stored at -80°C until extraction was done.

Total RNA was extracted from microdissected tissues using the RNeasy[®] micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol and eluted with 14 μl of RNAse-

free water. The concentration of RNA was determined using Nanodrop 1000 and the integrity of RNA was determined using RNA 6000 Pico Kit and Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Gene	GenBank ID	Forward Sequence (5'-3')	Reverse Sequence (5'-3')
Eef1a1	NM_010106	TGAACCATCCAGGCCAAATC	GCATGCTATGTGGGCTGTGT
<i>Ywhaz</i>	NM_011740	CTTGTGAGGCTGTGACACAAACA	TGGATTCCTGCTCTCAAACCTAACC
Sdha	NM_023281	TACAAAGTGCGGGTCGATGA	TGTTCCCCAAACGGCTTCT
<i>NonO</i>	NM_013743	CTGTCTGGTGCATTCTGAACAT	AGCTCTGAGTTCATTTCCCATG
Tuba4a	NM_009447	CTGGACCACAAGTTTGACTTGATG	TCCATTCCCTCACCCACATAC
Hmbs	NM_013551	TCAACAAAGGAGCCAAGAACATC	CCTACAGACCAGTTAGCGCACAT
Esr1 (ER α)	NM_007956	TGCCTATTGCTGGGTGTTGA	AATAATTTTCCTTCCCAGGCATAAT
Esr2 (ER β)	NM_207707	CTGCTGCTGGAGATGCTGAA	CAGCACTCAGACCCCGAGAT

Table 1 : Primer sequences

Genomic DNA contaminations were removed using the turboDNA free kit (Invitrogen). The integrity of the RNA was checked by capillary electrophoresis using the RNA 6000 Nano Lab-on-a-Chip kit and the Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Briefly, cDNA was synthesized from 2 μ g of total RNA using RevertAid Premium Reverse Transcriptase (Fermentas) and primed with oligo-dT primers (Fermentas) and random primers (Fermentas). QPCR was performed using a LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche, Meylan, France). qPCR reactions were done in duplicate for each sample, using transcript-specific primers, cDNA and LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche) in a final volume of 10 μ l. The PCR data were exported and analyzed in an informatics tool (Gene Expression Analysis Software Environment) developed at the NeuroCentre Magendie. For the determination of the reference gene, the Genorm method was used. Relative expression analysis was corrected for PCR efficiency and normalized against two reference genes. In particular, Eef1a1, Ywhaz and Nono genes were used as reference genes for CA1; Sdha, Eef1a1 and Hmbs were used as reference genes for CA3; Ywhaz, Hmbs, and Tuba4a were used as reference genes for DG. The relative level of expression was calculated using the comparative ($2^{-\Delta\Delta CT}$) method. Primers sequences are reported in table 1.

Dendritic spine density analysis

Golgi–Cox staining was performed using the FD Rapid GolgiStain kit (FD NeuroTechnologies). Mice were sacrificed by cervical dislocation and brains rapidly removed, rinsed briefly in water and processed according to the manufacturer's protocol. Sections of 100 μm were obtained with a Leica VT1200S vibratome (Leica Microsystems, Wetzlar, Hesse, Germany). Sections of 150 μm were obtained with a Leica VT1200S vibratome (Leica Microsystems, Wetzlar, Hesse, Germany). Images of CA1 stratum radiatum were taken using a Zeiss microscope at x63 magnification and then spines were measured using ImageJ software. Protuberance with a height $> 1,8 \mu\text{m}$ were classified as filopodia and protuberance with a height $< 1,8\mu\text{m}$ were classified as spines. Spines morphology was classified according to spine's head diameter: above $0,6\mu\text{m}$ spines were classified as mushrooms and below $0,6\mu\text{m}$, spines were classified as thin (Nodé-Langlois et al. 2006).

Statistical analyses

- Analyses of variance

Behavioural and immunohistochemical data were submitted to one-way analysis of variance (ANOVA) with either the between-subject factor: Age or Treatment, or two-way ANOVA with the factors: *Treatment* and *Behaviour* (Naive, Treadmill, WM, DM). Post-hoc comparisons were performed using Tukey/Kramer test.

- Functional connectivity

C-Fos data were submitted to numerical analyses designed to quantify the pattern of inter-regional functional connectivity, which then allowed us to examine if this might significantly differ between experimental groups. Namely, the pattern of a given group was represented as a whole by the correlative matrix comprising all possible pairwise correlations between any two structures. In order to compare correlation matrices between groups, we computed two indices: (i) the mean of the absolute value of the difference between the lower triangular parts of the two matrices (Md, see Eq. 1) and (ii) the Euclidean distance between the lower triangular parts of the two matrices (ED, see Eq. 2). They were computed as follows:

$$Md = \frac{2 \sum_{j=1}^k \sum_{i=j+1}^k (A_{ij} - B_{ij})}{k(k-1)} \text{ Eq.1}$$

$$ED = \sqrt{\sum_{j=1}^k \sum_{i=j+1}^k (A_{ij} - B_{ij})^2} \text{ Eq.2}$$

A and **B** refer to the two correlation matrices being compared, and k is the number of columns or rows in the matrix. For Md , the numerator expresses the sum of the differences (element by element) between the lower triangular part of the two correlation matrices, and the denominator expresses the number of elements in the lower triangular part of the two matrices. The complementary nature of the quadratic (ED) and non-quadratic (Md) indices have been discussed earlier (Boucard, Mons, Micheau, & Nogues, 2009), and a significant difference in either index would be sufficient to illustrate a notable difference in terms of functional connectivity.

Like covariance, Md and ED have no metric. Therefore, statistical tests are needed to interpret them and to draw conclusions about a putative effect of an experimental factor. Given that the distribution of these two parameters is unknown, a bootstrap procedure was used to test for statistical significance (Boucard, et al., 2009; Efron & Tibshirani, 1991) (Horwitz, Grady, Schlageter, Duara, & Rapoport, 1987). This was implemented by a script in Octave 2.9.13 (Eaton, 2002). P-values were determined after 10,000 re-samplings (with replacement) based on the specified samples sizes of the two groups under comparison.

This method allowed a global comparison of the two corresponding correlation matrices. Only when this yielded a significant difference would we perform pair-wise comparisons between individual elements of the two matrices using the standard procedure described previously (Zar, 1999). This approach thus provided sufficient guard against Type I errors and avoided the excessive compromise in statistical power due to correction for unplanned multiple explorative comparisons.

Chapter 2: Too much memory is not good for memory: the case of estradiol

Too Much Memory Is Not Good For Memory: the Case of Estradiol

Al Abed S, Sellami A, Brayda-Bruno L, Lamothe V, Nogues X, Bennetau C, Potier M, Marighetto A
Neurocentre Magendie, Pathophysiology of neuronal plasticity, Inserm U862, Université
Bordeaux

Abstract

In the present study, we addressed the issue of the potential consequences of exposure to exogenous estrogens on young adult memory function using a model of E2 exposure through drinking water in male mice. In agreement with our hypothesis, we found that the impact of E2 exposure was not equivalent on different components of memory function. Just as could be expected on the basis of previously described effects of E2 on hippocampal synaptic plasticity, the behavioral profile of present E2-treated mice demonstrates that the treatment favors mnemonic retention over forgetting. Thus, E2 treatment enhanced long-term associative memory assessed in trace fear conditioning. It also prolonged the duration of short-term memory assessed a radial maze task which requires temporary retention and organization/forgetting of varying information. In this “every day-like” learning task, the attenuation of forgetting by E2 was found to paradoxically impair memory by aggravating interference. At the brain level, we analyzed Fos protein expression as an indicator of neuronal activation induced by the radial-maze learning task within critical brain areas for memory, and the functional connectivity based on Fos between-structure correlations. The results showed that the memory impairment was associated with neuro-functional alterations of the DG subfield of the hippocampus. Namely, its basal activity was increased and its functional reactivity to the memory task was altered, especially regarding functional connectivity with the other hippocampal subfields, the prefrontal cortex and lateral amygdala. Altogether present results provide evidence that chronic exposure to E2 is detrimental to young adult cognitive function as too much memory is not good for memory, especially in “every day-like” conditions, when a balance between remembering and forgetting is required to optimize temporary retention of changing information.

Introduction

Populations of Western developed countries are exposed to increasing amounts of exogenous estrogens under the form of chemical compounds (*e.g.* pesticides) or phytoestrogens provided by food (*e.g.* soy). It is therefore an important issue of public health to understand the potential consequences of chronic exposure to estrogens on physiological functions known to be sensitive to estrogens, among which is cognition (Frye et al. 2012).

Indeed, 17 β -estradiol (E2), the most biologically active compound of the estrogen class, can affect cognitive function through the modulation of brain cellular mechanisms of memory. E2 comes from peripheral production by the sexual organ in females but also from local production in the male and female brain (Hojo et al. 2004; Kato et al. 2013). In particular, E2 is present in one critical brain region for long-term memory, the hippocampus (*e.g.*, rev Squire 1992). In this structure, E2 was shown to promote a mechanism of synaptic plasticity believed to sustain long-term retention of information, called “Long-Term Potentiation” (LTP; Foy et al. 1999; Córdoba Montoya & Carrer 1997). LTP is a long lasting enhancement of synaptic efficacy artificially induced by electrical stimulation in hippocampal slices, and supposedly naturally induced by coincident neuronal activities during learning to support long-term associative memory (Bliss & Lomo 1973). Furthermore, E2 would reduce the “opposite” synaptic plasticity mechanism, “Long Term Depression” (LTD) of synaptic efficacy (Vouimba et al. 2000), believed to underlie forgetting (Vouimba et al. 2000; Nicholls et al. 2008).

Based on its effects on hippocampal synaptic plasticity, E2 is thought to favor mnemonic retention over forgetting, hence to enhance long-term memory. This view is supported by several lines of evidence. In particular, several studies in peri/post-menopausal women and in ovariectomized animals have shown that decrease in E2 production coincides with memory decline (Halbreich et al. 1995; Greendale et al. 2010; Fuh et al. 2006). Furthermore, in such conditions of interrupted/diminished sexual estrogen production, E2 supplementation often restores the memory impairment (Korol & Kolo 2002; Li et al. 2004; Luine et al. 1998; Sandstrom & Williams 2004). The literature is far from being homogenous though (Janowsky et al. 2000; Binder

et al. 2001). In the current state of knowledge, what might be the effect of chronic exposure to exogenous estrogens on memory function in normal, young adulthood is unclear.

To address this issue we studied the mnemonic effects of a chronic exposure to E2 through drinking water in young adult mice, at a dose (1 μ M, *i.e.* about 33,3 μ g/kg/day, Figure 1) that can be considered as “moderate” relative to current E2 treatments used in the literature (Barha et al. 2010). We used male mice to avoid potential interference from cyclic variations of peripheral E2 production in females.

Because E2 is expected to enhance long-term mnemonic retention and prevent forgetting, we hypothesized that the E2 treatment may not have the same beneficial impact on all different memory components. Indeed, in every-day life, memory function implies much more than long-term storage of information. In particular, it is also necessary to temporarily remember information, which is varying all the time *e.g.* “where did I park my car this morning?”. This information is relevant until I get my car back, and then it becomes irrelevant and potentially confusing with memories of next placements of my car. Thus, forgetting and organizing information in memory to avoid interference from previous learning also is an important component of memory function, although much less studied than the remembering component, in particular regarding potential sensitivity to E2.

We expected that the E2 treatment would enhance long-term associative memory, which essentially requires retention based on hippocampal “LTP-like” mechanisms, but will not enhance short-term memory of always varying and potentially interfering information. The later form of memory might even be impaired by the E2 treatment as less forgetting may result in memory overload and increased interference from previous information. To test these hypotheses, we studied the behavioral effects of the E2 treatment (i) in trace fear conditioning, which is a well-documented and fast conditioning procedure to assess long-term associative memory; (ii) in a radial-maze task specifically designed as model of “where did I park my car this morning?” to study temporary retention of always varying and interfering information. Finally, (iii) we explored the effects of the E2 treatment on neurofunctional activities within memory systems by

measuring Fos protein expression as an indicator of neuronal activation (Touzani et al. 2003; Mingaud et al. 2008), in different brain areas involved in memory following radial-maze testing.

The present study demonstrates for the first time that chronic exposure to E2 can paradoxically impairs memory by enhancing mnemonic retention: less forgetting aggravates deleterious effects of interference from previous information. This impairment is associated with an altered activity of the hippocampal subfield, dentate gyrus, and disorganization of its functional coordination with other brain structures.

Results

Exposure to E2 enhances long-term associative memory

After 2 weeks of treatment through drinking water, (n=22) placebo- and (n=22) E2-treated mice were submitted to a trace fear conditioning task.

During the acquisition of the conditioning task, 3 deliveries of a neutral stimulus (a tone) were followed by systematic occurrence of an aversive electric foot-shock, with a time interval separating the tone and the shock (the trace) of either 20 or 60 seconds depending on the groups (n=11 by trace interval x treatment condition). There was no effect of the treatment in the acquisition of a conditioned fear response to the tone (Figure 1A). Namely, whichever the tone-shock interval, all groups exhibited increasing fear during tone delivery (% time of freezing) across the 3 tone repetitions (*Repeated measures*: $p < 0.001$ for each group; *repeated measures X Treatment*: ns for each interval condition).

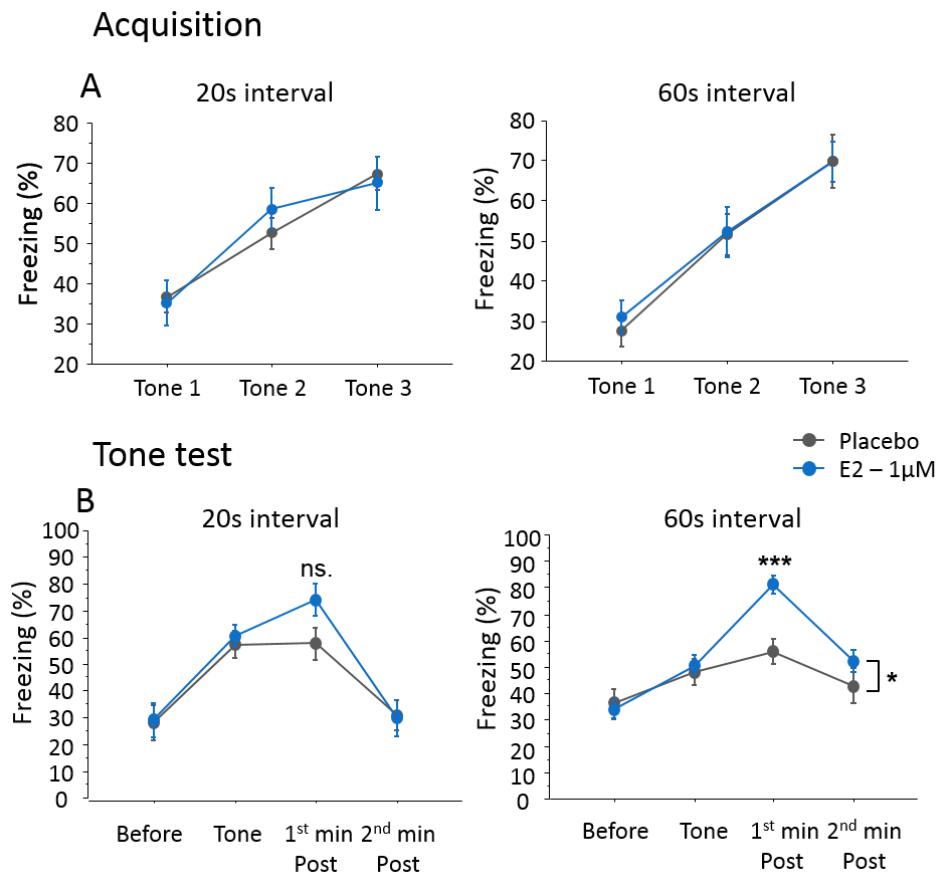


Figure 1: E2 enhanced the 24 hr-retention (but not acquisition) of tone-shock association in a trace fear conditioning. **A:** Evolution of % freezing time during each successive tone deliveries during acquisition of the trace conditioning for groups trained with a 20 sec.- (left) or 60 sec.- (right) interval between the tone and the shock. **B:** Evolution of % freezing time in the tone test 24 hour later, (2 min.) before, (2 min.) during and (1st min., 2nd min.) after the tone delivery for groups trained with a 20 sec.- (left) or 60 sec.- (right) trace interval in acquisition. *: $p < 0.05$ (repeated measure $\times$ treatment); ***: $p < 0.0001$. Data presented as mean $\pm$ SEM.

Twenty four hours later, memory of the tone-shock association was evaluated by measuring the fear response (freezing) elicited by the tone alone (tone test) in a different context. Analyses of freezing evolution (before, during and after the tone, Figure 1B) showed that the amplitude of the fear response to the tone (*i.e.* during tone + 1st min. post tone) varied as a function of the trace interval condition during acquisition (*i.e.* the longer was the trace, the smaller was the amplitude) and as a function of the treatment condition. Namely, the E2 treatment enhanced the response to the tone only under the 60 sec.-interval condition (for 60 sec.-: *Repeated measures*

X Treatment: $F_{3,60}=4.005$; $p<0.0115$; 1st min. post-tone: *Treatment* effect: $p=0.0003$. For 20 sec.-: 1st min. post-tone: *Treatment* effect: $p=0.067$ ns).

In contrast, when animals were re-exposed to the conditioning context (alone), the fear response was similar between treatment groups (all *Treatment* effects: $p>0.2$ ns; supplementary Figure S2, context test).

Thus, E2 treatment enhanced the 24 hr-retention of the association established between (60 sec.-) temporally distant events (the tone and the shock), but it affected neither the acquisition of this association nor the retention of tone association with surrounding contextual cues. These findings demonstrated that the treatment had a beneficial effect on long-term associative memory that seemed to specifically concern the storage of associations across time.

Exposure to E2 “paradoxically” impairs memory of varying information under “every-day like” learning conditions: prolonged retention and more interference

After 2 weeks of treatment, (n=13) placebo- and (n=12) E2-treated mice were trained during 18 days in a radial-maze task to assess short-term (from seconds to minutes) retention of constantly varying information and organization of this information to avoid interference (Marighetto et al. 2011).

In this task, the mouse is submitted to repeated presentations of the same 3 pairs of adjacent arms, and the food-containing arm in each pair is constantly changing according to an alternation rule. Mimicking the “where did I park my car this morning?” situation, the mouse is required to remember “which arm did I visit last time I faced this pair?” in order to correctly alternate its choices between successive trials (for detailed protocol, see material and methods Figure 5). Global performance is evaluated by the percentage of correct choices among (20) successive trials of each training session. We evaluate also each of the two components required by the task, *i.e.* mnemonic retention and organization of successive trials memory. Thus, performance is also

measured respectively, as a function of “retention interval” and of “interference level”, which both vary across successive trials.

The percentages of correct responses by 3-day blocks (Figure 2A) demonstrated that global performance similarly increased with training until reaching a plateau in each group. The E2-treated group tended to remain at lower performance level than the controls all over training (between treatment, $p=0.051$).

Strikingly, analyses of final performance (“at plateau”) highlighted opposite effects of the E2 treatment on the capability to maintain varying information in memory, *i.e.* temporary retention, and on the capability to avoid interference from previous trials, *i.e.* organization. Specifically, the E2 treatment prolonged temporary retention of successive arm visits (Figure 2B) and increased deleterious effects of interference (Figure 2C).

Regarding retention (Figure 2B), performance did not diminish similarly between the two groups as retention interval increased. While performance of placebo-treated mice regularly decreased and approached chance level for the longer interval, performance of E2-treated mice did not, and remained clearly above chance (*Retention Interval X Treatment interaction*: $F_{4,100}=3.774$; $p=0.00067$). Thus, the E2 treatment reduced forgetting, making mice capable to remember specific events of the recent past under delay conditions at which control mice had forgotten.

The beneficial effect of E2 on retention of varying information was associated with a negative impact on memory organization of this information: the treatment induced an aggravation of the deleterious effect of interference from previous trials, called *Proactive Interference* (PI, Figure 2C). Namely, while performance of the E2-treated group was at the same (high) level as that of placebo group in trials with low PI, it was clearly below the placebo performance in trials with high PI (*Interference X Treatment interaction*: $F_{1,25}=7.609$; $p=0.0107$). Such aggravation of interference resulted in overall impairing effect of the E2 treatment (*Treatment effect*: $F_{1,25}=7.945$; $p=0.0093$).

In conclusion, under “every day-like” learning conditions, E2 has the capability to prolong mnemonic retention, and such attenuation of forgetting can have negative impact on the organization component of memory function. Thus, chronic exposure to E2 can paradoxically impairs memory by enhancing mnemonic retention.

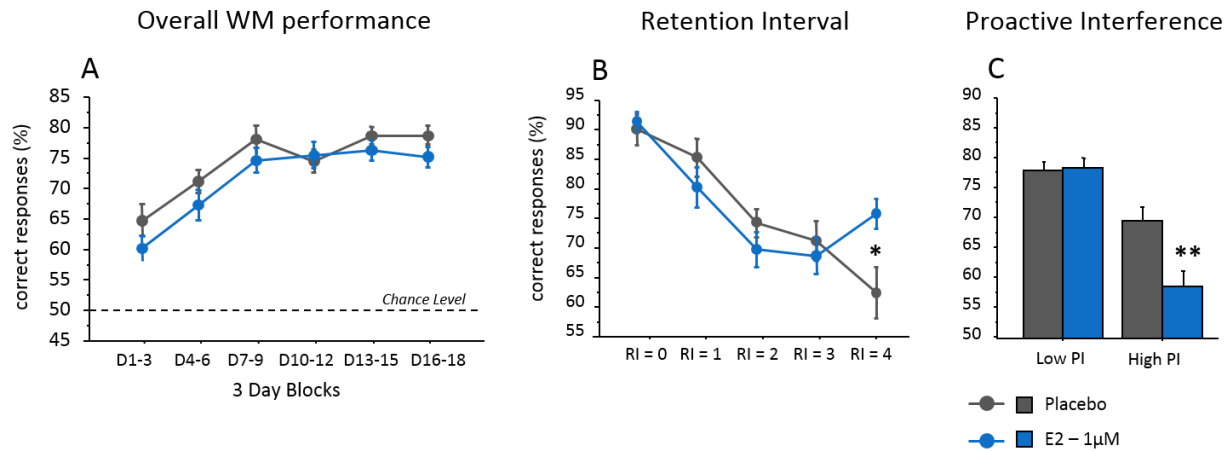


Figure 2: Performance of placebo- and estradiol-treated mice in the radial-maze task of varying short-term memory. **A.** Overall performance of each treatment group augmented similarly across 3 day-blocks of training. E2-treated (blue lines) mice exhibited performance non-significantly below that of placebo mice (grey lines) during all training ($p=0.051$). **B.** Final performance (Days 10-18) diminished progressively as retention interval (RI) increased in Placebo-treated mice but not in E2-treated mice for the longest RI (RI=4; $p=0.019$). Thus E2 prolonged mnemonic retention **C.** Final performance decreased more as proactive interference (PI) increased in E2-treated mice than in placebo-treated ones ($p=0.0028$ for high PI). E2 aggravated deleterious effect of interference. **: $p<0.001$. Data presented as mean $\pm$ SEM.

The paradoxical memory impairment by E2 exposure is associated with neurofunctional alterations of the dentate gyrus (DG) of the hippocampus

To identify potential alterations due to the E2 treatment in functional activity of brain structures known to be involved in memory, we measured neuronal activation induced by the radial-maze task. For this purpose post-testing levels of Fos protein were measured in the different subfields (CA1, CA3, DG) of the hippocampus, which besides its well-known role in long-term memory formation, is also needed to perform the radial-maze task of short-term varying memory (Marighetto et al. 2011), and in different parts of the prefrontal cortex, dorsal striatum and amygdala. Fos levels measured in radial-maze trained placebo- and E2-treated groups were

compared to a resting condition (naive placebo- and E2-treated mice) measuring basal (pre-training) level of activity.

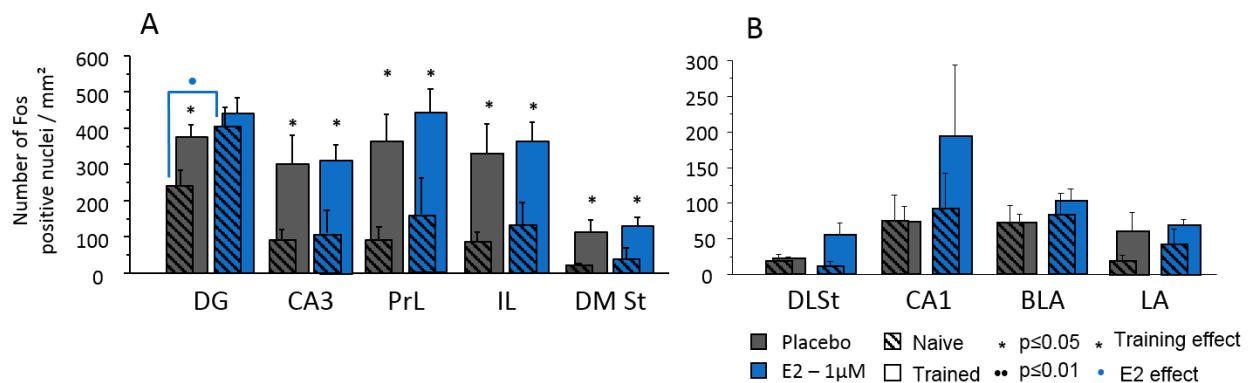


Figure 3: Fos imaging of neuronal activity levels in brain structures involved in memory in placebo- (grey) and E2- (blue) treated mice. A. Brain structures recruited by the memory task: Fos levels were significantly higher in trained mice (radial maze, plain bar plots) than in naive mice (home cage, striped bar plots) except in DG which was the sole structure affected by E2: its activity was higher in basal (naïve) condition ($p=0.046$), and was not increased by memory testing. **B.** Brain structures in which Fos levels were not different between naive and trained groups. * ($p<0.05$) represents significant difference within a structure between naive and trained mice; • represents significant difference between placebo and E2-treated mice.. Abbreviation: DG: Dentate Gyrus, PrL: Prelimbic cortex, IL: Infralimbic cortex, DMst: Dorsomedial Striatum, DLSt: Dosolateral Striatum, BLA: Basolateral amygdala, LA: Lateral amygdala. Data presented as mean $\pm$ SEM.

Numerous studied structures were recruited by the memory task, as attested by significant increases in Fos levels relative to the naive condition, and the sole area affected by the treatment, the DG subfield of the hippocampus was part of this activated network (Figure 3). Specifically, in the DG, basal activity was increased by the E2 treatment and Fos activation induced by memory testing disappeared.

To better evaluate alteration induced by E2 treatment on functional networks, additional analyses of between-structure correlations were performed to potentially unveil between-group differences in functional coordination among brain structures (see methods on functional connectivity analyses). Comparison of between-structure correlation matrices indicated that functional alteration induced by the E2 treatment was in fact not restricted to the DG. Indeed, the functional connectivity triggered by memory testing in placebo-treated mice, was not seen in

E2-treated mice (Figure 4; correlation matrices are significantly different: $p < 0.045$ between trained placebo and trained E2 according to the 2 statistical indicators used, see methods). Thus, significant changes induced by E2 (Figure 4, black dashed lines: correlations significantly different between from trained placebo) also concerned several structures which were functionally connected with the DG and CA3 during memory testing in placebo conditions, *i.e.* the prefrontal cortex and CA1, as well as a structure which was not functionally connected to the DG, the lateral amygdala. Thus, the E2 treatment altered the functional coordination of a neural network extending from DG to other hippocampal fields, prefrontal cortex and lateral amygdala.

In conclusion, the paradoxical impairment of varying memory induced by E2 chronic exposure was associated with an alteration in the task-reactivity of the DG: both its activation and its functional coordination with an extended network of structures were modified.

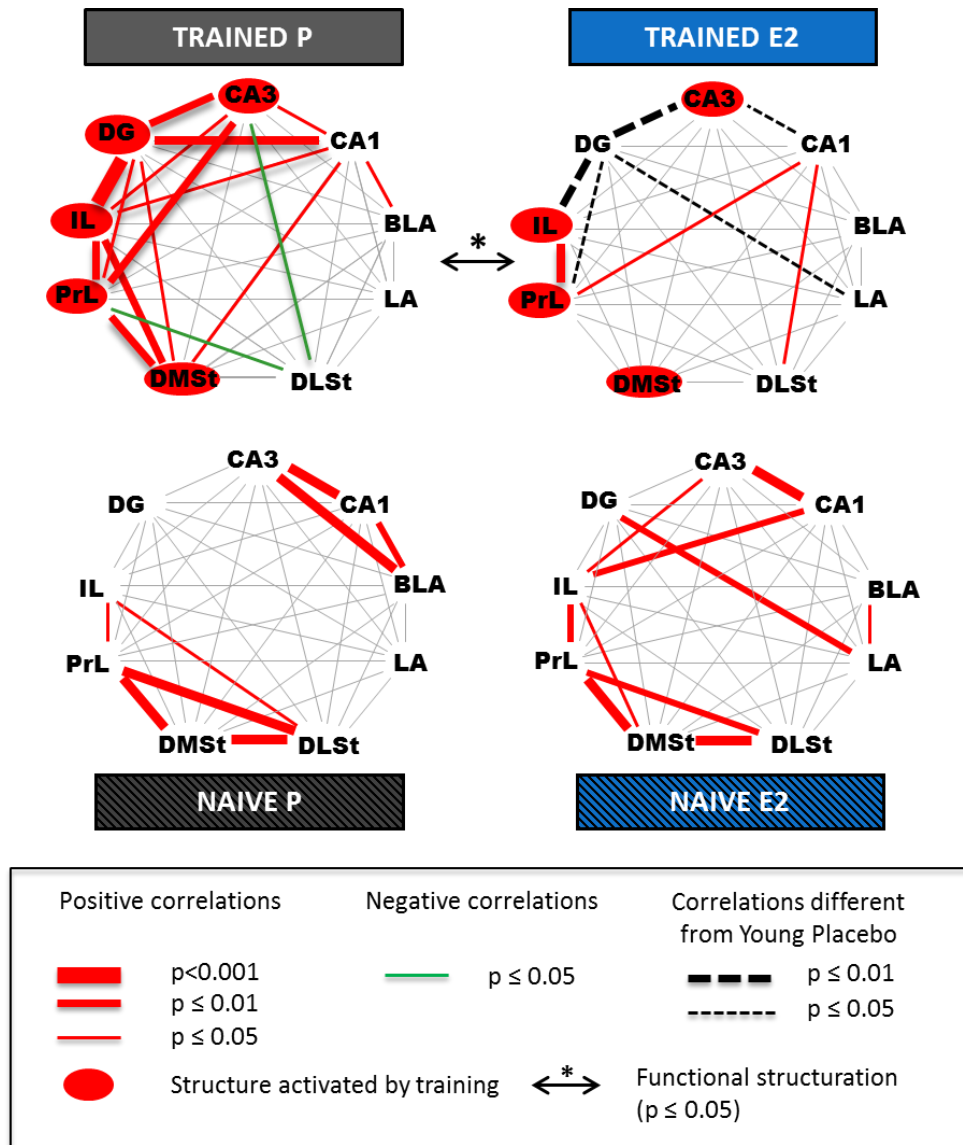


Figure 4: E2 altered functional connectivity among brain structures triggered by memory testing. Schematic representation of the correlation matrix of each group of mice: Placebo Trained, Placebo Naive, E2 Trained, E2 Naive. The Figure recapitulates statistically significant inter-structure correlations within the matrix of each group: positive correlations in red, negatives in green. The statistical significance of each correlation is represented by its line width: thin when $p < 0.05$, medium when $p < 0.01$ and thick when $p \geq 0.001$. The statistical comparison of correlation matrices by the method developed by Boucard et al. (bootstrap test, cf Methods and materials) confirmed the visual impression that the correlation matrix of the E2 trained group was statistically different from the one in the placebo trained group (*: $p < 0.05$). Because the 2 matrices were different, each correlation significantly different from placebo is indicated in the E2 Trained matrix (black dashed lines). The grey lines illustrate every possible correlation. Abbreviations. CA1, CA3, DG: subfields of dorsal hippocampus; LA: lateral amygdala; BLA: basolateral amygdala; DLSt: dorsolateral striatum; DMSt: dorsomedial striatum.

Discussion

In the present study, we addressed the issue of the potential consequences of exposure to exogenous estrogens on young adult memory function using a model of E2 exposure through drinking water in mice. In agreement with our hypothesis, we found that the impact of E2 exposure was not equivalent on different components of memory function. Just as could be expected on the basis of previously described effects of E2 on hippocampal synaptic plasticity, the behavioral profile of present E2-treated mice demonstrates that the treatment favors mnemonic retention over forgetting. Thus, it enhanced long-term memory and also prolonged the duration of short-term memory, but this attenuation of forgetting was found to paradoxically impair memory by aggravating interference in “every day-like” learning conditions. At the brain level, this memory impairment was essentially associated with neuro-functional alterations of the DG subfield of the hippocampus. As discussed below, these findings demonstrate that the memory enhancing properties of E2 are not obligatory good for memory function in young adulthood

Because E2 affects hippocampal synaptic plasticity in favor of LTP (Córdoba Montoya & Carrer 1997; Foy et al. 1999), the present treatment was expected to have beneficial impact on long-term associative memory assessed by the trace fear conditioning task. Indeed, this associative memory is known to depend on hippocampal NMDA glutamatergic receptors (Huerta et al. 2000; Misane et al. 2005; Brigman et al. 2010) which also sustain E2-sensitive LTP (Smith et al. 2009). In line with our expectations, the E2 treatment enhanced the 24 hour-retention of the tone-shock association under long trace interval, i.e. under trace interval for which control mice exhibited very low memory retention. This finding is in line with previous studies showing that trace fear memory (Leuner et al. 2003; Dalla et al. 2009; Hodes & Shors 2005) and more globally hippocampus dependent long-term memory (for review see Frick 2009) can be modulated by E2 circulating levels. Furthermore, the present beneficial effect on associative memory appeared to specifically concern storage of associations across time, a process which is fundamental in formation of the most important form of hippocampus-dependent long-term memory, episodic

memory, our conscious remembering of everyday life events (“What happened where and when”, Eichenbaum 2004). Given that episodic memory is impaired in various neuropsychiatric disorders and aging, the present finding further demonstrates potential relevance of estrogens as therapeutic targets (for review see Frick 2012).

E2 capability to enhance mnemonic retention was further demonstrated in the radial maze task of short-term memory, which also requires functional integrity of the hippocampus and declines in aging (Marighetto et al. 2011). The treatment was found to prolong memory of successive arm-visits over long retention intervals for which control mice displayed almost no memory, an effect opposite to the tremendous acceleration of forgetting produced by hippocampal lesion in the same task. Such attenuation of short-term memory forgetting may be related to E2 capability to attenuate LTD, as demonstrated in hippocampal slices from young-stressed and old rats (M. R. Foy et al. 2008), and it can be taken as further evidence for the potential interest of estrogens against aging-related memory decline (Frick 2012). However, even if the retention enhancing property of E2 might be beneficial to deficient memory function, our study clearly shows that this property turned out to be detrimental in normal young adult conditions.

Indeed, the attenuation of forgetting observed in the radial-maze task was found to paradoxically impair memory by aggravating interference between successive arm-visits. This deleterious effect of E2 was discovered because the radial maze task taxes concomitantly temporary retention *and* organization/forgetting of varying information. The fact that retention and organization are rarely investigated together in current studies may partly explain heterogeneity of results among studies relative to E2 modulation of short-term memory (e.g. (Hampson & Morley 2013; Grigorova & Sherwin 2006). By mimicking “every day-like” learning conditions, the radial-maze task enabled us to capture important organizational component of memory function, such as remembering “where I parked my car *this* morning” and not “where I parked it the days before”. Hence the task enabled us to show that chronic exposure to E2 has negative impact on memory organization/forgetting in young adulthood.

At the brain level, the memory impairment was associated with neuro-functional alterations within memory systems. Namely, basal activity of hippocampal DG was increased and its functional reactivity to the memory task was altered, especially regarding functional coordination with other hippocampal subfields, the prefrontal cortex and lateral amygdala. As first Fos imaging experiment done in young males, present study shows that E2 can alter neurofunctional activities underlying memory function in young adult males as previously shown principally in post-menopausal women (Maki & Resnick 2001; Blanc et al. 2010) and in aged/ovariectomized female rodents (Fonseca et al. 2013; Pleil et al. 2011; Zeidan et al. 2011).

It can be mentioned that functional alterations induced by the treatment were principally evidenced by the analysis of functional connectivity, rarely performed so far in neuroimaging studies done in animals (Boucard et al. 2007). Functional connectivity therefore appears as useful complementary tool of classical Fos imaging approach to study the impact of any experimental manipulation on brain function (Boucard et al. 2009; Brayda-Bruno et al. 2013), and to bridge the gap between studies in animals and in humans, i.e. between molecular/cellular and structure/system levels of analysis.

DG appeared as a central structure of the functional neuronal network affected by chronic exposure to E2. Although we can only speculate about which specific processes might be involved, the central role of DG in the present effects is in full agreement with the two main functions attributed to this hippocampal subfield, i.e. a computational function called *pattern separation*, and adult neurogenesis. Thus, DG is known for sustaining pattern separation, the process of transforming similar representations or memories into highly dissimilar, non-overlapping representations or memories (Rolls 2013). This function is crucial to perform the radial maze task that we used. Namely, repeated using of the same 3 pairs of spatially adjacent arms across successive trials puts high demand on spatial and temporal pattern separation in order to discriminate between the two arms and successive trials relative to each pair. The finding that E2 treatment aggravated proactive interference due to small temporal separation between two successive trials supports the conclusion that temporal pattern separation function of DG was altered. Interestingly, DG (Fos) over-activation was previously found in aged mice trained under

increased demand on temporal pattern separation in the same radial maze task (Marighetto et al. 2011). As previously suggested for aging (Gallagher et al. 2010), the memory impairment induced by E2 may result from altered balance between pattern separation and pattern completion processes, due to functional alteration of hippocampal DG-CA3 circuits (Stark et al. 2010). Pattern completion, the process by which an incomplete pattern triggers representation of complete pattern, is an essential function for memory retrieval. E2 treatment may have altered pattern separation/pattern completion balance in favor of pattern completion, hence enhancing retention but impairing organization.

DG is also known for being one of the two brain structures in which neurogenesis was found to continue in adulthood. DG neurogenesis is necessary for long-term memory formation and retrieval (Dupret et al. 2008). Strikingly, while ablating neurogenesis has been repeatedly shown to impair hippocampus-dependent long-term memory, it was shown to induce paradoxical memory facilitation in a radial-maze task similar to ours, taxing short-term memory of repetitive information with high interference level (Saxe et al. 2007). Thus, ablating neurogenesis produces a pattern of mnemonic alterations strictly opposite to the one induced by E2 treatment. This observation, taken with the fact that DG neurogenesis has been shown to be positively modulated by E2 (Galea 2008; Dalla et al. 2009), suggests that the present mnemonic effects of E2 may be due to an increase of DG neurogenesis.

Here we show that too much memory is not good for memory. Even though E2 has the capability to prolong mnemonic retention, it has negative impact on memory function in “daily life-like” conditions, when a balance between remembering and forgetting is required to optimize temporary retention of numerous constantly changing information over variable intervals. In conclusion, we provide the first demonstration that chronic exposure to external estrogens may be detrimental to young adult cognitive function.

METHODS AND MATERIALS

Animals

Studies were conducted using young adult male C57/BL6 mice (12 weeks, Charles River, L'Arbresle, France). From their arrival, mice were collectively caged in animal standardized room conditions under a 12:12 light:dark cycle, and *ad libitum* food and water. For the trace fear conditioning experiment, mice were separated in 4 mouse groups the day before the experiment. For the radial maze, mice were caged individually one week before behavioral training and they were submitted to a partial food deprivation (85-90% of their free feeding weight) throughout the duration of training.

Treatments

Mice were divided in two treatment groups: Placebo (2% Propanediol-1,2 (Prolabo, PG); n=35) and 17 β -Estradiol (E2; Sigma E8875) 1 μ M (33 μ g/kg/day) in 2% PG (n=34) and were supplemented in drinking water for 2 weeks prior to behavioral experiment. The dose of E2 was determined on the basis of two preliminary experiments: dose effect of E2 short-term memory testing in the radial maze task (Supp. Figure S1A) and study of the dose effect of E2 on nycthemeral rhythms over 48h (Supp. Figure S1B-C). During the experiment the mice were fed with soybean-less food (Harlan Teklad Global Diet; Harlan Laboratories Inc, Indianapolis, Indiana, USA, for the preliminary experiments and LASQCdiet®, Rod18, Rad, LASvendi, Pagenstr, Germany for the rest of the experiments). Treatments lasted until sacrifice.

Trace fear conditioning task

Apparatus

Fear conditioning behavior was performed in a Plexiglas conditioning chamber (30 x 24 x 22 cm), in a brightness of 100 lux, given access to the different visual-spatial cues in the experimental room. The floor of the chamber consisted of stainless-steel rods connected to a shock generator (Imetronic, Pessac, France).

Trace fear conditioning procedure

The box was cleaned with 70% ethanol before each trial. During acquisition of conditioning, each animal was placed in a conditioning chamber and received 3 pairings of a tone (85 dB, 1 kHz, 30 s) and a footshock (0.3 mA, 50 Hz, 1 s). The two stimuli were separated by a trace interval, varying from 0 to 60 sec., depending of the group.

All mice were submitted to a 24h- retention test of tone-shock association memory. Mice were re-exposed to the tone alone in a dark and modified chamber [2min pre-tone, 2min tone and 2min post-tone]. Animals were continuously recorded on videotape for off-line scoring of freezing by an observer blind of experimental groups. Freezing is defined as a lack of all movement except for respiratory-related movements (Fanselow 1980). Conditioned fear response to the tone during the tone test was evaluated by the evolution of the freezing during and just after the tone compared to the no-tone periods (*i.e.* the 2 minutes before the tone and the last minute of the tone test).

Two hours later, all animals were submitted to the context test: they were placed in the same conditioning chamber as for acquisition of conditioning for 2x2 minutes. During the first 2 min, the grid was removed; during the second 2 min the grid was in its place. The evolution of freezing during this test was compared to the level of freezing measured before the tone in the tone test, to evaluate freezing to the conditioning context relative to a neutral context.

Radial maze task of short-term memory

Apparatus

An 8-arm radial maze automatized by IMETRONIC (Pessac- France) and described in (Mingaud, et al., 2007; Mingaud, et al., 2008) was used for the learning condition.

Short-Term Memory Test Design

E2-treated mice and their controls were submitted to the radial arm-maze memory testing for 18 consecutive days. In this task, food pellets are available at the end of certain arms but the

location of food varies according to an alternation rule across successive trials within a day. At the beginning of each daily testing session, the mouse is placed at the center of the maze with no access to the arms, which are all closed and all containing a food pellet. During the 23 successive trials of the testing session, the mouse is given access successively to 3 pairs of adjacent arms. In other words, in each trial, two doors are opened simultaneously and the mouse is required to visit one of the two arms: the door of the non-chosen arm is closed as soon as the mouse reaches the end of the chosen arm. As the mouse comes back in the center, the door of the chosen arm is closed. Then another trial with two arms (same pair, or any of the two other pairs) can begin, and so on. In the first trial with any pair, both arms contain a food pellet; but from then, only one of the two arms will contain the food: the one which was not visited on the preceding trial with the same pair. Therefore, to collect the food pellet on anyone trial, the mouse must remember which arm was visited in the preceding trial, and alternate its choices between the two arms. Thus, “which arm was visited in one particular trial” must be kept in memory until next trial with the same pair. Then, this specific information becomes irrelevant and potentially confusing for the following trial. In other words, each new arm-visit must be maintained in memory for a certain interval, called retention interval and then it should be forgotten to avoid between-trial

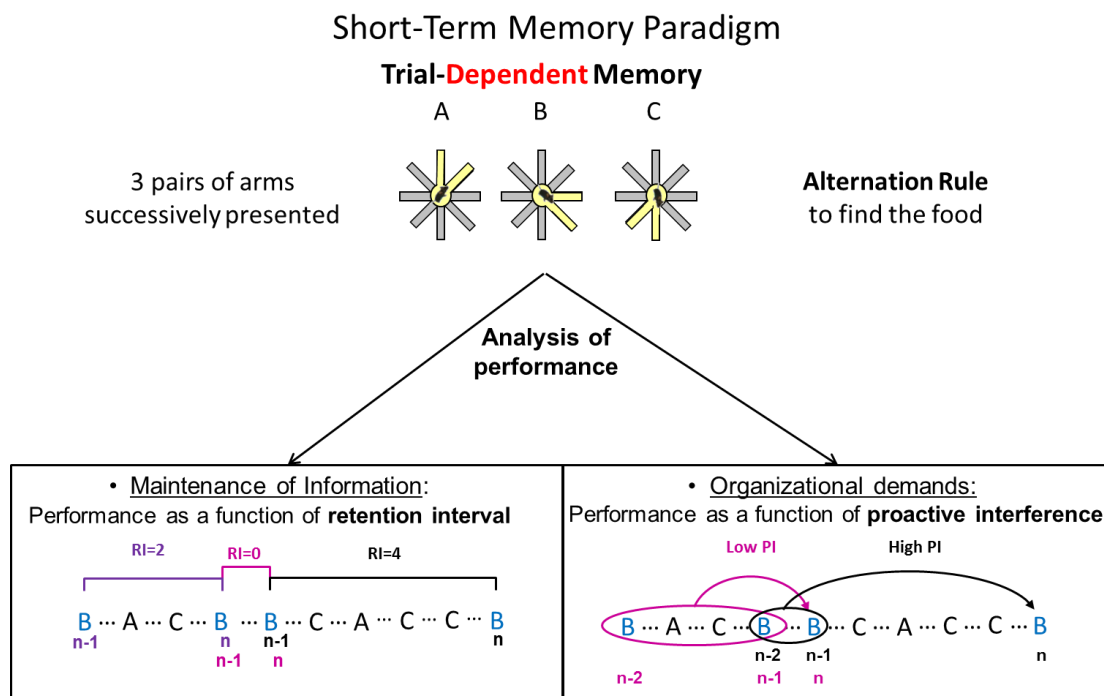


Figure 5: Short-Term Memory paradigm. For details, see text

interference. Therefore the task requires both mnemonic retention and forgetting/organization of successive trials.

These two components are evaluated respectively by measuring performance as a function of “retention interval” and of “interference level” (see Figure 5).

Fos Immunohistochemistry

Trained mice were submitted to behavioral training in radial maze memory task and naïve mice were kept in their home cage. Behaviorally trained and naive mice were sacrificed and perfused 90 min after the beginning of the last session of training and the brains were prepared for immunohistochemistry as detailed previously (Mingaud, et al., 2008).

The antibodies used were: anti-c-Fos rabbit polyclonal antibody (1:5000; Santa Cruz Biotechnology) and biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:2000; Jackson ImmunoResearch). Counts of Fos immunohistochemistry were made as described above in the following structures: CA1, CA3, dentate gyrus (DG) of the dorsal hippocampus, medial and lateral parts of dorsal striatum (DMSt, DLSt); lateral and baso-lateral nucleus of the amygdala (LA, BLA). The experimenter was blind to the experimental condition. Results were expressed as the number of positive cells per mm².

Statistical analyses

Analyses of variance

Behavioural and immunohistochemical data were submitted to one-way analysis of variance (ANOVA) with either the between-subject factor Treatment, or two-way ANOVA with the factors: *Treatment* and *Learning* (Naive, Trained). Post-hoc comparisons were performed using PLSD test.

Functional connectivity

Fos data were submitted to numerical analyses designed to quantify the pattern of inter-regional functional connectivity, which then allowed us to examine if this might significantly differ between experimental groups. Namely, the pattern of a given group was represented as a whole by the correlative matrix comprising all possible pairwise correlations between any two structures. In order to compare correlation matrices between groups, we computed two indices:

(i) the mean of the absolute value of the difference between the lower triangular parts of the two matrices (Md , see Eq. 1) and (ii) the Euclidean distance between the lower triangular parts of the two matrices (ED , see Eq. 2). They were computed as follows:

$$Md = \frac{2 \sum_{j=1}^k \sum_{i=j+1}^k (A_{ij} - B_{ij})}{k(k-1)} \quad \text{Eq.1}$$

$$ED = \sqrt{\sum_{j=1}^k \sum_{i=j+1}^k (A_{ij} - B_{ij})^2} \quad \text{Eq.2}$$

A and **B** refer to the two correlation matrices being compared, and k is the number of columns or rows in the matrix. For Md , the numerator expresses the sum of the differences (element by element) between the lower triangular part of the two correlation matrices, and the denominator expresses the number of elements in the lower triangular part of the two matrices. The complementary nature of the quadratic (ED) and non-quadratic (Md) indices have been discussed earlier (Boucard et al. 2009), and a significant difference in either index would be sufficient to illustrate a notable difference in terms of functional connectivity.

Like covariance, Md and ED have no metric. Therefore, statistical tests are needed to interpret them and to draw conclusions about a putative effect of an experimental factor. Given that the distribution of these two parameters is unknown, a bootstrap procedure was used to test for statistical significance (Boucard et al. 2009; Efron & Tibshirani 1991; Horwitz et al. 1987). This was implemented by a script in Octave 2.9.13 (Eaton 2002). P-values were determined after 10,000 re-samplings (with replacement) based on the specified samples sizes of the two groups under comparison.

This method allowed a global comparison of the two corresponding correlation matrices. Only when this yielded a significant difference would we perform pair-wise comparisons between individual elements of the two matrices using the standard procedure described previously (Zar 1999). This approach thus provided sufficient guard against Type I errors and avoided the

excessive compromise in statistical power due to correction for unplanned multiple explorative comparisons.

Bibliography

- Barha, C.K., Dalton, G.L., Galea, L.A., 2010. Low doses of 17alpha-estradiol and 17beta-estradiol facilitate, whereas higher doses of estrone and 17alpha- and 17beta-estradiol impair, contextual fear conditioning in adult female rats. *Neuropsychopharmacology* 35, 547–59. doi:10.1038/npp.2009.161
- Binder, E.F., Schechtman, K.B., Birge, S.J., Williams, D.B., Kohrt, W.M., 2001. Effects of hormone replacement therapy on cognitive performance in elderly women. *Maturitas* 38, 137–46.
- Blanc, F., Poisbeau, P., Sellal, F., Tranchant, C., de Seze, J., André, G., 2010. [Alzheimer disease, memory and estrogen]. *Rev. Neurol. (Paris)*. 166, 377–88. doi:10.1016/j.neurol.2009.07.010
- Bliss, T. V, 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, 331–56.
- Boucard, A., Marchand, A., Noguès, X., 2007. Reliability and validity of structural equation modeling applied to neuroimaging data: a simulation study. *J. Neurosci. Methods* 166, 278–92. doi:10.1016/j.jneumeth.2007.07.011
- Boucard, A., Mons, N., Micheau, J., Noguès, X., 2009. Activating a memory system focuses connectivity toward its central structure. *Behav. Brain Res.* 204, 226–34. doi:10.1016/j.bbr.2009.06.016
- Brayda-Bruno, L., Mons, N., Yee, B.K., Micheau, J., Abrous, D.N., Nogues, X., Marighetto, A., 2013. Partial loss in septo-hippocampal cholinergic neurons alters memory-dependent measures of brain connectivity without overt memory deficits. *Neurobiol. Dis.* 54, 372–81. doi:10.1016/j.nbd.2013.01.010
- Brigman, J.L., Wright, T., Talani, G., Prasad-Mulcare, S., Jinde, S., Seabold, G.K., Mathur, P., Davis, M.I., Bock, R., Gustin, R.M., Colbran, R.J., Alvarez, V. a, Nakazawa, K., Delpire, E., Lovinger, D.M., Holmes, A., 2010. Loss of GluN2B-containing NMDA receptors in CA1 hippocampus and cortex impairs long-term depression, reduces dendritic spine density, and disrupts learning. *J. Neurosci.* 30, 4590–600. doi:10.1523/JNEUROSCI.0640-10.2010
- Córdoba Montoya, D. a, Carrer, H.F., 1997. Estrogen facilitates induction of long term potentiation in the hippocampus of awake rats. *Brain Res.* 778, 430–8.
- Dalla, C., Papachristos, E.B., Whetstone, A.S., Shors, T.J., 2009. Female rats learn trace memories

- better than male rats and consequently retain a greater proportion of new neurons in their hippocampi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 2927–32. doi:10.1073/pnas.0809650106
- Dupret, D., Revest, J.-M., Koehl, M., Ichas, F., De Giorgi, F., Costet, P., Abrous, D.N., Piazza, P.V., 2008. Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS One* 3, e1959. doi:10.1371/journal.pone.0001959
- Eaton, J., 2002. *Manual Network Theory: GNU Octave*.
- Efron, B., Tibshirani, R., 1991. Statistical data analysis in the computer age. *Science* 253, 390–5. doi:10.1126/science.253.5018.390
- Eichenbaum, H., 2004. Hippocampus : Cognitive Processes and Neural Representations that Underlie Declarative Memory The hippocampus serves a critical role in declarative. *Neuron* 44, 109–120.
- Fanselow, M.S., 1980. Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlov. J. Biol. Sci.* 15, 177–82.
- Fonseca, C.S., Gusmão, I.D., Raslan, A.C.S., Monteiro, B.M.M., Massensini, A.R., Moraes, M.F.D., Pereira, G.S., 2013. Object recognition memory and temporal lobe activation after delayed estrogen replacement therapy. *Neurobiol. Learn. Mem.* 101, 19–25. doi:10.1016/j.nlm.2012.12.016
- Foy, M.R., Baudry, M., Foy, J.G., Thompson, R.F., 2008. 17 β -estradiol modifies stress-induced and age-related changes in hippocampal synaptic plasticity. *Behav. Neurosci.* 122, 301–9. doi:10.1037/0735-7044.122.2.301
- Foy, Xu, J., Xie, X., Brinton, R.D., Thompson, R.F., Berger, T.W., 1999. 17 β -Estradiol Enhances NMDA Receptor-Mediated EPSPs and Long-Term Potentiation. *J. Neurophysiol.* 81, 925–929.
- Frick, K.M., 2012. Building a better hormone therapy? How understanding the rapid effects of sex steroid hormones could lead to new therapeutics for age-related memory decline. *Behav. Neurosci.* 126, 29–53. doi:10.1037/a0026660
- Frick, K.M., 2008. Estrogens and age-related memory decline in rodents: what have we learned and where do we go from here? *Horm. Behav.* 55, 2–23. doi:10.1016/j.yhbeh.2008.08.015
- Frye, C.A., Bo, E., Calamandrei, G., Calzà, L., Dessì-Fulgheri, F., Fernández, M., Fusani, L., Kah, O., Kajta, M., Le Page, Y., Patisaul, H.B., Venerosi, A., Wojtowicz, A.K., Panzica, G.C., 2012.

- Endocrine disruptors: a review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems. *J. Neuroendocrinol.* 24, 144–59. doi:10.1111/j.1365-2826.2011.02229.x
- Fuh, J.-L., Wang, S.-J., Lee, S.-J., Lu, S.-R., Juang, K.-D., 2006. A longitudinal study of cognition change during early menopausal transition in a rural community. *Maturitas* 53, 447–53. doi:10.1016/j.maturitas.2005.07.009
- Galea, L.A.M., 2008. Gonadal hormone modulation of neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rodents. *Brain Res. Rev.* 57, 332–41. doi:10.1016/j.brainresrev.2007.05.008
- Gallagher, M., Bakker, A., Yassa, M.A., Stark, C.E.L., 2010. Bridging neurocognitive aging and disease modification: targeting functional mechanisms of memory impairment. *Curr. Alzheimer Res.* 7, 197–9.
- Greendale, G.A., Wight, R.G., Huang, M.-H., Avis, N., Gold, E.B., Joffe, H., Seeman, T., Vuge, M., Karlamangla, A.S., 2010. Menopause-associated symptoms and cognitive performance: results from the study of women's health across the nation. *Am. J. Epidemiol.* 171, 1214–24. doi:10.1093/aje/kwq067
- Grigорова, M., Sherwin, B.B., 2006. No differences in performance on test of working memory and executive functioning between healthy elderly postmenopausal women using or not using hormone therapy. *Climacteric* 9, 181–94. doi:10.1080/13697130600727107
- Halbreich, U., Lumley, L.A., Palter, S., Manning, C., Gengo, F., Joe, S.H., 1995. Possible acceleration of age effects on cognition following menopause. *J. Psychiatr. Res.* 29, 153–63.
- Hampson, E., Morley, E.E., 2013. Estradiol concentrations and working memory performance in women of reproductive age. *Psychoneuroendocrinology*. doi:10.1016/j.psyneuen.2013.07.020
- Hodes, G.E., Shors, T.J., 2005. Distinctive stress effects on learning during puberty. *Horm. Behav.* 48, 163–71. doi:10.1016/j.yhbeh.2005.02.008
- Hojo, Y., Hattori, T.-A., Enami, T., Furukawa, A., Suzuki, K., Ishii, H.-T., Mukai, H., Morrison, J.H., Janssen, W.G.M., Kominami, S., Harada, N., Kimoto, T., Kawato, S., 2004. Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 865–70.

doi:10.1073/pnas.2630225100

- Horwitz, B., Grady, C.L., Schlageter, N.L., Duara, R., Rapoport, S.I., 1987. Intercorrelations of regional cerebral glucose metabolic rates in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 407, 294–306.
- Huerta, P.T., Sun, L.D., Wilson, M.A., Tonegawa, S., 2000. Formation of temporal memory requires NMDA receptors within CA1 pyramidal neurons. *Neuron* 25, 473–80.
- Janowsky, J.S., Chavez, B., Orwoll, E., 2000. Sex steroids modify working memory. *J. Cogn. Neurosci.* 12, 407–14.
- Kato, A., Hojo, Y., Higo, S., Komatsuzaki, Y., Murakami, G., Yoshino, H., Uebayashi, M., Kawato, S., 2013. Female hippocampal estrogens have a significant correlation with cyclic fluctuation of hippocampal spines. *Front. Neural Circuits* 7, 149. doi:10.3389/fncir.2013.00149
- Korol, D.L., Kolo, L.L., 2002. Estrogen-induced changes in place and response learning in young adult female rats. *Behav. Neurosci.* 116, 411–20.
- Leuner, B., Falduto, J., Shors, T.J., 2003. Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. *J. Neurosci.* 23, 659–65.
- Li, C., Brake, W.G., Romeo, R.D., Dunlop, J.C., Gordon, M., Buzescu, R., Magarinos, A.M., Allen, P.B., Greengard, P., Luine, V., McEwen, B.S., 2004. Estrogen alters hippocampal dendritic spine shape and enhances synaptic protein immunoreactivity and spatial memory in female mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2185–90. doi:10.1073/pnas.0307313101
- Luine, V.N., Richards, S.T., Wu, V.Y., Beck, K.D., 1998. Estradiol Enhances Learning and Memory in a Spatial Memory Task and Effects Levels of Monoaminergic Neurotransmitters. *Horm. Behav.* 34, 149–162. doi:10.1006/hbeh.1998.1473
- Maki, P.M., Resnick, S.M., 2001. Effects of estrogen on patterns of brain activity at rest and during cognitive activity: a review of neuroimaging studies. *Neuroimage* 14, 789–801. doi:10.1006/nimg.2001.0887
- Marighetto, Brayda-bruno, Etchamendy, 2011. Studying the Impact of Aging on Memory Systems : Contribution of Two Behavioral Models in the Mouse. doi:10.1007/7854
- Mingaud, F., Mormede, C., Etchamendy, N., Mons, N., Niedergang, B., Wietrzyk, M., Pallet, V., Jaffard, R., Krezel, W., Higuieret, P., Marighetto, A., 2008. Retinoid hyposignaling contributes to aging-related decline in hippocampal function in short-term/working memory

- organization and long-term declarative memory encoding in mice. *J. Neurosci.* 28, 279–91. doi:10.1523/JNEUROSCI.4065-07.2008
- Misane, I., Tovote, P., Meyer, M., Spiess, J., Ogren, S.O., Stiedl, O., 2005. Time-dependent involvement of the dorsal hippocampus in trace fear conditioning in mice. *Hippocampus* 15, 418–26. doi:10.1002/hipo.20067
- Nicholls, R.E., Alarcon, J.M., Malleret, G., Carroll, R.C., Grody, M., Vronskaya, S., Kandel, E.R., 2008. Transgenic mice lacking NMDAR-dependent LTD exhibit deficits in behavioral flexibility. *Neuron* 58, 104–17. doi:10.1016/j.neuron.2008.01.039
- Pleil, K.E., Glenn, M.J., Williams, C.L., 2011. Estradiol alters Fos-immunoreactivity in the hippocampus and dorsal striatum during place and response learning in middle-aged but not young adult female rats. *Endocrinology* 152, 946–56. doi:10.1210/en.2010-0715
- Rolls, E.T., 2013. The mechanisms for pattern completion and pattern separation in the hippocampus. *Front. Syst. Neurosci.* 7, 74. doi:10.3389/fnsys.2013.00074
- Sandstrom, N.J., Williams, C.L., 2004. Spatial memory retention is enhanced by acute and continuous estradiol replacement. *Horm. Behav.* 45, 128–35. doi:10.1016/j.yhbeh.2003.09.010
- Saxe, M.D., Malleret, G., Vronskaya, S., Mendez, I., Garcia, a D., Sofroniew, M. V, Kandel, E.R., Hen, R., 2007. Paradoxical influence of hippocampal neurogenesis on working memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 4642–6. doi:10.1073/pnas.0611718104
- Smith, C.C., Vedder, L.C., McMahon, L.L., 2009. Estradiol and the relationship between dendritic spines, NR2B containing NMDA receptors, and the magnitude of long-term potentiation at hippocampal CA3-CA1 synapses. *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1, S130–42. doi:10.1016/j.psyneuen.2009.06.003
- Squire, L.R., 1992. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol. Rev.* 99, 195–231.
- Stark, S.M., Yassa, M. a, Stark, C.E.L., 2010. Individual differences in spatial pattern separation performance associated with healthy aging in humans. *Learn. Mem.* 17, 284–8. doi:10.1101/lm.1768110
- Touzani, K., Marighetto, A., Jaffard, R., 2003. Fos imaging reveals ageing-related changes in

- hippocampal response to radial maze discrimination testing in mice. *Eur. J. Neurosci.* 17, 628–640. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02464.x
- Vouimba, R.M., Foy, M.R., Foy, J.G., Thompson, R.F., 2000. 17Beta-Estradiol Suppresses Expression of Long-Term Depression in Aged Rats. *Brain Res. Bull.* 53, 783–7.
- Zar, J., 1999. *Biostatistical Analysis*, Biostatistical Analysis.
- Zeidan, M. a, Igoe, S. a, Linnman, C., Vitalo, A., Levine, J.B., Klibanski, A., Goldstein, J.M., Milad, M.R., 2011. Estradiol modulates medial prefrontal cortex and amygdala activity during fear extinction in women and female rats. *Biol. Psychiatry* 70, 920–7. doi:10.1016/j.biopsych.2011.05.016

Supplementary Figures

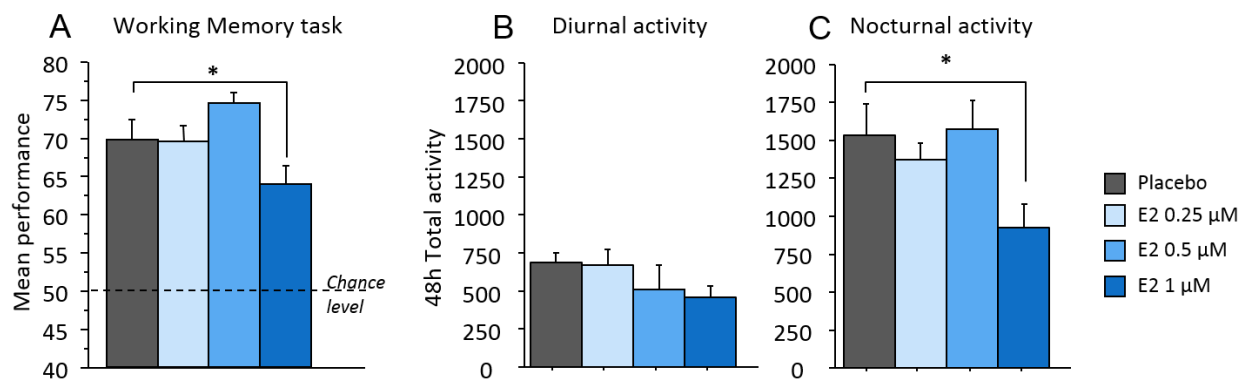


Figure S1: Preliminary experiments: dose effect of E2 on working memory performance and nycthemeral rhythm. **A:** Dose effect of E2 on percentage of correct answers over 9 days of training. Only 1 μ M-treated mice displayed impaired performance ($p < 0.05$). **B:** Dose effect of E2 on diurnal activity over 48h. E2 had no effect whatever the dose. **C:** Dose effect of E2 on nocturnal activity over 48h. 1 μ M treated mice had decreased activity compared to placebo mice ($p < 0.05$). Data are represented as mean $\pm$ SEM. See methods for details.

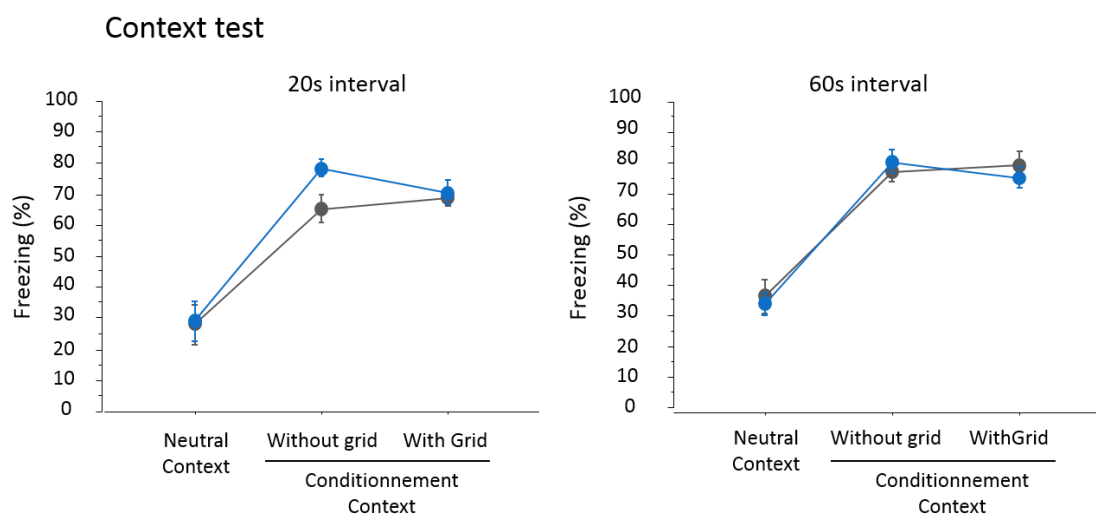


Figure S2: E2 had no effect on the fear response to context. Evolution of % freezing time during exposure to each context for groups trained with a 20 sec.- (left) or 60 sec.- (right) interval during acquisition. Neutral context is the context of the tone test. For the context fear response test, mice were first re-exposed 2min to the conditioning context in which the grid was removed, and then 2min in the conditioning context with the grid. Data are represented as mean $\pm$ SEM.

Discussion Générale

La voie des estrogènes étant une cible thérapeutique potentielle contre le déclin de la mémoire associé au vieillissement, le but de mon travail de thèse était d'améliorer notre compréhension des effets mnésiques d'une supplémentation en E2. Nous avons étudié, chez la souris mâle, jeune et âgée, les effets d'une exposition chronique par l'eau de boisson, sur les formes de mémoire les plus dégradées par le vieillissement. L'approche comportementale a été combinée à des analyses neurobiologiques ciblant d'abord le niveau des systèmes, puis le niveau cellulaire/moléculaire.

Les résultats obtenus valident l'hypothèse générale de départ, selon laquelle l'effet mnésique d'une supplémentation en E2 devrait être doublement dépendant du niveau d'E2 endogène, lui-même lié à l'âge du sujet, et du type de mémoire considéré. Les effets comportementaux observés montrent en effet que si l'E2 prolonge bien la rétention mnésique, comme attendu sur la base de la littérature cet effet « promnésiant » ne se traduit pas nécessairement par une amélioration de la performance.

Dans les pages qui suivent, après avoir récapitulé les effets comportementaux observés sur le modèle âgé et sur le modèle jeune, nous tenterons de montrer en quoi ces effets sont totalement compatibles avec les effets de l'E2 sur les mécanismes de la plasticité synaptique hippocampique décrits dans la littérature. Puis nous récapitulerons les effets neurobiologiques observés sur les modèles jeune et âgé afin d'envisager les mécanismes potentiels de ces effets, qui feront l'objet de nos prochaines études.

I. L'E2 PROLONGE LA RETENTION MNESIQUE CE QUI N'EST PAS TOUJOURS BENEFIQUE A LA MEMOIRE

Les résultats comportementaux montrent que la supplémentation en E2 prolonge la rétention des informations en mémoire, ce qui se traduit principalement par une nette réduction des déficits de mémoire à long-terme « relationnelle » chez les animaux âgés, et par un effet délétère sur la mémoire à court terme des informations variantes chez les animaux jeunes.

Le modèle âgé montre que la supplémentation en E2 réduit les déficits de la mémoire à long-terme dite « déclarative/relationnelle » et « hippocampe-dépendante » (modèle de R/DM en labyrinthe radiaire). Cette amélioration semble s'accompagner d'un basculement de la stratégie préférentielle d'apprentissage vers le système relationnel, et au détriment du système procédural. Elle ne concerne toutefois qu'une majorité d'animaux âgés, faisant ainsi apparaître une sous-population de « non-répondants à l'E2 », qui pourrait modéliser un vieillissement pathologique.

La normalisation de la mémoire relationnelle/déclarative serait due à l'amélioration de la capacité de relier des événements séparés dans le temps (test de conditionnement de trace). En rétablissant une durée « normale » de rétention des informations en mémoire, la supplémentation rétablirait la capacité de lier en mémoire des événements temporellement distants, capacité qui est réduite par le vieillissement. De ce fait, l'E2 rétablirait la formation d'une mémoire à long-terme relationnelle/déclarative « normale ».

En revanche, la supplémentation reste sans effet sur le déficit sévère observé dans une tâche de mémoire à court-terme qui sollicite non seulement la rétention, mais aussi l'organisation des informations en mémoire et l'oubli pour éviter les interférences (mémoire de travail en labyrinthe radiaire). Dans ce cas, en l'absence d'effet bénéfique sur la capacité d'organisation des informations, capacité très affectée par le vieillissement, l'effet « promnésiant » de l'E2 pourrait être masqué : le prolongement de la rétention entraînant davantage d'interférences.

Le modèle jeune montre qu'une exposition chronique à l'E2 peut avoir des effets délétères sur la fonction mnésique normale. En effet, si le prolongement de la rétention mnésique peut avoir des effets bénéfiques sur la mémoire à long-terme, il peut « paradoxalement » s'avérer dommageable sur la mémoire à court-terme/de travail parce qu'il aggrave les effets d'interférence. Précisément, l'E2 augmente la capacité de relier des événements distants, et permet ainsi la formation d'une *mémoire à long-terme relationnelle* pour un éloignement temporel entre événements qui empêche normalement la formation de cette mémoire. Dans la tâche de mémoire à court-terme, l'E2 améliore la performance lorsque la demande en rétention dépasse la capacité normale de rétention. Cependant, en ralentissant l'oubli des informations

successives, il provoque une surcharge mnésique et *in fine* une dégradation de la performance, due aux interférences.

Notre travail confirme donc l'intérêt thérapeutique de l'E2 dans le contexte du vieillissement mnésique et permet d'en préciser les limites. Pour une éventuelle transposition à l'humain, il sera nécessaire de rechercher des modulateurs sélectifs des récepteurs à l'E2 (SERMs) qui reproduisent les effets bénéfiques de l'E2 sur la fonction mnésique mais pas les effets délétères sur la prolifération des cellules cancéreuses mammaires. En montrant l'effet mnésique paradoxal d'une exposition chronique à l'E2 sur le modèle jeune, ce travail invite aussi à considérer davantage les conséquences d'une exposition croissante aux composés œstrogéniques de l'environnement sur la santé publique.

II. EFFETS MNESIQUES ET EFFETS SUR LA PLASTICITE SYNAPTIQUE

Globalement, en augmentant la capacité de former des associations durables entre évènements, l'E2 améliore la mémoire à long-terme relationnelle mais peut accroître les interférences entre informations répétitives et variantes, délétères à la mémoire à court-terme. Ces effets sont totalement en accord avec les effets de l'E2 décrits dans la littérature sur la plasticité synaptique. L'E2 favorise en effet des mécanismes qui sont censés sous-tendre la rétention mnésique (LTP) alors qu'il s'oppose à un mécanisme potentiel de l'oubli (LTD).

Précisément, si l'on suit le modèle « LTP= mémoire », un accroissement de l'efficacité synaptique (LTP-like) serait induite par la coïncidence d'activité au sein des populations neuronales activées par l'apprentissage et c'est cette potentialisation des synapses co-activées qui sous-tendrait la mémoire associative.

Dans les conditions normales, un seuil minimal de « co-activation » des synapses est nécessaire à l'induction d'un phénomène « LTP-like » (par la mise en jeu des récepteurs NMDA). Ainsi, lorsque deux évènements successifs sont suffisamment proches dans le temps, il y aura beaucoup d'activités coïncidentes entre le réseau de neurones codant pour le 1^{er} évènement, et celui qui est activé par le 2nd. De ce fait, de nombreuses synapses seront potentialisées, ce qui

permettra la conservation à long-terme de la mémoire associative de ces deux évènements. Au-delà d'un certain intervalle temporel entre les deux évènements toutefois, les activations coïncidentes diminuent, et trop peu de synapses atteignent le seuil nécessaire au déclenchement d'une LTP-like. Comme montré par le test de conditionnement de trace (dépendant des récepteurs NMDA, tout comme la LTP), au-delà d'un certain intervalle entre le son et choc électrique, la mémoire associative ne peut plus être conservée. Le même phénomène explique que la formation de la mémoire relationnelle/déclarative en labyrinthe radial est également dépendante de l'intervalle temporel entre les événements séparés au stade 1 (et dépendante des récepteurs NMDA de la région CA1). Cette mémoire relationnelle ne peut plus être formée au-delà d'un certain intervalle inter-essais (Brayda-Bruno et al, en préparation).

Il est connu que l'E2 diminue le seuil de déclenchement de la LTP (Kramár et al. 2009). C'est-à-dire que pour un même niveau d'activations coïncidentes, davantage de synapses seront potentialisées et la rétention mnésique sera accrue. Ceci explique que l'E2 permette la formation de la mémoire associative même lorsque l'intervalle temporel entre les deux événements dépasse la capacité associative d'un animal normal.

III. LES EFFETS NEUROBIOLOGIQUES OBSERVÉS DE LA SUPPLÉMENTATION EN E2

Tout d'abord, les effets neurobiologiques au plan des systèmes et structures confirment l'hypothèse générale. L'imagerie Fos montre en effet que les effets de la supplémentation en E2 dépendent de l'âge du sujet, de la tâche considérée et dans une certaine mesure, de la structure cérébrale étudiée. Ainsi, le seul effet de l'E2 observé chez les animaux jeunes est l'augmentation de l'activité basale du DG (animaux naïfs). Au contraire, chez les animaux âgés, les effets d'E2 dépendent de la tâche. E2 réduit l'activité basale de CA1, CA3 et DMS, mais il réduit l'activité associée à l'entraînement dans une tâche locomotrice (tapis roulant), dans toutes les structures étudiées. En revanche, chez les animaux entraînés dans une tâche d'apprentissage, seules les

activités du CA3 en mémoire de travail et du DMS en mémoire relationnelle/déclarative sont réduites.

Ensuite, du point de vue de leur convergence avec les effets comportementaux, les effets neurobiologiques de l'E2 confirment partiellement nos attentes. Les points de convergence concernent :

(i) l'effet délétère de l'E2 sur la mémoire de travail sur le modèle jeune. L'augmentation de l'activité basale du DG perturbe en effet sa réactivité à l'apprentissage, en particulier sa coordination fonctionnelle avec un réseau de structures comprenant les autres champs hippocampiques, les PFC et LA. Ainsi, l'effet ciblé sur le DG a des répercussions sur le fonctionnement de l'ensemble du réseau étudié et peut donc expliquer la perturbation de la mémoire de travail

(ii) l'absence d'effet bénéfique sur le déficit de mémoire de travail sur le modèle âgé. L'E2 ne normalise aucune des altérations fonctionnelles liées au vieillissement, ni au plan des niveaux d'activations induites par la tâche, ni au plan de la connectivité fonctionnelle. En particulier, l'E2 n'a pas d'effet sur le PFC ce qui pourrait expliquer l'absence d'effets bénéfiques sur le déficit de gestion des interférences, compte tenu du rôle attribué à cette région dans la littérature.

(iii) la réduction du déficit de mémoire relationnelle/déclarative sur le modèle âgé. En accord avec notre hypothèse, l'E2 restaure la réactivité (i.e. l'activation Fos par rapport à l'activité basale) de CA1 et CA3 à la tâche comportementale, ce qui est en accord avec le rôle critique de ces régions dans la mémoire relationnelle, et en particulier de CA1 dans la capacité d'associer des événements temporellement séparés. L'E2 rétablit aussi un profil de morphologie des épines plus dynamiques dans le CA1. Nos résultats restent à compléter pour démontrer que les effets morphologiques sont effectivement sélectifs du CA1. Toutefois, les données de la littérature montrent que les effets de l'E2 sur la densité des épines sont exclusifs de CA1 (Gould et al. 1990). Enfin, les résultats moléculaires vont également dans ce sens puisque l'expression d'ER α est modifiée par le vieillissement uniquement dans CA1 et que l'effet bénéfique de l'E2 sur la mémoire relationnelle est précisément reproduit par l'agoniste α (PPT).

Les points de divergence portent sur le fait que l'E2 ne normalise pas chez l'âgé, les niveaux d'activité hippocampiques associés à la tâche de mémoire relationnelle/déclarative, qui demeurent très diminués relativement à ceux mesurés chez les animaux jeunes. Concernant les autres régions cérébrales étudiées, contrairement à nos hypothèses et aux effets comportementaux de l'E2, les résultats préliminaires ne confortent que partiellement l'idée d'un basculement vers l'hippocampe, structure clé dans la mémoire relationnelle/déclarative. En effet, même s'il entraîne une réduction de l'activité du DMS, l'E2 ne diminue pas l'activation par la tâche de cette structure, importante pour la mémoire non déclarative. Enfin, la connectivité fonctionnelle ne semble pas être rétablie par l'E2.

Quoi qu'il en soit, les résultats de l'analyse à l'échelle systémique concernant les effets bénéfiques en mémoire à long-terme focalisent l'attention sur le CA1 et ceux concernant les effets délétères en mémoire à court-terme, sur le DG.

IV. HYPOTHESES SUR LE MECANISME D'ACTION DE L'E2 SUR LA FONCTION MNESIQUE

Dans l'hippocampe, il existe deux grands types de neurones : les neurones glutamatergiques et les neurones GABAergiques. Même s'il a été montré de nombreux effets de l'E2 sur la transmission GABAergique (pour revue : Wójtowicz & Mozrzymas, 2010), nous nous focaliserons sur les effets de l'E2 sur la transmission glutamatergique, sur la neurogénèse dans le DG, et évoquerons la possibilité d'un effet de l'E2 orchestré par l'Acétylcholine (ACh).

▪ Implication des récepteurs glutamatergiques dans les effets de l'E2

Un grand nombre d'études ont mis en évidence l'implication des récepteurs NMDA dans la capacité de l'E2 à moduler la densité synaptique (pour revue : Foy, Baudry, Diaz Brinton, & Thompson, 2008; Spencer et al., 2008). En effet, suite à une ovariectomie, on observe une diminution conjointe de la densité des épines et de l'expression des récepteurs GluN1 et GluN2b dans l'hippocampe (Cyr, Thibault, et al. 2001; Cyr, Ghribi, et al. 2001) et la supplémentation en E2

normalise ces mesures (Gazzaley et al. 1996; Woolley et al. 1997; Weiland 1992). De plus, GluN2b semble être crucial aux effets de l'E2 sur la plasticité synaptique en particulier chez les animaux âgés : l'E2 augmente l'expression de l'ARNm de GluN2b, le nombre de sites de liaison des GluN2b, et normalise la localisation synaptique des récepteurs contenant cette sous-unité (Adams et al. 2004). Puisqu'il a été montré qu'une localisation altérée des GluN2b pouvait en partie sous-tendre les déficits de plasticité synaptique liés à l'âge (Kollen et al. 2008; Jouvenceau & Dutar 2006), il est crucial de mieux comprendre en quoi l'E2 affecte cette protéine. Une des pistes de recherche est l'étude de la mobilité latérale de GluN2b. Adams et collaborateurs (Adams et al. 2004) ont montré que l'E2 ne modifiait pas l'expression à la synapse de GluN1 et GluN2b mais rétablissait une distribution synaptique "plus jeune" de GluN2b dans CA1. Sur cette base, ces auteurs ont suggéré un potentiel effet de l'E2 sur la mobilité latérale de GluN2b. Des expériences récentes de l'équipe confirment cette hypothèse (Potier-Georges et al, en préparation). En effet, l'E2 *in vitro* affecte la mobilité latérale de GluN2b. D'autre part, la mobilité latérale des GluN1R dans CA1 est cruciale à la LTP *in vivo* et au conditionnement de trace. Des expériences futures chercheront à établir qu'*in vivo* la mobilité latérale de GluN2b est critique à l'effet bénéfique de l'E2 sur la fonction mnésique. D'autre part, nous avons basé nos hypothèses sur les effets de l'E2 sur la LTP et la LTD rapportés dans la littérature, mais nous avons été confrontés au manque de données chez les mâles. Ainsi, nous souhaiterions poursuivre notre étude en examinant la plasticité synaptique *in vivo*, chez l'animal vigile dans nos tâches en labyrinthe radial.

▪ Implication de la neurogénèse dans les effets de l'E2

Le DG est connu pour être l'une des deux structures capables de produire de la neurogénèse chez l'adulte, processus nécessaire à la formation de la mémoire à long-terme (Dupret et al. 2008). De plus, il a été montré que les niveaux d'E2 circulant étaient corrélés aux performances mnésiques et également à la neurogénèse (Dalla et al. 2009). Ainsi, les femelles rattes présentent une neurogénèse et une mémoire associative plus élevées que les mâles. Si nous n'avons pas étudié spécifiquement la neurogénèse suite à notre supplémentation en E2, nous avons en revanche observé que l'activité basale du DG était augmentée chez les animaux jeunes, compatible avec un accroissement de la neurogénèse. Une augmentation de la neurogénèse par

l'E2 pourrait à la fois expliquer l'augmentation de la mémoire à long-terme mais également l'aggravation des interférences proactives en mémoire de travail. En effet, il a été montré que l'ablation de la neurogénèse induisait une amélioration paradoxale des performances en mémoire de travail en particulier lorsque les interférences proactives étaient fortes (Saxe et al. 2007). Cette étude démontre donc, en l'absence de neurogénèse, un profil comportemental inverse de celui de nos animaux jeunes exposés à l'E2.

▪ **Comment concilier les effets de l'E2 : un rôle pour la transmission cholinergique ?**

Etant donné que nous avons utilisé une supplémentation orale, il est probable que les effets observés résultent de la combinaison d'un ensemble de mécanismes. A ce titre, une modulation plus globale de l'activité cérébrale par le neuromodulateur Acétylcholine (ACh) pourrait être envisagée. En effet, il a notamment été montré que l'E2 augmentait la libération d'ACh dans l'hippocampe (Marriott & Korol 2003; Gibbs 2010) suggérant que certains des effets de l'E2 dans cette région pourrait être relayé par la transmission cholinergique. De plus, l'augmentation induite par de l'E2 du « binding » des GluNR et des performances en mémoire de travail, serait sous-tendue par le système cholinergique muscarinique. Cette étude a également montré qu'augmenter la concentration en ACh en inhibant son enzyme de dégradation (l'acétylcholinestérase) répliquait les effets de l'E2 (Daniel & Dohanich 2001). D'autre part, le transporteur vésiculaire de l'ACh et $Er\alpha$ sont co-localisés dans des terminaisons axonales et les épines dendritiques de CA1 (Towart et al. 2003). Ceci suggère que l'E2 lié à $Er\alpha$ pourrait affecter la libération locale d'ACh afin d'influencer l'expression des GluNR et la fonction hippocampique. Ces données confortent l'idée que $Er\alpha$ sous-tendrait les effets bénéfiques de l'E2 sur le déficit de mémoire relationnelle/déclarative.

De plus, l'E2 pourrait également moduler la libération d'ACh en agissant directement sur les projections cholinergiques provenant du septum et atteignant l'hippocampe (Rudick et al. 2003). Il a été montré que la lésion du septum atténuait partiellement la désinhibition induite par l'E2 des neurones pyramidaux du CA1. Enfin, l'activation de voies de signalisation similaires dans les neurones cholinergiques et hippocampiques *in vitro*, suggèrent que l'E2 pourrait exercer des effets synergiques, conduisant à l'augmentation de l'apprentissage et de la mémoire hippocampo-dépendants (Szego et al. 2006).

D'autre part, la transmission cholinergique affecte également la neurogénèse. En effet, une augmentation de la libération d'ACh induirait une augmentation de la prolifération et de la survie des nouveaux neurones dans le DG (Brüel-Jungferman et al. 2011). Il est ainsi possible que l'augmentation de la neurogénèse induite par l'E2 soit due à une augmentation de la libération d'ACh également induite par l'E2, par effet sur les terminaisons hippocampiques ou sur le septum. L'idée d'un effet de l'E2 sur les corps cellulaires cholinergiques du septum est confortée par la forte expression des ERs dans cette structure (Mitra et al. 2003).

La transmission cholinergique pourrait également être responsable des effets de l'E2 sur les différents systèmes de mémoire. En effet, l'ACh module l'activité des structures essentielles aux différentes formes de mémoire pour adapter le fonctionnement des systèmes à la demande mnésique spécifique de la tâche (Brayda-Bruno et al. 2013). La libération d'ACh dans l'hippocampe est induite par l'apprentissage spatial, et cette libération est accrue par l'E2 (Marriott & Korol 2003). De plus, la libération d'ACh est augmentée dans le striatum lors d'un basculement d'une stratégie spatial vers une stratégie motrice-réponse (Chang & Gold 2003). Ainsi, l'augmentation d'ACh dans une structure particulière pourrait induire une prédominance de cette structure dans la stratégie utilisée lors d'un apprentissage. Puisque l'E2 est connu pour entraîner l'utilisation préférentielle d'une stratégie centrée sur l'hippocampe (Davis, 2005; Korol, 2004), l'ensemble de ces données suggèrent que cet effet pourrait passer par le système cholinergique.

En ce qui concerne le vieillissement, une meilleure compréhension de l'implication du système cholinergique dans les effets de l'E2 est cruciale. En effet, l'hypothèse cholinergique du vieillissement mnésique stipule qu'une diminution de l'activité cholinergique sous-tendrait le déclin mnésique lié à l'âge (Bartus et al. 1982). Ainsi, un effet positif de l'E2 sur la libération d'ACh pourrait être responsable des effets bénéfiques de l'E2 sur le déficit de mémoire relationnelle/déclarative lié à l'âge, et sur le rétablissement d'une activation fonctionnelle de l'hippocampe par la tâche. En revanche, chez les animaux jeunes, l'E2 pourrait « sur-activer » la transmission cholinergique expliquant à la fois l'amélioration de la rétention (via son effet sur la neurogénèse et sur la transmission glutamatergique dans CA1) mais également l'aggravation des

interférences proactives, aboutissant à un effet délétère sur la mémoire à court terme des informations variantes. Enfin, si les effets de l'E2 passent par une augmentation de la libération d'ACh, on peut comprendre qu'il ne normalise pas toutes les altérations fonctionnelles et tous les déficits liés à l'âge, puisque cet effet direct sur l'ACh ne peut permettre de rétablir une modulation cholinergique différentielle et adaptée à la demande mnésique de la tâche.

Références

- Adams, M.M., Shah, R. a, et al., 2001. Different modes of hippocampal plasticity in response to estrogen in young and aged female rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(14), pp.8071–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=35469&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Adams, M.M. et al., 2002. Estrogen and aging affect the subcellular distribution of estrogen receptor-alpha in the hippocampus of female rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(9), pp.3608–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11978836>.
- Adams, M.M., 2003. Estrogen and the Aging Hippocampal Synapse. *Cerebral Cortex*, 13(12), pp.1271–1275. Available at: <http://www.cercor.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/cercor/bhg078> [Accessed May 28, 2012].
- Adams, M.M. et al., 2004. Estrogen modulates synaptic N-methyl-D-aspartate receptor subunit distribution in the aged hippocampus. *The Journal of comparative neurology*, 474(3), pp.419–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15174084> [Accessed May 17, 2012].
- Adams, M.M., Morrison, J.H. & Gore, a C., 2001. N-methyl-D-aspartate receptor mRNA levels change during reproductive senescence in the hippocampus of female rats. *Experimental neurology*, 170(1), pp.171–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11421594> [Accessed June 13, 2012].
- Ahmed, T. et al., 2011. An N-methyl-D-aspartate-receptor dependent, late-phase long-term depression in middle-aged mice identifies no GluN2-subunit bias. *Neuroscience*, 185, pp.27–38. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21504782> [Accessed October 22, 2013].
- Akama, K.T. et al., 2013. Post-synaptic density-95 (PSD-95) binding capacity of G-protein-coupled receptor 30 (GPR30), an estrogen receptor that can be identified in hippocampal dendritic spines. *The Journal of biological chemistry*, 288(9), pp.6438–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23300088> [Accessed September 19, 2013].
- Amaral, D.G. & Witter, M.P., 1989. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31(3), pp.571–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2687721> [Accessed November 6, 2013].
- Azcoitia, I., Yague, J.G. & Garcia-Segura, L.M., 2011. Estradiol synthesis within the human brain. *Neuroscience*, 191, pp.139–47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21320576> [Accessed October 6, 2013].
- Bäckström, T., 1976. Epilepsy in women. Oestrogen and progesterone plasma levels. *Experientia*, 32(2), pp.248–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1269627> [Accessed September 10, 2013].
- Baddeley, A., 2000. The episodic buffer: a new component of working memory? *Trends in cognitive sciences*, 4(11), pp.417–423. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11058819>.
- Baddeley, A., 1996. The fractionation of working memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24), pp.13468–72. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=33632&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 7, 2013].
- Baddeley, A. et al., 1999. Working memory and vigilance: evidence from normal aging and Alzheimer's disease. *Brain and cognition*, 41(1), pp.87–108. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10536087> [Accessed November 7, 2013].
- Banasr, M. et al., 2001. Serotonin mediates oestrogen stimulation of cell proliferation in the adult dentate

- gyrus. *The European journal of neuroscience*, 14(9), pp.1417–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11722603> [Accessed January 20, 2016].
- Barha, C.K., Dalton, G.L. & Galea, L.A., 2010. Low doses of 17alpha-estradiol and 17beta-estradiol facilitate, whereas higher doses of estrone and 17alpha- and 17beta-estradiol impair, contextual fear conditioning in adult female rats. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 35(2), pp.547–59. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3055382&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 13, 2012].
- Barha, C.K. & Galea, L.A.M., 2011. Motherhood alters the cellular response to estrogens in the hippocampus later in life. *Neurobiology of aging*, 32(11), pp.2091–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20034703> [Accessed February 16, 2016].
- Barha, C.K., Lieblich, S.E. & Galea, L.A.M., 2009. Different forms of oestrogen rapidly upregulate cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats. *Journal of neuroendocrinology*, 21(3), pp.155–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19076272> [Accessed February 16, 2016].
- Barker, J.M. & Galea, L.A.M., 2008. Repeated estradiol administration alters different aspects of neurogenesis and cell death in the hippocampus of female, but not male, rats. *Neuroscience*, 152(4), pp.888–902. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18353559> [Accessed February 16, 2016].
- Barnes, C.A., Nadel, L. & Honig, W.K., 1980. Spatial memory deficit in senescent rats. *Canadian journal of psychology*, 34(1), pp.29–39. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7388694> [Accessed October 15, 2013].
- Bartus, R.T. et al., 1982. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science (New York, N.Y.)*, 217(4558), pp.408–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7046051> [Accessed November 8, 2013].
- Berlinger, M. et al., 2008. Anatomy of the episodic buffer: a voxel-based morphometry study in patients with dementia. *Behavioural neurology*, 19(1-2), pp.29–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18413913>.
- Berry, B., McMahan, R. & Gallagher, M., 1997. Spatial learning and memory at defined points of the estrous cycle: effects on performance of a hippocampal-dependent task. *Behavioral neuroscience*, 111(2), pp.267–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9106667> [Accessed January 15, 2014].
- Bi, R. et al., 2001. Cyclic changes in estradiol regulate synaptic plasticity through the MAP kinase pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(23), pp.13391–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=60881&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Bimonte, H.A. & Denenberg, V.H., 1999. Estradiol facilitates performance as working memory load increases. *Psychoneuroendocrinology*, 24(2), pp.161–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10101725> [Accessed October 31, 2013].
- Binder, E.F. et al., 2001. Effects of hormone replacement therapy on cognitive performance in elderly women. *Maturitas*, 38(2), pp.137–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11306202> [Accessed November 7, 2013].
- Blanc, F. et al., 2010. [Alzheimer disease, memory and estrogen]. *Revue neurologique*, 166(4), pp.377–88.

- Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19836813> [Accessed October 18, 2013].
- Bliss, T. V & Collingridge, G.L., 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361(6407), pp.31–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8421494> [Accessed October 23, 2013].
- Bliss, T. V & Lomo, T., 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology*, 232(2), pp.331–56. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1350458&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 7, 2013].
- Boric, K. et al., 2008. Potential adaptive function for altered long-term potentiation mechanisms in aging hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(32), pp.8034–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2615232&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 18, 2013].
- Bosch, M. & Hayashi, Y., 2012. Structural plasticity of dendritic spines. *Current opinion in neurobiology*, 22(3), pp.383–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21963169> [Accessed May 24, 2013].
- Boucard, A. et al., 2009. Activating a memory system focuses connectivity toward its central structure. *Behavioural brain research*, 204(1), pp.226–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19539661> [Accessed November 6, 2013].
- Boucard, A., Marchand, A. & Noguès, X., 2007. Reliability and validity of structural equation modeling applied to neuroimaging data: a simulation study. *Journal of neuroscience methods*, 166(2), pp.278–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17825426> [Accessed November 6, 2013].
- Braver & West, 2008. memory, executive processes, and aging. In *Handbook of Aging and cognition*.
- Brayda-Bruno, L., 2010. *Etude des déficits de mémoire relationnelle/Déclarative au cours du vieillissement chez la souris : approche systémique*.
- Brayda-Bruno, L. et al., 2013. Partial loss in septo-hippocampal cholinergic neurons alters memory-dependent measures of brain connectivity without overt memory deficits. *Neurobiology of disease*, 54, pp.372–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23376311> [Accessed May 21, 2013].
- Brigman, J.L. et al., 2010. Loss of GluN2B-containing NMDA receptors in CA1 hippocampus and cortex impairs long-term depression, reduces dendritic spine density, and disrupts learning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(13), pp.4590–600. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2869199&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 8, 2013].
- Brown, T.C. et al., 2005. NMDA receptor-dependent activation of the small GTPase Rab5 drives the removal of synaptic AMPA receptors during hippocampal LTD. *Neuron*, 45(1), pp.81–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15629704> [Accessed October 24, 2013].
- Bruel-Jungerman, E., Lucassen, P.J. & Francis, F., 2011. Cholinergic influences on cortical development and adult neurogenesis. *Behavioural brain research*, 221(2), pp.379–88. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21272598> [Accessed November 12, 2013].
- Bunge, S.A. et al., 2000. A resource model of the neural basis of executive working memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(7), pp.3573–8. Available at:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=16281&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 7, 2013].
- Burke, S.N. & Barnes, C. a, 2006. Neural plasticity in the ageing brain. *Nature reviews. Neuroscience*, 7(1), pp.30–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16371948> [Accessed March 2, 2012].
- Cabeza, R. et al., 2002. Aging gracefully: compensatory brain activity in high-performing older adults. *NeuroImage*, 17(3), pp.1394–402. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414279> [Accessed November 6, 2013].
- Cabeza, R., 2008. Role of parietal regions in episodic memory retrieval: the dual attentional processes hypothesis. *Neuropsychologia*, 46(7), pp.1813–27. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2517132&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 6, 2013].
- Chalfonte, B.L. & Johnson, M.K., 1996. Feature memory and binding in young and older adults. *Memory & cognition*, 24(4), pp.403–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8757490> [Accessed November 6, 2013].
- Chambers, K.C., Thornton, J.E. & Roselli, C.E., 1991. Age-related deficits in brain androgen binding and metabolism, testosterone, and sexual behavior of male rats. *Neurobiology of aging*, 12(2), pp.123–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2052127> [Accessed November 12, 2013].
- Chambliss, K.L. & Shaul, P.W., 2002. Estrogen Modulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Endocrine Reviews*, 23(5), pp.665–686. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12372846> [Accessed October 18, 2013].
- Chang, Q. & Gold, P.E., 2003. Switching memory systems during learning: changes in patterns of brain acetylcholine release in the hippocampus and striatum in rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(7), pp.3001–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12684487> [Accessed November 6, 2013].
- Cherrier, M.M., 2005. Androgens and cognitive function. *Journal of endocrinological investigation*, 28(3 Suppl), pp.65–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16044582> [Accessed November 6, 2013].
- Chiba, S. et al., 2007. Involvement of granulin in estrogen-induced neurogenesis in the adult rat hippocampus. *The Journal of reproduction and development*, 53(2), pp.297–307. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17179653> [Accessed February 16, 2016].
- Cohen, N.J., 1984. *Neuropsychology of Memory*,
- Collette & Van der Linden, 2005. La mémoire de travail. In *die d'Alzheimer. Capacités mnésiques perturbées et préservées. Evaluation et prise en charge des troubles mnésiques*. pp. 35–71.
- Committee, N., 1999. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*, 97(2), pp.161–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10219237> [Accessed November 6, 2013].
- Conrad, C.D. & Bimonte-Nelson, H. a, 2010. *Impact of the hypothalamic-pituitary-adrenal/gonadal axes on trajectory of age-related cognitive decline.*, Elsevier B.V. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20541660> [Accessed October 14, 2013].
- Córdoba Montoya, D. a & Carrer, H.F., 1997. Estrogen facilitates induction of long term potentiation in the hippocampus of awake rats. *Brain research*, 778(2), pp.430–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9459564>.

- Coussen, F., 2009. Molecular determinants of kainate receptor trafficking. *Neuroscience*, 158(1), pp.25–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18358623> [Accessed November 6, 2013].
- Cull-Candy, S.G. & Leszkiewicz, D.N., 2004. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment*, 2004(255), p.re16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15494561> [Accessed November 6, 2013].
- Cuppini, R. et al., 2006. Age-related naturally occurring depression of hippocampal neurogenesis does not affect trace fear conditioning. *Hippocampus*, 16(2), pp.141–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16261556> [Accessed October 10, 2013].
- CURTIS, D.R. & WATKINS, J.C., 1960. The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. *Journal of neurochemistry*, 6, pp.117–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13718948> [Accessed November 6, 2013].
- Cyr, M., Thibault, C., et al., 2001. Estrogen-like activity of tamoxifen and raloxifene on NMDA receptor binding and expression of its subunits in rat brain. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 25(2), pp.242–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11425508>.
- Cyr, M., Ghribi, O., et al., 2001. Ovarian steroids and selective estrogen receptor modulators activity on rat brain NMDA and AMPA receptors. *Brain research. Brain research reviews*, 37(1-3), pp.153–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11744083> [Accessed November 6, 2013].
- Dalla, C. et al., 2009. Female rats learn trace memories better than male rats and consequently retain a greater proportion of new neurons in their hippocampi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(8), pp.2927–32. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2650367&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 11, 2013].
- Daniel, J.M. & Dohanich, G.P., 2001. Acetylcholine mediates the estrogen-induced increase in NMDA receptor binding in CA1 of the hippocampus and the associated improvement in working memory. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(17), pp.6949–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11517282>.
- Das, S. et al., 1998. Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature*, 393(6683), pp.377–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9620802> [Accessed November 6, 2013].
- Daselaar, S.M. et al., 2006. The medial temporal lobe distinguishes old from new independently of consciousness. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(21), pp.5835–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16723542> [Accessed November 6, 2013].
- Davachi, L. & Wagner, A.D., 2002. Hippocampal contributions to episodic encoding: insights from relational and item-based learning. *Journal of neurophysiology*, 88(2), pp.982–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12163547> [Accessed November 6, 2013].
- Davidson, J.M. et al., 1983. Hormonal changes and sexual function in aging men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 57(1), pp.71–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6602143> [Accessed November 6, 2013].
- Davis, D.M. et al., 2005. Differential effects of estrogen on hippocampal- and striatal-dependent learning. *Neurobiology of learning and memory*, 84(2), pp.132–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16054404> [Accessed June 4, 2013].

- Day, M. et al., 2005. Beta estrogen receptor knockout (BERKO) mice present attenuated hippocampal CA1 long-term potentiation and related memory deficits in contextual fear conditioning. *Behavioural brain research*, 164(1), pp.128–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16054246> [Accessed June 13, 2012].
- Day, M. & Good, M., 2005. Ovariectomy-induced disruption of long-term synaptic depression in the hippocampal CA1 region in vivo is attenuated with chronic estrogen replacement. *Neurobiology of learning and memory*, 83(1), pp.13–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15607684> [Accessed October 14, 2013].
- Deng, W., Mayford, M. & Gage, F.H., 2013. Selection of distinct populations of dentate granule cells in response to inputs as a mechanism for pattern separation in mice. *eLife*, 2, p.e00312. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3602954&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 18, 2013].
- Desmond, N.L., Zhang, D.X. & Levy, W.B., 2000. Estradiol enhances the induction of homosynaptic long-term depression in the CA1 region of the adult, ovariectomized rat. *Neurobiology of learning and memory*, 73(2), pp.180–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10704327> [Accessed October 14, 2013].
- Dominguez, R. et al., 2009. 17beta-estradiol-mediated neuroprotection and ERK activation require a pertussis toxin-sensitive mechanism involving GRK2 and beta-arrestin-1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(13), pp.4228–38. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3182118&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 24, 2013].
- Dupret, D. et al., 2008. Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PloS one*, 3(4), p.e1959. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2396793&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 11, 2013].
- Eaton, J., 2002. *Manual Network Theory: GNU Octave*,
- Efron, B. & Tibshirani, R., 1991. Statistical data analysis in the computer age. *Science (New York, N.Y.)*, 253(5018), pp.390–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17746394> [Accessed November 11, 2013].
- Eichenbaum, H., 2000. A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nature reviews. Neuroscience*, 1(1), pp.41–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11252767> [Accessed November 6, 2013].
- Eichenbaum, H. et al., 1988. Hippocampal system dysfunction and odor discrimination learning in rats: impairment or facilitation depending on representational demands. *Behavioral neuroscience*, 102(3), pp.331–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3395444> [Accessed November 7, 2013].
- Eichenbaum, H., 2004. Hippocampus : Cognitive Processes and Neural Representations that Underlie Declarative Memory The hippocampus serves a critical role in declarative. *Neuron*, 44, pp.109–120.
- Eichenbaum, H., 1992. The hippocampal system and declarative memory in animals. *Journal of cognitive neuroscience*, 4(3), pp.217–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23964879> [Accessed November 7, 2013].
- Eichenbaum, H., Mathews, P. & Cohen, N.J., 1989. Further studies of hippocampal representation during odor discrimination learning. *Behavioral neuroscience*, 103(6), pp.1207–16. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2610913> [Accessed November 7, 2013].
- El-Husseini, A.E. et al., 2000. PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science (New York, N.Y.)*, 290(5495), pp.1364–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11082065> [Accessed November 12, 2013].
- Epp, J.R., Beasley, C.L. & Galea, L.A., 2013. Increased hippocampal neurogenesis and p21 expression in depression: dependent on antidepressants, sex, age, and antipsychotic exposure. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 38(11), pp.2297–306. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3773682&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 16, 2016].
- Epp, J.R., Chow, C. & Galea, L.A.M., 2013. Hippocampus-dependent learning influences hippocampal neurogenesis. *Frontiers in Neuroscience*, 7, p.57. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3627134&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 16, 2016].
- Ergorul, C. & Eichenbaum, H., 2004. The hippocampus and memory for “what,” “where,” and “when”. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 11(4), pp.397–405. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=498318&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 4, 2013].
- Eriksson, P.S. et al., 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine*, 4(11), pp.1313–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9809557> [Accessed November 18, 2014].
- Erreger, K. et al., 2005. Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles. *The Journal of physiology*, 563(Pt 2), pp.345–58. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1665591&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 12, 2013].
- Etchamendy, N. et al., 2001. Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(16), pp.6423–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11487666> [Accessed November 6, 2013].
- Etchamendy, N. et al., 2012. Evidence for a virtual human analog of a rodent relational memory task: a study of aging and fMRI in young adults. *Hippocampus*, 22(4), pp.869–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21656872> [Accessed November 4, 2013].
- Etchamendy, N. et al., 2003. Hippocampal lesions and discrimination performance of mice in the radial maze: sparing or impairment depending on the representational demands of the task. *Hippocampus*, 13(2), pp.197–211. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12699328> [Accessed November 6, 2013].
- Evans, H.M. & Long, J.A., 1922. Characteristic Effects upon Growth, Oestrus and Ovulation Induced by the Intraperitoneal Administration of Fresh Anterior Hypophyseal Substance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 8(3), pp.38–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1084981&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 12, 2013].
- Fan, L. et al., 2010. Estradiol-induced object memory consolidation in middle-aged female mice requires dorsal hippocampal extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase activation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(12),

- pp.4390–400. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2852263&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 16, 2014].
- Fanselow, M.S., 1980. Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. *The Pavlovian journal of biological science*, 15(4), pp.177–82. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7208128> [Accessed November 11, 2013].
- Fernandez, S.M. et al., 2008. Estradiol-induced enhancement of object memory consolidation involves hippocampal extracellular signal-regulated kinase activation and membrane-bound estrogen receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(35), pp.8660–7. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2693006&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 4, 2013].
- Fonseca, C.S. et al., 2013. Object recognition memory and temporal lobe activation after delayed estrogen replacement therapy. *Neurobiology of learning and memory*, 101, pp.19–25. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23298786> [Accessed October 30, 2013].
- Foster, 1999. Involvement of hippocampal synaptic plasticity in age-related memory decline. *Brain research. Brain research reviews*, 30(3), pp.236–49. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10567726>.
- Foster & Norris, C.M., 1997. Age-Associated Changes in Ca²-Dependent Processes: Relation to Hippocampal Synaptic Plasticity. , 612(August), pp.602–612.
- Foster, T.C., 2012. Dissecting the age-related decline on spatial learning and memory tasks in rodent models: N-methyl-D-aspartate receptors and voltage-dependent Ca²⁺ channels in senescent synaptic plasticity. , 96(3), pp.283–303.
- Foy et al., 1999. 17 β -Estradiol Enhances NMDA Receptor-Mediated EPSPs and Long-Term Potentiation. *Journal of neurophysiology*, 81, pp.925–929.
- Foy et al., 2008. Estrogen and hippocampal plasticity in rodent models. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 15(4), pp.589–603. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2819757&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Foy, M.R. et al., 2008. 17beta-estradiol modifies stress-induced and age-related changes in hippocampal synaptic plasticity. *Behavioral neuroscience*, 122(2), pp.301–9. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18410170> [Accessed October 30, 2013].
- Frick, K.M., 2012. Building a better hormone therapy? How understanding the rapid effects of sex steroid hormones could lead to new therapeutics for age-related memory decline. *Behavioral neuroscience*, 126(1), pp.29–53. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3401046&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 18, 2013].
- Frick, K.M., 2008. Estrogens and age-related memory decline in rodents: what have we learned and where do we go from here? *Hormones and behavior*, 55(1), pp.2–23. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2664384&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 13, 2012].
- Frick, K.M. & Berger-Sweeney, J., 2001. Spatial reference memory and neocortical neurochemistry vary with the estrous cycle in C57BL/6 mice. *Behavioral neuroscience*, 115(1), pp.229–37. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11256446>.

- Friedman, D., Nessler, D. & Johnson, R., 2007. Memory encoding and retrieval in the aging brain. *Clinical EEG and neuroscience : official journal of the EEG and Clinical Neuroscience Society (ENCS)*, 38(1), pp.2–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17319586> [Accessed November 6, 2013].
- Frye, C., Rhodes, M.E. & Dudek, B., 2005. Estradiol to aged female or male mice improves learning in inhibitory avoidance and water maze tasks. *Brain research*, 1036(1-2), pp.101–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3619722&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 4, 2013].
- Frye, C.A. et al., 2012. Endocrine disrupters: a review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems. *Journal of neuroendocrinology*, 24(1), pp.144–59. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3245362&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 7, 2013].
- Frye, C.A., 1995. Estrus-associated decrements in a water maze task are limited to acquisition. *Physiology & behavior*, 57(1), pp.5–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7878125> [Accessed January 15, 2014].
- Fuh, J.-L. et al., 2006. A longitudinal study of cognition change during early menopausal transition in a rural community. *Maturitas*, 53(4), pp.447–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16198073> [Accessed November 7, 2013].
- Galea, L.A. et al., 2001. High levels of estradiol disrupt conditioned place preference learning, stimulus response learning and reference memory but have limited effects on working memory. *Behavioural brain research*, 126(1-2), pp.115–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11704257> [Accessed January 15, 2014].
- Galea, L.A.M., 2008. Gonadal hormone modulation of neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rodents. *Brain research reviews*, 57(2), pp.332–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17669502> [Accessed June 4, 2013].
- Gallagher, M. et al., 2010. Bridging neurocognitive aging and disease modification: targeting functional mechanisms of memory impairment. *Current Alzheimer research*, 7(3), pp.197–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3008592&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 11, 2013].
- Gallagher, M. & Rapp, P.R., 1997. The use of animal models to study the effects of aging on cognition. *Annual review of psychology*, 48, pp.339–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9046563> [Accessed November 12, 2013].
- Garcia-Segura, L.M. et al., 1999. Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience*, 89(2), pp.567–78. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10077336> [Accessed November 6, 2013].
- Gautier, A. et al., 2013. Associations between visceral adipose tissue, inflammation and sex steroid concentrations in men. *Clinical endocrinology*, 78(3), pp.373–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22469460> [Accessed November 6, 2013].
- Gazzaley, a H. et al., 1996. Differential regulation of NMDAR1 mRNA and protein by estradiol in the rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(21), pp.6830–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8824322>.

- Geinisman, Y., Detoledo-morrell, L. & Heller, R.E., 1995. Hippocampal markers of age-related memory dysfunction: behavioral, electrophysiological and morphological perspectives. *Progress in Neurobiology*, 45, pp.223–252.
- Germain, P. et al., 2006. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacological reviews*, 58(4), pp.685–704. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17132848> [Accessed November 6, 2013].
- Gibbs, R.B., 1999. Estrogen replacement enhances acquisition of a spatial memory task and reduces deficits associated with hippocampal muscarinic receptor inhibition. *Hormones and behavior*, 36(3), pp.222–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10603286> [Accessed October 24, 2013].
- Gibbs, R.B., 2010. Estrogen therapy and cognition: a review of the cholinergic hypothesis. *Endocrine reviews*, 31(2), pp.224–53. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2852210&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 11, 2012].
- Gibbs, R.B., 2000. Long-term treatment with estrogen and progesterone enhances acquisition of a spatial memory task by ovariectomized aged rats. *Neurobiology of aging*, 21(1), pp.107–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10794855> [Accessed October 31, 2013].
- Gielen, M., 2010. Des protéines de la transmission synaptique excitatrice canaux du glutamate. , pp.65–72.
- Gisquet-Verrier, P. & Delatour, B., 2006. The role of the rat prelimbic/infralimbic cortex in working memory: not involved in the short-term maintenance but in monitoring and processing functions. *Neuroscience*, 141(2), pp.585–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16713111> [Accessed November 4, 2013].
- Good, M., Day, M. & Muir, J.L., 1999. SHORT COMMUNICATION Cyclical changes in endogenous levels of oestrogen modulate the induction of LTD and LTP in the hippocampal CA1 region. , 11, pp.4476–4480.
- Gould, E. et al., 1990. Gonadal Steroids Regulate Dendritic Pyramidal Cells in Adulthood Spine Density in Hippocampal. , (April).
- Gould, E., 1999. Serotonin and Hippocampal Neurogenesis. *Neuropsychopharmacology*, 21(2), p.46S–51S. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10432488> [Accessed February 16, 2016].
- Grady, C.L. et al., 1995. Age-related reductions in human recognition memory due to impaired encoding. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5221), pp.218–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7618082> [Accessed November 6, 2013].
- Grady, C.L. & Craik, F.I., 2000. Changes in memory processing with age. *Current opinion in neurobiology*, 10(2), pp.224–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10753795> [Accessed November 6, 2013].
- Grassi, S. et al., 2011. Neural 17 β -estradiol facilitates long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *Neuroscience*, 192, pp.67–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21749911> [Accessed June 13, 2012].
- Greendale, G.A. et al., 2010. Menopause-associated symptoms and cognitive performance: results from the study of women's health across the nation. *American journal of epidemiology*, 171(11), pp.1214–24. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2915492&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

e=abstract [Accessed November 7, 2013].

- Grigorova, M. & Sherwin, B.B., 2006. No differences in performance on test of working memory and executive functioning between healthy elderly postmenopausal women using or not using hormone therapy. *Climacteric : the journal of the International Menopause Society*, 9(3), pp.181–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16766432> [Accessed November 11, 2013].
- Guillaume, C. et al., 2009. Mémoire et vieillissement normal : données comportementales et électrophysiologiques. *NPG Neurologie - Psychiatrie - Gériatrie*, 9(49), pp.3–9. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1627483008000949> [Accessed November 4, 2013].
- Gureviciene, I. et al., 2003. Estrogen treatment alleviates NMDA-antagonist induced hippocampal LTP blockade and cognitive deficits in ovariectomized mice. *Neurobiology of learning and memory*, 79(1), pp.72–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12482681> [Accessed October 24, 2013].
- Guzowski, J.F. et al., 2001. Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(14), pp.5089–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11438584>.
- Halbreich, U. et al., 1995. Possible acceleration of age effects on cognition following menopause. *Journal of psychiatric research*, 29(3), pp.153–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7473292> [Accessed November 7, 2013].
- Hampson, E. & Morley, E.E., 2013. Estradiol concentrations and working memory performance in women of reproductive age. *Psychoneuroendocrinology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24011502> [Accessed November 6, 2013].
- Hamson, D.K. et al., 2013. Androgens increase survival of adult-born neurons in the dentate gyrus by an androgen receptor-dependent mechanism in male rats. *Endocrinology*, 154(9), pp.3294–304. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23782943> [Accessed February 16, 2016].
- Hart, S.A., Patton, J.D. & Woolley, C.S., 2001. Quantitative analysis of ER alpha and GAD colocalization in the hippocampus of the adult female rat. *The Journal of comparative neurology*, 440(2), pp.144–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11745614> [Accessed October 24, 2013].
- Hayashi, Y. et al., 2000. Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5461), pp.2262–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10731148> [Accessed November 6, 2013].
- Hedden, T. & Gabrieli, J.D.E., 2004. Insights into the ageing mind: a view from cognitive neuroscience. *Nature reviews. Neuroscience*, 5(2), pp.87–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14735112> [Accessed May 21, 2013].
- Henderson, V.W. & Popat, R.A., 2011. Effects of endogenous and exogenous estrogen exposures in midlife and late-life women on episodic memory and executive functions. *Neuroscience*, 191, pp.129–38. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21664950> [Accessed November 12, 2013].
- Hijazi, R.A. & Cunningham, G.R., 2005. Andropause: is androgen replacement therapy indicated for the aging male? *Annual review of medicine*, 56, pp.117–37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15660505> [Accessed November 6, 2013].
- Hodes, G.E. & Shors, T.J., 2005. Distinctive stress effects on learning during puberty. *Hormones and behavior*, 48(2), pp.163–71. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3364669&tool=pmcentrez&rendertyp>

e=abstract [Accessed November 11, 2013].

- Hogervorst, E., 2013. Effects Of Gonadal Hormones On Cognitive Behavior In Elderly Men And Women. *Journal of neuroendocrinology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23895362> [Accessed November 6, 2013].
- Hogervorst, E. et al., 2004. Serum levels of estradiol and testosterone and performance in different cognitive domains in healthy elderly men and women. *Psychoneuroendocrinology*, 29(3), pp.405–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14644069> [Accessed November 6, 2013].
- Hojo, Y. et al., 2004. Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(3), pp.865–70. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=321772&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hojo, Y. et al., 2009. Comparison between hippocampus-synthesized and circulation-derived sex steroids in the hippocampus. *Endocrinology*, 150(11), pp.5106–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19589866> [Accessed June 4, 2013].
- Hojo, Y. et al., 2008. Estrogen synthesis in the brain--role in synaptic plasticity and memory. *Molecular and cellular endocrinology*, 290(1-2), pp.31–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18541362> [Accessed October 18, 2013].
- Hölscher, C., 1997. Long-term potentiation: a good model for learning and memory? *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 21(1), pp.47–68. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9075258>.
- Holtmaat, A.J.G.D. et al., 2005. Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron*, 45(2), pp.279–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15664179> [Accessed October 24, 2013].
- Honjo, H. et al., 2003. Estrogen and non-feminizing estrogen for Alzheimer's disease. *Endocrine journal*, 50(4), pp.361–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14599108> [Accessed November 12, 2013].
- Horwitz, B. et al., 1987. Intercorrelations of regional cerebral glucose metabolic rates in Alzheimer's disease. *Brain research*, 407(2), pp.294–306. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3494486> [Accessed November 11, 2013].
- Huerta, P.T. et al., 2000. Formation of temporal memory requires NMDA receptors within CA1 pyramidal neurons. *Neuron*, 25(2), pp.473–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10719900> [Accessed October 8, 2013].
- Janowsky, J.S., 2006. The role of androgens in cognition and brain aging in men. *Neuroscience*, 138(3), pp.1015–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16310318> [Accessed June 13, 2012].
- Janowsky, J.S., Chavez, B. & Orwoll, E., 2000. Sex steroids modify working memory. *Journal of cognitive neuroscience*, 12(3), pp.407–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10931767> [Accessed November 6, 2013].
- Joffe, H. et al., 2006. Estrogen therapy selectively enhances prefrontal cognitive processes: a randomized, double-blind, placebo-controlled study with functional magnetic resonance imaging in perimenopausal and recently postmenopausal women. *Menopause (New York, N.Y.)*, 13(3), pp.411–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16735938> [Accessed November 6, 2013].

- Jouveneau, A. & Dutar, P., 2006. A role for the protein phosphatase 2B in altered hippocampal synaptic plasticity in the aged rat. *Journal of physiology, Paris*, 99(2-3), pp.154–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16442785> [Accessed June 13, 2012].
- Ju, W. et al., 2004. Activity-dependent regulation of dendritic synthesis and trafficking of AMPA receptors. *Nature neuroscience*, 7(3), pp.244–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14770185> [Accessed November 6, 2013].
- Kaczorowski, C.C., Davis, S.J. & Moyer, J.R., 2012. Aging redistributes medial prefrontal neuronal excitability and impedes extinction of trace fear conditioning. *Neurobiology of aging*, 33(8), pp.1744–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21531046> [Accessed October 10, 2013].
- Kalpouzos, G. et al., 2010. Neurocognitive systems related to real-world prospective memory. *PloS one*, 5(10), p.e13304. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2951914&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 6, 2013].
- Karthikeyan, N. & Thampan, R. V, 1996. Plasma membrane is the primary site of localization of the nonactivated estrogen receptor in the goat uterus: hormone binding causes receptor internalization. *Archives of biochemistry and biophysics*, 325(1), pp.47–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8554342> [Accessed October 24, 2013].
- Kasai, H. et al., 2003. Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends in neurosciences*, 26(7), pp.360–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12850432> [Accessed October 18, 2013].
- Kato, A. et al., 2013. Female hippocampal estrogens have a significant correlation with cyclic fluctuation of hippocampal spines. *Frontiers in neural circuits*, 7(October), p.149. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3798982&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 6, 2013].
- Kemp, A. & Manahan-Vaughan, D., 2007. Hippocampal long-term depression: master or minion in declarative memory processes? *Trends in neurosciences*, 30(3), pp.111–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17234277> [Accessed October 8, 2013].
- Kim, M.T. et al., 2006. 17beta-Estradiol potentiates field excitatory postsynaptic potentials within each subfield of the hippocampus with greatest potentiation of the associational/commissural afferents of CA3. *Neuroscience*, 141(1), pp.391–406. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16725270> [Accessed August 26, 2013].
- Kollen, M., Dutar, P. & Jouveneau, a, 2008. The magnitude of hippocampal long term depression depends on the synaptic location of activated NR2-containing N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience*, 154(4), pp.1308–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18538939> [Accessed June 12, 2012].
- Korol, D.L., 2004. Role of estrogen in balancing contributions from multiple memory systems. *Neurobiology of learning and memory*, 82(3), pp.309–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15464412> [Accessed August 22, 2013].
- Korol, D.L. & Kolo, L.L., 2002. Estrogen-induced changes in place and response learning in young adult female rats. *Behavioral neuroscience*, 116(3), pp.411–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12049322> [Accessed October 22, 2013].
- Kramár, E. a et al., 2009. Cytoskeletal changes underlie estrogen's acute effects on synaptic transmission and plasticity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(41),

- pp.12982–93. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2806054&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 13, 2012].
- Kritzer, M.F. et al., 2001. Gonadectomy impairs T-maze acquisition in adult male rats. *Hormones and behavior*, 39(2), pp.167–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11243744> [Accessed November 6, 2013].
- Kugaya, A. et al., 2003. Increase in prefrontal cortex serotonin 2A receptors following estrogen treatment in postmenopausal women. *The American journal of psychiatry*, 160(8), pp.1522–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12900319> [Accessed November 6, 2013].
- Kuhn, H.G., Dickinson-Anson, H. & Gage, F.H., 1996. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(6), pp.2027–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8604047> [Accessed August 21, 2015].
- Kuiper, G.G. et al., 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(12), pp.5925–30. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=39164&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 28, 2013].
- Kumar, A. & Foster, T.C., 2004. Enhanced long-term potentiation during aging is masked by processes involving intracellular calcium stores. *Journal of neurophysiology*, 91(6), pp.2437–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14762159>.
- Kumar, A. & Foster, T.C., 2005. Intracellular calcium stores contribute to increased susceptibility to LTD induction during aging. *Brain research*, 1031(1), pp.125–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15621020> [Accessed October 22, 2013].
- Leigland, L.A., Schulz, L.E. & Janowsky, J.S., 2004. Age related changes in emotional memory. *Neurobiology of aging*, 25(8), pp.1117–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15212836> [Accessed November 6, 2013].
- Leranth, C., Petnehazy, O. & MacLusky, N.J., 2003. Gonadal hormones affect spine synaptic density in the CA1 hippocampal subfield of male rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(5), pp.1588–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12629162>.
- Leuner, B., Falduto, J. & Shors, T.J., 2003. Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(2), pp.659–65. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2740640&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Leung, P.C. & Armstrong, D.T., 1980. Further evidence in support of a short-loop feedback action of estrogen on ovarian androgen production. *Life sciences*, 27(5), pp.415–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6774184> [Accessed November 4, 2013].
- Levin, E.R., 2005. Integration of the extranuclear and nuclear action of estrogens. , 19(8), pp.1951–1959.
- Levin, E.R., 2009. Plasma membrane estrogen receptors. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 20(10), pp.477–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19783454> [Accessed March 24, 2012].
- Levy, W.B., 1996. A sequence predicting CA3 is a flexible associator that learns and uses context to solve hippocampal-like tasks. *Hippocampus*, 6(6), pp.579–90. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9034847> [Accessed November 7, 2013].
- Lewis, M.C. et al., 2008. Estradiol-induced enhancement of object memory consolidation involves NMDA receptors and protein kinase A in the dorsal hippocampus of female C57BL/6 mice. *Behavioral neuroscience*, 122(3), pp.716–21. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2673328&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 16, 2014].
- Li, C. et al., 2004. Estrogen alters hippocampal dendritic spine shape and enhances synaptic protein immunoreactivity and spatial memory in female mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7), pp.2185–90. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=357073&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Lisman, J., 2003. Long-term potentiation: outstanding questions and attempted synthesis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 358(1432), pp.829–42. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1693147&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 24, 2013].
- Lisman, J., Schulman, H. & Cline, H., 2002. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nature reviews. Neuroscience*, 3(3), pp.175–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11994750> [Accessed October 21, 2013].
- Liu, M. et al., 2007. Role of P450 aromatase in sex-specific astrocytic cell death. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27(1), pp.135–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16736049> [Accessed November 6, 2013].
- Luine, V. & Rodriguez, M., 1994. Effects of estradiol on radial arm maze performance of young and aged rats. *Behavioral and neural biology*, 62(3), pp.230–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7857245> [Accessed October 30, 2013].
- Luine, V.N. et al., 1998. Estradiol Enhances Learning and Memory in a Spatial Memory Task and Effects Levels of Monoaminergic Neurotransmitters. *Hormones and Behavior*, 34(2), pp.149–162. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0018506X98914738>.
- Lüthi, A. et al., 2004. Bi-directional modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *BMC neuroscience*, 5, p.44. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=535344&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 24, 2013].
- MacDonald, P.C. et al., 1979. Origin of estrogen in normal men and in women with testicular feminization. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 49(6), pp.905–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/511978> [Accessed November 6, 2013].
- Magnusson, K.R., Brim, B.L. & Das, S.R., 2010. Selective Vulnerabilities of N-methyl-D-aspartate (NMDA) Receptors During Brain Aging. *Frontiers in aging neuroscience*, 2(March), p.11. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2874396&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 13, 2012].
- Maki et al., 2011. Perimenopausal use of hormone therapy is associated with enhanced memory and hippocampal function later in life. *Brain research*, 1379, pp.232–43. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3046212&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 2, 2013].

- Maki, P.M. & Resnick, S.M., 2001. Effects of estrogen on patterns of brain activity at rest and during cognitive activity: a review of neuroimaging studies. *NeuroImage*, 14(4), pp.789–801. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11554798> [Accessed October 18, 2013].
- Malenka, R.C. et al., 1989. An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature*, 340(6234), pp.554–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2549423> [Accessed October 24, 2013].
- Malenka, R.C. & Bear, M.F., 2004. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*, 44(1), pp.5–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15450156> [Accessed October 21, 2013].
- Marighetto, a et al., 1999. Knowing which and knowing what: a potential mouse model for age-related human declarative memory decline. *The European journal of neuroscience*, 11(9), pp.3312–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10510196>.
- Marighetto, A. et al., 2000. Further evidence for a dissociation between different forms of mnemonic expressions in a mouse model of age-related cognitive decline: effects of tacrine and S 17092, a novel prolyl endopeptidase inhibitor. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 7(3), pp.159–69. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=311328&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 7, 2013].
- Marighetto, Brayda-bruno & Etchamendy, 2011. Studying the Impact of Aging on Memory Systems : Contribution of Two Behavioral Models in the Mouse.
- Marino, M., Ascenzi, P. & Acconcia, F., 2006. S-palmitoylation modulates estrogen receptor alpha localization and functions. *Steroids*, 71(4), pp.298–303. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16274718> [Accessed October 30, 2013].
- Marriott, L.K. & Korol, D.L., 2003. Short-term estrogen treatment in ovariectomized rats augments hippocampal acetylcholine release during place learning. *Neurobiology of learning and memory*, 80(3), pp.315–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14521873> [Accessed November 6, 2013].
- Massey, P. V et al., 2004. Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(36), pp.7821–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15356193> [Accessed August 23, 2013].
- Massey, P. V & Bashir, Z.I., 2007. Long-term depression: multiple forms and implications for brain function. *Trends in neurosciences*, 30(4), pp.176–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17335914> [Accessed September 23, 2013].
- Mather, M. & Carstensen, L.L., 2003. Aging and attentional biases for emotional faces. *Psychological science*, 14(5), pp.409–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12930469> [Accessed November 6, 2013].
- Matsuzaki, M. et al., 2001. Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nature neuroscience*, 4(11), pp.1086–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11687814> [Accessed October 21, 2013].
- Mazzucco, C.A. et al., 2006. Both estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta agonists enhance cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats. *Neuroscience*, 141(4), pp.1793–800. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16797852> [Accessed January 20, 2016].
- McAllister, A.K., 2007. Dynamic aspects of CNS synapse formation. *Annual review of neuroscience*, 30,

- pp.425–50. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3251656&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 6, 2013].
- McClure, R.E.S., Barha, C.K. & Galea, L.A.M., 2013. 17β -Estradiol, but not estrone, increases the survival and activation of new neurons in the hippocampus in response to spatial memory in adult female rats. *Hormones and behavior*, 63(1), pp.144–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23063473> [Accessed January 28, 2016].
- McEchron, M.D., Weible, A.P. & Disterhoft, J.F., 2001. Aging and learning-specific changes in single-neuron activity in CA1 hippocampus during rabbit trace eyeblink conditioning. *Journal of neurophysiology*, 86(4), pp.1839–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11600644> [Accessed November 7, 2013].
- McEwen, B., 2002. Estrogen actions throughout the brain. *Recent progress in hormone research*, 57, pp.357–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12017552>.
- Micevych, P. & Dominguez, R., 2009. Membrane estradiol signaling in the brain. *Frontiers in neuroendocrinology*, 30(3), pp.315–27. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2720427&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 11, 2012].
- Milner, T. a et al., 2001. Ultrastructural evidence that hippocampal alpha estrogen receptors are located at extranuclear sites. *The Journal of comparative neurology*, 429(3), pp.355–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11116225>.
- Mingaud, F. et al., 2008. Retinoid hyposignaling contributes to aging-related decline in hippocampal function in short-term/working memory organization and long-term declarative memory encoding in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(1), pp.279–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18171945> [Accessed June 13, 2012].
- Mingaud, F. et al., 2007. The hippocampus plays a critical role at encoding discontinuous events for subsequent declarative memory expression in mice. *Hippocampus*, 17(4), pp.264–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17265459> [Accessed November 6, 2013].
- Miranda, P., Williams, C.L. & Einstein, G., 1999. Granule cells in aging rats are sexually dimorphic in their response to estradiol. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(9), pp.3316–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10212291>.
- Misane, I. et al., 2005. Time-dependent involvement of the dorsal hippocampus in trace fear conditioning in mice. *Hippocampus*, 15(4), pp.418–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15669102> [Accessed October 8, 2013].
- Mitra, S.W. et al., 2003. Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology*, 144(5), pp.2055–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12697714> [Accessed October 24, 2013].
- Moffat, S.D., 2005. Effects of testosterone on cognitive and brain aging in elderly men. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1055, pp.80–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16387720> [Accessed October 14, 2013].
- Monyer, H. et al., 1994. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*, 12(3), pp.529–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7512349> [Accessed November 6, 2013].
- Morissette, M., Le Saux, M. & Di Paolo, T., 2008. Effect of Oestrogen Receptor Alpha and Beta Agonists on

- Brain N -Methyl-d-Aspartate Receptors. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(8), pp.1006–1014. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2826.2008.01754.x> [Accessed May 8, 2012].
- Mukai, H. et al., 2010. Modulation of synaptic plasticity by brain estrogen in the hippocampus. *Biochimica et biophysica acta*, 1800(10), pp.1030–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19909788> [Accessed March 12, 2012].
- Mukai, H. et al., 2007. Rapid modulation of long-term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons. *Journal of Neurochemistry*, 100(4), pp.950–967. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-4159.2006.04264.x> [Accessed May 8, 2012].
- Mulkey, R.M. et al., 1994. Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature*, 369(6480), pp.486–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7515479> [Accessed October 24, 2013].
- Mulkey, R.M., Herron, C.E. & Malenka, R.C., 1993. An essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression. *Science (New York, N.Y.)*, 261(5124), pp.1051–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8394601> [Accessed October 24, 2013].
- Murakami, G. et al., 2006. Comparison between basal and apical dendritic spines in estrogen-induced rapid spinogenesis of CA1 principal neurons in the adult hippocampus. *Biochemical and biophysical research communications*, 351(2), pp.553–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17070772> [Accessed June 4, 2013].
- Nadel, L. & Hardt, O., 2011. Update on memory systems and processes. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 36(1), pp.251–73. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3055510&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 24, 2013].
- Naveh-Benjamin, M., 2000. Adult age differences in memory performance: tests of an associative deficit hypothesis. *Journal of experimental psychology. Learning, memory, and cognition*, 26(5), pp.1170–87. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11009251> [Accessed November 6, 2013].
- Nicholls, R.E. et al., 2008. Transgenic mice lacking NMDAR-dependent LTD exhibit deficits in behavioral flexibility. *Neuron*, 58(1), pp.104–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18400167> [Accessed May 21, 2013].
- Nicoll, R.A. & Malenka, R.C., 1999. Expression mechanisms underlying NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 868, pp.515–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10414328> [Accessed October 24, 2013].
- Nirmala, P.B. & Thampan, R. V, 1995. Ubiquitination of the rat uterine estrogen receptor: dependence on estradiol. *Biochemical and biophysical research communications*, 213(1), pp.24–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7639742> [Accessed October 24, 2013].
- Nodé-Langlois, R., Muller, D. & Boda, B., 2006. Sequential implication of the mental retardation proteins ARHGEF6 and PAK3 in spine morphogenesis. *Journal of cell science*, 119(Pt 23), pp.4986–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17105769> [Accessed October 29, 2013].
- Noguchi, J. et al., 2005. Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca²⁺ signaling in dendrites. *Neuron*, 46(4), pp.609–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15944129> [Accessed October 21, 2013].
- Norris, C.M., Korol, D.L. & Foster, T.C., 1996. Increased susceptibility to induction of long-term depression and long-term potentiation reversal during aging. *The Journal of neuroscience : the official journal of*

- the Society for Neuroscience*, 16(17), pp.5382–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8757251>.
- Nyberg, L. et al., 2012. Memory aging and brain maintenance. *Trends in cognitive sciences*, 16(5), pp.292–305. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22542563> [Accessed October 31, 2013].
- Ogiue-Ikeda, M. et al., 2008. Rapid modulation of synaptic plasticity by estrogens as well as endocrine disrupters in hippocampal neurons. *Brain research reviews*, 57(2), pp.363–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17822775> [Accessed March 31, 2012].
- Olariu, A., Cleaver, K.M. & Cameron, H.A., 2007. Decreased neurogenesis in aged rats results from loss of granule cell precursors without lengthening of the cell cycle. *The Journal of Comparative Neurology*, 501(4), pp.659–667. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17278139> [Accessed February 16, 2016].
- Packard, M.G. & Teather, L. a, 1997. Posttraining estradiol injections enhance memory in ovariectomized rats: cholinergic blockade and synergism. *Neurobiology of learning and memory*, 68(2), pp.172–88. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9322259>.
- Pedram, A., Razandi, M. & Levin, E.R., 2006. Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 20(9), pp.1996–2009. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16645038> [Accessed May 27, 2013].
- Petralia, R.S., Wang, Y.X. & Wenthold, R.J., 1994. The NMDA receptor subunits NR2A and NR2B show histological and ultrastructural localization patterns similar to those of NR1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 14(10), pp.6102–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7931566> [Accessed November 6, 2013].
- Petralia, R.S. & Wenthold, R.J., 1999. Immunocytochemistry of NMDA receptors. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 128, pp.73–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10320974> [Accessed November 6, 2013].
- Phan, A. et al., 2011. Rapid effects of estrogen receptor α and β selective agonists on learning and dendritic spines in female mice. *Endocrinology*, 152(4), pp.1492–502. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21285321> [Accessed June 4, 2013].
- Piekema, C. et al., 2010. Dissociating the neural correlates of intra-item and inter-item working-memory binding. *PloS one*, 5(4), p.e10214. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2856674&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 6, 2013].
- Piekema, C. et al., 2009. The hippocampus supports encoding of between-domain associations within working memory. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 16(4), pp.231–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19304893> [Accessed November 6, 2013].
- Pinheiro, P. & Mulle, C., 2006. Kainate receptors. *Cell and tissue research*, 326(2), pp.457–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16847640> [Accessed November 6, 2013].
- Piolino, P. et al., 2002. Episodic and semantic remote autobiographical memory in ageing. *Memory (Hove, England)*, 10(4), pp.239–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12097209> [Accessed November 6, 2013].
- Pleil, K.E., Glenn, M.J. & Williams, C.L., 2011. Estradiol alters Fos-immunoreactivity in the hippocampus and dorsal striatum during place and response learning in middle-aged but not young adult female rats. *Endocrinology*, 152(3), pp.946–56. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3040062&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

e=abstract [Accessed October 23, 2013].

- Pompili, A. et al., 2010. Working and reference memory across the estrous cycle of rat: a long-term study in gonadally intact females. *Behavioural brain research*, 213(1), pp.10–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20416343> [Accessed January 15, 2014].
- Pompili, A., Arnone, B. & Gasbarri, A., 2012. Estrogens and memory in physiological and neuropathological conditions. *Psychoneuroendocrinology*, 37(9), pp.1379–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22309827> [Accessed May 24, 2013].
- Rajah, M.N. & D’Esposito, M., 2005. Region-specific changes in prefrontal function with age: a review of PET and fMRI studies on working and episodic memory. *Brain : a journal of neurology*, 128(Pt 9), pp.1964–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16049041> [Accessed November 4, 2013].
- Ranganath, C. & Ritchey, M., 2012. Two cortical systems for memory-guided behaviour. *Nature reviews. Neuroscience*, 13(10), pp.713–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22992647> [Accessed November 1, 2013].
- Rao, M.S. et al., 2005. Newly born cells in the ageing dentate gyrus display normal migration, survival and neuronal fate choice but endure retarded early maturation. *The European journal of neuroscience*, 21(2), pp.464–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15673445> [Accessed January 31, 2016].
- Rao, M.S., Hattiangady, B. & Shetty, A.K., 2006. The window and mechanisms of major age-related decline in the production of new neurons within the dentate gyrus of the hippocampus. *Aging cell*, 5(6), pp.545–58. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17129216> [Accessed January 31, 2016].
- Rapp, S.R. et al., 2003. Effect of estrogen plus progestin on global cognitive function in postmenopausal women: the Women’s Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 289(20), pp.2663–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12771113> [Accessed October 23, 2013].
- Repovs, G. & Baddeley, A., 2006. The multi-component model of working memory: explorations in experimental cognitive psychology. *Neuroscience*, 139(1), pp.5–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16517088> [Accessed November 6, 2013].
- Resnick, S.M. et al., 2006. Effects of combination estrogen plus progestin hormone treatment on cognition and affect. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 91(5), pp.1802–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16522699> [Accessed October 23, 2013].
- Revankar, C.M. et al., 2005. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5715), pp.1625–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15705806> [Accessed March 24, 2014].
- Rhodes, M.E. & Frye, C.A., 2006. ERbeta-selective SERMs produce mnemonic-enhancing effects in the inhibitory avoidance and water maze tasks. *Neurobiology of learning and memory*, 85(2), pp.183–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16326119> [Accessed November 2, 2013].
- Robillard, J.M. et al., 2011. Glutathione restores the mechanism of synaptic plasticity in aged mice to that of the adult. *PloS one*, 6(5), p.e20676. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3105108&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 4, 2013].
- Rolls, E.T., 2013. The mechanisms for pattern completion and pattern separation in the hippocampus.

- Frontiers in systems neuroscience*, 7, p.74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24198767> [Accessed November 8, 2013].
- Rolls, E.T. & Kesner, R.P., 2006. A computational theory of hippocampal function, and empirical tests of the theory. *Progress in neurobiology*, 79(1), pp.1–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16781044> [Accessed November 6, 2013].
- Rudick, C.N., Gibbs, R.B. & Woolley, C.S., 2003. A role for the basal forebrain cholinergic system in estrogen-induced disinhibition of hippocampal pyramidal cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(11), pp.4479–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12805288> [Accessed November 6, 2013].
- Sandstrom, N.J. & Williams, C.L., 2004. Spatial memory retention is enhanced by acute and continuous estradiol replacement. *Hormones and behavior*, 45(2), pp.128–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15019800> [Accessed October 22, 2013].
- Saxe, M.D. et al., 2007. Paradoxical influence of hippocampal neurogenesis on working memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(11), pp.4642–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1810330&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Scharfman, H.E. & MacLusky, N.J., 2006. The influence of gonadal hormones on neuronal excitability, seizures, and epilepsy in the female. *Epilepsia*, 47(9), pp.1423–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1694802> [Accessed September 10, 2013].
- Schon, K. et al., 2009. Greater working memory load results in greater medial temporal activity at retrieval. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 19(11), pp.2561–71. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2758675&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 6, 2013].
- Segal, M., 2005. Dendritic spines and long-term plasticity. *Nature reviews. Neuroscience*, 6(4), pp.277–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15803159> [Accessed May 21, 2013].
- Sharrow, K.M., Kumar, A. & Foster, T.C., 2002. Calcineurin as a potential contributor in estradiol regulation of hippocampal synaptic function. *Neuroscience*, 113(1), pp.89–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12123687>.
- Shaywitz, S.E. et al., 1999. Effect of estrogen on brain activation patterns in postmenopausal women during working memory tasks. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 281(13), pp.1197–202. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10199429> [Accessed November 6, 2013].
- Sherwin, B.B., 2003. Estrogen and Cognitive Functioning in Women. *Endocrine Reviews*, 24(2), pp.133–151. Available at: <http://edrv.endojournals.org/cgi/doi/10.1210/er.2001-0016> [Accessed October 23, 2013].
- Sherwin, B.B., 1988. Estrogen and/or androgen replacement therapy and cognitive functioning in surgically menopausal women. *Psychoneuroendocrinology*, 13(4), pp.345–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3067252>.
- Shi, S. et al., 2001. Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons. *Cell*, 105(3), pp.331–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11348590> [Accessed November 6, 2013].
- Shiroma, S., Yamaguchi, T. & Kometani, K., 2005. Effects of 17beta-estradiol on chemically induced long-

- term depression. *Neuropharmacology*, 49(1), pp.97–102. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15992584> [Accessed June 13, 2012].
- Shughrue, P.J., Lane, M. V & Merchenthaler, I., 1997. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. , 525(August), pp.507–525.
- Shumaker, S.A. et al., 2004. Conjugated equine estrogens and incidence of probable dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: Women's Health Initiative Memory Study. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 291(24), pp.2947–58. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15213206> [Accessed October 23, 2013].
- Shumaker, S.A. et al., 2003. Estrogen plus progestin and the incidence of dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 289(20), pp.2651–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12771112> [Accessed October 23, 2013].
- Smith, C.C. et al., 2010. Duration of estrogen deprivation, not chronological age, prevents estrogen's ability to enhance hippocampal synaptic physiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(45), pp.19543–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2984203&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 16, 2016].
- Smith, C.C., Vedder, L.C. & McMahon, L.L., 2009. Estradiol and the relationship between dendritic spines, NR2B containing NMDA receptors, and the magnitude of long-term potentiation at hippocampal CA3-CA1 synapses. *Psychoneuroendocrinology*, 34 Suppl 1(2008), pp.S130–42. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2796081&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 28, 2012].
- Spencer, J.L. et al., 2008. Uncovering the mechanisms of estrogen effects on hippocampal function. *Frontiers in neuroendocrinology*, 29(2), pp.219–237.
- Spencer-Segal, J.L. et al., 2012. Estradiol acts via estrogen receptors alpha and beta on pathways important for synaptic plasticity in the mouse hippocampal formation. *Neuroscience*, 202, pp.131–46. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3505616&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 27, 2013].
- Spritzer, M.D. & Galea, L.A.M., 2007. Testosterone and dihydrotestosterone, but not estradiol, enhance survival of new hippocampal neurons in adult male rats. *Developmental neurobiology*, 67(10), pp.1321–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17638384> [Accessed February 16, 2016].
- Squire, L.R., 1992. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological review*, 99(2), pp.195–231. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1594723> [Accessed November 7, 2013].
- Squire, L.R., 2004. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiology of learning and memory*, 82(3), pp.171–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15464402> [Accessed November 6, 2013].
- Squire, L.R., Cohen, N.J. & Zouounis, J.A., 1984. Preserved memory in retrograde amnesia: sparing of a recently acquired skill. *Neuropsychologia*, 22(2), pp.145–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6728178> [Accessed November 7, 2013].
- Squire, L.R., Knowlton, B. & Musen, G., 1993. The structure and organization of memory. *Annual review of*

- psychology*, 44, pp.453–95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8434894>.
- Squire, L.R. & Zola, S.M., 1998. Episodic memory, semantic memory, and amnesia. *Hippocampus*, 8(3), pp.205–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9662135> [Accessed November 6, 2013].
- Squire, L.R. & Zola, S.M., 1996. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24), pp.13515–22. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=33639&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 6, 2013].
- Stanton, P.K., 1996. LTD, LTP, and the sliding threshold for long-term synaptic plasticity. *Hippocampus*, 6(1), pp.35–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8878740> [Accessed October 24, 2013].
- Stark, S.M., Yassa, M. a & Stark, C.E.L., 2010. Individual differences in spatial pattern separation performance associated with healthy aging in humans. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 17(6), pp.284–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2884287&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 11, 2013].
- Stevens, M.C., Calhoun, V.D. & Kiehl, K.A., 2005. fMRI in an oddball task: effects of target-to-target interval. *Psychophysiology*, 42(6), pp.636–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16364059> [Accessed November 6, 2013].
- Stocca, G. & Vicini, S., 1998. Increased contribution of NR2A subunit to synaptic NMDA receptors in developing rat cortical neurons. *The Journal of physiology*, 507 (Pt 1(1998), pp.13–24. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2230772&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Szego, E.M. et al., 2006. Estrogen induces estrogen receptor alpha-dependent cAMP response element-binding protein phosphorylation via mitogen activated protein kinase pathway in basal forebrain cholinergic neurons in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(15), pp.4104–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16611827> [Accessed September 5, 2013].
- Tanapat, P. et al., 1999. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(14), pp.5792–801. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10407020> [Accessed October 19, 2015].
- Tanapat, P., Hastings, N.B. & Gould, E., 2005. Ovarian steroids influence cell proliferation in the dentate gyrus of the adult female rat in a dose- and time-dependent manner. *The Journal of comparative neurology*, 481(3), pp.252–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15593136> [Accessed January 20, 2016].
- Tang, Y.P. et al., 1999. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature*, 401(6748), pp.63–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10485705>.
- Terasawa, E. & Timiras, P.S., 1968. Electrical activity during the estrous cycle of the rat: cyclic changes in limbic structures. *Endocrinology*, 83(2), pp.207–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4874282> [Accessed September 9, 2013].
- Teyler, T.J. et al., 1980. Gonadal steroids: effects on excitability of hippocampal pyramidal cells. *Science*

- (New York, N.Y.), 209(4460), pp.1017–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7190730> [Accessed September 10, 2013].
- Teyler, T.J. et al., 1994. Multideterminant role of calcium in hippocampal synaptic plasticity. *Hippocampus*, 4(6), pp.623–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7704107> [Accessed November 6, 2013].
- Thakur, M.K. & Sharma, P.K., 2006. Aging of brain: role of estrogen. *Neurochemical research*, 31(11), pp.1389–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17061165> [Accessed October 24, 2013].
- Toft & Gorski, 1966. A RECEPTOR MOLECULE FOR ESTROGENS: ISOLATION FROM THE RAT UTERUS AND PRELIMINARY CHARACTERIZATION. *PNAS*, 1148(1963), pp.1574–1581.
- Toran-Allerand, C.D., 2004. Minireview: A plethora of estrogen receptors in the brain: where will it end? *Endocrinology*, 145(3), pp.1069–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14670986> [Accessed June 4, 2013].
- Touzani, K., Marighetto, A. & Jaffard, R., 2003. Fos imaging reveals ageing-related changes in hippocampal response to radial maze discrimination testing in mice. *European Journal of Neuroscience*, 17(3), pp.628–640. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1460-9568.2003.02464.x> [Accessed May 24, 2013].
- Tovar, K.R. & Westbrook, G.L., 1999. The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(10), pp.4180–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10234045>.
- Towart, L.A. et al., 2003. Subcellular relationships between cholinergic terminals and estrogen receptor-alpha in the dorsal hippocampus. *The Journal of comparative neurology*, 463(4), pp.390–401. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12836175> [Accessed August 28, 2013].
- Tsumoto, T., 1993. Long-term depression in cerebral cortex: a possible substrate of “forgetting” that should not be forgotten. *Neuroscience research*, 16(4), pp.263–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8394553> [Accessed November 12, 2013].
- Tulving, E., 2002. Episodic memory: from mind to brain. *Annual review of psychology*, 53, pp.1–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11752477> [Accessed November 6, 2013].
- Tulving, E., 1984. How Many Memory Systems Are There ? , pp.385–398.
- Vermeulen, A. et al., 1991. Hormonal effects of a 5 alpha-reductase inhibitor (finasteride) on hormonal levels in normal men and in patients with benign prostatic hyperplasia. *European urology*, 20 Suppl 1, pp.82–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1722168> [Accessed November 6, 2013].
- Vouimba, R.M. et al., 2000. 17Beta-Estradiol Suppresses Expression of Long-Term Depression in Aged Rats. *Brain research bulletin*, 53(6), pp.783–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11179843>.
- Wallenstein, G. V, Eichenbaum, H. & Hasselmo, M.E., 1998. The hippocampus as an associator of discontiguous events. *Trends in neurosciences*, 21(8), pp.317–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9720595>.
- Warren, S.G. et al., 1995. LTP varies across the estrous cycle: enhanced synaptic plasticity in proestrus rats. *Brain research*, 703(1-2), pp.26–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8719612> [Accessed September 10, 2013].

- Warren, S.G. & Juraska, J.M., 1997. Spatial and nonspatial learning across the rat estrous cycle. *Behavioral neuroscience*, 111(2), pp.259–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9106666> [Accessed January 15, 2014].
- Watkins, J.C. & Evans, R.H., 1981. Excitatory amino acid transmitters. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 21, pp.165–204. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6112965> [Accessed November 6, 2013].
- Weiland, N.G., 1992. Estradiol selectively regulates agonist binding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor complex in the CA1 region of the hippocampus. *Endocrinology*, 131(2), pp.662–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1353442> [Accessed November 6, 2013].
- White, N.M. & McDonald, R.J., 2002. Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiology of learning and memory*, 77(2), pp.125–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11848717> [Accessed November 6, 2013].
- Whitlock, J.R. et al., 2006. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5790), pp.1093–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16931756> [Accessed May 24, 2013].
- Wise, P.M. et al., 2001. Estradiol is a protective factor in the adult and aging brain: understanding of mechanisms derived from in vivo and in vitro studies. *Brain research. Brain research reviews*, 37(1–3), pp.313–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11744096>.
- Wójtowicz, T. & Mozrzymas, J.W., 2010. Estradiol and GABAergic transmission in the hippocampus. *Vitamins and hormones*, 82(10), pp.279–300. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20472144> [Accessed June 13, 2012].
- Wong, M. & Moss, L., 1992. Long-term and Short-term on the Synaptic Properties Electrophysiological Effects of Estrogen of Hippocampal CA1 Neurons. , 12(August).
- Woolley, C. & Mcewen, B., 1992. Estradiol Mediates during the Estrous Fluctuation in Hippocampal Cycle in the Adult Rat Synapse Density. , 12(July).
- Woolley, C.S. et al., 1997. Estradiol increases the sensitivity of hippocampal CA1 pyramidal cells to NMDA receptor-mediated synaptic input: correlation with dendritic spine density. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(5), pp.1848–59. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9030643>.
- Woolley & Mcewen, B.S., 1994. Estradiol Regulates Hippocampal Dendritic Spine Density via an Mechanism. , 74(December).
- Woolley, S. & Mcewen, S., 1990. Naturally Occurring Fluctuation in Dendritic Hippocampal Pyramidal Neurons Spine Density on Adult. , (December).
- Xu, X. & Zhang, Z., 2006. Effects of estradiol benzoate on learning-memory behavior and synaptic structure in ovariectomized mice. *Life sciences*, 79(16), pp.1553–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16750837> [Accessed October 24, 2013].
- Yang, S.-H. et al., 2003. The use of estrogens and related compounds in the treatment of damage from cerebral ischemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1007, pp.101–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14993044> [Accessed November 6, 2013].
- Yang, S.N., Tang, Y.G. & Zucker, R.S., 1999. Selective induction of LTP and LTD by postsynaptic [Ca²⁺]_i elevation. *Journal of neurophysiology*, 81(2), pp.781–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10036277> [Accessed November 6, 2013].

- Yashiro, K. & Philpot, B.D., 2008. Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology*, 55(7), pp.1081–94. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2590778&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 6, 2013].
- Zacks, Hasher & Li, 1999. Human memory. In *The Handbook of Aging and Cognition*. pp. 200–230.
- Zamani, M.R., Desmond, N.L. & Levy, W.B., 2000. Estradiol modulates long-term synaptic depression in female rat hippocampus. *Journal of neurophysiology*, 84(4), pp.1800–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11024072>.
- Zar, J., 1999. *Biostatistical Analysis*,
- Zeidan, M. a et al., 2011. Estradiol modulates medial prefrontal cortex and amygdala activity during fear extinction in women and female rats. *Biological psychiatry*, 70(10), pp.920–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3197763&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 30, 2013].
- Zhang, Z. et al., 2010. Progesterone promotes the survival of newborn neurons in the dentate gyrus of adult male mice. *Hippocampus*, 20(3), pp.402–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19475650> [Accessed February 16, 2016].
- Zhao, L. et al., 2005. 17beta-estradiol induces Ca²⁺ influx, dendritic and nuclear Ca²⁺ rise and subsequent cyclic AMP response element-binding protein activation in hippocampal neurons: a potential initiation mechanism for estrogen neurotrophism. *Neuroscience*, 132(2), pp.299–311. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15802184> [Accessed October 22, 2013].
- Zhou, Q., Homma, K.J. & Poo, M., 2004. Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron*, 44(5), pp.749–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15572107>.
- Zurkovsky, L., Brown, S.L. & Korol, D.L., 2006. Estrogen modulates place learning through estrogen receptors in the hippocampus. *Neurobiology of learning and memory*, 86(3), pp.336–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16979357> [Accessed November 6, 2013].