



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG



ÉCOLE DOCTORALE Vie et Santé (ED 414)

Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives (UMR 7364)

THÈSE présentée par :

Jean-Bastien BOTT

Soutenu le : 26 septembre 2014

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Biologie/Neurosciences

**REORGANISATIONS SYNAPTIQUES DANS
L'HIPPOCAMPE ET RECUPERATION FONCTIONNELLE
APRES LESION DU CORTEX ENTORHINAL ;
EFFETS DE L'ALLELE *APOE4*, DU
BOURGEONNEMENT CHOLINERGIQUE ET DE LA
REINNERVATION GLUTAMATERGIQUE.**

THÈSE dirigée par :

Mme. MATHIS Chantal

docteur, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. MASKOS Uwe

docteur, institut Pasteur (Paris)

M. SAVE Etienne

docteur, université de Provence

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. BAILLY Yannick

docteur, université de Strasbourg

Remerciements

En premier lieu, je souhaite remercier ma directrice de thèse, le docteur Chantal Mathis. En effet, elle a su soutenir au cours de ces quatre années ma passion pour les neurosciences de par son écoute, ses réflexions scientifiques et son expertise du comportement animal. Chantal, je te suis sincèrement reconnaissant pour ton encadrement aboutis mêlant sagement autonomie élargie et interventionnisme adapté... C'est avant tout grâce à toi qu'aujourd'hui je poursuis mon aventure de jeune chercheur avec la passion du comportement profondément ancrée en moi.

Dans la même veine, je souhaite également remercier chaudement le docteur Romain Goutagny. En effet, dès son arrivée au laboratoire au milieu de ma thèse, il m'a immédiatement communiqué sa passion pour l'électrophysiologie et son enthousiasme scientifique à toute épreuve. Romain, au-delà de l'électrophysiologie et de Matlab, nos multiples discussions m'ont appris à structurer mes pensées et à mieux cerner notre communauté scientifique... C'est maintenant à moi de suivre tes traces chez Sylvain, en espérant que cela se passera aussi bien que pour toi !

Je remercie le Doyen de la faculté de psychologie et ancien directeur du laboratoire, le docteur Christian Kelche, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire ainsi que pour son soutien durant la rédaction de cette thèse (encore désolé pour le mal de tête orthographique et grammatical...).

Je remercie également l'actuel directeur du laboratoire, le professeur Jean-Christophe Cassel pour son dynamisme son entrain et sa passion pour les neurosciences ainsi que pour son soutien sans faille et pour l'accueil très sympathique qu'il a accordé à Lorène durant cette dernière année de thèse.

Je remercie tout particulièrement les docteurs Uwe Maskos, Etienne Save, Yannick Bailly et Olivier Despres pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer ce travail de thèse et d'avoir enrichi le débat ayant suivi ma présentation.

Je suis extrêmement reconnaissant à Brigitte Cosquer, Karin Herbeaux (Geiger) et Carole Stritmatter ainsi qu'au docteur Céline Héraud pour leur indispensable aide technique, toujours accompagnée d'une bonne humeur à toute épreuve.

Je remercie également tous les étudiants qui m'ont aidé à accomplir ce travail : Julien Aubert, Sarah Bushman, Marie Munch, Maxime Sartori et Anne-Sophie Wilding.

Un grand merci également aux docteurs Alexandra Barbelivien et Monique Majchrzak pour m'avoir initié à l'enseignement, pour vos conseils précieux et nos discussions toujours intéressantes.

Je tiens particulièrement à remercier le docteur Pierre-Henri Moreau qui m'a précédé de quelques années et qui m'a communiqué son enthousiasme à toute épreuve. Merci pour toutes nos discussions scientifiques ou non, j'espère qu'on se recroisera souvent à l'avenir !

Un grand merci également aux docteurs Sarah Pol-Bodetto et Marc-Antoine Muller pour leurs soutiens et leurs aide précieuse durant mon stage de master 2 et tout au long de cette thèse.

Je tiens également à remercier les docteur Lucas Lecourtier et Pascal Romieu pour tout ce qu'ils m'ont appris sur leurs domaines de recherche respectifs et pour les excellents moments passés ensemble à l'intérieur comme hors du laboratoire.

Un grand merci également à tous les doctorants et anciens doctorants du laboratoire : Mohamad Ali, Raphaëlle Cassel, Snehajyoti Chatterjee, Thibault Cholvin, Mathieu Fontenau, Fanny Fuchs, Julien Gasser, Valentine Hamm, Michaël Lourreiro, Edouardo Marques, Victor Mathis, Romain Neidel et Nour Yacine, pour toutes nos discussions et pour tous ces bons moments passés avec vous.

Merci à tous les membres du laboratoire, Patrick Anglard, Anne Antony, Katia Befort, Olivier Bildstein, Aurélie Bombardier, Olivier Bousiges, Anne-Laurence Boutiller, Aurélia Ces, Jean-Bernard Dietrich, Daniel Egesi, Patrick Giré, Catherine Krieger, Anne Pereira de Vasconcelos et Jean Zwiller pour tous ces moments de partage et votre bonne humeur.

Enfin, j'ai une pensée émue pour le docteur Philippe Oberling avec qui j'ai partagé tant de discussions scientifiques et philosophiques passionnantes avant qu'il ne décline sous nos yeux impuissants et nous quitte trop tôt. Philippe, je te dédie cette thèse, merci pour votre amitié sincère.

Je remercie également tous mes amis hors labo qui m'ont permis de toujours garder le moral : notamment Anne-Julie, Aurélien, Cécile, Charles, Nico, John, Julien et Sam.

Un grand merci, enfin, mes parents et toute ma famille pour m'avoir soutenu durant toutes ces années et avoir su accepté, il faut le dire, mon comportement parfois un peu trop autistique ! Alain, Almut, Emilie, Evelyne, Eloise, Emmanuelle, Florian, Jacques, Joséphine, Saskia, Stéphane, Valentine, si mes mots sont parfois trop rares, sachez que mes pensées vous sont acquises.

Pour terminer en gardant le meilleur pour la fin, mes remerciements les plus forts vont à Lorène, qui malgré les épreuves que nous traversons garde toujours le moral et sais si bien me soutenir et m'aider efficacement. Lorène, je suis si fier de partager ta vie, sans toi je ne serais pas arrivé jusque-là, alors courage à toi et que nos rêves se réalisent !

SOMMAIRE

<u>INTRODUCTION GENERALE</u>	p.1
<u>CHAPITRE 1 : Apolipoprotéine E et démences de type Alzheimer.</u>	p.4
<u>I. Maladie d'Alzheimer ou Démences de types Alzheimer ?</u>	p.4
<u>1. Epidémiologie.</u>	p.5
<u>2. Facteurs génétiques.</u>	p.6
<u>2.1 Mutations familiales à forte pénétrance.</u>	p.6
<u>2.2 Polymorphismes du gène APOE.</u>	p.7
<u>2.3 Autres polymorphiques.</u>	p.7
<u>3. Facteurs environnementaux.</u>	p.8
<u>3.1 Réserve cérébrale.</u>	p.9
<u>3.2 Traumatismes crâniens.</u>	p.9
<u>3.3 Syndrome métabolique.</u>	p.10
<u>3.4 Infections latentes et inflammations chroniques.</u>	p.11
<u>3.5 Nutrition</u>	p.12
<u>4. Trajectoires cliniques, diagnostic et approches thérapeutiques</u>	p.12
<u>4.1 Phases cliniques</u>	p.13
<u>4.1.1 Phases précliniques</u>	p.14
<u>4.1.2 Troubles cognitifs légers ou MCI</u>	p.14
<u>4.1.3 La conversion vers la démence</u>	p.15
<u>4.2 Stratégies thérapeutiques</u>	p.16
<u>II. Pathogénèse</u>	p.17
<u>1. Protéinopathies</u>	p.17
<u>1.1 Amyloïdopathie</u>	p.18
<u>1.1.1 Physiologie de l'APP et de ses dérivés</u>	p.18
<u>1.1.2 L'amyloïdopathie</u>	p.20
<u>1.2 Tauopathie</u>	p.20
<u>1.2.1 Physiologie de la protéine tau</u>	p.21
<u>1.2.1. La Tauopathie</u>	p.22
<u>1.2.3 Protéinopathies ou mécanismes de défense ?</u>	p.23
<u>2. Altérations neuronales et synaptiques</u>	p.24
<u>2.1 Pertes dans la formation hippocampique</u>	p.24
<u>2.2 Pertes cholinergiques</u>	p.25
<u>III. L'Apolipoprotéine E</u>	p.26
<u>1. Génotype APOE et cognition</u>	p.26
<u>1.1 Isoformes de l'APOE</u>	p.26
<u>1.2 APOE4 et cognition, un exemple de pléiotropie antagoniste. ?</u>	p.28
<u>1.3 Effets cognitifs de l'APOE4 chez la souris transgénique</u>	p.30
<u>1.4 APOE4, atteintes cérébrales et des troubles cognitifs liées aux DTA</u>	p.31
<u>2. Une protéine pléiotropique</u>	p.32
<u>2.1 Régulation de l'expression de l'ApoE</u>	p.32
<u>2.2 Transport du cholestérol, synaptogénèse et remodelages dendritiques</u>	p.33
<u>2.3 ApoE et protéinopathies</u>	p.35
<u>2.3.1 ApoE et amyloïdopathie</u>	p.35

2.3.2 <i>ApoE et Tauopathie</i>	p.35
3. <i>APOE et neurodégénérescence</i>	p.36
<u>CHAPITRE 2 : mémoire, formation hippocampique et système cholinergique</u>	p.39
<u>I. Mémoire et formation hippocampique</u>	p.40
1. <u>Mémoire épisodique</u>	p.40
2. <u>Orientation et navigation spatiale</u>	p.41
2.1 <i>Représentations allocentriques de l'environnement</i>	p.42
2.2 <i>Représentations égocentriques de l'environnement</i>	p.42
2.3 <i>L'intégration des trajectoires</i>	p.43
2.4 <i>Navigation et comportements orientés vers un but</i>	p.44
2.5 <i>Navigation spatiale, DTA et cortex entorhinal</i>	p.44
3. <u>Mémoire de reconnaissance d'objets et de localisation d'objets</u>	p.45
4. <u>Mémoire olfactive</u>	p.46
<u>II. Neuroanatomie de la formation hippocampique</u>	p.47
1. <u>Cortex entorhinal</u>	p.49
1.1 <i>Anatomie</i>	p.49
1.2 <i>Activités unitaires</i>	p.51
2. <u>Hippocampe</u>	p.54
2.1 <i>Gyrus denté</i>	p.55
2.2 <i>CA3</i>	p.57
2.3 <i>CA2</i>	p.59
2.4 <i>CA1</i>	p.60
3. <u>Les réseaux de la formation hippocampique</u>	p.61
<u>III. Activités oscillatoires</u>	p.63
1. <u>Oscillations et mémoire</u>	p.63
1.1 <i>Thêta</i>	p.63
1.2 <i>Gamma</i>	p.67
1.3 <i>Couplage entre phase du thêta et amplitude du gamma</i>	p.69
2. <u>Oscillations et communication entre régions cérébrales</u>	p.71
<u>IV. Modulation cholinergique de la formation hippocampique</u>	p.74
1. <u>Anatomie du septum médian et de la bande diagonale de Broca (MSDB)</u>	p.74
1.1 <i>Organisation des projections vers la formation hippocampique</i>	p.75
1.2 <i>Récepteurs cholinergiques dans la formation hippocampique</i>	p.75
1.3 <i>Système cholinergiques septo-hippocampique et mémoire</i>	p.77
2. <u>Modulation de la formation hippocampique</u>	p.78
2.1 <i>Routage de l'information et shift encodage/récupération</i>	p.79
2.2 <i>Plasticité synaptique</i>	p.80
2.3 <i>Oscillations</i>	p.81
2.4 <i>Synthèse</i>	p.82
3. <u>Système cholinergique et DTA</u>	p.83
<u>CHAPITRE 3 : Le syndrome de déconnection hippocampique et sa compensation</u>	p.85

<u>I. Un syndrome de déconnexion progressive</u>	p.85
<u>1. Circuits et progression de la pathologie</u>	p.85
<u>1.1 Tauopathie</u>	p.85
<u>1.2 Amyloïdopathie</u>	p.87
<u>2. La déconnexion entorhino-hippocampique</u>	p.88
<u>2.1 L'atteinte du cortex entorhinal et de ses projections</u>	p.88
<u>2.2 Excitabilité aberrante et déconnexion hippocampique</u>	p.88
<u>2.3 Déconnexion et troubles cognitifs</u>	p.89
<u>II. Compensation de la déconnexion hippocampique</u>	p.91
<u>1. Compensation fonctionnelle de la déconnexion</u>	p.91
<u>1.1 Rémission cognitive, ApoE et réorganisation synaptiques</u>	p.91
<u>1.2 Lésion, désafférentation et bourgeonnement de collatérales</u>	p.93
<u>2. Bourgeonnement de collatérales cholinergiques</u>	p.95
<u>3. Réinnervation glutamatergique</u>	p.96
<u>III. APOE4 et déficit de compensation ?</u>	p.99
<u>1. APOE4 et déficit de bourgeonnement synaptique chez la Souris</u>	p.99
<u>2. Un déficit e bourgeonnement cholinergique chez les patients APOE4 ?</u>	p.99
<u>3. Bourgeonnement synaptique, ApoE et œstrogènes</u>	p.100
<u>OBJECTIFS DE LA THESE</u>	p.103
<u>MATERIELS ET METHODES</u>	p.105
<u>I. Animaux</u>	p.106
<u>1. Souris hAPP/APOE</u>	p.106
<u>2. Souris ChAT-ChR2</u>	p.107
<u>II. Chirurgie et électrophysiologie</u>	p.109
<u>1. Lésion du cortex entorhinal</u>	p.109
<u>2. Electrophysiologie et optogénétique sous anesthésie à l'uréthane</u>	p.110
<u>III. Comportement</u>	p.114
<u>1. Mesure de l'activité locomotrice</u>	p.114
<u>2. Evaluation de l'anxiété</u>	p.114
<u>3. Reconnaissance d'objets et localisation d'objets</u>	p.115
<u>4. Piscine de Morris</u>	p.117
<u>5. Labyrinthe de Barnes</u>	p.118
<u>IV. Histologie</u>	p.121
<u>1. Mise à mort et traitement des tissus</u>	p.121
<u>2. Mesure de l'étendue des lésions</u>	p.121
<u>3. Révélation de l'activité de l'acétylcholinestérase</u>	p.122
<u>4. Marquages immunohistochimiques</u>	p.123
<u>CONTRIBUTIONS EXPERIMENTALES</u>	p.125
<u>ETUDE N°1</u>	p.127

SOMMAIRE

<u>ETUDE N°2</u>	p.133
<u>ETUDE N°3</u>	p.151
<u>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u>	p.197
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	p.203
<u>ANNEXES</u>	p.259

LISTE DES ABREVIATIONS

Aβ	Peptide β -amyloïde
ABCA1	<i>ATP-binding cassette transporter 1</i> (génèse des lipoprotéines)
AChE	Acétylcholine estérase
AICD	domaine intracellulaire de l'Amyloïde
AMPA	<i>α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
APOE	Gène codant pour l'Apolipoprotéine E
ApoE	Apolipoprotéine E
APOE2	Gène codant pour l'allèle ϵ 2 de l'Apolipoprotéine E
APOE3	Gène codant pour l'allèle ϵ 3 de l'Apolipoprotéine E
APOE4	Gène codant pour l'allèle ϵ 4 de l'Apolipoprotéine E
APOER2	<i>apolipoprotein receptor type II</i>
APOH	Gène codant pour l'Apolipoprotéine H
APP	Protéine précurseur de l'amyloïde
ARN	Acide ribonucléique
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
C/A	Commissural et associatif
CA1	Corne d'Ammon 1 de l'hippocampe
CA2	Corne d'Ammon 2 de l'hippocampe
CA3	Corne d'Ammon 3 de l'hippocampe
CCK	<i>Cholecystokinin</i>
CdK	<i>Cyclin-dependant kinase</i>
ChAT	Choline acétyltransférase
ChR2	<i>Channel rhodopsine-2</i>
CR1	Complement receptor 1
CSF	<i>Current source density</i>
CSF	Liquide céphalo-rachidien
DG	Gyrus denté
DNM	<i>Default mode network</i>
DTA	Démences de type Alzheimer (ensemble hétérogène de pathologies multifactorielles)
DTI	imagerie de tenseur de diffusion
EC	Cortex entorhinal
EphB	<i>Ephrin receptors type A</i>
FDG-PET	tomographie par émission de positrons basée sur le fluorodésoxyglucose
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GSK3β	<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>
GRAN	couche des cellules granulaires du gyrus denté
HC	Hippocampe
HIV	Virus de l'immunodéficience humaine

LISTE DES ABREVIATIONS

iAChE	inhibiteur de l'Acétylcholine estérase
iLM	<i>inner lacunosum-moleculare</i>
IML	couche moléculaire interne du gyrus denté
Il-1	interleukine-1
Ip	intra-péritonéal
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
KPI	<i>Kunitz protease inhibitor</i>
LDLR	<i>Low density lipoprotein receptor</i>
LEC	Cortex entorhinal latéral
LFP	<i>Local field potential</i>
LM	<i>stratum lacunosum-moleculare</i>
LRP1	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 1</i>
LTD	Dépression à long terme
LTP	Potentialisation à long terme
mAChRs	récepteur cholinergique muscarinique
MA	Maladie d'Alzheimer (forme familiale précoce)
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCI	stade de troubles cognitifs légers
MEC	Cortex entorhinal médian
MML	couche moléculaire médiane du gyrus denté
MRI	Imagerie par résonance magnétique
MSDB	Septum médian et bande diagonale de Broca
nAChRs	récepteur cholinergique nicotinique
NCAM	<i>Neural Cell Adhesion Molecule</i>
NGF	Nerve growth factor
NINCDS-ADRA	<i>National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association</i> (critère diagnostiques)
NMDA	<i>N</i> -méthyl-D-aspartate
Notch1	<i>Notch homolog 1, translocation-associated</i>
NSE	<i>Neuron specific enolase</i>
OML	couche moléculaire externe du gyrus denté
oLM	<i>outer lacunosum-moleculare</i>
OR	<i>stratum oriens</i>
PER	cortex périrhinal
PAR	cortex parahippocampique
paraSUB	para-Subiculum
PARV	parvalbumine
PKA	<i>protein kinase A</i>
PKC	<i>protein kinase C</i>
POR	cortex postrhinal

LISTE DES ABREVIATIONS

PP1	<i>protein phosphatase 1</i>
PP2A	<i>protein phosphatase 2A</i>
PP2B	<i>protein phosphatase 2B</i>
preSUB	pré-Subiculum
<i>Prnp</i>	gène codant pour la protéine prion
p75^{NTR}	<i>p75 neurotrophin receptor</i>
PYR	<i>stratum pyramidale</i>
RAD	<i>stratum radiatum</i>
sAPP	fragments sécrétés de l'APP
SL	<i>stratum lucidum</i>
SorLA	<i>sortilin-related receptor</i>
STD	Depression à court terme
SUB	Subiculum
SWR	<i>Sharp-waves ripples</i>
TDP-43	<i>TAR DNA-binding protein 43</i>
TGF1β	<i>Transforming growth factor beta 1</i>
Tr	<i>targeted-replacement</i> (souris transgéniques)
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
VACHT	transporteur vésiculaire de l'acétylcholine
VDB	bras vertical de la bande diagonale de Broca
VGAT	transporteur vésiculaire du GABA
VGLUT1	transporteur vésiculaire de type 1 du glutamate
VGLUT2	transporteur vésiculaire de type 2 du glutamate
YAC	<i>Yeast artificial chromosome</i>

Introduction générale

The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not 'Eureka!' but 'That's funny...' Isaac Asimov (1920-1992).

Introduction générale

Les démences de type Alzheimer sont des pathologies neurodégénératives influencées par l'interaction entre de multiples facteurs de risques génétiques et environnementaux.

Généralement, la pathogénèse de ces démences est expliquée principalement par l'accumulation de peptides β -amyloïdes et de protéines tau hyperphosphorylées. Cependant, ces protéinopathies pourraient également représenter des mécanismes de défense face à l'accumulation de lésions et autres dysfonctionnements neuronaux. En effet, il semblerait que les pertes synaptiques et neuronales joueraient un rôle prépondérant dans l'apparition des déficits cognitifs. Le génotype *APOE4* est le plus puissant facteur de risque génétique pour les démences de type Alzheimer et il induirait ces effets délétères notamment au cours des phases précoces de la pathologie. Cependant, il faut remarquer que l'*APOE4* influence le risque de développer de nombreuses autres pathologies neurodégénératives. Cet effet non-spécifique suggère que l'*APOE4* pourrait en fait induire une moindre capacité de résistance à l'avancée des pathologies neurodégénératives en général et aux démences de type Alzheimer en particulier.

Durant les phases précoces des démences de type Alzheimer, c'est essentiellement la mémoire épisodique qui est touchée. Ces déficits spécifiques s'expliqueraient notamment par l'atteinte des structures du lobe temporal médian et notamment de la formation hippocampique et des structures qui la composent (hippocampe, subiculum, pré-subiculum, para-subiculum, cortex entorhinal, cortex périrhinal, cortex postrhinal). En effet, en plus de déficits en mémoire épisodique, les patients présentent également précocement des altérations d'autres fonctions dépendantes de la formation hippocampique tel que l'orientation et la navigation spatiale, la mémoire de reconnaissance et de localisation d'objet ainsi que la mémoire olfactive. Or, ces formes de mémoire ont un fort potentiel diagnostique et translationnel étant directement mesurables dans les modèles animaux et chez les patients par des approches comparables. Il apparaît donc que durant les phases précoces des démences de types Alzheimer, les réseaux de la formation hippocampiques sont largement perturbés. Or, l'activité de ces réseaux serait finement régulée par la présence d'activités oscillatoires et par des systèmes neuromodulateurs comme le système cholinergique. La perturbation de ces divers mécanismes de régulation des réseaux pourrait être impliquée dans la progression de la pathologie.

L'atteinte très précoce du cortex entorhinal induirait une déconnexion partielle de l'hippocampe qui serait responsable de l'apparition des troubles cognitifs. Cependant, divers arguments suggèrent que l'hippocampe pourrait s'adapter à cette déconnexion *via* la mobilisation de mécanismes compensatoires. En effet, le bourgeonnement de collatérales cholinergique dans l'hippocampe pourrait compenser la déconnexion hippocampique induite par la perte de neurones entorhinaux, bien que cela n'ait jamais été expérimentalement démontré. De plus, les projections entorhinales survivantes innervant l'hippocampe pourraient également présenter un bourgeonnement de collatérales pouvant potentiellement induire une réinnervation homotypique de l'hippocampe. Comme ces deux phénomènes ont lieu en parallèle, il est possible qu'ils interagissent de façon synergétique pour compenser la déconnexion hippocampique. Cependant, il faut noter que leurs implication respective dans la compensation de la déconnexion restent mal connues, de même que leurs décours temporel et leurs étendues exactes à travers les différentes sous-régions hippocampiques. De manière intéressante, l'*APOE4* pourrait induire des déficits de bourgeonnement cholinergiques et glutamatergiques, et ainsi perturber la réorganisation compensatrice des circuits hippocampiques. De telles altérations des mécanismes compensatoires pourraient d'ailleurs contribuer directement aux effets négatifs de cet allèle sur la progression des démences de type Alzheimer et, plus largement, de nombreuses autres pathologies neurodégénératives.

Ainsi, au cours de cette thèse, je me suis particulièrement intéressé aux effets de l'allèle *APOE4* sur la récupération fonctionnelle après lésion entorhinale. J'ai également cherché à déterminer les contributions respectives des bourgeonnements glutamatergiques et cholinergiques à cette récupération fonctionnelle. Afin de détailler le cadre conceptuel dans lequel ce travail s'intègre, cette thèse débute par une revue de la bibliographie concernant (i) les démences de type Alzheimer et l'ApoE (chapitre 1), (ii) les formes de mémoire impliquant la formation hippocampique et pouvant être perturbés précocement dans les démences de types Alzheimer (chapitre 2) et enfin (iii) le syndrome de déconnexion hippocampique, sa compensation et l'influence de l'*APOE4* sur ces phénomènes (chapitre 3).

Apolipoprotéine E et démences de type Alzheimer.

I. Maladie d'Alzheimer ou Démences de type Alzheimer ?

En 1907, le médecin bavarois Alois Alzheimer décrivait un cas de démence à prédominance langagière et émotionnelle (anxiété et paranoïa) chez une femme âgée de 45 ans. Alzheimer proposa que la cause de cette démence réside dans l'accumulation de fibrilles intra-neuronales et de plaques amyloïdes dans le parenchyme cérébral. La même année, des plaques amyloïdes similaires avaient été décrites dans le cadre de démences séniles par le médecin tchèque Oskar Fisher. A l'époque, une forte rivalité existait entre l'école de Prague (Fisher, Pick etc.) et l'école munichoise à laquelle appartenait Alzheimer. Cette rivalité a probablement amené Emile Kraepelin, l'un des membres les plus influents de l'école munichoise à utiliser le terme de maladie d'Alzheimer dès 1910 après la description de moins de 10 patients pour définir l'état de démence présénile associée à des plaques amyloïdes et des fibrilles intra-neuronales comme une entité pathologique originale ([Berchtold & Cotman 1998](#)).

Cette distinction resta en vigueur jusqu'au milieu des années 1970, les démences à dominante mnésique se développant au-delà de 65 ans étant alors considérées comme des démences séniles ([Boller & Forbes 1998](#)). Cependant, au milieu des années 1970, l'essor de la biologie moléculaire mit en exergue le fait que maladie d'Alzheimer et démence sénile ont les mêmes caractéristiques neuropathologiques : les plaques amyloïdes et les dégénérescences neuro-fibrillaires. Ainsi, progressivement un nouveau paradigme s'imposa, regroupant démence sénile et maladie d'Alzheimer au sein d'une entité pathologique unique avec une hypothèse étiologique dominante centrée sur l'accumulation pathologique de peptide β -amyloïde ([Hyman 1996](#)).

Selon cette définition, la maladie d'Alzheimer (MA) représenterait la principale cause de démence dans le monde (au minimum 15 millions de patients). Pourtant, malgré des années de recherche intensive, l'étiologie de cette pathologie incurable reste discutée et les tentatives de traitement centrées sur le peptide β -amyloïde ont échoué. De plus, la population « Alzheimer » est caractérisée par une forte hétérogénéité histopathologique et clinique. Ainsi, il est possible qu'on ait en fait regroupé par erreur différentes pathologies partageant certaines manifestations cliniques (démences progressives) et neuropathologiques (plaques amyloïdes et dégénérescences neuro-fibrillaires).

En effet, on peut en premier lieu différencier une forme sporadique de la maladie d'Alzheimer (de 95 à 99% des patients) d'une forme familiale (de 1 à 5% des patients). De plus, la forme sporadique de la maladie d'Alzheimer est elle-même fortement hétérogène d'un point de vue génétique, clinique et histopathologique ([Duckaerts et al. 2009](#) ; [Jellinger 2011](#)). Partant du principe que la définition actuelle de la maladie d'Alzheimer regroupe différentes pathologies, je préfère parler dans le cadre de cette thèse de démences de type Alzheimer (DTA) pour définir un ensemble de pathologies neurodégénératives ayant comme point commun la présence de plaques amyloïdes et de dégénérescences neuro-fibrillaires et qui seraient causées par les interactions complexes entre vieillissement et divers facteurs de susceptibilité génétique et environnementaux.

I.1. Épidémiologie

Les DTA regrouperaient environ 60 à 70% des cas de démences. Si leur prévalence est actuellement la plus forte dans les pays riches, plus de la moitié des patients vivent en fait dans des pays en développement où la disponibilité des soins est souvent problématique. Le vieillissement est le principal facteur de risque pour les DTA. Ainsi, elles ont une prévalence d'environ 1% à 60 ans qui augmente ensuite exponentiellement pour atteindre 5% à 70 ans, puis 24-33% à l'âge de 85 ans ([Alzheimer's Association 2010](#)), l'incidence augmentant surtout durant les 7^e et 8^e décennies de la vie. Ainsi, avec le vieillissement de la population à l'échelle mondiale, les projections estiment que le nombre de patients déments devrait passer de 24 millions en 2001 à 81 millions en 2040, ce qui implique une multiplication par 2 à 4 de la proportion de la population affectée selon la région du monde considérée ([tableau 1](#)).

Tableau 1 : Prévalence et incidence de la démence dans le monde en 2001.
(D'après [Ferri et al. 2005](#)).

Région du monde	Prévalence de la démence au-delà de 60 ans (%)	Incidence annuelle de démence (pour 1000 individus)	Personnes démentes de plus de 60 ans en 2001	Estimation de l'augmentation de la proportion de démences de 2001 à 2040 (%)
Europe occidentale	5.4	8.8	4 900 000	102
Europe orientale (faible mortalité adulte)	3.8	7.7	1 000 000	169
Europe orientale (forte mortalité adulte)	3.9	8.1	1 800 000	84
Amérique du Nord	6.4	10.5	3 400 000	172
Amérique latine	4.6	9.2	1 800 000	393
Afrique du nord et moyen orient	3.6	7.6	1 000 000	385
Pays développé du Pacifique	4.3	7	1 500 000	189
Chine et pays en développement d'Asie de l'est	4	8	6 000 000	336
Indonésie, Thaïlande et Sri Lanka	2.7	5.9	600 000	325
Inde et Asie du Sud	1.9	4.3	1 800 000	314
Afrique	1.6	3.5	500 000	235
Ensemble	3.9	7.5	24 300 000	234

Le vieillissement étant le principal facteur de risque pour les DTA, il est envisageable que des facteurs non-spécifiques liés au vieillissement, comme par exemple le stress oxydatif ou encore les perturbations hormonales induites par la ménopause, pourraient jouer un rôle dans la mise en place des DTA. De plus, les protéinopathies caractéristiques des DTA (plaques amyloïdes constituées de peptide β -amyloïde et dégénérescences neuro-fibrillaires constituées de protéine tau hyper-phosphorylée) semblent être associées avec le vieillissement ([Arriagada et al. 1992](#)). Cependant, il apparaît également que tous les individus vieillissant ne présentent pas nécessairement de DTA et certains sujets restent même asymptomatiques malgré la présence d'une neuropathologie DTA très avancée ([Rowe et al. 2010](#) ; [Monsell et al. 2013](#) ;

Negash et al. 2013 ; Iacono et al. 2014). Ainsi, au-delà du vieillissement, d'autres facteurs semblent nécessaires pour induire la mise en place d'une DTA.

I.2. Facteurs Génétiques

L'héritabilité des DTA serait particulièrement importante, un individu avec un parent affecté ayant environ deux fois plus de risque de développer une DTA. Ainsi, d'après une étude menée chez 11 884 sujets, la part héréditaire expliquerait 50 à 80% du risque de développer une DTA (Blennow et al. 2006). Cette forte hérédité pourrait notamment s'expliquer par la présence de facteurs génétiques augmentant le risque de présenter une DTA. En effet, à ce jour, plus d'une quinzaine de facteurs de risque génétiques ont été décrits.

I.2.1. Mutations familiales à forte pénétrance

Il existe environ 200 mutations autosomales dominantes qui concernent un peu plus de 400 familles dans le monde et mènent obligatoirement à la déclaration d'une maladie d'Alzheimer (Reitz et al. 2011). Ces mutations sont toutes liées à la genèse du peptide β -amyloïde ($A\beta$). En effet, elles concernent notamment les gènes codant pour les présénilines 1 et 2 (codant pour des protéases impliquées dans la genèse de l' $A\beta$) et, plus rarement, du gène codant pour la protéine précurseur de l'amyloïde (APP). Ces mutations familiales entraînent une démence précoce se déclarant avant l'âge de 65 ans (Blennow et al. 2006). Ces formes familiales représenteraient 1 à 5% des patients actuellement considérés comme des patients Alzheimer et sont plutôt associées avec des symptômes à prédominance émotionnelle et exécutive (au moins dans les premières phases), tandis que les DTA (95 à 99% des patients) seraient plutôt associées à des symptômes à prédominance mnésique (Panegyres et al. 2013, Cavado et al. 2014). Ainsi, les formes familiales représenteraient une pathologie spécifique, la maladie initialement décrite par Alzheimer. Cependant, l'immense majorité des modèles animaux des DTA actuellement disponibles reposent sur ces mutations génétiques familiales et partent donc du postulat que la pathologie familiale est similaire aux DTA. Si cette approche centrée sur l'hypothèse amyloïde s'avère incomplète, cela expliquerait en partie les échecs qui ont conclu la plupart des approches thérapeutiques récemment testées. Pourtant, depuis plus de 20 ans, de nombreux autres facteurs génétiques ont été décrits chez les 99% de patients souffrant de la forme sporadique de la pathologie. Cependant, ces polymorphismes génétiques n'étant que des facteurs de risque, leur présence augmente la probabilité de développer un DTA sans y mener nécessairement.

I.2.2 Polymorphismes du gène *APOE*

Les polymorphismes du gène *APOE* codant pour l'apolipoprotéine E (ApoE) sont les facteurs de risque génétiques les plus puissants. Il existe dans la population trois allèles majoritaires de ce gène : l'allèle ancestral *APOE4* (10-15% de la population), l'allèle *APOE3* qui serait apparu il y a environ 300 000 ans (70% de la population) et l'allèle le plus récent *APOE2* (10-15% de la population). Ces trois allèles génèrent trois isoformes de la protéine ApoE (apoE4, apoE3 et apoE2) qui ne diffèrent que par deux acides aminés. La possession de l'allèle *APOE4* augmente le risque de développer une DTA (x3 chez les hétérozygotes et x15 chez les

Les démences de type Alzheimer

homozygotes) et induit une déclaration des symptômes plus précoce d’une décennie par allèle *APOE4* présent. Cependant, si l’*APOE4* est surreprésenté chez les patients DTA (40-50% des patients), la présence de cet allèle n’entraîne pas forcément de DTA, l’*APOE4* n’étant qu’un facteur de risque génétique. L’allèle *APOE3* est généralement considéré comme n’influençant pas particulièrement le risque de présenter une DTA, tandis que l’allèle *APOE2* serait plutôt protecteur. Récemment, un nouveau variant de l’*APOE*, l’*APOE3b* a été décrit en association avec une réduction du risque de présenter une DTA (Medway et al. 2014). L’*APOE4* étant de loin le facteur de risque génétique le plus puissant, cette thèse a porté sur ses effets chez la souris. Cependant, d’autres polymorphismes génétiques influenceraient également le risque de développer une DTA.

I.2.3. Autres polymorphismes

Avec le développement des méthodes d’étude génétiques à l’échelle du génome entier (*genome wide association studies*), au moins 22 polymorphismes ont été associés à l’augmentation du risque de développer une DTA (Rosenthal et al. 2014). Les mécanismes impliqués restent mal connus, bien que les gènes concernés semblent être liés préférentiellement à certains processus biologiques (Tableau 2).

Tableau 2 : Gènes dont les polymorphismes influencent le risque de développer une DTA et les grands processus biologiques auxquels ils sont associés.

Gène	Pathologie cardiovasculaires	Maturation, mort & survie cellulaire	Cancer, réplication et réparation de l’ADN	Développement de l’organisme	Endocytose	Réponse immunitaire
<i>APOE</i>	X	X	X	X	X	X
<i>CLU</i>	X	X	X	X		X
<i>CR1</i>	X	X	X	X		X
<i>BIN1</i>			X	X	X	X
<i>CD2AP</i>		X		X	X	X
<i>CD33</i>		X	X	X		X
<i>PICALM</i>		X	X	X		
<i>PTK2B</i>	X	X	X	X		X
<i>EPHA1</i>		X	X			
<i>ABCA1</i>			X	X		X
<i>SORL1</i>			X		X	X
<i>INPP5D</i>		X	X	X		X
<i>MEF2CL</i>		X	X	X		X
<i>MS4A4A</i>			X			
<i>TREM2</i>	X	X				X
<i>HLA-DRB1</i>	X		X			X
<i>MS4A6A</i>						X
<i>FERMT2</i>	X		X			
<i>SLC22A4</i>			X	X		
<i>MS4A4E</i>						X
<i>MA4A6E</i>						X
<i>NME8</i>		X				
<i>Rin3</i>		X				
<i>CASS4</i>		X				
<i>CELF1</i>			X			

Les démences de type Alzheimer

Malgré tout, il faut rappeler qu'aucun de ces polymorphismes génétiques n'est nécessaire ou suffisant pour entraîner le développement d'une DTA, celles-ci étant plutôt causées par l'interaction de facteurs génétiques, environnementaux et physiologiques liés au vieillissement.

I.3. Facteurs environnementaux

Les DTA sont des pathologies multifactorielles dans lesquelles divers facteurs génétiques et environnementaux interagissent et se modulent mutuellement. Ainsi, les individus porteurs de l'*APOE4* seraient par exemple plus sensibles à certains facteurs environnementaux protecteurs (activité physique, consommation modérée d'alcool) ou préjudiciable comme le tabagisme (Carmelli et al. 1999, Schuit et al. 2001) ou les pesticides agricoles et leurs métabolites (Richardson et al. 2013). Les facteurs environnementaux protecteurs influenceraient notamment la résilience du système nerveux central face aux atteintes causées par les processus pathologiques : un phénomène appelé la réserve cérébrale.

I.3.1 Réserve cérébrale

Au cours de la vie, les stimulations cognitives et physiques augmenteraient la quantité de neurones survivants ainsi que le nombre de synapses ce qui augmenterait la résistance à l'avancée de la pathologie (Negash et al. 2013). Cette réserve cérébrale irait de paire avec une utilisation plus efficace des réseaux cérébraux (moindre activation pour une tâche donnée) et ralentirait notamment les taux d'atrophie cérébrale de même que la vitesse de progression de la pathologie. De plus, les stratégies cognitives élaborées au fur et à mesure des expériences de vie augmenteraient la résistance à l'avancée de la pathologie (Negash et al. 2013).

Ainsi, un volume cérébral réduit, un faible niveau éducatif et des activités physiques et mentales réduites sont généralement associées à une augmentation du risque de présenter une DTA. Un niveau éducatif élevé et la pratique d'activités cognitives stimulantes permettraient notamment de développer des stratégies cognitives permettant de résister à l'avancée de la pathologie (Negash et al. 2013). De son côté, un bon niveau d'activité physique augmenterait la perfusion sanguine cérébrale (densité des capillaires), améliorerait l'extraction de l'oxygène ainsi que l'utilisation du glucose, tout en stimulant la production de facteurs de croissance. Ces facteurs peuvent être modélisés chez l'animal de laboratoire *via* un élevage en milieu enrichi en termes cognitifs, sociaux et physiques.

La réserve cérébrale diminuerait ainsi le risque de 50% chez les porteurs de l'*APOE4* et les individus portant l'*APOE2* pourraient être encore plus protégés (Moceri et al. 2001, Wang et al. 2011, Pettigrew et al. 2013). Cependant, la présence de l'allèle *APOE4* pourrait également bloquer l'effet bénéfique de certains facteurs tel que le niveau d'éducation (Kalmijn et al. 1997), suggérant que l'*APOE4* pourrait induire un déficit de réserve cérébrale *via* ses effets sur les processus biologiques sous-jacents.

La réserve cérébrale semble être un facteur de résistance général car elle altère, non seulement la progression des DTA, mais aussi celle d'autres types de démences comme les démences liées à la maladie de Parkinson, à la sclérose en plaques, au HIV ou encore aux traumatismes crâniens (Barulli et al. 2013). De manière intéressante, l'activité du système cholinergique

Les démences de type Alzheimer

dans les régions cérébrales mnésiques est corrélée avec les mesures de réserve cognitive, suggérant que celle-ci est associée à une neurotransmission cholinergique préservée voire augmentée (Garibotto et al. 2013).

I.3.2 Traumatismes crâniens

Un épisode de traumatisme crânien augmente fortement le risque de développer une DTA ou d'autres types de démences (Plasman et al. 2000). De plus, les traumatismes crâniens semblent accélérer la progression de la neuropathologie (Thom et al. 2011) de même que l'apparition des symptômes déments (Gilbert et al. 2014). De plus, il existe chez les sportifs de haut niveau fortement exposés aux traumatismes crâniens (boxeurs, joueurs de football américain...) des cas de démence pugilistique présentant une certaine analogie neuropathologique avec les DTA (Jordan et al. 1997). Les traumatismes crâniens pourraient ainsi initier ou potentialiser la cascade pathologique et réduiraient ainsi les capacités de réserve cérébrale. Il existerait une synergie particulière entre le génotype *APOE4* et les traumatismes crâniens, la coprésence d'un allèle *APOE4* et d'un historique de traumatisme crânien induisant une multiplication par cinq du risque de développer une DTA déjà induit par l'*APOE4* (Mayeux et al. 1995).

I.3.3 Syndrome métabolique

Le syndrome métabolique et ses pathologies associées seraient fortement liés à la pathogénèse des DTA. En effet, diabète de type II, perturbation de l'homéostasie du cholestérol et accidents vasculaires cérébraux augmentent sensiblement le risque de développer une DTA.

Le risque de présenter une DTA serait ainsi démultiplié par la présence préalable d'une pathologie cérébro-vasculaire (hypercholestérolémie, hypertension, athérosclérose ou encore pathologie coronarienne). Ainsi, au moins 7,4% des patients ayant connu un accident vasculaire cérébral développeraient ensuite une démence (Pendlebury & Rothwell 2009). Les accidents vasculaires pourraient notamment initier la mise en place d'une neuro-inflammation chronique, voir favoriser la progression de neuropathologies déjà présentes (Reitz et al. 2011). Même sans interactions directes, la comorbidité cérébro-vasculaire pourrait contribuer au risque de déclaration d'une DTA en surajoutant une charge pathologique induisant un dépassement du seuil au-delà duquel apparaissent les symptômes. A l'inverse, une bonne santé vasculaire réduirait le risque de démence et retarderait l'apparition des symptômes, même chez les sujets porteurs du facteur génétique *APOE4* (Ferrari et al. 2012).

Les perturbations de l'homéostasie du cholestérol et du métabolisme des lipides pourraient également influencer indirectement le risque de présenter une DTA *via* leurs effets cardio-vasculaires (Reitz et al. 2010). Cependant, un lien plus direct pourrait lier DTA et métabolisme du cholestérol. En effet, l'A β ainsi que les protéines codées par les gènes à risque *APOE* et *ABCA1*, sont impliqués dans le métabolisme cérébral du cholestérol. Or, les régions particulièrement sensibles aux atteintes des DTA présentent précocement des perturbations du métabolisme du cholestérol en lien avec l'augmentation de l'expression de ces protéines (Akram et al. 2010). De plus, cholestérol et les lipides sont des constituants élémentaires des membranes cellulaires, alors que les neurones adultes n'ont qu'une faible capacité de synthèse de cholestérol (Pfrieger et al. 2011). Ainsi, ces neurones dépendraient

Les démences de type Alzheimer

fortement des cellules gliales pour leur approvisionnement en cholestérol et en lipide *via* la capture des lipoprotéines transportées par l'ApoE. Ce phénomène serait notamment capital pour maintenir le *turn-over* synaptique ainsi que la synaptogénèse et les remodelages des réseaux neuronaux en réponse à l'avancée de la pathologie (voir chapitre III).

La présence d'un diabète de type II doublerait le risque de présenter une DTA et les traitements ciblant l'insuline auraient un effet positif sur les stades précoces des DTA, notamment en absence de l'allèle *APOE4* (Reitz et al. 2011). De manière intéressante, diabète de type II et DTA présentent tous deux une désensibilisation des récepteurs à l'insuline dans le système nerveux central. Or l'insuline y joue un rôle de facteur de croissance influençant la synaptogénèse et facilitant la plasticité cérébrale, notamment la potentialisation à long terme (*long-term potentialisation*, LTP) de l'activité synaptique (Hölscher 2011). De plus, l'allèle *APOE4* est également un facteur de risque pour le développement du diabète de type II (Chandhary 2012) et augmenterait notamment la sensibilité cognitive à la perte du contrôle glycémique dans le cadre de cette pathologie (Ravona-Springer et al. 2014).

I.3.4 Infections et inflammation chroniques

De nombreux agents infectieux entraînant des inflammations latentes chroniques augmentent significativement le risque de présenter une DTA (Honjo et al. 2009) :

Virus *Herpes simplex*. Le virus de l'herpès infecte durablement les systèmes nerveux périphérique et central. Cette infection souvent latente, induirait un état d'inflammation chronique sous-clinique. De nombreuses protéines liées aux DTA sont impliquées directement (ApoE, Cr1, APP, présénilines) ou indirectement (Clusterin, PICALM) dans le cycle de vie du virus Herpès, l'*APOE4* facilitant par exemple l'infection cérébrale par l'herpès (Carter 2010). Isolément, l'infection herpétique ne serait pas suffisante pour induire une DTA, mais elle deviendrait un facteur de risque significatif en association avec l'allèle *APOE4* (Itzhaki et al. 1997). Le virus de l'herpès potentialiserait la progression des neuropathologies amyloïde et neuro-fibrillaire liées aux DTA. De plus, ce virus partage des séquences homologues avec l'ApoE, la clusterine et PICALM et pourrait ainsi agir comme un ligand perturbant les voies de signalisation liées à ces protéines (Carter 2011). Ces similitudes pourraient également entraîner une pathologie auto-immune où les anticorps générés pour répondre à l'infection par l'herpès se retourneraient finalement contre ces protéines partageant des séquences avec l'herpès (Carter 2011).

Picornavirus. La famille des picornavirus regroupe un grand nombre de virus dont certains sont connus pour infecter préférentiellement les cellules pyramidales de l'hippocampe et induire des déficits mnésiques chez la Souris (Honjo et al. 2009).

Chlamydia pneumoniae. Cette bactérie respiratoire infecte initialement les muqueuses orales et nasales. Ce type d'infection augmenterait le risque ischémique et cardiovasculaire et serait présent dans 70 à 80% des cerveaux de patients DTA contre 10% des cerveaux de sujets âgés sains (Balin et al. 1998, Gerard et al. 2006). L'infection cérébrale par *Chlamydia pneumoniae* ciblerait préférentiellement l'hippocampe et le cortex frontal (Gérard et al. 2005). L'*APOE4* faciliterait là encore l'infection par *Chlamydia pneumoniae* et la combinaison des deux augmenterait le risque de présenter une DTA (Gerard et al. 2005).

Helicobacter pylori. Cette bactérie, responsable d'infection gastrique infantile, resterait présente dans le système nerveux central tout au long de la vie et serait présente dans 88% des patients DTA contre seulement 47% des sujets contrôles. Les effets négatifs de cette bactérie

pourraient notamment être dus à l'hyperphosphorylation de la protéine tau qu'elle induit (Xiu-Lian et al. 2014)

Dans une étude comprenant 128 patients DTA et 135 contrôles (Bu et al. 2014), il a été ainsi démontré que la charge infectieuse combinée (*cytomegalovirus*, *Herpes simplex virus type 1*, *Borrelia burgdorferi*, *Chlamydia pneumoniae* et *Helicobacter pylori*) induit un risque significatif de développement d'une DTA indépendamment de l'âge, du niveau éducatif, du génotype *APOE* ou de la présence d'autres comorbidités. De plus, cette charge infectieuse est corrélée négativement avec les performances cognitives et positivement avec l'accumulation d'A β ainsi qu'avec l'expression des cytokines inflammatoires, suggérant un rôle potentiellement important des inflammations sous-cliniques chroniques liées aux infections latentes dans la pathogénèse des DTA.

I.3.5 Nutrition

Les facteurs nutritionnels auraient une influence significative sur le risque de développer une DTA. En effet, les carences en vitamine B12 (essentielle au fonctionnement normal du système nerveux et notamment à la synthèse de neurotransmetteurs et à la myélinisation), en vitamine B6 ainsi qu'en antioxydants tels que les vitamines C et E augmentent toutes le risque de DTA (Reitz et al. 2011). De plus, un régime riche en acides gras non saturé, en oméga-3 et comprenant une consommation d'alcool modérée induirait une diminution significative du risque de DTA. Ainsi, la supplémentation en oméga-3 serait notamment bénéfique pour les patients *APOE4* durant les stades les plus précoces des DTA (Reitz et al. 2011). Ces effets nutritionnels agiraient en partie indirectement, les antioxydants et acides gras non-saturés ayant notamment des effets favorables sur les fonctions vasculaires et les processus inflammatoires.

I.4. Trajectoires cliniques, diagnostique et approches thérapeutiques

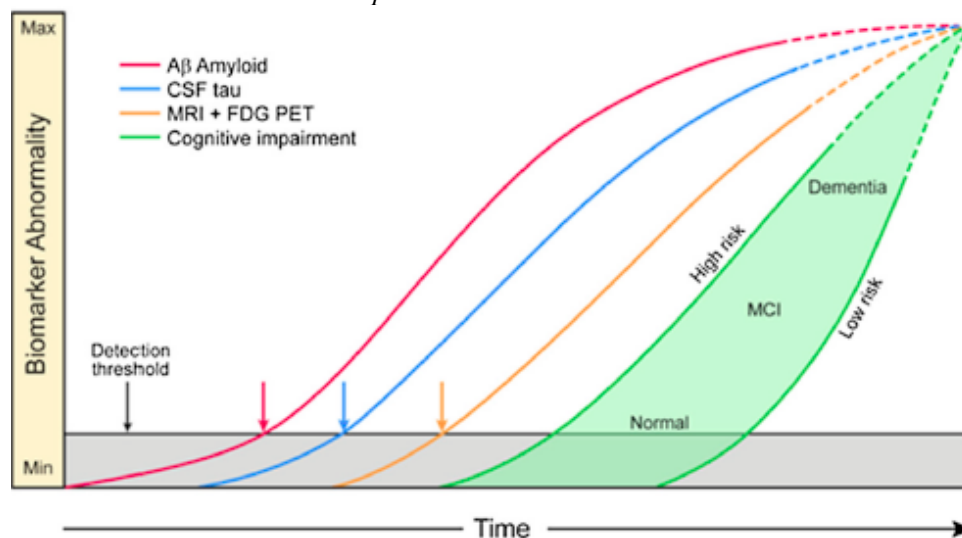
La progression des DTA serait caractérisée par une longue phase préclinique (>20 ans) suivie généralement d'une phase de troubles cognitifs légers (*mild cognitive impairment* ou MCI) qui dure environ une décennie et enfin d'une phase de démence d'environ 10 ans ou plus précédant le décès. Notons ici que si les individus classés en stade MCI présentent un risque important pour le développement d'une DTA, ils n'en développent pas nécessairement une. La majorité des interventions thérapeutiques a lieu tardivement une fois la démence déclarée, ce qui pourrait expliquer le manque d'efficacité des thérapies actuelles ainsi que l'échec des essais cliniques entrepris ces dernières années (Selkoe 2012). Ainsi, le stade de MCI représenterait la dernière fenêtre de traitement potentiellement efficace. Cependant, la mise en place de traitements précoces (durant le stade MCI, voir même pendant les phases précliniques) requiert l'établissement d'un diagnostic précoce particulièrement difficile à obtenir.

En effet à l'heure actuelle, le diagnostic se base essentiellement sur les critères du NINCDS-ADRA qui reposent sur un diagnostic clinique de « maladie d'Alzheimer probable » obtenu par approches neuropsychologiques et cliniques. Ainsi, d'après ces critères, le diagnostic définitif ne peut être obtenu qu'après confirmation histopathologique (autopsie/biopsie). Les efforts actuels portent donc sur le développement de biomarqueurs permettant la détection

Les démences de type Alzheimer

préclinique des patients (avant l'apparition des premiers troubles ; Jack et al. 2010). En effet, si le déclin mnésique ne débute qu'un à deux ans avant la déclaration des symptômes de démence (Lange et al. 2002), les dépôts amyloïdes débuteraient environ 19 ans avant et l'atrophie de l'hippocampe serait détectable plus de 4 ans avant le diagnostic (Villemagne et al. 2013). La principale difficulté avec les biomarqueurs est de prédéterminer un seuil clair et spécifique permettant de contribuer utilement au diagnostic. En effet, les mesures des biomarqueurs sont généralement caractérisées par une grande variabilité interindividuelle. Quoiqu'il en soit, la plupart des approches actuelles sont essentiellement basées sur l'analyse protéique du liquide céphalo-rachidien (amyloïde, tau) et l'imagerie cérébrale (amyloïde, fonctionnelle et anatomique). Le suivi longitudinal de ces biomarqueurs dans de vastes échantillons, suggère néanmoins qu'une séquence d'anomalies pourrait être prédictive de la déclaration d'une DTA (Figure 1).

Figure 1 : Evolution des changements précédant la déclaration des DTA.
Repris de Jack et al. 2013



La figure représente la progression théorique des principaux biomarqueurs à l'étude dans les phases précédant la déclaration de la démence de type Alzheimer. CSF, liquide céphalo-rachidien ; MRI, imagerie par résonance magnétique ; FDG PET, tomographie par émission de positrons basée sur le fluorodésoxyglucose.

Cependant, l'utilité de ces biomarqueurs reste limitée. En effet, leur utilisation dans le cadre d'une pratique clinique visant à dépister la quasi-totalité des sujets de plus de 50 ans (détection préclinique de la pathologie) n'est pas réaliste. En effet, la plupart de ces biomarqueurs sont invasifs (ponctions lombaires, exposition à des radiations) ce qui complique le suivi régulier des patients. De plus, ils sont coûteux et requièrent un niveau technique élevé qui pourrait être problématique pour les 60% de patients vivant dans des pays en développement.

Enfin, il faut noter que la prise en compte du génotype *APOE4* n'est pas intégrée dans la pratique clinique, essentiellement pour des raisons éthiques. En effet l'*APOE4* n'est qu'un facteur de risque, mais il s'avère que lorsqu'un patient apprend qu'il est porteur de cet allèle, c'est suffisant pour influencer négativement ses performances cognitives ultérieures, révélant ainsi l'impact des facteurs métacognitifs sur l'expression clinique (Lineweaver et al. 2013).

I.4.1 Phases cliniques

Les DTA seraient caractérisées par l'accumulation progressive de lésions intracérébrales suivie à plusieurs années de décalage de l'apparition progressive de troubles cliniques (Figure 1). Ce décalage temporel entre changements pathologiques cérébraux et troubles cliniques pourrait s'expliquer en partie par la présence de mécanismes compensatoires. Cette compensation jouerait potentiellement un grand rôle, certains sujets asymptomatiques présentant des lésions typiques de patients en fin de démence malgré l'absence de troubles significatifs (Rowe et al. 2010 ; Monsell et al. 2013 ; Negash et al. 2013 ; Iacono et al. 2014). Ainsi, si la progression des DTA peut ressembler à une marche inexorable vers l'état de démence, il est possible que cette progression puisse être ralentie en soutenant l'activité des mécanismes endogènes de compensation, notamment si ces interventions sont menées précocement.

I.4.1.1. Phase préclinique

Les processus neurodégénératifs débuteraient au moins deux décennies avant le diagnostic de DTA (Villemagne et al. 2013). Durant cette longue phase préclinique, le patient ne présente que des troubles extrêmement subtils ne pouvant être détectés qu'au niveau du groupe (Twamley et al. 2006). Ainsi, cette phase ne paraît pas pouvoir être détectée par un diagnostic neuropsychologique classique. Or, ce serait durant cette phase que les protéinopathies amyloïdes et tau se mettent en place (voir ci-dessous) suivies par des atrophies précoces trahissant les premières neurodégénérescences. Durant cette phase, les principales anomalies toucheraient le cortex entorhinal en lien avec la mise en place progressive d'une tauopathie dans cette structure (Khan et al. 2013). Au cours de cette phase, il y aurait également des anomalies métaboliques dans le *default mode network* ou DNM, un ensemble de régions cérébrales formant un circuit dont l'activité est augmentée durant le repos (Brier et al. 2014). Enfin, la progression vers le MCI semble être associée à un hypo métabolisme au niveau du cortex entorhinal (de Léon et al. 2001). Ainsi, il apparaît que le cortex entorhinal est perturbé dès les premières phases précliniques de la pathologie et que l'aggravation de l'atteinte de cette structure pourrait jouer un rôle dans l'apparition des premiers troubles cognitifs visibles.

I.4.1.2. Troubles cognitifs légers ou MCI

Le stade de MCI est une entité clinique qui précède généralement la déclaration clinique de la démence (Petersen et al. 2001). Cependant, comme indiqué plus haut, ce stade paraît être particulièrement hétérogène en termes de durée et même de devenir clinique. En effet, si le stade MCI conduit souvent à la déclaration une DTA, il peut mener à d'autres types de démence ou rester durablement stable (Bennett et al. 2002). Il a même été récemment suggéré que le stade MCI pouvait être suivi d'une rémission vers des performances cognitives normales (Koepsell et al. 2012). Ce dernier point est particulièrement intéressant car il pourrait également refléter l'action de mécanismes compensatoires.

Le stade MCI est également hétérogène en termes de présentation clinique. On distingue ainsi notamment les MCI à dominante amnésique qui représenterait un stade prodromal des DTA, tandis que les MCI non-amnésiques peuvent également précéder d'autres types de démence (Gallagher et al. 2010, Sachdev et al. 2011). Si environ 60% des patients MCI présentent des

Les démences de type Alzheimer

indices neuropathologiques suggérant la mise en place d'une DTA, les neuropathologies vasculaires représenteraient également une part significative des atteintes cérébrales menant au stade MCI (Petersen et al. 2009). Les MCI amnésiques seraient notamment accompagnés par une atrophie prédominante du cortex entorhinal (Bell-McGinty et al. 2005), ainsi que par des altérations métaboliques du cortex rétrosplénial (Nestor et al. 2003) et par une hyperactivité de l'ensemble gyrus denté (*dentate gyrus*, DG) et corne d'Ammon 3 (CA3) de l'hippocampe (Yassa et al. 2010). Certains troubles comportementaux semblent être spécifiques des MCI amnésiques comme les déficits de localisation d'objets (Hampstead et al. 2011), les déficits de discrimination de configurations ambiguës (*pattern separation* ; Yassa et al. 2010), et des déficits de navigation spatiale (Hort et al. 2007, Laczó et al. 2009). Ces déficits particuliers sont cohérents avec une atteinte spécifique des réseaux du lobe temporal médian (Delpolyi et al. 2007 ; Lim et al. 2010 ; partie II de l'introduction).

Malgré cette forte hétérogénéité symptomatique des MCI, les processus impliqués dans ce stade semblent spécifiques et ne correspondant ni aux changements liés au vieillissement ni à ceux accompagnant les DTA. En effet, les profils d'expression des gènes dans le cortex entorhinal, l'hippocampe, les cortex pariétaux et frontaux durant ce stade sont spécifiques du MCI et différent des profils associés au vieillissement normal ou aux DTA (Berchtold et al. 2014). La particularité du MCI serait qu'il pourrait être associé à la mobilisation de processus de compensation, ce qui s'illustrerait par l'hétérogénéité des devenir cliniques allant de la conversion vers la démence à la rémission vers une cognition normale (Koepsell et al. 2012). L'augmentation de la densité de l'innervation cholinergique dans l'hippocampe et le cortex (Dekosky et al. 2002) pourrait être un de ces mécanismes compensatoires. En effet, le MCI s'accompagne de la surexpression de gènes liés à la synaptogénèse et la plasticité synaptique dans ces régions (Berchtold et al. 2014) et, comme évoqué plus haut, l'intensité de l'activité cholinergique corrèle avec l'amplitude des mesures de la réserve cérébrale (Garibotto et al. 2013). Or, les patients porteurs de l'*APOE4* pourraient présenter des déficits de ce type de compensation car ils ont un risque exacerbé de développer un MCI de type amnésique et ont de moindre taux de rémission vers la normale (Koepsell et al. 2012). Pour toutes ces raisons, le stade MCI représente probablement la dernière fenêtre thérapeutique crédible afin d'entraver durablement la conversion vers la démence (Selkoe 2012). Durant cette thèse, je me suis donc notamment intéressé à l'influence de l'allèle *APOE4* sur les mécanismes hippocampiques permettant de compenser l'atteinte du cortex entorhinal.

1.4.1.3. La conversion vers la démence.

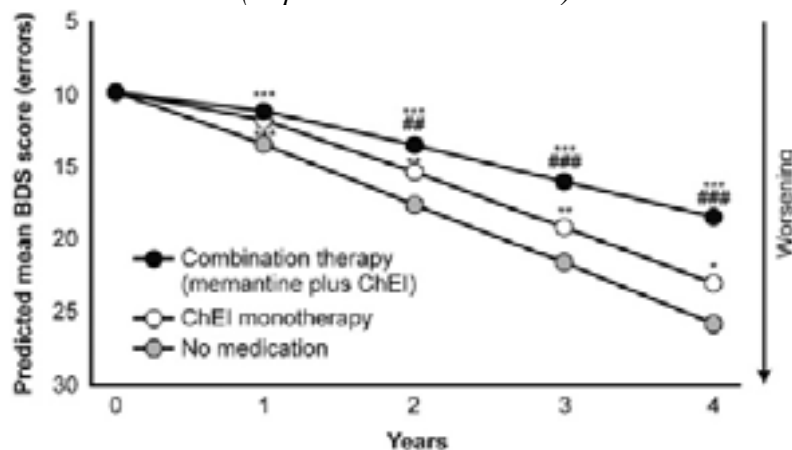
Environ 10% des patients MCI convertissent vers la démence en une année. Cette conversion serait notamment influencée par la sévérité clinique, la présence de l'*APOE4* et par des taux élevés d'atrophie de l'hippocampe, du cortex entorhinal et du subiculum (Petersen et al. 2009, Devanand et al. 2012). De plus, l'atteinte du cortex préfrontal, du cortex rétrosplénial et du cortex pariétal semble aussi accompagner la conversion vers la DTA (Chételat et al. 2009, Fouquet et al. 2009, Carmichael et al. 2012). L'expression d'un MCI de type amnésique augmenterait fortement le risque de conversion vers la DTA, ce qui rend cette population particulièrement intéressante pour des interventions préventives (Damian et al. 2013). Cependant, si la présence de l'*APOE4* multiplie par 6 le risque de présenter un MCI de type amnésique, elle n'influencerait pas significativement le risque de conversion vers la démence (Barabash et al. 2009), sauf chez les homozygotes (Xu et al. 2013).

I.4.2 Stratégie thérapeutique

A l'heure actuelle, les options thérapeutiques sont limitées à des traitements n'ayant qu'un impact léger sur les symptômes cognitifs et ne permettent de retarder la progression de la pathologie que d'un ou deux ans. Ces traitements comprennent notamment les inhibiteurs de l'acétylcholine estérase (iAChE) et la mémantine, un antagoniste non-compétitif des récepteurs glutamatergiques *N*-méthyl-D-aspartate (NMDA). Malheureusement, toutes les tentatives récentes visant la pathologie amyloïde ont été des échecs, peut-être parce qu'ils ciblaient des patients ayant déjà déclaré une DTA (Selkoe 2012).

L'effet bénéfique transitoire des iAChE est cohérent avec un rôle compensatoire du système cholinergique dans les phases précoces MCI/DTA. Cependant, ces traitements prescrits notamment dans les stades légers ne parviennent à retarder la progression des troubles que d'un à deux ans (Rombouts et al. 2002). Ce manque d'efficacité pourrait s'expliquer par une prescription tardive, souvent après la conversion vers la démence. Quoi qu'il en soit, les traitements cholinergiques manquent d'efficacité chez les 40 à 50% des patients porteurs de l'*APOE4* (Wang et al. 2014), ce qui renforce l'hypothèse d'une compensation cholinergique déficitaire chez ces patients. De son côté, la mémantine est plutôt prescrite aux patients avec démence modérée à sévère, et elle induirait un effet neuroprotecteur en inhibant les mécanismes excitotoxiques liés à la sur-activation des récepteurs NMDA. Cependant, la combinaison mémantine et iAChE pourrait induire de meilleurs résultats cliniques (Figure 2, Atri et al. 2008).

Figure 2 : Intérêt potentiel de la combinaison iAChE avec mémantine.
(Repris d'Atri et al. 2008)



La figure représente le taux de déclin cognitif annuel (Blessed Dementia Scale) pour des patients recevant une monothérapie iAChE (ChEI) et pour des patients recevant une combinaison iAChE et mémantine. * $p < 0,05$ vs l'absence de traitement ; ** $p < 0,01$ vs l'absence de traitement ; *** $p < 0,001$ vs l'absence de traitement ; ## $p < 0,01$ vs monothérapie cholinergique ; ### $p < 0,001$ vs monothérapie cholinergique.

Cependant, si la bithérapie iAChE + mémantine peut potentiellement induire un bénéfice prolongé qui augmenterait même avec le temps (Parson et al. 2013 ; Gauthier et al. 2013), la prescription de la mémantine n'est pas pour l'instant pas approuvée durant les phases précoces des DTA.

II. Pathogénèse

Actuellement, l'accumulation de protéines anormales ($A\beta$ et tau hyper phosphorylées) est considérée comme la principale force responsable de la mise en place des déficits dans les DTA. Ces protéinopathies induiraient notamment des dommages oxydatifs et inflammatoires menant à un dérèglement énergétique et à des dysfonctionnements synaptiques (Querfurth et al. 2010). Cependant, les facteurs déclencheurs de ces protéinopathies restent mal connus. Si ces anomalies augmentent proportionnellement avec l'âge, l'étude de sujets centenaires indique que ces protéinopathies ne sont pas des conséquences nécessaires du vieillissement.

Au-delà de ces protéinopathies, il faut noter que les régions cérébrales les plus touchées dans les DTA sont des régions limbiques caractérisées par le maintien d'un fort potentiel de plasticité à l'âge adulte (croissance neuritique, remodelages synaptiques, synaptogénèse, neurogénèse). De plus, les protéines impliquées dans les DTA (APP, fragments sécrétés de l'APP, présénilines, ApoE) participent aux phénomènes de neuroplasticité potentiellement mobilisés par les mécanismes compensatoires. Ainsi, une charge plastique trop importante pourrait participer à la genèse des DTA (Mesulam 2000). Les DTA sont d'ailleurs caractérisées par la réexpression d'isoformes protéiques développementales (tubuline embryonnaire, motif de phosphorylation fœtale de la protéine tau) et sont associées à la réexpression de protéines liées au cycle cellulaire (CdK1, 4 et 5). Il est donc possible que la réactivation dans le cadre des DTA des mécanismes développementaux ne reflète que le stade final de l'emballement des processus compensateurs recrutant des gènes développementalement régulés (Arendt 2001).

II.1. Protéinopathies

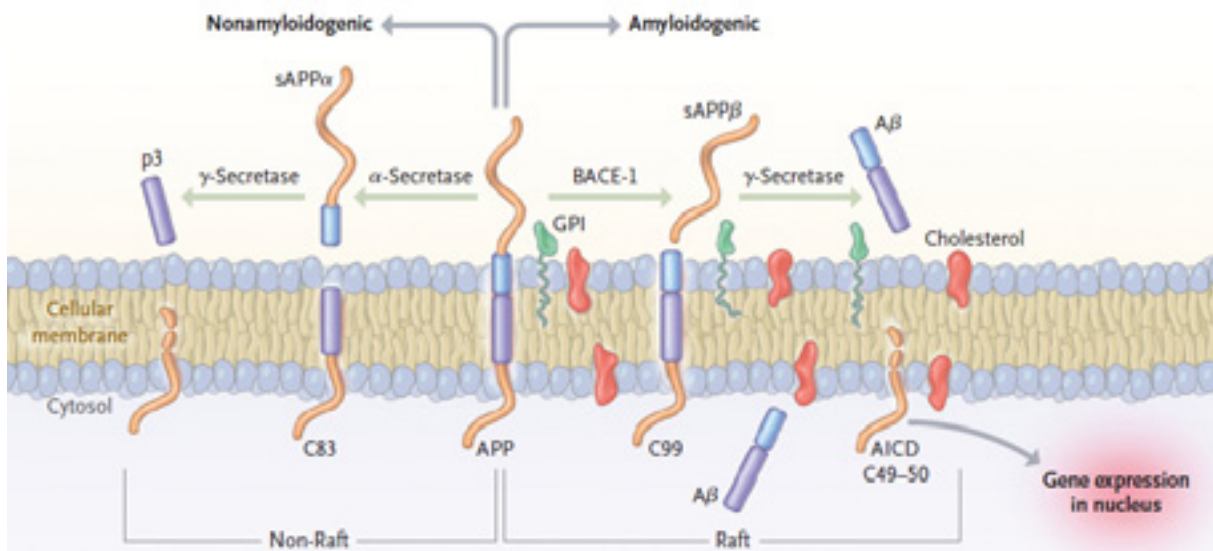
Si les protéinopathies décrites par Alois Alzheimer (amyloïdopathie et tauopathie) sont généralement considérées comme étant les causes neuropathologiques des DTA, leurs association corrélative aux DTA pourraient également traduire un rôle de mécanisme de défense de l'amyloïde et du tau hyperphosphorylé (Smith et al. 2002). Ainsi, la présence d'atteinte cérébrale pourrait expliquer l'apparition de ces anomalies protéiques bien que les protéinopathies sont actuellement conceptuellement systématiquement placées en amont des atteintes cérébrales (Krstic et al. 2013). Pour cette raison, la grande majorité des modèles animaux repose sur l'induction d'une amyloïdopathie, d'une tauopathie, voire de la combinaison des deux. Cependant ces formes « pures » des protéinopathies de type Alzheimer ne sont pas nécessairement communes chez le patient, ni même spécifiques aux DTA. En effet, une étude chez des centenaires a révélé que si 100% des individus présentent une tauopathie, 68% ont une amyloïdopathie, 25% présentent des accumulations d' α -synucléine, 13% ont une pathologie TDP-43 et 49% présentent des traces de lésions vasculaires (Kovacs et al. 2013). Par conséquent, les protéinopathies et autres pathologies cérébrales caractéristiques d'autres types de démences ainsi que leur combinaison avec les protéinopathies de type Alzheimer paraissent être très fréquentes au cours du vieillissement. Enfin, si amyloïdopathies et tauopathies sont traditionnellement perçues comme des phénomènes liés, elles pourraient refléter des processus différents. En effet, une étude rétrospective de 1599 autopsies menées durant les 40 dernières années suggère que si sur cette période l'incidence des tauopathies a tendance à augmenter, celle des amyloïdopathies diminue (Kovari et al. 2013).

II.1.1 Amyloïdopathie

II.1.1.1 Physiologie de l'APP et de ses dérivés.

L'APP est une glycoprotéine transmembranaire ubiquitaire. Sous sa forme entière, elle jouerait notamment un rôle de récepteur de surface et de molécule d'adhésion cellulaire avec une activité neurotrophique et synaptotrophique (Dodart et al. 2000). Ainsi, l'APP serait impliquée dans la formation et la maintenance des synapses et protégerait contre l'excitotoxicité *via* son domaine KPI (Kunitz protease inhibitor) d'inhibition des protéases (Mucke et al. 1996). En effet, dans des cultures de neurones hippocampiques, l'expression de l'APP favorise la formation et le maintien des épines dendritiques (Lee et al. 2010). L'APP peut être clivée par différentes protéases, ce qui va permettre la genèse d'une multitude de fragments protéiques bioactifs. Le clivage de l'APP peut suivre deux voies principales (Figure 3).

Figure 3 : Les deux principales voies de clivage de l'APP
Repris de Querfurth et al. 2010



Le clivage par l' α -sécrétase au milieu de la séquence contenant le peptide $A\beta$ initie le traitement non-amyloïdogénique qui est majoritaire en conditions normales (90%). Ce clivage génère un fragment sécrété ($sAPP\alpha$) ainsi qu'un résidu de 83 aa en C-terminal (C83). Ce dernier étant à son tour clivé par la γ -sécrétase (présénilines) permettant la libération de peptide p3 et du domaine intracellulaire de l'amyloïde (AICD) qui modulent l'expression des gènes.

La voie de traitement amyloïdogénique débute par un clivage de la β -sécrétase induisant la libération d'un fragment sécrété plus court ($sAPP\beta$). Le reste de la protéine (C99 ou β -CTF) connaît alors un clivage par la γ -sécrétase induisant la libération de l' $A\beta$ et de l'AICD. L' $A\beta$ monomérique peut former des multimères toxiques (Crew et al. 2010) puis continué à s'agréger en des formes moins toxiques (fibrilles puis plaques amyloïdes). Ainsi, certains postulent que les plaques amyloïdes pourraient être globalement protectrices en permettant la séquestration de l' $A\beta$ soluble (Montarolo et al. 2013). Les radeaux lipidiques (Raft) sont des micro-compartiments membranaires enrichis en cholestérol qui sont particulièrement favorables au clivage β -sécrétase (Rushworth et al. 2010).

Si les processus de clivage de l'APP peuvent prendre place à la surface cellulaire, le clivage β aurait surtout lieu dans les organelles intracellulaires. En effet, la β -sécrétase est bien plus efficace en environnement acide, et l'activité neuronale induirait l'internalisation de l'APP et

son convoyage vers des organelles riches en β -secrétase active tels que les endosomes de recyclage (Das et al. 2013). Plus largement, l'ensemble des processus de clivage de l'APP semble être contrôlé par l'activité synaptique, celle-ci induisant la libération extracellulaire des différents fragments bioactifs de l'APP. Ceux-ci joueraient un rôle physiologique dans les modulations de la plasticité neuronale (Brunholz et al. 2011). Ainsi, ils modulent notamment la potentialisation à long terme (*long-term potentialisation* ou LTP) qui permet l'augmentation de la force synaptique entre deux neurones et pourrait être un substrat cellulaire de l'apprentissage.

Parmi ces fragments de l'APP, les sAPP ont des effets neurotrophiques, induisent l'augmentation de l'expression membranaire des récepteurs NMDA et favorisent la prolifération cellulaire. Ainsi, *in vitro*, les sAPP augmentent la longueur des neurites, le nombre de branchements dendritiques et seraient un des médiateurs des effets du NGF sur la croissance neuritique (Milward et al. 1992). Ils soutiennent également la prolifération des neuroblastes (Caillé et al. 2004) et facilitent la consolidation mnésique (Meziane et al. 1998) ainsi que la mise en place de la LTP (Ishida et al. 1997). Le sAPP α jouerait aussi le rôle de protéine chaperonne pour le cuivre et le zinc en jouant un rôle de transporteur neuronal des métaux (Chasseigneaux & Allinquant 2012). Enfin, les sAPP α protégeraient contre les conséquences des stress excitotoxiques, oxydatifs et la déprivation de glucose (Chasseigneaux & Allinquant 2012). Globalement, les sAPP β jouent des rôles similaires, mais sans influencer la LTP et en étant moins neuroprotecteurs (Taylor et al. 2008, Chasseigneaux & Allinquant 2012).

Parmi les différents effets physiologiques de l'A β , il faut notamment distinguer la prévention des dommages oxydatifs, la stimulation des processus de la LTP, le contrôle de l'homéostasie du cholestérol et la modulation de l'activité de nombreuses kinases (notamment ERK et GSK3). L'activité synaptique entraîne physiologiquement la libération d'A β chez le rongeur (Cirrito et al. 2005) et chez l'Homme (Brody et al. 2008). L'A β ainsi sécrété dans des gammes picomolaires n'influencerait pas l'activité synaptique basale, mais potentialiserait la LTP *via* l'activation directe des récepteurs nicotiques présynaptiques $\alpha 7$ ($\alpha 7nAChRs$). A des concentrations plus fortes de l'ordre nanomolaire, cet effet s'inverse et l'A β inhibe alors la LTP (Puzzo et al. 2008). Le rôle physiologique de l'A β picomolaire est bloqué par les antagonistes cholinergiques et participerait aux phénomènes d'apprentissage. En effet, l'inhibition de la production d'A β induit des déficits d'acquisition et de la consolidation mnésique qui sont reversés par l'instillation d'A β exogène en concentration picomolaire (Garcia-Osta et al. 2009). L'expression de l'A β sous forme monomérique aide également à la survie neuronale dans le cadre d'une déprivation de facteurs de croissance et protège les neurones de l'excitotoxicité (Giuffrida et al. 2009). L'A β faciliterait également la prolifération des progéniteurs neuronaux et contrôlerait leur différenciation, l'A β 1-40 induisant une différenciation neuronale, et l'A β 1-42 une différenciation astrocytaire (Chen & Dong 2009).

Enfin, l'AICD participerait aux régulations du cytosquelette et modulerait l'activité de différentes kinases (Brunholz et al. 2011). L'A β et l'AICD participeraient à la régulation de l'homéostasie du cholestérol, en inhibant la biosynthèse neuronale du cholestérol et en inhibant sa capture *via* la diminution de l'expression du récepteur aux lipoprotéines LRP1 (Grimm et al. 2011).

II.1.1.2 l'Amyloïdopathie.

Les DTA sont associées avec une accumulation d'agrégats d'A β (oligomères, fibrilles et plaques). Bien que ces accumulations aient également lieu au cours du vieillissement normal (Rowe et al. 2010), l'hypothèse dominante de la pathogénèse des DTA reste celle de la cascade amyloïde. Cette hypothèse postule que les accumulations d'A β seraient l'évènement initiateur de la pathologie. Elle repose notamment sur le fait que les mutations menant obligatoirement à la maladie d'Alzheimer familiale induisent des amyloïdopathies massives et que les patients souffrant de trisomie 21 (qui possèdent trois copies du gène de l'APP) développent systématiquement une DTA semblable à la maladie d'Alzheimer familiale. De plus, récemment, une mutation dans la séquence de l'APP a été associée à une réduction conjointe de la production d'A β et du risque de développer une DTA (Jonsson et al. 2012). Enfin, l'accumulation d'A β , notamment intra-neuronale, pourrait potentialiser le développement de la pathologie neuro-fibrillaire liée à la protéine tau (Oddo et al. 2003).

Les effets toxiques de l'A β seraient notamment médiés par les pertes synaptiques induites par les différentes formes oligomériques d'A β (Lue et al. 1999, Selkoe 2002), potentiellement *via* l'induction d'un stress oxydatif au niveau des mitochondries synaptiques (Du et al. 2010). Les A β oligomériques peuvent également bloquer post-synaptiquement la LTP (Krafft et al. 2010). L'activité synaptique va faciliter la formation d'oligomères d'A β , en co-libérant de l'A β et du zinc ce dernier potentialisant les processus d'oligomérisation (Deshpande et al. 2006). Dans le cadre des formes familiales de la Maladie d'Alzheimer, l'anabolisme de l'A β est augmenté (Zhang et al. 2009), alors qu'un tel effet est absent des DTA. Il est néanmoins possible qu'avec le vieillissement caractérisant les DTA la dégradation de l'A β par la néprilysine soit tout de même moins efficace (Yasojima et al. 2001, Iwata et al. 2002). Enfin, il semble que le développement de l'amyloïdopathie hippocampique serait associé à l'atteinte du cortex entorhinal. En effet, les lieux d'accumulation préférentiels de l'A β dans l'hippocampe correspondent aux zones de terminaison des projections du cortex entorhinal chez l'humain (Hyman et al. 1986) comme chez la Souris (Fukami et al. 2002).

Cependant, malgré ces arguments, il faut être conscient que le degré d'accumulation d'A β n'est pas directement lié à l'étendue des troubles cognitifs et des neurodégénérescences. Ainsi, il pourrait représenter un processus indépendant (Jack et al. 2014).

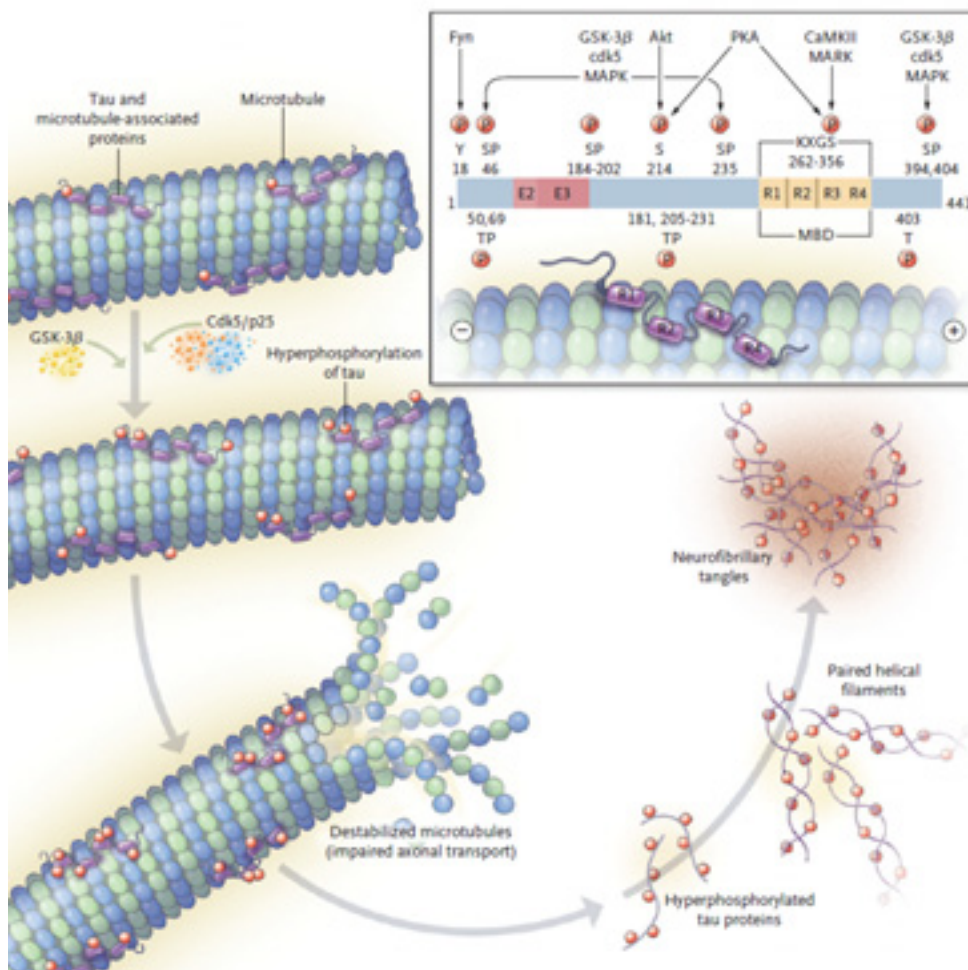
II.1.2 Tauopathie.

Globalement, si l'accumulation de protéines tau hyper-phosphorylées au niveau du cortex entorhinal semble être une conséquence quasi-obligatoire du vieillissement, il apparaît néanmoins que son extension vers l'hippocampe corrèle avec la progression des troubles cognitifs dans les DTA (Braak et al. 2006). L'activité biologique de la protéine tau est fortement régulée par son état de phosphorylation. Avec le vieillissement, les processus de phosphorylation s'emballeraient et induiraient la formation d'agrégats neurotoxiques ayant la capacité de se propager le long des circuits cérébraux. Parmi ceux-ci, les circuits reliant les cortex perirhinaux, entorhinaux et l'hippocampe seraient particulièrement sensibles à ces accumulations. A l'heure actuelle, aucune mutation associée à la protéine tau n'a été décrite dans le cadre des DTA, malgré la découverte de nombreuses mutations associées au développement de démences fronto-temporales.

II.1.2.1 Physiologie de la protéine tau.

La protéine tau est une protéine de liaison aux microtubules. En tant que telle, elle module notamment l'état de polymérisation des microtubules et donc la dynamique du cytosquelette et le transport axonal. En effet, lorsque la protéine tau est faiblement phosphorylée, elle se lie aux microtubules ce qui permet leur stabilisation. Cependant, la protéine tau peut être phosphorylée par de nombreuses kinases (GSK3 β , MAPK, les CdK, JNK, PKA, PKC, Fyn...) sur au moins 85 sites différents dont au moins 40 sont phosphorylés dans le cadre des DTA (Avila 2009, Hanger et al. 2009). Le niveau de phosphorylation de la protéine tau dépendrait ainsi d'un équilibre finement régulé entre les kinases et diverses phosphatases (PP1, PP2A, PP2B...). Les effets biologiques de la phosphorylation dépendraient notamment des résidus qui sont phosphorylés. Généralement la phosphorylation de tau réduirait ses interactions avec les membranes cellulaires de même que son affinité pour les microtubules tout en facilitant ses interactions avec d'autres protéines de liaison aux microtubules. L'hyperphosphorylation de tau induirait ultimement une déstabilisation des microtubules qui faciliterait la dynamique du cytosquelette et pourrait ainsi participer aux phénomènes de division et de prolifération cellulaire (Hong et al. 2010), ainsi qu'à la neurogénèse et aux remodelages dendritiques et axoniques (Llorens-Martin et al. 2012).

*Figure 4 : Fonctions et pathologies de la protéine tau
Repris de Querfurth et al. 2010*



Les séquences R1 à R4 (encadré) forment le domaine de liaison aux microtubules de tau (MBD). La phosphorylation normale de tau a lieu sur les résidus sérine (S) et thréonine (T) de tau. Quand ces résidus sont suivis d'une proline, ils vont être phosphorylés par les kinases GSK-3, Cdk-5 et MAPK. Ces phosphorylations de tau régulent normalement la dynamique des micro-tubules en les déstabilisant. Cependant, dans le cadre des DTA, certains sites, notamment à proximité de la séquences de liaison aux microtubules, sont hyperphosphorylés ce qui entrainerait des perturbations du cytosquelette et notamment du transport axonal et finirait par générer différents agrégats protéiques pathologiques (pairs de filaments, agrégats et enfin dégénérescences neuro-fibrillaires).

II.1.2.2 La tauopathie.

L'hyperphosphorylation de tau est commune dans le cadre du vieillissement normal, notamment au niveau du cortex entorhinal et l'agrégation de tau sous forme de fibrilles est présente dans de nombreuses pathologies neurodégénératives.

Cependant, dans les DTA cette hyperphosphorylation de tau s'étend à l'hippocampe puis aux aires corticales associatives et au cerveau antérieur de la base (Braak et al. 2006). Chez le patient DTA, la présence d'une tauopathie serait nécessaire pour qu'A β soit toxique (Desikan et al. 2012) et, à l'inverse, la présence d'une pathologie amyloïde exacerberait l'agressivité de la tauopathie (Héraud et al. 2013). Cependant, comme ces deux protéinopathies ont tendance à se développer dans des régions cérébrales distinctes, la question de la façon dont elles s'influencent mutuellement reste ouverte (Musiek et al. 2012). Dans les DTA, la tauopathie toucherait précocement et massivement le cortex entorhinal, CA1, ainsi que le pré- et le para-subiculum (Fukutani et al. 1995). L'atteinte du cortex entorhinal par la tauopathie serait particulièrement critique, cette accumulation de tau étant suffisante pour induire des déficits de plasticité au niveau des voies perforantes entorhino-hippocampique (Polydoro et al. 2013). De plus, l'atteinte du cortex entorhinal semble suffisante pour induire des déficits cognitifs, la tauopathie touchant essentiellement les neurones entorhinaux et leurs projections au moment de la déclaration des symptômes (Thal et al. 2000). En effet, cette atteinte entorhinale massive par la tauopathie y entrainerait des pertes de plus de la moitié des neurones (Gomez-Isla et al. 1996), ce qui réduirait sensiblement la densité des entrées synaptiques dans l'hippocampe. Ce phénomène a été conceptualisé en tant que « syndrome de déconnexion hippocampique » (Hyman et al. 1984), et contribuerait significativement à l'apparition des premiers déficits cognitifs.

Ainsi, globalement, la tauopathie serait plus directement liée que l'A β aux pertes synaptiques et au développement des déficits cognitifs précoces (Malchiodi-Albedi et al. 1997, Llorens-Martin et al. 2014).

II.1.3 Protéinopathies ou mécanismes de défense ?

Le dogme d'un rôle causal de l'amyloïdopathie et la tauopathie dans la pathogénèse des DTA est rarement remis en cause. Cependant, si ces protéinopathies sont liée à la présence d'une DTA, cet effet pourrait n'avoir que peu de conséquences cliniques voir même traduire un rôle neuroprotecteur selon les auteurs (Smith et al. 2002, Maltsev et al. 2013).

Ainsi, les atteintes cérébrales liées au vieillissement pourraient en fait mobiliser la production d'amyloïde et induire la phosphorylation de tau plutôt qu'en être les conséquences (Krstic et al. 2013). Un argument en faveur de cette hypothèse vient des sujets asymptomatiques qui présentent des amyloïdopathies et tauopathies similaires à celles des patients DTA, mais sans

déficits cognitifs (Iacono et al. 2014). Les différences dans l'expression clinique par rapport à l'étendue des protéinopathies s'expliqueraient alors par le génotype *APOE* ou par la présence de comorbidités comme des pathologies cérébrovasculaires (Monsell et al. 2013). En effet, l'A β dérivé des patients asymptomatiques possède une toxicité similaire à celle de l'A β dérivé de patients DTA, confirmant que les phénomènes amyloïdes présents chez les patients asymptomatiques ne diffèrent pas fondamentalement de ceux présents chez les patients DTA (Duran-Aniot et al. 2013). La question de l'implication réelle des protéinopathies dans la pathogénèse des DTA est pourtant d'une importance capitale au moment où les recherches thérapeutiques tendent à promouvoir un ciblage préclinique de l'amyloïdopathie, c'est-à-dire à un stade encore dénué d'atteinte cérébrale majeure (West et al. 2004, Castello et al. 2013). Même les effets des mutations familiales pourraient être indépendants de l'A β lui-même. En effet, ces mutations entraînent également des déficits de transport et de protéolyse endo-lysosomale et les mutations des présénilines altèrent le clivage de nombreuses protéines transmembranaires autres que l'APP (cadhérines, ephrines, Notch1, EphB...), ce qui pourrait perturber la transduction du signal de nombreuses voies cellulaires (Pimplikar et al. 2010).

Quoi qu'il en soit, il apparaît que le meilleur corrélat de l'apparition et du développement des déficits cognitifs reste l'ampleur des pertes synaptiques (Terry et al. 1991), celle-ci étant directement liée à la perturbation fonctionnelle des réseaux neuronaux concernés.

II.2. Altérations neuronales et synaptiques.

Dans les DTA, l'ampleur des pertes synaptiques jouerait un rôle central dans la genèse des déficits cognitifs, qu'elle soit causée par les protéinopathies ou par d'autres facteurs. Ainsi, les pertes synaptiques précoces au niveau du cortex entorhinal, de l'hippocampe, du néocortex (surtout frontal, pariétal) ainsi que dans le noyau basal de Meynert seraient responsables de l'apparition des troubles cognitifs (Masliah et al. 2001). Au-delà des pertes synaptiques, il faut également préciser que les DTA sont aussi caractérisées par des pertes neuronales qui joueraient un rôle central dans l'apparition des déficits cognitifs. En effet, si l'étendue de l'amyloïdopathie ou de la tauopathie ne permet pas de différencier les individus asymptomatiques des patients, la présence d'une perte neuronale serait spécifique des individus souffrant de symptômes cognitifs (Andrade-Moraes et al. 2013).

Ces pertes synaptiques et neuronales se traduiraient au niveau macroscopique par un patron d'atrophie caractéristique des DTA. Dans les stades de MCI, les zones les plus atrophiées sont donc le cortex entorhinal, l'hippocampe, l'amygdale et le cortex para-hippocampique (Fennema-Notestine et al. 2009). Plus précisément, les patients souffrant de la variante amnésique du MCI présenteraient une atrophie prépondérante du cortex entorhinal et de l'amygdale tandis que les autres MCI auraient plutôt des atrophies frontales (Bell-McGinty et al. 2005). L'atrophie du cortex entorhinal serait donc une marque caractéristique d'une DTA en cours de mise en place, ce qui n'est pas forcément le cas dans les formes familiales héréditaires de la maladie d'Alzheimer (Shibuya et al. 2012). Avec la conversion du MCI vers la DTA, l'atrophie s'étendrait ensuite au cortex pariétal inférieur, au cortex rétrospécial ainsi qu'au cortex frontal médian (Fennema-Notestine et al. 2009) et au thalamus (Roh et al. 2011). La conversion vers la démence serait ainsi caractérisée par une perturbation progressive des réseaux extra-hippocampiques et notamment des circuits préfrontaux (Carmichael et al. 2012).

II.2.1 Pertes dans la formation hippocampique.

L'atrophie de l'hippocampe deviendrait détectable environ 4 ans avant le diagnostic de DTA (Villemagne et al. 2013). Cependant, l'atrophie du cortex entorhinal et de l'hippocampe pourrait également accompagner le vieillissement normal (Kerchner et al. 2013), bien qu'elles soient particulièrement marquées chez les patients MCI en voie de convertir vers la démence (Stoub et al. 2010). Ces atrophies seraient dû à des pertes synaptiques précoces indépendantes de l'amyloïdopathie (Heinonen et al. 1995). Ces pertes synaptiques pourraient être directement liées à des pertes neuronales précoces dans le cortex entorhinal et le subiculum qui entraîneraient alors un isolement relatif de l'hippocampe de la plupart de ses entrées et sorties corticales, un phénomène conceptualisé en tant que « syndrome de déconnection hippocampique » (Hyman et al. 1984). En effet, s'il n'y a pas de pertes neuronales marquées dans le cortex entorhinal au cours du vieillissement normal ou des phases précliniques des DTA, l'apparition des déficits cognitifs coïnciderait avec la présence de pertes neuronales significatives (Price et al. 2001). Ces pertes neuronales entorhinales seraient, au moins en partie, dues à la tauopathie exacerbée touchant cette région (Hof et al. 2003) et causeraient directement les pertes synaptiques dans les couches hippocampiques recevant les entrées entorhinales (Hamos et al. 1989); ces pertes synaptiques seraient alors responsables des déficits cognitifs précoces (Sze et al. 1997).

II.2.2 Pertes cholinergiques.

On suspecte depuis longtemps l'existence d'un lien particulier entre les dysfonctionnements et les pertes des neurones cholinergiques, le vieillissement et la présence de déficits cognitifs (Bartus et al. 1982).

Cependant, il n'y aurait pas de perte franche de neurones cholinergiques durant le MCI et les phases précoces des DTA bien que, par la suite, la réduction du nombre de neurones cholinergiques soit corrélée à la sévérité de la démence (Gilmor et al. 1999). Malgré l'absence de pertes neuronales précoces, les neurones cholinergiques présenteraient une tauopathie précoce (Mesulam et al. 2004), mais à progression lente (Vana et al. 2011). Avec la progression des DTA, le nombre de neurones cholinergiques exprimant les récepteurs aux facteurs de croissance tyrosine kinase et p75^{NTR} diminue, ce qui suggère une perte de sensibilité des neurones cholinergiques aux facteurs neurotrophiques (Salehi et al. 1996, Mufson et al. 2000, Ginsberg et al. 2006). Ces altérations n'iraient pas de pair avec des pertes neuronales, mais plutôt avec des perturbations fonctionnelles des neurones cholinergiques (Mufson et al. 2002).

Au niveau des projections de ces neurones, certains dysfonctionnements cholinergiques (diminution de l'expression de la ChAT et des récepteurs muscariniques dans le néocortex) seraient présents dès les stades précliniques (Potter et al. 2011). Globalement, les cerveaux DTA avancés présentent des diminutions de l'expression des récepteurs nicotiques, malgré l'augmentation de l'expression du récepteur $\alpha 7$ nAChR dans l'hippocampe (Nordberg et al. 2001). De manière intéressante, ces $\alpha 7$ nAChRs pourraient être particulièrement impliqués dans la pathogénèse des DTA (Teaktong et al. 2003). En effet, les régions avec forte expression des $\alpha 7$ nAChRs sont également celles qui sont les plus sujettes à présenter une amyloïdopathie (Ikonomovic et al. 2009). L'amyloïdopathie pourrait être facilitée par

l'expression de l' $\alpha 7$ nAChRs celui-ci induisant l'endocytose neuronale de l'A β 1-42 (Nagele et al. 2002). L'A β oligomérique agissant en tant que ligand des $\alpha 7$ nAChRs (Lilja et al. 2011).

III. L'Apolipoprotéine E

L'apolipoprotéine E est la principale apolipoprotéine du système nerveux central. Elle y joue notamment un rôle dans l'endocytose des lipoprotéines et participe ainsi au transport du cholestérol et des autres lipides vers les neurones, où ceux-ci sont utilisés notamment pour la néo-synthèse membranaire nécessaire au *turn-over* synaptique et à la croissance neuritique ainsi que comme substrat. En plus de son rôle dans le transport des lipoprotéines, la liaison de l'ApoE avec ses récepteurs activerait également différentes voies de signalisations intracellulaires liées à ces récepteurs.

III.1. Génotype *APOE* et cognition

L'*APOE4* étant le principal facteur de risque génétique pour les DTA, de nombreuses études ont cherché à déterminer son impact sur la cognition, que ce soit chez l'Homme ou la Souris transgénique. Globalement, il apparaît que l'*APOE4* exerce un effet négatif sur la cognition notamment *via* l'augmentation du risque de présenter un vieillissement pathologique. Cependant, en début de vie l'*APOE4* n'aurait qu'un effet limité sur la cognition et il est même possible que l'*APOE4* induise une facilitation cognitive durant le développement précoce et les deux premières décennies de vie.

III.1.1 Isoformes de l'*APOE*

Chez l'homme, l'*APOE* est majoritairement présente sous la forme de trois allèles dénommés *APOE epsilon 2* (*APOE2*), *APOE epsilon 3* (*APOE3*) et *APOE epsilon 4* (*APOE4*). Ces allèles codent pour trois isoformes protéiques ApoE2, ApoE3 et ApoE4. L'*APOE3* est majoritaire dans la population normale, mais l'*APOE4* est surreprésenté dans les populations DTA (Tableau 3).

Tableau 3 : Fréquence des génotypes *APOE* aux Etats-unis et risque pour les DTA.
D'après Raber et al. 2004

Génotype	Fréquence dans la population normale (%)	Fréquence dans la Population DTA (%)	Risque de DTA induit par le génotype (%)
<i>E2/E2</i>	1	0.1	0.08
<i>E2/E3</i>	12	4	3.2
<i>E3/E3</i>	60	35	5.1
<i>E3/E4</i>	21	42	18
<i>E4/E4</i>	2	16	67

Les séquences des différents isoformes de l'ApoE ne diffèrent que par deux acides aminés en position 112 et 158, l'apoE2 ayant une cystéine à ces deux positions, l'apoE3 ayant une cystéine en position 112 et une arginine en position 158, et l'apoE4 ayant une arginine en 112 et en position 158. Ces différences minimales influenceraient cependant fortement les

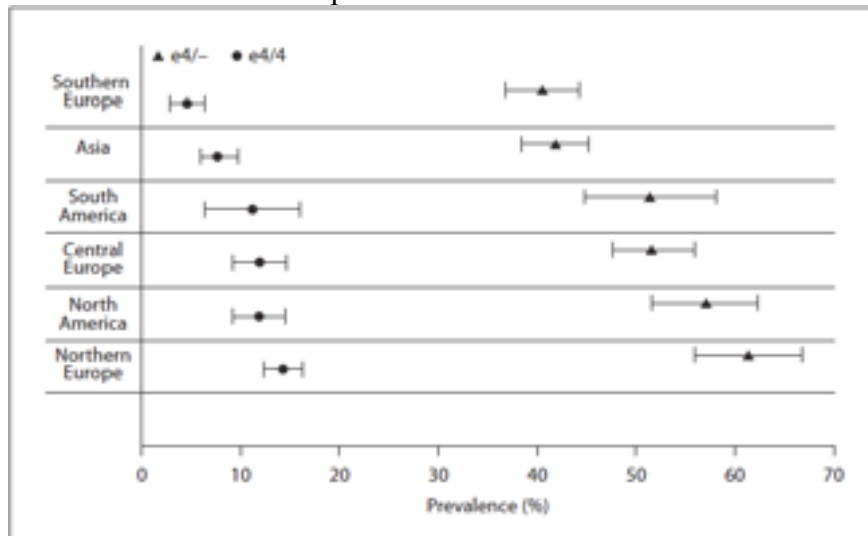
L'Apolipoprotéine E

propriétés de liaison de l'ApoE à ces récepteurs ainsi qu'aux lipoprotéines (Kim 2009). Ainsi, l'ApoE4 se lierait préférentiellement aux lipoprotéines de faible densité alors que l'ApoE3 et l'ApoE2 ont une préférence pour les lipoprotéines de haute densité (Dong et al. 1994). Ces différences pourraient expliquer pourquoi l'*APOE4* semble moins efficace que les deux autres allèles pour le transport du cholestérol et des lipides. Enfin, la spécificité structurale de l'*APOE4* induirait la capacité de rester de manière stable dans une conformation en globule de Molton, une conformation qui faciliterait l'agrégation de l'ApoE et altérerait sa liaison avec les lipides tout en facilitant sa dégradation et la genèse de fragments neurotoxiques (Zhong & Waisgraber 2009).

L'*APOE4* possède la plus grande homologie avec l'*APOE* des autres primates et elle serait l'allèle ancestral (Finch & Sapolsky 1999). En effet, il était déjà présent chez l'homme de Denisova (McIntosh et al. 2012), une lignée archaïque proche à la fois de l'homme de Neandertal et de l'homme anatomiquement moderne qui se serait apparié avec ces deux sous-espèces (Reich et al. 2010, Meyer et al. 2012). L'*APOE3* serait apparu avant l'émergence de l'*Homo Sapiens* il y a plus de 300 000 ans, tandis que l'*APOE2* serait plus récent avec un âge estimé à environ 200 000 ans (Finch & Sapolsky 1999). La fréquence de l'*APOE3* aurait commencé à augmenter il y a 200 000 ans (Fullerton et al. 2000), potentiellement en lien avec une adaptation à une diète enrichie en viande (Finch & Stanford 2004, Finch 2010). En effet, l'apparition chez l'Homme du polymorphisme de l'*APOE* coïnciderait avec celle d'autres polymorphismes modernes (*APOH*, *Prnp* codant pour la protéine prion...) qui induiraient tous une protection accrue contre les risques inhérents à une consommation importante de viande et de cerveaux mammaliens, voire même humains (hypercholestérolémie, risque d'infection par des pathologies à prions, virus, bactéries et autres protozoaires; Finch & Stanford 2004). De plus, le génotype *APOE* influence les réponses immunitaires, or l'infection chronique est la principale cause de mortalité (73% des décès) chez les chasseurs-cueilleurs (Finch 2010). Alternativement, l'augmentation de la prévalence des allèles *APOE3* et *APOE2* pourrait s'expliquer par l'avantage évolutif associé à un vieillissement non-pathologique, notamment en termes de soins donnés aux enfants par les membres âgés du groupe afin de décharger les membres plus jeunes (théorie des grands-mères, Finch & Sapolsky 1999).

La fréquence des différents génotypes *APOE* donnée dans le tableau 3 reprend les valeurs moyennes de la population américaine d'origine européenne. Cependant, à l'échelle mondiale, il y a une forte variation géographique dans la fréquence des différents génotypes *APOE* (Figure 5). Ainsi, en Europe, la proportion d'*APOE3* est la plus importante dans le bassin méditerranéen tandis que la fréquence la plus forte d'*APOE4* se retrouve dans les populations d'Europe du nord (Egert et al. 2012, Ward et al. 2012). De même, la fréquence de l'*APOE4* est relativement plus faible dans les populations d'Europe méridionale et d'Asie (Crean et al. 2011).

Figure 5 : Prévalence du génotype *APOE4* dans différentes régions du monde :
D'après Ward et al. 2012

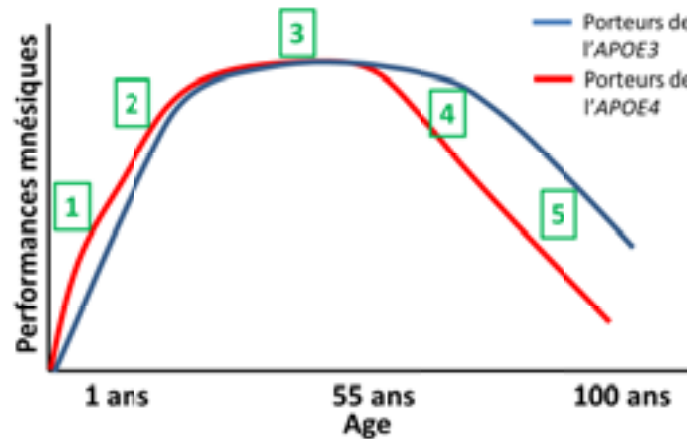


Ces différences géographiques pourraient s'expliquer en partie par les effets spécifiques de l'*APOE4* sur le métabolisme du cholestérol. En effet, l'*APOE4* augmente les niveaux de cholestérol circulants et sous les latitudes les plus froides ou les plus chaudes, le fort taux métabolique nécessiterait plus de cholestérol. De plus, cette répartition allélique se serait mise en place à une époque où le mode de vie frugal (chasseur-cueilleur) n'était pas associé à une exposition à des taux de cholestérol aussi importants que ceux de la diète moderne (Eisenberg et al. 2010). Un autre facteur environnemental pouvant influencer positivement la sélection du génotype *APOE4* serait l'exposition au paludisme. En effet, la proportion d'*APOE4* est souvent élevée dans les populations vivant dans des zones connaissant un état de malaria endémique et le sérum dérivé de sujets porteurs de l'*APOE4* inhibe la croissance du parasite *P.Falciparum* responsable du paludisme (Fujioka et al. 2013).

III.1.2. *APOE4* et cognition, un exemple de pléiotropie antagoniste ?

Avec le vieillissement, l'*APOE4* est associée non seulement à diverses pathologies neurodégénératives, mais également à des pathologies cardio-vasculaires graves comme l'athérosclérose. Il peut donc sembler étrange que cet allèle se soit maintenu au cours de l'évolution. L'*APOE4* serait en fait un bon exemple de l'effet de pléiotropie antagoniste, un mécanisme évolutif par lequel un allèle représentant un facteur de risque important pour des pathologies liées à la sénescence reste positivement sélectionné de par ses effets positifs sur la survie durant la jeunesse (Williams 1957). En effet, l'*APOE4* exercerait plutôt une influence positive sur la cognition durant la petite enfance (Wright et al. 2003), il induirait encore un avantage cognitif significatif en début de vie (Han et al. 2007a, Mondadori et al. 2007), puis il serait associé à des déficits cognitifs durant le vieillissement (figure 6, Han et al. 2008, Deary et al. 2002). Ainsi, l'effet positif de l'*APOE4* sur la cognition serait encore détectable à la vingtaine, mais dès la cinquantaine un léger déclin mnésique devient détectable (Schultz et al. 2008). Cependant, cet effet de pléiotropie antagoniste reste discuté (Ihle et al. 2012) et n'a pas été franchement étudié dans les modèles transgéniques exprimant les différentes isoformes de l'ApoE.

Figure 6 : Performances mnésiques et allèles APOE3 et APOE4



L'influence de l'APOE4 sur les performances mnésiques et plus largement sur les capacités cognitives illustre bien le phénomène d'antagonisme pléiotropique. 1/ en début de vie, l'APOE4 faciliterait le développement, notamment dans le cadre de conditions de vie difficiles. 2/ jusqu'à 20-25 ans, les porteurs de l'APOE4 peuvent avoir des performances légèrement plus élevées que les porteurs de l'APOE3. 3/ en milieu de vie, les sujets APOE3 et APOE4 ne diffèrent pas significativement l'un de l'autre. 4/ vers 55-60 ans, le déclin mnésique débute précocement chez les porteurs de l'APOE4, tandis que les porteurs de l'APOE3 maintiendraient plus longtemps leurs performances (potentiellement via la compensation des effets délétères liés au vieillissement). 5/ en fin de vie, l'APOE4 n'influencerait pas significativement la vitesse de déclin cognitif par rapport à l'APOE3.

En début de vie, l'APOE4 réduirait le risque de fausse couche (Zetterberg et al. 2002) de même que la mortalité périnatale (Becher et al. 2006) et faciliterait le développement cognitif durant les deux premières années de vie (Oria et al. 2005). Aux alentours de la vingtaine, les sujets porteurs de l'APOE4 ont un QI plus élevé que les non-porteurs (Yu et al. 2000), font plus souvent de hautes études que les APOE2 (Hubacek et al. 2001) et ont de meilleures performances cognitives (Puttonen et al. 2003 ; Mondadori et al. 2007). De manière intéressante, il apparaît que les souris transgéniques APOE4 jeunes présentent une LTP plus importante dans l'hippocampe, ce qui pourrait concourir à de meilleures capacités d'apprentissage (Kitamura et al. 2004). Cependant, chez l'humain, l'APOE4 pourrait déjà avoir un effet négatif sur la cognition si un historique de DTA existe dans la famille (Bloss et al. 2008), ce qui suggère la présence de facteurs héréditaires supplémentaires influençant la cognition chez les APOE4. Ces effets positifs se tassent ensuite et chez l'individu adulte il n'y aurait pas de différences cognitives franches entre les porteurs de l'APOE4 et le reste de la population (Alexander et al. 2007).

Avec le vieillissement normal, l'APOE4 commencerait à être associé à des troubles cognitifs. Cet effet négatif de l'APOE4 serait surtout marqué au début du vieillissement et spécifique à certains domaines, notamment la mémoire épisodique (Liu et al. 2010) et les fonctions exécutives (Small et al. 2004). Ces effets négatifs prennent place malgré une compensation passant par le recrutement d'aires cérébrales additionnelles pour répondre aux besoins des tâches épisodiques (Han et al. 2007a). Si les tests neuropsychologiques classiques peuvent manquer de sensibilité, les porteurs APOE4 âgés présenteraient notamment des déficits de reconnaissance d'objets et de navigation spatiale (Bertheau-Pavy et al. 2007). L'effet de l'APOE4 consisterait à précipiter le déclin en mémoire épisodique, celui-ci se manifestant vers la cinquantaine chez les porteurs contre la septantaine chez les non-porteurs (Caselli et al. 2009). Ces déficits pourraient s'expliquer par des perturbations spécifiques au niveau du cortex orbitofrontal et du cortex pariétal latéral (Brown et al. 2011), bien que l'incidence de la

démence chez ces porteurs *APOE4* puisse également expliquer ces effets cognitifs (Praetorius et al. 2013). En effet, d'après une étude menée chez 764 sujets contrôles, 131 patients MCI et 168 patients DTA, l'*APOE4* n'influence pas significativement les performances chez les sujets âgés sains si on prend en compte l'effet lié aux DTA (Foster et al. 2013).

Ainsi, c'est sur le déclin cognitif pathologique que l'influence de l'*APOE4* est la plus claire. L'*APOE4* est associé à une augmentation du risque de présenter une DTA et induit une déclaration de la pathologie plus précoce d'environ 10 ans par allèle (Corder et al. 1993). Ces effets seraient d'autant plus marqués chez les femmes (Beydoun et al. 2012, Altman et al. 2014). Cependant, si l'*APOE4* précipite l'apparition des symptômes, son influence sur la vitesse de progression de la pathologie est moindre (Roses et al. 1996). Au-delà du vieillissement, l'influence négative de l'*APOE4* sur la cognition pourrait dépendre de la présence de dommages cérébraux. En effet, l'*APOE4* augmente la sévérité des déficits neurologiques chroniques dans le cadre de la démence pugilistique (Jordan et al. 1997) et chez les joueurs de football américain (Kutner et al. 2000). De plus, l'*APOE4* est associée à un retard de la récupération cognitive et neurologique après traumatismes crâniens (Friedman et al. 1999), un résultat confirmé expérimentalement chez la souris transgénique (Sabo et al. 2000, Bennet et al. 2013). Ces effets négatifs de l'*APOE4* seraient médié par un retard de récupération plus que par une sensibilité initiale à l'atteinte plus importante (Zhou et al. 2008). L'étude d'expression des gènes après traumatisme crânien expérimental chez la Souris suggère d'ailleurs que la mauvaise récupération associée à l'*APOE4* serait plus liée à un défaut de réparation neuronale qu'à l'activation de mécanismes pathologiques (Crawford et al. 2009). Quoiqu'il en soit, ce retard de récupération resterait tout de même sensible au vieillissement chez l'Homme, les porteurs de l'*APOE4* âgés de 20 à 25 ans présentant une récupération normale voire meilleure après traumatisme crânien (Han et al. 2007b).

III.1.3 Effets cognitifs de l'*APOE4* chez la Souris transgénique

Les effets de l'*APOE4* sur la cognition chez la Souris sont influencés par l'âge, le sexe et le type de constructions transgéniques. En effet, il existe trois grandes familles de lignées transgéniques exprimant des isoformes humaines de l'*APOE*, soit spécifiquement dans les astrocytes (sous le contrôle du promoteur du *GFAP*), soit spécifiquement dans les neurones (sous le contrôle du promoteur de l'énolase neuronale, *NSE*), soit enfin sous le contrôle du promoteur de l'*APOE* (souris KI ou *targeted replacement*, TR) ce dernier model permettant une expression physiologiquement régulée de l'*APOE*. Il est à noter que la souris ne possède qu'une forme d'ApoE qui partagerait les propriétés physiologiques de l'ApoE4 (également 2 arginines en positions 112 et 158 ; Rajavashisth et al. 1985) et de l'ApoE3 (thréonine commune en position 61 qui est critique pour la conformation spatiale de la protéine ; Weisgraber & Mahley 1996)

Chez les souris *APOE4-GFAP*, des déficits en mémoire de travail en labyrinthe radial sont présents vers 11-14 mois en absence d'une quelconque pathologie amyloïde (Hartman et al. 2001), bien que des déficits partiels de navigation puissent être présents chez les femelles dès 6 mois (VanMeer et al. 2007). Chez les souris *APOE4-NSE*, les déficits spatiaux apparaîtraient plus précocement dès 6-8 mois chez les femelles (Raber et al. 2002). Chez les souris *APOE-TR* enfin, les souris femelles *APOE4* ont des déficits de localisation d'objets vers 4-8 mois (Grootendorst et al. 2004, Kornecook et al. 2009) et présentent des déficits de navigation en piscine de Morris vers 15 mois (Bour et al. 2008). Il apparaît donc que

l'expression neuronale de l'ApoE4 est potentiellement toxique et que les souris femelles sont plus sensibles aux effets spontanés de l'*APOE4* sur la cognition.

Ainsi, chez la souris, l'*APOE4* induirait des déficits spontanés plutôt modérés se développant avec l'âge, notamment chez les femelles. Au moment où débutait ce travail, l'hypothèse de l'antagonisme pléiotropique n'avait pas encore été évaluée dans ces modèles transgéniques et cela a motivé la première étude de mon travail ([Publication n°1](#)).

III.1.4 *APOE4*, atteintes cérébrales et des troubles cognitifs liées aux DTA.

Les effets cliniques de la présence de l'*APOE4* nous renseignent indirectement sur le rôle potentiel de cet allèle dans la pathogénèse des DTA. Il apparaît ainsi que l'*APOE4* joue un rôle négatif essentiellement durant les phases précoces de la pathologie. De plus, l'*APOE4* outre son effet facilitateur de l'apparition des troubles cognitifs, perturberait spécifiquement certaines fonctions en lien avec certaines atteintes cérébrales.

Il est possible que la population DTA porteuse de l'*APOE4* représente ainsi une pathologie à part. En effet, les patients *APOE4* diffèrent des autres au niveau des zones cérébrales les plus touchées et en termes de troubles cognitifs associées. L'*APOE4* favoriserait en fait surtout des déficits mnésiques de type DTA et n'aurait pas d'effet négatif significatif sur d'autres types de démence ([Rogalski et al. 2011](#)). Les patients DTA porteurs de l'*APOE4* présentent ainsi une atrophie exacerbée du lobe temporal médian en association avec des troubles mnésiques prédominants, tandis que les non-porteurs auraient plutôt des déficits de mémoire de travail, de contrôle exécutif et d'accès lexical en association avec une atrophie à prédominance fronto-pariétale ([Wolk et al. 2010](#)). De plus, les sujets *APOE4* présenteraient précocement des déficits de navigation et d'orientation spatiale ([Laczo et al. 2010](#)) associés à des déficits de reconnaissance d'objets ([Bertheau-Pavy et al. 2007](#)). Le néocortex temporal serait donc une des cibles privilégiées de l'*APOE4* ([De Léon et al. 2001](#)), de même que l'hippocampe qui est plus atrophié chez les porteurs ([Manning et al. 2014](#)). Au niveau de la formation hippocampique, si vieillissement normal et DTA induisent surtout des atrophies du cortex entorhinal, du subiculum, de CA1 et de CA2, la présence de l'*APOE4* est associée à une atteinte encore plus marquée du gyrus denté (DG) et de CA3. L'*APOE4* induirait la plupart de ses effets négatifs pendant les phases précoces des DTA, donc potentiellement durant une période spécifique de la pathogénèse. En effet, l'*APOE4* est un facteur de risque important pour le développement d'un MCI, mais n'influencerait pas le risque de transition vers les DTA ([Brainerd et al. 2013](#)), sauf en cas d'homozygotie qui augmente le risque de conversion et l'accélère de 3 ans ([Xu et al. 2013](#)). Une fois la DTA déclarée, l'*APOE4* n'influencerait plus significativement le taux de déclin cognitif ([Corder et al. 1995](#), [Growdon et al. 1996](#)), même en prenant en compte les homozygotes ([Dal Forno et al. 1996](#)). Paradoxalement, il apparaîtrait même que les homozygotes *E4/E4* présenteraient potentiellement un déclin cognitif plus lent, ce qui suggère que différents mécanismes sont impliqués dans la mise en place d'une part et dans la progression de la DTA d'autre part ([Hoyt et al. 2005](#)).

Ainsi, l'*APOE4* accélérerait bien la progression de la pathologie, mais spécifiquement durant les phases les plus précoces précédant ou entourant la déclaration des troubles ([Cosentino et al. 2008](#), [Foster et al. 2013](#)). Cet effet suggère que l'*APOE4* impacte plus particulièrement les processus biologiques sous-tendant ces premières étapes de mise en place des déficits cognitifs comme durant le MCI. De manière intéressante, il semblerait qu'il y ait justement une surexpression de l'ApoE spécifiquement durant les phases les plus précoces des DTA, ce

qui semble confirmer que l'ApoE participe activement aux processus mis en jeu dans les phases précoces, notamment dans le cadre du MCI (Glöckner et al. 2002). Se pose alors la question du (ou des) processus sur le(s)quel(s) l'*APOE4* induit ces effets négatifs.

III.2. Une protéine pléiotropique

L'*APOE4* est souvent présentée comme un facteur précipitant l'apparition des protéinopathies caractéristiques des DTA (Ohm et al. 1995). Cependant, au-delà de ces effets sur l'A β et la phosphorylation de tau, l'*APOE4* pourrait également induire une part non négligeable de ces effets pathologiques *via* son influence sur le transport du cholestérol, voire par une toxicité directe notamment dans le cas d'accumulations intra-neurales (Huang 2010).

III.2.1. Régulations de l'expression de l'ApoE

On a vu que l'expression protéique de l'ApoE est augmentée durant les phases précoces des DTA. Or, différents facteurs pourraient moduler l'expression de l'ApoE et notamment son expression neuronale qui serait la plus toxique. En effet, à l'état normal l'ApoE est surtout produite au niveau des cellules gliales.

Les œstrogènes induisent l'expression de l'ApoE dans les astrocytes et les microglies (Stone et al. 1997), notamment dans l'hippocampe et l'hypothalamus (Stone et al. 1998). Or ces structures connaissent des remodelages synaptiques transitoires durant le proestrus (Desmond & Levy 1997) et l'ApoE serait justement impliquée dans le transport du cholestérol et des lipides nécessaires à la synaptogénèse (Mahley 1988, Poirier et al. 1995). Ce type de régulation serait également possible chez l'individu mâle, la testostérone pouvant être convertie en œstrogène localement par les astrocytes. Normalement, l'expression de l'ApoE est essentiellement astrocytaire. Cependant, les stress neuronaux induisent l'expression neuronale de l'ApoE (Mahley et al. 2012) or, avec l'*apoE4*, cette expression neuronale serait toxique (Buttini et al. 2000). En effet, la structure de l'*apoE4* la rend particulièrement sensible à une protéolyse neuronale générant des fragments neurotoxiques (Huang et al. 2001; Brecht 2004; Harris 2003). Ces fragments d'ApoE s'accumulent dans les cerveaux de patients DTA et cela d'autant plus chez les porteurs de l'*APOE4* (Harris et al 2003).

Les niveaux d'expression de l'ApoE augmentent dans le cadre de blessures cérébrales (Lendon et al. 2000), celles-ci pouvant nécessiter une mobilisation du transport du cholestérol et des lipides afin de protéger les neurones face à l'apoptose (Hayashi et al. 2007), l'excitotoxicité (Buttini et al. 2010) ou encore pour faciliter la réparation neuronale (May et al. 1990, Poirier et al. 1991a, 1991b). A noter également que, chez l'Homme, l'augmentation de l'expression de l'ApoE concernerait spécifiquement les stades précoces Braak I/Braak II (Glöckner et al. 2002). Cette augmentation des niveaux d'ApoE jouerait un rôle protecteur, voire de compensation, car elle n'est pas significative chez les patients *APOE4* (Glöckner et al. 2002).

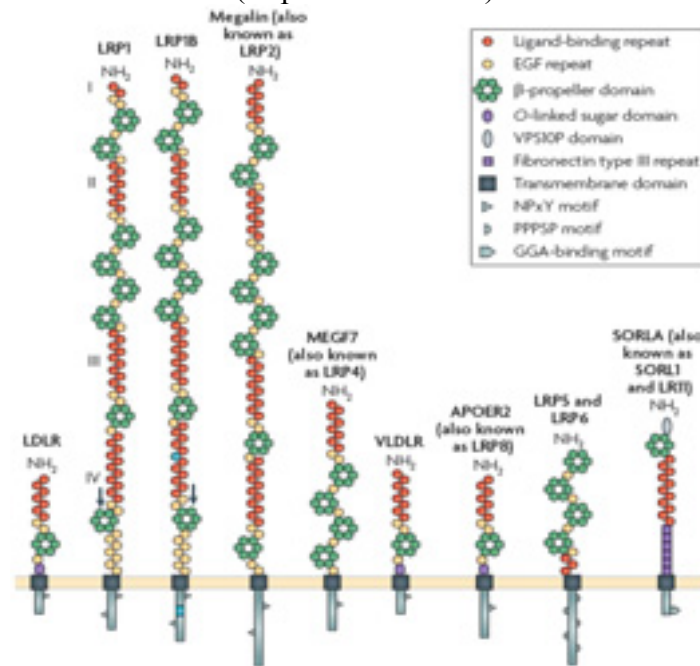
III.2.2 Transport du cholestérol, synaptogénèse et remodelages dendritiques.

Les neurones ont des besoins importants de cholestérol, notamment pour la synthèse membranaire et en tant que substrat pour la biosynthèse. Le métabolisme du cholestérol joue donc un rôle important dans les phénomènes de synaptogénèse, de stabilisation des synapses et de remodelage dendritiques (Leduc et al. 2010, Pfrieger 2010).

Les neurones peuvent obtenir du cholestérol par deux voies, soit une synthèse *in situ* soit par utilisation du cholestérol dérivé des lipoprotéines. A l'âge adulte, les neurones reposeraient essentiellement sur la capture de lipoprotéines générées par les astrocytes, car ils sont moins efficaces que ceux-ci dans la synthèse de cholestérol (Pfrieger et al. 2011) et leurs neurites peuvent être très éloignées du corps cellulaire (Mauch et al. 2001). L'ApoE étant la principale apolipoprotéine du système nerveux central, elle y joue donc un rôle capital pour soutenir les remodelages membranaires nécessaires au *turn-over* synaptique normal (Pfrieger et al. 2011) ainsi qu'aux remodelages neuritiques et synaptiques supportant la réorganisation des réseaux neuronaux en réponse à la présence de lésions (May et al. 1990, Poirier et al. 1991a, 1991b). Les lipoprotéines sont produites par les astrocytes finement associées avec les synapses (Priegler 2010, Pfrieger et al. 2011). Dans ces astrocytes, le transporteur ABCA1 et la lipoprotéine lipase regroupent cholestérol, ApoE et phospholipides pour former des lipoprotéines. Ces lipoprotéines sont ensuite sécrétées dans le milieu extracellulaire où elles vont pouvoir être internalisées *via* les récepteurs aux lipoprotéines et délivrer lipides et cholestérol (Michikawa et al. 2000 ; Hirsch-Reinshagen et al. 2005 ; Blain et al. 2004). Signalons également que, l'ApoE3 et l'ApoE2 seraient deux fois plus efficaces que l'ApoE4 dans ce rôle de transport du cholestérol vers les neurones (Gong et al. 2002 ; Rapp et al. 2006). Cette différence pourrait expliquer pourquoi, l'ApoE4 est associé avec l'âge à des pertes synaptiques spontanées dans l'hippocampe et l'amygdale des souris transgéniques (Cambon et al. 2000 ; Ji et al. 2003 ; Wang et al. 2005, Klein et al. 2010).

Cependant, la liaison de l'ApoE avec ses récepteurs active également leurs voies de signalisation cellulaires. Celles-ci peuvent en elles-mêmes contribuer aux effets de l'ApoE4 indépendants du transport du cholestérol ou des lipides (Figure 7, revue dans Bu 2009).

Figure 7 : Principaux récepteurs de l'APOE
(Repris de Bu 2009)



LDLR (low-density lipoprotein receptor) : joue notamment un rôle d'internalisation des lipoprotéines dans les neurones et glies. L'ApoE doit être associée à des lipides pour pouvoir se lier à LDLR. Ce récepteur jouerait également un rôle dans la clairance de l'Aβ.

LRP1 (lipoprotein receptor-related protein 1) : Le principal récepteur neuronal pour l'ApoE dans le SNC ; il joue donc un rôle capital dans le métabolisme des lipoprotéines et du cholestérol. Celui-ci se lie aussi avec l'APP et l'Aβ et régulerait le métabolisme de l'Aβ et de l'APP. Le domaine intracellulaire de l'APP, l'AICD, inhiberait la transcription de LRP1. Chez la souris transgénique, l'apoE4 induirait l'expression de LRP1 dans les neurones de CA1 en présence d'une augmentation d'Aβ, ce qui faciliterait l'accumulation intracellulaire d'Aβ (Gilat-Frenkel et al. 2013). LRP1 jouerait également un rôle dans le maintien de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique et de la transmission synaptique.

LRP1B : antagonise les effets de LRP1 avec lequel il partage ses ligands

Mégaline (ou LRP2) : récepteur de l'ApoE, ApoB, ApoJ et de l'albumine ; fortement impliqué dans l'homéostasie du cholestérol pendant l'embryogénèse et dans la voie de signalisation sonic hedgehog.

MEGF7 (ou LRP4) : récepteur de l'ApoE et de l'agrénine ; participerait à la formation des synapses neuromusculaires.

APOER2 (ou LRP8) : récepteur à la reeline, à l'ApoE et à la lipoprotéine lipase ; LRP8 serait impliqué notamment dans la migration neuronale, le transport de l'APP, le développement du SNC ainsi que dans la synaptogénèse et la stabilisation des épines dendritiques (Dumanis et al. 2011). ApoER2 se lie aux récepteurs NMDA et AMPA à la membrane cellulaire et pourrait les stabiliser. Cependant, lorsque l'ApoE se lie à la reeline, elle induirait l'internalisation du complexe formé par l'ApoER2 avec les récepteurs NMDA et AMPA. L'ApoE4 induirait une séquestration de ces complexes dans les compartiments intracellulaires et réduirait la capacité de la reeline à augmenter l'activité de ces récepteurs glutamatergiques (Chen et al. 2010).

LRP5 et 6 : corécepteurs de Wnt ; régule développement embryonnaire et survie des cellules souches.

SorLA (lipoprotéine receptor with 11 binding repeats ou LR11) : récepteur neuronal de l'ApoE et de l'APP. Son expression diminuerait dans les DTA parallèlement à l'augmentation d'Aβ (des polymorphismes de SorLA font d'ailleurs partie des facteurs de risque génétiques pour les DTA). SorLA séquestrerait l'APP dans le réseau trans-golgien et réduirait ainsi son expression à la membrane. Il jouerait également un rôle dans la neurogénèse.

III.2.3 ApoE et Protéinopathies

III.2.3.1 ApoE et Amyloïdopathie

Chez l'Homme, quel que soit le statut clinique, l'*APOE4* est associé à une augmentation de la charge amyloïde durant le vieillissement (Walker et al. 2000, Vermuri et al. 2010), notamment entre 40 et 59 ans (Morshima-Kawashima et al. 2000).

Chez la souris double transgénique exprimant de l'APP avec des mutations Alzheimer et de l'ApoE humaine, l'*APOE4* potentialise aussi les dépôts amyloïdes, mais moins que l'*APOE* murine (Holtzman et al. 1999, Zepa et al. 2011). Dans l'hippocampe, l'*APOE* faciliterait l'accumulation de l'amyloïde préférentiellement au niveau des terminaisons des voies perforantes en provenance du cortex entorhinal (Fagan et al. 2002, Bien-Ly et al. 2012). Cependant, si *in vitro* toutes les isoformes de l'ApoE ont un effet pro-agrégant, la particularité de l'ApoE4 serait de stabiliser l'Aβ dans une conformation oligomérique (Cerf et al. 2011). En effet, il apparaît que les niveaux d'oligomères d'Aβ chez les patients sont dépendants du génotype *APOE* (apoE4>apoE3>apoE2; Hashimoto et al. 2012) et l'*APOE4* induirait notamment l'accumulation des oligomères au niveau des synapses (Koffie et al. 2012, Belinson et al. 2010).

L'ApoE influencerait également la clairance de l'Aβ, mais l'ApoE4 serait moins efficace que l'ApoE3 dans l'élimination de l'Aβ du parenchyme (Bachmeier et al. 2012). Il apparaît cependant que cet effet sur la clairance de l'Aβ serait indirect car l'ApoE n'interagirait que peu directement avec l'Aβ. En fait, l'ApoE serait en compétition avec l'Aβ pour l'endocytose astrocytaire *via* notamment leur récepteur commun LRP1 (Verghese et al. 2013).

III.2.3.2 ApoE et Tauopathie

Chez le patient, l'*APOE4* entraînerait une apparition plus précoce de la tauopathie (Ghebremedhin et al. 1998 ; Leoni 2001).

Cependant, chez la souris transgénique *APOE-TR*, l'*APOE4* affecte le pattern de phosphorylation de tau, mais sans induire de tauopathie (Kobayashi et al. 2003), ce qui pourrait s'expliquer par les différences de séquences entre tau humain et murin. Par contre, l'absence d'ApoE chez la Souris entraîne bien une hyperphosphorylation de tau (Genis et al. 2000), suggérant que le rôle de l'ApoE est d'inhiber la phosphorylation de tau. En effet, *in vitro*, l'ApoE est capable de se lier directement avec la protéine tau et d'inhiber sa phosphorylation, mais il apparaît que l'ApoE3 serait plus efficace que l'ApoE4 (Strittmatter et al. 1994). De plus, l'ApoE inhiberait l'activité des principales kinases impliquées dans la phosphorylation de tau et là encore, l'*APOE4* serait moins efficace que l'*APOE3* (Hoe et al. 2006).

L'expression neuronale de l'*APOE4* potentialiserait la phosphorylation de tau. En effet, des neurones en culture avec de l'ApoE4 lipidifiée présentent des perturbations du cytosquelette associées à des déficits de croissance neuritique (Nathan et al 1994 ; 1995). Or, l'ApoE4 induirait une hyperphosphorylation de tau uniquement lorsqu'elle est exprimée dans les neurones, un effet qui serait dû à la genèse des fragments neurotoxiques de l'apoE4

(Andrews-Zwilling et al. 2010 ; Harris et al. 2003). En effet, l'ApoE neuronale subirait un clivage en C-terminal générant des fragments d'ApoE (ApoE Δ Cterm ; Huang et al. 2001). Or, cet ApoE Δ Cterm interagirait directement avec la protéine tau hyperphosphorylée et faciliterait sa fibrillarisation et donc le développement des dégénérescences neuro-fibrillaires et ultimement la mort neuronale (Huang et al. 2001 ; Harris et al. 2003). L'ApoE4 serait l'isoforme la plus susceptible à ce clivage, que ce soit chez la Souris ou chez le patient DTA. De plus, l'expression neuronale des fragments ApoE4 Δ Cterm chez la Souris induit une neurodégénérescence et des déficits de navigation spatiale en piscine de Morris (Huang et al. 2001 ; Harris et al. 2003). Cela pourrait expliquer le fait que les souris NSE-apoE4 sont plus atteintes que les autres lignées transgéniques d'un point de vue des neurodégénérescence et des déficits cognitifs (Buttini et al. 1999 ; Raber et al. 1998 et 2000). Par ailleurs, cette pathologie de fragmentation neurotoxique de l'ApoE4 serait spécifique des interneurons GABAergiques du gyrus denté de l'hippocampe en lien avec une diminution de la neurogénèse (Li et al. 2009) et l'apparition de déficits mnésiques (Andrews-Zwilling et al. 2010).

III.3. APOE et neurodégénérescence...

Au-delà de l'effet de l'*APOE4* sur les DTA, il faut noter que cet allèle influence également le risque ou la progression d'autres pathologies neurodégénératives. En effet, l'étude de 324 familles parkinsoniennes a permis de démontrer que l'*APOE4* augmente le risque de démence dans la maladie de Parkinson et induit une apparition plus précoce des symptômes cognitifs (Pankratz et al. 2006). De plus, l'*APOE4* modulerait la symptomatologie dans diverses pathologies (Engelborghs et al. 2006) et entraînerait la co-occurrence de dégénérescences de type DTA dans les tauopathies et synucléinopathies (Josephs et al. 2004). La pathogénèse de la maladie de Parkinson serait d'ailleurs moléculairement liée à celle des DTA, la surexpression de l' α -synucléine induisant l'expression d'ApoE et d'A β tandis que la délétion de l'ApoE réduit l'accumulation de l' α -synucléine et de l'A β (Gallardo et al. 2008). A l'inverse, le génotype *APOE4* contribuerait à la présence de pathologie à corps de Lewis dans les DTA (Tsuang et al. 2005), augmenterait le risque d'accident vasculaire (Slooter et al. 1997), d'hémorragie intracérébrale (Greenberg et al. 1995, O'Donnell et al. 2000) et d'infarctus cérébral (Schneider et al. 2005 ; Hultman et al. 2013).

Plus largement, le génotype *APOE4* influencerait le risque pour de nombreuses neurodégénérescences qui sont associées à différentes protéinopathies (tableau 4), bien que les résultats puissent être contradictoires en fonction de la taille des échantillons.

Table 4 : Influence du génotype *APOE4* sur les principales pathologies neurodégénératives
(D'après Verghese et al. 2011 et Leduc et al. 2011)

Neurodégénérescence	Protéinopathies caractéristique	Importance des troubles déments	Influence de l' <i>APOE4</i> sur le risque	Influence de l' <i>APOE4</i> sur la progression
DTA	A β , tau	++	Augmente	Accélère
Traumatismes crâniens	A β , tau	variable		Retarde la rémission
Maladie de Pick	tau	++	Augmente	Accélère
Parkinson Démence	α -synucléine	++	Augmente	Accélère
Sclérose latérale amyotrophique	α -synucléine, tau	5% avec démence frontotemporale	Augmente	Accélère
Maladie à corps de Lewi	α -synucléine, A β , tau	++	Augmente	Accélère
Démence cortico-basale	tau	++	Augmente	Neutre
Sclérose en plaques		+	Augmente	Neutre
Atrophie multi-systématisée	α -synucléine, tau	+	Neutre	Retarde
Huntington	huntingtine	+	Neutre	Retarde
Paralysie supranucléaire progressive	tau	+	Neutre (risque quand <i>APOE2</i>)	?
Dégénérescence Maculaire liée à l'âge	A β	-	Diminue	Retarde

Si l'*APOE4* est généralement vu comme un facteur de risque pour les différents types de pathologies neurodégénératives, il apparaît également que cet allèle est protecteur ou ralentirait la progression d'une partie d'entre elles. Ces effets différentiels s'observent malgré la présence des mêmes protéinopathies que celles associées aux DTA. Ainsi, il apparaît que l'ApoE4 pourrait influencer ces pathologies par d'autres mécanismes. Un candidat potentiel serait la modulation des réorganisations des circuits neuronaux touchés par ces pathologies (voir le chapitre 3).

Principaux points abordés dans le chapitre 1 :

Les démences de type Alzheimer sont des pathologies neurodégénératives multifactorielles influencées par les interactions entre de multiples facteurs de risques génétiques et environnementaux.

Généralement, la pathogénèse des démences de type Alzheimer est expliquée par l'accumulation de peptide β -amyloïde et de protéine tau hyperphosphorylée. Cependant, ces protéinopathies pourraient également représenter des mécanismes de défense face à l'accumulation de lésions et autres dysfonctionnements neuronaux. En effet, il semblerait que c'est surtout les pertes synaptiques et neuronales qui sont à l'origine des déficits cognitifs.

Le génotype *APOE4* est le plus puissant facteur de risque génétique pour les démences de type Alzheimer et il induirait ces effets délétères notamment au cours des phases précoces de la pathologie. Cependant, il faut remarquer que l'*APOE4* influence le risque de développer de nombreuses pathologies neurodégénératives. Cet effet non-spécifiques suggèrent que l'*APOE4* pourrait en fait induire de moindre capacités de résistance à l'avancé des pathologies neurodégénératives en général et aux démences de type Alzheimer en particulier.

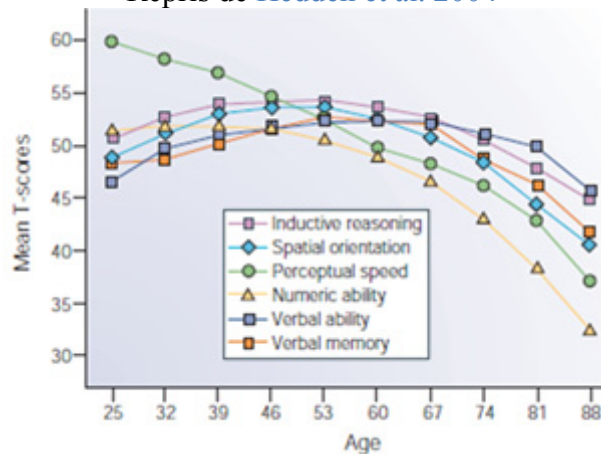
CHAPITRE 1:
L'Apolipoprotéine E

Mémoire, formation hippocampique et système cholinergique

Le vieillissement, qu'il soit pathologique ou normal, serait associé à un déclin progressif des fonctions mnésiques. Cependant, il est difficile de séparer la contribution du vieillissement normal de celle du vieillissement pathologique, d'autant plus que ce dernier est souvent caractérisé par une longue phase préclinique. Le vieillissement normal serait notamment accompagné d'un déclin de la mémoire épisodique (mémoire des épisodes et des faits dans leur contexte spatial et temporel), de la mémoire de travail. Cependant, la mémoire à court terme, la mémoire autobiographique (souvenirs personnels), les connaissances sémantiques et les traitements émotionnels resteraient plus stables. Les études longitudinales suggèrent que la plupart des performances cognitives resteraient stables au moins entre 20 et 60 ans (Hedden et al. 2004, figure 8).

Figure 8 : Estimation des changements cognitifs liés au vieillissement.

Repris de Hedden et al. 2004



Les premières fonctions à décliner au-delà de 60 ans sont l'orientation spatiale et la mémoire verbale (notamment épisodique). Or, ces fonctions cognitives impliquent fortement les réseaux neuronaux de la formation hippocampique (Small et al. 2002), un ensemble de régions du lobe temporal caractérisé par un déclin métabolique au cours du vieillissement normal (notamment dans le DG et le subiculum) et du vieillissement pathologique des DTA (cortex entorhinal, CA1). Cependant, dans le cadre du vieillissement normal, ces atteintes fonctionnelles ne seraient pas associées à des pertes neuronales marquées, contrairement à la situation observée dans les DTA (Calhoun et al. 1998). Ainsi, dans les DTA, si les premières fonctions mnésiques touchées sont également l'orientation spatiale, la mémoire de reconnaissance des objets et la mémoire épisodique, ces déficits seraient liés aux pertes neuronales dans la formation hippocampique et aux perturbations des réseaux neuronaux qui y sont associés.

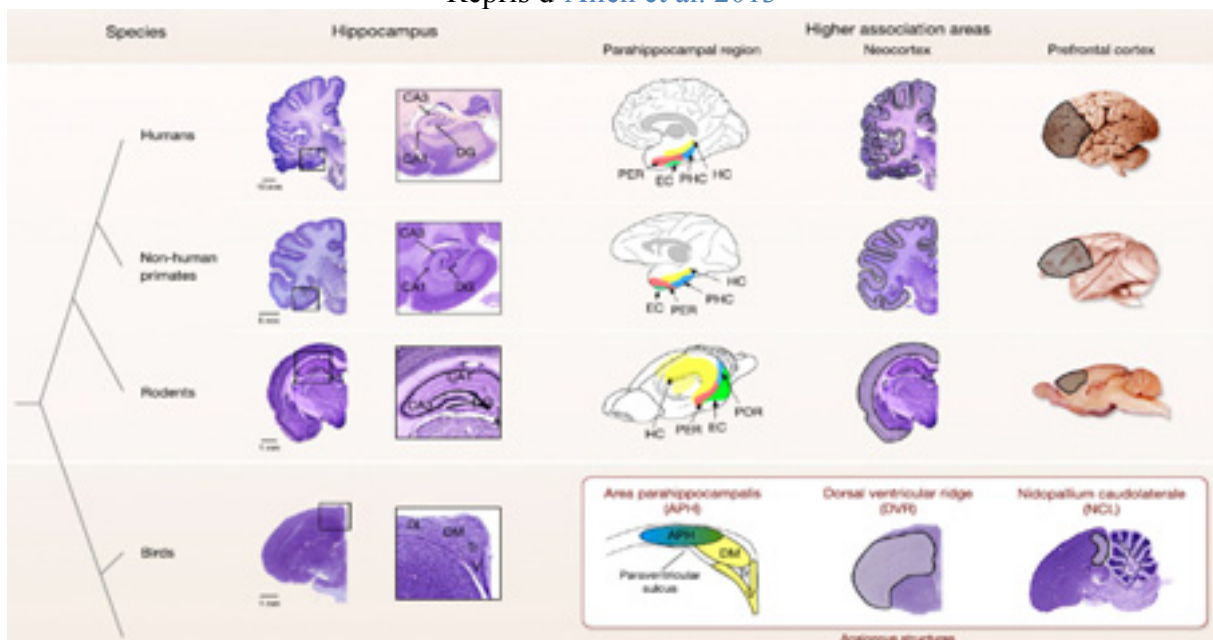
I. Mémoire et formation hippocampique :

I.1 Mémoire épisodique

La mémoire épisodique est définie par son contenu (un souvenir d'un évènement unique, dans un cadre spatio-temporel spécifique et formé en une expérience unique) et sa structure prenant la forme d'une représentation intégrée de l'évènement (Clayton et al. 2003). Ces dernières années, de nouveaux paradigmes comportementaux ont permis d'évaluer une forme de mémoire de type épisodique (*episodic-like memory*) chez l'animal non-humain, démontrant ainsi expérimentalement la dépendance de cette forme de mémoire à l'intégrité de la formation hippocampique (Day et al. 2003, Ergorul et al. 2004). En effet, les capacités de mémoire épisodique et les structures cérébrales associées sont fortement conservées chez les mammifères (Allen et al. 2013 ; Figure 9).

Figure 9 : Correspondance des principales structures cérébrales impliquées dans la mémoire épisodique à travers les différents embranchements phylogénétiques.

Repris d'Allen et al. 2013



PER, cortex périrhinal ; EC, cortex entorhinal ; PHC, cortex parahippocampique (ou cortex postrhinal) ; HC, hippocampe.

La mémoire épisodique nécessiterait plus spécifiquement l'intégrité du réseau comprenant le DG et la région CA3 de l'hippocampe et des opérations de *pattern separation/pattern completion* qui y prennent place (Palmer et al. 2011). La représentation du contexte spatial fait partie à part entière de la représentation épisodique et durant le rappel d'un souvenir épisodique, l'activité de décharge de l'hippocampe traduirait la réactivation de la représentation du contexte spatial chez l'Homme (Miller et al. 2013). De manière intéressante, au-delà des troubles de la mémoire épisodique, le codage de l'espace semble être précocement atteint dans le cadre des DTA, cela d'autant plus en présence de l'allèle *APOE4*. En effet, les patients DTA présentent précocement des déficits de navigation spatiale (Nedelska et al. 2012 ; Lithfous et al. 2013). Cependant, la définition de la mémoire épisodique étant particulièrement adaptée à l'Homme et au langage verbal, je me suis focalisé dans cette revue du contexte scientifique sur les fonctions associées (navigation spatiale, reconnaissance et

Mémoire et formation hippocampique

localisation d'objets, mémoire olfactive) qui sont atteintes précocément et spécifiquement dans les DTA et qui demeurent plus facilement transposables aux études chez la Souris.

I.2 Orientation et navigation spatiale

Les capacités d'orientation et de navigation spatiales reposent sur différents processus (représentation allocentrique et égocentrique de l'environnement, intégration des trajectoires) qui se combinent afin de générer des représentations spatiales de l'environnement.

Chez l'Homme, des expériences de navigation dans un environnement virtuel couplé à de l'imagerie révèle un recrutement au cours de la navigation spatiale d'un réseau distribué de structures cérébrales (Grön et al. 2000) : le gyrus occipital médian (reconnaissance d'objets et des indices environnementaux), le cortex pariétal latéral et médian (mémoire de travail et représentation égocentrique de l'environnement), le cortex rétrosplénial (intégration des représentations allocentriques et égocentriques) ainsi que l'hippocampe et le cortex parahippocampique (représentation allocentrique de l'environnement). Dans les DTA, les atteintes cérébrales combinées de ces structures expliqueraient l'émergence des déficits de navigation spatiale.

Depuis le milieu des années 1970, de nombreux corrélats cellulaires du codage de l'espace ont été décrits :

- cellules de lieu (*place cells*; O'Keefe & Dostrovsky 1971) : codent pour l'emplacement de l'animal dans l'environnement (hippocampe et DG)
- cellules de direction de la tête (*head direction cells*; Taube et al. 1990, Taube 2007) : codent pour l'orientation de la tête par rapport à l'environnement et au corps (subiculum, post-subiculum, cortex entorhinal et thalamus antérieur).
- cellules de la grille (*grid cells*; Fyhn et al. 2004, Sargolini et al. 2006) : codent pour la géométrie de l'environnement (cortex entorhinal caudo-médial et potentiellement le subiculum).
- cellules de la bordure (*border cells*; Solstad et al. 2008) : codent pour les bordures de l'environnement (parois et creux ; cortex entorhinal médian, pré- et para-subiculum).

Ces neurones ont été initialement décrits chez le rongeur. Chez l'Homme, comme la formation hippocampique répond également à des stimuli visuels, un débat sur l'homologie du codage neuronal entre les primates et les rongeurs a longtemps perduré. Cependant, l'enregistrement de neurones dans la formation hippocampique humaine a révélé la présence de cellules de lieux fortement modulé par le but dans l'hippocampe et de cellules répondant à la vue des indices environnementaux dans le cortex parahippocampique (Ekstrom et al. 2003). Par la suite, des cellules similaires aux cellules de la grille ont été également décrites (Jacobs et al. 2013a). Ainsi, il semble bien que les processus de codage spatial de l'environnement sont fortement similaires entre primates et rongeurs.

I.2.1 Représentations allocentriques de l'environnement

Les représentations allocentriques de l'environnement reposeraient sur la formation et l'utilisation de cartes cognitives codant la localisation spatiale des éléments de l'environnement, des indices environnementaux ainsi que des relations entre ceux-ci. Elles seraient le support de la navigation flexible dans l'environnement, les cartes cognitives permettant de planifier rapidement de nouvelles trajectoires en fonction de la demande

Mémoire et formation hippocampique

comportementale (Tolman 1948). Les cellules de lieu hippocampiques pourraient représenter un substrat neuronal de la carte spatiale (O'Keefe & Dostrovsky 1971). Signalons aussi que ces cellules procèderaient bien à un codage de type cognitif et pas simplement sensoriel, car elles codent aussi pour les trajectoires à venir de l'animal (séquences de cellules de lieu codant pour la trajectoire future), même si la trajectoire en question n'a encore jamais été empruntée (Pfeiffer & Foster 2013, Jadhav et al. 2012). Cette représentation de l'environnement est flexible, car elle s'adapte rapidement aux modifications environnementales ce qui nécessiterait de bonnes capacités de discrimination des entrées sensorielles ambiguës (*pattern separation*).

La navigation allocentrique dans l'environnement dépend étroitement de l'hippocampe chez le rongeur (Morris et al. 1982) et de l'hippocampe droit chez l'Homme (Burgess et al. 2002, Astur et al. 2002). Plus largement, le circuit regroupant hippocampe et cortex para-hippocampique serait particulièrement impliqué dans la représentation allocentrique de l'environnement (Maguire et al. 1996, Aguire et al. 1996), les lésions de ces structures chez l'Homme allant de pair avec des déficits de navigation spatiale (Bohbot et al. 1998). L'hippocampe serait particulièrement activé durant les phases d'encodage de l'environnement, puis avec la familiarité, le cortex rétrospécial (intégration des informations égocentriques et allocentriques) augmenterait progressivement sa contribution (Wolbers & Buchel 2005). La reconnaissance des indices environnementaux impliquerait plus particulièrement le cortex para-hippocampique (Epstein & Kanwisher 1998) et la reconnaissance des scènes visuelles, le cortex rétrospécial (Epstein et al. 2007).

I.2.2 Représentations égocentriques de l'environnement

Les représentations égocentriques de l'environnement sont centrées sur le corps du sujet et seraient notamment utiles pour guider la navigation le long de routes connues ou en l'absence d'indices environnementaux suffisants. Ces représentations impliqueraient notamment le striatum dorsal (McDonald & White 1994 ; de Leonibus et al. 2005), mais aussi le cortex pariétal inférieur (Wolbers et al. 2004) et le cortex pariétal médian (Maguire et al. 1998).

Le processus de navigation spatiale combinerait en fait l'usage des représentations égocentriques et des représentations allocentriques, la stratégie dominante étant déterminée par la disponibilité des indices ainsi que la nature de la tâche (Burgess 2006). De plus, l'utilisation d'une stratégie préférentielle peut varier d'un sujet à l'autre (Iaria et al. 2003), bien que les stratégies allocentriques soient favorisées dans des environnements nouveaux et les stratégies égocentriques dans des environnements familiers (Hartley et al. 2003). Les changements de stratégie en cours de tâche sont toujours possibles, le blocage de la stratégie égocentrique *via* l'inhibition du striatum chez le Rat induisant par exemple l'utilisation préférentielle de stratégies allocentriques pour résoudre la tâche (Packard & McGaugh 1996).

I.2.3 L'intégration des trajectoires

L'intégration de trajectoire (*path integration*) permet d'estimer la distance parcourue et le déplacement angulaire par rapport à un point de départ. Ce processus serait dérivé des informations liées aux mouvements (indices vestibulaires, proprioceptifs et flot optique). L'intégration de trajectoire évaluée en absence d'indices visuels dépendrait du lobe temporal médian droit (Worsley et al. 2001), du cortex entorhinal et du cortex pariétal (Parron & Save

Mémoire et formation hippocampique

2004 ; Whitlock et al. 2008 ; Save & Poucet 2009). Notons ici que le vieillissement cérébral est associé chez l'Homme à des déficits d'intégration de trajectoire qui pourraient concourir au déclin des capacités de navigation (Harris et al. 2012).

Le cortex entorhinal médian jouerait un rôle particulier dans l'intégration de trajectoire. En effet, il possède des cellules opérant à un codage spatial de l'environnement (cellules de la grille), de la direction de la tête et de cellules combinant ces deux propriétés (cellules de la grille modulées par la direction de la tête) ce qui en fait une structure particulièrement adaptée pour l'utilisation des indices égocentriques linéaires et angulaires (McNaughton et al. 2006a). Ainsi, on observe des déficits d'intégration de trajectoire chez le rongeur après lésions hippocampiques (Maaswinkel et al. 1999 ; Whishaw et al. 2001) ou entorhinales (Parron & Save 2004). Cependant, il apparaît que des lésions du cortex entorhinal chez l'Homme n'induisent pas nécessairement de déficit d'intégration de trajectoire, probablement *via* une compensation par le cortex pariétal (Shrager et al. 2008). En effet, d'après les résultats obtenus en EEG durant une tâche de navigation chez l'Homme, cette dernière structure serait particulièrement impliquée dans le codage des trajectoires spatiales (Snider et al. 2013).

Pour naviguer efficacement dans l'environnement, l'animal doit être capable de traduire les informations topographiques des cartes spatiales de la formation hippocampique en représentations centrées sur le corps pouvant être utilisées pour guider la locomotion. Or, le cortex pariétal postérieur pourrait être impliqué dans cette transformation en convertissant l'information spatiale codée par la formation hippocampique en séquences motrices orientées vers le but (Whitlock et al. 2008). En effet, si le cortex pariétal antérieur est à dominante somato-sensorielle, le cortex pariétal postérieur est plutôt multimodal et associatif (voie dorsale de perception de l'espace chez le primate). Ainsi, l'information sensorielle et motrice se mêlerait au niveau du pariétal postérieur pour générer une multitude de représentations spatiales centrées sur le corps et utiles à la planification des mouvements précis. Chacune de ces représentations serait spécialisée dans le support d'un type d'action comme les mouvements des yeux, de la tête, de l'ensemble du corps et plus largement de l'ensemble de la séquence d'actions nécessaires pour atteindre une cible (Andersen & Buneo 2002). Chez le rongeur, les lésions du pariétal postérieur induisent des déficits de navigation en piscine de Morris (Kolb & Walkey 1987), en localisation d'objets (Save et al. 1992), et en intégration de trajectoire (Parron & Save 2004). D'ailleurs, d'un point de vue électrophysiologique, certains neurones du pariétal postérieur répondent à la conjonction de mouvements et de localisation spécifique, chez le primate (Sato et al. 2006) comme chez le rongeur (Nitz 2006).

Ainsi, l'intégration de la trajectoire au niveau du cortex entorhinal et de l'hippocampe pourrait être utilisée par les neurones du cortex pariétal pour la planification des séquences de mouvements nécessaires à l'animal pour atteindre un but (Whitlock et al. 2008), que ce soit par des projections directes entre ces structures (Burwell & Amaral 1998) ou *via* des relais dans les cortex préfrontal et rétrospinal (Whitlock et al. 2008).

I.2.4 Navigation et comportements orientés vers un but

Dans l'environnement, les processus de navigation sont généralement orientés vers un but. La navigation requiert donc la prise de décisions adaptatives nécessitant une coordination continue des perceptions, processus mnésiques et de la planification du comportement. Elle implique donc des systèmes cérébraux multiples et étendus.

Mémoire et formation hippocampique

La formation hippocampique étant fortement impliquée dans la navigation et la mémoire spatiale, elle influence les systèmes de sélection et d'orientation du comportement situés dans le mésencéphale et le striatum. Ainsi, d'après Penner et collaborateurs (2012), le striatum ventral serait impliqué dans la prédiction des conséquences du comportement, tandis que le striatum dorsal sélectionnerait le comportement adapté à l'obtention du but. Ainsi, il a par exemple été décrit dans le striatum un codage dopaminergique de la distance séparant l'animal du but (Howe et al. 2013a). En retour, l'activité des cellules de lieu hippocampiques est influencée par les états internes et l'action à venir, ce qui représenterait un mécanisme coordonnant motivation, représentation spatiale et mémoire pour guider le comportement (Kennedy et al. 2009). Ainsi, le comportement de décharge des cellules de lieu hippocampiques est modulé par la présence d'un but saillant, leurs champs d'activité se déplaceraient au cours de l'apprentissage afin d'augmenter la densité du codage de l'environnement immédiat du renforçateur (Kobayashi et al. 2003). Ce type de représentation de la saillance comportementale de certaines localisations serait spécifique à la région CA1 ce qui suggère que la représentation de CA1 est flexible et s'adapte à la demande de la tâche tandis que les cellules de lieu de CA3 coderaient plutôt pour une représentation purement spatiale de l'environnement (Dupret et al. 2010). A l'échelle des populations de cellules de lieu, il est possible que la représentation spatiale dans des environnements comprenant des buts multiples, mais stables, soit en fait constituée de multiples sous-cartes cognitives dont la sélection dépend de l'objectif courant de l'animal (Jackson et al. 2007). Au contraire, dans des environnements où le renforçateur n'est pas systématiquement à la même position, une carte globale coderait pour l'ensemble de l'environnement.

1.2.5 Navigation spatiale, DTA et cortex entorhinal.

La désorientation spatiale apparaît précocement dans les DTA (Henderson et al. 1989, Monacelli et al. 2003, Kalova et al. 2005) et représente l'un de ses symptômes les plus handicapants (Pai & Jacobs 2004). Cette désorientation est notamment corrélée aux dégénérescences induites par la tauopathie (Giannakopoulos et al. 2000).

Dans le cadre du vieillissement normal, des déficits subtils de navigation seraient déjà présents (Cushman et al. 2008 ; Zarkanis et al. 2009) en lien potentiel avec une diminution du codage spatial des cellules de lieu (Barnes et al. 1980 ; Barnes et al. 1983). Cependant, ces déficits seraient particulièrement exacerbés dans le cadre des DTA. La présence d'un trouble de l'orientation spatiale aurait un intérêt diagnostique particulier car elle permettrait de différencier les DTA d'autres pathologies neurodégénératives comme les démences fronto-temporales (Bird et al. 2010). Les souris porteuses de mutations humaines familiales entraînant la maladie d'Alzheimer présentent également des déficits de navigation (Walker et al. 2011 ; Cacucci et al. 2008 ; O'Leary & Brown 2009), ce qui fait de la navigation spatiale un paradigme translationnel particulièrement intéressant pour l'étude des déficits d'orientation et de leurs substrats.

Les déficits de navigation spatiale apparaîtraient dès le stade de MCI, notamment chez les MCI amnésiques (aMCI) qui présentent un fort risque de progression vers la démence (Hort et al. 2007, Laczko et al. 2009). Ainsi, le dépistage de ces déficits de navigation pourrait contribuer au diagnostic (Weniger et al. 2011). Ces déficits seraient associés à l'atteinte des réseaux de l'hippocampe, du cortex parahippocampique et du cortex pariétal (Delpolyi et al. 2007, Lim et al. 2010). De manière intéressante, la présence de l'allèle *APOE4* induirait des déficits spatiaux exacerbés au cours du vieillissement (Bertheau-Pavy et al. 2007), notamment

Mémoire et formation hippocampique

dans le cadre du MCI amnésique (Laczo et al. 2010). Ainsi, il est concevable que l'*APOE4* induise une atteinte précoce des réseaux neuronaux impliqués dans la navigation spatiale.

La stimulation électrique du cortex entorhinal durant l'apprentissage en navigation spatiale augmente les performances de mémorisation de l'information spatiale ce qui suggère que cette structure joue un rôle important dans la navigation spatiale (Suthana et al. 2012). Cependant, les lésions excitotoxiques sélectives des neurones du cortex entorhinal n'induisent généralement que peu de déficit de navigation, du moins tant que la tâche n'est pas compliquée comme pour l'apprentissage d'une nouvelle position dans un environnement connu (Hagan et al. 1992) ou la nécessité d'utiliser de manière flexible des indices environnementaux (Oswald et al. 2003). D'un point de vue électrophysiologique, la lésion du cortex entorhinal n'induit pas de perturbation du comportement de décharge des cellules de lieu hippocampiques, mais perturbe leur capacité de recodage dans le cadre de changements environnementaux (Lu et al. 2013). De plus, il apparaît que ce serait essentiellement la partie médiane du cortex entorhinal qui serait impliquée dans la navigation spatiale (Van Cauter et al. 2012). Enfin, les lésions du cortex entorhinal induirait d'autant plus facilement des déficits quand la charge en mémoire de travail est importante (Galani et al. 1998).

I.3 Mémoire de reconnaissance d'objets et de localisation d'objets

Parmi les autres formes de mémoire touchées précocement dans les DTA, mémoire de reconnaissance d'objets et mémoire de localisation d'objets pourraient potentiellement être perturbées avant la navigation spatiale (Didic et al. 2011).

En effet, les patients aMCI présentent des déficits de localisation d'objets en lien avec des déficits d'activation des réseaux cérébraux des voies visuelles dorsales et ventrales ainsi que de l'hippocampe (Hampstead et al. 2011). Là encore, les porteurs de l'*APOE4* présenteraient des déficits plus précoces de reconnaissance d'objets (Berteau-Pavy et al. 2007). Les interactions entre le cortex périrhinal, le cortex postrhinal, le cortex entorhinal et l'hippocampe seraient particulièrement importantes pour les mémoires associatives basées sur des objets chez le rongeur comme chez l'Homme (Vilberg et al. 2013). En effet, chez le Rat la présentation d'un objet inconnu active fortement le cortex périrhinal, tandis qu'une nouvelle configuration d'objets familiers active plutôt le cortex postrhinal et l'aire CA1 de l'hippocampe (Wan et al. 1999). Le cortex périrhinal serait plus particulièrement impliqué dans la reconnaissance d'objets et serait essentiel à la discrimination d'objets entre eux (Kesner et al. 2001, Bachevalier et al. 2008). Le cortex postrhinal serait plus particulièrement impliqué dans la localisation spatiale des objets et l'hippocampe lorsqu'il y a association fine entre objets, positions et contexte (Bachevalier et al. 2008). La partie latérale du cortex entorhinal participerait à l'intégration des objets avec leur emplacement et le contexte environnemental global (Wilson et al. 2013a, 2013b). En effet, des enregistrements électrophysiologiques chez le Rat ont révélé l'existence de cellules codant pour l'emplacement des objets et pour les emplacements précédemment occupés par un objet, ce qui représenterait un corrélat neurobiologique possible de l'implication du cortex entorhinal latéral dans la mémoire de localisation des objets (Tsao et al. 2013). Par ailleurs, la lésion du cortex entorhinal médian induirait surtout des déficits de localisation d'objet, tandis que la lésion du cortex entorhinal latéral perturberait à la fois les traitements spatiaux et les traitements non-spatiaux des objets (Van Cauter et al. 2012).

I.4 Mémoire olfactive

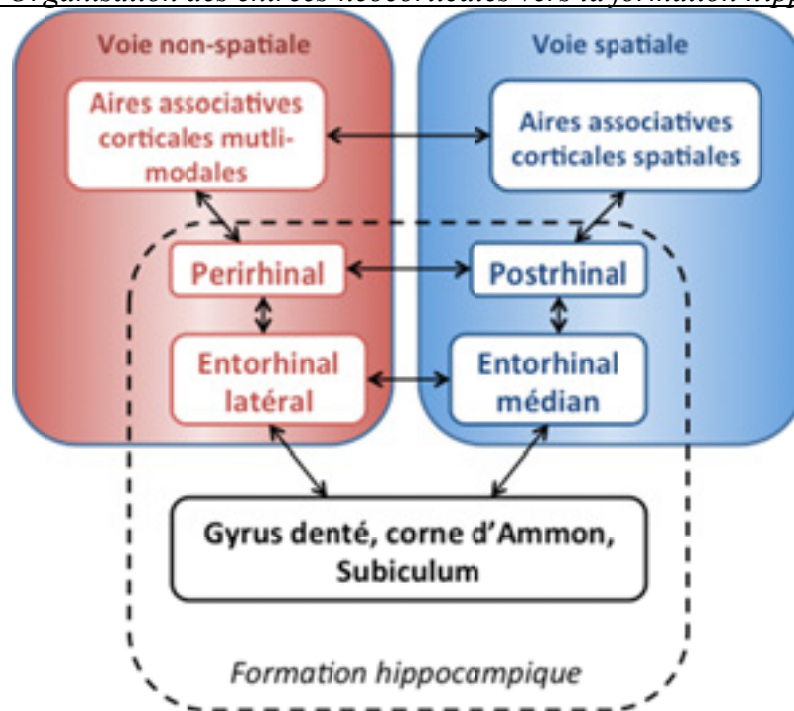
Des déficits de reconnaissance d'odeur apparaissent avec le vieillissement et sont exacerbés dans le cadre des DTA (Nordin & Murphy 1998). Plus particulièrement, les déficits olfactifs apparaîtraient dès le MCI et ils augmenteraient encore avec la progression vers la démence, ce qui en fait un indicateur précoce potentiellement extrêmement utile d'un point de vue diagnostique (Djordjevic et al. 2008). De manière intéressante, l'ampleur des déficits olfactifs seraient mêmes corrélé à la neuropathologie chez les sujets asymptomatiques ainsi que chez les sujets sains qui vont par la suite évoluer vers le MCI (Wilson et al. 2009). Cependant, des déficits olfactifs se retrouvent également dans le syndrome de Down, dans la maladie d'Huntington et pourraient être présents chez les porteurs sains de l'*APOE4* (Murphy 1999). Les déficits olfactifs durant le MCI pourraient être liés à l'atteinte précoce des régions olfactives incluant le noyau antérieur olfactif, le cortex orbitofrontal, le cortex entorhinal latéral et l'amygdale (Price et al. 1991, Braak & Braak 1992).

L'atteinte du cortex entorhinal pourrait particulièrement contribuer aux déficits olfactifs précoces car il est touché précocement dans le cadre des DTA. En effet, les lésions du cortex entorhinal entraînent un oubli rapide de l'information olfactive (Stäubli et al. 1984, Sauvage et al. 2010). Cependant, elles entraîneraient surtout des déficits dans le cadre de tâches de discrimination olfactive simultanée (Otto & Garruto 1997), tandis qu'elles seraient plutôt facilitatrices de l'apprentissage de la discrimination séquentielle d'odeurs (Otto et al. 1991). En effet, le cortex entorhinal serait impliqué dans la réduction de la persistance de la trace mnésique olfactive (Wirth et al. 1998, Ferry et al. 2006).

II. Neuroanatomie de la formation hippocampique

La formation hippocampique regroupe des structures du lobe temporal médian qui sont fortement impliqués dans les processus mnésiques et notamment dans les formes de mémoire décrites dans la partie précédente. Anatomiquement et en accord avec un rôle associatif majeur, la formation hippocampique est une région majeure de convergence progressive des différentes modalités sensorielles (Figure 10).

Figure 10 : Organisation des entrées néocorticales vers la formation hippocampique :

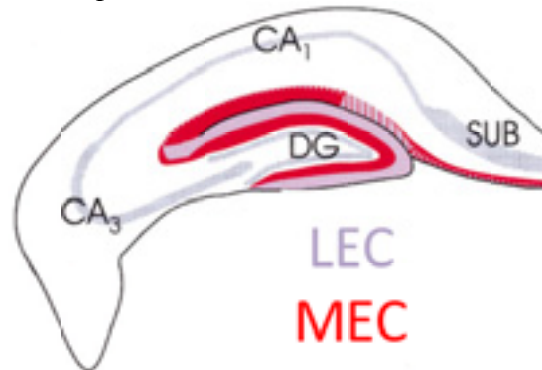


L'information arriverait à la formation hippocampique selon deux voies majeures : une voie spatiale convoyant des informations corticales des aires associatives spatiales (cortex rétrosplénial, pariétal, aire visuelle V4) et une voie multi-modale contextuelle convoyant des informations corticales des aires associatives multimodales (cingulaire antérieure, régions sensorielles, amygdale étendue, cortex associatif temporal).

Ainsi, il existerait une dissociation fondamentale entre le type d'informations néocorticales entrantes, cela jusqu'au niveau des projections du cortex entorhinal latéral et médian au niveau de l'hippocampe (Hargreaves et al. 2005). En effet, les projections du cortex entorhinal vers les différentes sous-régions de l'hippocampe sont organisées topographiquement (Figure 11) en fonction de leurs points d'origine dans le cortex entorhinal latéral (*Lateral entorhinal cortex ; LEC*) ou dans le cortex entorhinal médian (*medial entorhinal cortex, MEC*) :

Neuroanatomie de la formation hippocampique

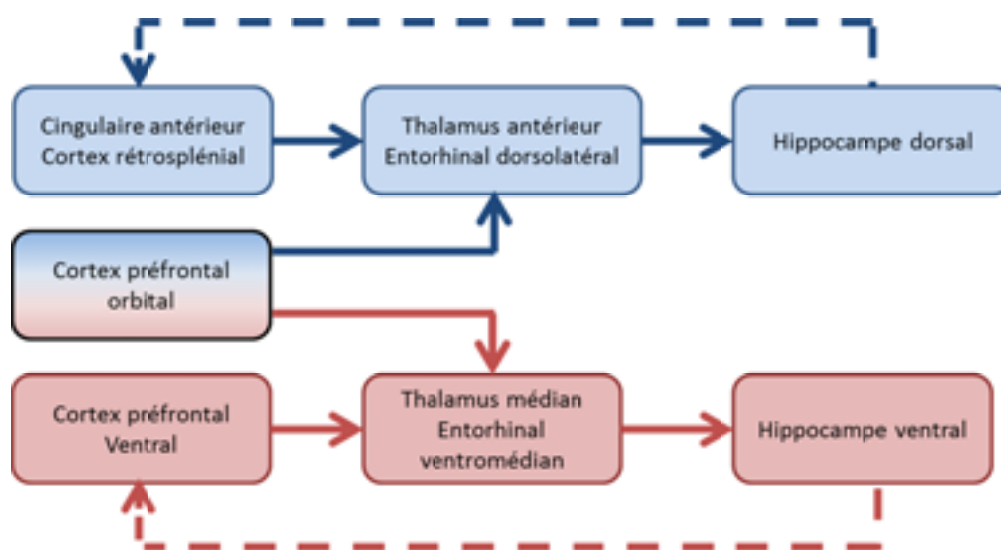
Figure 11 : Organisation des projections entorhino-hippocampiques chez la Souris
Repris de Van Groen et al. 2003b



La figure représente les couches cellulaires du DG, corne d'Ammon et subiculum en gris. En rouge sont représentés les terminaisons du MEC, en violet les terminaisons du LEC. Notez que dans DG et CA3, les informations du cortex entorhinal latéral (lateral entorhinal cortex, LEC) et du cortex entorhinal médian (medial entorhinal cortex, MEC) convergerait au même niveau.

De plus, la formation hippocampique est également organisée selon un gradient dorso-ventral (postéro-anérieur chez le primate). En effet, les parties les plus dorsales de l'hippocampe et la bande dorsolatérale de l'entorhinal seraient spécialisées dans la cognition visuo-spatiale, tandis que la partie la plus ventrale de l'hippocampe et la bande ventromédiane de l'entorhinal seraient plutôt spécialisées dans la cognition émotionnelle, olfactive et viscérale (Jung et al. 1994; Maurer et al. 2005 ; Kjelstrup et al. 2008 ; Fanselow et al. 2010). Ces différences dorso-ventrales seraient déterminées génétiquement *via* l'influence de différents *loci* (Martin et al. 2006). Ces boucles de traitements parallèles de l'information dans la formation hippocampique seraient également maintenues dans les circuits reliant la formation hippocampique au cortex préfrontal et au thalamus (Figure 12, Prasad et al. 2013).

Figure 12 : Ségrégation dorso-ventrale des boucles entre l'hippocampe, le cortex et le thalamus
d'après Prasad et al. 2013



Dans la suite de ce chapitre, je vais rapidement décrire les principales sous-structures que j'ai étudiées au cours de ma thèse : le cortex entorhinal, le DG ainsi que les trois champs de la

Neuroanatomie de la formation hippocampique

corne d'Ammon. Je me focaliserai essentiellement sur le pôle dorsal de l'hippocampe et les structures connectées, mon travail étant plus particulièrement focalisé sur la cognition spatiale.

II.1 Cortex entorhinal

Dans le cadre des DTA, le cortex entorhinal est probablement la structure corticale à présenter les pertes neuronales les plus précoces. En effet, à la déclaration clinique des symptômes, environ la moitié des cellules du cortex entorhinal serait déjà perdue (Gomez-Isla et al. 1996). Ainsi, l'atteinte du cortex entorhinal pourrait contribuer fortement aux troubles mnésiques caractéristiques des phases précoces des DTA (déficit de reconnaissance et de localisation d'objets, déficits de navigation et déficit de discrimination olfactive).

II.1.1. Anatomie

Le cortex entorhinal serait la principale région de relais entre le néocortex et le reste de l'hippocampe. On peut le diviser en cortex entorhinal latéral (*lateral entorhinal cortex* : LEC) et cortex entorhinal médian (*medial entorhinal cortex* : MEC) chez le rongeur, tandis que chez le primate on distingue cortex entorhinal antérieur et postérieur. Le cortex entorhinal est constitué de quatre couches cellulaires, les deux couches superficielles (II-III) projetant massivement vers l'hippocampe et les deux couches profondes (V et VI) recevant en retour de nombreuses projections hippocampiques.

Le cortex entorhinal est interconnecté avec un grand nombre de régions corticales, sous-corticales et hippocampiques (Kerr et al. 2007, [tableau 5](#)).

En termes d'innervation corticale, on peut noter que globalement le LEC est majoritairement interconnecté avec les cortex piriforme, frontal et insulaire, tandis que le MEC et sa sous-région comprenant les cellules de la grille est préférentiellement interconnecté avec les régions temporale, cingulaire, pariétale et occipitale. Cette organisation refléterait une relative spécialisation visuo-spatiale pour le MEC (afférences occipitales et pariétales) ainsi qu'une prédominance olfactive (piriforme) et limbique (insulaire, frontal) au niveau du LEC. Ces différences sont encore présentes en termes d'interconnexions avec les régions sous-corticales, le LEC étant majoritairement interconnecté avec les régions olfactives et limbiques (amygdale), bien que les efférences majeures de toutes les sous-régions entorhinales semblent s'orienter vers les ganglions de la base. Il faut noter que le *claustrum* (contenant une carte rétinotopique et une carte somatosensorielle) forme l'une des entrées sous-corticales principales de la région des cellules de la grille. En termes de relations avec le reste de la formation hippocampique, quantitativement les principales afférences de le cortex entorhinal proviennent de CA2/CA1, du subiculum et du périrhinal, tandis que les principales efférences sont les DG/CA3 et CA2/CA1, notamment dans le pôle dorsal ainsi que les cortex postrhinal et périrhinal. Enfin, il faut noter que la région des cellules de la grille reçoit la majorité des afférences hippocampique de la part des régions CA2/CA1 dorsal ainsi que du présubiculum, tandis que ses principales afférences sont CA2/CA1 dorsal et le cortex périrhinal. Plus globalement, la région des cellules de la grille est préférentiellement interconnectée avec l'hippocampe dorsal (spatial). Si de telles études quantitatives sont informatives, il ne faut pas non plus négliger les connexions minoritaires. En effet, fonctionnellement, des projections apparemment peu denses peuvent jouer un rôle modulateur important, comme par exemple les

Neuroanatomie de la formation hippocampique

projections GABAergiques en *feedback* allant du DG vers le cortex entorhinal (moins de 0,5% des fibres hippocampo-entorhinal) qui, même peu nombreuses, seraient capables de réguler l'activité du cortex entorhinal (Melzer et al. 2012).

Tableau 5 : principales afférences et efférences du cortex entorhinal (D'après Kerr et al. 2007)

	Afférences corticales			Efférences corticales		
	LEC	MEC	Cellules de la grille	LEC	MEC	Cellules de la grille
Piriforme	43.7%	34%	2.9%	33.6	18.8	0
Frontal	13.4%	11.7%	12.9%	19.8	6.5	0
Insulaire	24%	6.8%	9.1%	17.9	9.5	0.3
Temporal	7.3%	8.4%	14.1%	5.8	16	24.2
Cingulaire	4.1%	13.3%	12.3%	9.4	11.6	2
Pariétal	4.2%	10.4%	16.1%	11.8	15.7	17.6
Occipital	3.3%	15.3%	32.6%	1.9	7.3	12.1

	Afférences sous-corticales			Efférences sous-corticales		
	LEC	MEC	Cellules de la grille	LEC	MEC	Cellules de la grille
Olfactif	36.9%	18.4%	7.1%	54.5	9.4	7.5
Clastrum	20.2%	19.6%	37.3%	12.4	2.1	3.1
Amygdale	23%	17.2%	7.3%	42.2	5.7	6.1
Noyaux septaux	3.5%	5.5%	6.2%	15.7	5.8	1.5
Ganglion de la base	1.2%	2.5%	3.3%	121	38.1	91.8
Thalamus dorsal	11.4%	25.9%	28.6%	1.8	1.2	0.9
Thalamus ventral	1.3%	3.8%	4.9%	0.4	0.2	0
Hypothalamus	2.5%	7.1%	5.3%	1.3	2.2	0

	Afférences Hippocampiques			Efférences Hippocampiques		
	LEC	MEC	Cellules de la grille	LEC	MEC	Cellules de la grille
HPC dorsal						
<i>DG/CA3</i>	0.5%	0.5%	0.1%	21.5	26.5	2.5
<i>CA2/CA1</i>	10.5%	16%	46.4%	22.8	26	25.3
<i>SUB</i>	4.3%	3%	7.5%	3	2	3.5
HPC ventral						
<i>DG/CA3</i>	1.1%	5.7%	0	7.5	9.2	0
<i>CA2/CA1</i>	37.5%	14.9%	3.4%	8.4	8.1	0
<i>SUB</i>	12.7%	12.2%	3.1%	6.4	5.1	0.2
Para HPC						
<i>Présubiculum</i>	3.8%	19.5%	18.8%	4.3	3.2	2.1
<i>Parasubiculum</i>	5.9%	17.8%	8.6%	1.1	2.4	0.4
<i>Postrhinal</i>	4.9%	5.6%	5.6%	44.1	56.6	5.9
<i>Pérrhinal</i>	19%	4.8%	6.5%	167.3	212.2	25.8

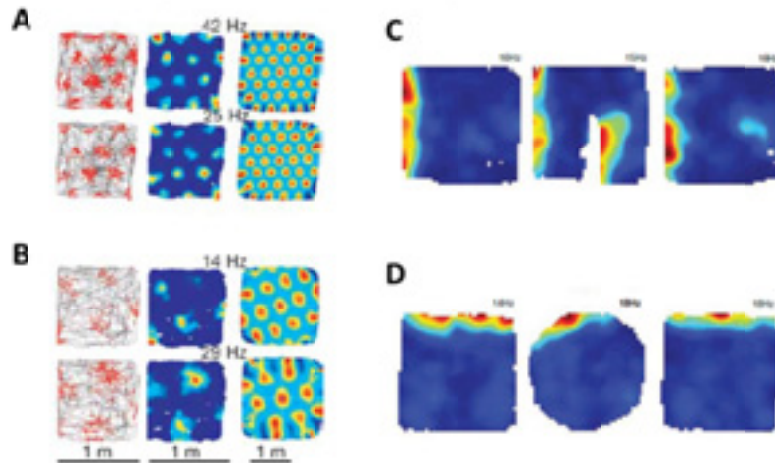
II.1.2. Activités unitaires

Les projections entorhino-hippocampiques impliqueraient les cellules modulées spatialement (cellules de la grille, de la bordure et de la direction de la tête) ainsi que les cellules ayant une activité non spatiale, ce qui suggère une convergence importante des différents types d'informations traitées par l'entorhinal dans l'hippocampe (Zhang et al. 2013).

Neuroanatomie de la formation hippocampique

Le cortex entorhinal médian du rongeur contient de nombreux types cellulaires modulés spatialement (Figure 13) : les cellules de la grille, des cellules de direction de la tête, des cellules combinant ces deux propriétés et enfin des cellules de bordure.

Figure 13: Exemples de cellules de la grille et de cellules de bordure



A et B : exemple de cellules de lieu tiré des travaux de Hafting et al. (2005). Les deux cellules proviennent des parties dorsale et ventrale du cortex entorhinal (A et B respectivement). Le tracé de gauche représente la trajectoire de l'animal (gris) avec les décharges des neurones en surimpression (rouge) ; le tracé du milieu représente la fréquence de décharge en fonction de l'espace (plus la couleur est chaude plus la cellule décharge) ; le tracé de droite traduit l'autocorrélation spatiale des tracés obtenus. On peut noter que la précision du codage spatial est plus élevée dans le cortex entorhinal dorsal (A) que ventral (B).

C et D : exemples de cellules de la bordure tirés des travaux de Solstad et al. (2008). Les illustrations présentent le taux de décharge des cellules (plus la couleur est chaude plus la cellule décharge). On peut noter que les cellules de la bordure sont sensibles à l'insertion d'une séparation dans l'environnement (C, carte du milieu), et qu'elles opèrent un même type de codage quelle que soit la forme de l'environnement (D).

Les cellules de la grille ont de multiples champs d'activité organisés en triangles et qui sont potentiellement générés par la microcircuiterie inhibitrice locale (Couey et al. 2013). Des expériences d'inactivation de l'hippocampe ont montré que l'activité spatiale des cellules de la grille dépend en partie des informations envoyées par l'hippocampe, mais aussi d'autres régions encore indéfinies (Bonnevie et al. 2013). Tout comme pour les cellules de lieu hippocampiques, la taille et l'espacement des champs d'activité augmentent progressivement selon l'axe dorso-ventral du cortex entorhinal médian. Ainsi, le codage spatial des cellules de la grille serait d'autant plus précis dans les parties dorsales où on retrouve par ailleurs la densité maximale d'entrées visuelles et pariétales (Fyhn et al. 2004). Les cellules de la grille voisines ont des champs récepteurs dont l'orientation et l'espacement sont similaires, mais avec différentes phases spatiales (Fyhn et al. 2008). Ces cellules de la grille encoderaient topographiquement l'ensemble de l'environnement et représenteraient un système métrique universel non spécifique à un environnement donné (Hafting et al. 2005 ; Fyhn et al. 2007). Elles seraient groupées en 4 à 5 modules indépendants avec une échelle, une orientation et une modulation rythmique spécifiques (Stensola et al. 2012). Les cellules de la grille qui sont également modulées par la direction de la tête combinent les deux types d'information (Sargolini et al. 2006). Le codage spatial des cellules de la grille n'est pas simplement

Neuroanatomie de la formation hippocampique

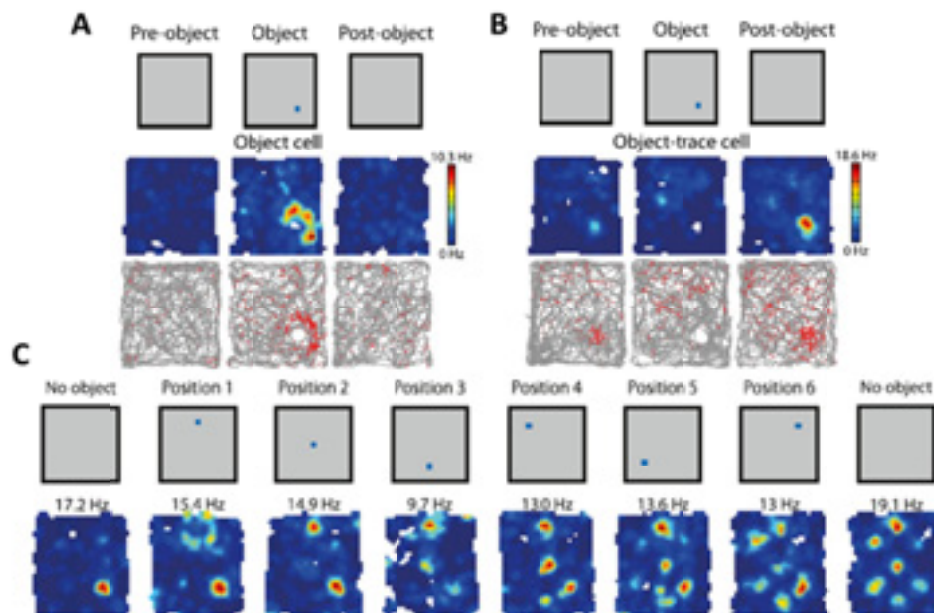
sensoriel, leur activité étant modulée par des facteurs cognitifs tels que la trajectoire à venir (Lipton et al. 2007). Des cellules ayant un profil d'activité semblable ont été décrites dans le cortex entorhinal postérieur du primate durant des enregistrements en tête restreinte (Killian et al. 2012). Dans ce cas où le singe est maintenu en contention, les cellules de type grille opèrent plutôt un codage de l'espace visuel. De plus, des enregistrements intra-entorhinal chez des patients épileptiques durant une tâche de navigation a révélé des cellules codant pour la trajectoire (*path equivalent cells*) qui déchargent en fonction de la direction du déplacement (Jacobs et al. 2010). Des cellules similaires sont décrites chez le rongeur : elles codent pour la direction des virages à venir ou des virages précédents, notamment au point de choix (*retrospective et prospective cells*, Frank et al. 2000 ; Lipton et al. 2007). Enfin des cellules de la grille ont été récemment décrites chez des patients épileptiques au moyen d'enregistrements dans le cortex entorhinal, démontrant que le codage spatial dans le cerveau humain serait en grande partie similaire à celui du rongeur (Jacobs et al. 2013a).

Les cellules de bordure coderaient pour les limites de l'environnement directement accessibles à l'animal, que ces limites soit induites par une paroi en hauteur ou par un trou (Solstad et al. 2008). Ces cellules pourraient être utiles à la planification des trajectoires et dans l'ancrage des champs des cellules de la grille et des cellules de lieu dans un cadre de référence géométrique. Enfin, les cellules de direction de la tête encoderaient la direction absolue de la tête par rapport à l'environnement (similairement à un compas).

Le cortex entorhinal latéral serait impliqué préférentiellement dans le traitement des informations non-spatiales (Lisman 2007 ; Moser et al. 2008). En effet, chez le rongeur, les neurones du cortex entorhinal latéral seraient faiblement modulés spatialement (Hargreaves et al. 2005), mais ils déchargent à proximité d'objets discrets (Deshmukh & Knierim 2011). Des réponses similaires ont été décrites dans le cortex entorhinal antérieur chez le primate, mais *via* un codage de l'espace visuel (Killian et al. 2012). Enfin, des enregistrements électrophysiologiques chez le Rat ont révélé que 15 à 30% des neurones coderaient pour l'emplacement des objets (*Object in place cells*) tandis que 5 à 15% des neurones coderaient pour un emplacement ayant été précédemment associé à un objet (*Object trace cells*), ce dernier type de codage pouvant représenter un substrat de la mémoire de l'emplacement des objets (Figure 14 ; Tsao et al. 2013).

Neuroanatomie de la formation hippocampique

Figure 14 : Exemples d'une object cell et d'une object-trace cell
Repris des travaux de Tsao et al. 2013



L'expérience se déroule en trois étapes séparées d'une minute : une exposition à l'environnement sans objet (« pre-object »), une réexposition à l'environnement avec l'objet (« Object ») et enfin une séance avec réexposition à l'environnement sans objet (« Post-object »). A/ exemple d'une cellule répondant à la présence d'un objet (carte du taux de décharge de la cellule au milieu, et les décharges surimposées sur les déplacements de l'animal en bas). B/ exemple d'une cellule répondant à l'emplacement précédemment occupé par l'objet. C/ les champs d'activité des « object-trace cells » sont capables de suivre les déplacements séquentiels de l'objet en gardant en mémoire la séquence d'emplacements précédemment associés à celui-ci.

Des enregistrements chez le Macaque ont par ailleurs suggéré que le cortex entorhinal antérieur serait impliqué dans le maintien en mémoire de travail des représentations de l'objet et de la localisation de l'objet (Suzuki et al. 1997). Au-delà, les neurones du LEC répondraient également chez le rongeur à des images d'objets ainsi qu'à des odeurs (Zhu et al. 1995 ; Young et al. 1997).

Globalement, de par ses connexions et les types cellulaires qui le composent, le cortex entorhinal serait impliqué dans la mémoire et la navigation *via* le codage des attributs polymodaux du contexte comportemental courant (Eichenbaum et al. 2007). Ainsi, chaque type de neurone entorhinal encoderait un attribut perceptuel, spatial ou cognitif du contexte courant. Ce codage serait non-spécifique dans le sens où des contextes similaires mais non-équivalents généreraient des représentations entorhinales similaires (Quirk et al. 1992, Fyhn et al. 2007). Ainsi, l'EC encoderait les caractéristiques de la tâche en cours comme les mouvements futurs ou passés (Frank et al. 2000 ; Lipton et al. 2007), le contenu en mémoire de travail de la tâche (Suzuki et al. 1997), les objets contenus dans l'environnement et leurs caractéristiques (Ekstrom et al. 2003 ; Quiroga et al. 2006), la distance par rapport aux bordures de l'environnement (Solstad et al. 2008) et la localisation dans l'espace (Quirk et al. 1992 ; Hafting et al. 2005 ; Sargolini et al. 2006). De plus, le cortex entorhinal serait impliqué dans la rétention de l'information en mémoire de travail (Levisohn et al. 1991), certains neurones entorhinaux présentant une activité soutenue durant les périodes de délais (Schon et al. 2005) ce qui pourrait participer au maintien temporaire de l'information (Brickman et al. 2010). Pris ensemble, ces arguments supportent le point de vue que le cortex entorhinal joue

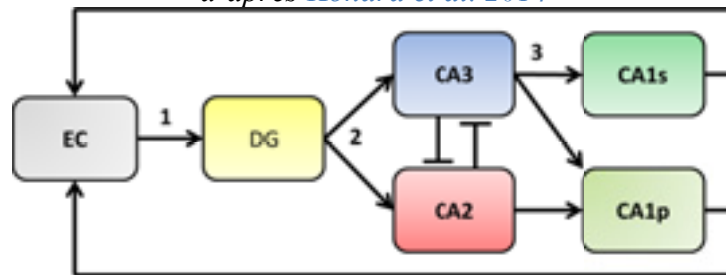
Neuroanatomie de la formation hippocampique

un rôle important dans la formation de la mémoire *via* l'encodage des différents attributs du contexte avant leur intégration et stockage en mémoire par l'hippocampe (Eichenbaum et al. 2007).

II.2 Hippocampe

L'organisation fonctionnelle des projections entre le cortex entorhinal et l'hippocampe est classiquement résumée à un circuit trisynaptique dans lequel le cortex entorhinal projette sur le DG qui projette ensuite sur CA3 qui, à son tour projette sur CA1. Or, ce point de vue a récemment été remis en cause par des travaux menés chez la Souris (Kohara et al. 2014). En effet, l'hippocampe serait plutôt organisé selon deux circuits tri-synaptiques parallèles se contrôlant réciproquement (Figure 15).

Figure 15 : Les deux circuits tri-synaptiques parallèles de l'hippocampe d'après Kohara et al. 2014

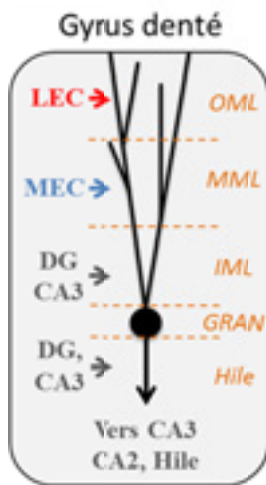


EC, cortex entorhinal ; DG, gyrus denté ; CA3, corne d'Ammon 3 ; CA2, corne d'Ammon 2 ; CA1s, partie superficielle de la corne d'Ammon 1 ; CA1p, partie profonde de la corne d'Ammon 1. 1, voies perforantes ; 2, fibres moussues ; 3, collatérales de Schaffer.

Ainsi, après son activation par les entrées entorhinales, le DG contacterait directement CA3 *via* la composante transversale des fibres moussues et CA2 *via* une composante longitudinale (septo-temporale) des fibres moussues. CA2 projetterait ensuite essentiellement sur les cellules pyramidales de la couche profonde de CA1, notamment *via* une innervation de la *stratum oriens*, tandis que CA3 projetterait sur l'ensemble de la population des cellules pyramidales *via* l'innervation des *stratum oriens* et *radiatum* avec les collatérales de Schaffer (Kohara et al. 2014). De manière intéressante, les projections de CA2 vers CA1 seraient également caractérisées par une forte composante longitudinale (Tamamaki et al. 1988 ; Shinohara et al. 2012), tandis que les projections de CA3 à CA1 seraient plutôt restreintes au même niveau dorso-ventral. De cette manière, l'activation de CA2 par la composante longitudinale des fibres moussues, suivie de projections à forte composante longitudinale vers CA1, ferait de CA2 le centre d'un circuit tri-synaptique longitudinal (Kohara et al. 2014) différent du circuit trisynaptique classique qui serait principalement transversal (Sloviter & Lomo 2012). CA2 permettrait ainsi d'établir un lien rapide entre une entrée dans le DG dorsal et les traitements dans CA1 ventral et ses zones de projection comme le cortex préfrontal et l'amygdale basolatérale.

Neuroanatomie de la formation hippocampique

II.2.1 Gyrus denté



Le DG/hile peut être divisé en cinq couches principales : la couche moléculaire externe (OML), la couche moléculaire médiane (MML), la couche moléculaire interne (IML), la couche granulaire (GRAN) et le Hile (Amaral et al. 2007 ; Leranth & Hajszanl 2007). Les cellules granulaires sont les cellules glutamatergiques principales du DG. Elles projettent massivement sur CA3 et CA2 et font des collatérales dans le hile sur des interneurons inhibiteurs et les cellules moussues.

Les principales afférences corticales glutamatergiques du DG proviennent de la couche II du cortex entorhinal (85% des terminaisons sur les épines dendritiques des cellules granulaires). Cependant il y aurait également quelques efférences des couches V et VI du cortex entorhinal. Il a également été rapporté la présence d'afférences du présubiculum et du parasubiculum (sur l'OML et la

MML), mais leurs phénotypes neurochimiques sont inconnus (Amaral et al. 2007 ; Leranth & Hajszan 2007). Enfin, des afférences des cortex périrhinal et postrhinal ont été décrites (Van Strien et al. 2009). Les principales afférences hippocampiques glutamatergiques du DG proviennent des collatérales des cellules pyramidales de CA3 (Scharfman 2007). Il faut également noter la présence d'afférences en provenance de l'aire supramammillaire, ces projections exprimant à la fois le transporteur vésiculaire du glutamate (VGLUT2) et du GABA (VGAT) ; elles procèdent potentiellement à la co-libération de ces deux neurotransmetteurs. La présence du transporteur vésiculaire du glutamate de type 1 (VGLUT1) permet d'identifier les terminaisons présynaptiques glutamatergiques des neurones principaux du cortex entorhinal et de l'hippocampe (Leranth & Hajszran 2007).

Comme le reste de l'hippocampe, le DG reçoit également des afférences neuro-modulatrices. Le complexe regroupant le septum médian et la bande diagonale de Broca (MSDB) envoie ainsi des afférences GABAergiques (notamment sur les interneurons du Hile), glutamatergiques et cholinergiques. Les afférences modulatrices cholinergiques semblent contacter l'ensemble des cellules du DG (Amaral et al. 2007 ; Leranth & Hajszanl 2007). Le hile reçoit également des afférences modulatrices dopaminergiques (aire tegmentale ventrale), sérotoninergiques (raphé dorsal) et noradrénergiques (*locus coeruleus*).

La principale efférence du DG provient des cellules granulaires et forme les fibres moussues. Ce système de projection est formé d'une composante transversale qui innerve le Hile par des collatérales puis CA3, ainsi que d'une composante longitudinale plus distale qui innervait essentiellement CA2 (Kohara et al. 2014). Les synapses des fibres moussues sont particulièrement puissantes, une seule fibre moussue étant capable de dépolariser un neurone dans CA3 (Rollenhagen & Lübcke 2010).

Discrimination des patrons d'activité (pattern separation).

Le DG serait particulièrement impliqué dans le phénomène de *pattern separation*, une opération computationnelle renvoyant au fait de générer des activités différentes à partir d'entrées synaptiques fortement similaires (McHugh et al. 2007 ; Schmidt et al. 2012 ; Gilbert et al. 2001). En effet, anatomiquement il y a une forte divergence entre le cortex entorhinal et le DG, ce dernier contenant 10 fois plus de cellules principales que la couche II du CE. De plus, l'activité des cellules granulaires est très éparse (faibles taux de décharge), mais leurs

Neuroanatomie de la formation hippocampique

projections sont puissantes (l'activation d'une seule fibre moussue est suffisante pour faire décharger une cellule pyramidale de CA3). Ainsi, des environnements similaires induisent l'activation de populations différentes dans le DG et ces différences d'activation du DG seraient capables d'induire un recodage de l'environnement (*remapping*) dans tout l'hippocampe (Tanila 1999, Morris et al. 2012).

La balance entre encodage du contexte courant en tant que nouveau contexte et rappel d'une représentation déjà encodée dépendrait des interactions entre le DG et CA3. En effet, dans un environnement nouveau fortement similaire à un environnement familier, le cortex entorhinal enverrait à l'ensemble de l'hippocampe des *inputs* codant pour le contexte dans lequel l'animal se trouve. En réponse à ces entrées entorhinales, l'activité du DG permettrait de discriminer ce contexte et faciliterait ainsi son encodage en tant que nouveau contexte (Deng et al. 2013). Au contraire, l'activité dans l'aire CA3 induirait plutôt le rappel d'un contexte déjà connu (*pattern completion*). Ainsi, l'intégrité du DG est importante pour la discrimination de contextes fortement similaires (Leutgeb et al. 2007 ; Jinde et al. 2012 ; Morris et al. 2012) alors que son implication dans l'encodage de contextes qui diffèrent fortement ne serait pas forcément nécessaire (Leutgeb et al. 2007 ; Morris et al. 2012). De manière intéressante, la neurogénèse adulte qui prend place dans le DG pourrait concourir au *pattern separation*, les cellules granulaires néoformées étant plutôt enclines à opérer un *pattern separation* tandis que les cellules granulaires plus anciennes concourraient plutôt au *pattern completion* (Nakashiba et al. 2012). En effet, le pic d'excitabilité des cellules granulaires néoformées aurait lieu vers la 4^e semaine et cette excitabilité diminuerait ensuite dès la 6^e semaine (Dieni et al. 2013). L'implication des neurones néoformés dans les phénomènes de *pattern separation* dépendrait notamment des entrées en provenance du cortex entorhinal et du cortex périrhinal (Vivar et al. 2012 ; 2013). D'ailleurs, de petits changements environnementaux sont suffisants pour augmenter la proportion de neurones néoformés survivants *via* l'inhibition de l'apoptose (Nokia et al. 2012), ce qui suggère une mobilisation spécifique de cette population par l'encodage d'informations nouvelles dans le DG.

Chez l'humain, le DG serait également impliqué dans les processus de *pattern separation*, notamment dans le cadre de tâches de discrimination visuelle (Bakker et al. 2008 ; Brickman et al. 2010 ; Yassa & Stark 2011b). Or, dans le cadre du vieillissement normal, il y aurait diminution des capacités de *pattern separation* en lien avec l'affaiblissement des voies perforantes et de la modulation cholinergique soutenant normalement l'encodage de nouvelles expériences (Wilson et al. 2006 ; Yassa & Stark 2011b). Dans le cadre du MCI, l'atteinte fonctionnelle précoce du DG et de CA3 paraît liée aux déficits de *pattern separation* (Yassa et al. 2010). Plus précisément, il semblerait que l'hyperactivation du DG observé durant le MCI puisse expliquer les déficits de *pattern separation*, car elle pourrait traduire une perturbation du codage épars qui caractérise normalement le DG. En effet, la réduction pharmacologique de cette hyperactivité fait disparaître les déficits de *pattern separation* (Bakker et al. 2012).

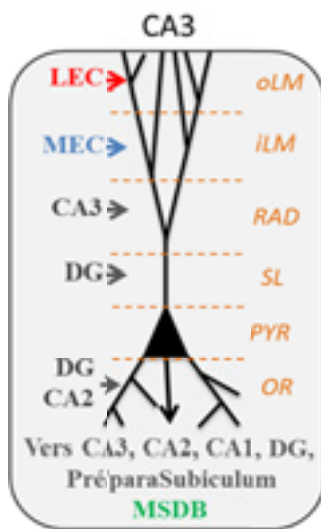
Encodage et consolidation.

L'implication du DG dans l'encodage de l'information nouvelle serait fortement liée aux opérations de *pattern separation*, car en absence de détection d'une situation ambivalente mais nouvelle, l'hippocampe opérerait préférentiellement un rappel d'informations déjà encodées. Ainsi, dans le cadre de l'encodage d'une nouvelle situation, le DG faciliterait l'établissement de nouvelles représentations dans CA3 et CA1 (Lee et al. 2009 ; Cerasti et al. 2010). Le DG ne serait pas nécessaire au codage spatial de l'environnement en tant que tel, mais jouerait un rôle important dans les phénomènes d'apprentissages spatiaux. En effet, la

Neuroanatomie de la formation hippocampique

lésion du DG chez le Rat induit des déficits d'apprentissage sans pour autant impacter le codage spatial de l'environnement par les cellules de lieu de la corne d'Ammon (McNaughton et al. 1989). De plus, le DG serait plus particulièrement impliqué dans l'apprentissage de la mémoire spatiale de référence, mais pas dans la mémoire de travail (Uzakov et al. 2005 ; Andrews-Zwilling et al. 2012). Cependant, le DG participerait au codage du contexte environnemental (Liu et al. 2012). En effet, les activités unitaires dans le DG suggèrent une participation au codage de l'environnement, les cellules granulaires ayant des champs d'activité spatiaux uniques et les cellules moussues des champs d'activité multiples ressemblant aux champs d'activité des cellules de la grille du cortex entorhinal (Leutgeb et al. 2007 ; Neunuebel et al. 2012). Ainsi, dans une élégante étude, Ramirez et collaborateurs (2013) ont induit l'expression de canaux rhodopsine dans les cellules du DG qui était activée dans un contexte neutre. Or, la réactivation de cette population de cellules du DG dans un contexte différent associé à un conditionnement de peur induit l'association du conditionnement de peur avec le contexte neutre, démontrant que les activités neuronales du DG sont suffisantes pour réactiver une représentation spécifique d'un contexte spatial. Enfin, en lien avec ces résultats, il faut noter que le DG présente durant le sommeil paradoxal des augmentations phasiques de son activité (*dentate burst*) qui pourraient promouvoir la consolidation de la mémoire (Montgomery et al. 2008).

II.2.2 CA3



La région CA3 est subdivisée en six couches principales : la *stratum lacunosum-moleculare* externe (*outer lacunosum-moleculare, oLM*) recevant principalement les afférences du cortex entorhinal latéral (LEC) ; la *stratum lacunosum-moleculare* interne (*inner lacunosum-moleculare, iLM*) recevant principalement les afférences du cortex entorhinal médian (MEC) ; la *stratum radiatum* (RAD) recevant principalement les afférences des projections récurrentes de CA3 ipsilatéral et controlatéral ; la *stratum lucidum* (SL) recevant principalement les afférences des fibres moussues (cellules granulaires du DG) ; la *stratum pyramidale* (PYR) qui est la principale couche cellulaire comprenant notamment les corps cellulaires de cellules pyramidales et enfin la *stratum oriens* (OR) recevant les projections des fibres moussues (notamment dans CA3c, la partie la plus proximale de CA3) et les fibres des cellules pyramidales de

CA2 (notamment dans CA3b et CA3a). CA3 entretient des relations inhibitrices réciproques avec CA2 (Kohara et al. 2014) et les entrées de fibres moussues dans la *stratum lucidum* sont particulièrement puissantes, bien que peu nombreuses et relativement peu souvent actives (Rollenhagen & Lübcke 2010)

La particularité la plus remarquable des neurones pyramidaux de CA3 est qu'ils reçoivent la majorité de leurs entrées de la part de collatérales (bilatérales) d'autres neurones pyramidaux de CA3. Ces connexions récurrentes formeraient un réseau auto-associatif idéal pour la formation rapide d'associations multimodales (par exemple entre un objet, un son un choc ou une odeur et un contexte) et seraient également impliquées dans le maintien en mémoire de travail de l'information spatiale (Gilbert & Kesner 2003 ; Rolls & Kesner 2006 ; Dumas et

Neuroanatomie de la formation hippocampique

al. 2005). De plus, cette circuiterie particulière permettrait d'initier le rappel mnésique à partir des entrées entorhinales *via* les phénomènes de *pattern completion* : une opération computationnelle consistant à réactiver une représentation à partir d'entrées sensorielles partiellement en recouvrement avec la représentation initiale (Nakazawa et al. 2002 ; Gold & Kesner 2005).

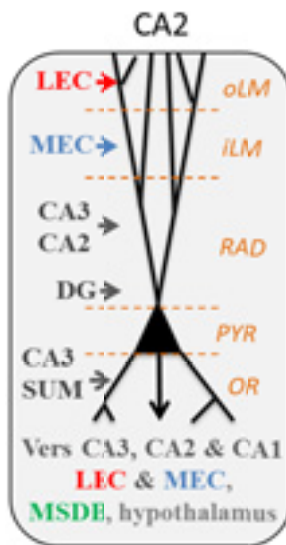
La région CA3 peut être également divisée en trois zones proximo-distales par rapport au DG : CA3c (la plus proximale du DG), CA3b (intermédiaire) et CA3a (la plus distale du DG) (pour revue, voir Kesner 2007). Ainsi, CA3a et b seraient particulièrement impliqués dans l'encodage rapide de l'information spatiale en mémoire à court-terme, les neurones de CA3 répondant plus rapidement que les neurones de CA1 à un changement de configuration de l'environnement (Leutgeb et al. 2006). Dans le cadre d'un apprentissage spatial sur plusieurs essais, CA3a/b joueraient aussi un rôle dans l'encodage progressif de l'information spatiale en mémoire à long-terme, la lésion de cette sous-structure entraînant des déficits d'amélioration inter-essais (Gilbert & Kesner 2003). CA3a/b serait également impliquée dans la formation d'associations entre stimulus, comme des associations entre objet et l'emplacement d'un renforcement (pour revue, voir Kesner 2007). Enfin, CA3a/b jouerait un rôle dans le rappel des informations à partir d'entrées partielles *via* les processus de *pattern completion* (pour revue, voir Kesner 2007). En effet, le blocage de la signalisation glutamatergique *via* les récepteurs NMDA dans CA3 entraîne des déficits de *pattern completion* en piscine de Morris (pas de rappel si certains indices sont déplacés dans la pièce ; Nakazawa et al. 2002). La partie CA3c, quant à elle, jouerait un rôle important dans le codage géométrique de l'environnement (pour revue, voir Kesner 2007).

Les entrées des fibres moussues seraient particulièrement importantes pour induire l'encodage d'un nouveau contexte, notamment lorsqu'il y a une forte similarité entre le contexte courant et des contextes déjà encodés ce qui induirait une forte charge en *pattern separation* (Jermain et al. 2006). Les entrées des voies perforantes permettraient, quant à elles, d'initier le rappel de l'information à partir d'indices de rappel incomplets, la perturbation des voies perforantes dans CA3 induisant des déficits d'apprentissage en navigation spatiale d'un jour à l'autre, mais pas entre les différents essais de chaque jour (Lee & Kesner 2004).

Les projections de CA3 (notamment de CA3c) vers le DG cibleraient plus particulièrement le Hile où elles contactent précocement les neurones néoformés du DG (Vivar et al 2012 ; 2013). Ces projections de CA3c concourraient également aux phénomènes de *pattern separation*, notamment dans le cadre du *pattern separation* géométrique : le DG pouvant opérer seul à un *pattern separation* spatial sur la base de localisations spécifiques, mais dépendrait de CA3c dans le cadre du *pattern separation* sur la base de la géométrie de l'environnement (pour revue, voir Kesner 2007). Les projections vers CA1, à travers les collatérales de Schaffer, seraient notamment impliquées dans le traitement des séquences temporelles (Gilbert et al. 2001). Enfin, les projections vers le complexe septum médian/bande diagonale de Broca (MSDB ; Gaykema et al. 1991) pourraient moduler les projections GABAergiques, cholinergiques et glutamatergiques vers l'ensemble de la formation hippocampique.

Neuroanatomie de la formation hippocampique

II.2.3 CA2



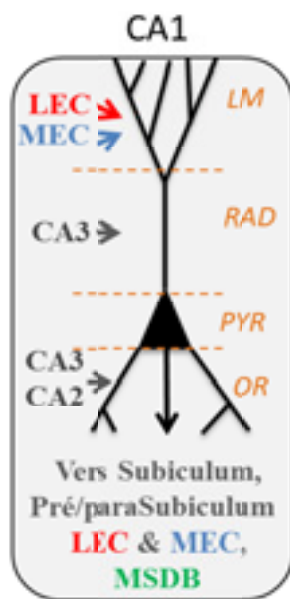
La région CA2 est probablement la région la moins étudiée de l'hippocampe, notamment parce qu'elle est difficile d'accès chez le rongeur et du fait de sa petite taille. Cependant, l'utilisation d'approches génétiques a récemment montré que CA2 est en fait bien plus étendu que ne l'avait suggéré les études anatomiques classiques. En effet, une partie de ce qui était considéré comme CA3a serait en fait une sous-partie de l'aire CA2, celle-ci recevant de ce fait des afférences du DG (partie la plus distale des fibres moussues ; Kohara et al. 2014). La région CA2 est classiquement subdivisée en cinq couches : la *stratum lacunosum-moleculare* externe (*outer lacunosum-moleculare*, oLM) recevant principalement les afférences du cortex entorhinal latéral (LEC) ; la *stratum lacunosum-moleculare* interne (*inner lacunosum-moleculare*, iLM) recevant principalement les afférences du cortex entorhinal médian (MEC) ; la *stratum radiatum* (RAD) recevant principalement les afférences des collatérales de Schaffer (CA3) ; la *stratum pyramidale*

(PYR) qui est la principale couche cellulaire comprenant notamment les corps cellulaires de cellules pyramidales et enfin la *stratum oriens* (OR) recevant également les projections des collatérales de Schaffer (CA3) et des afférences de l'aire supra-mamillaire (SUM). Il faut noter que dans les analyses présentées dans cette thèse, je n'ai pas quantifié les changements synaptiques dans les terminaisons des fibres moussues au niveau de CA2.

CA2 est mutuellement lié par des relations inhibitrices avec CA3 (Kohara et al. 2014). Si CA2 reçoit des afférences puissantes de la part de la couche II du cortex entorhinal (Chevaleyre et al. 2010), CA2 envoie également en retour des projections denses vers cette couche (Rowland et al. 2013), formant ainsi un circuit court entre le cortex entorhinal et l'hippocampe. De la même manière, CA2 reçoit des entrées bilatérales de CA3 et CA2 et projette en retour bilatéralement sur CA1, CA2 et CA3 (Cui et al. 2013). Ainsi, CA2 serait, tout comme CA3, caractérisé par la présence de connexions récurrentes et bilatérales. Les entrées de CA3 seraient plutôt associées à une inhibition *feed-forward* (Chevaleyre et al. 2010). Les projections vers CA1 seraient particulièrement puissantes et cibleraient spécifiquement la sous-population la plus profonde des cellules pyramidales de CA1 (Chevaleyre et al. 2010 ; Kohara et al. 2014). L'une des singularités de CA2 étant sa forte composante longitudinale, cette structure semble opérer sur l'ensemble de l'axe dorso-ventral de l'hippocampe (Kohara et al. 2014). Concernant la circuiterie sous-corticale, CA2 reçoit des entrées du MSDB et de l'hypothalamus (notamment de l'aire supra-mamillaire) et projette également en retour vers ces structures (Cui et al. 2013). Enfin, CA2 reçoit des entrées importantes et bilatérales du raphé médian.

Bien que le rôle fonctionnel de CA2 soit encore mal défini, ses relations réciproques avec l'ensemble des sous-régions hippocampiques, avec le MSDB et avec les couches superficielles du cortex entorhinal laisse présager une implication potentiellement importante dans l'ensemble des comportements hippocampo-dépendants.

II.2.4 CA1



La région CA1 est classiquement divisée en quatre couches principales : la *stratum lacunosum-moleculare* (LM) recevant principalement les afférences du cortex entorhinal et des noyaux thalamiques ; la *stratum radiatum* (RAD) recevant principalement les afférences des collatérales de Schaffer (CA3) et de CA2 ; la *stratum pyramidale* (PYR) qui est la principale couche cellulaire comprenant notamment les corps cellulaires de cellules pyramidales et enfin la *stratum oriens* (OR) recevant notamment les projections des collatérales de Schaffer (CA3) et de CA2. Les entrées entorhinales dans CA1 seraient essentiellement modulatrices. En effet, la coïncidence entre les entrées entorhinales et les entrées des collatérales de Schaffer induirait par exemple la potentialisation de ces dernières (Xu et al. 2012). Les projections de CA1 vers le MSDB émergeraient principalement des neurones GABAergiques et celles-ci contacteraient principalement les neurones GABAergiques de projection du MSDB (Manseau et al. 2008). Contrairement au DG, à CA3 et à CA2, CA1 recevrait la majorité de ses entrées

entorhinales de la part de la couche III.

Fonctionnellement, CA1 a été impliquée dans la formation d'associations temporelles, la consolidation de la mémoire et le rappel mnésique. En effet, les perturbations de CA1 induisent des déficits d'apprentissage de séquences temporelles (Huerta et al. 2000 ; Hoge & Kesner 2007), de rappel en mémoire spatiale (Vago et al. 2007) et de consolidation à long terme des traces mnésiques (Remondes & Schuman 2004).

L'implication de CA1 dans la navigation spatiale et la mémoire spatiale reposerait notamment sur les cellules de lieu. Dans CA1, ces cellules de lieu se mettent en place progressivement et leur codage spatial resterait stable pendant des mois au minimum (Lever et al. 2002). Le comportement de décharge des cellules de CA1 est spatialement modulé surtout dans la partie proximale de CA1, en accord avec des projections entorhinales provenant principalement du MEC (Henriksen et al. 2010). Dans un labyrinthe en T, une proportion non négligeable de cellules de lieu auraient un comportement de décharge différentiel en fonction de la direction du virage, indiquant un codage modulé par l'objectif de l'animal (Griffin et al. 2007). Au-delà du codage de la position par la fréquence de décharge, les cellules de lieu procéderaient également à un codage combiné de la position, de la trajectoire et de la direction *via* le phénomène de précession de phase (Huxter et al. 2008 ; voir partie III de ce chapitre). Les cellules de lieu seraient ainsi impliquées dans un codage de la position, un codage prospectif (positions à venir) et un codage rétrospectif (positions passées) et au voisinage du point de choix le codage de la trajectoire est particulièrement proéminent (Ferbinteanu et al. 2011). Le comportement de décharge spatialement modulé des cellules de lieu est généralement vu comme dépendant essentiellement des indices visuels, mais la comparaison entre une navigation dans une version réelle et dans une version virtuelle du même environnement a démontré que les indices vestibulaires sont nécessaires pour activer de manière optimale la représentation spatiale de l'environnement dans CA1 (Ravassard et al. 2013).

L'implication de CA1 dans le codage des associations temporelles dépendrait étroitement de la coopération entre CA1 et CA3 (Lee et al. 2005 ; Kesner 2007). La description de cellules temporelles (*time cells*) codant pour le délai séparant deux événements significatifs d'une

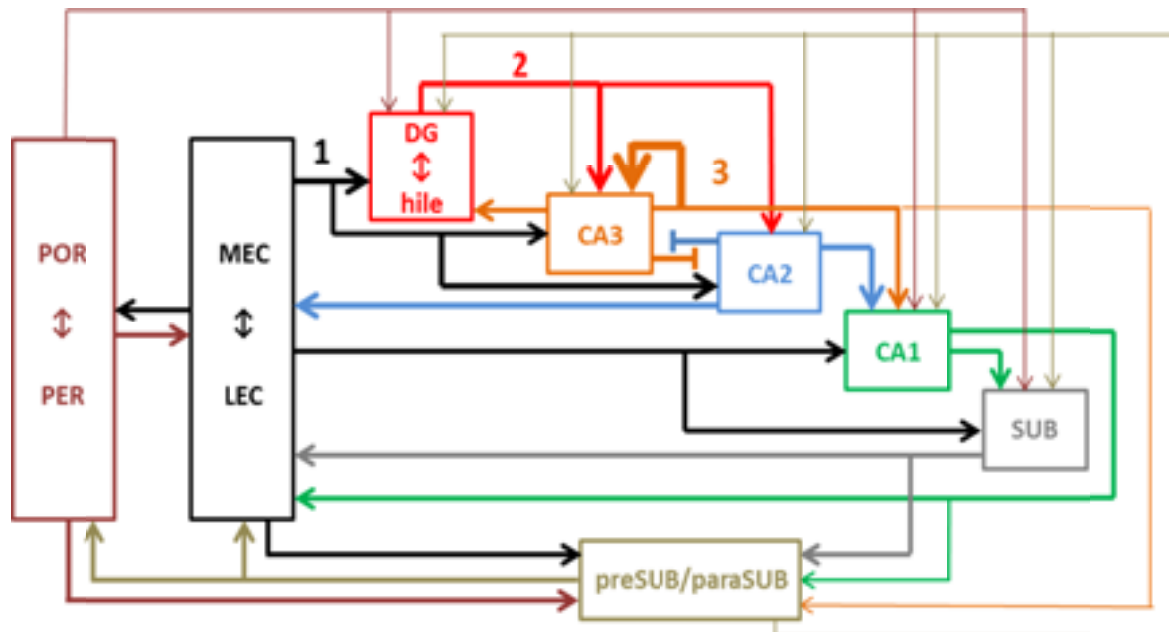
Neuroanatomie de la formation hippocampique

tâche en fonction de la localisation et du comportement en cours de l'animal, serait un substrat des fonctions temporelles de CA1 (MacDonald et al. 2011 ; Kraus et al. 2013). Cependant, les projections en provenance de la couche III du cortex entorhinal joueraient également un rôle dans la mémoire des associations temporelles (Suh et al. 2011) et potentiellement dans l'encodage de l'ordre temporel des événements dans un épisode (MacDonald et al. 2011).

II.3 Les réseaux de la formation hippocampique.

Classiquement, l'organisation de la circuiterie de la formation hippocampique est décrite comme une boucle trisynaptique de traitement de l'information (entorhinal→DG→CA3→CA1). Cependant, l'organisation des circuits de la formation hippocampique est plus complexe et consisterait plutôt en de multiples boucles parallèles de traitement de l'information (Figure 16).

Figure 16 : Organisation des principaux circuits intrinsèques de la formation hippocampique.



Cette figure présente les principaux circuits de la formation hippocampique déterminés d'après Llorens-Martin et al. 2014 et Van Strien et al. 2009. La plupart de ces circuits ont été décrits à partir d'expériences de traçage neuroanatomique chez le Rat. N'apparaissent sur cette figure que les projections les plus denses. Il faut cependant noter qu'il existe également de nombreuses projections GABAergiques en retour comme par exemple entre le DG et le cortex entorhinal (Melzer et al. 2012) ou encore entre le subiculum et CA3 (Publication n°6 en annexe). Ces projections éparpillées allant à contre-sens des projections « dominantes », pourraient notamment être impliquées dans la synchronisation des structures entre elles via la modulation de leurs activités oscillatoires (Melzer et al. 2012 ; Publication n°6 en annexe). POR, postrhinal ; PER, périorhinal ; MEC, cortex entorhinal médian ; LEC, cortex entorhinal latéral ; DG, gyrus denté ; SUB, subiculum ; preSUB, présubiculum ; paraSUB, para-subiculum. 1, voies perforantes ; 2, fibres moussues ; 3, collatérales de Schaffer. Les circuits en trait fin font référence à des connexions encore mal connues.

Neuroanatomie de la formation hippocampique

La complexité de ces circuits nécessite une coordination fine de l'activité des différentes structures de la formation hippocampique. Plus largement, les activités des circuits de la formation hippocampique doivent également se coordonner avec les aires cérébrales extra-temporales également impliquées dans la navigation. Cette coordination passerait notamment par l'organisation temporelle fine de l'activité des multiples populations neuronales qui composent ces réseaux, un phénomène qui se reflèterait dans les activités électriques oscillatoires rythmiques traduisant l'activité synchronisée d'une population de neurones.

III. Activités oscillatoires.

L'exécution des fonctions cognitives complexes requiert la coordination de multiples réseaux neuronaux s'étendant à travers de nombreuses régions cérébrales. Comment ces populations de neurones se coordonnent-elles pour coder l'information?

Les réseaux neuronaux présentent des fluctuations rythmiques de leur excitabilité qui se traduisent par des oscillations rythmiques des potentiels de champ extracellulaires (*local field potential, LFP*). Ces fluctuations de l'excitabilité génèreraient des fenêtres temporelles ouvertes à la communication inter-neuronale. Ainsi, les oscillations cohérentes entre différents groupes de neurones leur permettraient d'interagir efficacement, leur fenêtre de communication étant ouverte aux mêmes moments. L'activité rythmique des neurones représenterait donc un des mécanismes permettant de lier et de coordonner les activités d'assemblées neuronales distribuées. Dans la formation hippocampique, deux principaux rythmes synchroniseraient ainsi l'activité neuronale, le rythme thêta (d'environ 4 à 12 Hz) et le rythme gamma (d'environ 25 à 140 Hz).

III.1 Oscillations et mémoire.

III.1.1 Thêta

Les oscillations thêta sont des activités électriques sinusoïdales associées notamment aux comportements actifs et au sommeil paradoxal (Winson 1974 ; Colgin 2013). Cette activité rythmique est prédominante dans l'hippocampe, mais on la retrouve également dans les structures interconnectées avec l'hippocampe comme le cortex entorhinal (Mitchell & Ranck 1980), le septum (Nerad & McNaughton 2006), l'amygdale (Seidenbecher et al. 2003), le parasubiculum (Glasgow & Chapman 2007), le striatum (DeCoteau et al. 2007) et le cortex préfrontal (Jones & Wilson 2005).

Corrélat comportementaux de l'activité thêta.

La puissance du thêta est corrélée aux mouvements, notamment aux mouvements actifs (Terrazas et al. 2005). Elle corrèle également aux performances de rappel mnésique chez le Rat (Landfield et al. 1972, Winson 1978) comme chez l'Homme (Rutishauser et al. 2010). Cette implication du thêta dans les phénomènes mnésiques et d'apprentissage pourrait notamment s'expliquer par la modulation des modifications plastiques de la force synaptique (Larson et al. 1986 ; Greenstein et al. 1988).

Genèse des oscillations thêta.

Le thêta dans la formation hippocampique a longtemps été perçue comme générée par l'innervation provenant du complexe septum médian/bande diagonale de Broca (MSDB).

En effet, la lésion ou l'inactivation réversible du MSDB induit une réduction drastique de la puissance du thêta dans l'hippocampe et le cortex entorhinal (Petsche et al. 1962 ; Mitchell et al. 1982 ; Koenig et al. 2011 ; Brandon et al. 2011). Anatomiquement, les neurones GABAergiques du MSDB projetant vers la formation hippocampique ont une activité de décharge rythmique au thêta, tandis que les neurones de projections cholinergiques modulerait l'excitabilité neuronale dans la formation hippocampique pour promouvoir les décharges rythmiques au thêta (Simon et al. 2006). Cependant, l'étude *ex vivo* de l'activité

oscillatoire de l'hippocampe intact, mais isolé, a révélé que celle-ci est capable de générer de manière autonome un rythme thêta grâce à la présence de multiples oscillateurs locaux (Goutagny et al. 2003). Les interneurons hippocampiques joueraient un rôle particulièrement important dans la synchronisation des populations neuronales et supporteraient la genèse des oscillations dans les réseaux neuronaux (Klausberger 2008). Le maintien de ces activités thêta reposerait sur les interactions entre certains types d'interneurones et les cellules pyramidales principales. En effet des courants post-synaptiques inhibiteurs rythmiques sont enregistrés dans les cellules pyramidales, tandis que les interneurons présentent des courants post-synaptiques excitateurs rythmiques. Le cortex entorhinal participerait également à la modulation du thêta hippocampique. En effet, les cellules des couches superficielles du cortex entorhinal ont des décharges synchrones au rythme thêta (Quilichini et al. 2010), ce qui suggère que les voies perforantes pourraient rythmiquement moduler les décharges dans l'hippocampe (Alonso et al. 1987). Cependant, chez le Rat libre de ses mouvements, les cellules étoilées de la couche II du cortex entorhinal ne seraient que faiblement modulées au rythme thêta (Ray et al. 2014).

En fait, il y aurait deux types d'oscillations thêta dans l'hippocampe, un thêta accompagnant les comportements exploratoires, résistants à l'atropine, mais dépendant de l'intégrité du cortex entorhinal, et un thêta prédominant durant l'anesthésie à l'uréthane, sensible à l'atropine (donc à l'innervation cholinergique provenant du MSDB), mais résistant à la lésion du cortex entorhinal (Kramis et al. 1975).

Organisation de l'information et oscillations thêta.

L'hippocampe recevant des informations convergentes en provenance de multiples aires, ces informations doivent arriver de manière coordonnée afin de pouvoir être intégrées de manière appropriée. Or, le rythme thêta semble être lié à la prise rythmique de l'information environnementale. En effet, chez le Rat, la fréquence du thêta est corrélée à la fréquence des mouvements des vibrisses (Berg & Kleinfeld 2003 ; Ganguly & Kleinfeld 2004) et au rythme des reniflements (Macrides et al. 1982), tandis que chez l'Homme le rythme thêta serait essentiellement modulé par le rythme des saccades oculaires (Otero-Millan et al. 2008). Ainsi, il apparaît que chaque cycle thêta peut contenir un échantillon discret d'informations sensorielles (Kepecs et al. 2006).

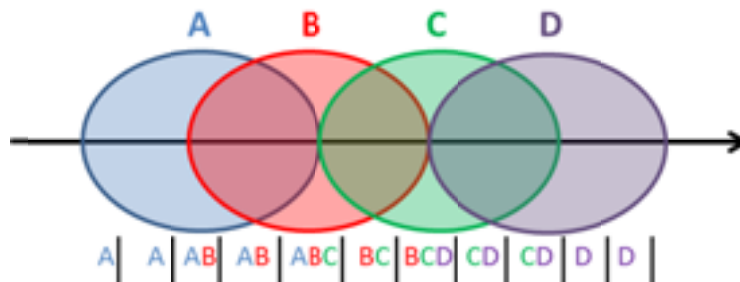
Au-delà des étapes de traitement sensoriel de l'information, le rythme thêta pourrait servir à relier l'information sensorielle aux informations motivationnelles, émotionnelles et mnésiques, faisant ainsi de chaque cycle thêta une entité de traitement discret et intégré de l'information quant aux conditions environnementales courantes de l'animal. Dans une élégante expérience, Jezek et collaborateurs (2011) ont apporté une démonstration forte de ce rôle du thêta. Dans leurs travaux, des rats ont été familiarisés avec deux champs-ouverts reliés par un passage. Les deux champs ouverts ne différaient que par les conditions d'éclairage et les rats ont progressivement développé une représentation propre de chacun de ces champs ouverts. Les rats ont ensuite été placés dans un champ ouvert avec un éclairage correspondant à l'un des environnements, puis brusquement l'éclairage a été changé pour correspondre à celui caractérisant l'autre environnement (expérience de « téléportation »). Au moment de ce changement abrupt, Jezek et collaborateurs ont observé que la représentation spatiale de l'environnement était temporairement instable, celle-ci oscillant périodiquement entre les représentations spécifiques de chacun des environnements sur des cycles thêta propres. L'implication du rythme thêta dans l'organisation de l'information est encore renforcée par le fait que durant les tâches d'alternance en labyrinthe en T, les séquences de cellules de lieu

occupant chaque cycle thêta représentent alternativement les différentes trajectoires possibles (Gupta et al. 2012).

Précession de phase thêta et codage spatio-temporel de l'information.

Lorsque l'animal traverse le champ d'activité d'une cellule de lieu, la décharge de celle-ci se produit de plus en plus tôt à chaque cycle thêta, un phénomène appelé la précession de phase (O'Keefe & Recce 1993 ; Skaggs et al. 1996). Or, comme chaque cycle thêta est accompagné de la décharge de plusieurs cellules de lieu associées à des champs d'activité séquentiels en recouvrement partiel (Figure 17), un cycle thêta individuel contiendrait ainsi une représentation compressée de l'espace (Skaggs et al. 1996).

Figure 17 : Représentation schématique de la précession de phase des cellules de lieu (adapté de Skaggs et al. 1996)



La figure représente quatre champs d'activité de cellules de lieu en recouvrement partiel (A, B, C et D) pour un animal se déplaçant vers la droite (flèche noire). En bas de la figure sont représentées les décharges des cellules de lieu en fonction du pic de la phase de l'oscillation thêta (barres verticales noires). On peut observer qu'au cours du déplacement de l'animal, il y a activation répétée des séquences de cellules de lieu au sein de chaque cycle thêta.

Ainsi, la précession de phase permettrait de coder à la fois de la position courante de l'animal (cellule la plus active), la trajectoire passée (cellules déchargeant plus tôt dans le cycle) et la trajectoire future (cellules déchargeant plus tard dans le cycle ; Dragoi & Buzsaki 2006). Cependant, certains cycles thêta représenteraient majoritairement la trajectoire passée, tandis que d'autres représenteraient plutôt la trajectoire à venir (Gupta et al. 2012).

Si la précession de phase thêta a beaucoup été étudiée au niveau de CA1, elle a également été rapportée dans le DG (Yamaguchi et al. 2002 ; Mizuseki et al. 2009), dans CA3 (Mizuseki et al. 2009), dans le subiculum (Kim et al. 2012), dans le cortex entorhinal (Hafting et al. 2008, Mizuseki et al. 2009) et dans le striatum ventral (Van der Meer & Redish 2011). Elle représenterait donc un mécanisme général de codage de l'information par la phase de l'oscillation thêta. La précession de phase au niveau des cellules entorhinales de la grille augmente sensiblement la quantité d'informations spatiales codée par la décharge de la cellule et ainsi les multiples champs d'activité des cellules de la grille pourraient être vus comme autant d'éléments indépendants du codage spatial (Reifenstein et al. 2012).

Ainsi, la précession de phase de décharges neuronales par rapport au thêta augmente-t-elle significativement la quantité d'informations codées par les potentiels d'action, notamment en différenciant les décharges ayant lieu dans les champs d'activité de celles qui ont lieu en dehors et en prédisant parmi les différentes alternatives, la trajectoire future de l'animal. Globalement, la prise en compte de l'activité thêta permettrait donc un codage plus complet de l'information neuronale que le seul patron de décharge (Molter et al. 2012).

Modulation des dynamiques d'encodage et de rappel par la phase du thêta.

La relation de phase entre les décharges neuronales et l'oscillation thêta (c'est-à-dire le maintien d'une relation de phase constante entre la décharge d'un neurone et l'oscillation thêta locale) conditionnerait l'efficacité de l'apprentissage. Ainsi, chez l'humain, la puissance des oscillations thêta en EEG est corrélée avec un encodage réussi de mots (Klimesch et al. 1996 ; Jacobs et al. 2009 ; Snider et al. 2013) et des enregistrements intracérébraux ont montré que la force du rappel de l'information est prédite par la force de la relation de phase des neurones au rythme thêta durant l'apprentissage (Rutishauser et al. 2010). De plus, chez l'Homme, la puissance des oscillations thêta dans l'hippocampe et le cortex parahippocampique corrèle avec les performances d'apprentissage dans une tâche de navigation dans un environnement virtuel (Cornwell et al. 2008). De la même façon, le thêta est corrélé avec la réussite de l'apprentissage chez le Rat (Winson 1978). Plus particulièrement, la diminution du thêta par inhibition du MSDB entraîne un retard d'apprentissage en navigation spatiale chez le Rat, un déficit réversé par la réinstauration artificielle d'un rythme thêta dans l'hippocampe, démontrant ainsi expérimentalement le rôle important du thêta dans les phénomènes mnésiques et notamment dans la navigation spatiale (McNaughton et al. 2006b). Or, des expériences menées au cours d'enregistrement sur le Rat anesthésié à l'uréthane et le Rat libre de ces mouvements ont démontré que le phénomène de potentialisation à long terme (LTP) dans le DG serait facilité lorsque les stimulations sont induites à la fréquence thêta (Greenstein et al. 1988, Orr et al. 2001). Plus précisément, la phase à laquelle la stimulation a lieu détermine si cette stimulation induit de la LTP ou ne modifie pas la force synaptique (Pavlidis et al. 1988 ; Orr et al. 2001 ; Hyman et al. 2003 ; Douchamps et al. 2013).

A partir de ces effets sur la LTP et en se focalisant sur la région CA1, le modèle proposé par Hasselmo suggère que les différentes phases de l'oscillation thêta induisent l'alternance entre différents modes d'opération et notamment entre les dynamiques d'encodage et de rappel de l'information (Figure 18 ; Hasselmo et al. 2002).

En effet, il apparaît que les entrées entorhinales et les entrées en provenance de CA3 n'ont pas lieu à la même phase du thêta local (Brankack et al. 1993). De plus, la LTP serait plus facilement induite lorsque les entrées arrivent au pic du thêta dans la couche dendritique correspondante, tandis qu'une entrée ayant lieu aux alentours du creux du thêta au niveau de la dendrite correspondante induirait plutôt une dépression à long terme de la force synaptique (LTD, Orr et al. 2001 ; Hyman et al. 2003 ; Villarreal et al. 2007, Douchamps et al. 2013). Ainsi, le pic de genèse de LTP correspondrait au moment où CA1 reçoit le moins d'entrées en provenance de CA3, mais où les dendrites sont fortement dépolarisées par les entrées entorhinales. Dans ce cas de figure, il apparaît que la dépolarisation des dendrites est suffisante pour induire une LTP, même si le soma est fortement hyperpolarisé (Golding et al. 2002). Ainsi, les oscillations thêta moduleraient les dynamiques d'encodage et de récupération à l'échelle de la centaine de millisecondes (soit la durée approximative d'un cycle thêta individuel).

Figure 18 : Modulation des dynamiques d'encodage et de rappel par la phase du thêta (Repris d'Hasselmo et al. 2002)

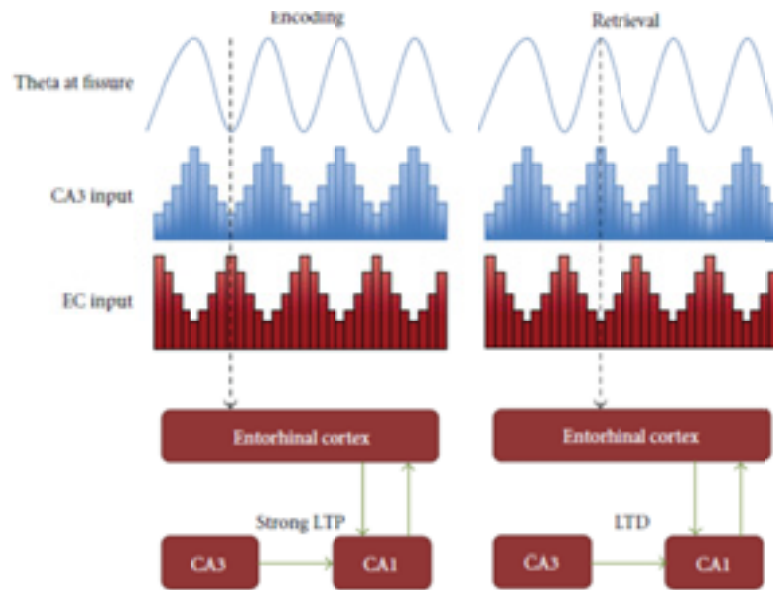


FIGURE 2: Schematic illustration of the Hasselmo et al. model. Redrawn from [52].

D'après ce modèle, l'encodage aurait plutôt lieu durant les phases thêta associées à de fortes entrées entorhinales et à une induction facilitée de la LTP sur les connexions excitatrices en provenance de CA3, bien que la transmission de CA3 soit faible à cette phase du thêta (ce qui permettrait de prévenir le risque d'interférences avec des informations déjà apprises). Au contraire, la récupération de l'information aurait préférentiellement lieu durant la phase où les entrées entorhinales sont faibles et les entrées en provenance de CA3 sont puissantes en association avec une LTD facilitée.

III.1.2 Gamma

Les oscillations gamma (environ 25 à 140 Hz) ont lieu en rafale (*burst*) au sein des cycles thêta chez le rongeur (Bragin et al. 1995, Colgin et al. 2009) comme chez l'humain (Canolty et al. 2006). Le gamma permettrait notamment de séparer les décharges des différentes assemblées cellulaires qui sont actives au sein du même cycle thêta (Jensen & Colgin 2007, Senior et al. 2008). De manière intéressante, chez l'Homme, la puissance des oscillations gamma hippocampiques augmente avec la charge en mémoire de travail (Van Vugt et al. 2010), suggérant un rôle possible dans l'encodage et le rappel mnésique à court terme. Il a ainsi été avancé que le nombre maximal d'oscillations gamma par cycle thêta déterminerait la capacité mnésique ce qui pourrait par exemple expliquer pourquoi les capacités mnésiques de stockage à court terme sont souvent limitées à environ sept items (Lisman & Idiart 1995).

Genèse.

Dans l'hippocampe, il existerait au moins deux types d'oscillations gamma : un gamma lent généré par CA3 et un gamma rapide généré par le cortex entorhinal. En effet, dans CA1, on observe durant le gamma lent principalement un couplage avec CA3, tandis que le gamma rapide serait majoritairement associé à un couplage fort entre CA1 et le cortex entorhinal (Colgin et al. 2009). D'autre part, dans le DG, l'analyse des profils des sources de courants dans le milieu extracellulaire (*current source density, CSD*) durant les activités gamma montre un profil similaire à celui associé aux stimulations des voies perforantes, tandis que dans CA1 le profil serait plutôt cohérent avec celui d'une stimulation des collatérales de Schaffer (Bragin et al. 1995 ; Csicsvari et al. 2003). La genèse de ces rythmes dans

l'hippocampe dépendrait là encore étroitement des interneurons inhibiteurs, certains entretenant une relation de phase entre leur comportement de décharge et le gamma (Buzsaki et al. 1983 ; Penttonen et al. 1998 ; Tukker et al. 2007).

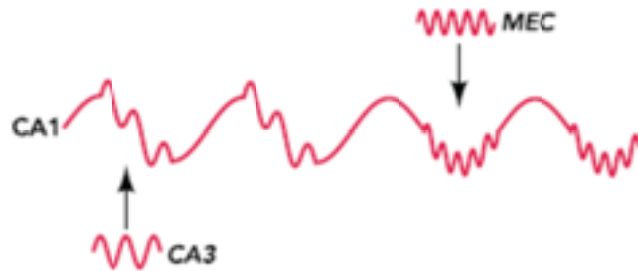
Organisation de l'information.

Un cycle gamma particulier s'accompagnerait de la décharge synchrone d'une sous-population de neurones formant une assemblée cellulaire (Csicsvari et al. 2003, Senior et al. 2008 ; Colgin et al. 2009).

Ainsi, au niveau sensoriel, des enregistrements dans le cortex visuel primaire ont montré que des neurones de différentes colonnes répondant au même stimulus (une barre lumineuse) déchargent à la même fréquence gamma (Gray et al. 1989). De plus, les oscillations gamma seraient également importantes pour la sélection des stimuli devant être traités dans les aires d'ordre supérieur (Fries et al. 2001). Ainsi, le gamma permettrait la sélection des stimuli les plus pertinents et, par là-même, faciliterait le filtrage du bruit causé par les stimuli non-pertinents. Dans l'hippocampe, les oscillations gamma permettraient l'organisation séquentielle des décharges des différentes assemblées cellulaires au sein même d'un cycle thêta (Jensen & Colgin 2007, Senior et al. 2008). Cette activation séquentielle au rythme gamma coderait pour une version compactée de l'information spatiale (Skaggs et al. 1996) et celle-ci est souvent prédictive du comportement à venir de l'animal (Battaglia et al. 2004). Ainsi, dans les tâches d'alternance en labyrinthe en T, les différentes représentations des cellules de lieu dans CA3 correspondant aux futures trajectoires possibles s'activeraient séquentiellement en association avec les oscillations gamma, ce qui serait particulièrement utile pour la sélection de la trajectoire à venir (Johnson & Redish 2007).

Les oscillations gamma synchronisées entre deux populations de neurones faciliteraient la transmission de l'information entre ces deux populations, puisque les phases d'excitabilité fluctuantes de ces neurones coïncideraient (Fries 2005 ; Woernelsdorf et al. 2006). Ainsi, dans CA1, les courants excitateurs liés aux entrées de CA3 et aux entrées entorhinales arrivent à différentes phases du thêta (Brankack et al. 1993, Hasselmo et al. 1995, Kamondi et al. 1998), ce qui préviendrait le risque d'interférence entre les représentations en mémoire (CA3) et l'encodage de nouvelles associations (Hasselmo et al. 1995). De plus, les entrées de CA3 et les entrées de l'entorhinal seraient associées à deux types d'oscillations gamma, respectivement une oscillation gamma lente et une oscillation gamma rapide (Figure 19, Colgin et al. 2009).

Figure 19 : Représentation des rythmes gamma liés à CA3 et ceux liés à l'entorhinal
(D'après Colgin et al. 2009).



La figure représente une trace LFP enregistrée au niveau de la couche pyramidale de CA1, montrant les différentes phases du thêta associées aux oscillations gamma lentes (projections de CA3) et aux oscillations gamma rapides (cortex entorhinal médian ou MEC).

Au-delà des circuits intrinsèques à l'hippocampe, les oscillations gamma faciliteraient également la communication entre l'hippocampe et le striatum (Tort et al. 2008) ainsi qu'entre l'hippocampe et le cortex préfrontal (Sirota et al. 2008).

Oscillations gamma et mémoire.

Les oscillations gamma faciliteraient les processus d'encodage. En effet, chez l'Homme, la puissance du gamma enregistré dans l'hippocampe durant l'apprentissage de mots prédit la qualité du rappel à venir (Fell et al. 2001 ; Sederberg et al. 2007). De même manière, chez le primate non-humain, la cohérence des décharges des neurones hippocampiques avec le gamma est associée à un encodage réussi (Jutras et al. 2009). En prenant l'exemple de l'aire CA1, l'encodage coïnciderait avec l'activité gamma rapide associée aux entrées entorhinales Or, l'activation séquentielle des neurones de CA1 à 10-15ms d'intervalle (cycles gamma rapides successifs) faciliterait la mise en place des phénomènes de plasticité dépendant de la synchronisation des décharges pré- et post-synaptiques (*spike-timing dependant plasticity* ; Bi & Poo 1998).

Les oscillations gamma faciliteraient également les processus de rappel. En effet, durant des tâches d'alternance chez le Rat, on peut observer une augmentation de la cohérence gamma entre CA3 et CA1 lorsque l'animal est au point de choix où il doit se rappeler de la trajectoire précédente pour obtenir sa récompense (Montgomery & Buzsaki 2007). Or, les connections entre CA3 et CA1 seraient particulièrement critiques pour le rappel de l'information (Steffenach et al. 2002 ; Fyhn et al. 2004 ; Nakashiba et al. 2008), d'autant plus que le rythme gamma lent associé aux projections de CA3 induit des activations séquentielles des cellules pyramidales de CA1 espacées de plus de 20ms, ce qui représente un intervalle inefficace pour induire des changements synaptiques durables et robustes (Bi & Poo 1998).

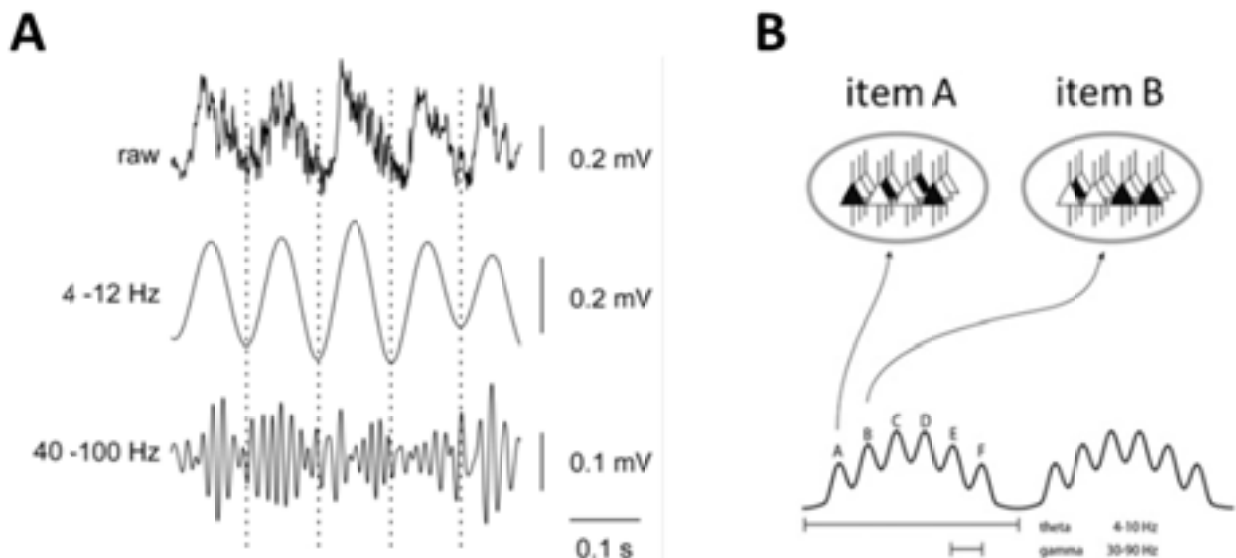
III.1.3 couplage entre phase du rythme thêta et amplitude du rythme gamma

Généralement, les oscillations thêta et gamma ont lieu de manière synchronisée et l'amplitude de l'oscillation gamma est modulée par la phase de l'oscillation thêta (Figure 20a). Ce type de couplage phase-amplitude existe entre plusieurs bandes de fréquences, mais le couplage le plus couramment décrit est le couplage entre la phase du thêta et l'amplitude du gamma (Canolty et al. 2010). Quoi qu'il en soit, ce type de couplage a été décrit au cours de diverses tâches dans les régions corticales et sous-corticales du rongeur (Bragin et al. 1995 ; Tort et al.

2008 ; 2009), chez le primate non-humain (Lakatos et al. 2005) ainsi que chez l'Homme (Bruns & Eckorn 2004 ; Voytek et al. 2010). En fait, la phase de l'oscillation thêta traduirait le niveau d'excitabilité neuronale local tandis que les variations rapides de la puissance de l'oscillation gamma refléteraient les augmentations rythmiques de l'activité synaptique (revue dans Canolty et al. 2010), chaque cycle gamma correspondant ainsi potentiellement à l'arrivée synchrone des entrées en provenance d'une assemblée neuronale particulière (Figure 20).

Ce couplage phase-amplitude entre le thêta et le gamma serait impliqué dans la coordination de la communication entre des régions cérébrales distribuées ainsi que dans les opérations sensorielles et mnésiques (revu dans Lisman & Jensen 2013). En effet, comme vu précédemment, la phase du rythme thêta et du rythme gamma représenterait un code permettant la représentation ordonnée de multiples items (Figure 20B), les assemblées cellulaires déchargeant durant des phases préférentielles de l'oscillation gamma (Skaggs et al. 1996 ; Dragoi & Buzsaki 2006 ; Senior et al. 2008 ; Gupta et al. 2012).

*Figure 20 : Couplage entre la phase du thêta et l'amplitude du gamma.
(d'après Scheffzük et al. 2011 et Lisman & Jensen 2013)*



La phase de l'oscillation thêta (ou de l'oscillation la plus lente) module l'amplitude de l'oscillation gamma plus rapide (A). Or, chaque cycle gamma contenu dans un cycle thêta correspondrait à l'activation spécifique d'une assemblée neuronale particulière (B).

De plus, le couplage entre thêta et gamma serait fonctionnellement important pour les processus d'apprentissage. En effet, dans une tâche d'association entre le contexte spatial et la localisation d'une récompense, le couplage phase/amplitude entre thêta et gamma dans CA3 augmente parallèlement avec l'augmentation des performances et la valeur de ce couplage est prédictive de la probabilité de choix correct (Tort et al. 2009). Ainsi, le couplage entre la phase du thêta et l'amplitude du gamma faciliterait le rappel réussi de l'information spatiale (Shirvankar et al. 2010). Chez l'humain aussi, l'augmentation du couplage entre le thêta frontal et le rythme gamma postérieur en EEG est associée à l'encodage réussi en mémoire à long terme (Friese et al. 2012).

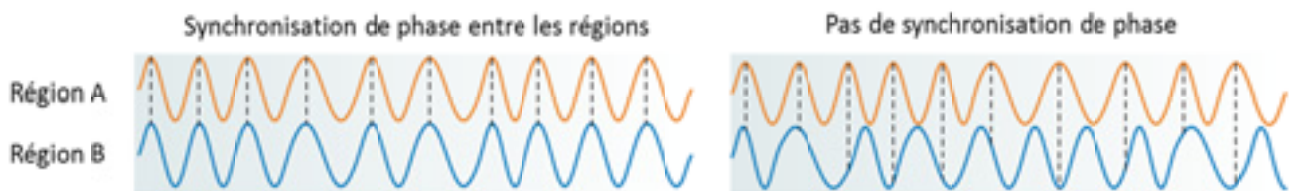
Le couplage phase/amplitude jouerait également un rôle dans le cadre de la mémoire de travail (revue dans Roux et al. 2013). En effet, les phases de délai dans les tâches de mémoire de travail sont souvent associées à une augmentation du couplage entre thêta et gamma, ce qui

serait associé avec la maintenance de la trace mnésique en mémoire de travail (Axmacher et al. 2010). De plus, il y aurait un lien paramétrique entre le nombre d'items à mémoriser en mémoire de travail et l'amplitude de ce gamma associé à la période de maintenance, cette dernière étant en plus corrélée aux performances de rappel (Roux et al. 2013). Chez l'Homme, l'activité gamma liée à la mémoire de travail est notamment générée dans le cortex préfrontal et le cortex pariétal, des régions classiquement associées au réseau de la mémoire de travail. Ainsi, chez l'Homme, il y aurait deux codes phase/amplitudes dédiés à l'organisation séquentielle et hiérarchique des représentations des différents items : un code thêta-gamma relativement général et polymodal et un code alpha-gamma lorsqu'il s'agit de l'ordonnement d'items visuels discrets (Roux et al. 2013).

III.2 Oscillations et communication entre régions cérébrales.

Les oscillations enregistrées localement dans des régions interconnectées peuvent être synchronisées entre elles, c'est-à-dire entretenir une relation de phase (Figure 21). Or, la synchronisation des activités oscillatoires entre différentes régions cérébrales (couplage inter-régional) faciliterait la communication entre ces régions.

*Figure 21 : Relations de phase entre régions.
(D'après Fell & Axmacher 2011).*

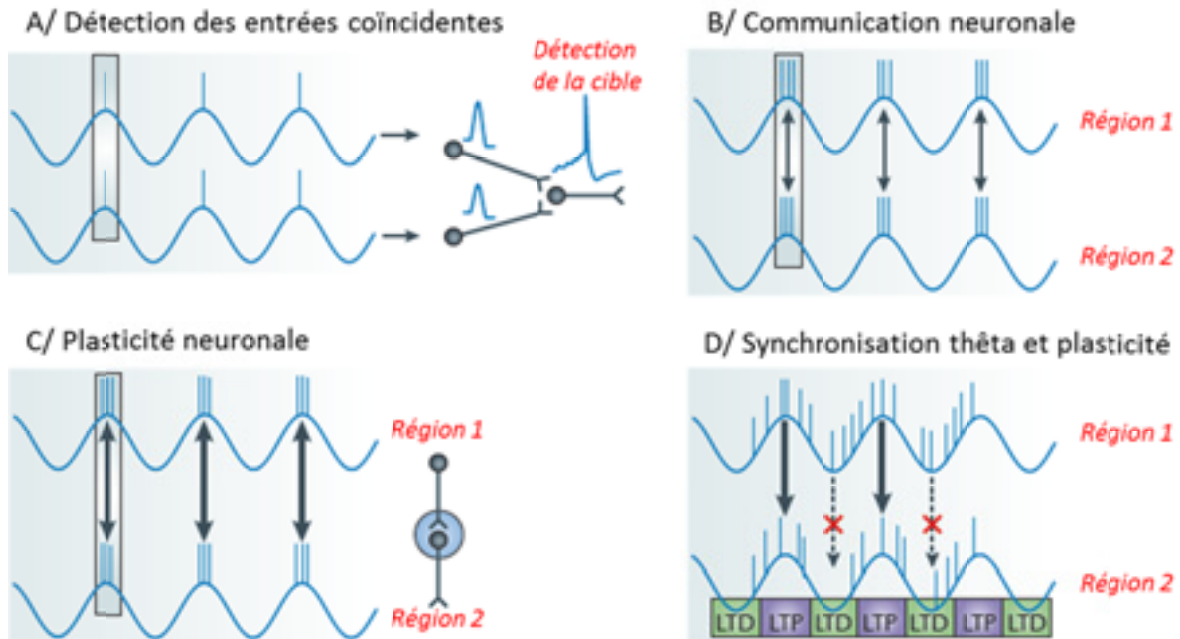


La figure représente les oscillations enregistrées dans une région A en orange et dans une région B en bleu.

Couplage inter-régional et mémoire.

Il y aurait un lien entre le couplage au rythme thêta entre différentes régions et les performances comportementales. En effet, le couplage au thêta entre l'hippocampe et le cortex préfrontal médian serait notamment augmenté durant les choix corrects en mémoire de travail dans les tâches d'alternance spatiale (Jones & Wilson 2005 ; Benchenane et al. 2010). Plus particulièrement, il y aurait un couplage entre les décharges des neurones du préfrontal médian, le gamma dans cette structure et le thêta hippocampique (Jones & Wilson 2005 ; Sirota et al. 2008 ; Hyman et al. 2010). Ce type de couplage entre l'hippocampe et le préfrontal médian se retrouverait également durant les apprentissages réussis en localisation spatiale d'objets (Kim et al. 2011). La signification de ce couplage durant les tâches de mémoire spatiale pouvant notamment traduire la focalisation de l'attention sur la représentation requise pour résoudre la tâche, la perte du couplage au début des essais ratés traduisant alors un déplacement de l'attention hors des représentations liées à la tâche (Hyman et al. 2011).

Figure 22 : Mécanismes hypothétiques reliant synchronisation inter-régionale et mémoire.
(Adapté d'après Fell & Axmacher 2011)



La figure représente les rôles potentiels de la synchronisation de phase dans les traitements neuronaux. Les courbes bleues représentent les oscillations des assemblées neuronales dans deux régions cérébrales, les flèches représentant le transfert inter-régional de l'information.

A/ la synchronisation de phase des décharges des assemblées neuronales dans deux régions projetant sur une cible commune (cadre noir sur le premier cycle oscillatoire) permettrait l'arrivée coïncidente de leurs entrées synaptiques dans la région cible. Ces entrées coordonnées induiraient ainsi plus facilement la décharge des neurones cibles.

B/ La synchronisation des phases entre de multiples régions cérébrales permettrait un transfert efficace de l'information (flèches) durant la période d'excitabilité optimale (indiquée sur le premier cycle oscillatoire par le cadre noir).

C/ La synchronisation précise des potentiels d'action produite par la synchronisation de phase entre deux régions faciliterait l'induction de la plasticité synaptique dépendant du timing des décharges pré- et post-synaptiques (spike timing dependent plasticity), ce qui faciliterait d'autant plus la communication entre ces régions (flèches noires plus épaisses).

D/ Fonctions potentielles de la synchronisation de phase au thêta entre deux régions : la direction des changements plastiques des poids synaptiques entre deux régions serait influencée par la phase du thêta dans la région 2 dans laquelle l'entrée synaptique a lieu. LTD, dépression à long terme ; LTP, potentialisation à long terme.

En fonction des tâches, le couplage inter-régional lié aux performances impliquerait différentes régions comme le striatum et l'hippocampe dans des tâches indicées (DeCoteau et al. 2007), l'amygdale et l'hippocampe dans le cadre de conditionnement de peur (Seidenbecher et al. 2003) ou encore le bulbe olfactif et l'hippocampe dans le cadre d'une discrimination d'odeur (Kay 2005). Ce couplage augmente parallèlement aux performances au cours de l'apprentissage (Benchenane et al. 2010) et son absence n'est associée qu'aux essais ratés (Hyman et al. 2010). Ainsi, on peut observer un pic de cohérence gamma entre le LEC et la partie distale de CA1 durant l'analyse de l'indice olfactif permettant de déterminer l'emplacement spatial d'une récompense et cette cohérence augmenterait progressivement avec l'acquisition de cette tâche d'association odeur/position, ce qui traduirait une

synchronisation de plus en plus efficace des neurones faisant partie des circuits impliqués dans la mémoire associative spatiale (Igarashi et al. 2014).

Comment le couplage inter-régional influence-t-il l'apprentissage et la mémoire ?

Ce contrôle fin de l'activité du réseau durant le comportement serait notamment permis par les différents types d'interneurones inhibiteurs ciblant spécifiquement différents domaines subcellulaires (Lapray et al. 2012). La synchronisation thêta entre régions faciliterait le transfert de l'information et assurerait que les neurones ciblés soient bien dans une phase d'excitabilité adaptée au moment où les entrées surviennent (Figure 22 ; Fell & Axmacher 2011).

Si le couplage entre régions s'observe à différentes fréquences, l'échelle temporelle relativement basse du thêta serait particulièrement adaptée à la coordination multisynaptique et multirégionale notamment entre régions éloignées (Colgin 2013).

IV. Modulation cholinergique du fonctionnement de la formation hippocampique.

IV.1. Anatomie et fonction du septum médian et de la bande diagonale de Broca (MSDB).

La formation hippocampique reçoit de nombreuses entrées sous-corticales et notamment des projections venant du complexe regroupant le septum médian et les bras verticaux et horizontaux de la bande diagonale de Broca (MSDB). Ces projections sont de nature cholinergique, GABAergique et glutamatergique, et en retour la formation hippocampique envoie des projections vers le MSDB (Toth et al. 1993 ; Manseau et al. 2008). Il faut également noter que certains neurones cholinergiques du MSDB pourraient également co-synthétiser du glutamate (Manns et al. 2001 ; Gritti et al. 2006). Au cours de cette thèse, je me suis particulièrement intéressé aux projections cholinergiques du MSDB, celles-ci étant impliquées dans les DTA (Bartus et al. 1982 ; Raedler et al. 2007 ; Schliebs & Arendt 2011).

Les projections cholinergiques du MSDB vers l'hippocampe influenceraient la cognition, et notamment la mémoire, *via* la modulation de l'excitabilité neuronale, de la plasticité synaptique et en favorisant les entrées extrinsèques par rapport aux circuits intrinsèques (revue dans Teles-Grilo Ruivo & Mellor 2013). Le bilan global de ces actions faciliterait notamment l'encodage au détriment du rappel de l'information (Hasselmo 2006). Cette implication spécifique de l'acétylcholine dans l'encodage semble confirmée par le fait qu'une exposition à un environnement inconnu (Giovannini et al. 2001) ou encore un apprentissage spatial (Toumane et al. 1988 ; Fadda et al. 2000) entraîne une forte augmentation des niveaux d'acétylcholine dans l'hippocampe. Cependant, le motif de décharge des neurones cholinergiques durant l'encodage reste inconnu.

Un des obstacles majeurs à la compréhension du rôle des projections cholinergiques sur la formation hippocampique est que la nature même de la transmission cholinergique est encore mal comprise. Anatomiquement, les terminaisons cholinergiques dans la formation hippocampique, comme dans le reste du système nerveux central, sont plutôt diffuses et rarement associées à un élément post-synaptique clairement défini (Vizi et al 1998 ; Zoli et al. 1999). Ces données anatomiques suggèrent un mode de transmission volumique lent ayant des effets de longue durée plutôt qu'une transmission synaptique discrète d'un point de vue spatial et temporel (Vizi et al 1998 ; Zoli et al. 1999). Cependant, de récentes études ampérométriques au niveau du cortex ont montré que la transmission cholinergique pouvait être finement régulée temporellement pour être directement corrélée à la détection ou non de stimuli discrets notamment *via* la modulation des processus attentionnels, suggérant ainsi la possibilité d'une transmission cholinergique phasique, au moins au niveau du cortex préfrontal (Parikh et al. 2007 ; Sarter et al. 2009 ; Howe et al. 2013b).

Au niveau de l'hippocampe, le profil de libération d'acétylcholine est mal connu (les études étant limitées à des dosages de l'acétylcholine par microdialyse suivie de chromatographie liquide à haute pression n'ayant qu'une résolution temporelle de l'ordre de plusieurs minutes). Ainsi, il n'est pas possible à l'heure actuelle d'attribuer un rôle précis à la transmission cholinergique sur les processus dépendants de la formation hippocampique.

IV.1.1. Organisation des projections cholinergiques vers la formation hippocampique.

L'innervation cholinergique de l'hippocampe proviendrait largement des voies septo-hippocampiques en provenance du MSDB (Lewis & Shute 1967 ; Dutar et al. 1995). Or, ces voies sont organisées topographiquement, les subdivisions dorso-ventrales présentes dans la formation hippocampique ayant leur pendant au niveau des afférences en provenance du MSDB. En effet, les neurones cholinergiques du bras vertical de la bande diagonale de Broca (VDB) innerveraient principalement l'hippocampe dorsal tandis que les neurones cholinergiques du septum médian (MS) projetteraient préférentiellement sur l'hippocampe ventral (Amaral & Kurz 1985, Gaykema et al. 1990, Nyakas et al. 1987). Les neurones du bras horizontal de la bande de Broca innervent notamment les noyaux olfactifs, le LEC, le cortex mésolimbique médian, le lobe occipital et le bulbe olfactif, tandis que le septum médian innerverait notamment le MEC en plus de l'hippocampe ventral (Gaykema et al. 1990).

L'innervation cholinergique de l'hippocampe ciblerait à la fois les neurones principaux et les interneurons GABAergiques, que ce soit dans la corne d'Ammon ou dans le DG (Frotscher & Leranth 1985 ; Nyakas et al. 1987). De leur côté, les neurones de projection GABAergiques du MSDB cibleraient principalement les interneurons GABAergiques de l'hippocampe (Freund & Antal 1988 ; Papp et al. 1999) et les neurones de projection glutamatergiques projetteraient en partie sur les neurones pyramidaux de la corne d'Ammon (Manseau et al. 2008). Les projections allant de l'hippocampe vers le MSDB seraient des projections directes des cellules pyramidales de CA3 (Gaykema et al. 1991), des projections indirectes des cellules pyramidales de CA1 et des projections directes des interneurons GABAergiques de CA1. Cette organisation anatomique réciproque formerait ainsi une boucle fonctionnelle reliant MSDB et hippocampe.

IV.1.2. Récepteurs cholinergiques dans la formation hippocampique.

Dans la formation hippocampique, l'acétylcholine agit sur des récepteurs métabotropiques à sept domaines transmembranaires muscariniques (mAChRs) et des récepteurs ionotropiques pentamériques nicotiques (nAChRs). Il existe cinq sous-types de mAChRs : M1, M3 et M5 qui sont couplés à la phospholipase C ainsi que M2 et M4 qui sont couplés négativement à l'adénylate cyclase. Les nAChRs sont, quant à eux, constitués de pentamères d'unité α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) et β ($\beta 2$ - $\beta 4$) formant des canaux cationiques perméables aux ions Na^+ , K^+ et Ca^{2+} . Ces récepteurs sont différenciellement exprimés à travers l'hippocampe où ils rempliraient différentes fonctions (Tableaux 6 et 7).

Tableau 6 : Répartition des différents mAChRs dans l'hippocampe (d'après Teles-Grilo Ruivo & Mellor 2013).

Sous-type	Distribution
M1	Neurones excitateurs (soma, dendrites et épines) Neurones du Hile Interneurones Parvalbumine et CCK de CA1
M2	Terminaisons présynaptiques des entrées cholinergiques et non-cholinergiques en provenance du MSDB Terminaisons présynaptiques des interneurones parvalbumine dans CA3 et CA1
M3	Neurones excitateurs (Soma et dendrites) Interneurones Parvalbumine et CCK de CA1
M4	Inter-neurones (Soma) Terminaisons présynaptiques des collatérales de Schaffer Terminaisons présynaptiques des entrées non-cholinergiques en provenance du MSDB

Tableau 7 : Répartition des différents nAChRs dans l'hippocampe (d'après Teles-Grilo Ruivo & Mellor 2013).

Sous-type	Distribution
$\alpha 7$	Synapses glutamatergiques et GABAergiques (pré- et post-synaptiques) Synapses cholinergiques (post-synaptiques)
$\alpha 4\beta 2$	Neurones excitateurs (Soma) Terminaisons GABAergiques
$\alpha 3\beta 4$	Terminaisons glutamatergiques et GABAergiques (pré-synaptiques)

L'activation des nAChRs induit une entrée de Ca^{2+} , ce qui dépolarise rapidement la membrane (les $\alpha 7$ sont les nAChRs les plus perméables au Ca^{2+}). En présynaptique, l'influx de Ca^{2+} facilite la libération de neurotransmetteur, tandis qu'au niveau post-synaptique, cet influx induirait une réponse excitatrice rapide. Ce type de dépolarisation rapide des membranes active diverses cascades de signalisation (canaux calciques voltage-dépendant, AMPc, libération du calcium des stocks intracellulaires, activation des conductances chloriques contrecarrant la dépolarisation). L'expression différentielle des nAChRs ainsi que leurs effets excitateurs puis inhibiteurs permettraient aux nAChRs de moduler différentiellement l'excitabilité neuronale en fonction du type cellulaire ainsi que de la force et du timing de l'entrée cholinergique.

Les mAChRs sont couplés aux protéines $G_{q/11}$ (M1 et M3) ou $G_{i/o}$ (M2 et M4). Ainsi l'activation des mAChRs induit-elle des réponses lentes. Les mAChRs présynaptiques couplés à $G_{i/o}$ inhibent la libération de glutamate, GABA et acétylcholine (inhibition des canaux calciques voltage-dépendants et de la signalisation AMPc). A l'inverse, la signalisation post-synaptique *via* $G_{q/11}$ potentialise les courants NMDA, module les courants calciques voltage-dépendants et potentialise la phospholipase C, l'inositol triphosphate et les concentrations calciques intracellulaires. De plus, les mAChRs couplés à $G_{q/11}$ inhibent les courants responsables de l'hyperpolarisation, facilitant ainsi la dépolarisation.

De manière intéressante, les nAChRs et mAChRs sont également présents sur les astrocytes où ils induisent l'augmentation des concentrations intracellulaire de Ca^{2+} et la libération de transmetteurs capables de moduler transmission synaptique et plasticité (Sharma & Vijayaraghavan 2001 ; Takata et al. 2011). Cette grande variété de sous-types de récepteurs et de localisation pré- et post-synaptique sur les neurones à la fois excitateurs et inhibiteurs permettrait au système cholinergique de moduler les activités cellulaires, synaptiques et de réseau dans l'hippocampe. L'intégration des contributions des nAChRs rapides et des mAChRs lents, permettrait également à l'acétylcholine d'influencer les propriétés

dynamiques des réseaux hippocampiques à de multiples échelles temporelles et modulerait notamment la plasticité synaptique et les activités oscillatoires.

IV.1.3. Système cholinergique septo-hippocampique et mémoire.

Recrutement du système cholinergique septo-hippocampique.

Le système cholinergique septo-hippocampique paraît être recruté par des situations nouvelles, notamment durant l'exploration d'environnements nouveaux (Giovannini et al. 2001), ce qui impliquerait un rôle dans la modulation des processus d'encodage de nouvelles informations.

En effet, les niveaux d'acétylcholine hippocampiques augmentent durant l'apprentissage de tâches spatiales (Chang & Gold 2003), notamment quand les animaux utilisent des stratégies spatiales pour résoudre la tâche (McIntyre et al. 2003). Ainsi, il a été montré chez la Souris en labyrinthe radial que les tâches de mémoire spatiale de référence et de travail sont associées à une augmentation transitoire du tonus cholinergique hippocampique durant le comportement (Marighetto et al. 1993). Ces augmentations transitoires des niveaux d'acétylcholine hippocampiques seraient de plus en plus importantes au fur et à mesure des jours d'apprentissage en corrélation avec les performances (Fadda et al. 2000). Ces augmentations du tonus cholinergique en lien avec l'exploration d'un environnement ne serait pas limitée à l'hippocampe, mais concernerait également d'autres structures impliquées dans la mémoire spatiale comme le cortex rétrosplénial (Anzalone et al. 2009). Au contraire, les phases de consolidation post-entraînement étant plutôt associées à des diminutions du niveau d'acétylcholine (Marighetto et al. 1993). Cependant, cet effet pourrait être différentiel en fonction de la structure ciblée par les afférences cholinergiques, l'augmentation du tonus cholinergique associée à l'exploration spatiale dans le cortex rétrosplénial étant plus longue, elle pourrait être associée également à la consolidation précoce de l'information dans cette structure (Anzalone et al. 2009).

Ainsi, il paraît tentant d'associer innervation cholinergique de la formation hippocampique et encodage de l'information. Cependant, les niveaux d'acétylcholine dans l'hippocampe et leurs fluctuations à l'échelle temporelle du comportement restent mal connus, tout comme les concentrations d'acétylcholine nécessaires à l'activation des différents récepteurs cholinergiques.

Pharmacologie.

Les manipulations pharmacologiques des récepteurs cholinergiques semblent confirmer une implication préférentielle de l'innervation cholinergique dans l'apprentissage, mais le sous-type de récepteur impliqué et les zones du cerveau responsables des effets mesurés sont mal connus. En effet, la plupart des études consistent à injecter systématiquement des agonistes ou antagonistes cholinergiques ce qui n'impliquerait pas uniquement l'innervation cholinergique hippocampique.

Globalement, les antagonistes muscarinique et nicotinique induisent des déficits d'apprentissage spatiaux, tandis que les agonistes induisent plutôt une facilitation, notamment quand l'intégrité du système cholinergique est compromise comme durant le vieillissement (Deiana et al. 2011). Cependant, l'inhibition directe des neurones du MSDB entraînerait des déficits de mémoire spatiale de travail associés à une diminution de la libération d'acétylcholine dans l'hippocampe (Marighetto et al. 1989 ; Herzog et al. 2000).

Etudes lésionnelles.

Les approches lésionnelles ne confirment pas clairement l'existence d'un rôle capital de l'innervation cholinergique hippocampique dans l'apprentissage. En effet, les résultats obtenus sont plutôt variables.

Généralement, les lésions du MSDB qui ne sont pas sélectives des neurones cholinergiques induisent bien des déficits marqués en mémoire spatiale (Hagan et al. 1988 ; Mizumori et al. 1990). Cependant, ces déficits peuvent également provenir de la perte des neurones GABAergiques et glutamatergiques. Les études menées par des approches sélectives sont plutôt associées à des déficits légers d'apprentissage spatial malgré la perte massive d'innervation cholinergique de l'hippocampe (Berger-Sweeney et al. 1994 ; Baxter & Gallager 1996 ; Dornan et al. 1997), bien que certaines études montrent des déficits plus marqués (Aztiria et al. 2007 ; 2009). Cependant, les approches lésionnelles spécifiques induisant des déficits majeurs pourraient être liées aux pertes d'autres neurones, notamment dans le cervelet (Waite et al. 1995 ; 1999).

Ainsi l'implication des neurones cholinergiques septo-hippocampiques dans la cognition spatiale reste discutée et semble relativement discrète dans des tâches spatiales classiques (piscine de Morris, labyrinthe de Barnes, etc...). Cependant, l'implication de ce système cholinergique septo-hippocampique pourrait être plus sélective, et influencer spécifiquement certains processus neurobiologiques qui sous-tendent la mémoire spatiale. Par exemple, la lésion sélective des neurones cholinergiques induit des déficits marqués de sélectivité dans la mise en place d'une nouvelle représentation spatiale durant l'exposition à un environnement nouveau (Ikonen et al. 2002).

IV.2. Modulation de la formation hippocampique

L'activation des nAChRs hippocampiques induirait préférentiellement l'activation des interneurons GABAergiques innervant les dendrites plutôt que celle des interneurons responsables de l'inhibition périsonotique et des cellules principales (revue Cobb & Davies 2004). Ainsi, dans le DG, l'effet net de l'activation nicotinique des interneurons et cellules moussues induit une inhibition des cellules granulaires (Frazier et al. 2003), tandis que l'activation muscarinique dans le DG serait principalement associée à une activation des cellules moussues et à une dépression de la transmission GABAergique (Hofmann et al. 2010). Dans CA1, l'activation des mAChRs augmenterait les décharges et les oscillations membranaires spontanées des interneurons CCK sur la bande delta/thêta (1-7Hz), des effets qui dépendraient notamment des M3 (Cea-del Rio et al. 2011). De plus, la signalisation synergique entre les mGluRs I (récepteur métabotropique au glutamate) et les mAChRs augmenterait les niveaux d'excitabilité des neurones pyramidaux de CA1 (Park et al. 2012). Enfin, dans le cortex entorhinal, l'acétylcholine induirait l'élargissement des champs récepteurs et augmenterait leurs espacements (Heys et al. 2012). De plus, l'activation des mAChRs faciliterait, dans certains neurones, des comportements de décharge persistants qui pourraient supporter la mémoire de travail (Heys et al. 2012). Un mécanisme complémentaire facilitant l'encodage de l'information pourrait être le renforcement des comportements de décharge persistant dans les neurones entorhinaux, périrhinaux et préfrontaux (Klink & Alonso 1997).

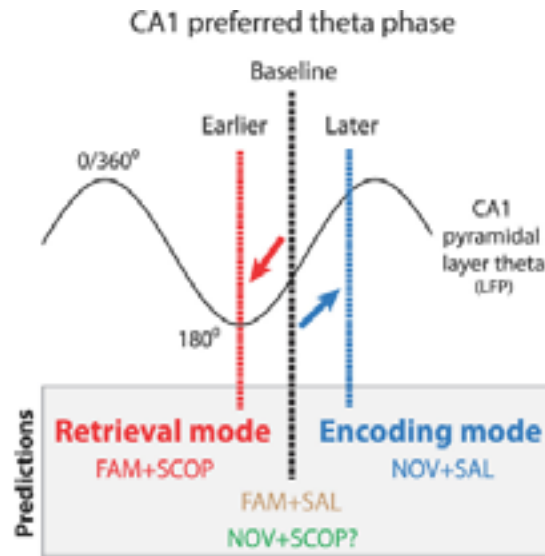
IV.2.1. Routage de l'information et *shift* encodage/récupération

Dans les circuits hippocampiques, l'encodage de l'information serait associé à une modulation positive du poids d'afférences extrinsèques et à une réduction du poids des réseaux intrinsèques (réduction de l'interférence) malgré l'induction de la plasticité synaptique dans ces derniers (pour revue, voir [Stella & Treves 2011](#)). Si on a vu plus haut que la phase de l'oscillation thêta pouvait réguler les dynamiques de réseaux dans une alternance de phase d'encodage et de rappel à l'échelle de la centaine de millisecondes, la modulation cholinergique de l'hippocampe pourrait également la tourner durablement (de l'ordre de la minute) vers l'encodage ([Stella & Treves 2011](#)).

En effet, l'acétylcholine inhiberait sélectivement les circuits intra-hippocampiques ce qui favoriserait les circuits d'entrée. Au niveau de CA1, l'acétylcholine inhibe ainsi plus fortement les entrées en provenance de CA3 que celles venant de l'entorhinal ([Hasselmo et al. 1994](#)), sauf quand elles sont précédées de 25 à 75 millisecondes par une entrée entorhinale, ce qui suggère que l'acétylcholine n'inhibe pas l'activité des collatérales de Schaffer quand celle-ci coïncide avec l'activité entorhinale ([McQuiston 2010](#)). L'acétylcholine supprimerait également les projections entre CA1 et le subiculum ([Kunitake et al. 2004](#)). On observe généralement le même type d'effet dans CA3, où l'acétylcholine induirait une inhibition sélective des collatérales récurrente ([Hasselmo et al. 1995](#)), ce qui réduirait l'influence des représentations déjà stockées et faciliterait l'encodage de l'information entrante ([Kremen et al. 2007](#)). Cependant, il faut noter que l'acétylcholine inhiberait les entrées des voies perforantes médianes dans le DG ([Kahle & Cotman 1989](#) ; [Foster & Deadwyler 1992](#)). Ces effets inhibiteurs de l'acétylcholine seraient essentiellement médiés par les récepteurs muscariniques ([Kunitake et al. 2004](#)), ceux-ci déprimant l'activité des canaux calciques voltage-dépendants présynaptiques ([Qian & Saggau 1997](#)).

A partir de ces arguments, [Hasselmo \(2006\)](#) a proposé une théorie selon laquelle l'acétylcholine faciliterait l'encodage dans l'hippocampe *via* le renforcement du poids des entrées, la promotion de la LTP et le renforcement de la puissance du thêta. Ainsi, les influences de la phase thêta (à l'échelle de la centaine de milliseconde) et de l'acétylcholine (à l'échelle de la minute) devraient interagir pour diriger la computation hippocampique vers l'encodage plutôt que vers un rappel. Or, les prédictions de cette théorie viennent d'être confirmées expérimentalement ([Douchamps et al. 2013](#)). En effet, d'après la théorie, lorsque l'hippocampe fonctionne selon un mode de rappel, les neurones principaux devraient décharger dans la phase ascendante du thêta local, tandis que lorsque l'hippocampe encode de nouvelles informations, ces neurones devraient décharger plus tard dans le cycle thêta ([figure 23](#)). De plus, si l'acétylcholine favorise un fonctionnement pro-encodage de l'hippocampe, le blocage du système cholinergique devrait induire un *shift* des décharges neuronales vers une phase plus précoce du cycle thêta local.

Figure 23 : Prédictions de la théorie d'Hasselmo quant à la phase de décharge des neurones hippocampiques en fonction des phases d'encodage et de rappel et du tonus cholinergique.



Les résultats obtenus par Douchamps et collaborateurs (2013) confirment ces prédictions, démontrant l'implication de la modulation cholinergique dans le décalage de la phase préférentielle de décharge des neurones hippocampiques durant l'encodage des caractéristiques d'un environnement nouveau.

IV.2.2. Plasticité synaptique

En plus de favoriser sélectivement les entrées extrinsèques par rapport au réseau intra-hippocampique, l'acétylcholine modulerait également les phénomènes de plasticité synaptique afin de faciliter l'encodage de nouvelles représentations. Les mécanismes impliqués ainsi que la direction des changements plastiques dépendrait de la concentration d'acétylcholine, de son *timing* de libération et de la séquence temporelle d'activation des nAChRs et des mAChRs en fonction de l'activité neuronale en cours (Gu et al. 2011 ; 2012).

Dans le DG, il a été proposé que l'acétylcholine facilite la mise en place de la LTP au niveau des voies perforantes sur les cellules granulaires adultes, mais l'inhiberait sur les neurones néoformés (Zhang et al. 2010a), mais la contribution des différents récepteurs n'est pas claire (Walsby et al. 2006 ; Wang et al. 2006 ; Bergado et al. 2007). Dans la corne d'Ammon, l'acétylcholine faciliterait la LTP dans les projections récurrentes et les collatérales de Schaffer, mais elle l'inhiberait dans les fibres moussues en provenance du DG (Zheng et al. 2012 ; Sugisaki et al. 2011).

Cependant, physiologiquement, le type de plasticité synaptique mis en place dépendrait étroitement du *timing* entre l'arrivée des signaux afférents et la décharge post-synaptique (*spike-timing-dependent plasticity*). Or, il apparaît que les effets de l'acétylcholine sur la plasticité synaptique au niveau des collatérales de Schaffer dépendent étroitement du délai séparant les entrées glutamatergiques et cholinergiques. En effet, si l'activation cholinergique précède de 100ms les entrées glutamatergiques, elle favorise la LTP *via* les $\alpha 7$ -nAChRs ; si elle ne précède le glutamate que de 10 ms on observera plutôt une STD (*short term*

Modulation cholinergique

depression) dépendant des $\alpha 7$ -nAChRs ; enfin, si l'acétylcholine arrive 10 ms après les entrées excitatrices, on observera une LTP muscarinique (Gu et al. 2011).

Cependant, il faut noter que la plupart des études ont eu recours à des agonistes ou antagonistes exogènes, ce qui fait qu'on ignore encore largement l'effet d'une libération endogène d'acétylcholine sur la plasticité synaptique hippocampique. De plus, comme le comportement de décharge des neurones cholinergiques est inconnu, l'impact réel de ses neurones sur la modulation de la plasticité hippocampique reste énigmatique.

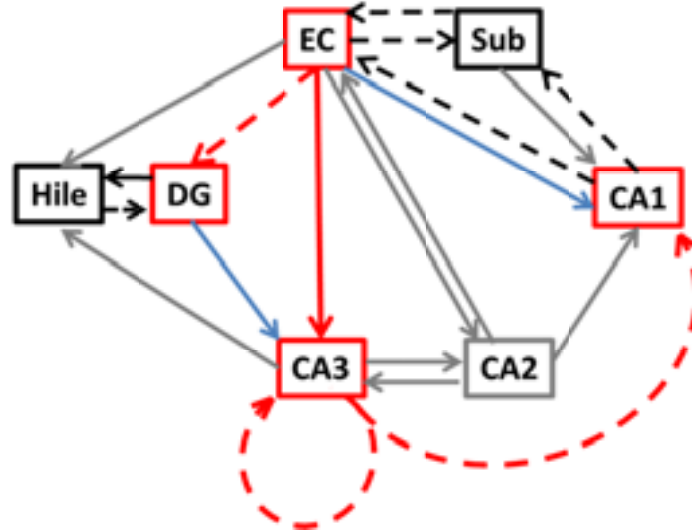
IV.2.3. Oscillations

Les neurones de projection GABAergiques du MSDB sont importants dans l'entraînement du thêta hippocampique (Hangya et al. 2009). En effet, contrairement aux neurones cholinergiques, ils ont une activité de décharge en rafale au thêta finement corrélée au rythme thêta hippocampique (Simon et al. 2006) et ils sont directement contactés par les neurones de projection GABAergiques de CA1 déchargeant eux aussi au thêta (Manseau et al. 2008). Cependant, il apparaît que les neurones cholinergiques puissent indirectement favoriser les oscillations thêta dans l'hippocampe. En effet, les lésions sélectives des neurones cholinergiques du MSDB entraînent une diminution drastique de l'amplitude du thêta hippocampique sans pour autant le faire disparaître (Lee et al. 1994 ; Bassan et al. 1995). Ainsi, l'innervation cholinergique jouerait un rôle dans la modulation de l'amplitude du thêta hippocampique (Lee et al. 1994 ; Apartis et al. 1998). De plus, l'activation optogénétique des neurones cholinergiques induit une activité de décharge en rafale rythmique dans certains interneurons hippocampiques CCK (Nagode et al. 2011). Ceci pourrait expliquer pourquoi la libération d'acétylcholine dans l'hippocampe est corrélée positivement à la puissance du thêta hippocampique, l'acétylcholine influençant les mécanismes impliqués dans la modulation de l'amplitude et de la fréquence du thêta dans l'hippocampe (Keita et al. 2000). Enfin, l'acétylcholine hippocampique pourrait également jouer un rôle dans la synchronisation du thêta et du gamma. En effet, sur tranches d'hippocampe, des oscillations gamma peuvent être induites par l'application d'agonistes muscariniques (Fisahn et al. 2002 ; Hajos et al. 2004 ; Mann et al. 2005).

IV.2.4. Synthèse

En guise de résumé de cette partie, la figure 25 représente la synthèse des principaux effets connus de l'acétylcholine sur les réseaux hippocampiques.

Figure 25 : Principaux effets de l'acétylcholine sur les réseaux hippocampiques.



La figure représente les principaux réseaux de la formation hippocampique et les effets modulateurs de l'acétylcholine sur ceux-ci. Les encadrées en rouge représentent les régions où l'acétylcholine induit soit la dépolarisation directe des neurones soit l'augmentation de l'excitabilité neuronale. Les flèches en pointillés indiquent les voies dont l'activité est inhibée par l'acétylcholine. La co-occurrence d'une LTP facilitée et d'une dépression de la transmission synaptique n'est pas contradictoire, les effets de suppression de la transmission réduisant le bruit de fond synaptique. Les flèches bleues indiquent les voies où l'acétylcholine inhibe la LTP tandis que les flèches rouges indiquent les voies où l'acétylcholine augmente la LTP. Les flèches et encadrés gris indiquent les régions et voies où les effets de l'acétylcholine sont mal connus. EC, cortex entorhinal ; DG, gyrus denté ; Sub, subiculum.

Ainsi, en jouant sur la puissance relative des différentes entrées, la mise en place des phénomènes de plasticité synaptique et les activités oscillatoires, l'acétylcholine modulerait l'activité des principaux circuits de la formation hippocampique et faciliterait notamment l'encodage de l'information plutôt que sa consolidation ou son rappel.

IV.3. Système cholinergique et DTA

L'innervation cholinergique corticale est altérée dans les DTA (Davies & Maloney 1976 ; Bowen & Davison 1980) et la réduction des niveaux de ChAT, des récepteurs nicotiques et muscariniques est corrélée avec le niveau de démence (Bierer et al. 1995). Ces diminutions cholinergiques dans le cortex seraient liées à des pertes neuronales dans les noyaux cholinergiques (Etienne et al. 1986). Ainsi, les déficits mnésiques apparaîtraient au moment où environ 30% des neurones cholinergiques de la base du cerveau antérieur sont perdus (Arendt et al. 1999). Ces éléments ont amené, Bartus et collaborateurs à proposer que les déficits mnésiques liés au vieillissement et aux DTA soient liés aux dysfonctionnements du système cholinergique (Bartus 2000). Les pertes de neurones cholinergiques concerneraient surtout le noyau basal de Meynert qui innerve l'ensemble du manteau cortical (Davies & Maloney 1976) et se retrouvent chez le primate non-humain âgé (Kitt et al. 1984). De plus, il apparaît que l'innervation cholinergique est également diminuée dans l'hippocampe dans les stades terminaux des DTA (Dekosky et al. 2002), suggérant que le MSDB présente également des pertes de neurones cholinergiques durant les stades plus avancés des DTA.

Cependant, durant les phases précoces des DTA et notamment le MCI, il apparaît que l'innervation cholinergique de l'hippocampe et du cortex serait plutôt augmentée transitoirement (Dekosky et al. 2002) avant de diminuer avec l'avancée de la pathologie. En effet, il semble qu'il n'y ait pas de pertes significatives de neurones cholinergiques durant le MCI et les phases les plus précoces des DTA, bien que le nombre de neurone cholinergique soit corrélé avec la sévérité de la démence (Gilmor et al. 1999). Ainsi, cette augmentation de l'activité cholinergique dans l'hippocampe pourrait compenser l'avancée des troubles (voir ci-dessous). Puis, avec l'atteinte progressive des neurones cholinergiques, ce mécanisme de compensation perdrait de son efficacité et l'état cognitif s'aggraverait pour aboutir à la mise en place d'une démence.

Principaux points abordés dans ce chapitre :

Durant les phases précoces des démences de type Alzheimer, c'est essentiellement la mémoire et notamment la mémoire épisodique qui est touchée. Ces déficits s'expliqueraient notamment par l'atteinte des structures du lobe temporal médian et notamment de la formation hippocampique.

En effet, au-delà des classiques déficits de mémoire épisodique, les patients présentent précocement des altérations de fonctions impliquant la formation hippocampique, telles que l'orientation et la navigation spatiale, la mémoire de reconnaissance et de localisation d'objet ainsi que la mémoire olfactive. L'avantage de ces formes de mémoire est qu'elles ont un fort potentiel translationnel puisqu'elles sont directement mesurables dans les modèles animaux.

Afin de remplir ces fonctions, les réseaux de la formation hippocampique nécessitent une régulation extrêmement fine par diverses activités oscillatoires (modulations à l'échelle de la milliseconde) et par plusieurs systèmes neuromodulateurs (régulation à l'échelle de la seconde, minute) comme le système cholinergique

Ces divers mécanismes de réseaux pourraient être impliqués dans la progression de la pathologie.

Le syndrome de déconnexion hippocampique et sa compensation

I. Un syndrome de déconnexion progressive

Certaines régions cérébrales sont touchées précocement durant le MCI.

Le cortex entorhinal et l'hippocampe présentent ainsi une atrophie bilatérale précoce, tandis que l'amygdale et le cortex parahippocampique sont touchés surtout dans l'hémisphère gauche (Fennema-Notestine et al. 2009). Avec l'avancée de la pathologie, des régions pariétales, rétrosplénial et frontales médianes commencent à présenter également des signes d'atrophie (Fennema-Notestine et al. 2009). Certaines structures sous-corticales seraient également touchées précocement comme l'amygdale et le thalamus (Roh et al. 2011).

L'atteinte entorhinale prédominante a amené à assimiler les phases précoces des DTA à un « syndrome de déconnexion hippocampique » (Hyman et al. 1984). Cependant, cette déconnexion ne serait que partielle et les entrées survivantes faciliteraient la propagation de la pathologie à travers les réseaux hippocampiques tout en perturbant probablement la computation hippocampique (Brier et al. 2014). Concernant la propagation des protéinopathies, l'A β , la protéine tau hyperphosphorylée et l' α -synucléine partageraient tous des mécanismes de réplication similaires à ceux de la protéine prion, d'ailleurs la suractivation des voies UPR (*unfolded protein response*) étant présente dans les infections à prion tout comme dans les DTA et la maladie de Parkinson (Halliday et al. 2014).

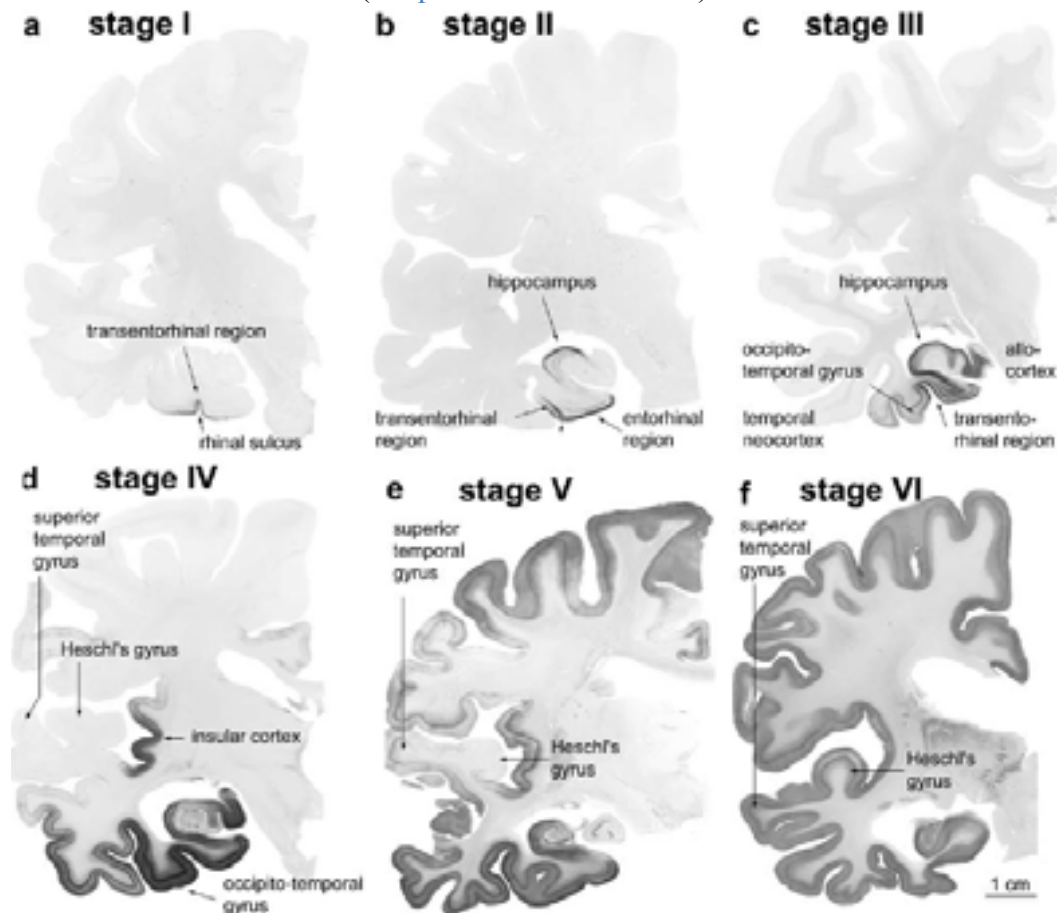
I.1 Circuits et progression de la pathologie

I.1.1 Tauopathie

D'un individu à l'autre, la progression clinique des DTA est associée à une propagation relativement stéréotypée de la tauopathie (Braak et al. 1991). Cette progression reproductible d'un individu à l'autre à travers les réseaux de la formation hippocampique permet de définir six stades pathologiques qui corréleront à l'avancée des troubles cognitifs (Figure 27 ; Braak et al. 2006). En fait, la tauopathie se mettrait en place très précocement, aux alentours de la puberté dans les noyaux du *locus coeruleus* et du raphé dorsal, puis elle progresserait lentement le long des réseaux cérébraux pour apparaître dans la région transentorhinale vers la cinquantaine, avant de progressivement envahir la formation hippocampique (Braak et al. 2011). En accord avec le concept de syndrome de déconnexion hippocampique, l'apparition de la tauopathie dans les voies perforantes et l'aire CA1 corréle avec la déclaration des symptômes cognitifs de même qu'avec la sévérité de la pathologie dans les stades plus avancés (Thal et al. 2000).

Le syndrome de déconnexion hippocampique

Figure 27 : Les stades Braak de la progression de la tauopathie
(D'après Braak et al. 2006).



Au stade Braak I seul le cortex transentorhinal est significativement touché. Au stade Braak II la pathologie progresse vers l'entorhinal superficiel et suit ses projections pour atteindre CA1 et CA2. Au stade III, la pathologie envahit totalement le cortex entorhinal, CA1, CA2, le Hile et CA3, mais épargne les cellules granulaires du DG. Au stade IV, la pathologie s'étend encore dans la formation hippocampique et commence à atteindre les aires associatives néocorticales (surtout temporales). Au stade V, la pathologie s'étend vers les lobes frontaux, pariétaux et occipitaux. Enfin, au stade VI, toutes les régions corticales secondaires et primaires sont atteintes.

La progression de la tauopathie paraît être ainsi fortement liée à l'âge, mais elle représenterait en fait un processus indépendant du vieillissement qui se retrouverait amplifié dans le cadre des DTA (Delacourte et al. 2002). Si quasiment tous les patients DTA présentent une tauopathie dans l'entorhinal, CA1 ainsi que dans les pré- et para- subiculum, les sujets contrôles qui présentent une tauopathie ont surtout des atteintes du gyrus denté, de CA3 et de CA2 (Fukutani et al. 1995). Ainsi, il semblerait que différents processus déterminent la progression de la tauopathie dans le cadre du vieillissement normal et des DTA.

Quoi qu'il en soit, les protéines tau hyperphosphorylées se propagent de neurone à neurone par un mécanisme de type prionoïde. En effet, l'injection stéréotaxique de tau-fibrillaire chez une Souris normale s'accompagne par une propagation lente et progressive de la tauopathie vers les régions cérébrales interconnectées (Clavaguera et al. 2009). De plus, chez la souris transgénique, l'expression d'une protéine tau pathologique uniquement dans le cortex entorhinal induit avec le vieillissement une propagation transynaptique de la tauopathie similaire à celle des stades Braak (Liu et al. 2012a ; Khan et al. 2013). De manière

Le syndrome de déconnexion hippocampique

intéressante, dans ce type de souris, l'apparition de la tauopathie dans les voies perforantes irait de pair avec des pertes des terminaisons entorhinales dans l'hippocampe ainsi que d'environ la moitié des neurones entorhinaux, suggérant qu'une tauopathie entorhinale est suffisante pour induire un syndrome de déconnexion hippocampique caractéristique des DTA (De Calignon et al. 2012).

I.1.2 Amyloïdopathie

La pathologie amyloïde s'accumulerait également préférentiellement dans certaines régions liées au cortex entorhinal, bien que le patron de dépôt amyloïde soit beaucoup plus variable que celui de la tauopathie (Braak et al. 1991). L'accumulation amyloïde aurait notamment lieu préférentiellement dans le « *default mode network* » (Buckner et al. 2005). Or, cette accumulation induirait une hyperactivité aberrante de ce réseau, ceci que l'individu soit asymptomatique ou atteint de DTA (Sperling et al. 2009).

L'amyloïdopathie pourrait également contribuer à la déconnexion hippocampique. En effet, l'APP et ses métabolites (A β , sAPP et AICD) jouent tous un rôle dans la modulation de l'activité synaptique hippocampique (Brunholz et al. 2011). Or, il apparaît chez l'humain non dément comme chez le patient DTA, que les accumulations amyloïdes ont lieu préférentiellement au niveau des terminaisons des voies perforantes reliant le cortex entorhinal et l'hippocampe (Crain & Burger 1988). Une même spécificité spatiale peut se retrouver chez les souris transgéniques (Su & Ni 1998) et la lésion entorhinale ou la transection des voies perforantes réduit ces accumulations, ce qui suggère que l'APP est transporté et converti en A β au niveau des voies perforantes (Sheng et al. 2002 ; Lazarov et al. 2002 ; Van Groen et al. 2003a). Ces accumulations d'A β pourraient traduire la présence de dysfonctionnements des neurones entorhinaux. En effet, chez ces souris transgéniques, les accumulations amyloïdes dans les voies perforantes ont lieu alors que les cellules de la couche II du cortex entorhinal médian présentent une hyperactivité aberrante (Marcantoni et al. 2013). L'hyperactivité des neurones entorhinaux pourrait induire l'accumulation d'amyloïde, l'A β étant sécrétée en réponse à l'activité synaptique (Cirrito et al. 2005 ; Brody et al. 2008). De plus, l'A β pourrait même représenter un mécanisme de réduction de l'activité synaptique *via* son effet dépresseur en post-synaptique.

Ainsi, la pathologie amyloïde ciblerait particulièrement le réseau reliant le cortex entorhinal et l'hippocampe et y induirait des perturbations fonctionnelles (balance entre excitation et inhibition, pertes synaptiques), ce qui perturberait les opérations cognitives dépendant de la formation hippocampique. Cependant, les pertes franches de neurones seraient plutôt liées à la tauopathie.

I.2 La déconnexion entorhino-hippocampique

I.2.1 L'atteinte du cortex entorhinal et de ses projections.

Dans les cerveaux de patients DTA, les pertes de neurones liées à la tauopathie ont lieu surtout dans le cortex entorhinal et le subiculum, ce qui isolerait de fait l'hippocampe de la plupart de ses entrées et sorties avec le cortex (syndrome de déconnexion hippocampique ; Hyman et al. 1984). Or, les pertes de neurones entorhinaux projetant vers l'hippocampe auraient lieu dès le stade de MCI (Kordower et al. 2001), les patients ayant déjà perdu la

Le syndrome de déconnexion hippocampique

moitié des neurones hippocampiques au moment de la déclaration des symptômes DTA (Gomez-Isla et al. 1996). Les couches superficielles du cortex entorhinal semblent en effet particulièrement sensibles au vieillissement et aux DTA (Stranahan et al. 2010). De plus, il apparaît que les pertes de neurones entorhinaux pourraient être encore plus marquées si on compare aux densités neuronales de sujets jeunes plutôt qu'à celles de sujets contrôles âgés. En effet, la perte d'environ un tiers des neurones entorhinaux serait une composante à part entière du vieillissement normal (Simic et al. 2005).

Les voies perforantes reliant cortex entorhinal et hippocampe seraient fortement impactées par les pertes des neurones entorhinaux (Hyman et al. 1986). Ainsi, chez l'Homme, les études en imagerie de tenseur de diffusion (DTI) permettant de révéler la connectivité fonctionnelle des réseaux (Bokde et al. 2009) suggèrent des altérations majeures des voies perforantes dès le stade de MCI (Kalus et al. 2006). Ces résultats confirment les résultats d'autopsies qui indiquent une perte massive de synapses dans la couche moléculaire du gyrus denté (Hamos et al. 1989), pertes qui sont similaires à celles observées chez le rongeur après lésion entorhinale (Cabalka et al. 1992). Or, ces pertes synaptiques sont fortement corrélées aux performances cognitives et représentent un indice neurobiologique convainquant de l'avancée des troubles durant la progression des DTA (Masliah et al. 1994 ; Scheff et al. 2006), validant par là le concept du syndrome de déconnexion hippocampique comme étant une des atteintes majeures des DTA, notamment au cours des stades précoces de ces pathologies.

I.2.2 Excitabilité aberrante et déconnexion hippocampique

En parallèle de la mise en place du syndrome de déconnexion hippocampique, les patients MCI présentent une hyperactivité aberrante dans le cortex entorhinal et de l'hippocampe (Dickerson et al. 2005 ; Das et al. 2012). Cette hyperactivation hippocampique spécifique du MCI serait associée à un déclin cognitif marqué (Miller et al. 2008) et pourrait prédire l'apparition d'une DTA chez un individu sain (Putcha et al. 2011). Cette hyperactivation de la formation hippocampique disparaît aux stades plus avancés de la pathologie (Hämäläinen et al. 2007 ; Dickerson et al. 2008). C'est pourquoi l'hyperactivation hippocampique a longtemps été vue comme un mécanisme de compensation. Cependant, il s'avère que les patients ayant le déclin le plus rapide ont en fait la plus forte hyperactivité suivie de la plus forte diminution de l'activité hippocampique (O'Brien et al. 2010).

De manière intéressante, il faut noter que cette hyperactivité spécifique du MCI toucherait essentiellement le DG et CA3 en lien avec la perte d'intégrité des voies perforantes et l'apparition de déficits de *pattern separation* (Yassa et al. 2010 ; 2011a). Ainsi, l'hyperactivité hippocampique et des cortex associés mènerait à une excitotoxicité locale et contribuerait ainsi directement aux pertes neuronales et synaptiques ainsi qu'aux déficits mnésiques associés (Morcom et al. 2007). D'ailleurs, chez les sujets âgés, il existe une corrélation négative entre activité hippocampique, atrophie et performance mnésique (Putcha et al. 2011). De manière intéressante, l'inhibition de cette hyperactivité par une drogue antiépileptique améliore les performances cognitives chez le patient MCI en lien avec une normalisation de l'activité dans le DG et CA3 (Bakker et al. 2012). L'hyperactivité pourrait être un phénomène précoce dans la pathogénèse des DTA, celle-ci étant observée précocement chez des individus asymptomatiques porteurs de mutations familiales (Quiroz et al. 2010) et chez les sujets sains porteurs de l'*APOE4* (Woodard et al. 2009 ; Filippini et al. 2009). Il est concevable que l'atteinte du cortex entorhinal et le syndrome de déconnexion hippocampique lié puissent paradoxalement faciliter l'hyperexcitabilité hippocampique. En

Le syndrome de déconnexion hippocampique

effet, les lésions entorhinales induisent des rétractations neuritiques des interneurons parvalbumine dans le gyrus denté (Nitsch et al. 1992), pertes qui se retrouvent chez les patients DTA dans les différentes sous-régions hippocampiques (Brady et al. 1997) de même que dans le cortex parahippocampique (Inaguma et al. 1992). Ces pertes spécifiques des interneurons parvalbumine pourraient s'expliquer par une plus grande sensibilité à la gliose induite par la dénervation et notamment à la neuro-inflammation qui l'accompagne (Rappert et al. 2004). Par ailleurs, il a également été démontré que la lésion des neurones de la couche III du cortex entorhinal induit une hyperexcitabilité chronique du réseau cortex entorhinal/hippocampe (Scharfman et al. 1998).

Ainsi, étant donné que le DG et CA3 sont particulièrement sujets à l'hyperactivité précoce durant le MCI (Yassa et al. 2010 ; 2011a ; Bakker et al. 2012), notamment chez les porteurs de l'*APOE4* (Woodard et al. 2009), il serait intéressant d'étudier l'impact de lésions entorhinales sur les réorganisations de ces régions en fonction du génotype *APOE* (publication n°3).

1.2.3 Déconnexion et troubles cognitifs

Le syndrome de déconnexion hippocampique causé par les pertes précoces de neurones entorhinaux pourrait expliquer les déficits cognitifs caractéristiques du stade MCI.

En effet, chez le patient MCI, l'atrophie du cortex entorhinal est corrélée aux déficits de rappel différé en mémoires épisodique et sémantique (Di Paola et al. 2007 ; Barbeau et al. 2012). De plus, l'atteinte du cortex entorhinal et du subiculum permet de prédire la survenue de déficits mnésiques d'encodage à deux ans (Burggren et al. 2011), tandis que l'atrophie supplémentaire de l'hippocampe prédit quels patients MCI vont convertir en démence (Stoub et al. 2010).

Chez le rongeur, les lésions du cortex entorhinal induisent des déficits dans les tâches de navigation spatiale (Cho & Jaffard 1995) et de mémoire spatiale de travail (Jonhson et al. 1994). Ces déficits spatiaux peuvent notamment s'expliquer par une diminution de la précision du codage spatial par les cellules de lieux de CA1, celle-ci présentant une augmentation de la taille des champs d'activité associée à une diminution de la densité d'information codée (Brun et al. 2008). Cependant, la lésion entorhinal ne n'aboli pas la formation des champs d'activité des cellules de lieu, ni leur sélectivité spatiale, bien qu'elles présentent une moindre stabilité dans le temps (Van Cauter et al. 2008). Ainsi, l'intégrité du cortex entorhinal ne serait pas critique pour l'émergence d'une représentation spatiale dans CA1, mais jouerait un rôle dans la réactivation de ces représentations : la lésion entorhinal rend les représentations spatiales hippocampiques plus labiles et vulnérables aux interférences.

Cependant, si les lésions bilatérales du cortex entorhinal induisent des déficits durables dans des tâches spatiales la lésion unilatérale n'induit que des déficits transitoires (Steward et al. 1977 ; Loesche et al. 1977). Ainsi, il apparaît que les déficits entraînés par la lésion entorhinal peuvent être compensés par une réinnervation en provenance du cortex entorhinal controlatéral. Il est donc concevable que l'atteinte entorhinal perturbe fonctionnellement l'hippocampe (syndrome de déconnexion hippocampique), mais que les réorganisations synaptiques dans l'hippocampe soient capables de compenser ces dysfonctionnements hippocampiques et d'induire une rémission cognitive. De manière intéressante, le cortex

Le syndrome de déconnexion hippocampique

entorhinal et ses zones de projection dans l'hippocampe pourraient présenter une atrophie même durant le vieillissement normal (Von Gunter et al. 2005 ; Kerchener et al. 2013). Il apparaît donc que la déconnexion hippocampique puisse ne pas être accompagnée de déficits marqués. Les capacités de compensation de la déconnexion hippocampique pourraient donc jouer un rôle critique dans l'apparition ou non de symptômes cognitifs, de moindres capacités de compensation pouvant alors faciliter la déclaration des symptômes.

II. Compensation de la déconnexion hippocampique

La progression de la pathologie et des déficits mnésiques qui l'accompagnent ne s'explique pas uniquement par l'étendue des pertes synaptiques et neuronales, mais aussi par l'interaction avec des mécanismes de compensation multiples et notamment des réorganisations synaptiques et l'augmentation de l'activité cholinergique hippocampique (Savioz et al. 2009). L'augmentation de l'innervation cholinergique pourrait jouer un rôle particulièrement important dans la compensation, les thérapies cholinergiques normalisant chez les patients DTA l'activation cérébrale associée à l'encodage (Rombouts et al. 2002).

Dans cette thèse, je me suis particulièrement intéressé aux réorganisations synaptiques hippocampiques et à leurs effets potentiels sur la compensation des déficits cognitifs causés par la lésion entorhinale. Cependant, il faut noter que la compensation pourrait aussi passer par la mobilisation de zones cérébrales supplémentaires. En effet, il apparaît que les patients MCI avec de bonnes performances recrutent des régions additionnelles notamment en préfrontal (Clément et al. 2010). Enfin, il semblerait également que les sujets sains âgés porteurs de l'*APOE4* activent plus de régions pour résoudre les mêmes tâches, ce qui pourrait représenter une compensation précoce des atteintes causées par l'*APOE4* (Han et al. 2007a ; Haase et al. 2013).

Ces différents mécanismes de compensation pourraient ainsi contribuer à la réserve cognitive (capacité du cerveau à compenser des lésions pathologiques pour retarder l'apparition des symptômes cliniques). En effet, il apparaît que 10 à 20% des sujets âgés cognitivement sains présentent en fait une neuropathologie tout à fait comparable à celle des patients DTA (Katzman et al. 1988 ; Valenzuela & Sachdev 2006 ; Roe et al. 2007). Cette réserve cognitive se constituerait progressivement sous l'influence de facteurs aussi précoces que l'état nutritif pendant la grossesse de la mère (Borenstein et al. 2006), le niveau éducatif (Roe et al. 2007) ou encore le niveau d'activités cognitives complexes et stimulantes tout au long de la vie (Barulli et al. 2013). Au-delà des DTA, la réserve cognitive réduirait la progression clinique dans la maladie de Parkinson (Poletti et al. 2011), dans la sclérose en plaques (Sumowski et al. 2009) dans les démences liées au HIV (Foley et al. 2012) et faciliterait la rémission après un traumatisme crânien (Fay et al. 2010). La réserve cognitive modulerait ainsi la transition de la cognition normale à un stade MCI et d'un MCI vers une DTA déclarée notamment *via* l'augmentation de l'efficacité des réseaux cérébraux allant de pair avec une moindre activation de ces derniers pour résoudre la même tâche (Barulli et al. 2013). Récemment, il a été rapporté que la réserve cognitive serait associée à une neurotransmission cholinergique préservée voire augmentée dans les régions fortement impliquées dans la mémoire (Garibotto et al. 2013).

II.1 La compensation fonctionnelle de la déconnexion

II.1.1 Rémission cognitive, ApoE et réorganisations synaptiques.

La présence de cas de rémission vers une cognition normale durant le MCI suggère la présence de mécanismes capables de compenser activement la déconnexion hippocampique causée par la perte des neurones entorhinaux.

En effet, environ 16 à 38% des patients MCI présentent une rémission spontanée vers une cognition normale (Koepsell et al. 2012 ; Roberts et al. 2013). De plus, ce type de rémission serait encore possible à un stade plus avancé de la pathologie que le MCI (Kudrnovsky-Moser et al. 2013). Il faut cependant noter que ce type de réversion n'est souvent que temporaire et est

Compensation de la déconnexion hippocampique

généralement suivit après quelques années par un retour vers le MCI, voire une conversion vers la démence (Koepsell et al. 2012 ; Roberts et al. 2013), ce qui suggère que les capacités de compensation se retrouvent finalement dépassées.

Des réorganisations synaptiques dans l'hippocampe pourraient directement compenser la déconnexion partielle induite par la perte partielle de neurones entorhinaux avec le vieillissement. En effet, si durant le vieillissement, il y a perte de neurones entorhinaux, la différence entre les sujets qui progressent vers une DTA et les sujets demeurant asymptomatiques passerait surtout par le maintien d'une densité synaptique acceptable dans l'hippocampe malgré la perte des entrées entorhinales (Lippa et al. 1992). Ce maintien synaptique, malgré la perte d'une partie des fibres entorhinales projetant vers l'hippocampe pourrait passer par un bourgeonnement de collatérales provenant des axones survivants. Un argument en faveur de cette hypothèse vient de l'expression des gènes mesurée dans le cortex entorhinal et l'hippocampe de patients MCI. En effet, l'expression génétique des patients MCI dans ces régions diffère à la fois de celle des sujets contrôles et des patients DTA, ce qui suggère que le MCI est un état à part entière et ne fait pas partie d'une trajectoire rectiligne de détérioration aboutissant nécessairement à un état démentiel (Berchtold et al. 2014). Ainsi, l'atteinte du cortex entorhinal dans le MCI est associée dans l'hippocampe à l'augmentation de l'expression de gènes de guidage axonal (éphrines), de gènes synaptiques (vésicules, récepteurs, structure et stabilisation synaptique) et des voies de signalisation liées aux facteurs de croissance (Berchtold et al. 2014 ; Shashwath et al. 2012).

De plus, la lésion du cortex entorhinal est associée à un bourgeonnement de collatérales cholinergique dans l'hippocampe chez l'animal (Lynch et al. 1972) et chez le patient DTA (Geddes et al. 1985). Le stade de MCI serait ainsi caractérisé par une augmentation d'activité cholinergique dans l'hippocampe (Dekosky et al. 2002 ; Ikonomic et al. 2003), ce qui pourrait traduire un bourgeonnement cholinergique durant cette phase de déconnexion hippocampique. Ainsi, les réorganisations de l'innervation cholinergique hippocampique participeraient à la compensation du syndrome de déconnexion hippocampique caractérisant les phases précoces des DTA, et notamment le MCI.

La protéine ApoE serait impliquée dans les réorganisations synaptiques en réponse aux lésions entorhinales et notamment dans les phénomènes de bourgeonnement de collatérales cholinergiques. En effet, chez le Rat, les niveaux d'ARN messager de l'ApoE sont augmentés après lésion entorhinale dans l'hippocampe et les voies septo-hippocampiques (Poirier et al. 1991b). L'ApoE et ses récepteurs seraient ainsi mobilisés durant les processus de réinnervation synaptique (Poirier et al. 1993a), notamment pour transporter les lipoprotéines contenant le cholestérol et les lipides nécessaires à la synthèse membranaire vers les neurones impliqués dans les phénomènes de bourgeonnement. Parmi les récepteurs de l'ApoE, le récepteur LRP jouerait un rôle essentiel dans les phénomènes de croissance neuritique dépendant de l'ApoE (Holtzman et al. 1995 ; Fagan et al. 1996). Au-delà de leurs effets sur l'internalisation des lipoprotéines, les récepteurs aux lipoprotéines joueraient également un rôle direct dans les réorganisations synaptiques *via* leurs cascades de signalisation intracellulaire promouvant elles-mêmes la croissance neuritique (Nathan et al. 1994 ; Beffert et al. 2004). En effet, des agonistes artificiels de LRP sont suffisants pour faciliter la croissance neuritique après transection de la moelle épinière et ces agonistes de synthèse pourraient potentiellement être utilisés pour soutenir le bourgeonnement de collatérales (Yoon et al. 2013). Il faut noter que l'homologie entre l'Homme et le Rongeur serait plutôt bonne, des phénomènes de bourgeonnement similaires ayant aussi été décrits après lésion chirurgicale du cortex entorhinal chez le patient (Grady et al. 1989).

II.1.2 Lésion, désafférentation et bourgeonnement de collatérales.

A l'heure actuelle, les phénomènes de réorganisation synaptique dans l'hippocampe après lésion entorhinale n'ont été décrits que dans le gyrus denté, malgré le fait que le cortex entorhinal projette sur l'ensemble des régions hippocampiques (figure 28).

Réaction gliale.

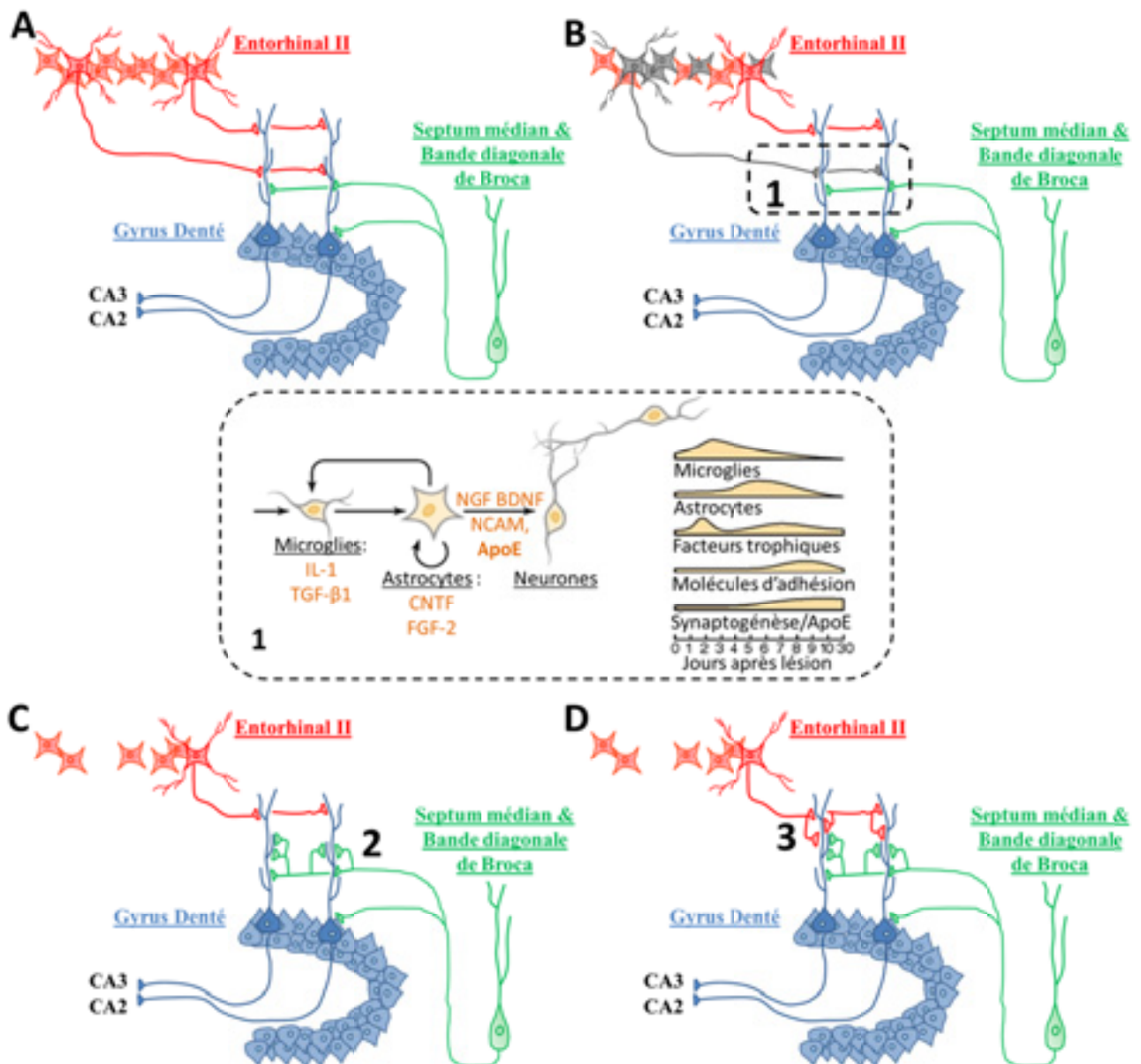
Après lésion entorhinale, la dégénérescence des neurones entorhinaux entraîne la perte des entrées entorhinales dans l'hippocampe. Ces terminaisons entorhinales en dégénérescence vont produire des débris extracellulaires dans la zone désafférentée qui vont être nettoyés par les astrocytes et microglies réactifs (Hailer et al. 1999). Les microglies vont notamment libérer des cytokines pro-inflammatoires (IL-1) qui vont activer les astrocytes avoisinants. Ces derniers vont alors métaboliser les débris cellulaires afin d'approvisionner les neurones en lipoprotéines contenant le cholestérol et les lipides nécessaires à la néo-synthèse membranaire requise pour soutenir le bourgeonnement de collatérales, les remodelages dendritiques à la synaptogénèse. De plus, les astrocytes sécrètent divers facteurs de croissance (NGF, BDNF) et molécules d'adhésion cellulaire (NCAM) qui facilitent les processus de bourgeonnement et de réinnervation.

Transport du cholestérol vers les neurones.

L'augmentation parallèle de l'expression dans les cellules gliales de l'ApoE impliquée dans le transport de lipoprotéines (Poirier et al. 1991b ; White et al. 2001a) et de l'ABCA1 impliquée dans la constitution des lipoprotéines (Jasmin et al. 2014) permettrait de délivrer ces matériaux lipidiques vers les neurones qui augmentent en retour l'expression des récepteurs aux lipoprotéines afin de faciliter l'internalisation de ces dernières (Poirier et al. 1993a). En effet, si le cholestérol est vital pour la croissance neuritique et la formation de nouvelles synapses, l'essentiel du cholestérol neuronal serait transporté par les lipoprotéines d'origine astrocytaire (Poirier et al. 1993a ; Mauch et al. 2001).

Compensation de la déconnexion hippocampique

Figure 28: Désafférentation du gyrus denté et bourgeonnement de collatérales axonales



A/ La figure représente schématiquement les neurones entorhinaux (rouge), les cellules granulaires du gyrus denté (bleu) et les afférences cholinergiques du MSDB (vert).

B/ Une perte partielle des neurones entorhinaux entraîne la dégénérescence de leurs terminaisons dans le gyrus denté (1). Cette accumulation de débris de membranes va entraîner une réaction microgliale inflammatoire qui va activer les astrocytes (IL-1, TGF-β1). Les astrocytes réactifs vont alors métaboliser les débris cellulaires, produire de l'ApoE et générer des lipoprotéines destinées au transport du cholestérol et des lipides vers les neurones afin de soutenir le bourgeonnement de collatérales. De plus, les astrocytes réactifs vont sécréter divers facteurs de croissance (NGF, BDNF) et molécules d'adhésion cellulaire (NCAM) qui vont stimuler le bourgeonnement de collatérales.

C/ Les projections cholinergiques vont alors présenter un bourgeonnement de collatérales axoniques et une synaptogénèse qui va envahir la zones désafférentées (2).

D/ les neurones entorhinaux survivants vont également produire des collatérales axoniques permettant une réinnervation glutamatergique homotypique des cellules granulaires désafférentées (3).

Compensation de la déconnexion hippocampique

Croissance neuritique, bourgeonnement de collatérales et réinnervation.

La redistribution des matériaux lipidiques contenus dans les lipoprotéines vers les neurones en réorganisation et vers les fibres en bourgeonnement faciliterait l'extension neuritique et la formation de nouvelles synapses (White et al. 2001a).

Les réorganisations synaptiques dans le DG consécutives à la lésion entorhinale concerneraient potentiellement quatre réseaux : les afférences cholinergiques du MSDB qui réagiraient le plus précocement suivies des réorganisations des afférences glutamatergiques survivantes du cortex entorhinal ainsi que potentiellement des afférences glutamatergiques des cellules mossues (système commissural et associatif) voire des collatérales des fibres mossues (Ramirez 2001). Ces changements seraient accompagnés de réorganisation GABAergiques parallèles qui permettraient le maintien de la balance excitation/inhibition dans le DG (Mizukami et al. 1997). Cependant, la lésion du cortex entorhinal irait de pair avec une diminution initiale de l'innervation GABAergique induisant une désinhibition *feed-forward* des cellules granulaires (Zipp et al. 1989), ce qui expliquerait l'apparition transitoire d'une activité épileptiforme dans le DG désafférenté dans les 10 jours suivant la lésion (Dasheiff & McNamara 1982 ; Kelley & Steward 1997) et contribuerait à l'hyperactivité caractérisant le gyrus denté durant le MCI.

Les principaux phénomènes de bourgeonnement de collatérales concerneraient cependant essentiellement le bourgeonnement de collatérales cholinergique ainsi que les processus de réinnervation glutamatergique homotypique par les afférences entorhinales survivantes.

II.2 Bourgeonnement de collatérales cholinergiques

Bourgeonnement cholinergique et lésion entorhinale chez l'Homme et le Rongeur.

La lésion du cortex entorhinal entraîne classiquement un bourgeonnement de collatérales cholinergiques dans le gyrus denté de l'hippocampe (Lynch et al. 1972). Chez le Rat, ce bourgeonnement de collatérales cholinergiques débute dès 4-5 jours après la mise en place de la lésion et augmenterait durant les semaines qui suivent (Fass & Ramirez 1984). Si l'augmentation de l'expression des marqueurs cholinergiques peut traduire une augmentation de l'expression de ces marqueurs plus qu'une prolifération de collatérales axoniques, des approches de traçage antérograde confirment que les projections septo-hippocampiques se ramifient après lésion entorhinale (Nyakas et al. 1988). De plus, ces collatérales cholinergiques proviendraient bien de neurones du MSDB, la lésion spécifique de ces derniers induisant la disparition du bourgeonnement cholinergique (Naumann et al. 1997).

Depuis les travaux de Geddes et collaborateurs (1985), on sait que les patients DTA présentent des signes de bourgeonnement cholinergique similaire aux phénomènes observés chez le rongeur avec lésion entorhinale. Ce bourgeonnement qui prendrait place dès le stade de MCI et est corrélé avec un stade Braak III/IV où la tauopathie touche fortement le cortex entorhinal (Dekosky et al. 2002 ; Ikonovic et al. 2003). Ainsi, il semble que la lésion entorhinale soit un bon modèle de la déconnexion hippocampique et des compensations synaptiques qui la suivent.

L'APP et ses dérivés ayant des effets neurotrophiques (revue dans Teter & Ashford 2002), il est possible que la présence d'une pathologie amyloïde puisse moduler les phénomènes de bourgeonnement. Cependant, il n'apparaît pas que la présence d'une pathologie amyloïde ou la surexpression d'APP puisse impacter significativement le bourgeonnement chez la souris (Kadish et al. 2009).

Une compensation cholinergique ?

Le bourgeonnement cholinergique semble bien traduire une réponse compensatrice, car il disparaît quand les patients convertissent vers la démence (Dekosky et al. 2002). De plus,

Compensation de la déconnexion hippocampique

l'étendue de la réserve cognitive serait corrélée à l'amplitude de la neurotransmission cholinergique (Garibotto et al. 2013).

Cependant, à l'heure actuelle, on ne sait pas par quels mécanismes le bourgeonnement cholinergique permettrait la compensation fonctionnelle de la désafférentation. Il a bien été proposé que le bourgeonnement cholinergique permette de maintenir le niveau d'excitabilité des cellules granulaires. En effet, la co-stimulation du MSDB et des voies perforantes augmente la réponse des cellules granulaires par rapport à la stimulation des voies perforantes seules (Fantie & Goddard 1982). Cependant, ces stimulations n'étant pas spécifiques des neurones cholinergiques, leurs effets pourraient également s'expliquer par le recrutement des neurones GABAergiques et glutamatergiques de projections. Malgré tout, au-delà de la compensation de la désafférentation hippocampique, il apparaît que le système cholinergique soit capable de compenser fonctionnellement différents types de lésions cérébrales, comme les lésions de type Korsakoff dans les modèles animaux de cette pathologie (Roland et al. 2008), ou encore des lésions du système limbique chez le primate (Croxson et al. 2012).

Généralement, le bourgeonnement cholinergique est évalué à travers la densité de marquage de l'activité de l'AChE. Cependant ces changements de marquage AChE pourrait aussi traduire des changements d'expression génique (Chen et al. 1983 ; McKeon et al. 1989) ou être le produit de l'atrophie du tissu (Storm-Mathisen, 1974). En effet, lorsque les variations du marquage AChE sont comparées à celle de la ChAT (Choline acétyl transférase, enzyme de synthèse de l'acétylcholine), il s'avère que ces deux marqueurs cholinergiques évoluent de manière différentielle (Henderson et al. 1998). Certains ont suggéré que l'intensification du marquage de l'AChE serait un artefact dû à l'atrophie du DG (Phinney et al. 2004). Cependant, ces auteurs ont eu recours à une transection des voies perforantes qui induit une atrophie beaucoup plus marquée que celle qui suit une lésion excitotoxique partielle.

Quoi qu'il en soit, le fait que la variation d'expression de l'AChE après lésion entorhinale ne soit pas forcément liée aux variations des autres marqueurs cholinergiques (Aubert et al. 1994) argumente en faveur d'un rôle indépendant possible pour l'AChE et suggère que d'autres marqueurs pourraient mieux décrire les modifications anatomiques plastiques du système cholinergique. C'est pourquoi j'ai choisi d'utiliser le marquage du transporteur vésiculaire de l'acétylcholine (VAChT) pour mesurer l'étendue des réorganisations cholinergiques dans le cadre de cette thèse.

II.3 Réinnervation glutamatergique

Les lésions entorhinales partielles induisent des pertes des synapses glutamatergiques dans le gyrus denté similaires à celles causées par la tauopathie chez les patients DTA (Cabalka et al. 1992). Or, cette déconnexion glutamatergique du gyrus denté s'accompagne également du remodelage des systèmes glutamatergiques et notamment des fibres entorhinales survivantes, des fibres commissurales et associatives des cellules mossues et des fibres mossues issues des cellules granulaires (Ramirez 2001).

Réinnervation homotypique.

Chez le Rat, contrairement à la souris ou au primate, il y a une forte composante inter-hémisphérique au niveau des voies perforantes (Van Groen et al. 2003b). Ainsi, après lésion unilatérale du cortex entorhinal, on observe chez le Rat un bourgeonnement des terminaisons des voies perforantes croisées (Steward 1976 ; Deller et al. 1996). Ce bourgeonnement débute vers 12 jours après une lésion électrolytique unilatérale (Steward & Loesche 1977) et il se poursuivrait au moins jusqu'à 60 jours après la lésion (Steward et al. 1976). Chez la Souris, la réinnervation glutamatergique impliquerait plutôt les fibres ipsilatérales survivantes du cortex

Compensation de la déconnexion hippocampique

entorhinal (Kadish et al. 2003), même en cas de lésion unilatérale du fait de l'absence des voies perforantes croisées (Van Groen et al. 2003b). La Souris est en cela un meilleur modèle animal que le Rat pour l'étude de la compensation de la désafférentation de l'hippocampe, la composante bilatérale étant également faible dans la formation hippocampique des primates (Witter & Amaral 1991). Or, la réinnervation du gyrus denté par les projections glutamatergiques pourrait également soutenir la récupération fonctionnelle des capacités de mémoire spatiale chez la Souris (Hardman et al. 1997). Ainsi, les fibres entorhinales survivantes seraient suffisantes pour permettre une compensation glutamatergique de la déconnexion hippocampique.

Bourgeoisement commissural et associatif (projections des cellules moussues).

Suite à la lésion entorhinale, le système commissural et associatif (C/A) des cellules moussues du hile qui projette normalement vers la couche moléculaire interne du gyrus denté (IML) s'étendrait dans les zones désafférentées. En effet, on peut observer une expansion de 20 à 30% de l'épaisseur de l'IML (Lynch et al. 1976 ; West 1984). Ce bourgeoisement serait réduit avec le vieillissement (Schauwecker et al. 1995), ce qui suggère que sa contribution dans les DTA pourrait être limitée. De plus, la présence d'un bourgeoisement cholinergique précoce inhiberait le bourgeoisement C/A (Schauwecker & McNeill 1995), ce qui indique que les différentes réorganisations synaptiques dans le gyrus denté se régulent entre elles.

Bourgeoisement des fibres moussues (projections des cellules granulaires).

Ce type de bourgeoisement s'observe surtout dans le cadre de transection des voies perforantes (Laurberg & Zimmer 1981) et donc dans le cadre d'une désafférentation totale et immédiate du gyrus denté. Ce bourgeoisement pourrait être impliqué dans la mise en place d'activités épileptiformes (revue dans Dudek & Spitz 1997). Bien que certains suggèrent qu'il permettrait plutôt de contrôler l'excitabilité des cellules granulaires *via* la stimulation des interneurons inhibiteurs (Sloviter 1992).

Chez l'Homme.

Chez le patient DTA, la perte de neurones entorhinaux s'accompagne d'un bourgeoisement cholinergique et potentiellement d'un bourgeoisement des fibres commissurales et associatives (Geddes et al. 1985), mais pas d'un bourgeoisement des fibres moussues (Represa et al. 1988). La principale différence entre l'Homme et les modèles animaux est que chez l'Homme les pertes neuronales sont progressives et ininterrompues. Cependant, le fait que les pertes neuronales sont progressives dans le cadre des DTA ne devrait pas remettre en cause les résultats obtenus avec des lésions chez le rongeur. En effet, l'atteinte progressive du cortex entorhinal par lésions successives accélère les processus de réinnervation (Ramirez et al. 1996). Cependant, le fait que les pertes neuronales entorhinales sont continues est plus dérangeant. Le bourgeoisement cholinergique est plus rapide que la réinnervation glutamatergique, celui-ci jouerait potentiellement un plus grand rôle que la réinnervation glutamatergique homotypique, une réelle compensation glutamatergique ne pouvant se mettre en place que si l'avancée de la pathologie entorhinale peut être interrompue. Il faut tout de même noter qu'il n'y a pas de perte complète de synapses entorhinales dans les DTA, ce qui suggère qu'une partie des voies perforantes serait maintenue, voire qu'un bourgeoisement homotypique partiel reste possible chez le patient (Cabalka et al. 1992).

En effet, si la tauopathie est associée à des pertes neuronales entorhinales, il s'avère que certains neurones resteraient viables, voire indemnes de pathologie tau (Hof et al. 2003). Bien qu'on ne sache pas si ces neurones survivants sont fonctionnels, ils pourraient constituer la base d'une réinnervation homotypique. Cependant, la moitié des neurones entorhinaux étant perdue dès le stade de MCI (Gomez-Isla et al. 1996), on peut se demander si la taille de la population

Compensation de la déconnexion hippocampique

survivante est suffisante pour permettre une réinnervation homotypique à la hauteur des pertes synaptiques au niveau de l'hippocampe. Un argument en faveur d'une capacité de compensation fonctionnelle via une réinnervation homotypique préservée vient du fait qu'un petit nombre de cellules de la grille pourrait collectivement représenter l'environnement dans sa totalité (Fyhn et al. 2008) et transmettre cette information à l'hippocampe, suggérant que des pertes partielles de neurones entorhinaux sont compensables par un bourgeonnement de collatérales.

Un lien entre réorganisations glutamatergiques et bourgeonnement cholinergique ?

Comme on l'a vu, la présence d'un bourgeonnement cholinergique module l'amplitude des réorganisations glutamatergiques et inhibe notamment le bourgeonnement C/A (Schauwecker et al. 1995). A l'inverse, l'amplitude de la réinnervation glutamatergique pourrait moduler l'étendue du bourgeonnement cholinergique. En effet, chez le primate avec des lésions aiguës, il semblerait que le système cholinergique n'est nécessaire à la récupération fonctionnelle que durant une période critique qui précéderait les phénomènes de récupération/réinnervation homotypiques (Croxson et al. 2012).

Au-delà d'une compensation directe par le système cholinergique, il est également possible que l'augmentation de l'innervation cholinergique puisse soutenir la mise en place du bourgeonnement glutamatergique. En effet, au cours du développement, l'expression des récepteurs $\alpha 7$ nAChR faciliterait la synaptogénèse glutamatergique (Lozada et al. 2012a), tandis que les récepteurs $\beta 2$ nAChR faciliteraient la stabilisation des synapses ciblant les épines dendritiques post-synaptiques (Lozada et al. 2012b).

III. *APOE4* et déficit de compensation ?

III.1 *APOE4* et déficit de bourgeonnement synaptique chez la Souris.

Bien que l'absence d'ApoE soit associée à un développement synaptique normal, il apparaît que les phénomènes de bourgeonnement synaptique glutamatergiques et cholinergiques sont fortement perturbés chez les souris *APOE-KO*, notamment dans la lame supérieure du gyrus denté (Stone et al. 1998 ; Teter et al. 1999a ; Champagne et al. 2005).

Concernant les différences entre isoformes, l'ApoE3 serait deux fois plus efficace que l'ApoE4 pour soutenir la croissance neuritique dans les cultures primaires et cultures organotypiques hippocampiques (Teter et al. 1999b, 2002), l'ApoE3 ayant des effets synaptotrophiques plus importants que l'ApoE4 *in vivo* (Veinbergs et al. 1999). Chez les souris exprimant plus physiologiquement les différentes isoformes d'ApoE, il apparaît que l'allèle ApoE4 induit un déficit de bourgeonnement cholinergique (Blain et al. 2006) et de réinnervation du gyrus denté (White et al. 2001b). L'effet négatif de l'ApoE4 sur la croissance neuritique en général et sur le bourgeonnement de collatérales en particulier dépendrait du transport des lipoprotéines et de l'activation des récepteurs lipoprotéiques notamment LRP (Nathan et al. 1994, 2002). Après l'induction d'un traumatisme crânien expérimental, l'analyse d'expression des gènes dans l'hippocampe et le cortex chez les souris *APOE3* et *APOE4* suggère que la mauvaise récupération serait liée à des déficits de réparation (moindre expression chez les souris *APOE4* de gènes up-régulés chez les souris *APOE3*) et non pas à l'activation de mécanismes pathologiques (Crawford et al. 2009).

Cependant, il n'a encore jamais été établi de liens directs entre le bourgeonnement de collatérales cholinergiques et la compensation de la déconnection hippocampique. Ainsi, l'influence des isoformes de l'ApoE sur le bourgeonnement cholinergique et la récupération fonctionnelle restent hypothétiques. Cette question représente le point central de mon travail de thèse.

III. 2 Un déficit de bourgeonnement cholinergique chez les patients *APOE4* ?

Chez les patients, ni le bourgeonnement cholinergique hippocampique (Geddes et al. 1985), ni l'augmentation de l'activité cholinergique durant le MCI (Dekosky et al. 2002 ; Ikonovic et al. 2003) n'ont été analysés en fonction du génotype *APOE*. Cependant, des arguments indirects suggèrent la possibilité d'un tel déficit.

Pour commencer, l'ApoE jouerait un rôle important surtout durant les phases précoces de la pathologie qui sont associées avec à la plasticité cholinergique. En effet, l'augmentation transitoire de l'expression d'*APOE* durant les stades Braak associés à l'atteinte du cortex entorhinal (Glöckner et al. 2002) indique que l'ApoE serait mobilisé spécifiquement durant ces stades précoces de la pathologie par ailleurs également associés à une augmentation transitoire de l'activité cholinergique hippocampique (Dekosky et al. 2002 ; Ikonovic et al. 2003). De plus, il apparaît que l'*APOE4* induit l'essentiel de ses effets négatifs durant la phase précoce de MCI et n'impacterait pas clairement le décours de la pathologie dans les phases plus avancées (Foster et al. 2013). Notons aussi que l'apparition de déficit de navigation spatiale dès le stade de MCI serait une des caractéristiques des patients *APOE4*, les patients non-porteurs n'en présentant que plus tardivement, lorsque la pathologie envahi complètement l'ensemble de la formation hippocampique (Laczo et al. 2010). Ainsi, un déficit des réorganisations cholinergiques pourrait contribuer significativement à l'agressivité particulière du stade de MCI chez les patients porteurs de l'*APOE4*.

Le nombre et la morphologie des neurones cholinergiques ne semblent pas être influencés par l'*APOE4* (Bronfman et al. 2000) ce qui est en accord avec le fait que les pertes de neurones cholinergiques auraient lieu après le stade de MCI et même après les phases précoces des DTA (Gilmor et al. 1999). Cependant, il apparaît que les réorganisations du système cholinergique sont tout de même impactées par la présence de l'*APOE4* chez la Souris (Blain et al. 2006) et il est possible que ce soit également le cas chez l'Homme. En effet, les thérapies à base d'inhibiteurs de l'activité de l'AChE visant à augmenter le tonus cholinergique n'induisent de réponse clinique que dans 25 à 50% des patients DTA et il s'avère que les patients porteurs de l'allèle *APOE4* répondent moins bien à ces médications (Farlow et al. 1996 ; Poirier et al. 1999 ; Sjögren et al. 2001 ; Wang et al. 2014). Ainsi, il est possible que les thérapies augmentant le tonus cholinergique ne soient effectives qu'en présence d'un bourgeonnement de collatérales cholinergique dans l'hippocampe, ce dernier démultipliant potentiellement les effets de l'inhibition de la dégradation de l'acétylcholine.

De manière intéressante, la présence de l'allèle *APOE4* est également associée à un moindre taux de réversion du stade de MCI vers une cognition normale (Koepsell et al. 2012 ; Kudrnovsky-Moser et al. 2013 ; Roberts et al. 2013). Ainsi, cet allèle pourrait être associé à de moindres capacités de compensation. Au-delà des DTA, l'étude de patients avec traumatisme aigu suggère que des déficits de compensation après atteinte cérébrale sont couramment retrouvés chez les patients *APOE4*. En effet, l'*APOE4* induit une mauvaise récupération fonctionnelle après chirurgie cardiaque (Tardiff et al. 1997) et après traumatisme crânien (Teasdale et al. 1997 ; Friedman et al. 1999). Ces résultats ont d'ailleurs été répliqués chez la souris transgénique *APOE4* (Sabo et al. 2000).

Dans le cadre d'atteintes chroniques, la présence de l'*APOE4* augmente la sévérité des déficits neurologiques associés à la démence pugilistique (Jordan et al. 1997) et les joueurs professionnels de football américain porteurs de l'*APOE4* présentent des déficits cognitifs précoces et exacerbés (Kutner et al. 2000). Ces déficits seraient bien associés à des défauts de réparation cérébrale, l'*APOE4* n'influence pas la sévérité initiale du traumatisme crânien mais spécifiquement la récupération à 6 mois (Zhou et al. 2008). D'ailleurs, les études chez la Souris suggèrent bien que les déficits induits par l'*APOE4* sont liés à des défauts de réparation et non pas à l'activation de mécanismes pathologiques (Crawford et al. 2009), même lorsqu'il s'agit de souris transgéniques exprimant des mutations familiales causant la forme familiale de la maladie d'Alzheimer (Bennet et al. 2013). De plus, ces déficits de réparation cérébrale associés à une mauvaise récupération fonctionnelle chez les sujets *APOE4* dépendrait fortement de l'âge. En effet, dans une population de militaires avec traumatisme crânien âgée de 20 à 25 ans, l'*APOE4* n'entraîne pas d'effet négatif sur la récupération fonctionnelle (Han et al. 2007b).

III. 3 Bourgeonnement synaptique, ApoE et œstrogènes.

Chez la femme, MCI et DTA prennent généralement place après la ménopause. D'ailleurs, la prévalence de ces pathologies serait plus importante chez celle-ci. Les thérapies de remplacement oestrogéniques réduisent le risque de DTA (Paganini-Hill 1996), retardent l'âge de déclaration (Tang et al. 1996) et induisent une amélioration cognitive (Sherwin 1997). Or, il apparaît que les hormones féminines potentialisent les capacités de bourgeonnement cholinergique et de remodelage synaptique (Kadish et al. 2009) et facilitent la récupération fonctionnelle après lésion entorhinale (Stein 2001). Ainsi, il est possible que la diminution des taux d'hormones sexuelles féminines induise un déficit de compensation synaptique facilitant la progression de la pathologie. Chez la femme, la ménopause chirurgicale précoce est associée à un déclin cognitif exacerbé et à l'augmentation du risque de DTA (Bove et al. 2013). De plus, une étude portant sur 1436 femmes a montré que les polymorphismes

APOE4 et déficit de compensation ?

génétiques du gène codant pour le récepteur α des œstrogènes affectent l'âge de déclaration des DTA (Janicki et al. 2014).

De manière intéressante, les thérapies de substitution hormonales améliorent les performances cognitives (Henderson et al. 1996, Schneider & Finch 1997) et augmentent la réponse aux inhibiteurs de l'AChE (Schneider et al. 1996), bien que leurs bénéfices paraissent variables et dépendent notamment de l'âge au moment de la mise en place du traitement, des doses utilisées et de l'interaction avec d'autres polymorphismes génétiques (Cholerton et al. 2002 ; Xing et al. 2013). Ainsi, il est possible que les œstrogènes permettent de soutenir la mise en place du bourgeonnement cholinergique et donc de potentialiser les phénomènes de compensation de la déconnexion hippocampique.

Chez le rongeur, il apparaît qu'après lésion entorhinale les rates femelles sont moins déficitaires que les rats mâles (Roof et al. 1993). Cet effet pourrait s'expliquer par la potentialisation hormonale des réorganisations cholinergiques (Kadish et al. 2002a) et glutamatergiques (Morse et al. 1986). En effet, en plus de leurs effets neuroprotecteurs propres (protection contre l'ischémie, l'hypoxie, l'excitotoxicité, le stress oxydatif), les œstrogènes auraient également des effets neurotrophiques en facilitant notamment la synaptogénèse et la spinogénèse hippocampiques (Liu et al. 2001). Il est même possible que les phénomènes de bourgeonnement soient dépendant des hormones sexuelles spécifiquement chez les femelles, car seules les rates sont sensibles à la gonadectomie (Morse et al. 1986). Chez les femelles ovariectomisées, le remplacement hormonal en testostérone induit également un effet protecteur (Morse et al. 1986) ainsi, apparaît-il que la production locale d'œstrogènes par les astrocytes (aromatase) jouerait un rôle essentiel dans la plasticité synaptique hippocampique (Rune et al. 2006).

Ces effets positifs des œstrogènes dépendraient notamment des astrocytes (Garcia-Segura et al. 1999) et de la présence de l'ApoE, les œstrogènes n'induisant pas d'effets bénéfiques sur le bourgeonnement synaptique *in vitro* chez les souris *APOE-KO* (Stone et al. 1998). Il semble ainsi que les œstrogènes contrôlent la gliose et régulent les processus neuro-inflammatoires tout en induisant la libération de facteurs neurotrophiques par les astrocytes (Acas-Fonseca et al. 2014). Or il semblerait qu'œstrogènes et ApoE interagissent pour moduler le risque DTA et la récupération après traumatisme crânien. L'interaction avec l'ApoE semble particulièrement importante, les œstrogènes ne modulant le bourgeonnement synaptique que dans les régions où ce dernier dépend également de l'ApoE (Teter et al. 1999a). Un mécanisme potentiel serait la surexpression de l'ApoE induite par les œstrogènes au niveau astrocytaire (Teter et al. 1999a). Chez l'humain, il apparaît que les patientes porteuses de l'*APOE4* ont plus de risques de développer une DTA. De plus, chez les souris transgéniques *APOE*, les femelles sont généralement plus promptes à présenter des déficits liés à l'âge (Raber et al. 1998, 2000 ; Grootendorst et al. 2004 ; Bour et al. 2008). Ainsi, si l'absence d'œstrogènes paraît avoir un impact d'autant plus fort en présence de l'*APOE4*, la relation entre *APOE4* et œstrogènes durant les phénomènes de bourgeonnement synaptique et de compensation fonctionnelle de la lésion entorhinale n'ont jamais été étudiés. En effet, il est possible que l'*APOE4* contrecarre l'effet facilitateur des œstrogènes, mais alternativement il est également envisageable que les œstrogènes puissent compenser l'effet négatif de l'*APOE4*. Les femmes porteuses de l'*APOE4* représentant l'une des populations ayant le plus fort risque de développer une DTA (Altmann et al. 2014), si les œstrogènes sont capables de compenser les effets négatifs de l'*APOE4*, le ciblage de leurs voies de signalisation représenterait alors une perspective thérapeutique particulièrement intéressante.

Principaux points abordés dans ce chapitre :

L'atteinte précoce du cortex entorhinal induirait une déconnection partielle de l'hippocampe qui serait responsable de l'apparition des troubles cognitifs. Cependant, divers arguments suggèrent que l'hippocampe pourrait s'adapter à cette déconnexion via la mobilisation de mécanismes compensatoires.

En effet, le bourgeonnement de collatérales cholinergique dans l'hippocampe pourrait compenser activement la déconnexion hippocampique induite par la perte de neurones entorhinaux, bien que cela n'ait jamais été directement démontré.

De plus, les projections entorhinales survivantes vers l'hippocampe pourraient également être caractérisées par un bourgeonnement de collatérales pouvant potentiellement induire une réinnervation homotypique de l'hippocampe. Comme ces deux phénomènes ont lieu en parallèle, il est possible qu'ils interagissent entre eux afin de compenser la déconnexion hippocampique.

De manière intéressante, l'*APOE4* pourrait induire des déficits de bourgeonnement et de réorganisation des circuits hippocampiques qui pourraient contribuer aux effets négatifs de cet allèle sur la progression des démences de types Alzheimer et plus largement de nombreuses autres pathologies neurodégénératives.

Enfin, les hormones sexuelles moduleraient ces phénomènes de bourgeoisements. Ainsi, ces hormones pourraient potentiellement influencer l'impact de de l'allèle *APOE4*.

Points clés :

L'allèle *APOE4* est souvent associé à la présence de déficits cognitifs, mais il est possible qu'il induit en fait une facilitation cognitive en début de vie tandis qu'il précipiterait ensuite l'apparition de pathologies neurodégénératives liées au vieillissement (pléiotropie antagoniste).

Les démences de type Alzheimer sont des pathologies hétérogènes dont l'origine proviendrait de l'interaction, au cours de vieillissement, entre de multiples facteurs génétiques et environnementaux.

Le plus important facteur de risque génétique est l'allèle *APOE4* ; cet allèle induisant la plupart de ses effets négatifs durant les phases précoces des DTA (MCI).

Le MCI est associé à des pertes partielles des neurones du cortex entorhinal ce qui induit une déconnexion partielle de l'hippocampe.

Cependant, des phénomènes de bourgeonnements cholinergique et glutamatergique pourraient compenser ce syndrome de déconnexion hippocampique voire même induire une rémission vers une cognition normale.

Principales questions posées au cours de cette thèse :

L'effet pléiotropique antagoniste de l'*APOE4* sur la cognition existe-t-il chez la Souris ?
(Publication n°1)

La lésion partielle du cortex entorhinal est-elle associée à des déficits mnésiques exacerbés chez les souris porteuses de l'*APOE4* ?
(Publication n°2)

Quel sont les rôles respectifs du bourgeonnement cholinergique et de la réinnervation glutamatergique dans la compensation fonctionnelle ?
(Publication n°3)

Quelle est l'étendue de ces réorganisations synaptiques dans les différentes sous-régions hippocampiques ?
(Publication n°3)

Quels sont les effets du génotype *APOE* et du sexe sur ces phénomènes ?
(Publication n°3)

Matériels et méthodes

I. Animaux

Les souris nécessaires à la réalisation de cette thèse sont nées dans notre propre élevage au laboratoire. Après sevrage, elles sont identifiées individuellement au moyen d'une puce RFID sous-cutanée (Résaumatique, Bernay, France), puis sont stabulées par groupes de 3 à 4 souris de même génotype, portée et sexe (cages en Makrolon de 42*26*15 cm, garnies de papier absorbant pour faire un nid, en cycle lumineux de 12h/12h avec une période éclairée de 7h à 19h, 22±1°C, une humidité contrôlée et de la nourriture et de l'eau *ad libitum*).

Les souris expérimentales sont isolées 7 jours avant le début des expériences en cages individuelles (22*20*14cm) disposant d'un bout de papier absorbant pour se faire un nid. Les souris expérimentales sont régulièrement pesées et manipulées afin d'être familiarisées à l'expérimentateur.

I.1. Souris *hAPP/APOE*

Afin d'étudier l'impact de l'allèle *APOE4* sur les réorganisations synaptiques hippocampiques en lien avec la récupération fonctionnelle, nous avons utilisé des souris *hAPP/APOE3* et *hAPP/APOE4*. Ces souris expriment l'*APOE3* ou l'*APOE4* humaine sous le contrôle du promoteur murin de l'*APOE*, ce qui permet une régulation physiologique des niveaux d'*APOE* (*targeted-replacement*). Ces souris expriment en plus de l'*APP* murine, une copie supplémentaire d'*APP* humaine normale (*hAPP*) via l'insertion d'un chromosome artificiel de levure (YAC). En effet, cette lignée bi-transgénique est obtenue en croisant des souris *APOE3-tr* ou *APOE4-tr* (Sullivan et al. 1997) avec des souris *hAPP-YAC* (Lamb et al. 1993). Initialement, nous avons sélectionné ce modèle car d'après la littérature, une partie des effets des allèles de l'*APOE* pourrait provenir des interactions spécifiques entre isoformes d'ApoE et APP ou ces sous-produits de clivage (cf. : introduction, partie I).

Ainsi, le principal intérêt de ce modèle transgénique est de rendre possible les interactions spécifiques entre les deux principales isoformes d'ApoE humaine et de l'*APP* humaine normale, mais sans induire artificiellement de pathologie amyloïde comme ce serait le cas *via* l'expression d'une *APP* humaine avec mutation Alzheimer familiale. Eventuellement, la présence d'une copie supplémentaire d'*APP* normale apporterait ici un substrat potentiel pour la genèse d'amyloïde.

Ces souris ont été générées par Taconic (Germantown, NY, USA) pour le compte de Merk Sharp & Dohme Corp (Boston, USA) et leur utilisation fait l'objet d'un accord de transfert de matériel (MTA) entre Merk et le Dr C. Mathis. De plus, l'usage de cette lignée possède également l'agrément d'utilisation confinée d'OGM du groupe 1 n°6516 en date du 03/09/2013. Enfin, en accord avec la législation européenne, les procédures expérimentales ont été validées par le comité d'éthique de l'université de Strasbourg (n° d'autorisation AL/15/22/02/13).

Souris hAPP-YAC.

Cette lignée exprime une copie d l'APP humaine normale qui a été insérée par la méthode de transfert de chromosomes artificiels de levure (*yeast artificial chromosome, YAC* ; Lamb et al. 1993). Brièvement, le gène de l'APP extrait du chromosome 21 humain par digestion enzymatique a été intégré par des enzymes de recombinaison à un chromosome de levure AB1380. Ce YAC contenant la séquence du gène APP humain normal (APP-8 : clone B142F9 de 650 kb) a ensuite été transfecté dans des cellules embryonnaires souche *via* un plasmide P8. Les cellules transfectées ont alors été implantées dans des embryons au stade de blastocyste et les embryons ont été transférés dans une mère porteuse de souche C57BL/6J afin de donner naissance à des souris chimères *hAPP-YAC* co-exprimant l'APP humain et l'APP murin à des niveaux comparables (Lamb et al. 1993).

Souris APOE3-tr et APOE4-tr.

Les souris *APOE3-tr* et *APOE4-tr* ont été générées par remplacement ciblé du gène murin de l'*APOE* par l'allèle humaine *APOE3* ou *APOE4* (Sullivan et al. 1997). Ce remplacement ciblé laisse intacte les séquences régulatrices du gène murin ce qui permet de maintenir une régulation physiologique du niveau de transcription de l'allèle *APOE* humaine ainsi inséré et donc une distribution et un niveau d'expression des isoformes apoE3 ou apoE4 comparable à celui de l'ApoE murine de souris non-transgéniques. Brièvement, un vecteur contenant le gène humain a été injecté dans des cellules embryonnaires E14TG2a de la lignée de souris 129P2 et ces cellules embryonnaires ont été injectées dans une mère porteuse de lignées C57BL/6J.

Souris double transgéniques hAPP/APOE3 et hAPP/APOE4.

Ces souris double-transgéniques ont été obtenues en croisant des souris *hAPP-YAC* avec des souris *APOE3-tr* et *APOE4-tr* (Kornecook et al. 2009). Dans le cadre de notre accord de transfert de matériel (MTA), nous avons élevé au laboratoire l'ensemble des souris *hAPP/APOE3* et *hAPP/APOE4* utilisé durant cette thèse. Partant de 10 mâles et 20 femelles homozygotes pour l'*APOE3* ou l'*APOE4*, nous avons limité notre élevage à deux générations afin de limiter les risques de dérive génétique inhérents au maintien d'une lignée par croisement homozygote.

I.2. Souris *ChAT-ChR2*

Afin d'étudier l'impact de l'activation des fibres cholinergiques sur les propriétés des réseaux hippocampiques, nous avons élevé des souris *ChAT-ChR2* qui expriment le canal cationique Rhodopsine-2 sous le contrôle du promoteur du gène de la choline-acétyltransférase (*ChAT*), l'enzyme de synthèse de l'acétylcholine. Le canal Rhodopsine-2 est un photorécepteur sensoriel à 7 domaines transmembranaires provenant d'une algue verte (*Chlamydomonas reinhardtii*). Cette construction génétique permet ainsi de dépolariser spécifiquement les neurones cholinergiques par une stimulation lumineuse de 480 nm de longueur d'onde.

Ces souris ont été générées par le professeur Feng Guoping (Neuroscience McGovern Institute for Brain Research ; Massachusetts Institute of Technology) et leur utilisation fait l'objet d'un accord de transfert de matériel (MTA). Enfin, en accord avec la législation européenne, l'intégralité des procédures expérimentales a été validée par le comité d'éthique de l'université de Strasbourg (n° d'autorisation AL/58/65/02/13).

Les souris *ChAT-ChR2* expriment le *ChR2* *via* l'insertion d'un chromosome artificiel de bactérie au niveau du gène codant pour le transporteur vésiculaire de l'acétylcholine (*VACHT*,

Animaux

Slc18a3). La protéine ChR2 est également fusionnée avec un gène rapporteur (*enhanced Yellow Fluorescent Protein, eYFP*) permettant de marquer les corps cellulaires et les prolongements des neurones exprimant le ChR2.

La séquence cDNA du ChR2 a été modifiée par une substitution gain de fonction H134R (CAC vers CGC) permettant d'obtenir des photo-courants stables plus larges. Cette séquence a ensuite été fusionnée avec celle de l'*eYFP* et a été insérée dans la région codante du locus *Chat* de la souris par recombinaison homologue sur le BAC. Ce BAC contient également le gène *VAcHT*, sous le contrôle du promoteur du gène *Chat* puisque la séquence *VAcHT* est localisée dans un intron entre l'exon 1 et l'exon 2 du gène *Chat*. Ce BAC d'environ 220kb a ensuite été injecté dans des oocytes de souris C57BL/6J pour générer la lignée *Chat-ChR2*. Cette lignée a ensuite été maintenue sur fond C57BL/6J.

II. Chirurgie et électrophysiologie

II.1. Lésion du Cortex entorhinal

Afin de modéliser les pertes neuronales caractéristiques des phases précoces des DTA (MCI), nous avons pratiqué des lésions partielles du cortex entorhinal, induisant ainsi une désafférentation partielle de l'hippocampe. Ces lésions partielles ont été réalisées au moyen de 6 injections de NMDA (3 par hémisphère, 120mM/L). Le NMDA étant un agoniste de synthèse des récepteurs glutamatergiques de type NMDA, il induit une lésion excitotoxique des neurones tout en épargnant les fibres de passage (Corbit et al. 2002). La solution a été préparée en une fois en diluant le NMDA dans du tampon phosphate salin (PBS, 0,1mM, pH=7,4), puis les aliquots ont été maintenus à -80°C.

Anesthésie :

Les souris sont anesthésiées par une injection intrapéritonéale (ip) de pentobarbital sodique (Ceva santé animal, 70 mg/kg). Une fois anesthésiées (perte des réflexes de retrait de la patte), les souris sont positionnées dans un cadre stéréotaxique et leurs yeux sont protégés contre le dessèchement avec du Lacrigel (Europhtha). L'hypothermie est également contrôlée par un système de plaque thermorégulatrice relié à une sonde rectale.

Procédure chirurgicale :

Afin de limiter la douleur, les souris reçoivent une injection sous-cutanée de 0.2ml d'anesthésique local (Xilocaine, Xylovert, France ; 21mg/ml) avant le début de la procédure chirurgicale. Après incision longitudinale du scalp, la boîte crânienne est percée bilatéralement à l'aide d'une fraise dentaire aux coordonnées d'injection. Ces coordonnées sont définies par rapport au point de repère osseux Bregma et ont été calculées à partir de l'atlas stéréotaxique de la Souris en prenant comme référence le site *lambda* (Paxinos & Franklin 2004). Concernant la profondeur des sites d'injection, la variabilité anatomique des souris nous a amené à procéder selon la technique du *touch & up* (T&U). Avec cette technique, la micropipette d'injection est descendue jusqu'au plancher de la boîte crânienne avant d'être remontée aux coordonnées dorso-ventrales désirées.

Tableau 8 : Coordonnées stéréotaxiques d'injection pour les lésions entorhinales

Sites	Antéro-posteriorité	Médio-latéralité	Profondeur	Volume injecté	Structure visée
1	+0,6 mm	± 4,3 mm	T&U +0.5mm	0,08µl	Cortex entorhinal latéral
2a	+0 mm	± 3,7 mm	T&U +1.5mm	0,1µl	Cortex entorhinal médian (ventral)
2b	+0 mm	± 3,7 mm	T&U +1.5mm	0,05µl	Cortex entorhinal médian (dorsal)

La solution de NMDA a été injectée à l'aide d'une micropipette de verre reliée à un cathéter en polyéthylène fixé sur une microseringue Exmir de 10µL (ITO Corporation, Fuji, Japon). Le rythme d'injection étant contrôlé par une micropompe (CMA model 100) délivrant la solution de NMDA avec un débit de 0,1µL/min. Après l'injection, la micropipette reste en place pendant 5 minutes avant d'être lentement remontée (afin de minimiser l'aspiration de la solution de NMDA au cours du retrait de la canule). Enfin, la souris est suturée et replacée

Chirurgie et électrophysiologie

dans une cage propre disposée au chaud jusqu'au réveil complet. Les souris témoins ont subi les mêmes procédures, mais sans injection de NMDA.

A l'issue de l'opération, les souris sont suturées, placées dans une cage propre et reçoivent un traitement anti-inflammatoire non-stéroïdien afin de limiter le risque de souffrance (Meloxicam, Boehringer Ingelheim, France). De plus, le réveil des animaux est suivi, de même que la récupération post-opératoire (contrôle quotidien de la prise de poids et de l'aspect général de l'animal).

II.2. Electrophysiologie et optogénétique sous anesthésie à l'uréthane

La stimulation des neurones cholinergiques projetant vers l'hippocampe dorsal nous a permis de comparer l'impact de l'innervation cholinergique normale et de l'innervation cholinergique après réorganisation (bourgeoisement cholinergique induit par la lésion entorhinale) sur les propriétés des réseaux hippocampiques. A cette fin, nous avons utilisé des stimulations directes des neurones cholinergiques du MSDB par un stimulateur optique à LED (Prizmatix, Givat-Shmuel, Israël) connecté à une fibre optique (100µm de diamètre) tout en enregistrant l'activité électrique dans l'hippocampe dorsal (CA1 et DG) avec une électrode linéaire en silicone comportant 16 canaux espacés de 50 µm (Neuronexus, A1x16-2mm-50-177). Alternativement, nous avons également procédé à des stimulations locales des projections cholinergiques intra-hippocampiques avec une optrode linéaire en silicone de 16 canaux (Neuronexus, O A1x16-2mm-50-177) permettant de stimuler les fibres exprimant les ChR2 avoisinant le site d'enregistrement. De plus, nous avons également procédé à des stimulations des voies perforantes projetant vers l'hippocampe dorsal afin d'évaluer la modulation cholinergique des entrées entorhinales. Les enregistrements sont amplifiés (200x), filtrés (entre 0 et 9KHz) et digitalisés à 22KHz grâce à un système AlphaLab SnR (Alpha-Omega, Ubstadt Weiher, Germany).

Anesthésie

Les souris *ChAT-ChR2* sont anesthésiées par une injection ip d'uréthane (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA ; 1.5g/kg) suivie après 20 minutes par une deuxième injection de kétamine (50mg/kg ; Imalgen, Merial, Gerlan, France)/xylazine (10mg/kg ; Rompun, Bayer Health Care, Leverkusen, Germany). L'uréthane induisant une hypothermie, les souris sont placées sur un coussin chauffant durant l'ensemble du protocole d'enregistrement. Une fois anesthésiées (perte des réflexes de retrait), les souris sont positionnées dans un cadre stéréotaxique placé dans une cage de Faraday afin de limiter l'influence du bruit électrique extérieur sur les enregistrements (La cage faisant alors office de « terre électrophysiologique »).

Procédure chirurgicale

Après dégagement du crâne, deux fenêtres sont ouvertes sur la boîte crânienne à l'aide d'une fraise dentaire aux coordonnées permettant d'atteindre le MSDB et l'hippocampe dorsal. Si les enregistrements ont tous été faits dans l'hémisphère droit, les fenêtres d'accès débordent sur l'hémisphère controlatéral afin de pouvoir prendre le repère médio-latéral sur le sinus veineux inter-hémisphérique (en effet, à cause d'une grande variabilité, la suture osseuse inter-hémisphérique ne peut fournir de point de repère suffisamment précis). Le point de repère antéropostérieur est le point Bregma, tandis que le repère de profondeur est pris sur la

Chirurgie et électrophysiologie

surface de la dure-mère. Enfin, une vis en acier inoxydable est placée en avant du Bregma afin de servir d'électrode de référence.

Tableau 9 : Coordonnées utilisées pour les expériences électrophysiologiques

Sites	Antéro-postériorité	Médio-latéralité	Profondeur	Expérience
MSDB	+0.8 mm	- 0.1 mm	-3.4 mm	Stimulation optogénétique des neurones cholinergiques du MSDB
dHPC	-2 mm	- 2.4 mm	-2 mm	Enregistrements électrophysiologiques de CA1 et du DG
Angulus	-4.2 mm	-2.5 mm	-1.5 mm	Stimulation électrique des voies perforantes projetant vers l'hippocampe dorsal

MSDB, septum médian et bande diagonale de Broca ; dHPC, hippocampe dorsal.

La neuroanatomie des voies de projections septo-hippocampiques n'ayant été précisément analysée que chez le Rat, les coordonnées de stimulation des neurones cholinergiques du MSDB ont été déterminées par une expérience de traçage rétrograde (injection de CtB dans l'hippocampe dorsal afin de déterminer la position des neurones cholinergiques projetant vers l'hippocampe). Cette expérience a permis de déterminer que chez la Souris comme chez le Rat, les neurones cholinergiques innervant l'hippocampe dorsal ont principalement leurs corps cellulaires localisés dans le bras vertical de la bande diagonale de Broca (VDB).

Afin de vérifier les coordonnées d'enregistrement et de stimulation à l'issue de l'expérience, les fibres optiques, électrodes de stimulation et électrodes d'enregistrement sont plongées dans un traceur fluorescent émettant à 565 nm, le DiI (Invitrogen Molecular probes, Waltham, USA). La profondeur de l'enregistrement dans l'hippocampe est, de plus, confirmée en cours de descente par le suivi de l'activité électrophysiologique permettant de repérer l'emplacement des différentes couches cellulaires (détection de décharges multi-unitaires). Enfin, afin de vérifier que les effets sont bien dûs à la stimulation de l'innervation cholinergique, nous avons répété cette expérience chez des souris ayant reçu une injection de l'antagoniste muscarinique hydrochlorure de scopolamine (1mg/kg).

Protocole d'enregistrement

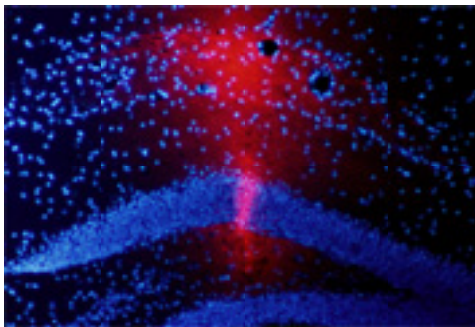
Une fois l'électrode d'enregistrement et la fibre optique en place, la souris est laissée en stabilisation durant 20 minutes. A l'issue de cette période de stabilisation, les enregistrements débutent par 300 secondes d'enregistrement du niveau de base (*baseline*) suivies d'une minute de stimulation et enfin de 300 secondes de récupération (*recovery*). Les stimulations optogénétiques des neurones cholinergiques ou de leurs terminaisons ont été produites par des *pulses* de lumière (480 nm de longueur d'onde ; 5ms de durée). Ces stimulations lumineuses ont été délivrées à 0,2 ; 5 et 20 Hz afin d'induire la libération de différentes quantités d'acétylcholine. Nous avons également procédé à une stimulation sensorielle (pincement de la queue), celle-ci étant connue pour induire des oscillations thêta spontanées. A l'issue de la séance d'enregistrement, les souris ont été mises à mort et ont subi une perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde à 4% afin de fixer les tissus cérébraux.

Protocole de stimulation des voies perforantes

Ce protocole reprend les principales étapes du protocole précédent. Cependant, en lieu et place de la stimulation des neurones cholinergiques, nous avons procédé à la stimulation des

Chirurgie et électrophysiologie

voies perforantes projetant sur l'hippocampe dorsal afin de déterminer les profils de courants associés à l'activation des entrées entorhinales (*CSD, current source density*). Dans ce protocole, la co-stimulation des afférences cholinergiques a été produite au moyen d'une optrode placée dans l'hippocampe dorsal, celle-ci permettant également d'enregistrer les réponses aux stimulations. Les stimulations électriques des voies perforantes ont été produites en suivant une gamme allant de 100 μ A à 1000 μ A d'amplitude (avec un pas de 100 μ A), à raison de 10 stimulations pour chaque intensité (une stimulation toutes les 15 secondes, chaque stimulation durant 1ms). Ce protocole de stimulation des voies perforantes nous a permis de déterminer les courbes d'entrée/sortie au niveau du DG afin de sélectionner une intensité de stimulation induisant 50% de réponse maximale.

Analyse des données

A l'issue des expériences, les animaux ont été mis à mort et les sites d'implantation ont été déterminés grâce à l'observation du marquage au DiI (ci-contre).

Ce marquage ainsi que les caractéristiques électrophysiologiques des enregistrements (position des couches cellulaires, inversion de phase à la fissure hippocampique) ont permis de déterminer l'emplacement de chacune des 16 électrodes (CA1 pyramidale, radiatum, lacunosum-moleculare, DG

moléculaire, granulaire, hile). Ceci nous a permis de procéder à des analyses spécifiques pour chacune des principales couches de CA1 et du DG. Les données électrophysiologiques ont été analysées avec le logiciel Matlab (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA) en utilisant principalement la bibliothèque de script Chronux.

Prétraitements : Les données brutes sont tout d'abord importées sur le logiciel Matlab. La dérive lente est ensuite atténuée si présente (fonction *Locdetrend*) et l'activité à 50Hz ainsi qu'à ses harmoniques est supprimée en utilisant un filtre dynamique (fonction *removline*). Enfin, les traces brutes sont filtrées selon 2 modalités différentes.

- entre 400 et 8000 Hz afin d'extraire les activités multi-unitaires.

- entre 0,1 et 500 Hz afin d'obtenir les activités de potentiels de champs locaux.

Les analyses sont ensuite effectuées en utilisant l'une ou l'autre des modalités.

Analyses spectrale : Les caractéristiques des activités oscillatoires ont été déterminées sur les enregistrements dénués d'artéfacts par des analyses spectrales du potentiel de champ local. Les analyses spectrales ont été effectuées en utilisant une méthode à pondération multiple de la transformée de Fourier (index de pondération de 4) avec une fenêtre glissante de 4 secondes et un pas de 1 seconde (fonction *specgramc*). La transformée de Fourier reposant sur la démonstration qu'un son complexe peut être réduit à une somme de composantes sinusoïdales formant un spectre de fréquences (à la manière d'un prisme décomposant la lumière en un spectre de couleurs). L'aire sous la courbe dans les différentes bandes de fréquences d'intérêt a ensuite été calculée : θ (3-10Hz), γ lent (20-60Hz), γ rapide (60-100Hz) et oscillations à haute fréquences (100-250Hz).

Analyse des bouffées d'activités : lors des enregistrements, nous avons détecté l'apparition rythmique de bouffées d'activité ressemblant aux *dentate-burts* décrit par Montgomery et collaborateurs en association avec le sommeil paradoxal (2008). Ces bouffées phasiques ont été détectées en utilisant un seuil à deux erreurs-standard sur la puissance allant de 1 à 250Hz, sur une fenêtre glissante de deux secondes et un pas d'une demi-seconde (*specgramc*). Afin de révéler la composante aberrante de ces bouffées, une détection à cinq erreurs-standard au-dessus de la moyenne de puissance a également été menée. L'anesthésie à l'uréthane

Chirurgie et électrophysiologie

produirait une alternance en des états similaires au sommeil lent profond caractérisé par une activité lente dominante et des états plutôt similaires au sommeil paradoxal caractérisé par une forte activité thêta (Pagliardini et al. 2013). Les bouffées phasiques du DG étant associées au sommeil paradoxal (Montgomery et al. 2008), nous avons donc porté nos analyses essentiellement sur des périodes associées avec une activité thêta prépondérante.

Nous avons ensuite analysé l'effet des stimulations optogénétiques sur ces activités oscillatoires en comparant 60 secondes de *baseline* avec 60 secondes de stimulation suivies de 60 secondes de récupération, le début de la stimulation étant précisément déterminé grâce à un signal TTL délivré par le système de stimulation.

III. Comportement

La répétition de tests comportementaux influence potentiellement le comportement des souris (McIlwain et al. 2001). Afin de limiter les perturbations comportementales, l'expérience de phénotypage comportemental après lésion entorhinale (publication n°2) a été menée en allant du test le moins invasif et le plus spontané (activité locomotrice) vers le test potentiellement le plus perturbant (restriction alimentaire pour le test de discrimination olfactive).

III.1. Mesure de l'activité locomotrice

Principe

Lorsque des souris sont placées dans un environnement nouveau, elles vont l'explorer en détail, ce qui va se traduire par une augmentation transitoire de l'activité locomotrice. Ensuite, l'activité locomotrice va progressivement diminuer ce qui traduit l'habituation au contexte nouveau. L'activité spontanée des souris est également régulée par le cycle circadien. Les souris étant des animaux nocturnes, elles seront donc plus actives durant les phases sombres du cycle circadien. Ces deux types d'activité locomotrice ont été mesurés chez nos souris, car la lésion du cortex entorhinal peut induire une hyperactivité locomotrice (Steward et al. 1977). De plus, les données locomotrices sont importantes, les effets de la lésion sur la locomotion pouvant interagir avec certaines mesures comportementales évaluant les fonctions cognitives, notamment dans le cadre de tâches de navigation spatiale (ex : latence d'arrivée à la cible).

Dispositif expérimental et protocole

L'activité locomotrice des animaux a été mesurée sur l'ensemble d'un cycle circadien dans une pièce expérimentale dédiée. Ces mesures ayant lieu dans des cages non connues de l'animal (42*25*15 cm), elles permettent d'évaluer l'habituation à la nouveauté (3 premières heures d'enregistrement), puis l'activité locomotrice basale en phase claire et en phase sombre (les 21 autres heures d'enregistrement). Le dispositif est constitué de deux faisceaux infrarouges espacés de 28 cm et traversant la cage 2,5 cm au-dessus du niveau du plancher de la cage. Les traversées des faisceaux par la souris à travers sa cage sont détectées et comptabilisées par des cellules photoélectriques raccordées à un ordinateur.

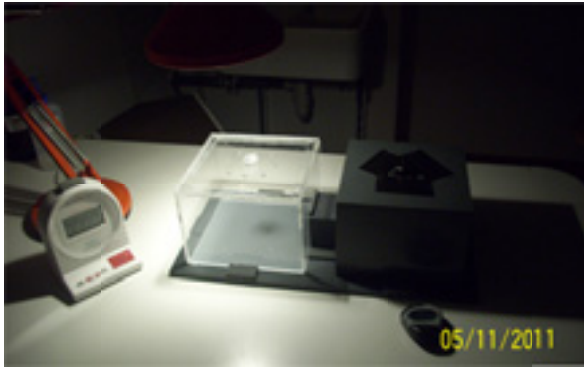
III.2. Evaluation de l'anxiété (test des boîtes claires et obscures)

Principe

L'anxiété est définie par un ensemble de réactions comportementales et neurovégétatives déclenchées par la présence d'une menace potentielle (Blanchard & Blanchard 1989). Les souris étant des animaux nocturnes, elles ont tendance à éviter les environnements fortement éclairés et ouverts qui sont anxiogènes pour aller se réfugier dans des environnements sombres et fermés (Belzung et al. 1989). Cependant, les souris sont également curieuses et promptes à explorer des environnements inconnus. Lors de la confrontation à un environnement nouveau, elles vont présenter un mélange de comportements d'approche traduisant la tendance à explorer et de comportements d'évitement traduisant l'anxiété (Montgomery 1955). Ainsi, dans un environnement comprenant une partie sombre et une

partie fortement éclairée, l'exploration de la partie éclairée va-t-elle dépendre de la balance entre curiosité et anxiété.

Dispositif expérimental



Le dispositif est constitué de deux cages de taille identique (19*19*14,5 cm) recouvertes d'un couvercle en plexiglas. Les souris peuvent se déplacer d'un environnement à l'autre *via* un couloir (7*5*10 cm). L'une des cages est maintenue à l'obscurité par des parois et un couvercle opaques, tandis que l'autre est constituée de parois et d'un couvercle transparents lui permettant d'être fortement éclairée (700 lux) par une lampe placée à 25 cm du couvercle.

Protocole de test

L'évaluation du niveau d'anxiété a lieu durant la phase nocturne aux alentours du pic d'activité spontanée (20h30-22h30). Les animaux sont introduits directement dans la boîte obscure et disposent alors de 5 minutes pour explorer librement le dispositif. Pour déterminer le niveau d'anxiété, on prend en compte le temps mis par la souris pour entrer dans la boîte claire ainsi que le temps passé dans celle-ci. Le nombre de transitions effectuées entre les deux boîtes serait quant à lui une mesure mixte reflétant à la fois le niveau d'anxiété et la curiosité de l'animal.

III.3. Reconnaissance d'objets et localisation d'objets

Dans un environnement familier, les rongeurs ont naturellement tendance à explorer préférentiellement les éléments nouveaux par rapport aux éléments stables et connus de l'environnement. Ainsi, les tâches de reconnaissance visent à évaluer les capacités des souris à détecter l'apparition d'un objet inconnu (reconnaissance d'objet) ou le déplacement d'un objet connu à une position nouvelle (localisation d'objet).

Comme indiqué dans l'introduction, ces formes de mémoire impliquent notamment les réseaux distribués dans les structures du lobe temporal médian (cortex périrhinal, postrhinal et entorhinal, ainsi que l'hippocampe). Les processus de reconnaissance d'objet dépendraient notamment de l'intégrité du cortex périrhinal, tandis que la localisation d'objet impliquerait fortement le cortex postrhinal, l'entorhinal (notamment latéral), le préfrontal médian et l'hippocampe.

Dispositif expérimental

Le dispositif est constitué d'un champ ouvert (*open field* ; 55*55*43 cm) en plexiglas opaque. Le plancher du dispositif est divisé en 25 carreaux identiques afin de placer facilement les objets à des places prédéfinies. Une carte plastifiée de 21*29,7 cm et comprenant un succession de bandes noir et blanches est fixée sur l'une des parois intérieures afin de servir de point de repère proximal. Ces tâches reposant sur des comportements spontanés des souris, l'éclairage est volontairement faible (60 lux) afin de minimiser la dimension aversive de la situation. Les objets utilisés dans ce test ont fait l'objet d'un paramétrage permettant la

sélection d'objets d'appétence similaire. A travers l'ensemble du protocole, les souris sont systématiquement déposés de la même manière au milieu du dispositif.

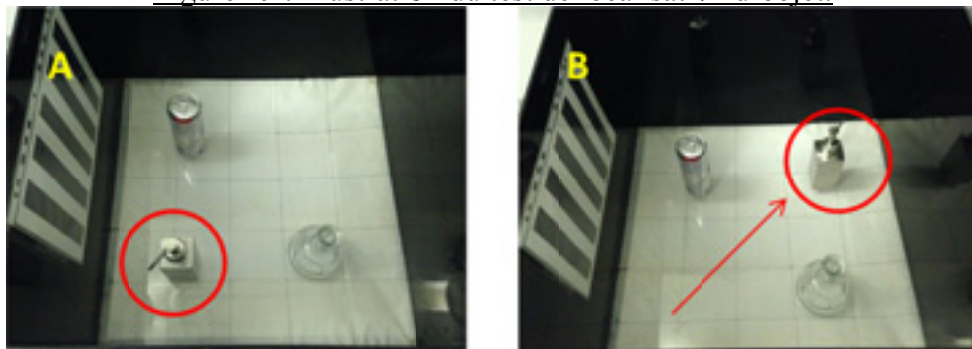
Habituation (Jours 1 et 2)

Durant cette phase, les souris vont se familiariser durant deux jours au dispositif de test ainsi qu'à la présence dans celui-ci de différents objets dans des configurations variables. Chaque jour, les souris vont ainsi explorer librement le dispositif durant 10 minutes.

Localisation d'objet (Jour 3)

Durant cette phase de test, on cherche à déterminer si la souris est capable de détecter parmi trois objets celui ayant été déplacé. Durant une première phase de 10 minutes, les souris explorent librement le dispositif comprenant une configuration de trois objets nouveaux (figure 29 A). Elles vont ainsi se forger une représentation de l'emplacement des objets dans l'environnement. L'animal est ensuite retiré du dispositif pendant 5 minutes, ce qui permet de nettoyer le champ ouvert à l'alcool à 70% afin de brouiller les indices olfactifs et les trois objets sont remplacés par des copies identiques propres, l'une étant placée dans une nouvelle position (l'objet déplacé ; figure 29 B). A l'issue des 5 minutes, la souris est replacée dans le dispositif et va pouvoir l'explorer librement pendant 10 minutes. Les temps d'exploration de chaque objet sont quantifiés. Ces temps d'exploration sont définis par un reniflement dirigé vers l'objet à une distance maximale d'un centimètre. Les comportements de mordillement des objets, d'escalade des objets ou le fait de frôler un objet ne sont pas pris en compte.

Figure 29 : illustration du test de localisation d'objet.



Reconnaissance d'objet (Jour 4)

Cette dernière phase a lieu le lendemain du test de localisation d'objet. Elle consiste à évaluer les capacités de reconnaissance des objets en remplaçant l'un des trois objets utilisés la veille durant la phase de localisation par un nouvel objet. Cette séance dure également 10 minutes au cours desquelles la souris explore librement le dispositif et les objets.

III.4. Piscine de Morris

Principe

Le test de la piscine de Morris est couramment utilisé pour évaluer la mémoire spatiale de référence¹ chez le rongeur (Morris et al. 1982). L'animal est placé dans un environnement

¹ La mémoire de référence spatiale est une forme de mémoire à long terme regroupant les règles et procédures générales propres à une situation ainsi que les informations quant au contexte de la situation.

rempli d'eau opaque sans échappatoire visible. Pour s'extraire de cette situation aversive, il va devoir trouver une plate-forme immergée sous la surface de l'eau. En répétant les essais avec une plate-forme restant au même endroit, l'animal va progressivement apprendre à localiser l'emplacement de cet échappatoire. Pour cela, il utilisera notamment les indices visuels distaux (stratégie spatiale allocentrique), aucun indice proximal intra-dispositif ne permettant de retrouver la position de la plate-forme. Les capacités de localisation de la plate-forme vont être évaluées en fin d'apprentissage par un test de rétention durant lequel aucune plateforme n'est présente dans la piscine. Ainsi, les animaux se souvenant de l'emplacement de la plateforme focaliseront leur recherche aux environs de l'emplacement précédemment occupé par la plateforme.

Dispositif expérimental



Le dispositif est constitué d'une piscine de 140cm de diamètre et de 40cm de haut. Elle est remplie sur 20 cm par de d'eau opacifiée avec du lait en poudre (sur l'image ci-contre, le dispositif est vide afin de voir la plate-forme). La température de l'eau ($20\pm 1^\circ\text{C}$) induit une aversion pour le dispositif qui permet d'éviter les comportements de flottement passif observés chez les souris de souche C57BL/6J. La pièce expérimentale contient divers indices distaux (chauffe-eau, portoir à cages, formes contrastées sur le mur, radio). La plateforme est circulaire, mesure 10 cm de diamètre et est immergée à 1 cm sous le niveau de l'eau pour la rendre invisible à la souris. La trajectoire de la souris est enregistrée et analysée grâce à un système de vidéo-tracking (Ethovision 2.3, Noldus Information Technology, Wageningen, Pays-Bas). Les principales variables prises en compte sont la latence d'arrivée à la

plate-forme, la distance parcourue ainsi que le temps passé dans les différentes zones d'intérêt de la piscine.

Protocole de mémoire de référence

Les souris sont placées dans la pièce 30 minutes avant le début de chaque séance afin qu'elles s'habituent au contexte. Le premier jour, les souris sont habituées pendant une minute au dispositif qui n'est alors rempli que de 3,5 cm d'eau avec une plateforme visible positionnée à quelques centimètres du bord pour que les souris apprennent à s'extraire de l'eau. Le deuxième jour, les souris explorent librement le dispositif rempli d'eau, mais sans plateforme pendant 2 minutes. Le troisième jour, les souris débutent la phase d'acquisition qui s'étend sur 5 jours, à raison de 4 essais par jour espacés de 5 minutes. Au fur et à mesure des essais, les souris apprennent à retrouver la plateforme immergée à une position fixe dans la piscine. Afin de réduire le développement de stratégies égocentriques, les points de départ des animaux varient pseudo-aléatoirement d'un essai à l'autre. Les essais durent 60 secondes. Si la souris ne trouve pas la plateforme à l'issue de cette minute, elle est délicatement guidée jusqu'à celle-ci et y reste 10 secondes avant d'être retirée du dispositif. Vingt-quatre heures après la dernière séance d'acquisition, les performances de mémoire spatiales sont évaluées durant un test de rétention de 60 secondes sans plateforme. Le temps passé dans le quadrant

cible (là où se trouvait la plate-forme durant l'apprentissage) est alors comparé au temps passé dans les 3 autres quadrants.

Protocole avec plate-forme visible

Cette tâche permet de contrôler les capacités sensori-motrices et la motivation des souris pour échapper à la piscine. En effet, au cours de cette séance de test, la plate-forme est visible (1 cm au-dessus de l'eau) et sa position change à chacun des 4 essais.

III.5. Labyrinthe de Barnes

Principe



Le test du labyrinthe de Barnes a été développé par Carol A Barnes pour évaluer l'apprentissage et la mémoire spatiale chez le Rat âgé (Barnes 1979). L'animal est placé sur une vaste plate-forme circulaire ouverte, surélevée et fortement éclairée. Pour s'extraire à cette situation aversive, l'animal va devoir trouver, parmi les trous percés dans la périphérie du dispositif, lequel va lui permettre d'aller se réfugier dans sa cage. En répétant les essais, l'animal va progressivement apprendre à localiser de plus en plus efficacement l'emplacement du trou qui mène à sa cage, notamment en utilisant les indices distaux comme pour la piscine de Morris. La mémoire de référence s'évalue ainsi généralement à l'issue de plusieurs jours d'apprentissage (1 à 3 essais par jour) au cours d'un test de rétention durant lequel aucun trou ne permet de fuir le dispositif. Un animal capable de localiser

l'emplacement du trou qui menait à sa cage aux essais précédents va alors focaliser sa recherche sur celui-ci et sur les trous avoisinants (stratégie de recherche allocentrique).

Contrairement aux rats sauvages qui ont évolué en milieu marécageux, les souris proviennent de milieu semi-aride. Ainsi, comparativement à la piscine de Morris, le labyrinthe de Barnes serait plus adapté à la physiologie de la Souris. En effet, il s'avère que si les souris ont généralement des performances inférieures à celles du rat en piscine de Morris, elles ont des performances équivalentes dans les paradigmes d'évaluation en milieu sec (Whishaw & Tomie 1996).

Dispositif expérimental

Le labyrinthe de Barnes que nous avons utilisé est constitué d'une plate-forme circulaire (1 m de diamètre) percée de 12 trous (4 cm de diamètre) situés sur la circonférence du dispositif (à 9 cm du bord). La plate-forme est surélevée à 65 cm de hauteur et placée sur un socle rotatif permettant de la tourner facilement. Un tube flexible relie l'un des 12 trous à la cage d'élevage de la souris, cette cage étant placée centralement sous la plate-forme. La pièce comporte divers indices distaux (étagère, armoires, formes sur les murs, meubles, radio).

L'aversion induite par le dispositif (une plate-forme ouverte, surélevée et éclairée à hauteur de 800 lux au centre du dispositif) sert de motivation pour quitter le dispositif. La trajectoire des souris est enregistrée et analysée grâce à un système de vidéo-tracking ANY-maze (Stoelting ANY-maze 4.30 ; Ugo Basile, Gemonio, Italy). Les principales variables prises en compte sont la latence d'arrivée à la plate-forme, la distance parcourue ainsi que le temps passé dans les différentes zones d'intérêt de labyrinthe.

Acquisition

Durant les trois jours précédant le début de l'acquisition, les souris sont familiarisées avec le tube flexible à raison de 3 essais par jour. Elles apprennent ainsi que le tube leur permet d'aller directement se réfugier dans leur cage d'élevage. La phase d'apprentissage débute le lendemain et court sur 5 jours, à raison de 3 essais par jour espacés d'environ 15 minutes. La cage est alors connectée *via* le tube flexible à un des trous de la plate-forme (le trou cible) dont la position est stable tout au long du protocole. Si la position du trou cible reste la même, ce n'est jamais systématiquement le même trou qui fait office de trou cible, le dispositif étant tourné selon un plan pseudo-aléatoire entre chaque essai. De plus, entre chaque essai, la plate-forme est essuyée avec un chiffon imbibé d'alcool à 70% de manière à brouiller les éventuels indices olfactifs intra-dispositif. Au début d'un essai, la souris est placée dans un cylindre de départ opaque au milieu du dispositif. Après une dizaine de secondes, le cylindre est retiré et la souris dispose alors de 3 minutes pour trouver le trou cible et aller se réfugier dans sa cage. Si la souris ne trouve pas le trou cible à la fin des 3 minutes, elle y est délicatement guidée. A chaque essai, on relève la latence de visite et d'entrée dans le trou cible ainsi que l'ordre des visites, permettant ainsi de calculer le nombre d'erreurs effectuées par la souris (visites à des trous n'étant pas le trou cible). De plus la trajectoire de l'animal suivit par le logiciel de vidéo-tracking permet de mesurer la distance parcourue, le temps passé dans les différents quadrants, la vitesse et la durée d'immobilité de l'animal.

Test de rétention

Pour évaluer les performances de mémoire spatiale de référence, un test de rétention est réalisé le lendemain de la dernière séance d'apprentissage. La souris explore alors librement la plate-forme pendant 2 minutes, sans qu'aucun trou ne soit relié à la cage d'élevage. Pendant cet essai, l'ordre de visite des trous, la latence pour atteindre le trou cible ainsi que la distance parcourue dans chacun des quadrants sont relevés. Une souris se rappelant de l'emplacement du trou-cible le visitera plus que les autres trous et explorera plus le quadrant contenant ce trou-cible que les trois autres quadrants.

IV. Histologie

IV.1. Mise à mort et traitement des tissus

A l'issue de la phase comportementale des expériences, les animaux destinés aux mesures histologiques reçoivent une injection ip de pentobarbital sodique à une dose létale (365 mg/kg). Après disparition de tout réflexe au pincement de la queue et de la patte, les souris reçoivent une perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde (PAF) à 4% (tampon phosphate 0,1M ; pH 7,4 ; 4°C) durant 7 minutes afin de fixer le cerveau. Après extraction de l'encéphale, celui-ci est post-fixé dans la même solution de PAF durant 4 heures. La cryoprotection des cerveaux va alors se faire en immergeant les cerveaux pendant 48 h dans une solution de sucrose à 20% (tampon phosphate 0,1M ; pH 7,4 ; 4°C). Les cerveaux sont ensuite congelés dans de l'isopentane à - 40°C avant d'être stockés dans un congélateur à - 80°C. Afin de procéder aux divers marquages histologiques, les cerveaux sont coupés à l'aide d'un microtome placé dans un cryostat à -20°C. Les coupes destinées à être montées sur lames font 20 µm d'épaisseur ([publication n°3](#)) tandis que celles destinées aux marquages immunohistologiques en puits font 40 µm d'épaisseur ([publication n°2](#)). Les coupes montées sur lames gélatinées sont congelées à -20°C, tandis que les coupes stockées en puits baignent dans un milieu cryoprotectant (30% de glycérol, 30% d'éthylenglycol et 40% de tampon phosphate) et également placées à -20°C.

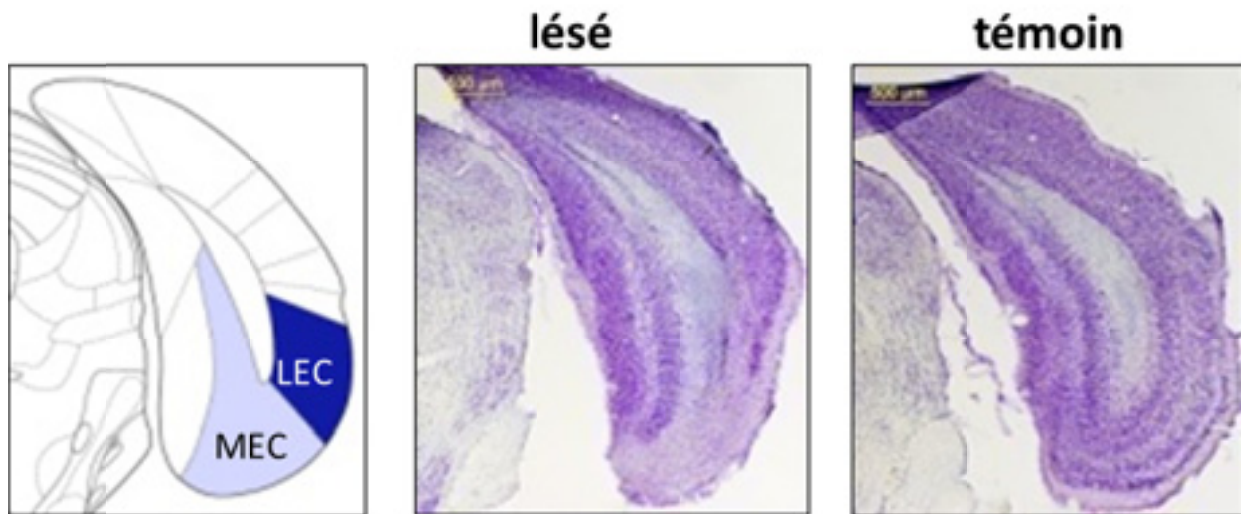
IV.2. Mesure de l'étendue des lésions

L'étendue des lésions entorhinales a été mesurée sur des coupes colorées au violet de crésyl ([Figure 30](#)). Cette coloration révèle notamment les corps de Nissl et colore ainsi intensément les noyaux cellulaires et corps cellulaires, révélant par là-même l'organisation du tissu. Ainsi, le cortex entorhinal prend normalement l'apparence d'une structure organisée en quatre couches cellulaires. Après lésion, cette organisation en couches est abolie et la majorité des grosses particules (principalement des noyaux neuronaux) est remplacée par des petites particules diffuses traduisant la présence de débris cellulaires et de cellules gliales réactives.

Après trois rinçages à l'eau distillée, les coupes baignent 5 minutes dans du violet de crésyl chauffé à 50°C. Les coupes sont ensuite rincées dans de l'eau distillée, puis subissent une différenciation dans une solution d'alcool-acide. Elles sont enfin déshydratées dans des bains d'alcool de concentrations croissantes avant d'être montées sous lamelle dans un milieu d'inclusion (Eukitt) permettant leur observation au microscope optique.

Après prise d'image au microscope (Olympus Vanox AHB3; camera, Olympus DP70; objective, Olympus DPlan x4), le pourcentage de lésion est déterminé en mesurant avec le logiciel Image J (*Image Processing and Analysis in Java*, National Institutes of Health) le rapport entre la partie lésée et la partie intacte du cortex entorhinal sur 20 niveaux dorso-ventraux successifs allant de -2,04mm à -5,04mm sous le point Bregma. Ces pourcentages de lésion ont été déterminés spécifiquement pour le cortex entorhinal médian et le cortex entorhinal latéral. Les animaux sans lésion significative, avec des lésions unilatérales ou s'étendant dans les structures adjacentes (généralement le subiculum, le cortex périrhinal et le cortex postrhinal) ont été exclus des analyses statistiques.

Figure 30 : exemple de coloration au violet de crésyl.



IV.3. Révélation de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE).

La révélation de l'activité de l'AChE (l'enzyme de dégradation de l'acétylcholine), est classiquement utilisée pour mesurer les réorganisations cholinergiques hippocampiques après lésion entorhinale, l'AChE étant majoritairement exprimée au niveau des terminaisons synaptiques des neurones cholinergiques (Lynch & Cotman 1972). Dans une première étape d'incubation, les coupes montées sur lame sont rincées à l'eau distillée, puis incubées pendant 18 h dans une solution mère chauffée à 37°C. Cette solution d'incubation est composée de glycine, de sulfate de cuivre (CuSO₄, 5 H₂O), d'acétate de sodium, d'iso-ompa (inhibiteur des cholinestérases non spécifiques telle que la BChE) et enfin de l'acétylthiocholine iodique, un substrat pour l'AChE. Durant la seconde étape de révélation, le produit de dégradation de l'activité enzymatique de l'AChE est révélé par un bain de sulfure de sodium (8mM) générant une coloration brune qui est fonction de l'activité de l'enzyme. Pour finir, les coupes subissent des bains d'alcool de concentration croissante avant d'être montées sous lamelle dans un milieu d'inclusion (Eukitt).

L'évaluation de l'activité de l'AChE est faite par mesure de densité optique (Image J) sur des photos de coupes prises au microscope au grossissement x4 (Olympus Vanox AHB3; camera, Olympus DP70; objective, Olympus DPlan x4). La densité optique (DO) est mesurée dans les mêmes 16 régions d'intérêt que celles choisies pour les analyses de densité d'innervation glutamatergique et cholinergique (Figure 31 ; tableau 11). La densité a été calculée à partir de trois mesures (prises dans des cadres de 10*10µm de côté) par coupe et par région d'intérêt, le tout répété sur trois coupes espacées de 140 µm. Ces mesures sont ensuite moyennées par région d'intérêt et la moyenne des valeurs de références prises au niveau du corps calleux est soustraite au signal. En effet, le corps calleux ne contenant pas d'AChE, la densité de marquage de cette zone sert de valeur contrôle (marquage non-spécifique) soustraite aux mesures prises dans les couches d'intérêt.

Cependant, l'AChE pouvant être exprimée dans des tissus non-cholinergiques au cours du développement, elle pourrait ne pas être un marqueur cholinergique suffisamment spécifique (Aubert et al. 1994). Nous avons donc décidé d'utiliser essentiellement le marquage immunohistochimique des vésicules de transport de l'acétylcholine pour déterminer avec une plus grande spécificité l'étendue des réorganisations synaptiques cholinergiques déclenchées par les lésions entorhinales.

IV.4. Marquages immunohistochimiques

Afin d'étudier les réorganisations synaptiques, nous avons utilisé principalement deux marqueurs des vésicules présynaptiques (Figure 31): VAcHT (terminaisons cholinergiques) et VGLUT1 (transporteur vésiculaire 1 du glutamate ; terminaisons glutamatergiques). Le VGLUT1 a été sélectionné car il permettrait de marquer spécifiquement les terminaisons des neurones principaux corticaux et hippocampiques (Freneau et al. 2004) et non les terminaisons des interneurons hippocampiques (VGLUT3) ou les afférences sous-corticales (VGLUT2).

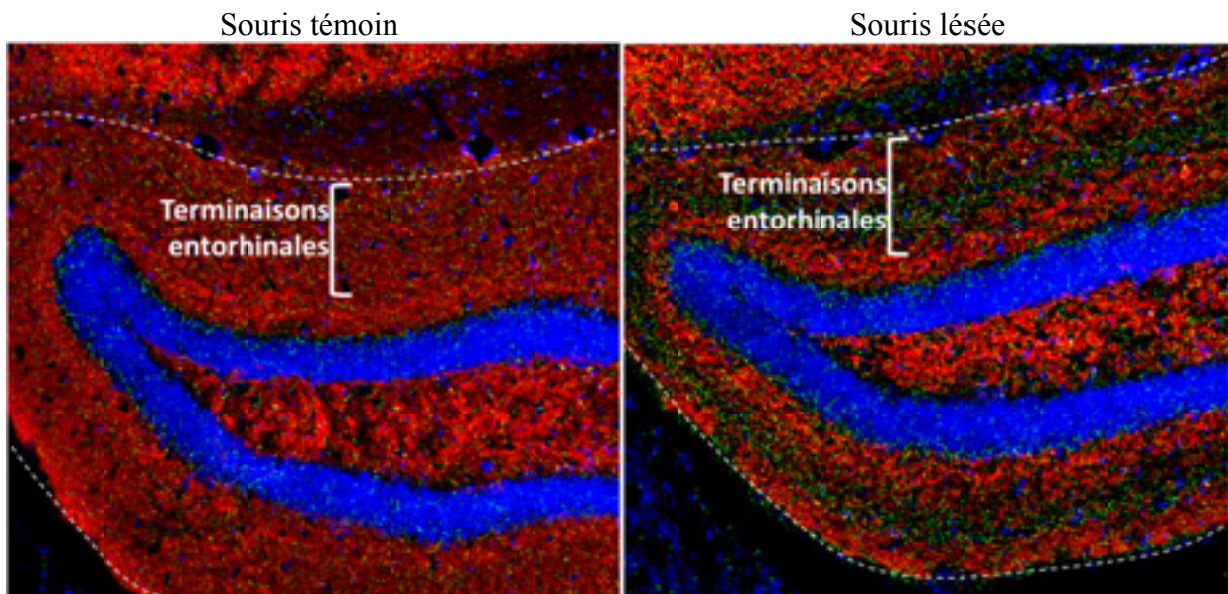
Les lames avec les coupes destinées aux marquages immunohistochimiques sont rincées trois fois pendant 10 minutes dans du PBS de manière à éliminer les poussières et réhydrater les coupes. Les lames sont ensuite incubées pendant 30 minutes à 80°C dans une solution de citrate de sodium (1,29g dilué dans 500mL d'eau ultra-pure ; pH 7,4). Cette incubation permet de dissoudre les ponts de paraformaldéhyde qui pourraient masquer les antigènes d'intérêt. Ensuite, les lames sont incubées pendant 2 h dans du sérum d'âne (Biowest, Nuaille, France), dilué à 10% dans du PBS afin de bloquer les sites non-spécifiques. Les lames sont ensuite incubées à température ambiante pendant 18 h avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS contenant 2% de sérum d'âne (tableau 10).

Tableau 10 : Principaux anticorps utilisés dans le cadre de cette thèse :

Antigènes	Espèce hôte	Dilution	Fournisseur
VAcHT	Lapin (Polyclonal)	1/1000	Synaptic System, Göttingen, Germany ; Ref : 139 103
VGLuT1	Cochon d'Inde (polyclonal)	1/1000	Synaptic System, Göttingen, Germany ; Ref : 135 304
Synaptophysine	Souris (Monoclonal)	1/500	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA ; Ref : 5768
Lapin	âne	1/1000	Life technologies Molecular Probe, St Aubin, France ; Ref : Alexa Fluor 555, A-31572
Cochon d'Inde	chèvre	1/1000	Life technologies Molecular Probe, St Aubin, France ; Ref : Alexa Fluor 488, A-11073
Souris	âne	1/1000	Life technologies Molecular Probe, St Aubin, France ; Ref : Alexa Fluor 488, A-21202

Après l'incubation avec l'anticorps primaire, les coupes sont rincées trois fois pendant 10 minutes dans du PBS de manière à éliminer l'excédent d'anticorps primaire. Les coupes sont alors incubées pendant 2h dans une solution contenant l'anticorps secondaire dirigé contre l'espèce de l'anticorps primaire. Enfin, les coupes sont rincées trois fois pendant 10 minutes dans du PBS de manière à éliminer l'excédent d'anticorps secondaire, puis elles sont montées dans un milieu d'inclusion contenant du Dapi afin de marquer les couches cellulaires allant servir de repère pour la prise d'image (Dapi Fluoromount-G ; Southern Biotech ; Birmingham, AL, USA).

Figure 30 : exemple de marquage VGLUT1 et VACHT.



Exemple typique du marquage immunohistochimique obtenu au niveau du gyrus denté de l'hippocampe (DG, délimité en pointillés blancs) avec le marquage des protéines VGLUT1 (rouge) et VACHT (vert) ainsi qu'avec un contre-marquage au Dapi (bleu). Le marquage Dapi permet de révéler les noyaux cellulaires et ainsi révèle l'organisation caractéristique de la couche principale du gyrus denté. On observe chez l'animal lésé une perte partielle de la densité de terminaisons VGLUT1-positives qui est associée avec l'augmentation de la densité de terminaisons VACHT-positives.

Prise d'image

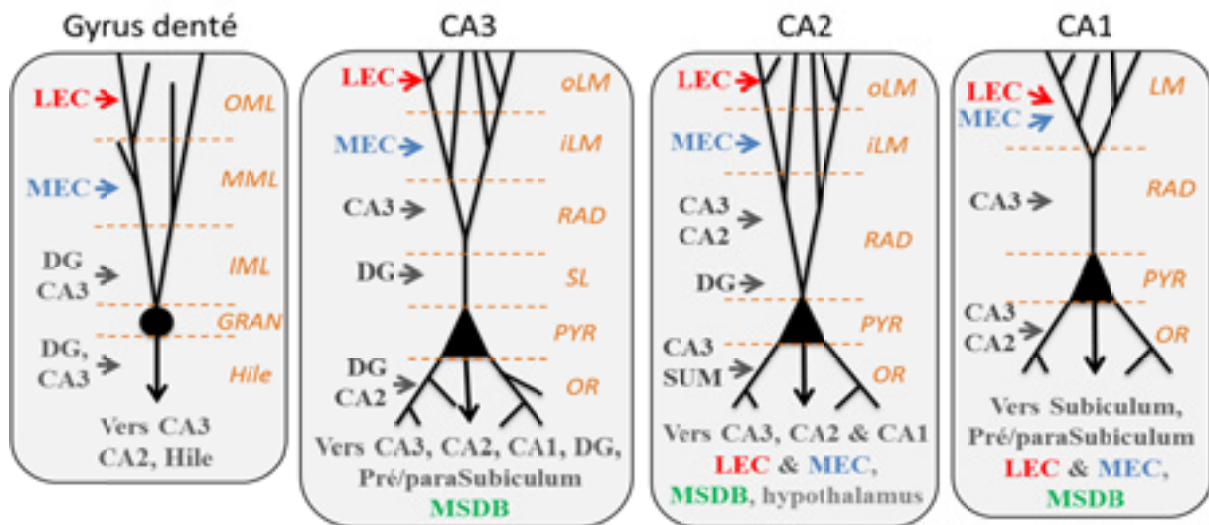
Les images destinées aux quantifications de VACHT et VGLUT1 ont été prises avec un microscope droit de marque Zeiss doté d'une plate-forme motorisée (Axio Imager 2 ; Carl Zeiss SAS, Le Pecq, France ; caméra StradView HDW-CAM-1368), le tout au grossissement x40. Les images ont été prises pour chacune des régions d'intérêt (Figure 32 ; Tableau 11). Seul l'hippocampe dorsal a été quantifié, nos lésions entorhinales induisant spécifiquement des troubles de cognition spatiale. L'ensemble des paramètres de prise d'image (intensité de la source lumineuse, gain, ambiance lumineuse dans la pièce) a été maintenu constant pour toutes les prises d'image d'un marquage donnée.

Quantification de la densité d'innervation cholinergique (VACHT)

Les quantifications de la densité de l'innervation cholinergique ont été menées avec le logiciel Image J sur les images après soustraction du bruit de fond suivi d'un seuillage automatisé. La densité de marquage VACHT traduisant la présence de fibres et terminaisons cholinergiques a alors été mesurée en termes de pourcentage de l'aire couverte par le marquage après seuillage, à raison de trois mesures prises sur quatre coupes espacées de 120 μ m par région d'intérêt. Ces mesures sont ensuite été moyennées par région d'intérêt et par hémisphère avant d'être exprimées en terme d'indice de la densité chez les souris contrôles respectives (par délai,

génotype et sexe) afin d'extraire spécifiquement la composante liée aux réorganisations synaptiques des effets induits par l'âge, le sexe ou le génotype.

Figure 32 : Principales régions d'intérêt étudiées dans le cadre de cette thèse



Les réorganisations synaptiques ont été quantifiées dans les couches synaptiques des quatre sous-régions hippocampiques (DG, CA3, CA2, CA1). Les flèches noires partant des corps cellulaires matérialisent les principales cibles des projections sortant de chaque région (celles-ci sont détaillées sous chaque schéma). Dans chaque insert apparaît à droite le nom des couches qui ont été quantifiées (orange), cependant les couches granulaires et pyramidales n'ont pas été incluses dans les analyses. Ainsi, les quantifications ont été menées dans 16 régions d'intérêt. Dans chaque insert apparaissent à gauche les zones d'origine des principales entrées excitatrices : CEL, cortex entorhinal latéral ; CEM, cortex entorhinal médian ; DG, gyrus denté ; OML, couche moléculaire externe ; MML, couche moléculaire médiane ; IML, couche moléculaire interne ; Hile ; oLM, Stratum Lacunosum-moleculare externe ; iLM, Lacunosum-moleculare externe ; RAD, stratum radiatum ; SL, stratum lucidum ; OR, stratum oriens ; LM, Lacunosum-moleculare.

Quantification de la densité d'innervation glutamatergique principale (VGLUT1)

La densité d'innervation glutamatergique dans chacune des régions d'intérêt a été estimée par le logiciel ImageJ avec la même stratégie d'échantillonnage que pour les densités cholinergiques (cadre de mesure de $10 \times 10 \mu\text{m}$, trois mesures par coupe sur 4 coupes). Cependant, le marquage glutamatergique étant beaucoup plus dense que le marquage cholinergique, la densité d'innervation glutamatergique a été mesurée en termes d'intensité d'immunofluorescence émise après soustraction du signal mesuré au niveau du corps calleux. Comme pour les densités cholinergiques, les mesures ont ensuite été moyennées par hémisphère et exprimées en termes d'indice de densité chez les souris témoins respectives. L'avantage du marquage VGLUT1, comparativement au marquage synaptophysine, est qu'il permet de cibler uniquement des synapses glutamatergiques des neurones principaux, permettant ainsi de poser des hypothèses sur l'origine des terminaisons (Tableau 11). En effet, les réseaux de la formation hippocampique sont relativement bien décrits et VGLUT1 serait spécifiquement exprimé dans les terminaisons en provenance des neurones principaux corticaux et hippocampiques (Fremeau et al. 2004). Ainsi, les résultats ne devraient pas traduire de réorganisation d'entrées sous-corticales (plutôt VGLUT2-positives) ou d'autres phénotypes neurochimiques (non-glutamatergiques).

Tableau 11 : Régions d'intérêt pour la mesure des réorganisations synaptiques

Région	Région d'intérêt	Origine principale des terminaisons VGLUT1+
Gyrus denté	Hile	Collatérales des fibres moussues > projections en retour de CA3
	IML (moléculaire interne)	Terminaisons commissurales & associatives (cellules moussues)
	MML (moléculaire médiane)	Voies perforantes médianes (entorhinal médian ; couche II)
	OML (moléculaire externe)	Voies perforantes latérales (entorhinal latéral ; couche II)
CA3	OR (<i>Stratum oriens</i>)	Terminaisons des fibres moussues, projections en retour de CA2
	SL (<i>Stratum lucidum</i>)	Terminaisons des fibres moussues
	RAD (<i>Stratum radiatum</i>)	Terminaisons récurrentes (cellules pyramidales de CA3)
	iLM (<i>lacunosum moleculare-interne</i>)	Voies perforantes médianes (entorhinal médian ; couche II)
	oLM (<i>lacunosum moleculare-externe</i>)	Voies perforantes latérales (entorhinal latéral ; couche II)
CA2	OR (<i>Stratum oriens</i>)	Collatérales de Schaeffer (cellules pyramidales de CA3) et récurrentes de CA2
	RAD (<i>Stratum radiatum</i>)	Collatérales de Schaeffer (cellules pyramidales de CA3) et récurrentes de CA2
	iLM (<i>lacunosum moleculare-interne</i>)	Voies perforantes médianes (entorhinal médian ; couche II)
	oLM (<i>lacunosum moleculare-externe</i>)	Voies perforantes latérales (entorhinal latéral ; couche II)
CA1	OR (<i>Stratum oriens</i>)	Projections des cellules pyramidales de CA2>CA3
	RAD (<i>Stratum radiatum</i>)	Collatérales de Schaeffer (cellules pyramidales de CA3)
	LM (<i>Stratum lacunosum moleculare</i>)	Terminaisons des voies temporo-ammoniques (cortex entorhinal latéral et médian ; couche III)

Contributions expérimentales

Etude n°1

L'effet cognitif pléiotropique antagoniste de l'*APOE4* Est-il présent chez la Souris transgénique ?

Cette première étude visait à évaluer si l'allèle *APOE4* induit un effet cognitif bénéfique chez de jeunes souris. Pour ce faire, nous avons évalué les performances de souris transgéniques âgées de 3 mois dans une tâche de navigation spatiale (piscine de Morris). Ce travail a fait l'objet d'une publication où j'apparais en tant que co-premier auteur, cette étude ayant été menées en collaboration avec Pierre-Henri Moreau, un étudiant qui finissait alors sa thèse au laboratoire sous la direction de Chantal Mathis.

L'effet cognitif pléiotropique antagoniste de l'*APOE4* Est-il présent chez la Souris transgénique ?

Contexte scientifique

Chez l'homme, la présence de l'allèle *APOE4* est souvent associée au développement de déficits cognitifs, notamment en mémoire épisodique (Liu et al. 2010), ainsi qu'en reconnaissance d'objets et en navigation spatiale (Berteau-Pavy et al. 2007). Cependant, il a également été suggéré qu'en début de vie, l'*APOE4* exercerait plutôt une influence positive sur le développement cognitif durant la petite enfance (Oria et al. 2005). De plus, l'*APOE4* resterait associé à de meilleures performances cognitives jusqu'au stade de jeune adulte d'une vingtaine d'années (Puttonen et al. 2003 ; Mondadori et al. 2007). Ainsi, ce ne serait qu'avec le vieillissement que l'*APOE4* deviendrait détrimentaire, notamment parce que cet allèle favorise le développement de pathologies neurodégénératives telles que les DTA (Praetorius et al. 2013 ; Foster et al. 2013). Le maintien d'un allèle par la sélection naturelle en raison d'un effet positif en début de vie malgré une influence négative sur le vieillissement a été conceptualisé en tant qu'effet « pléiotropique antagoniste » par le biologiste George C. Williams (1957). Cependant, de par la variabilité inhérente aux études menées chez l'Homme, cet effet facilitateur de l'*APOE4* sur la cognition chez l'individu jeune reste discuté (Ihle et al. 2012). Or, une meilleure compréhension des effets cognitifs complexes de l'*APOE4* au cours de la vie permettrait de mieux cerner l'influence de cet allèle.

La Souris transgénique exprimant l'*APOE4* humaine représente une alternative pour évaluer les effets cognitifs de l'*APOE4* en fonction de l'âge. Au moment où débutait cette thèse, les études menées chez la Souris transgénique jeune adulte étaient plutôt rares et concluaient généralement à une absence d'effets cognitifs marqués (Raber et al. 1998 ; Grootendorst et al. 2004 ; Belinson et al. 2008). En effet, l'essentiel des études sur les souris *APOE4* se

L'effet pléiotropique antagoniste de l'*APOE4*

focalisaient sur l'étude des effets délétères de l'*APOE4* chez des souris adultes de 6-8 mois ou d'âge « moyen » plus avancé (*middle-aged* ; 11-16 mois). Si on met de côté les études portant sur des modèles n'exprimant pas l'*APOE* de manière physiologique (Raber et al. 2000 ; Hartman et al. 2001 ; Van Meer et al. 2007), il apparaît que l'*APOE4* induit chez la Souris des déficits modérés dès 4-5 mois en localisation d'objet, notamment chez les femelles (Grootendorst et al. 2004) qui s'étendent vers 16 mois à la mémoire de référence spatiale et la mémoire de travail (Bour et al. 2008). Ainsi, au moment où ce travail débutait, aucune étude n'avait vraiment évalué la possibilité d'un effet pléiotropique antagoniste sur la cognition chez la Souris jeune. Or, les ApoE humaines induiraient une partie de leurs effets *via* leurs interactions avec le métabolisme de l'APP. L'holoprotéine de l'APP tout comme ses fragments bioactifs jouent de nombreux rôles dans la synaptogénèse, la plasticité synaptique et la neuroprotection (Chasseigneaux & Allinquant 2012). Il est donc possible que les effets cognitifs de l'*APOE4* soient également influencés par le niveau d'expression de l'APP. Il est également envisageable que les effets de l'*APOE4* nécessitent des interactions protéines/protéines avec l'APP qui pourrait se produire de manière optimale qu'en présence des isoformes humains des deux protéines.

Objectif de l'étude

Pour déterminer si l'effet facilitateur de l'*APOE4* sur la cognition existe chez l'animal jeune, nous avons donc étudié un modèle de souris transgéniques *hAPP/APOE* (Kornecook et al. 2009). En effet, dans cette lignée, les souris expriment soit l'ApoE3 soit l'ApoE4 humaines à la place de l'ApoE murine, et, en plus de l'APP murine, elles expriment une copie supplémentaire d'APP humaine normale (sans mutations liées à Alzheimer). Le même type de déficit lié à l'âge ayant été décrit chez la souris *hAPP/APOE* (Kornecook et al. 2009), ce modèle représentait potentiellement un intérêt pour l'évaluation des effets cognitifs de l'*APOE4*. Chez l'homme, les effets négatifs de l'*APOE4* au cours du vieillissement étant spécifiques à certaines fonctions cognitives, notamment à la mémoire épisodique (Liu et al. 2010) et particulièrement à la navigation spatiale (Berteau-Pavy et al. 2007). Nous avons donc cherché à mesurer l'influence de l'*APOE4* sur les performances de navigation spatiale chez l'animal jeune adulte (3 mois) afin de déterminer si les fonctions négativement influencées avec le vieillissement sont positivement modulées en début de vie.

Publication n°1

Moreau P-H*, **Bott J-B***, Zerbinatti C., Renger JJ., Kelche C., Cassel J-C., Mathis C.

*contribution égale (*equal contributor*)

**ApoE4 confers better spatial memory than apoE3
in young adult hAPP-Yak/ApoE-TR mice.**

Behav. Brain. Res. (2013), 243 :1-5.



Short Communication

ApoE4 confers better spatial memory than apoE3 in young adult hAPP-Yac/apoE-TR mice

Pierre-Henri Moreau^{a,1}, Jean-Bastien Bott^{a,1}, Celina Zerbinatti^b, John Joseph Renger^b, Christian Kelche^a, Jean-Christophe Cassel^a, Chantal Mathis^{a,*}

^a Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives, UMR 7237 CNRS, Université de Strasbourg, IFR 37, GDR CNRS 2905, 12 rue Goethe, F-67000 Strasbourg, France

^b Merck Sharp & Dohme Corp., Department of Neurodegenerative Disorders, 770 Sunningtown Pike, West Point, PA 19486, USA

HIGHLIGHTS

- ▶ Young hAPP-Yac/ApoE4-TR mice outperform hAPP-Yac/ApoE3-TR mice on spatial learning.
- ▶ Young hAPP-Yac/ApoE4-TR mice outperform hAPP-Yac/ApoE3-TR mice on spatial memory.
- ▶ No difference between both mouse lines in the non-spatial version of the task.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 November 2012

Received in revised form

21 December 2012

Accepted 24 December 2012

Available online 3 January 2013

Keywords:

Antagonist pleiotropic effect

Apolipoprotein E

Cognition

ABSTRACT

The APOE-ε4 allele is associated with increased cognitive decline during normal aging and Alzheimer's disease. However, several studies intriguingly found a beneficial effect on cognition in young adult human APOE-ε4 carriers. Here, we show that 3-month old bigenic hAPP-Yac/apoE4-TR mice outperformed their hAPP-Yac/apoE3-TR counterparts on learning and memory performances in the highly hippocampus-dependent, hidden-platform version of the Morris water maze task. The two mouse lines did not differ in a non-spatial visible-platform version of the task. This hAPP-Yac/apoE-TR model may thus provide a useful tool to study the mechanisms involved in the antagonistic pleiotropic effects of APOE-ε4 on cognitive functions.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

Apolipoprotein E (apoE) is a lipid-binding protein involved in neurodevelopment, neuroplasticity and repair processes in the brain. The most common human isoforms, apoE2, apoE3 and apoE4, are encoded by the APOE-ε2, APOE-ε3 and APOE-ε4 gene alleles; APOE-ε3 is the most frequent and APOE-ε2 the rarest. APOE-ε4 has been associated with higher rates of cognitive decline during normal aging [1,2] and with aggravating incidence in the context of several neurological disorders, including Alzheimer's disease. Intriguingly, several studies reported higher performances on global cognition, attention and episodic memory in young adult APOE-ε4 carriers compared to non-APOE-ε4 carriers [3–6]. Better cognitive functions with APOE-ε4 during the first decades of life followed by a negative influence after the fifth decade was interpreted as an antagonistic pleiotropic effect [6]. Antagonist

pleiotropy refers here to an age-dependent shift from positive to negative effects of a gene allele involved in complex traits. However, the beneficial effect of APOE-ε4 on cognitive performances at younger ages is still a matter of debate, most probably because of confounding factors inherent to human studies [7,8]. An alternative approach is to investigate the cognitive effects of human APOE alleles in genetically engineered animals.

In support of the accelerated cognitive decline found in humans, transgenic and apoE-TR (target replacement) mice expressing human apoE4 under the control of different promoters exhibit age-dependent memory impairments which are often more pronounced in females than in males and in tasks taxing spatial navigation memory [9–13]. Interestingly, a recent study reported improved learning performance on several spatial tasks, including the Morris water maze paradigm, as well as non-spatial tasks throughout adulthood (6 to 22 months) in female apoE4-TR mice, whereas their memory retention performances remained similar to those of apoE3-TR mice in the same tasks [14]. As suggested by the authors, the higher levels of anxiety of their apoE4-TR mice may have contributed to their improved learning performance. In a previous study [12], we also found that younger (4–5 months) male

* Corresponding author at: Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives, UMR 7237 CNRS, Université de Strasbourg, 12 rue Goethe, F-67000 Strasbourg, France. Tel.: +33 368 851 876; fax: +33 368 851 958.

E-mail addresses: chantal.mathis@unistra.fr, dianedelesn@hotmail.fr (C. Mathis).

¹ Equal contributing authors.

and female apoE4-TR mice tended to have better spatial learning performances than their apoE3-TR counterparts in the Morris water maze task, but this beneficial effect did not reach significance. Conversely, there was a moderate deleterious effect of apoE4 versus apoE3 on their memory retention performances during the probe trial. According to our knowledge, the few other studies performed on young adults (2–4 months) concluded on a lack of significant apoE-isoform effect on cognitive performance and anxiety levels in male apoE-TR and female NSE-apoE mice [9,15]. Thus, a beneficial effect of APOE-4 on both learning and memory performances in young adult animals has never been clearly demonstrated despite the extensive behavioral characterization of these apoE mouse models.

ApoE is known to modulate the processing of the amyloid precursor protein (APP) through lipoprotein receptor activation [16]. It is also known to interact directly with APP derivatives in an isoform-dependent manner [17]. APP derivatives, such as secreted forms of APP and A β , are known to show contrasting effects on memory processes, neuronal plasticity and neuronal survival depending on their concentrations [18]. Thus, APP may be involved, at least partly, in the effects of apoE on cognition. The hAPP-Yac/apoE-TR bigenic mouse lines were recently generated by crossing apoE-TR mice with hAPP-YAC mice [19]. They express human apoE isoforms at physiological levels and normal human APP in addition to murine APP. Since human APP and apoE genes differ from their respective homologues in mice, these bigenic mice provide an interesting tool to study specific in vivo interactions between human apoE isoforms and APP at the behavioral level. Interestingly, spatial memory performances are preserved in 4.5–9 months old single transgenic hAPP-YAC mice [20], whereas the bigenic hAPP-Yac/apoE4-TR female mice, but not males, showed some early deficits in spatial memory, fear conditioning and attentional tasks compared to hAPP/apoE3-TR mice at the age of 6–7 months [19,21]. The cognitive status of younger hAPP-Yac/apoE-TR mice is still unknown. Based on the previous results obtained in apoE-TR mice, we chose to assess specifically spatial memory in the hidden-platform version of the Morris water maze in 3-month old male hAPP-Yac/apoE4-TR and hAPP-Yac/apoE3-TR mice. We also assessed non-spatial performances (visible-platform), locomotor activity and anxiety levels to evaluate possible confounding factors on the animal's performances in the spatial memory task.

The bigenic mouse lines were generated at Taconic Farms, Inc (Germantown, NY, USA) by crossing hAPP-Yac mice with either apoE3-TR or apoE4-TR mice [21]. The genetic background was C57/BL6NTac. For each bigenic line, experimental animals were males obtained from a first generation mating of homozygous mice provided by Taconic Farms. Note that wild-type mice were not included because the present work focuses on apoE genotype differences. Mice were maintained in groups of 3–5 per cage (32 × 16 × 14 cm³; 24 ± 1 °C; 12/12 h cycle with lights on at 07h00 a.m.), with nesting material and ad libitum access to food and water. They were single housed two weeks before behavioral testing. Behavioral testing included platform navigation, open-field exploration, and anxiety tests. The water maze task was performed in a circular pool (1.40 m) filled with opaque water (20 °C). On day 6, the mice were tested for spatial memory retention in a 60 s probe trial without platform. On day 7, a 4-trial session with the visible-platform procedure was added to check for possible motivation or sensorimotor biases. Swimming velocity, latency and distance traveled to search the platform were recorded (Ethovision, Noldus, The Netherlands). The amount of time spent in each of the four virtual quadrants and the number of annulus zone (10 cm diameter centered on the platform) were also recorded. The probe trial results were analyzed as usual. All statistical analyses were performed using SPSS (version 17.0, SPSS Inc., Cary, NC, USA). Statistical significance was assessed using Student's *t*-test, Fisher's exact test, or Mann-Whitney *U*-test. A *P*-value of 0.05 was considered statistically significant. All data are presented as mean ± SEM. Statistical significance is indicated by asterisks (* *P* < 0.05, ** *P* < 0.01, *** *P* < 0.001). The authors have nothing to disclose.

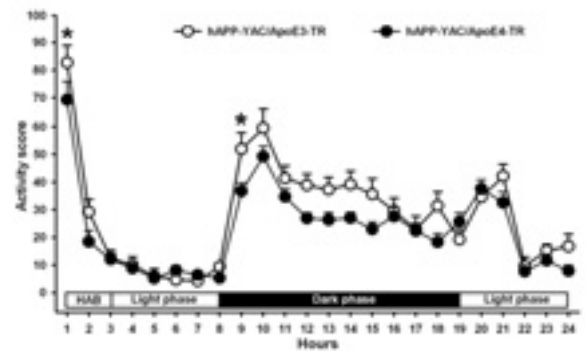


Fig. 1. Locomotor activity scores during the 3h habituation period (HAB) and the remaining 21h period. The hAPP-Yac/apoE4-TR male mice ($n = 24$) tended to display lower activity scores than hAPP-Yac/apoE3-TR male mice ($n = 21$). * $P < 0.05$, significantly different from hAPP-Yac/apoE3-TR, NK test.

Twenty-one hAPP-Yac/apoE3-TR and 24 hAPP-Yac/apoE4-TR male mice were first tested in unfamiliar activity cages (42 × 26 × 15 cm³) in order to determine their general levels of locomotor activity. Briefly, successive crossing of two infrared light beams passing through both sides of the activity cage were counted as longitudinal cage crossings. The session began at 11 h00 a.m. for a complete 24 h light–dark cycle. Data were recorded separately on a 3 h period of habituation to the experimental device, and the remaining 21 h period. Both genotypes showed a decrease in locomotor activity over the 3 h habituation period (Hour: $F_{(2,86)} = 116.09$, $P < 0.01$; Hour × Genotype: $F_{(2,86)} = 1.18$, $P = 0.31$). However, hAPP-Yac/apoE4-TR mice tended to display lower activity score than hAPP-Yac/apoE3-TR mice (Genotype: $F_{(1,43)} = 3.68$, $P = 0.06$), especially during the first hour. Over the next 21 h, there was a general increase in locomotor activity during the dark phase (Hour: $F_{(20,860)} = 44.33$, $P < 0.01$) which was less pronounced in hAPP-Yac/apoE4-TR than in hAPP-Yac/apoE3-TR mice (Genotype: $F_{(1,43)} = 5.65$, $P = 0.02$; Hour × Genotype: $F_{(20,860)} = 2.20$, $P < 0.01$; Fig. 1).

The following day, these mice were trained in the hidden-platform and visible-platform versions of the water maze paradigm adapted from [12]. After a 2-day familiarization period (water-paddling and free swim trial), the mice received 4 daily trials (maximum 60 s/trial) for 5 days to find a submerged (hidden) platform in a pool (Ø: 1.40 m) filled with opaque water (20 °C). On day 6, the mice were tested for spatial memory retention in a 60 s probe trial without platform. On day 7, a 4-trial session with the visible-platform procedure was added to check for possible motivation or sensorimotor biases. Swimming velocity, latency and distance traveled to search the platform were recorded (Ethovision, Noldus, The Netherlands). The amount of time spent in each of the four virtual quadrants and the number of annulus zone (10 cm diameter centered on the platform) were also recorded. The probe trial results were analyzed as usual. All statistical analyses were performed using SPSS (version 17.0, SPSS Inc., Cary, NC, USA). Statistical significance was assessed using Student's *t*-test, Fisher's exact test, or Mann-Whitney *U*-test. A *P*-value of 0.05 was considered statistically significant. All data are presented as mean ± SEM. Statistical significance is indicated by asterisks (* *P* < 0.05, ** *P* < 0.01, *** *P* < 0.001). The authors have nothing to disclose.

Latency to reach the platform, distance swam, and velocity were the primary variables that hAPP-Yac/apoE4-TR mice did not differ from hAPP-Yac/apoE3-TR mice. Swimming velocity was slightly slower for hAPP-Yac/apoE4-TR mice (latency: 22.96 ± 0.94 s; velocity: 187.05 cm/s)

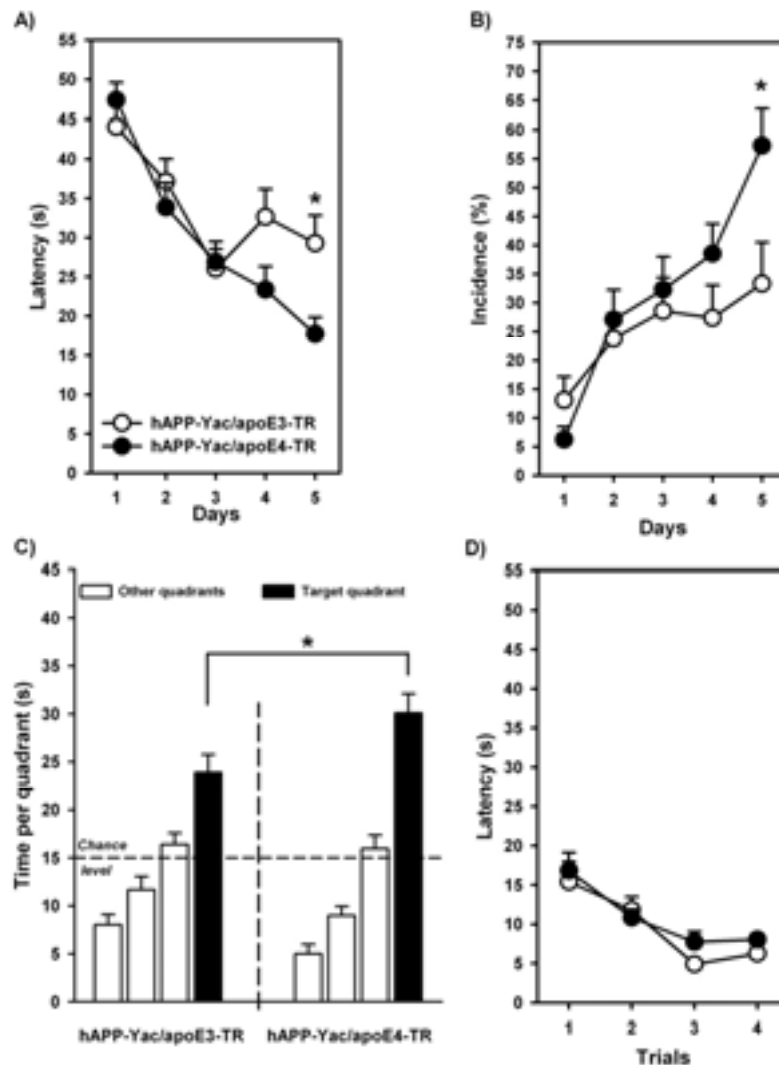


Fig. 2. Performance of 21 hAPP-Yac/apoE3-TR and 24 hAPP-Yac/apoE4-TR male mice in the water maze paradigm. (A) hAPP-Yac/apoE4-TR mice had lower average searching latencies (\pm SEM) than hAPP-Yac/apoE3-TR mice during hidden-platform training. (B) Incidence (\pm SEM) refers to the percentage of trials with direct to platform area strategy. It was higher in hAPP-Yac/apoE4-TR mice by the end of the hidden-platform training. (C) Average time (\pm SEM) spent in the four virtual quadrants (target quadrant: SO; other quadrant: NO, NE and SE) of the pool during the probe trial. The preference for the target quadrant was more pronounced in hAPP-Yac/apoE4-TR. (D) Both genotypes showed excellent performances in terms of average searching latency (\pm SEM) in the 4-trial visible platform task. * $P < 0.05$, significantly different from hAPP-Yac/apoE3-TR, NK test.

$F_{(1,43)} \geq 7.71$, $P \leq 0.008$) during the free swim habituation trial. Throughout subsequent training though, hAPP-Yac/apoE4-TR males (Day 1 to 5 means: 17.3, 19.5, 20.2, 19.7 and 19.0; maximal SEM ± 0.65 cm/s) showed similar swimming velocities to hAPP-Yac/apoE3-TR males (18.4, 19.6, 20.6, 20.6 and 21.3, maximal SEM ± 0.89 cm/s; Genotype: $F_{(1,43)} = 1.98$, $P = 0.16$; Day \times Genotype: $F_{(4,172)} = 1.29$, $P = 0.27$; No significant effect with the N-K test). Only latency data are shown here because analyses of distance led to similar results. Globally, the latency performance improved during hidden-platform training (Day: $F_{(4,172)} = 28.16$, $P < 0.01$; Fig. 2A), but the rate of acquisition differed among genotypes (Day \times Genotype: $F_{(4,172)} = 3.58$, $P < 0.01$; Genotype: $F_{(1,43)} = 2.14$, $P = 0.15$). Indeed, hAPP-Yac/apoE4-TR mice further improved their performance on the last two days as opposed to hAPP-Yac/apoE3-TR mice. Interestingly, this effect was observed in each of the

two batches run one week apart (supplementary data). Moreover, hAPP-Yac/apoE4 mice appeared to use a spatial-based strategy more than hAPP-Yac/apoE3-TR mice as suggested by a higher proportion of direct to platform area trials by the end of training (Day \times Genotype: $F_{(4,172)} = 2.84$, $P < 0.05$; Day: $F_{(1,43)} = 14.61$, $P < 0.001$; Fig. 2B). During the probe trial, both genotypes spent more than the 15 s chance level in the target quadrant (hAPP-Yac/apoE4-TR: $t_{23} = 7.53$, $P < 0.01$; hAPP-Yac/apoE3-TR: $t_{20} = 4.82$, $P < 0.01$; Fig. 2C), but this preference was more pronounced in hAPP-Yac/apoE4-TR mice (time in quadrant: Genotype: $F_{(1,43)} = 5.05$, $P < 0.02$; annulus crossings: apoE4 = 7.12 ± 0.73 and apoE3 = 4.66 ± 0.67 ; Genotype: $F_{(1,43)} = 5.97$, $P < 0.02$). In addition, both groups efficiently reached the visible platform and similarly improved their performance over the four trials (no significant effect or interaction with Genotype, Fig. 2D).

In order to test whether the differential hidden-platform performance were due to differences in anxiety levels between the two mouse lines, a distinct cohort of 13 hAPP-Yac/apoE3-TR and 12 hAPP-Yac/apoE4-TR naive male mice was subsequently tested at the same age in the light-dark box test. Two equal PVC boxes (18.5 × 18.5 × 15 cm), one opaque and the other transparent, were connected with an opaque PVC tunnel (5 cm Ø, 5.5 cm long). The transparent box was positioned 25 cm under a 100 W lamp. The mice were initially placed in the dark box. During the 5 min test, the time spent in the lit box was longer in hAPP-Yac/apoE4-TR mice (66.2 ± 8.3 s) than in hAPP-Yac/apoE3-TR mice (39.2 ± 9.6 s; $F_{(1,23)} = 4.32$, $P = 0.046$). There was no genotype difference in the number of box-to-box transitions (data not shown).

The most important finding of the present work is that the levels of both learning and memory performances in the spatial version of the water maze task were higher in young adult hAPP-Yac/apoE4-TR male mice than in their hAPP-Yac/apoE3-TR counterparts. The two genotypes acquired the task, but hAPP-Yac/apoE4-TR mice appeared to learn it more efficiently as they further improved their learning performance and outperformed hAPP-Yac/apoE3-TR mice during the probe trial. The use of a spatial strategy to find the hidden platform was more pronounced in hAPP-Yac/apoE4-TR mice during training and probe trials, which suggests a specific effect on navigational learning and memory. Both groups showed similar velocities throughout testing and performed similarly well in the visible-platform task, suggesting that differences in hidden-platform performance were not related to differences in sensory-motor abilities or other confounding factors like motivation. Similarly to what was found in older hAPP-Yac/apoE female mice [19] in different settings, hAPP-Yac/apoE4-TR male mice were slightly less active than hAPP-Yac/apoE3-TR mice during the first hour spent in a new environment and during the 21 h session after habituation to the activity device. Interestingly, hAPP-Yac/apoE4-TR mice were also less active during the free swim habituation trial, but not during subsequent water-maze training. It is noteworthy that despite their tendency for a reduced activity, hAPP-Yac/apoE4-TR mice did show improved latency performance by the end of the hidden platform training. Interestingly, reduced locomotor activity was also found in male and female apoE4-TR mice [12,14], but the mechanisms involved in this apoE isoform-dependent effect remain unknown. Similar performances on the first three days of the spatial task indicate that the mouse lines did not differ in the early stages of learning, especially in mastering the sensory-motor requirements of the task (e.g., swimming, platform climbing). Therefore, the most tempting explanation for better learning and memory performances in hAPP-Yac/apoE4-TR mice is a greater efficiency in mechanisms underlying spatial information processing. Alternatively, increased attention could also lead to better environment knowledge and more accurate searching of the platform. Finally, a contribution of slightly reduced anxiety levels to the improved spatial navigation performances of the young male hAPP-Yac/apoE4-TR mice cannot be excluded. Because increased learning with higher anxiety levels have been previously shown in 6–22 months old female apoE4-TR mice [14] when data are collapsed across ages, it seems important to emphasize here that the later effects were obtained with sex, model and ages differing from the present study. Each of these differences might have contributed to the particular pattern of apoE isoform-dependent effects on cognition and anxiety obtained in young male hAPP-Yac/apoE-TR, especially in regard of (i) the specificity of our effect on both learning and memory, (ii) the lack of genotype differences on non-cognitive aspects of the tasks (e.g., swim speed, initial improvement) and (iii) the way apoE isoforms modulated anxiety levels. The latter also suggests that further studies taking into account sex, age, environmental factors (e.g., different housing conditions) are required to clarify the exact contribution of the

modulation of anxiety levels by apoE isoforms on cognitive performances in each of these apoE models.

This is the first study to show a selective beneficial effect of the APOE-ε4 allele compared to the APOE-ε3 allele on spatial learning and memory in a mouse apoE model. These effects were found in mouse lines expressing both human apoE and human APP. Interestingly, apoE4 expression in apoE-TR mice is associated with improved NMDA-dependent long term potentiation (LTP) in the hippocampal CA1 of young (2–5 months), but not older mice [22,23]. This effect was related to an activation of the ERK signaling pathway presumably through an interaction of apoE4 with lipoprotein receptors [22]. Such findings are particularly relevant to the present work as NMDA-dependent synaptic plasticity and activation of the ERK cascade is critical to spatial memory formation [24]. Therefore, in hAPP-Yac/apoE4-TR mice, the human APP gene added to the apoE4-TR background may have potentiated an already existing, but moderate positive effect of apoE4 on mechanisms underlying hippocampal-dependent memory processes which is consistent with the small positive apoE4 effect restricted to water-maze learning performance in apoE-TR mice [12]. APP overexpression itself might have potentiated interactions between APP and apoE, possibly through lipoprotein receptors, and/or favored critical protein-protein interactions between human APP and human apoE isoforms.

The extent to which the improved spatial memory of hAPP-Yac/apoE4-TR mice reproduces the beneficial effect of APOE-ε4 found on cognitive performances in young adult humans is difficult to evaluate. The first reason is that the wide variety of neuropsychological tasks in which these positive effects were reported cannot be transposed to animals. The second reason is that the effect of APOE-ε4 on spatial navigation performances has not been tested yet in young adults. A deleterious effect has been repeatedly shown in older adults [25,26] and only once in 7–10 years old children [27] when navigational place learning is not fully developed [28]. However, episodic memory, which depends crucially on the hippocampus and also includes spatial components of memorized events, is improved in young adult APOE-ε4 carriers, while impaired in older adults [5,29].

Given that hAPP-Yac/apoE-TR mice show a deleterious effect of APOE-ε4 on cognition at later ages [19], the beneficial effect of APOE-ε4 versus APOE-ε3 on cognitive performances of young adult hAPP-Yac/apoE-TR mice provides an experimental argument in favor of the antagonistic pleiotropic effect hypothesis. This model appears as a valuable tool to study the biological mechanisms involved in the differential effects of apoE4 on cognition over life.

Acknowledgements

We thank Jean-Cosme Dodart for his help in initiating the present work and Elise Vogel for technical assistance. This work was supported by a grant from Alsace Alzheimer Haut-Rhin (68), graduate fellowships from the Région Alsace (PHM) and the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (JBB), and by the Université de Strasbourg and the Centre National de la Recherche Scientifique.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2012.12.043>.

References

- [1] Deary IJ, Whiteman MC, Parnie A, Starr JM, Hayward C, Wright AF, et al. Cognitive change and the APOE epsilon 4 allele. *Nature* 2002;418(6901):932.

Discussion de l'étude n°1

Synthèse des principaux résultats

Dans cette étude, les souris *hAPP/APOE4* ont été plus performantes que les souris *hAPP/APOE3* dans le test de la piscine de Morris.

Durant les 5 sessions d'apprentissage, les souris *hAPP/APOE4* améliorent continuellement leurs performances tandis que les *hAPP/APOE3* atteignent un plateau à un niveau de performances intermédiaire dès le troisième jour. Cet effet suggère que les *hAPP/APOE4* sont capables d'atteindre une précision de navigation spatiale supérieure à celle des *hAPP/APOE3*, ce qui est confirmé par l'incidence des essais avec trajectoire directe vers la plate-forme (55% chez les *hAPP/APOE4* contre seulement 30% chez les *hAPP/APOE3*). De plus, si lors du test de rétention les souris des deux génotypes présentent une préférence pour le quadrant cible où était localisée la plate-forme durant l'apprentissage, la recherche des souris *hAPP/APOE4* est plus focalisée que celle des *hAPP/APOE3*. Comme les souris des deux génotypes ne diffèrent pas durant la version visible de la tâche, les différences mesurées en cours de l'évaluation de l'apprentissage et du rappel de l'information spatiale ne s'expliqueraient probablement pas par des différences en termes de motivation ou d'habileté motrice.

Ainsi, nos résultats suggèrent que les souris *hAPP/APOE4* jeunes ont de meilleures capacités d'apprentissage et de navigation spatiale que les *hAPP/APOE3*, bien que cet effet reste modéré.

Comparaison avec les études récentes menées chez les souris *APOE4-tr*

Si nos résultats suggèrent que l'*APOE4* induit bien une influence positive sur la cognition en début de vie, dans le même temps, d'autres équipes se sont intéressés aux performances cognitives chez les souris *APOE4* avec des résultats contrastés. Néanmoins, les mécanismes supportant potentiellement cette modulation positive de la cognition spatiale par l'*APOE4* restent encore obscurs.

Le groupe de Raber a ainsi récemment suggéré que de jeunes souris femelles *APOE4-tr* présentent également un meilleur apprentissage dans la tâche de la piscine de Morris, bien que leurs performances de rétentions restent comparables avec celles des souris *APOE3-tr* (Siegel et al. 2012). D'un autre côté, en utilisant les mêmes souris *APOE-tr*, le groupe de Rebeck a trouvé chez de jeunes souris *APOE4* des déficits subtils en labyrinthe de Barnes mais pas en piscine de Morris (Rodriguez et al. 2013), ce qui suggère que le test labyrinthe de Barnes pourrait être plus sensible aux effets délétères de l'*APOE4* que la piscine de Morris. Cependant, ces auteurs ayant mélangé des souris des deux sexes, leurs résultats sont difficilement comparables à ceux du groupe de Raber ou aux nôtres. Enfin, le groupe de Michaelson a récemment suggéré que les souris *APOE4-tr* mâles âgées de 1 à 4 mois

L'effet pléiotropique antagoniste de l'*APOE4*

présentent des déficits dans une version sèche de la tâche de piscine de Morris avec renforcement hydrique (Liraz et al. 2013). Cependant, ce résultat manque de robustesse en l'absence d'un test de rétention mnésique. De plus, les auteurs admettent que les souris *APOE4* sont plus lentes à trouver leur renforçateur hydrique uniquement durant le dernier essai quotidien sur quatre. Or, les souris ayant déjà reçu 0,3ml de renforçateur, cet effet pourrait n'être qu'un artefact produit par une réduction accélérée de motivation, les souris étant potentiellement déjà à satiété lors de ce quatrième essai. Quoiqu'il en soit, nous avons posé l'hypothèse originale que l'effet pléiotropique antagoniste de l'*APOE4* nécessiterait l'interaction protéine/protéine directe avec l'APP humaine, ce qui ferait alors des souris transgéniques *hAPP/APOE* un modèle de choix pour étudier les effets cognitifs de l'*APOE4* de façon plus proche de l'Homme tout au long des âges.

Mécanismes potentiels

A l'heure actuelle, les mécanismes sous-tendant l'effet facilitateurs de l'*APOE4* restent encore à déterminer. Cependant, il a été rapporté que les souris *APOE4* âgées de deux mois auraient une facilitation de la mise en place de la LTP (Kitamura et al 2004), un effet qui disparaîtrait vers 6 mois et dépendrait notamment de l'activation des voies de signalisation ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*) modulant notamment l'expression des récepteurs NMDA (Korwek et al. 2009). Un tel effet pourrait avoir contribué à nos résultats, sachant que la plasticité dépendant d'ERK et des récepteurs NMDA est critique pour la mémoire spatiale (Nakazawa et al. 2004) et que l'APP et ses métabolites sont mobilisés par l'activité synaptique (Cirrito et al. 2005 ; Brody et al. 2008) notamment afin de favoriser la mise en place de la LTP et des apprentissages mnésiques (Puzzo et al. 2008 ; Garcia-Osta et al. 2009).

Conclusion

Bien que les capacités de navigation spatiales n'aient pas encore été évaluées chez de jeunes adultes humains porteurs de l'*APOE4*, elles sont sensibles à la présence de cet allèle au cours du vieillissement, chez l'Homme (Laczo et al. 2010 ; Berteau-Pavy et al. 2007) comme chez la Souris (Bour et al. 2008). Ainsi, certains aspects des capacités de navigation spatiale pourraient-elles également être favorisées chez les jeunes sujets humains porteurs de l'*APOE4*. En effet, une telle pléiotropie antagoniste sur les capacités de mémoire spatiale pourrait en effet contribuer aux meilleures performances épisodiques décrites chez le jeune sujet (Mondadori et al. 2007 ; Nilsson et al. 2006), la mémoire épisodique contenant une forte composante spatiale et mobilisant également fortement les circuits hippocampiques.

En conclusion, il apparaît que l'effet pléiotropique antagoniste de l'*APOE4* ayant été rapporté chez l'Homme puisse se retrouver dans certaines conditions chez la Souris. Globalement, le modèle *hAPP/APOE* semble reproduire de manière particulièrement satisfaisante les effets cognitifs contrastés de l'*APOE4*, que ce soit l'effet facilitateur chez le jeune adulte ([présente publication](#)) ou l'apparition progressive de déficits mnésiques avec l'âge (Kornecook et al. 2009).

Etude n°2

La lésion partielle du cortex entorhinal est-elle associée à des déficits mnésiques exacerbés chez les souris *hAPP/APOE4* ?

La précédente étude a permis de montrer que l'*APOE4* induit une influence positive modérée sur la mémoire spatiale chez la Souris *hAPP/APOE* jeune. Comme chez l'homme l'*APOE4* induirait également des effets délétères dans le cadre du vieillissement pathologique et plus particulièrement du MCI, nous avons cherché à déterminer si la Souris *hAPP/APOE4 middle-aged* est cognitivement plus sensible à la présence d'une atteinte du cortex entorhinal.

La lésion partielle du cortex entorhinal est-elle associée à des déficits mnésiques exacerbés chez les souris *hAPP/APOE4* ?

Contexte scientifique

La déclaration clinique des DTA est souvent précédée d'une phase de troubles cognitifs légers (MCI). Cette phase précoce est notamment caractérisée par des pertes de neurones entorhinaux (Gomez-Isla et al. 1996 ; Kordower et al. 2001). Ces pertes neuronales partielles entraînent une réduction des voies perforantes innervant l'hippocampe (Kalus et al. 2006) causant des pertes synaptiques dans le DG qui sont fortement corrélées à la progression des troubles cognitifs (Hamos et al. 1989 ; Masliah et al. 1994 ; Heinonen et al. 1995 ; Sze et al. 1997 ; Scheff et al. 2006). Ces pertes synaptiques partielles isoleraient ainsi l'hippocampe d'une partie de ses entrées, une situation qui a été conceptualisée en tant que « syndrome de déconnexion hippocampique » (Hyman et al. 1984).

Les individus porteurs de l'allèle *APOE4* ont plus de risque de développer un MCI (Brainerd et al. 2013), présentent moins de rémission cognitive durant le MCI (Koepsell et al. 2012 ; Kudrnovsky-Moser et al. 2013 ; Roberts et al. 2013), et convertissent plus facilement vers la démence (Xu et al. 2013).

De manière générale, les effets négatifs de l'*APOE4* semblent être spécifiques aux phases précoces de la pathologie et notamment au MCI (Cosentino et al. 2008 ; Foster et al. 2013). En effet, l'*APOE4* est un facteur de risque important pour le développement d'un MCI, mais sans influencer le risque de transition vers la démence (Brainerd et al. 2013), sauf en cas d'homozygotie (Xu et al. 2013). De plus, après la déclaration de la démence, l'*APOE4* n'accélérerait pas l'avancée de la pathologie (Corder et al. 1995 ; Growdon et al. 1996), même en prenant en compte les homozygotes (Dal Forno et al. 1996). De manière surprenante, l'allèle *APOE4* pourrait même ralentir la progression de la pathologie durant les phases plus avancées de démence (Hoyt et al. 2005).

En plus de ces effets, l'*APOE4* induirait également l'apparition de déficits spécifiques dans les DTA, indiquant potentiellement le recrutement de mécanismes pathologiques uniques à cet allèle. Ainsi, chez les porteurs de l'*APOE4*, les réseaux du lobe temporal médian incluant la formation hippocampique seraient plus particulièrement touchés en lien avec des troubles à prédominance mnésique, tandis que les non-porteurs auraient plutôt des déficits de mémoire de travail, de contrôle exécutif et d'accès lexical en association avec des atteintes à

***APOE4* et sensibilité exacerbée à la lésion entorhinale**

prédominance fronto-pariétale (Wolk et al. 2010). Plus précisément, les patients MCI *APOE4* présenteraient des troubles de reconnaissance d'objets et de navigation spatiale, ces-derniers n'apparaissant que dans les stades plus avancés de la pathologie chez les non-porteurs (Berteau-Pavy et al. 2007 ; Laczó et al. 2010).

Objectifs de l'étude

Pris ensemble, ces arguments suggèrent que différents mécanismes sont à l'œuvre durant les phases de MCI par rapport aux phases suivantes de démence et que l'*APOE4* induit son effet négatif spécifiquement sur les phénomènes caractérisant le MCI. Les déficits spontanés liés à l'âge des souris *APOE4* étant plutôt modérés, nous avons reproduit chez nos souris *hAPP/APOE4* et *hAPP/APOE3* la perte d'environ la moitié des neurones entorhinaux qui caractérise le MCI (Gomez-Isla et al. 1996). En effet, les souris transgéniques *APOE4* n'expriment pas spontanément de pertes neuronales entorhinales marqués.

Afin de déterminer quels sont les effets de l'*APOE4* sur les conséquences fonctionnelles de ces lésions bilatérales partielles du cortex entorhinal induites à l'âge de 11 mois, nous avons évalué les souris dans différentes tâches impliquant des formes de mémoires recrutant la formation hippocampique et connues pour être perturbées précocement chez le patient : reconnaissance et localisation d'objets (Hampstead et al. 2011), discrimination olfactive (Djordjevic et al. 2008) et navigation spatiale (Hort et al. 2007 ; Laczó et al. 2009). Enfin, à l'issue de ce phénotypage comportemental, nous avons mesuré les densités synaptiques (marquage synaptophysine) ainsi que l'ampleur du bourgeonnement cholinergique (marquage VAcHT) au niveau du DG de l'hippocampe dorsal.

Publication n°2

Bott J-B., Cosquer B., Héraud C., Zerbinatti C., Kelche C., Cassel J-C., Mathis C.

**Reduced plasticity and mild cognitive impairment-like deficits
after entorhinal lesions in *hAPP/APOE4* mice.**

Neurobiol. Aging. (2013), 34 : 2683-2693.



Reduced plasticity and mild cognitive impairment-like deficits after entorhinal lesions in *hAPP/APOE4* mice

Jean-Bastien Bott^a, Brigitte Cosquer^a, Céline Héraud^a, Celina Zerbinatti^b, Christian Kelche^a, Jean-Christophe Cassel^a, Chantal Mathis^{a,*}

^aLaboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives, UMR 7364 CNRS, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

^bDepartment of Neurosymptomatic Disorders, Merck Sharp & Dohme Corporation, West Point, PA, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 January 2013

Received in revised form 10 April 2013

Accepted 20 April 2013

Available online 23 May 2013

Keywords:

Entorhinal cortex

Apolipoprotein E

Spatial navigation memory

Mild cognitive impairment

Alzheimer disease (AD)

Acetylcholine

Dentate gyrus

Reactive synaptogenesis

ABSTRACT

Mild cognitive impairment (MCI) is a clinical condition that often precedes Alzheimer disease (AD). Compared with apolipoprotein E-ε3 (APOE3), the apolipoprotein E-ε4 (APOE4) allele is associated with an increased risk of developing MCI and spatial navigation impairments. In MCI, the entorhinal cortex (EC), which is the main innervation source of the dentate gyrus, displays partial neuronal loss. We show that bilateral partial EC lesions lead to marked spatial memory deficits and reduced synaptic density in the dentate gyrus of APOE4 mice compared with APOE3 mice. Genotype and lesion status did not affect the performance in non-navigational tasks. Thus, partial EC lesions in APOE4 mice were sufficient to induce severe spatial memory impairments and synaptic loss in the dentate gyrus. In addition, lesioned APOE4 mice showed no evidence of reactional increase in cholinergic terminals density as opposed to APOE3 mice, suggesting that APOE4 interferes with the ability of the cholinergic system to respond to EC input loss. These findings provide a possible mechanism underlying the aggravating effect of APOE4 on the cognitive outcome of MCI patients.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Sporadic Alzheimer disease (AD) is the main cause of age-related dementia. A decade before the onset of AD, future patients often present with mild cognitive impairment (MCI), a heterogeneous clinical condition (Petersen et al., 2009) mainly associated with amyloid deposition, tangle pathology, and synaptic loss, but also with potential compensatory mechanisms such as cholinergic upregulation (Mufson et al., 2012). Interestingly, some MCI patients can revert to normal cognition (Koeppell and Monsell, 2012). One possible explanation for this reversion could be the development of compensatory mechanisms. Therefore, understanding the compensatory mechanisms accompanying MCI is of particular interest, because they represent an opportunity to develop disease-modifying therapies long before the onset of AD.

In normal elderly subjects, a metabolic reduction in the entorhinal cortex (EC) predicts conversion from normal to MCI (de Leon et al., 2001). In MCI, the EC is characterized by neuronal loss and reduced projections to the hippocampus (Gomez-Isla et al., 1996;

Kalus et al., 2006; Kordower et al., 2001). These damages lead to an early synaptic loss in the dentate gyrus (DG) of the hippocampus (Hamos et al., 1989; Heinonen et al., 1995; Mashiah et al., 1994), which correlates with cognitive decline (Sze et al., 1997). The EC and the hippocampus are strongly involved in spatial navigation, a function already affected in MCI (Hoer et al., 2007; Laczó et al., 2009; Weniger et al., 2011) and in the early phases of AD (Kalova et al., 2005). The hippocampal cholinergic upregulation observed in MCI (DeKosky et al., 2002) has been considered a compensatory response to the loss of entorhinal inputs (Ikonomovic et al., 2003). Experimental EC lesions in mice also induce synaptic loss in the DG (Hardman et al., 1997; White et al., 2001a) and are known to be associated with increased cholinergic markers (see Kadish and Van Groen, 2003). In this context, one of the most exciting questions is whether the cholinergic upregulation plays a role in MCI reversion to normal cognition.

Sporadic AD and MCI are multifactorial diseases. In the 1990s, several groups reported that apolipoprotein E (ApoE) is one of the major genetic risk factors for these pathologies (Corder et al., 1993; Roses, 1996). ApoE is the main lipoprotein-binding partner in the brain and is mainly secreted by glial cells, although neurons can contribute under particular conditions (Xu et al., 2008). In the brain, ApoE influences the lipid metabolism, neuronal growth, neuritic extensions, and amyloid and tau metabolism (Bu, 2009). ApoE also

* Corresponding author at: Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives, UMR 7364 CNRS, Université de Strasbourg, 12 rue Goethe, Strasbourg F-67000, France. Tel.: +33 368 851 876; fax: +33 368 851 958.
E-mail address: chantal.mathis@unistra.fr (C. Mathis).

supports the maturation and maintenance of synapses and strongly influences synapse turnover (Pfrieger, 2010). In humans, 3 major genetic polymorphisms lead to 3 main alleles: APOE2, APOE3, and APOE4, with the first the rarest. Compared with APOE3, APOE4 is an important risk factor for MCI (Sachdev et al., 2012) and subsequent transition to AD (Petersen et al., 1995; Ekroaristizabal Martín et al., 2011). Interestingly, aged APOE4 carriers show a greater atrophy of the DG-CA3 region (Mueller and Weiner, 2009; Mueller et al., 2008), which could indicate exacerbated sensibility to the loss of EC inputs. Furthermore, MCI patients carrying APOE4 show aggravated spatial navigation impairment (Laczo et al., 2011). However, because of the pleiotropic influences of ApoE (Bu, 2009), the mechanistic link among APOE4, neuronal loss in the EC, and navigation deficits remains ambiguous. MCI often precedes AD in APOE4 carriers; thus, it is of particular interest to better understand the compensatory mechanisms associated with MCI, because this condition could be a unique temporal window to develop appropriate disease-modifying therapies, a decade before the onset of AD. The repetitive failures of clinical trials targeting mild to moderate AD suggest that MCI might represent the latest opportunity to treat AD (Selkoe, 2012). Because AD patients with APOE4 show impaired neuronal remodeling (Arendt et al., 1997) and MCI patients with APOE4 show less reversion to normal cognition (Koepsell and Monsell, 2012), it is possible that some of the pathologic effects of APOE4 are mediated by impaired compensatory mechanisms. Interestingly, APOE4 transgenic mice with unilateral EC lesions displayed delayed synaptic reorganization (White et al., 2001b) compared with APOE3 mice. Moreover, APOE4 transgenic mice also showed reduced upregulation of acetylcholinesterase (AChE) activity after such unilateral EC lesions (Blain et al., 2006). However, in both studies, the cognitive status of the lesioned APOE mice was not evaluated. We therefore hypothesized that cholinergic plasticity in the DG after EC lesions could represent one of the compensatory mechanisms impaired by APOE4, which might lead to accelerated spatial memory decline. To test this hypothesis, we used a new, doubly humanized, mouse model harboring both the APOE4 or APOE3 allele and the nonmutated human amyloid precursor protein (*APP*) gene. Thus, the genetics of these mice are closer to those found in sporadic AD than are the genetics of single APOE-TR mice or those transgenic for mutated human APP (Kornecook et al., 2010). Middle-age mice with partial bilateral EC lesions were tested in several memory tasks, and their DG region was subsequently analyzed for synaptic reorganization. We report that EC lesions selectively exacerbated the navigation deficits in APOE4 mice compared with APOE3 mice and that this greater impairment was associated with a greater synaptic loss and reduced cholinergic reorganization in the DG.

2. Methods

2.1. Animals

We used 11-month-old hAPP/ApoE3 (APOE3) and hAPP/ApoE4 (APOE4) male mice. These mouse lines were generated at Taconic Farm (Germantown, NY, USA) by crossing hAPP-YAC mice (Lamb et al., 1993) and APOE-TR mice (Sullivan et al., 2004) on a C57BL/6NTac background (Kornecook et al., 2010). These mice coexpress human ApoE3 or ApoE4 instead of murine ApoE and normal human APP, in addition to mouse APP. Human ApoEs are expressed at physiological levels under the control of the murine promoter (targeted-replacement mice, Sullivan et al., 2004). Normal human APP is expressed through the insertion of a yeast artificial chromosome (Lamb et al., 1993). Wild-type mice were not included in the present study, because we focused on APOE4 and APOE3 genotype comparisons relevant for humans. The mice

used in the present study were bred in our laboratory (transgenic mouse line authorization: 5016 CA-II; Moreau et al., 2013). Their APOE genetic status was confirmed by postexperimental genotyping. The littermates were housed in small groups (2–4 mice in a 46 × 26 × 15-cm³ cage) until surgery. Thereafter, and for the duration of the behavioral evaluation, the mice were housed in individual cages (22 × 20 × 14 cm³) with paper towel for nesting. The temperature (22 °C ± 1 °C) and light cycle (12/12 light–dark cycle, with lights turned on at 7 AM) were controlled. Food and water were available ad libitum, except during the food restriction period of the odor discrimination test. All experimental procedures were conducted in conformity with institutional guidelines (council directive 87/848, October 19, 1987, Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale; National Institutes of Health publications, 86-23, revised 1985). The official permission references were E-67-482-13 for the animal facility and 67-292 for C.M. and 67-215 for J.-C.C. for animal experimentation; J.-B.B. worked under their responsibility.

2.2. Study design

Fig. 1 presents a time-line diagram illustrating the study design. Because of the influence of repetitive testing on mice behavior (McIlwain et al., 2001), the tests were scheduled from the least to the most invasive (food restriction for odor discrimination).

2.3. Surgery (day 0)

The 11-month-old male mice of each genotype were randomly assigned to the sham or lesion groups. The mice were deeply anesthetized (sodium pentobarbital, 70 mg/kg, intraperitoneally; Cerva Santé Animale, France), placed in a stereotaxic frame, and their eyes protected with ophthalmic gel. Bilateral EC lesions were performed with N-methyl-D-aspartate (NMDA; 120 mM) diluted in phosphate-buffered saline (pH 7.4; 0.1 μL/min). This NMDA solution was injected through a glass micropipette at 3 brain sites in each hemisphere. The bregma and the midline were taken as the anterior (A) and lateral (L) references (Paxinos and Franklin, 2004):

- Site 1 (0.075 μL): A = −4.1 mm, L = 4.3 mm, and 0.5 mm above the bottom of the skull
- Site 2 (0.1 μL): A = −4.7 mm, L = 3.5 mm, and 0.5 mm above the bottom of the skull
- Site 3 (0.05 μL): A = −4.7 mm, L = 3.5 mm, and 1 mm above the bottom of the skull

At each injection site, the micropipette was left in place for 5 minutes before it was slowly retracted. The same procedure was applied to the sham group without the NMDA injection. After surgery, the mice were housed in clean cages placed on a heating pad and were monitored until complete awakening.



Fig. 1. Time-line diagram of behavioral evaluation.

2.4. Behavioral assessment

2.4.1. Locomotor activity test (days 27 and 110)

The mice were tested for 8 hours in a homemade activity device hosted in a specific room to evaluate their general activity during habituation to a novel environment. They were placed in an unfamiliar transparent cage ($42 \times 26 \times 15 \text{ cm}^3$) crossed by 2 infrared light beams, 2.5 cm above the cage floor and 28 cm apart. The activity score, defined as the number of successive crossings of the 2 infrared beams, was recorded from 11 AM onward. We conducted 2 activity tests, one 27 days after surgery and one 110 days after surgery, at the end of the behavioral evaluation.

2.4.2. Light–dark test (day 35)

The light–dark anxiety test was performed during the dark phase (activity period) of the animal facility lightening cycle. The apparatus consisted of 2 equal polyvinyl chloride boxes ($18.5 \times 18.5 \times 15 \text{ cm}^3$), 1 opaque and 1 transparent, connected with an opaque polyvinyl chloride tunnel (5 cm ϕ , 5.5 cm long) at floor level. The transparent box was positioned 25 cm under a 100 W lamp (700 lux). The mice were initially placed in the dark box. The time spent in the lit box, the latency to the first entry in the lit box, and the number of box-to-box transitions were recorded for 5 minutes.

2.4.3. Barnes maze task (days 60–75)

The Barnes maze task and the following tasks were conducted during the light phase. The Barnes maze is particularly relevant for assessing spatial memory in mice because of their natural ability to find an escape through small holes and their physiological adaptation to the dry-land maze (Whishaw and Tomie, 1996). The mice were trained during 4 days (3 trials daily; 180-second cutoff; inter-trial interval of 15 minutes) to find a target hole among 12 holes equally distributed along the perimeter of the maze on the board. During the acquisition phase, the target hole was presented at a fixed location in the first stage. For a given mouse, the target hole was at a fixed spatial location in the learning room, which provided extra-maze cues (ambient fluorescent lightbulb, 200 lux at the maze center) and a noisy background (45–55 dB at the maze center). A stationary cylinder placed in the center of the maze was lifted at the start of each trial. Between trials, the floor was washed with 70% ethanol and periodically rotated to minimize odor-based strategies. The mice were subjected to 2 probe tests to assess spatial memory: 24 trials of training and probe testing 11 days after training (spatial memory). After 4 days of training, the mice were subjected to the first probe trial (20 seconds) with all holes closed (day 60). Behavioral exploration of the target hole was an indicator of spatial goal memory retention. After this probe trial, the mice received 4 more acquisition trials and were subjected to the second probe trial 11 days later (day 75). For each training trial, we counted the number of visits to the target holes and the latency to first access to the target hole. Because mice with APOE4, 6 background are well known to prefer nonspatial strategies in the Barnes maze, each acquisition trial was classified into 1 of 3 search strategies (adapted from Harrison et al., 2006): direct spatial strategy (direct visit to the target or preceded by 1 adjacent hole visit), serial strategy (minimum of 2 adjacent hole visits in a serial manner before reaching the target), and mixed strategy (remaining trials). The total number of visits differed between the groups during the probe trials; therefore, each individual retention performance was evaluated using a spatial ratio (number of visits to a particular hole divided by the total number of visits).

2.4.4. Object location and object recognition tasks (days 49 and 50)

The object location and object recognition tasks were conducted according to the procedure previously described (Yassine et al.,

2013). These tasks are based on the spontaneous tendency of mice to preferentially explore objects that have been displaced to another location (object location) or new objects (object recognition). The 2 tasks were performed in a Plexiglas open-field ($52 \times 52 \text{ cm}$) with black walls (40 cm) and a white floor divided into 25 equal squares. A striped card was fixed on 1 wall. The 8 different objects (10–17 cm) used were made of metal, glass, or plastic and were available in triplicate (1 set for each trial). The mice were initially submitted to a 10-minute free exploration trial for 2 days. The next day (day 49), the mice were first exposed for 10 minutes to a spatial configuration of 3 new objects, then placed for 4 minutes in their home cage, before being subjected to a 10-minute retention trial using a novel spatial configuration with 1 object moved to a new location. On day 50, the mice received a 10-minute object recognition trial with the same object configuration, except that 1 of the familiar objects was replaced by an unfamiliar object. Between each trial, the walls, floor, and objects were cleaned with 70% ethanol. Exploration (nose pointing toward the object at a distance $< 1 \text{ cm}$) was quantified, and memory performance was evaluated using a discrimination index, defined as the time spent exploring the displaced object or the novel object divided by the time spent exploring all 3 objects. A preliminary study indicated that the mice did not show spontaneous preference for any of the objects.

2.4.5. Odor discrimination task (days 87–100)

In the odor discrimination task described by Yassine et al. (2013), the mice learn to associate 1 odor with food pellets (durum wheat noodle; $17.3 \pm 0.3 \text{ mg}$ each) and another odor with the absence of food in small pots. The mice were gradually food deprived for 5 days to reduce their body weight to 85% to 90% of their free-feeding weight. The mice were trained during 3 days (2 paired trials with food and 2 nonpaired trials without food). They had to dig in the odor pellets with bedding, 30 mm over food pellets, pasted on a layer of glass on a black base, inside a 10 cm \times 10 cm plastic box (the pot) (see Fig. 1a). Each pot was with 8 predrilled holes, one mouse can dig through a hole at 100 μm plasticate or hole in a polypropylene (Alkatis Chemical, St. Quentin Fallavier, France) or a filter paper. The paired and nonpaired trials were presented randomly instead on each training day. For each trial, male and female were randomly assigned to 20 \times 10 cm rectangular white pot and the total number of all food pellets was verified in the paired trials. Eleven days after the last acquisition day, long-term memory retention was evaluated in a new device: a polypropylene box ($45 \times 30 \times 10 \text{ cm}$) divided into 4 equal square pots (left, middle, and right) containing only small pieces of bedding (see Fig. 1b). In each probe trial, the 20 mm pots with 8 food pellets were placed in the left and middle and the right and no food pellets were placed in the middle and the right pots. Digging was recorded in each pot. Digging was strictly defined as moving the bedding with paws or nose. A larger hole spent digging in the color-painted pot was considered to reflect good olfactory memory, because of the high variability of digging times, the data are expressed as an index (time digging in a pot divided by the total digging time).

2.5. Histologic study

2.5.1. Perfusion and tissue preparation

One day after the last activity test (day 111), the mice were killed with an overdose of sodium pentobarbital (150 mg/kg intraperitoneally) and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde (in phosphate buffer, pH 7.4; 4 $^{\circ}\text{C}$). The brains were postfixed during 4 hours in the same paraformaldehyde solution and then cryoprotected in a saccharose solution (20% in phosphate buffer, 0.1 M; pH 7.4; 4 $^{\circ}\text{C}$) for 48 hours before being frozen with isopentane ($-40 \text{ }^{\circ}\text{C}$) and subsequently stored at $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Coronal brain sections

(30 μm) from the dorsal hippocampus (bregma -1.34 mm) to the end of the EC (bregma -5.20 mm) were made with a freezing microtome (-20°C). Every second and fourth section was mounted for AChE activity and cresyl violet staining, respectively. The remaining sections were serially collected for immunohistochemical treatment.

2.5.2. Assessment of lesion extent

The slides were dried at room temperature and stained with cresyl violet to evaluate the placement and extent of the EC lesions: the absence of significant lesions, unilateral lesions, or lesions extending to adjacent structures led to the exclusion of the mouse. The lesions for each selected mouse were manually drawn to allow reconstruction of the smallest and largest lesion extent.

2.5.3. AChE staining and assessment of width of dentate molecular layer (GAP43)

Slides stained for AChE activity histochemistry were used to assess the lesion-induced denervation in the DG and therefore complement the cresyl violet data. Semiquantitative evaluation of AChE activity was performed with the ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) at 6 positions in the molecular layer of the DG (3 in the outer molecular layer and 3 in the middle molecular layer) on each side and on 3 sections for each mouse. The relative optical density values were calculated using “background” values taken in the corpus callosum. The width of the DG middle and outer molecular layers was obtained by measuring on GAP43-stained slides (1:5000, rabbit polyclonal, Millipore, Billerica, MA, USA) the distance between the upper boundary of the inner molecular layer and the border between the DG molecular layer and the CA1 stratum lacunosum moleculare layer at 3 different positions on 3 sections for each mouse.

2.5.4. Immunohistochemistry

Immunohistochemical studies were conducted on a randomly selected subset of mice ($n = 6$ per group). Synaptophysin (mouse monoclonal; 1:800; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) was used to visualize the presynaptic terminals, and vesicular acetylcholine transporter (VAcHT; rabbit polyclonal; 1:1000, Synaptic System, Göttingen, Germany) was used to visualize the cholinergic presynaptic terminals.

Three sections (every seventh section) were processed for each marker. The sections were pretreated in citrate sodium (10 mM; pH 8; 30 minutes at 80°C) for antigen retrieval (Jiao et al., 1999). The sections were then rinsed in 0.1 M phosphate-buffered saline (3×10 minutes) before being blocked in 5% normal donkey serum (for 1 hour) followed by incubation with the primary antibodies in 2% normal donkey serum and 0.1% Triton-X for 16 hours at 4°C . Next, they were rinsed 3 times in 0.1 M phosphate-buffered saline before a 2-hour incubation with secondary antibodies: anti-mouse Alexa 488 (1:1000, Invitrogen) or Alexa 555 (1:1000, Invitrogen Molecular Probes). All procedures were performed at the GRI.

The remaining sections were stained to assess the possible development of an AD-like neuropathology with several APP knock-out mice (V3500, mouse monoclonal; 1:400, Millipore) and MAP2 (chicken polyclonal; 1:10,000, Abcam, Cambridge, UK) and 4D9 (chicken polyclonal; 1:5,000, Eako, Leppes, France) to the amygdala, $2 \times 2 \times 4$ (mouse anti-mouse D1, D4) and 5E10 (mouse monoclonal; 1:50, Abcam) to the entorhinal cortex. APP (1:1000, rabbit polyclonal; 1:200, Millipore) and A β (1:1000, polyclonal; 1:200, Abcam). We used a similar procedure for synaptophysin and VAcHT antibodies using appropriate secondary antibodies: anti-mouse Alexa 488 (1:1000, Invitrogen) or Alexa 555 (1:1000,

Invitrogen Molecular Probes (Paisley, UK).

2.5.5. Assessment of synaptic changes in DG

Synaptic density (VAcHT and synaptophysin) were analyzed with a procedure adapted from Rutten et al. (2005). We used the “grid” plugin in ImageJ to select 6 random areas per section: 3 for each hemisphere (1 for each layer of the DG: inner molecular layer, middle molecular layer [DGmm], and outer molecular layer [DGom]). High-power photomicrographs were taken (microscope, Olympus Vanox AHB3; camera, Olympus DP70; objective, Olympus DPlan Apo 100 \times oil) for each area 2 μm below the upper surface of the sections (when the synaptic terminals were in focus). The synaptic terminals were detected using ImageJ: after conversion of the image to gray scale, the plugin “background correction” was used to equalize the background level and correct for irregularities in illumination, then the background was subtracted, the resulting image was “thresholded” and “watershed” to quantify particles with size in the range of normal presynaptic terminals in the molecular layer of the DG (0.09–0.57 μm^2 ; Rutten et al., 2005). All settings were kept identical for all sections of each staining.

2.6. Statistical analysis

All data are expressed as the mean \pm standard error of mean. Analysis of variance with 2-factor (genotype and lesion) or repeated measures with different factors (hour, day, hole) were used, and multiple comparisons were performed using the Newman-Keuls test. A comparison to chance levels in behavioral tasks (object location, object novelty, and odor discrimination) was done using a 1-sample Student *t* test. For the histologic data, the percentage of change in the corresponding lesioned group was compared with its respective sham group using a 2-sample Student *t* test.

3. Results

3.1. Lesion extent and atrophy of DG molecular layer (day 111)

Fig. 2 provides a schematic representation of the minimum and maximum lesion extent in the APOE3 and APOE4 mice. A clear cell loss was seen in the lesioned EC, but no extensive damage was found in the hippocampus, presubiculum, perirhinal cortex, or postrhinal cortex. Therefore, the associated behavioral deficits were thought to be related to the damage of the EC cells. The lesion covered $<50\%$ of the EC, even in the injection zones, and did not cover the entire anteroposterior extent of the EC. The lesions mainly affected the posterior part of the EC. Thus, our bilateral injections of NMDA resulted in partial lesions of the EC as assessed 111 days after surgery.

For quantitative evaluation of the magnitude of the lesion, the damaged areas were measured. In the lateral and dorsal injection zones, lesioned APOE4 mice showed a trend toward a larger lesion in the lateral injection zones ($p = 0.09$); however, the magnitude of the lesion in the medial zones was similar in both genotypes. The mean value for the total area of the lesion in terms of lesion extent in the lateral and medial zones

The width of the inner two strata of the molecular layer where the EC inputs terminate was 127.50 \pm 1.54 μm for the sham APOE3 versus 126.87 \pm 2.44 μm for the lesioned APOE3 mice and 121.59 \pm 2.75 μm for the sham APOE4 versus 119.6 \pm 3.85 μm for the lesioned APOE4 mice. Thus, the EC lesion induced a similar shrinkage of $\sim 2\%$ and $\sim 1\%$ in the lesioned APOE3 and

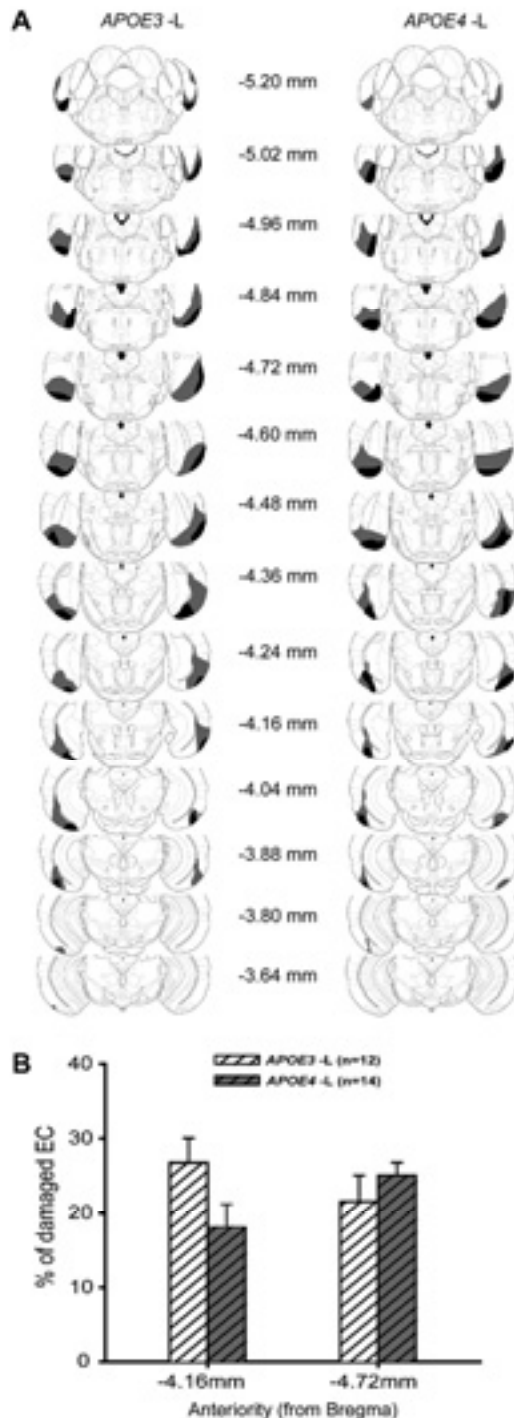


Fig. 2. Entorhinal cortex lesion extent. (A) Series of coronal planes (adapted from Paxinos and Franklin, 2004) showing the reconstruction of the smallest (dark gray) and largest (light gray) extents of lesions for APOE3 (left) and APOE4 (right) mice. Coordinates are relative to bregma. (B) Mean percentage of lesion \pm standard error of mean at each injection zone for APOE3 (dashed white) and APOE4 mice (dashed gray). Group

APOE4 mice, respectively ($p < 0.04$, vs. their respective sham group).

3.2. Behavior

3.2.1. Locomotor activity in a novel environment increased in APOE4 mice (days 27 and 110)

Locomotor activity was monitored for 8 hours in a novel environment at 27 and 110 days after surgery. The data for 1 lesioned APOE3 mouse and 2 sham APOE4 mice were lost because of photocell breakdowns. At the 27-day delay (Fig. 3A), the APOE4 mice were slightly more active than the APOE3 mice [genotype effect: $F_{(1,49)} = 4.44$, $p < 0.05$], but all mice ultimately reached the same baseline activity level (hour effect: $F_{(2,98)} = 111.48$, $p < 0.0001$). As shown in Fig. 3B, the APOE4 mice were again the most active [genotype effect: $F_{(1,49)} = 5.32$, $p < 0.05$] at the 110-day delay, although all groups finally reached the same level of baseline activity.

3.2.2. Slightly increased anxiety levels in APOE3 mice (day 35)

The time spent in the aversively lit box is shown in Fig. 3C. The APOE4 mice spent more time in the lit box than did their APOE3 counterparts [genotype effect: $F_{(1,51)} = 11.77$, $p < 0.005$]. No effect of the lesion was seen. The number of transitions between the 2 boxes was similar among all groups (APOE3 sham = 16.67 ± 2.42 ; APOE3 lesioned = 15.25 ± 2.47 ; APOE4 sham = 19.21 ± 1.97 ; APOE4 lesioned = 18.5 ± 1.43). Moreover, no group difference was seen in terms of entry latency into the lit box or the mean duration of visits (data not shown).

3.2.3. Barnes maze navigation deficits in lesioned APOE4 mice (days 60–75)

Spatial memory was evaluated in the Barnes maze task 60–75 days after surgery. One mouse in each group did not explore the maze or the holes. During the 5 training days (Fig. 4A), all groups reduced their latency to reach the target hole [day effect: $F_{(4,204)} = 53.26$, $p < 0.0001$]. Globally, the APOE3 mice found the target hole more slowly than did the APOE4 mice [genotype effect: $F_{(1,51)} = 8.09$, $p < 0.01$; genotype \times day interaction: $F_{(4,204)} = 2.59$, $p < 0.05$], and the lesioned mice were slower than the sham ones [lesion effect: $F_{(1,51)} = 5.87$, $p < 0.05$]. The number of errors before reaching the target hole diminished progressively [day effect: $F_{(4,204)} = 5.02$, $p < 0.005$]. Globally, the APOE4 mice made more errors than did the APOE3 mice [genotype effect: $F_{(1,51)} = 11.31$, $p < 0.005$], and the lesioned mice made more errors than the sham-operated ones [lesion effect: $F_{(1,51)} = 5.37$, $p < 0.05$, no genotype \times lesion interaction]. As often described in mice with a C57BL/6 background (O'Leary and Brown, 2012), the serial visiting strategy was predominantly used in all groups (Fig. 4B).

Spatial memory performance during the first probe trial (24 hours after the last acquisition trial, on day 64) is shown in Fig. 4C. The hole preference was influenced by the genotype [genotype \times hole interaction: $F_{(1,51)} = 5.24$, $p < 0.03$] and the lesion [lesion \times hole interaction: $F_{(1,51)} = 4.95$, $p < 0.04$]. Both sham groups and lesioned APOE3 mice displayed a marked bias for the target hole compared with the opposite one. Such a bias was not significant in the APOE4 lesioned mice. Although the lesioned APOE3 mice discriminated the target hole, they showed a reduced exploration of the target compared with their sham-operated counterparts ($p < 0.02$). During the long-term probe trial (11 days after the last

sizes are indicated in brackets. The percentage of lesion did not vary between genotypes.

2688

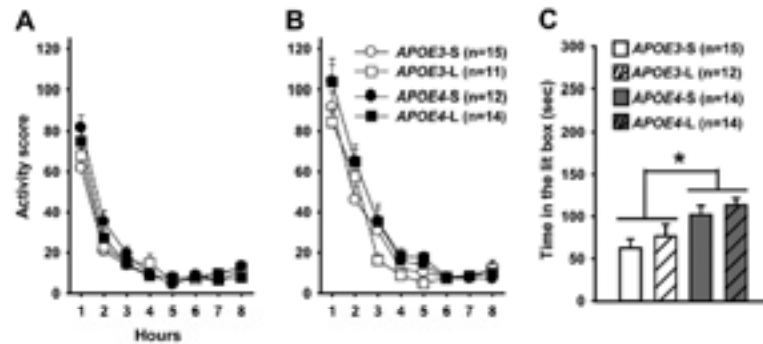
J.-B. Bott et al. / *Neurobiology of Aging* 34 (2013) 2683–2693

Fig. 3. Locomotor activity and light-dark tests. Locomotor activity recorded 27 days (A) and 110 days (B) after surgery. Data are shown as the mean activity score per hour \pm standard error of mean. Globally, APOE3 mice were slightly, but significantly, less active than APOE4 mice (see text for details). In the light-dark test performed on day 35 (C), APOE3 mice spent less time in the aversive lit box than did the APOE4 mice. Data are shown as mean \pm standard error of mean for sham APOE3 (APOE3-S), lesioned APOE3 (APOE3-L), sham APOE4 (APOE4-S), and lesioned APOE4 (APOE4-L) mice.

acquisition trial, Fig. 4D), the distribution of the visits was still affected by the lesion [lesion \times hole interaction: $F_{(1,34)} = 4.76$, $p < 0.04$], but not by the genotype. Similar to the first probe trial, the sham groups and lesioned APOE3 mice still displayed a preference for the target hole, a preference that was not observed in the lesioned APOE4 mice. During this second probe trial, the lesioned APOE3 mice only showed a trend toward a reduced preference for the target hole compared with their sham controls ($p = 0.052$).

3.2.4. Absence of effects on non-navigation tasks

Table 1 shows the performance in the non-navigation tasks. During the acquisition phase of the object location task (day 49), the

global exploration of the objects was similar (data not shown). During the retention phase, no effect was seen of genotype or lesion, and all groups displayed a significant preference for the displaced object [object location index: $t(15) > 5.37$; $p < 0.001$].

One lesioned APOE4 mouse did not explore the objects during the object recognition task performed on day 50 and was thus eliminated. The performance of the remaining mice was not influenced by genotype or lesion, and all groups preferred the unfamiliar object [object novelty index: $t(15) > 4.67$; $p < 0.001$].

One mouse in each of 3 groups (Table 1) did not explore the pots during the acquisition of the odor discrimination task (days 87–89). For the remaining mice, the repartition of the digging time between

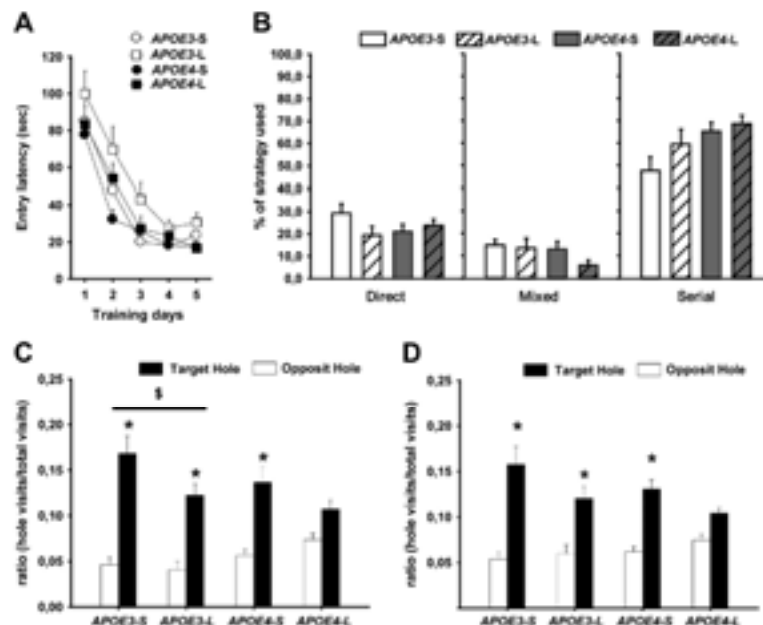


Fig. 4. Barnes Maze performance (day 60–75 after surgery). During training (A), APOE3 mice were slower than APOE4 mice (mean latency to reach target hole \pm standard error of mean), and all groups used the serial strategy more than others without any genotype or lesion effect. (B) Performance during the 2 probe trials conducted 24 hours (C) and 11 days (D) after training expressed as mean ratio of exploration for the target hole (black) and opposite hole (white). Only lesioned APOE4 (APOE4-L) mice did not discriminate the target hole from the opposite hole. * $p < 0.05$, significantly different from the opposite hole; § $p > 0.05$, significant difference in target ratios. Sham APOE3 mice (APOE3-S), $n = 14$; lesioned APOE3 mice (APOE3-L), $n = 11$; sham APOE4 mice (APOE4-S), $n = 13$; and APOE4-L, $n = 13$.

Table 1
Performance on non-navigational memory tests

	Object location (d 49) (chance = 0.33)	Object Novelty (d 50) (chance = 0.33)	Olfactory discrimination (d 100) (chance = 0.5)
APOE3 sham	0.52 ^a ± 0.02 (n = 15)	0.50 ^a ± 0.03 (n = 15)	0.89 ^a ± 0.03 (n = 14)
APOE3 lesioned	0.48 ^a ± 0.03 (n = 12)	0.56 ^a ± 0.03 (n = 12)	0.88 ^a ± 0.04 (n = 11)
APOE4 sham	0.46 ^a ± 0.02 (n = 14)	0.55 ^a ± 0.03 (n = 14)	0.87 ^a ± 0.02 (n = 14)
APOE4 lesioned	0.45 ^a ± 0.02 (n = 14)	0.54 ^a ± 0.02 (n = 13)	0.84 ^a ± 0.03 (n = 13)

^a Different from chance level ($p < 0.05$, t test).

the 2 odors was not influenced by genotype or lesion. All mice had a clear preference for the odor-paired pot [$t(15) = 8.06$; $p < 0.0001$].

3.3. Histologic evaluation (day 111)

We selected 6 mice per group for the histologic evaluation of the synaptic density in the DG 111 days after surgery. The selected mice performed all tasks and did not differ from the nonselected mice regarding their behavioral performance, lesion extent, or lesion magnitude at the injection sites. Representative photomicrographs for synaptophysin and VACHT immunohistochemistry are shown in the Supplementary Data 1.

3.3.1. Decreased synaptic density in the DG of lesioned APOE4 mice

The synaptic densities in the DG were assessed on synaptophysin immunofluorescence-stained material (Fig. 5A). In the inner molecular layer of the DG, the density of the synaptic terminals was reduced in the APOE4 mice compared with that in the APOE3 mice [genotype effect: $F_{(1,20)} = 4.64$, $p < 0.05$], but there was no effect of the lesion. In the DG_{int}, both genotype and lesion status influenced the density of the synaptic terminals [genotype effect: $F_{(1,20)} = 5.72$, $p < 0.03$; lesion effect: $F_{(1,20)} = 4.36$, $p < 0.05$]. However, only the lesioned APOE4 mice showed a significant reduction in synaptic density within this layer (−23% of their sham density, $p < 0.05$). In the DG_{oml}, lesion status, but not genotype, influenced the density of the synaptic terminals [lesion effect: $F_{(1,20)} = 6.06$, $p < 0.03$]. However, again only the lesioned APOE4 mice exhibited a significantly reduced synaptic density within this layer (−29% of their sham density, $p < 0.03$) 111 days after surgery.

3.3.2. Impaired cholinergic reorganization in DG of lesioned APOE4 mice

Cholinergic terminal densities were assessed using VACHT immunohistochemistry in the DG (Fig. 5B). In the DG_{int}, only the lesion status influenced the density of the cholinergic terminals [lesion effect: $F_{(1,20)} = 10.67$, $p < 0.004$]. Compared with their respective sham mice, lesioned APOE3 mice showed an important increase of cholinergic terminal density in this layer (+66% of their sham density, $p < 0.03$) 111 days after surgery. In the DG_{oml}, the lesion also influenced the density of the cholinergic terminals [lesion effect: $F_{(1,20)} = 6.06$, $p < 0.03$], and a significant interaction was seen between genotype and lesion [genotype × lesion interaction: $F_{(1,20)} = 5.67$, $p < 0.03$]. Only APOE3 lesioned mice showed a dramatic enhancement of cholinergic terminal density in this layer (+80% of their sham density, $p < 0.005$).

Relative optical density measurements of AChE activity are shown in Fig. 5C. No lesion effect was seen on AChE activity staining, although a clear increase was seen in the density of the VACHT terminals, as reported.

3.3.3. Absence of amyloid pathology or other neuropathology in the hippocampus

Finally, we did not find any amyloid neuropathology in the brains of the mice, despite the use of different antibodies (BAM10, which specifically recognizes human A β_{1-40} ; DE2B4, which

recognizes human and murine A β ; and AB5571, which recognizes only murine A β). Moreover, we did not find any detectable alteration of APP, neuronal nuclei, microtubule-associated protein 2, or glial fibrillary acidic protein staining.

4. Discussion

In the present study, we have shown that APOE4 mice, but not APOE3 mice, with partial bilateral EC lesions display severe navigation performance deficits associated with a synaptic loss and reduced reactive upregulation of cholinergic terminals in their DG. The specificity of the memory deficits in the spatial navigation task, the pattern of synaptic reorganization induced by partial EC lesions, and its possible relevance to the MCI state are discussed.

4.1. EC lesions induce severe navigation impairment only in APOE4 mice

In the Barnes maze task performed 60 to 75 days after surgery, the APOE3 mice were slower to reach the target hole throughout training, but they also made fewer errors and displayed good performance in the 2 probe trials. Thus, their longer latencies were most likely due to nonnesic factors, as suggested by their reduced locomotion in an unfamiliar environment and a slightly increased anxiety level, which was found previously (Moreau et al., 2013). Without EC lesions, the APOE3 and APOE4 mice did not differ in learning or remembering the position of the target hole, which is coherent with the lack of spontaneous spatial navigation deficits reported in middle-age males of other APOE4 mouse lines (Bour et al., 2008; Raber et al., 2000). However, the lesioned APOE4 mice showed no preference for the target hole, in contrast to the lesioned APOE3 mice. Thus, the EC lesion induced dramatic spatial memory impairment only when combined with an APOE4 genotype. Because both genotypes had similar lesion sites and extent, our results suggest that APOE4 exacerbated the effect of EC lesions. The 2 probe trials led to similar results, suggesting efficient spatial memory 24 hours and 11 days after acquisition (days 64 and 75 after surgery) in sham mice and a postacquisition delay-independent effect of the lesion in the APOE4 mice.

All groups of mice performed similarly well in non-navigational memory tasks, such as the object location task (day 49). The slight deficit found by Kornecook et al. (2010) in female mice of the same APOE4 mouse line has been related to a well-described higher sensitivity of females to the cognitive effect of APOE4 (Bour et al., 2008; Grootendorst et al., 2005; Raber et al., 2000). The lack of lesion effect in the object recognition task (day 50) might have been related to the preservation of the perirhinal cortex, which is strongly involved in object recognition (Burke et al., 2012). Thus, sparing of the direct connections between the perirhinal cortex and hippocampus (Van Strien et al., 2009), as well as limited damage to the lateral EC, which is more specifically involved in the processing of object attributes, might have contributed to the preservation of object recognition and location memories (Van Cauter et al., 2012). Finally, all groups had excellent odor discrimination performances (day 100 after surgery). The EC lesions were reported to induce

APOE4 et sensibilité exacerbée à la lésion entorhinale

2090

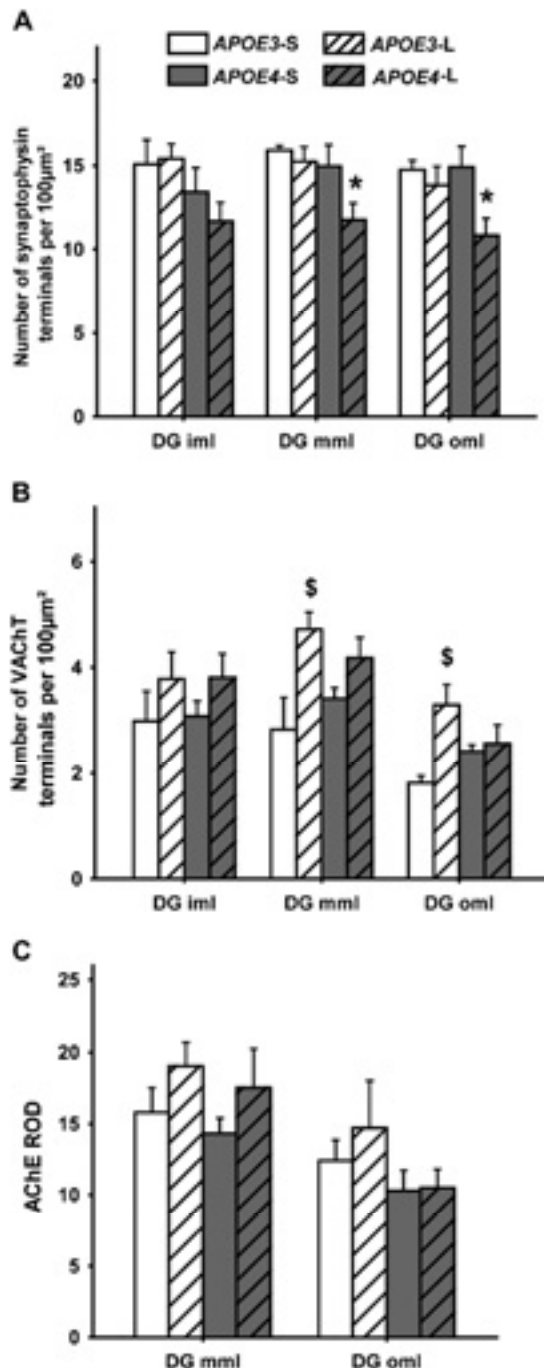
J.-B. Bott et al. / *Neurobiology of Aging* 34 (2013) 2083–2093

Fig. 5. Synaptophysin and cholinergic markers within dentate gyrus (day 111). (A) The lesion induced a decreased density of synaptophysin-positive terminals only in *APOE4* mice. (B) Only lesioned *APOE3* mice had an increased density of vesicular acetylcholine transporter (VACHT)-positive terminals. (C) Acetylcholinesterase (AChE) staining was not significantly influenced by genotype or lesion status. Data are shown as mean number of labeled terminals \pm standard error of mean for (A) and (B) and as mean relative optical density \pm standard error of mean for (C). * $p < 0.05$, lesioned *APOE4* mice (*APOE4-L*) differ from all other groups; \$ $p < 0.05$, lesioned *APOE3* mice (*APOE3-L*)

either facilitation or impairment in olfactory memory tasks (Ferry et al., 2006; Stäubli et al., 1984), but impairment seems to appear only with simultaneous presentation of odors during training (Otto and Garruto, 1997).

Taken together, our results have shown that the partial bilateral EC lesion selectively affected spatial navigation memory in the *APOE4* mice without impairing a wide range of other cognitive domains.

4.2. EC lesions induce synaptic impairments only in *APOE4* mice

The sham-operated *APOE3* and *APOE4* mice had similar synaptophysin particle densities in the DG, which confirms that *APOE4* does not induce major spontaneous synaptic alterations within the mouse hippocampus (Dumanis et al., 2009). EC lesions are known to induce transitory loss of synapses in the DG, followed by recovery within 28–90 days in adult mice (Hardman et al., 1997; White et al., 2001a). The dentate synaptophysin particle densities in *APOE3* mice were not affected 111 days after EC lesion creation. In contrast, lesioned *APOE4* mice showed more than a 20% decrease restricted to the DGmml and the DGomi, which specifically receive EC inputs. White et al. (2001b) have associated *APOE4* with an altered restoration of synaptophysin only in the DGmml, but this could be related to their use of a unilateral EC lesion, which would allow a potential contribution of contralateral projection remodeling. In our mice, the coexpression of normal *HAPP*, in addition to murine *APP*, might also have exacerbated the negative effects of *APOE4* on synaptic remodeling. However, it must be noted that we did not find any sign of amyloid accumulation in these mice. In addition, *APP* overexpression in mice has usually been associated with higher synaptic densities (Lee et al., 2010). Thus, a possible contribution of *HAPP* and its derivatives to the synaptic loss remains elusive at this stage.

After EC lesions have developed, recovery of synaptic densities is believed to depend at least in part on the sprouting of cholinergic fibers (Ramirez, 2001). Moreover, mild AD patients have shown some evidence of cholinergic sprouting in the DG (Geddes et al., 1985). In our mice, the AChE optical density was not significantly increased after EC lesions in any genotype. Blain et al. (2006) showed an *APOE4*-dependent deficit in the upregulation of AChE 30 days after unilateral electrolytic lesion, which was earlier than the 111 days we have reported with a partial bilateral lesion. Moreover, AChE changes were proposed to be principally related to DG atrophy induced by massive EC lesions or perforant path transection (Phinney et al., 2004). Thus, the use of a longer post-lesional delay and partial excitotoxic lesions, leading to less shrinkage, could therefore explain the weak effects on AChE. However, we performed VACHT immunohistochemistry to directly assess the density of the cholinergic terminals. The sham *APOE4* and *APOE3* mice showed similar densities in the VACHT terminals. That is coherent with the lack of structural cholinergic defect reported in *APOE4*-expressing mice (Bronfman et al., 2000). However, 111 days after the EC lesion, the *APOE3* mice showed massive upregulation of VACHT terminal densities in the DGmml and DGomi (+66% and +80%, respectively). In contrast, lesioned *APOE4* mice did not show any evidence of cholinergic reinnervation. Thus, *APOE4* does not appear to induce spontaneous cholinergic deficits per se; however, the presence of *APOE4* interferes with the ability of the cholinergic system to respond to EC input loss.

differ from their sham counterparts; $n = 6$ for all groups. Data are shown for the inner molecular layer of the DG (DGiml), middle molecular layer of the DG (DGmml), and outer molecular layer of the DG (DGomi).

4.3. Relevance for MCI

MCI refers to a heterogeneous population in which spatial navigation impairments have been proposed as a behavioral marker for subpopulations with a greater risk of subsequently developing AD. The amnesic MCI subpopulation already presents severe navigation impairments (Hort et al., 2007; Lacroix et al., 2009; Weniger et al., 2011). Moreover, MCI patients carrying APOE4 are characterized by a dramatic spatial disorientation similar to that observed later during AD in noncarriers (Lacroix et al., 2011). Thus, we propose that APOE4 might facilitate the earlier apparition of navigation impairments during MCI, before the complete spread of the pathology to the hippocampus by perturbing the hippocampal synaptic reorganization consecutive to the early EC atrophy characterizing MCI patients.

Our lesioned APOE4 mice also showed a loss of synapses in the DG that resemble that described in early AD (Hamos et al., 1989; Heinonen et al., 1995; Masliah et al., 1994). These mice have an impaired cholinergic plasticity compared with lesioned APOE3 mice. The APOE3-specific cholinergic sprouting found in our mice resembles the increased cholinergic activity described in MCI patients who were not assessed for the APOE genotype (DeKosky et al., 2002), which was proposed to occur in response to the loss of entorhinal inputs (Ikonomovic et al., 2003; Mufson et al., 2012). Thus, according to our results in lesioned APOE3 mice, the cholinergic upregulation observed in MCI might underlie a functional compensatory mechanism, which could be involved in the observed reversion to normal cognition in some patients (Koepsell and Monsell, 2012). Supporting this view, it was recently shown in monkeys that the cholinergic system contributed to the functional recovery of episodic memory after limbic lesions (Croxxon et al., 2012). The synaptic terminal density restoration has been associated with recovery of spatial memory in mice (Hardman et al., 1997). Thus, the navigation deficits of lesioned APOE4 mice could be related to their reduced synaptic density and, more specifically, to their impaired cholinergic remodeling. This led us to propose that, when EC neuronal loss occurs in humans, a failure in cholinergic compensatory mechanisms could explain the increased susceptibility of APOE4 carriers to present MCI (Barabash et al., 2009; Sachdev et al., 2012), and enhanced spatial deficits in MCI (Hort et al., 2007). Moreover, if cholinergic sprouting participates in the reversion from MCI to normal cognition, its impairment by APOE4 could also explain the low reversion rate observed in these patients (Koepsell and Monsell, 2012). It must be noted that our EC lesions were acutely induced, but in MCI, the neuronal loss is more progressive. However, progressive EC lesions have been reported to facilitate behavioral recovery and the sprouting response in rats (Ramirez et al., 1996). Thus, although additional studies with more progressive lesions are clearly needed, the implications of plastic responses with these progressive lesions are expected to be at least as important as in our conditions. In addition, studies of MCI patients to investigate hippocampal synaptic reorganization in relation to navigation impairments in APOE4 carriers are now clearly needed to confirm our hypothesis in humans. Finally, our results might also have some relevance to the outcome of cholinomimetic medications, which often induce some cognitive improvement for several months during the early stages of AD. The beneficial effect of these medications could rely on and possibly favor the upregulation of the cholinergic system in response to EC damage. It has been shown that such medications are less efficient in APOE4 carriers (Farlow et al., 1998; Poirier, 1999). Thus, the impaired cholinergic upregulation associated with APOE4 could also explain why these patients are less sensitive to cholinomimetic agents.

4.4. Conclusion

To the best of our knowledge, this is the first work to show that EC lesions induce exacerbated navigation impairments in APOE4 mice compared with APOE3 mice. In addition, compared with their APOE3 counterparts, the APOE4 mice with EC lesions also presented with a reduced synaptic density and nearly no reactional increase in the density of the cholinergic terminals in the DG. We therefore propose that APOE4 alters EC lesion-induced synaptic reorganizations in the hippocampus and thereby leads to navigation deficits. Synaptic deficits were found about 4 months after creation of an EC lesion. Whether APOE4 mice would have ultimately compensated for these deficits at a longer postlesion delay remains unknown. Studies with longer delays are currently undertaken to both clarify this point and to investigate other forms of synaptic remodeling. Nevertheless, our results suggest that therapeutic approaches aimed at supporting early synaptic reorganizations in the hippocampus of MCI patients could be an appropriate strategy to improve cognition in APOE4 carriers.

Disclosure statement

There is no actual or potential conflicts of interest. The mice were obtained through Department of Neurosympathetic Disorders, Merck Sharp & Dohme Corporation, West Point, PA, USA. All experimental procedures were conducted in conformity with institutional guidelines (council directive 87/848, October 19, 1987, Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale; National Institutes of Health publications, 86-23, revised 1985). Official permission references were E-67-482-13 for the animal facility and 67-292 for C.M. and 67-215 for J.-C.C. for animal experimentation; J.-B.B. worked under their responsibility.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from Alsace Alzheimer Haut-Rhin (68), the University of Strasbourg, the Centre National de la Recherche Scientifique, and the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. The authors want to thank Karin Geiger, Julien Aubert, and Marie Munch for their technical help in immunohistochemistry.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.04.018>.

References

- Arendt, T., Schindler, C., Brückner, M.K., Eschrich, K., Bigl, V., Zedlitz, D., Marosa, L., 1997. Plastic neuronal remodeling is impaired in patients with Alzheimer's disease carrying apolipoprotein e4 allele. *J. Neurosci.* 17, 536–529.
- Barabash, A., Marcos, A., Ancin, I., Vazquez-Alvarez, B., de Ugarte, C., Gil, P., Fernandez, C., Encinas, M., Lopez-Ibor, J.J., Cabanes, J.A., 2009. APOE, APOE2 and CHRNA7 genes in the conversion from amnesic mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 30, 1254–1264.
- Blain, J.F., Sullivan, P.M., Poirier, J., 2006. A deficit in astroglial organization causes the impaired reactive sprouting in human apolipoprotein E4 targeted replacement mice. *Neurobiol. Dis.* 21, 505–514.
- Bour, A., Grootendorst, J., Vogel, E., Kekic, C., Dodart, J.C., Bales, K., Moreau, P.H., Sullivan, P.M., Mathis, C., 2008. Middle-aged human apoE4 targeted-replacement mice show retention deficits on a wide range of spatial memory tasks. *Behav. Brain Res.* 193, 174–182.
- Bronfman, F.C., Tessier, I., Heffer, M.H., Havekens, L.M., Van Leuven, F., 2000. No evidence for cholinergic problems in apolipoprotein E knockout and apolipoprotein E4 transgenic mice. *Neuroscience* 97, 411–418.

- Bu, G., 2009. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 333–344.
- Burke, S.N., Maurer, A.P., Hartzell, A.L., Nematollahi, S., Uprety, A., Wallace, J.L., Barnes, C.A., 2012. Representation of three-dimensional objects by the rat perirhinal cortex. *Hippocampus* 22, 2032–2044.
- Cordeiro, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921–923.
- Cronson, P.L., Browning, P.C., Gaffan, D., Baxter, M.G., 2012. Acetylcholine facilitates recovery of episodic memory after brain damage. *J. Neurosci.* 32, 13787–13795.
- DeKosky, S.T., Ikonomovic, M.D., Styren, S.D., Beckert, L., Wisniewski, S., Bennett, D.A., Cochran, E.J., Kordower, J.H., Mufson, E.J., 2002. Upregulation of choline acetyltransferase activity in hippocampus and frontal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment. *Ann. Neurol.* 51, 145–155.
- de Leon, M.J., Conwit, A., Wolf, O.T., Tarshish, C.Y., DeSanti, S., Resnick, H., Tsai, W., Kandil, E., Scherer, A.J., Roche, A., Imort, A., Thom, E., Bobinski, M., Catoan, C., Lesbre, P., Schyer, D., Poirier, J., Reisberg, B., 2001. Prediction of cognitive decline in normal elderly subjects with 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxy-2-D-glucose/positron-emission tomography (FDG/PET). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 10966–10971.
- Dumanis, S.B., Tesoriero, J.A., Babus, L.W., Nguyen, M.T., Trotter, J.H., Ladu, M.J., Weeber, E.J., Turner, R.S., Xu, B., Rebeck, G.W., Hoe, H.S., 2009. ApoE4 decreases spine density and dendritic complexity in cortical neurons in vivo. *J. Neurosci.* 29, 15317–15322.
- Elcoroarintzabal Martin, X., Fernandez Martinez, M., Galdos Alcala, L., Molano Salazar, A., Bermejo Gandarias, R., Ingles Borda, S., Gomez Busto, F., Ullera Valente, J.M., Indakotoza Juanbelta, B., Gomez Bellarrain, M.A., de Pascorbo, M.M., 2011. Progression from amnesic mild cognitive impairment to Alzheimer's disease: ESR1 and ESR2 polymorphisms and APOE gene. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 32, 332–340.
- Farlow, M.R., Lahiri, D.K., Poirier, J., Davignon, J., Schneider, L., Hu, S.L., 1998. Treatment outcome of tacrine therapy depends on apolipoprotein genotype and gender of the subjects with Alzheimer's disease. *Neurology* 50, 669–677.
- Ferry, B., Ferreira, G., Traissard, N., Majchrzak, M., 2006. Selective involvement of the lateral entorhinal cortex in the control of the olfactory memory trace during conditioned odor aversion in the rat. *Behav. Neurosci.* 120, 1180–1186.
- Geddes, J.W., Monaghan, D.T., Cotman, C.W., Lott, I.T., Kim, R.C., Chui, H.C., 1985. Plasticity of hippocampal circuitry in Alzheimer's disease. *Science* 230, 1179–1181.
- Gomez-Isla, T., Price, J.L., McEwen, Jr., D.W., Morris, J.C., Growdon, J.H., Hyman, B.T., 1996. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 16, 4491–4500.
- Grootenboer, J., Boer, A., Vogel, E., Kelche, C., Sullivan, P.M., Dodart, J.C., Bales, K., Mathis, C., 2005. Human apoE targeted replacement mouse lines: h-*apoE4* and h-*apoE3* mice differ on spatial memory performance and avoidance behavior. *Behav. Brain Res.* 159, 1–14.
- Hamos, J.E., DeGennaro, L.J., Drachman, D.A., 1989. Synaptic loss in Alzheimer's disease and other dementias. *Neurology* 39, 355–361.
- Hardman, R., Evans, D.J., Fellows, L., Hayes, B., Rzepniak, H.T., Barnes, J.C., Higgins, G.A., 1997. Evidence for recovery of spatial learning following entorhinal cortex lesions in mice. *Brain Res.* 758, 187–200.
- Harrison, F.E., Reiserer, R.S., Tomarken, A.J., McDonald, M.P., 2006. Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze. *Learn. Mem.* 13, 809–819.
- Heinonen, O., Soisänen, H., Sorvali, H., Kosunen, O., Paljarvi, L., Koivisto, E., Riekkinen Sr., P.J., 1995. Loss of synaptophysin-like immunoreactivity in the hippocampal formation is an early phenomenon in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 64, 375–384.
- Hort, J., Lacro, J., Vyhalek, M., Bojar, M., Bures, J., Vlcek, K., 2007. Spatial navigation deficit in amnesic mild cognitive impairment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 4042–4047.
- Ikonomovic, M.D., Mufson, E.J., Wu, J., Cochran, E.J., Bennett, D.A., DeKosky, S.T., 2003. Cholinergic plasticity in hippocampus of individuals with mild cognitive impairment: correlation with Alzheimer's neuropathology. *J. Alzheimers Dis.* 5, 39–48.
- Jiao, Y., Sun, Z., Lee, T., Fusco, F.R., Kimble, T.D., Meade, C.A., Gathbertson, S., Reiser, A., 1999. A simple and sensitive antigen retrieval method for free-floating and slide-mounted tissue sections. *J. Neurosci. Meth.* 93, 149–162.
- Kadish, I., Van Groen, T., 2003. Differences in lesion-induced hippocampal plasticity between mice and rats. *Neuroscience* 116, 499–509.
- Kalova, E., Vlcek, K., Jarolimova, E., Bures, J., 2005. Allothetic orientation and sequential ordering of places is impaired in early stages of Alzheimer's disease: corresponding results in real space tests and computer tests. *Behav. Brain Res.* 159, 175–186.
- Kalcs, P., Slotboom, J., Gallinat, J., Mählberg, R., Cattapan-Ludewig, K., Wiest, R., Nyffeler, T., Buri, C., Federspiel, A., Kunz, D., Schroth, G., Kiefer, C., 2006. Examining the gateway to the limbic system with diffusion tensor imaging: the perforant pathway in dementia. *NeuroImage* 30, 713–720.
- Keesele, T.D., Mossiel, S.E., 2012. Reversion from mild cognitive impairment to normal or near-normal cognition: risk factors and prognosis. *Neurology* 79, 1591–1598.
- Kordower, J.H., Chu, Y., Saebians, G.T., DeKosky, S.T., Cochran, E.J., Bennett, D., Mufson, E.J., 2001. Loss and atrophy of layer II entorhinal cortex neurons in elderly people with mild cognitive impairment. *Ann. Neurol.* 49, 202–213.
- Kernecok, T.J., McKinsey, A.P., Ferguson, M.T., Dodart, J.C., 2010. Isoform-specific effects of apolipoprotein E on cognitive performance in targeted-replacement mice overexpressing human APP. *Genes Brain Behav.* 9, 182–192.
- Lacro, J., Andel, R., Vlcek, K., Macoska, V., Vyhalek, M., Tolat, M., Bojar, M., Hort, J., 2011. Spatial navigation and APOE in amnesic mild cognitive impairment. *Neurodegener. Dis.* 8, 169–177.
- Lacro, J., Vlcek, K., Vyhalek, M., Vajnerova, O., Ort, M., Holmerova, I., Tolat, M., Andel, R., Bojar, M., Hort, J., 2009. Spatial navigation testing discriminates two types of amnesic mild cognitive impairment. *Behav. Brain Res.* 202, 252–259.
- Lam, B.T., Sisodia, S.S., Lawler, A.M., Slont, H.H., Kott, C.A., Kearns, W.G., Pearson, P.L., Price, D.L., Gearhart, J.D., 1993. Introduction and expression of the 400 kilobase amyloid precursor protein gene in transgenic mice [corrected]. *Nat. Genet.* 5, 22–30.
- Lee, K.J., Mousa, C.E., Lee, Y., Sung, Y., Howell, B.W., Turner, R.S., Pak, D.T., Hoe, H.S., 2010. Beta amyloid-independent role of amyloid precursor protein in generation and maintenance of dendritic spines. *Neuroscience* 169, 344–356.
- Masliah, E., Mallory, M., Hansen, L., DeTeresa, R., Alford, M., Terry, R., 1994. Synaptic and neuritic alterations during the progression of Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 174, 67–72.
- McIlwain, K.L., Merrinweather, M.V., Yuva-Paylor, L.A., Paylor, R., 2001. The use of behavioral test batteries: effects of training history. *Physiol. Behav.* 73, 705–717.
- Morais, P.-H., Bott, J.B., Zerbini, C., Renger, J.J., Kelche, C., Cassel, J.C., Mathis, C., 2013. ApoE4 confers better spatial memory than apoE3 in young adult MAPP-Yac/apoE-TR mice. *Behav. Brain Res.* 243, 1–5.
- Muellet, S.G., Schuff, N., Rapoport, S., Elman, J., Weiner, M.W., 2008. Selective effect of ApoE4 on CA3 and dentate in normal aging and Alzheimer's disease using high resolution MRI at 4 T. *NeuroImage* 42, 42–48.
- Muellet, S.G., Weiner, M.W., 2009. Selective effect of age, ApoE4, and Alzheimer's disease on hippocampal subfields. *Hippocampus* 19, 558–564.
- Mufson, E.J., Binder, L., Counts, S.E., DeKosky, S.T., de Toledo-Morrell, L., Ginsberg, S.D., Ikonomovic, M.D., Perez, S.E., Scheff, S.W., 2002. Mild cognitive impairment: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol.* 123, 13–30.
- O'Leary, T.P., Brown, R.E., 2012. The effects of apparatus design and test procedure on learning and memory performance of C57BL/6J mice on the Barnes maze. *J. Neurosci. Meth.* 203, 315–324.
- Otto, T., Garruto, D., 1997. Rhinal cortex lesions impair simultaneous olfactory discrimination learning in rats. *Behav. Neurosci.* 111, 1146–1150.
- Paxinos, G., Franklin, K.B.J., 2004. The mouse brain atlas in stereotaxic coordinates. Elsevier Academic Press, London.
- Petersen, R.C., Roberts, R.O., Knopman, D.S., Boeve, B.F., Geda, Y.E., Ivnik, R.J., Smith, G.E., Jack Jr., C.R., 2009. Mild cognitive impairment: ten years later. *Arch. Neurol.* 66, 1447–1455.
- Petersen, R.C., Smith, G.E., Ivnik, R.J., Tangalos, E.G., Schaidt, D.J., Thibodeau, S.N., Kokmen, E., Waring, S.C., Kurland, L.T., 1995. Apolipoprotein E status as a predictor of the development of Alzheimer's disease in memory-impaired individuals. *JAMA* 273, 1274–1278.
- Pfrieger, F.W., 2010. Role of glial cells in the formation and maintenance of synapses. *Brain Res. Rev.* 63, 39–46.
- Phinney, A.L., Calhoun, M.E., Woods, A.G., Deller, T., Jucker, M., 2004. Stereological analysis of the reorganization of the dentate gyrus following entorhinal cortex lesion in mice. *Eur. J. Neurosci.* 19, 1733–1740.
- Poirier, J., 1999. Apolipoprotein E4, cholinergic integrity and the pharmacogenetics of Alzheimer's disease. *J. Psychiat. Neurosci.* 24, 147–153.
- Rabet, J., Wong, D., Yu, G.Q., Butini, M., Mahley, K.W., Pitas, R.E., Mucke, L., 2000. Apolipoprotein E and cognitive performance. *Nature* 404, 352–354.
- Ramirez, J.J., 2001. The role of axonal sprouting in functional reorganization after CNS injury: lessons from the hippocampal formation. *Restor. Neurol. Neurosci.* 19, 237–262.
- Ramirez, J.J., McQuilkin, M., Carrigan, T., MacDonald, K., Kelley, M.S., 1996. Progressive entorhinal cortex lesions accelerate hippocampal sprouting and spare spatial memory in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 15512–15517.
- Roses, A.D., 1996. Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Med.* 47, 387–400.
- Ruiten, B.P., Van der Kolk, N.M., Schafer, S., van Zandvoort, M.A., Bayer, T.A., Steinbusch, H.W., Schmitz, C., 2005. Age-related loss of synaptophysin immunoreactive presynaptic buttons within the hippocampus of APP751S1, PS1M146L, and APP751S1/PS1M146L transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 167, 161–173.
- Sachdev, P.S., Lipnicki, D.M., Crawford, J., Reppermund, S., Kochan, N.A., Trollor, J.N., Draper, B., Slavin, M.J., Kang, K., Liu, O., Mathes, K.A., Brodny, H., 2012. Risk profiles of subtypes of mild cognitive impairment: the Sydney memory and aging study. *J. Am. Geriatr. Soc.* 60, 24–31.
- Selkoe, D.J., 2012. Preventing Alzheimer's disease. *Science* 337, 1488–1492.
- Stübel, U., Ivy, G., Lynch, G., 1984. Hippocampal denervation causes rapid forgetting of olfactory information in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5885–5887.
- Sullivan, P.M., Mace, B.L., Maeda, N., Schmechel, D.E., 2004. Marked regional differences of brain human apolipoprotein E expression in targeted replacement mice. *Neuroscience* 124, 725–733.
- Sze, C.L., Troncoso, J.C., Kassas, C., Mouton, P., Price, D.L., Martin, L.J., 1997. Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 933–944.
- Van Caster, T., Camon, J., Ahrnsbe, A., Elduayen, C., Sargolini, F., Save, E., 2012. Distinct roles of medial and lateral entorhinal cortex in spatial cognition. *Cereb. Cortex* 23, 451–459.

- van Strien, N.M., Cappaert, N.L., Witter, M.P., 2009. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 272–282.
- Weniger, G., Ruhlstedt, M., Lange, C., Wolf, S., Irls, E., 2011. Egocentric and allocentric memory as assessed by virtual reality in individuals with amnesic mild cognitive impairment. *Neuropsychologia* 49, 518–527.
- Whishaw, I.Q., Tomie, J., 1996. Of mice and mazes: similarities between mice and rats on dry land but not water mazes. *Physiol. Behav.* 60, 1191–1197.
- White, F., Nicoll, J.A., Horsburgh, K., 2001a. Alterations in *ApoE* and *ApoJ* in relation to degeneration and regeneration in a mouse model of entorhinal cortex lesion. *Exp. Neurol.* 169, 307–318.
- White, F., Nicoll, J.A., Roses, A.D., Horsburgh, K., 2001b. Impaired neuronal plasticity in transgenic mice expressing human apolipoprotein E4 compared to E3 in a model of entorhinal cortex lesion. *Neurobiol. Dis.* 8, 611–625.
- Xu, F., Vitek, M.P., Colton, C.A., Poviti, M.L., Gharkholonarehe, N., Davis, J., Van Nostrand, W.E., 2008. Human apolipoprotein E redistributes fibrillar amyloid deposition in Tg-SwDI mice. *J. Neurosci.* 28, 5312–5320.
- Yassine, N., Lazaris, A., Dornier-Cloisek, C., Despres, O., Meyer, L., Maitre, M., Mensah-Nyagan, A.G., Casse, J.C., Mathis, C., 2013. Detecting spatial memory deficits beyond blindness in tg2576 Alzheimer mice. *Neurobiol. Aging* 34, 716–730.

Discussion de l'étude n°2

Résultats comportementaux

Dans cette étude, nous avons démontré que chez la Souris *APOE4*, la lésion entorhinale partielle induit spécifiquement des déficits de navigation spatiale en association avec une réduction de la densité synaptique et à un déficit de bourgeonnement cholinergique au niveau des zones de terminaison des voies perforantes dans le DG.

L'absence de déficit spontanée de navigation chez les souris *APOE4* témoins est cohérente avec les résultats obtenus chez des souris transgéniques *APOE4* mâles d'autres lignées à des âges équivalents (Raber et al. 2000 ; Bour et al. 2008). De plus, chez l'homme également, les effets négatifs de l'*APOE4* s'exprimeraient au cours de vieillissement essentiellement du fait de la présence de pathologies dégénératives (Praetorius et al. 2013 ; Foster et al. 2013).

En présence d'une lésion entorhinale bilatérale partielle, les souris *APOE4* présentent un déficit marqué au test de rétention du labyrinthe de Barnes alors que les souris *APOE3* lésées ont de bonnes performances de rétention malgré des lésions d'étendue similaire. Ce déficit paraît être spécifique des capacités de navigation, aucun déficit n'ayant été détecté dans les tâches où ce processus ne jouerait pas un rôle critique (reconnaissance d'objets, localisation d'objets, discrimination olfactive).

L'absence d'effet sur la reconnaissance d'objets pourrait s'expliquer notamment par le fait que le cortex périrhinal a été largement épargné par les lésions alors que cette structure semble être critique pour la reconnaissance des objets (Burke et al. 2012). Le fait que les capacités de détection de déplacement d'objets sont également préservées dans l'ensemble des animaux malgré l'atteinte du cortex entorhinal latéral est plus surprenant. En effet, le LEC serait particulièrement impliqué dans les traitements des objets contenus dans l'environnement (Ekstrom et al. 2003 ; Van Cauter et al. 2012) et notamment de l'emplacement des objets comme le suggère l'enregistrement des *Object-in-place cells* et des *Object-trace cells* dans cette structure (Tsao et al. 2013). Cette absence d'effet des lésions pourrait s'expliquer notamment par l'étendue limitée des dommages dans le LEC, nos lésions touchant plus massivement le MEC impliqué dans la cognition spatiale (Van Cauter et al. 2012).

Concernant les excellentes performances de discrimination olfactive de tous les groupes d'animaux, il faut noter que l'atteinte entorhinale induit des effets extrêmement contrastés sur la reconnaissance d'odeur allant d'une facilitation à l'induction de déficits sévères (Stäubli et al. 1984 ; Ferry et al. 2006). De plus, la dépendance de la discrimination olfactive au cortex entorhinal dépendrait du protocole utilisé, celle-ci étant la plus manifeste avec des protocoles d'apprentissages reposant sur la présentation simultanée des odeurs (Otto & Garruto 1997), or, notre protocole d'apprentissage reposait sur une présentation séquentielle des odeurs.

La sensibilité exacerbée des souris *APOE4* à la lésion entorhinale partielle dans la tâche de navigation suggère que, chez les patients MCI, l'atteinte précoce de cette structure suffirait à

***APOE4* et sensibilité exacerbée à la lésion entorhinale**

expliquer l'apparition de déficits de navigation qui caractérisent les porteurs de l'*APOE4* (Laczo et al. 2010). D'autre part, l'absence de déficit en reconnaissance et localisation d'objet chez nos souris suggère que ce serait plutôt l'atteinte connue et également précoce du cortex périrhinal (Braak et al. 2006) qui participerait au développement des déficits de reconnaissance et de localisation d'objets durant le MCI (Didic et al. 2011). Enfin, concernant les troubles précoces de reconnaissance olfactive des patients MCI, il est possible que l'atteinte entorhinale n'y joue pas un rôle central, ces déficits pouvant également s'expliquer par l'atteinte précoce d'autres régions olfactives (Price et al. 1991). De plus, il semblerait que les déficits olfactifs accompagnant le MCI soient plutôt liés à la pathologie amyloïde (présence de peptide et/ou dépôts amyloïdes) qui est absente chez nos souris. En effet, ces déficits olfactifs sont également présents chez les individus asymptomatiques ne présentant pas de pertes neuronales marquées (Wilson et al. 2009) et dans le cadre du syndrome de Down qui est associé à une amyloïdose marquée (Murphy et al. 1999).

Remodelages synaptiques

Les souris témoins des deux génotypes présentent des densités synaptiques similaires dans le DG, confirmant que l'*APOE4* n'induit pas en soit d'altérations synaptiques majeures dans l'hippocampe de la Souris (Dumanis et al. 2009). Cependant, 111 jours après la lésion, contrairement aux souris hAPP/*APOE3*, les souris hAPP/*APOE4* présentent une diminution de la densité synaptique dans les zones de terminaison des voies perforantes. L'absence de réduction de la densité synaptique chez les souris exprimant l'*APOE3* pourrait s'expliquer par une réinnervation du DG, la lésion entorhinale chez la Souris entraînant une perte initiale de synapses qui est progressivement compensée dans les 30 à 90 jours suivants (Hardman et al. 1997 ; White et al. 2001b). Ainsi, il est probable que nos souris hAPP/*APOE4* lésées présentent un déficit de bourgeonnement glutamatergique dans le DG, en accord avec les résultats obtenus avec des souris *APOE4-tr* (White et al. 2001b).

Concernant l'innervation cholinergique du DG, là encore, les souris témoins des deux génotypes présentent des densités similaires cohérentes avec l'absence d'atteintes structurelles cholinergiques spontanées chez les souris exprimant l'*APOE4* (Bronfman et al. 2000). La lésion entorhinale est associée à un bourgeonnement cholinergique dans les zones désafférentées du DG chez les rongeurs (Lynch et al. 1972 ; Ramirez 2001) comme chez les patients DTA (Geddes et al. 1985) et MCI (Dekosky et al. 2002 ; Ikonovic et al. 2003 ; Mufson et al. 2012). Dans notre étude, seules les souris *APOE3* présentent une augmentation de la densité des terminaisons cholinergiques dans le DG après lésion entorhinale. Ainsi, les souris *APOE4* présenteraient également un déficit de bourgeonnement cholinergique en cohérence avec les résultats obtenus chez des souris *APOE4-tr* (Blain et al. 2006).

Par conséquent, les déficits de navigation caractérisant les patients MCI porteur de l'*APOE4* pourraient être causés par une moindre capacité de compensation synaptique face à la déconnexion hippocampique induite par la perte de neurones entorhinaux. Cette hypothèse est d'autant plus plausible que les individus porteurs de l'*APOE4* ont également des retards de récupération fonctionnelle après traumatisme crânien (Teasdale et al. 1997 ; Friedman et al. 1999) qui seraient causés par des déficits des mécanismes de compensation plutôt que par une sévérité plus importante de l'atteinte initiale (Zhou et al. 2008). Chez la souris *APOE4* aussi, les déficits de récupération après un traumatisme crânien expérimental (Sabo et al. 2000 ;

APOE4 et sensibilité exacerbée à la lésion entorhinal

Bennet et al. 2013) seraient liées à un déficit des mécanismes de réparation plus qu'à l'activation de mécanismes pathologiques (Crawford et al. 2009).

Conclusion

Nos résultats suggèrent que le développement précoce de déficits de navigation chez les patients *APOE4* pourrait être lié à l'atteinte du cortex entorhinal. Ainsi, chez nos souris, une lésion dont l'ampleur ne suffit pas à provoquer un déficit chez les *APOE3* est-elle suffisante pour entraîner un déficit sévère chez les *APOE4*, résultat qui est en cohérence avec l'hypothèse d'une sensibilité cognitive exacerbée aux lésions entorhinales en présence de l'*APOE4*.

Ces déficits pourraient notamment s'expliquer par une moindre capacité de compensation et de réinnervation synaptique et notamment de bourgeonnement cholinergique chez les souris *hAPP/APOE4*. Cependant, comme les souris *hAPP/APOE3* lésées présentent à la fois une récupération glutamatergique et un bourgeonnement cholinergique, à cette étape de mon travail de thèse, il est prématuré de chercher à déterminer quelle est la contribution respective de ces deux types de réorganisations synaptiques à la récupération fonctionnelle. Il existe néanmoins un argument indirect en faveur d'un rôle fonctionnel du bourgeonnement cholinergique à la lumière d'un travail antérieur du laboratoire. En effet, des souris C57BL/6J avec une lésion partielle du cortex entorhinal présentent un déficit massif de performances de rétention dans des tâches de navigation spatiale (piscine de Morris et labyrinthe de Barnes) lorsque l'on ajoute une lésion massive et sélective des neurones cholinergiques du MSDBB (Thèse de Pierre-Henri Moreau, 2011). Cette seconde lésion ayant notamment empêché le bourgeonnement cholinergique, il est possible que les déficits massifs obtenus avec la double lésion soient liés à l'absence d'un effet compensatoire de ce bourgeonnement.

Afin de prendre en compte l'aspect dynamique des phénomènes de bourgeonnement et de dissocier les effets des bourgeonnements cholinergiques et glutamatergiques sur la récupération fonctionnelle, j'ai donc entrepris une troisième étude en utilisant différents délais post-lésionnel.

Etude n°3

Quelle est la contribution respective des bourgeonnements cholinergique et glutamatergique à la compensation du syndrome de déconnexion hippocampique ?

Les résultats de l'étude précédente suggèrent que les déficits de réorganisation synaptique, notamment de bourgeonnement cholinergique et glutamatergique, pourraient participer à une sensibilité exacerbée aux conséquences cognitives des lésions entorhinales en présence de l'allèle *APOE4*. Afin d'étudier la contribution respective de ces deux formes de réorganisation synaptique à la compensation fonctionnelle de la désafférentation hippocampique, nous avons utilisé les souris *hAPP/APOE4* comme un outil permettant d'étudier la dynamique de récupération fonctionnelle en l'absence de bourgeonnement cholinergique. De plus, à l'aide d'une approche électrophysiologique et optogénétique, nous avons exploré les mécanismes potentiels par lesquels le bourgeonnement cholinergique pouvait compenser la désafférentation hippocampique induite par lésion entorhinale.

Quelle est la contribution respective des bourgeonnements cholinergique et glutamatergique à la compensation du syndrome de déconnexion hippocampique ?

Contexte scientifique général

Le MCI est une condition clinique labile pouvant mené à la démence (Petersen et al. 2001), bien que cet état puisse resté stable (Bennett et al. 2002). Seize à 38% des patients MCI présentent même un minimum d'un épisode de rémission spontanée vers un niveau normal de performance cognitive (Koepsell et al. 2012 ; Roberts et al. 2013). Ainsi, le MCI représente probablement la dernière fenêtre thérapeutique crédible permettant d'intervenir significativement sur la progression de la pathologie (Selkoe 2012).

La grande variabilité interindividuelle dans la progression clinique du MCI pourrait notamment traduire l'action de mécanismes compensatoires limitant l'expression symptomatique du syndrome de déconnexion hippocampique. Si c'est le cas, il est envisageable que la perturbation de ces mécanismes puisse contribuer à la progression du MCI ainsi qu'à la conversion vers la démence. Or, les individus porteurs de l'allèle *APOE4* ont plus de risque de développer un MCI (Brainerd et al. 2013), présentent moins de rémission cognitive (Koepsell et al. 2012 ; Kudrnovsky-Moser et al. 2013 ; Roberts et al. 2013) et progressent plus facilement vers la démence (Xu et al. 2013). L'ensemble de ces caractéristiques est particulièrement compatible avec un déficit de compensation de la déconnection partielle de l'hippocampe caractérisant le MCI.

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

Cependant, les phénomènes mis en jeu dans la compensation de la désafférentation hippocampique ne sont pas clairement identifiés. Plusieurs changements ont lieu dans la formation hippocampique spécifiquement durant le MCI. Au sein de la formation hippocampique, on observe notamment l'augmentation parallèle du niveau d'expression de l'*APOE* (Glöckner et al. 2002), de l'innervation cholinergique (Dekosky et al. 2002 ; Ikonovic et al. 2003) ainsi que de l'activité des réseaux neuronaux (Putchá et al. 2011). Tous ces changements sont absents chez des sujets cognitivement normaux et tendent à disparaître avec la conversion vers la démence, ce qui en font des mécanismes compensatoires potentiels. D'ailleurs, durant le MCI, le cortex entorhinal et l'hippocampe présentent spécifiquement une augmentation transitoire de l'expression de gènes impliqués dans la synaptogénèse, la plasticité synaptique, le guidage axonal et la facilitation de l'excitabilité neuronale (Berchtold et al. 2014).

Il reste donc à déterminer parmi ces phénomènes propres au MCI et qui co-évoluent parallèlement lesquels sont pathologiques et lesquels sont compensateurs.

Bourgeoisements synaptiques et compensation fonctionnelle

Un mécanisme potentiel pourrait-être le bourgeoisement de collatérales cholinergiques dans les zones désafférentées du DG qui s'observe à la fois chez les rongeurs après lésion entorhinale (Lynch et al. 1972 ; Ramirez 2001) et chez le patient MCI (Geddes et al. 1985). De plus, le MCI n'étant caractérisé que par des pertes partielles de neurones entorhinaux, le bourgeoisement de collatérales des fibres entorhinales survivantes pourrait également contribuer à une réinnervation plus homotypique. La réinnervation glutamatergique des couches désafférentées joue probablement un rôle important dans la récupération fonctionnelle. En effet, dans le cadre de lésions partielles, les projections survivantes en provenances des zones non-lésées du cortex entorhinal pourraient présenter un bourgeoisement de collatérales et réinnerver les zones désafférentées de manière plus homotypique que le bourgeoisement cholinergique (Kadish et al. 2003). Cela n'a cependant jamais été directement démontré chez la Souris. Chez le Rat, la réinnervation par des collatérales de fibres entorhinales a été démontrée après une lésion entorhinale unilatérale. En effet, grâce à la présence des voies perforantes croisées, une lésion unilatérale massive va entraîner le bourgeoisement de collatérales des projections intactes du cortex entorhinal

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

contralatéral qui vont progressivement réinnerver la zone désafférentée (Steward 1976 ; Deller et al. 1996). Par conséquent, il semble bien que les voies perforantes soient capables de produire un bourgeonnement de collatérales et d'induire une réinnervation fonctionnelle de l'hippocampe désafférenté. Néanmoins, en l'absence de voies perforantes croisées significatives chez la Souris (Van Groen 2002) ou le Primate (Witter & Amaral 1991), la réinnervation glutamatergique homotypique ne pourrait provenir que de collatérales ipsilatérales. Enfin, il faut rappeler que d'autres circuits glutamatergiques hippocampiques pourraient également concourir à la réinnervation glutamatergique (Ramirez 2001). Quoiqu'il en soit, il apparaît que la dynamique de réinnervation synaptique reste globalement très similaire entre rat et souris (Hardman et al. 1997).

Si les réorganisations synaptiques hippocampiques, notamment cholinergiques, sont étudiées depuis plus de 40 ans (Lynch et al. 1972), la plupart des études se focalisent uniquement sur le DG, et le plus souvent chez le Rat. Or, le cortex entorhinal innerve directement l'ensemble de l'hippocampe (Van Strien et al. 2009) et donc les réorganisations dans les autres régions pourraient également contribuer à la récupération fonctionnelle. De plus, les mécanismes potentiellement impliqués dans la compensation de la déconnection glutamatergique de l'hippocampe par le bourgeonnement cholinergique restent particulièrement obscurs. En effet, ce phénomène n'a jamais été directement mis en relation avec la compensation d'une altération comportementale, notamment par le manque d'outils permettant de moduler spécifiquement le bourgeonnement cholinergique sans impacter le fonctionnement basal de l'innervation cholinergique. Or, les souris *hAPP/APOE* représentent potentiellement un tel outil étant donné que les souris *hAPP/APOE4* présentent un déficit de bourgeonnement cholinergique (publication n°2).

Il a été démontré qu'après lésion entorhinale, les souris transgéniques exprimant l'*APOE4* montrent des déficits de réorganisations synaptiques dans le DG (White et al. 2001b), notamment de bourgeonnement cholinergique (Blain et al. 2006). Néanmoins, en absence d'évaluation cognitive, les conséquences fonctionnelles de ces déficits synaptiques restent spéculatives. De plus, l'existence même du bourgeonnement cholinergique a été remise en cause par des études suggérant qu'il ne serait qu'un artefact produit par l'atrophie du tissu causée par la désafférentation de l'hippocampe (Phinney et al. 2004). De plus, il apparaît que les différents marqueurs cholinergiques ne traduisent pas tous un bourgeonnement

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

cholinergique (Aubert et al. 1994 ; Henderson et al. 1998), faisant douter de la fonctionnalité de ce phénomène, voire de son existence même. Or, le développement des approches optogénétiques permettant d'activer sélectivement un phénotype spécifique de neurones avec une résolution temporelle d'ordre physiologique permettrait d'évaluer les changements de sensibilité à la modulation cholinergique induits par le bourgeonnement. Cette approche est particulièrement adaptée pour démontrer la fonctionnalité du bourgeonnement et pour explorer les mécanismes par lesquels il est capable de compenser la désafférentation glutamatergique.

Les phénomènes de bourgeonnement synaptiques seraient fortement dépendant des hormones sexuelles chez les femelles (Kadish et al. 2009). En effet, les hormones sexuelles potentialiseraient les réorganisations cholinergiques (Kadish et al. 2002a) et glutamatergiques (Morse et al. 1986) *via* leurs effets neurotrophiques facilitant synaptogénèse et spinogénèse dans l'hippocampe (Liu et al. 2001). Ainsi, si les souris *hAPP/APOE4* mâles représentent un modèle intéressant pour étudier l'impact d'un déficit de bourgeonnement cholinergique sur la récupération fonctionnelle, il serait intéressant de déterminer si chez les souris *hAPP/APOE4* femelles les hormones sexuelles sont capables de compenser les effets délétères de l'*APOE4* sur le bourgeonnement cholinergique. En effet, à l'heure actuelle, aucune étude n'a évalué les capacités de bourgeonnement synaptique chez des souris *APOE4* femelles.

Objectifs de l'étude

Afin de déterminer la contribution respective des réorganisations cholinergiques et glutamatergiques dans l'hippocampe à la compensation fonctionnelle de la déconnexion hippocampique, nous avons utilisé les souris *hAPP/APOE4* en tant que modèle présentant un déficit de bourgeonnement sans atteinte du fonctionnement cholinergique normal.

Nous avons reproduit des lésions bilatérales partielles du cortex entorhinal chez des souris *hAPP/APOE3* et *hAPP/APOE4* des deux sexes afin de déterminer si les hormones sexuelles sont capables de compenser les effets négatifs de l'*APOE4*. Le profil de récupération fonctionnelle de ces souris dans la tâche du labyrinthe de Barnes a ensuite été évalué à trois délais post-lésionnels (30, 70 et 170 jours après la lésion) en parallèle avec l'étendue des

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

réorganisations synaptiques hippocampiques. L'étude précédente portait sur un seul délai post-lésionnel de 60-75 jours pour la tâche du labyrinthe de Barnes et de 111 jours pour l'évaluation du bourgeonnement. Les terminaisons cholinergiques ont été quantifiées par immunomarquage de la protéine VAcHT, tandis que les réorganisations des terminaisons glutamatergiques principales ont été étudiées *via* l'immunomarquage de la protéine VGLUT1, celle-ci étant fortement exprimée dans les terminaisons des cellules principales corticales et hippocampiques (Fremeau et al. 2004).

Enfin, nous avons utilisé des souris *ChAT-ChR2* exprimant le canal rhodopsine-2 spécifiquement dans les neurones cholinergiques pour déterminer en quoi le bourgeonnement cholinergique module l'influence cholinergique sur l'hippocampe par une approche combinant des enregistrements électrophysiologiques extracellulaires avec des stimulations optogénétiques des neurones cholinergiques projetant sur l'hippocampe.

Publication n°3

Bott J-B., Héraud C., Cosquer B., Herbeaux K, Aubert J., Sartori M., Zerbinatti C.,
Cassel J-C., Goutagny R., Mathis C.

APOE4-sensitive cholinergic sprouting compensates hippocampal disconnection

Manuscrit avant soumission.

Ce manuscrit est prévu pour publication en tant que short-communication, Cependant, pour faciliter la lecture, les principales figures ainsi que les figures supplémentaires sont inclusent dans le corps du texte.

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

***APOE4*-sensitive cholinergic sprouting compensates hippocampal
disconnection**

Jean-Bastien Bott¹, Céline Heraud¹, Brigitte Cosquer¹, Karine Herbeaux¹, Julien Aubert¹, Maxime Sartori¹, Celina Zerbinatti², Jean-Christophe Cassel¹, Romain Goutagny^{1*}, Chantal Mathis^{1*}

¹ *Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives, CNRS-UMR7364, Université de Strasbourg, Neuropôle de Strasbourg GDR/CNRS2905, Strasbourg, France.*

² *Merck Sharp & Dohme Corp., Department of Neurosymptomatic Disorders, West Point, USA*

** contributed equally to this work*

Corresponding author: Chantal Mathis, PhD

Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives, UMR7364 CNRS, Université de
Strasbourg, 12 rue Goethe, F-67000 Strasbourg, France

Phone: (33)368851876

E-mail: chantal.mathis@unistra.fr

Conflict of Interest: The authors declare no competing financial interest

Key words:

**Entorhinal cortex–Synaptic sprouting–Spatial memory –Acetylcholine–*APOE*–Mild
Cognitive Impairment–Alzheimer’s disease.**

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique**Abstract**

The Mild Cognitive Impairment (MCI) often precedes Alzheimer's disease (AD) and is characterized by a loss of entorhinal neurons leading to a hippocampal disconnection syndrome associated with aberrant hippocampal hyperactivity. Despite the lack of direct evidence, the concomitant sprouting of cholinergic fibers within the hippocampus has been proposed to eventually compensate this disconnection syndrome. Compared to patients bearing the *APOE3* allele, *APOE4*-carriers are more prone to develop MCI and show a faster transition to AD. Thus, impaired compensatory mechanisms may contribute to *APOE4*'s pathological effects. Using partial entorhinal lesions in transgenic mice, we demonstrated that a transient cholinergic sprouting followed by a slower glutamatergic reinnervation contributed to functional recovery. Interestingly, the cholinergic sprouting and related recovery were altered only in male but not female *APOE4* mice, whereas the glutamatergic reinnervation was altered in both sexes. Finally, in contrast with reports suggesting a major amyloid contribution to hippocampal hyperactivity in AD, we found that entorhinal neuronal loss was sufficient to trigger abnormal activities that were normalized by optogenetic cholinergic stimulations. Together, these data indicate that impaired synaptic compensations could contribute to the faster cognitive decline of *APOE4* MCI patients. Therefore, targeting sexual hormone signalization or supporting the cholinergic control of hippocampal aberrant activity may represent promising alternative therapeutic strategies during MCI, especially for *APOE4*-carriers.

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique**Introduction**

MCI is a clinical condition (1) that often leads to Alzheimer's disease (AD) and is anatomically characterized by early neuronal loss in the entorhinal cortex (EC). The loss of entorhinal inputs to the hippocampus, leading to a 'hippocampal disconnection syndrome' (2-3), is thought to drive cognitive decline (4). However, clinical trajectories vary markedly from abrupt AD-conversion to long-lasting MCI or even reversion to normal cognition (5). Thereby, some mechanisms may compensate for the hippocampal disconnection. Compared with *APOE3* allele carriers, *APOE4*-carriers have increased risk for MCI (6), faster transition to AD (7) and less reversion to normal cognition (5), indicating that the compensation could be altered in these patients. During MCI, a transient hippocampal cholinergic sprouting (8) has been proposed as a putative compensatory mechanism despite the lack of direct evidence. Since *APOE4*-patients are less sensitive to anticholinesterase therapies (9), the cholinergic sprouting may be impaired by *APOE4*. In support for this hypothesis, *APOE4* transgenic mice have been associated with impaired cholinergic sprouting in the hippocampal dentate gyrus (DG) after EC lesions (10-11).

However, alteration in cholinergic sprouting has never been directly related to impaired behavioral recovery, and the potential contribution of glutamatergic reorganization is underexplored. In addition, synaptic reorganization in extra-dentate hippocampal fields has never been characterized, even though the EC innervates all hippocampal sub-regions (12). More importantly, the mechanisms underlying a cholinergic compensation of hippocampal glutamatergic disconnection remain elusive.

To determine the respective contribution of hippocampal cholinergic and glutamatergic sproutings to the functional compensation of hippocampal disconnection, we induced partial bilateral entorhinal lesions in *APOE3* and *APOE4* targeted-replacement mice and determined the time course of behavioral recovery in a Barnes-maze task as well as

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

cholinergic and glutamatergic reorganizations in the main hippocampal subregions. Using optogenetic approaches, we also assessed whether the lesion-induced sprouting of cholinergic fibers tunes the cholinergic modulation of hippocampal network in mice harboring the channel-rhodopsin 2 specifically in cholinergic neurons (*Chat-ChR2* mice).

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

Results and Discussion:

To model the hippocampal disconnection syndrome, we induced bilateral partial EC lesions with stereotaxic NMDA excitotoxin micro-injections. Lesion size did not differ between groups and mice with lesion extending outside the EC were excluded ([Supplemental table1](#)).

Supplemental table 1. Percentage of lesioned EC

Dpl	Male <i>APOE3</i>	Male <i>APOE4</i>	Female <i>APOE3</i>	Female <i>APOE4</i>
30	39.196% ± 4.42	37.225% ± 4.37	44.532% ± 3.29	39.344% ± 3.11
70	39.474% ± 2.05	36.243% ± 4.66	40.957% ± 2.79	36.478% ± 2.59
170	40.122% ± 2.45	39.728% ± 2.33	34.362% ± 6.16	37.254% ± 3.91

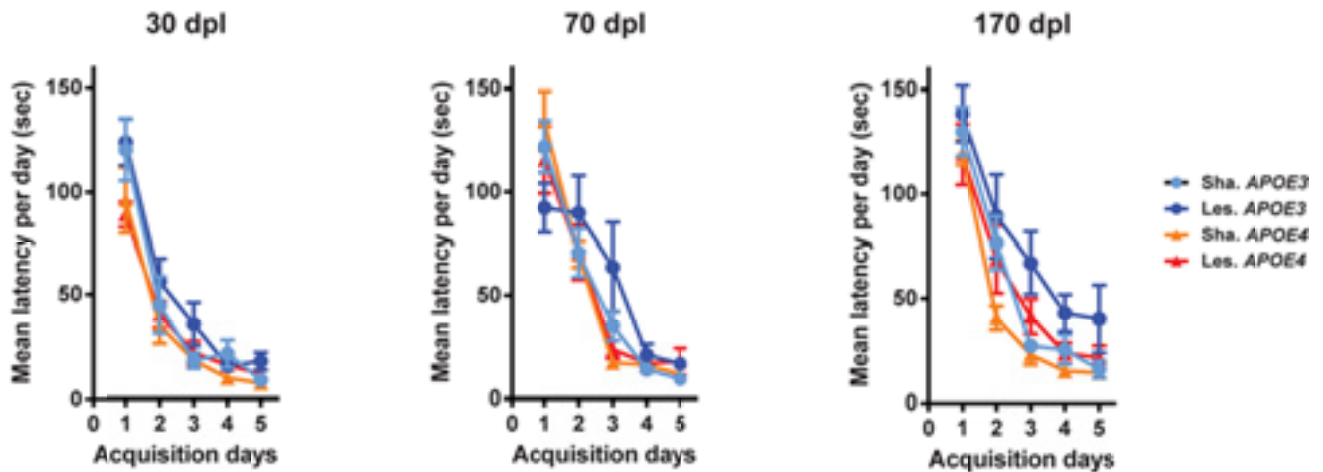
Data are presented as mean ± SEM

Table 1 provides lesion extent for all lesioned groups. There was no significant differences in the lesion extent between genotype ($F_{(1;78)}=2.073$, $p=0.16$), sex ($F_{(1;78)}=0.355$, $p=0.55$), post-lesional delays ($F_{(2;78)}=0.080$, $p=0.92$) or interaction among these factors. A clear cell loss was observed in the NMDA-lesioned EC. Mice with extensive damage to the hippocampus (>5.0%), presubiculum (>10%), perirhinal (>10%) or postrhinal (>10%) cortices were excluded. Finally, a total of 21 *APOE3* and 30 *APOE4* lesioned male mice as well as 19 *APOE3* and 22 *APOE4* lesioned female mice were included in analysis.

Since spatial memory impairments occur in MCI (**13**), especially in *APOE4*-carriers (**14**), we evaluated in male *APOE3* and *APOE4* mice the spatial memory recovery in a Barnes Maze task at 30, 70 and 170 days post-lesion (dpl). Following five acquisition days ([Supplemental Figure 1](#)), memory performances were measured in terms of target quadrant preference during a probe-trial 24 hours after the last acquisition session ([Figure 1a and supplemental table 2](#)). These retention performances were influenced by the post-surgical delay (delay*quadrant interaction: $F_{(6;285)}=2.49$; $p=0.02$) and the genotype (genotype*quadrant interaction: $F_{(3;285)}=5.68$; $p=0.0008$). However, all sham-mice visited more the target quadrant than the others or than chance, indicating a good recall of the target position. Lesioned-*APOE3* mice

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

were slightly impaired only at 30 dpl. On the opposite, lesioned-*APOE4* mice were deeply impaired at both 30 and 70 dpl before recovering at 170 dpl. Thus, *APOE4*-mice exhibited slower recovery than *APOE3*-mice following partial EC lesion.

Supplemental figure 1. Male *APOE*-mice learning in the Barnes maze.

During the 5 training days, all groups reduced the time needed to reach the target hole (day effect: $F_{(4,380)}=378.821$, $p<0.00001$) demonstrating a similar motivation to escape the maze. However, during the acquisition, mice preferentially developed a non-spatial serial strategy to solve the task, as frequently described in the C57BL/6J background. On the contrary, during the probe trial, only spatial strategies allowed the expression of a preference for the target hole. Thus this trial was used for assessing spatial memory performances (Figure 1a, in the main text).

To determine the extent of glutamatergic and cholinergic presynaptic reorganizations, we performed immunostaining against the vesicular glutamatergic transporter 1 (VGLUT1) and vesicular acetylcholine transporter (VACHT) respectively (Figure 1b and supplemental table 3-4).

Lesion-induced glutamatergic changes were layer- and delay-dependent (lesion*layers*delay interaction: $F_{(30,1005)}=2.117$; $p=0.00046$). In lesioned-*APOE3* mice, glutamatergic input loss was only present at 30 dpl and restricted to layers receiving entorhinal inputs. In contrast, at 30 dpl, lesioned-*APOE4* mice exhibited a loss of glutamatergic inputs in most hippocampal

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

layers (Figure 1b), suggesting an overall perturbation of intra-hippocampal glutamatergic networks. Furthermore, this glutamatergic loss was maintained at 70 dpl in layers receiving entorhinal inputs, indicating a slower glutamatergic reinnervation in lesioned-*APOE4* mice.

Post-lesional delay and genotype also influenced layer-specific cholinergic changes (layer*delay*genotype*lesion interaction: $F_{(30;1005)}=1.505$; $p=0.04$). At 30 dpl, lesioned-*APOE3* presented a cholinergic sprouting specifically in the deafferented DG middle molecular layer. At 70 dpl, this cholinergic sprouting expanded to some non-deafferented layers before disappearing at 170 dpl. Interestingly, lesioned-*APOE4* showed no evidence of cholinergic sprouting whatever the layer considered. Thus, lesioned-*APOE3* mice that had a faster behavioral recovery also expressed a transient cholinergic sprouting. However, the delayed glutamatergic sprouting in lesioned-*APOE4* mice might also have contributed to their delayed behavioral recovery, precluding any conclusion about the functional role of the cholinergic sprouting at this step.

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

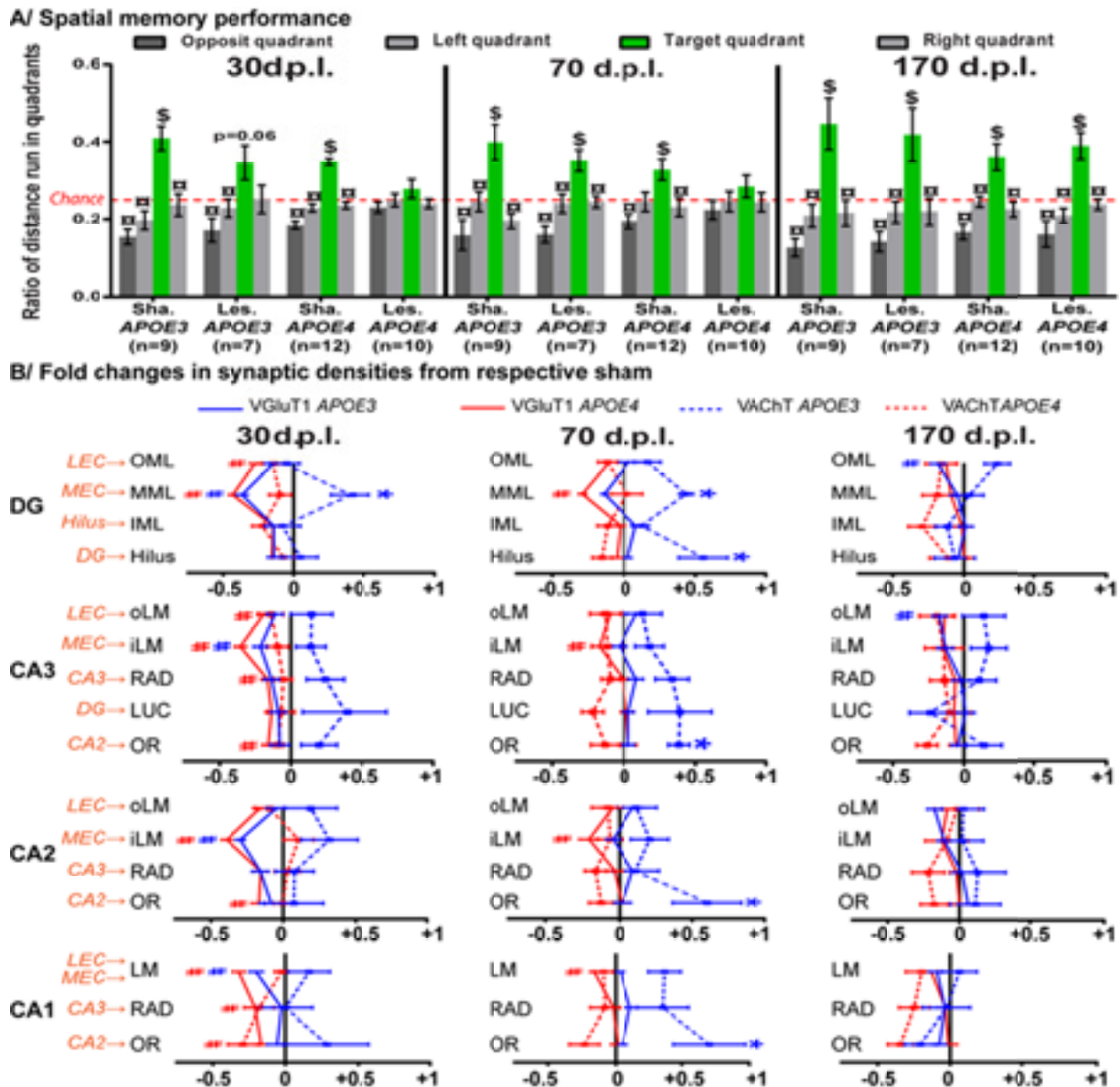
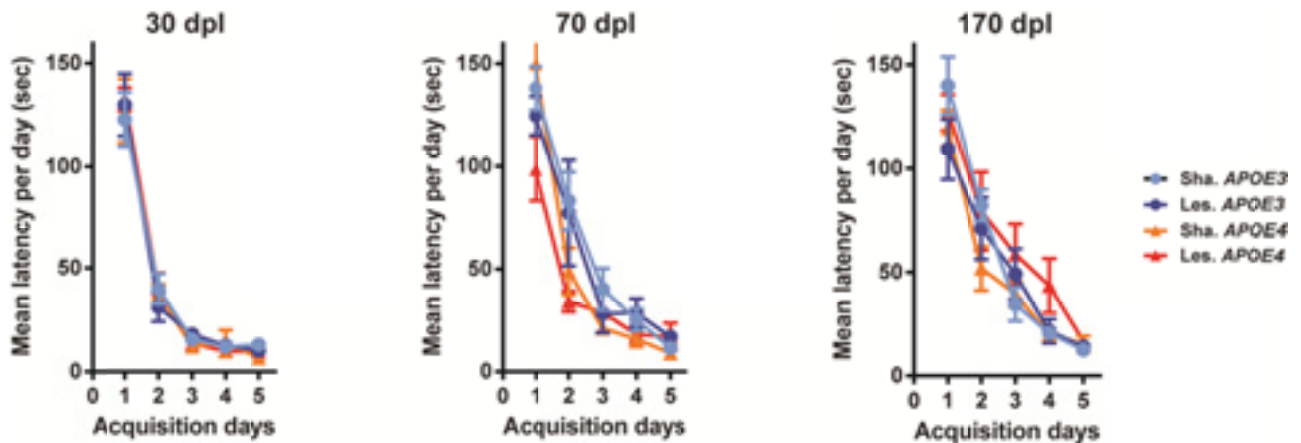


Figure 1. Delayed behavioral recovery associated with impaired cholinergic sprouting in lesioned male *APOE4*-mice. (A) In the Barnes maze probe trial, lesioned-*APOE4* mice were impaired at 30 and 70 dpl whereas lesioned-*APOE3* mice were only mildly affected at 30 dpl. \$: preference for target quadrant differs from chance at $p < 0.05$ (t -test); α : differs from target-quadrant $p < 0.05$ (LSD). (B) Lesioned-*APOE4* mice had a broader glutamatergic deafferentation at 30 dpl and a delayed glutamatergic reinnervation. Only lesioned-*APOE3* mice exhibited a cholinergic sprouting at 30 and 70 dpl. The putative origin of VGLuT1 inputs is indicated in orange. OML: outer molecular layer, MML: middle molecular layer, IML: inner molecular layer, HIL: *hilus*, oLM: outer *lacunosum-moleculare*, iLM inner *lacunosum-moleculare*, RAD: *radiatum*, LUC: *lucidium*, OR: *oriens*, LEC: lateral entorhinal cortex; MEC, medial entorhinal cortex *: VAcHT density differs from sham level ($p < 0.05$, LSD); #: VGLuT1 immunoreactivity differs from sham level ($p < 0.05$, LSD).

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

Female rodents have been shown to be less sensitive to EC lesion (16), maybe through a facilitator effect of estrogen on sprouting responses (17). Thus, we replicated our experiment in female *APOE3* and *APOE4* mice.

Supplemental figure 2. Female *APOE*-mice learning in the Barnes maze.



During the 5 training days, all groups reduced the time needed to reach the target hole (day effect: $F_{(4;340)}=378.437$, $p<0.00001$) demonstrating a similar motivation to escape the maze. However, during the acquisition, mice preferentially developed a non-spatial serial strategy to solve the task, as frequently described in C57BL/6J background. On the contrary, during the probe trial, only spatial strategies allowed the target hole localization and thus this trial was used for assessing spatial memory performances (Figure 2a in the main text).

In the Barnes maze (Figure 2a, supplemental table 1 and Supplemental Figure 2), the target quadrant preference was only influenced by the lesion (lesion*quadrant interaction: $F_{(3;255)}=2.86$; $p=0.037$). Contrary to male mice, sham and lesioned female mice from both genotypes visited more the target quadrant than chance at all delays. To determine whether these good performances at all dpl were linked to synaptic glutamatergic or cholinergic reorganization, we reproduce VGLUT1 and VACHT immunostainings. Lesion-induced glutamatergic changes (Figure 2b and supplemental table 5) were layer and genotype-specific (layers*genotype*lesion interaction: $F_{(15;900)}=2.303$; $p=0.0032$). As in male, glutamatergic inputs loss in female lesioned-*APOE3* mice was restricted to layers receiving entorhinal inputs at 30 dpl. In female lesioned-*APOE4* mice however, the glutamatergic loss was also

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

limited to these layers, but it persisted throughout all delays. Since female lesioned-*APOE4* mice expressed an early behavioral recovery despite an enduring glutamatergic deafferentation, it is unlikely that the glutamatergic reinnervation represent the only compensatory mechanism following entorhinal lesion.

Lesion-induced cholinergic sprouting in female mice (Figure 2b and supplemental table 6) was layer-specific and independently influenced by the delay (layers*lesion*delay interaction: $F_{(30;900)}=1.607$; $p=0.021$) and the genotype (layers*lesion*genotype interaction: $F_{(15;900)}=1.746$; $p=0.038$). In contrast to male *APOE4*-mice, lesioned-*APOE4* female mice showed a marked cholinergic sprouting in the deafferented layers at all post-lesional delays and in the CA3 *lucidium* at 30 and 70 dpl. Lesioned-*APOE3* female mice had also a cholinergic sprouting in the deafferented layers at each delay and this sprouting occasionally extended to layers not massively targeted by entorhinal inputs (CA2 and CA1 *oriens* and *radiatum* at 30 dpl and in the DG *hilus* at 170 dpl).

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

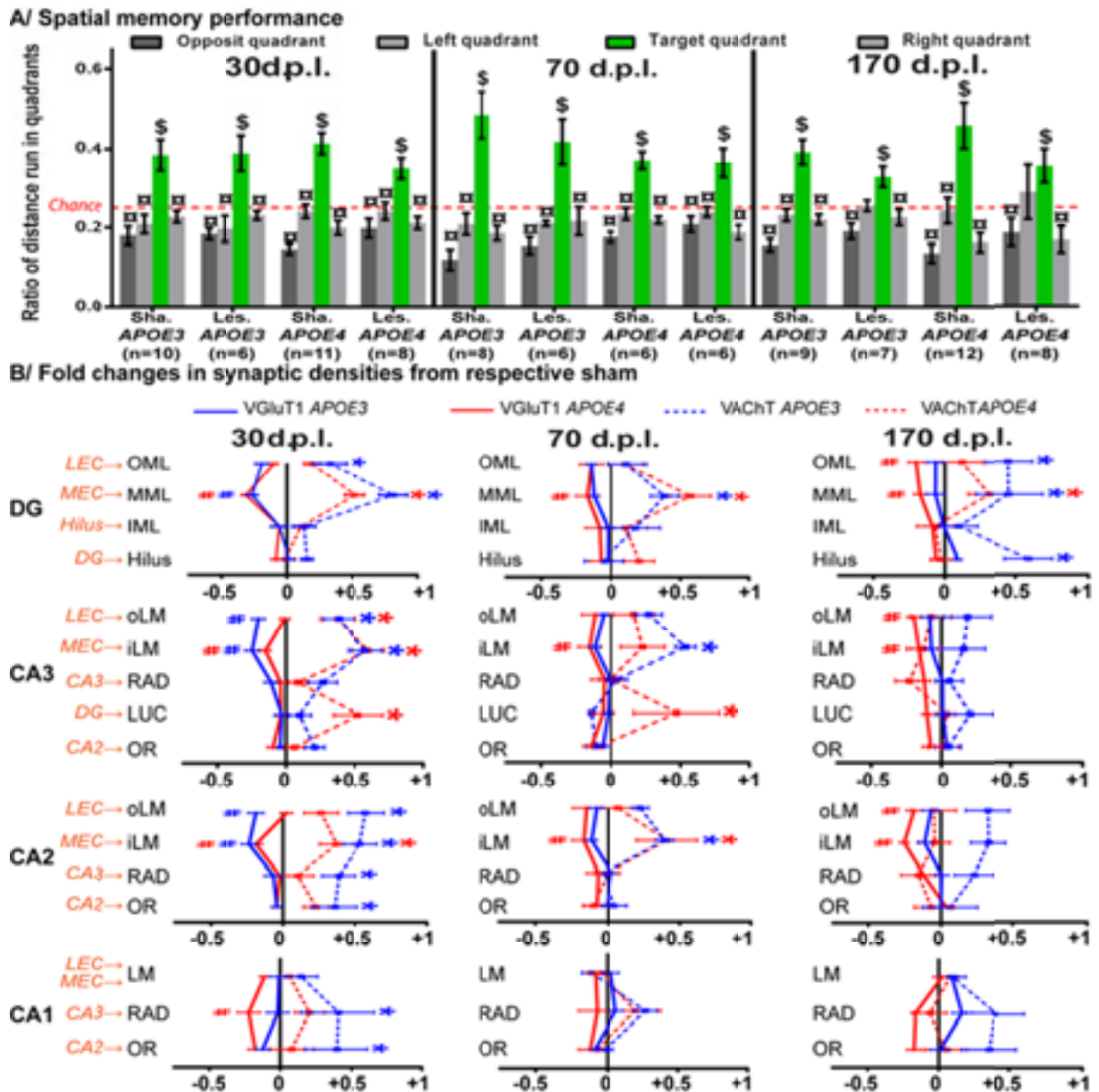


Figure 2. Lesioned-*APOE4* female mice had normal behavioral performance and intact cholinergic sprouting. (A) Lesioned female mice from both genotypes were never dramatically impaired in the Barnes Maze probe trial, indicating intact spatial memory. \$: preference for the target quadrant differs from chance at $p < 0.05$ (t-test); α : differ from target $p < 0.05$ (LSD). (B) Lesioned mice from both genotypes had a long-lasting cholinergic sprouting, and lesioned-*APOE4* mice had impaired glutamatergic reinnervation. The putative origin of VGLuT1 inputs is indicated in orange. OML: outer molecular layer, MML: middle molecular layer, IML: inner molecular layer, HIL: hilus, oLM: outer lacunosum-moleculare, iLM inner lacunosim-moleculare, RAD: radiatum, LUC: lucidium, OR: oriens, LEC: lateral entorhinal cortex; MEC, medial entorhinal cortex *: VACHT density differs from sham level ($p < 0.05$, LSD); #: VGLuT1 immunoreactivity differs from sham level ($p < 0.05$, LSD).

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

Thus, despite the absence of a complete glutamatergic reinnervation, lesioned-*APOE4* female mice had quite-normal behavioral performances associated with a long-lasting cholinergic sprouting, supporting the view that the cholinergic sprouting actively compensates the hippocampal glutamatergic disconnection. Interestingly, a similar transient cholinergic-related compensation of memory impairments was reported in primates after limbic lesions (18), and cholinergic activity was associated with cognitive reserve proxies in AD (19). Thus, the cholinergic sprouting in MCI patients (8) may represent a compensatory mechanism allowing coping with the loss of entorhinal inputs. The unaltered cholinergic sprouting in female *APOE4*-mice was most probably related to the positive hormonal modulation on sprouting (17). However, as MCI occurs in post-menopausal women, such positive modulations are not likely to occur in female *APOE4*-patients. Thus, *APOE4*-related impairments in cholinergic compensation may represent a general drive accelerating the cognitive decline during MCI.

Overall, the cholinergic sprouting was more consistent in deafferented layers, closely linking this reactive response with the loss of entorhinal inputs. However, the cholinergic sprouting occasionally expanded to non-deafferented layers, suggesting possible genotype and sex-dependent broader modulations of hippocampal networks. Nevertheless, the cholinergic sprouting in the DG appears to be sufficient to mediate a partial compensation (see lesioned-*APOE3* male at 30 dpl and lesioned-*APOE4* female at 170 dpl), implying that the DG is critical for the cholinergic compensation in the Barnes maze.

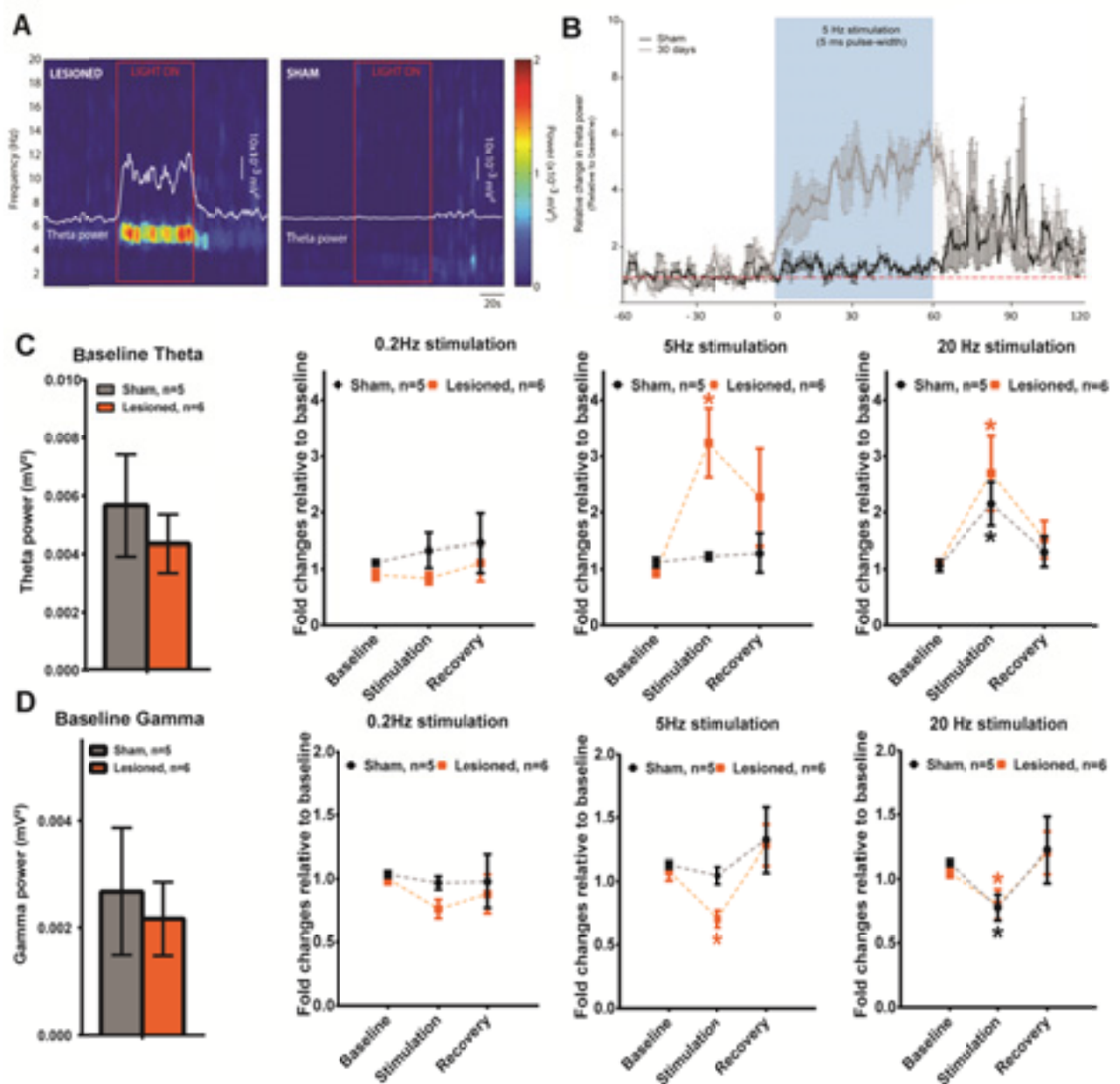
To investigate the changes induced by the sprouting on cholinergic modulation of hippocampal networks properties, EC lesions were reproduced in *Chat-ChR2* mice. These mice express the channelrhodopsin-2 only in cholinergic neurons, allowing their selective activation through 470 nm light-pulses. Lesioned-*Chat-ChR2* mice were not impaired in the Barnes maze at 30 dpl (quadrant effect: $F_{(3;24)}=12.23$, $p=0.0004$) and presented similar glutamatergic (layers*lesion interaction: $F_{(3;24)}=17.1912$; $p=0.0002$) and cholinergic changes (layers*lesion interaction: $F_{(3;24)}=17.1912$; $p=0.0003$) than *APOE*-mice exhibiting a

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

cholinergic sprouting (Figure 3A&B). Brain oscillations in theta and gamma frequency bands and their interactions are involved in learning and memory processes (20). To demonstrate the functionality of the cholinergic sprouting, we stimulated cholinergic neurons (5ms pulse-width) in the medial septum/diagonal band of Broca (MSDB), the main source of hippocampal cholinergic innervation. We used three stimulation frequencies (0.2, 05 and 20 Hz) to assess hippocampal response to increasing acetylcholine drive. The power of theta-band oscillation (3-8Hz; supplemental figure 3A) was not influenced by the 0.2Hz stimulation, but the 5Hz stimulation increased theta power in lesioned-mice (stimulation*lesion interaction: $F_{(2,18)}=3.6721$; $p=0.0459$), as did 20Hz stimulation in both sham and lesioned mice (stimulation effect: $F_{(2,18)}=8.3781$; $p=0.0026$). The power in gamma-band oscillation (60-100Hz, supplemental figure 3B) was reduced in lesioned mice at 0.2Hz (stimulation effect: $F_{(2,18)}=9.230$; $p=0.0141$) and 5Hz (stimulation effect: $F_{(2,18)}=9.579$; $p=0.01282$) and in both lesioned and sham mice at 20Hz (stimulation effect: $F_{(2,18)}=10.972$; $p=0.0090$). Thus, it appears that the cholinergic sprouting increased the cholinergic modulation on hippocampal oscillatory activities, demonstrating the functionality of this sprouting and confirming its MSDB origin.

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

Supplemental figure 3. Enhanced cholinergic modulation on theta and gamma oscillations in the molecular layer of lesioned *ChAT-ChR2*-mice.



A. Representative spectrogram obtained with 5Hz optogenetic stimulation. **B.** Theta power plotted against time for the whole 120 sec used for analysis **C.** Baseline theta power in the DG mol was not influenced by the lesion. However, a 5Hz cholinergic stimulation induced an increase in theta power in lesioned mice only (stimulation*lesion interaction: $F_{(2;18)}=3.67214$, $p<0.0459$), whereas a 20Hz stimulation increased theta power in both sham and lesioned mice (stimulation effect: $F_{(2;18)}=8.37858$, $p<0.0026$). **D.** Baseline gamma power in the DG mol was not influenced by the lesion. However, a 5Hz stimulation induced a decrease in gamma power in lesioned mice (stimulation*lesion interaction: $F_{(2;18)}=9.579$, $p=0.0128$), whereas a 20Hz stimulation decreased gamma power in both sham and lesioned mice (stimulation effect: $F_{(2;18)}=10.9720$, $p=0.00904$). *, differ from baseline (NK, $p<0.05$); \$, differ from sham (NK, $p<0.05$). *, differ from baseline (NK, $p<0.05$); \$, differ from sham (NK, $p<0.05$).

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

The most prominent feature of local field potential in lesioned mice was the increased frequency of burst of activity, especially in the dentate molecular layer (also called “Dentate Burst” see 21; lesion*region interaction: $F_{(5,126)}=2.217$; $p=0.0505$; Figure 3C). To investigate the potential origin of these bursts, current-source density analysis (CSD) of these events was done (Figure 3D). Surprisingly, in lesioned-mice, the CSD associated with these spontaneous dentate bursts was similar to those obtained by perforant path stimulations, suggesting that hyper-synchronous discharges occurs in the EC and strongly activate the DG. Interestingly, local optogenetic stimulation of hippocampal cholinergic inputs reduced the burst frequency in lesioned mice (optogenetic*lesion interaction: $F_{(2,42)}=9.196$; $p=0.0005$), whereas it increased the amount of these events in sham mice (Figure 3E). Thus, the cholinergic sprouting appears to shift the cholinergic influence on dentate burst toward an inhibitory control in order to alter the increased occurrence of this pattern of activity consecutive to partial entorhinal lesion.

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

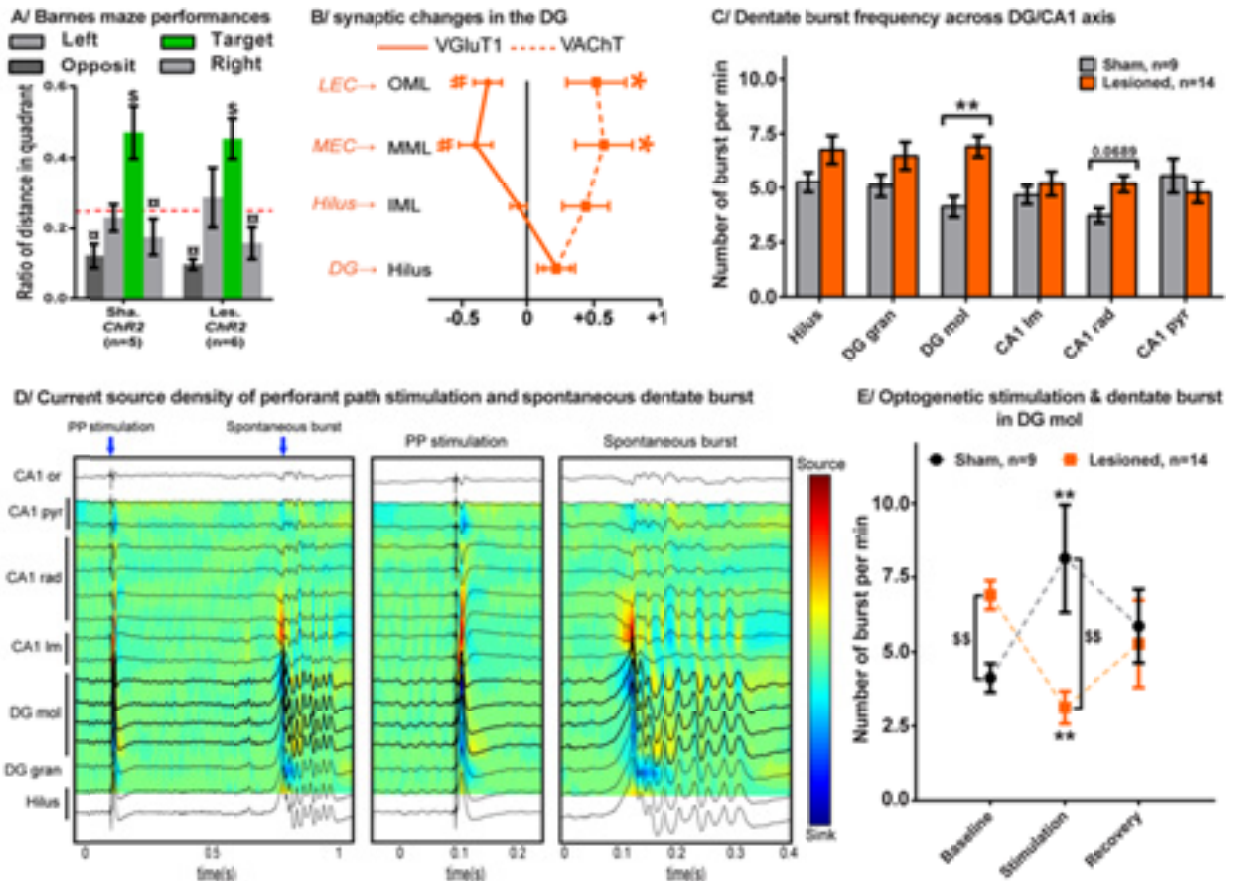


Figure 3. Lesioned *ChAT-ChR2* mice had normal behavioral recovery and intact cholinergic sprouting but presented increased dentate burst occurrence that are normalized by optogenetic cholinergic stimulation. (A) At 30 dpl, lesioned *ChAT-ChR2* mice had intact behavioral preference for target quadrant. \$: differ from chance ($p < 0.05$, t-test); \square : differ from target ($p < 0.05$, LSD). (B) Lesioned *ChAT-ChR2* had a cholinergic sprouting specific to deafferented layers. *: VACHT density differ from sham levels ($p < 0.05$, Newman-Keuls); #: VGLuT1 immunoreactivity differ from sham levels ($p < 0.05$, Newman-Keuls). (C) Lesioned *ChAT-ChR2* mice had increased burst frequency in the deafferented DG mol. **: differ from sham ($p < 0.01$, LSD). (D) CSD of spontaneous dentate burst and perforant path-evoked responses (PP) show similar profiles. (E) Optogenetic stimulation reduces the burst frequency in lesioned-mice but increases it in sham mice. \$\$: differ from sham ($p < 0.01$, Newman-Keuls); **: differ from baseline sham ($p < 0.01$, Newman-Keuls).

Our results suggest that partial EC lesion inducing an MCI-like hippocampal disconnection, paradoxically increased hippocampal activity. Such aberrant patterns of hyperactivity have been related to memory impairments in rodents (22) and in MCI patients (23). Moreover, the view that such enhanced hippocampal activity is pathogenic is further supported by the cognitive improvement in MCI patients after pharmacological reduction of this hyperactivity (24). Studies on transgenic mice overexpressing $A\beta$ have raised the hypothesis that abnormal

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

hippocampal hyperactivity in MCI/AD is primarily driven by amyloid pathology (25). However, our results suggest that structural factors such as the partial loss of EC neurons and related hippocampal disconnection is sufficient to induce such hyperactivity.

In conclusion, we have shown that after a partial hippocampal disconnection, a transient cholinergic sprouting followed by a slower glutamatergic reinnervation mediate behavioral recovery in mice. We associated *APOE4* with impairments of both sprouting responses in male and of glutamatergic sprouting in female. Moreover, we have shown that the hippocampal disconnection induced by EC neuronal loss led to an aberrant pattern of activity in the DG that is compensated by the recruitment of cholinergic fibers that have sprouted. As *APOE4*-carriers are more prone to DG/CA3 hyperactivity (26) and less sensitive to anticholinesterase therapies (9), impaired cholinergic compensations are likely to contribute to their faster cognitive decline during MCI. Thus, alternative therapeutic strategies targeting sexual hormone signalization or aiming to reduce hippocampal aberrant activity may be especially beneficial for *APOE4*-carriers.

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique**Methods:**

Further information can be found in the Supplemental Materials.

Mice. *hAPP-YAC/APOE3-tr (APOE3)*, *hAPP-YaC/APOE4-tr (APOE4)* and *ChAT-ChR2* mice were bred in our animal facility.

Study approval. This study was approved by the Institutional Ethical Comity (authorization number: AL/15/22/02/13 for *APOE*-experiments and AL/58/65/02/13 for *ChAT*-experiments) in accordance with the European Union guidelines.

Study design. Behavioral performances and synaptic reorganizations were analyzed at 30, 70 and 170 days post-lesion. *ChAT* transgenic mice were lesioned 30 days before optogenetic and electrophysiological experiments.

EC lesion. Anesthetized mice were stereotaxically and bilaterally injected with N-methyl-D-aspartate (NMDA, 120 mM) to perform partial bilateral EC lesion.

Barnes maze. Mice were trained to localize among 12 holes the target hole leading to their home-cage (5 days, 3 trials/day). To assess spatial memory, a 120-sec probe trial was conducted with all holes closed 24h after the last acquisition day.

Histology. Mice were killed by an overdose of sodium pentobarbital and perfused with 4% paraformaldehyde. Frozen brains were cut into 20 μm -thick sections. Lesion assessment was done on cresyl violet stained slices. Antibodies against VAcHT (rabbit polyclonal; 1:1000) and VGluT1 (guinea-pig polyclonal; 1:1000) were purchased from Synaptic System, and secondary antibodies from Invitrogen Molecular Probes.

Image analysis. Synaptic densities were measured with ImageJ software. Data were expressed as a ratio of the respective sham density (for each delay, genotype and sex) for the selective extraction of lesion-related synaptic reorganizations for all groups.

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

Optogenetic and electrophysiology. Cholinergic neurons/fibers were stimulated by pulses of blue light (470 nm, 10ms at 0.2, 5 or 20Hz) under urethane and ketamine xylazine anesthesia.

Extracellular recordings were done with 16-channel silicon probes.

Statistics. Data are expressed as mean \pm SEM and were analyzed using ANOVA or ANOVA with repeated measures. Multiple comparisons were tested with LSD or Newman-Keuls post-hoc test. The threshold for statistical significance was set at $p < 0.05$.

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

Acknowledgements:

Authors want to thanks Carole Strittmatter for the carrying of the *ChAT-ChR2* breeding. This work was supported by Alsace Alzheimer Haut-Rhin, the University of Strasbourg, the Centre National de la Recherche Scientifique, and the French minister of education and research. RG is supported by a Neurex “welcome of researcher” grant and a Marie curie Career integration grant from the European research council. *ChAT-ChR2*-mice were provided by Prof. Feng Guoping from the Massachusetts Institute of Technology.

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

References:

1. Petersen, RC, et al. Mild Cognitive Impairment. *Arch Neurol.* 2009; 66(12): 1447-1455.
2. Kordower, JH, et al. Loss and atrophy of layer II entorhinal neurons in elderly people with mild cognitive impairment. *Ann Neurol.* 2001; 49(2): 202-213.
3. Scheff, SW, et al. Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging.* 2006; 27(10): 1372-1384.
4. Sze, CI, et al. Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol;* 1997; 56(8): 933-944.
5. Koepsell, TD, Monsell, SE. Reversion from mild cognitive impairment to normal or near-normal cognition: risk factors and prognosis. *Neurology.* 2012; 79(15): 1591-1598.
6. Barabash, A, et al. *APOE*, *ACT* and *CHRNA7* genes in the conversion from amnesic mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2009; 30(8): 1254-1264.
7. Xu, WL, et al. Accelerated progression from mild cognitive impairment to dementia among *APOE* $\epsilon 4\epsilon 4$ carriers. *J Alzheimers Dis.* 2013; 33(2): 507-515.
8. DeKosky, ST, et al. Upregulation of choline acetyltransferase activity in hippocampus and frontal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment. *Ann Neurol.* 2002; 51(2): 145-155.
9. Farlow, MR, et al. Apolipoprotein E genotype and gender influence response to tacrine therapy. *Ann N Y Acad Sci.* 1996; 802: 101-110.
10. Blain, JF, et al. A deficit in astroglial organization causes the impaired reactive spouritng in human apolipoprotein E4 targeted replacement mice. *Neurobiol Dis.* 2006; 21(3): 505-514.
11. Bott, JB, et al. Reduced plasticity and mild cognitive impairment-like deficits after entorhinal lesions in *hAPP/APOE4* mice. *Neurobiol Aging.* 2013; 34(11): 2683-2693.

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

12. van Strien, NM, et al. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci.* 2009; 10(4): 272-282.
13. Hort, J, et al. Spatial navigation deficit in amnesic mild cognitive impairment. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104(10): 4042-4047.
14. Laczo, J, et al. Spatial navigation and *APOE* in amnesic mild cognitive impairment. *Neurodegener Dis.* 2011; 8(4): 169-177.
16. Roof, RL, et al. Gender-specific impairment on Morris water maze task after entorhinal cortex lesion. *Behav Brain Res.* 1993; 57(1): 47-51.
17. Stone, DJ, et al. Increased synaptic sprouting in response to estrogen via an apolipoprotein E-dependent mechanism: implication for Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 1996; 18(9): 3180-3185.
18. Crosson, PL, et al. Acetylcholine facilitates recovery of episodic memory after brain damage. *J Neurosci.* 2012; 32(40): 13787-13795.
19. Garibotto, V, et al. Cholinergic activity correlates with reserve proxies in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2013; 34(11): Jun 29.
20. Lisman, JE, and Jensen, O. The theta-gamma neural code. *Neuron.* 2013, 77: 1002-1016.
21. Montgomery, SM, et al. Theta and Gamma Coordination of hippocampal Networks during Waking and Rapid Eye movement Sleep. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, 104: 14495-14500.
22. Jinde, S, et al. Hilar mossy cell degeneration causes transient dentate granule cell hyperexcitability and impaired pattern separation. *Neuron* 2012; 76: 1189-1200.
23. Yassa, MA, et al. High-resolution structural and functional MRI of hippocampal CA3 and dentate gyrus in patients with aMCI. *Neuroimage* 2010; 51(3): 1242-1252.
24. Bakker, A, et al. Reduction of hippocampal hyperactivity improves cognition in amnesic mild cognitive impairment. *Neuron* 2012; 74: 467-474.

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

25. Palop, J, Mucke, L. Amyloid- β -induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nature Neuroscience* 2010; 13: 812-818.
26. Filippini, N, et al. Distinct patterns of brain activity in young carriers of the APOE- ϵ 4 allele. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 7209-7214.

Supplemental material:*Animals.*

A total of 255 male and female transgenic hAPP-YAC/*APOE3*-tr (*APOE3*) and hAPP-YaC/*APOE4*-tr (*APOE4*) mice that were 11-month-old at surgery were used for this study (n=204 mice finally included in analysis after removal of mice that did not reach lesion criterion). This mouse line was generated at Taconic farms (Germantown, NY, USA) as previously described (11). These mice expressed physiological levels of human *APOE3* or *APOE4* instead of murine *APOE*. Also, they harbor one supplementary copy of normal human *APP* (non-mutated) in addition to murine *APP*. This double transgenic construction allowed potential specific interactions between human *APOE* and *APP*. Wild-type mice were not included because we focused on *APOE4* and *APOE3* genotype comparisons relevant for humans, and in order to reduce the number of animals used in the study. *Chat-ChR2* transgenic-mice were provided by Prof. Feng Guoping from the Neuroscience McGovern Institute for Brain Research (Massachusetts Institute of Technology). These mice express the Channel-rhodopsine2 under the control of *Chat*-promoter (specifically in cholinergic neurons). All procedures were approved by the Institutional Ethical Comity (authorization number: AL/15/22/02/13 for *APOE*-experiments and AL/58/65/02/13 for *Chat*-experiments). Animals were maintained with *ad libitum* access to food and water.

Study design.

To investigate synaptic reorganizations in relation with behavioral performances at 30, 70 and 170 days post-lesion, *APOE* transgenic mice were pseudo-randomly assigned to 24 experimental groups (3 delays * 2 sex * 2 genotypes * 2 treatments). The experimenter was

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

blind to genotype and treatments until statistical analysis. *ChAT-ChR2*-mice were lesioned as *APOE* mice: 5 sham and 5 lesioned mice were used for behavioral and histological experiments, 9 sham and 14 lesioned mice were used for the intra-MSDB stimulation of cholinergic neurons, coupled with intra-hippocampal recordings and perforant path stimulations.

EC lesion.

Deeply anesthetized mice (complete loss of tail and paw-pinch retraction reflexes; sodium pentobarbital, 70 mg/kg i.p., Cerva Santé Animale, France) were stereotaxically and bilaterally injected with N-methyl-D-aspartate (NMDA, 120mM) to perform partial bilateral EC lesions. To limit the pain, pentobarbital-anesthetized mice received subcutaneously 0.05 ml of Xylocaïn (Xylovet, France; 21mg/ml) before scalp incisions. Coordinates from Bregma were calculated according to Paxinos and Franklin ([Supplemental reference S1](#)):

Site 1 (0.075 μ L): A= -4.1 mm; L= \pm 4.3 mm; 0.5 mm above the bottom of the skull.

Site 2 (0.1 μ l): A= -4.7 mm; L= \pm 3.5 mm; 0.5 mm above the bottom of the skull.

Site 3 (0.05 μ l): A= -4.7 mm; L= \pm 3.5 mm; 1 mm above the bottom of the skull.

After the surgery, mice received 5mg/kg of a non-steroidal anti-inflammatory treatment (Meloxicam, Boehringer Ingelheim, France). For the complete procedure see Bott et al. (11).

Optogenetic and Electrophysiology.

Mice under urethane (1.5 g/kg ; Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) and ketamine (50 mg/kg; Imalgén, Merial, Gerlan, France)/xylazine (10 mg/kg; Rompun, Bayer Health Care, Leverkusen, Germany) terminal anesthesia were placed in a stereotaxic apparatus after the complete loss of tail and paw-pinch retraction reflexes.

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

Coordinates for recordings in the dorsal hippocampus were calculated from Bregma (AP -1.94 mm; ML \pm 0.11 mm; P -0.12 mm from *dura*). Coordinates for the stimulation in the MSDB were calculated from Bregma (AP +0.078 mm; ML -0.015 mm; P-3.9 mm from *dura*). Coordinates for the stimulation of the perforant path were calculated from Bregma (AP-0.43 mm; ML \pm 0.24 mm; P -0.15 from *dura*).

Optogenetic stimulations were done with a LED-stimulation light (Prizmatix; Givat-Shmuel, Israel) through an optical fiber with 470 nm light-pulses (10ms pulses at 0.2, 5 or 20Hz). Recordings were done with 16-channel silicon probes (Neuronexus, A1x16-2mm-50-177) connected to an AlphaLab recording system (Alpha-Omega, Ubstadt Weiher, Germany). Raw signal was amplified (200x), filtered between 0 and 9 KHz and digitalized at 22 KHz.

Analyses were carried out using custom made script in Matlab (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA). When present, slow drift and electrical noise were removed using the Chronux toolbox. LFP data were filtered between 0.1 and 500 Hz. Spectral analysis were carried using the Chronux signal processing toolbox (S2) with a time-frequency product of three and five tapers. Time-frequency analyses were done on 4-s window moved across the data in 1-s increments. Power for theta (3-9Hz) and gamma (30-100Hz) were calculated in 4-s bins. Dentate burst (21), were detected using a 5SD threshold on 1-250Hz frequency band, with a 4 sec sliding window (1 sec step). As urethane anesthesia is characterized by alternating of SWP-like and REM-like states (S3), and since dentate burst have been described mainly during REM-sleep (21), analyses focused on periods associated with theta activity (REM-like).

The effect of optogenetic cholinergic stimulations on oscillatory activities and dentate bursts was determined in comparing recordings of 60 sec of baseline with 60 sec of stimulation followed by 60 sec of recovery.

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique*Barnes maze.*

This task was chosen because the Barnes maze is less stressful for mice than the Morris water-maze (S4). The device consists in a 1m diameter circular platform that was elevated at 1m from the ground and strongly illuminated (900 lux) to motivate avoidance from the device through an escape hole connected to the home cage. Mice's behavior was recorded with a video-tracking system (ANY-maze 4.3; Ugo Basile, Gemonio, Italy).

Mice were trained during 5 acquisition days (3 daily trials 15 min apart; 180 sec cut-off) to escape the device through one specific target hole connected to the home cage among 12 holes equally distributed at 4 cm from the edge of the platform. A probe trial (2 min with all holes closed) was conducted 24 hours after the last acquisition day to assess spatial memory performances. Between each trial, the platform was cleaned with 70% ethanol and rotated pseudo-randomly to avoid the development of olfactory-based strategy. A more detailed methodology is described in Bott et al. (11).

Perfusion and tissue preparation.

Twenty-four hours after the probe trial, mice were killed by an overdose of sodium pentobarbital (150mg/kg, i.p.) and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde after the complete loss of tail and paw-pinch retraction reflexes. Brains were further postfixed during 4 hours before being cryoprotected in a 20% saccharose solution for 48 hours and finally frozen with isopentane. Brains were cut into 20 μ m-thick sections with a freezing microtome. Coronal slices were serially taken for the dorsal hippocampus for immunohistochemistry and horizontal slices were serially taken for the entorhinal cortex (lesion measurement).

Lesions measurements.

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

Lesions were delimited on cresyl violet stained slices, and the lesion percentage was calculated. The absence of significant lesions, unilateral lesions and lesions extending to adjacent structures (subiculum, perirhinal and postrhinal cortices) led to exclusion of the mouse.

Immunohistochemistry.

VGLuT1 immunoreactivity was chosen to evaluate specifically the cortical and intra-hippocampal glutamatergic innervations (S5) and VAcHT for the quantification of cholinergic fibers and terminals. Immunofluorescence staining of cholinergic and glutamatergic synaptic terminals was done using primary antibodies against VAcHT (rabbit polyclonal; 1:1000) and VGLuT1 (guinea-pig polyclonal; 1:1000) purchased from Synaptic System (Göttingen, Germany), and secondary antibodies (Alexa fluor 488 anti-guinea-pig; 1:1000 and Alexa fluor 555 anti-rabbit; 1:1000) from Invitrogen Molecular Probes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Slices were first incubated with 5% normal donkey serum diluted in PBS with 0.1% of Triton x100 for 2 hours at room temperature, and then incubated at room temperature during 18 hours with primary antibodies diluted in PBS with 0.1% of Triton x100. After 3 washes with PBS, sections were incubated during 2 hours with secondary antibodies (1:1000) diluted in PBS. After 3 washes in PBS, sections were mounted with a Dapi-containing slide mounting kit (DAPI Fluoromount-G, SouthernBiotech, Birmingham, USA) to facilitate region of interest determination.

Images analysis.

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

Images were taken with 20x objective lens by Leica brightfield microscope, with all settings kept identical for all sections of each staining. All the image analysis was performed with ImageJ (NIH, USA) with 3 measurements per section on 3 sections per animal. Synaptic densities were measured in all synaptic layers of the DG, CA3, CA2 and CA1 (for each layer three measurements per section were taken in a 100 μm^2 sampling box on four sequential sections spaced by 120 μm). Cholinergic density was measured in binarized pictures as a percentage of area covered by the staining. Glutamatergic density was measured as an intensity of fluorescence after subtraction of background fluorescence taken in the corpus callosum. Data were then expressed as a ratio of the respective sham density (for each delay, genotype and sex) to enable the selective extraction and comparison of lesion-related synaptic reorganization throughout the groups.

Statistics.

Analyses were done with Statistica v.10 (StatSoft). Data were expressed as the mean \pm SEM. Analysis of variance with four-factors (genotype, lesion, delay, sex) and repeated measures (days and holes for the behavior, regional layers for immunohistochemistry) were carried out. In the case of significant interaction among factors, multiple comparisons among groups were performed using the Fisher LSD posthoc test (after factorial ANOVA) or the Newman-Keuls posthoc test (after ANOVA with repeated measures). A comparison to chance level in the Barnes maze was done using a 1-sample Student *t* test. The threshold for statistical significance was set at $P < 0.05$.

Supplemental reference:

- S1. Paxinos, G, and Franklin, K. The mouse brain atlas in stereotaxic coordinates. *Academic Press* 2010.
- S2. Bokil, H, et al. Chronux: a platform for analyzing neural signals. *J Neurosci Methods* 192: 146–151.
- S3. Pagliardini, S, et al. Spontaneous Sleep-Like Brain State Alternations and Breathing Characteristics in Urethane Anesthetized Mice. *PLOS ONE* 2013, 8(7): e70411
- S4. Patil SS, Sunyer B, Höger H, Lubec G. Evaluation of spatial memory of C57BL/6J and CD1 mice in the Barnes maze, the Multiple T-maze and in the Morris water maze. *Behav Brain Res.* 2009; 198: 58-68.
- S5. Fremeau, RT Jr, et al. Vesicular glutamate transporters 1 and 2 target to functionally distinct synaptic release sites. *Science.* 2004; 304(5678): 1815-1819.

Discussion de l'étude n°3

La récupération fonctionnelle après lésion entorhinale.

Au cours de la phase d'acquisition, quel que soit le délai, le sexe, le génotype ou le traitement, l'ensemble des souris ont des courbes d'apprentissages similaires. En fait, la plupart des souris ont essentiellement eu recours à une stratégie sérielle pour résoudre la tâche, comme cela a couramment été décrit dans le labyrinthe de Barnes chez les souris de souche C57BL/6J (O'Leary & Brown 2012) et comme nous l'avons décrit sur cette lignée *hAPP/APOE* de fond C57BL/6J (Publication n°2). Cette stratégie permet à la souris de rejoindre rapidement le trou cible sans nécessairement s'aider des indices distaux présents dans la pièce. Une expérience précédente au laboratoire a montré que grâce à cette stratégie, des souris avaient des performances d'acquisition aussi bonnes que celles des souris témoins alors qu'elles portaient une double lésion cholinergique et entorhinale qui affecte dramatiquement les capacités de navigation spatiale (thèse de Pierre-Henri Moreau, 2011). En revanche, seules les souris témoins présentaient de bonnes performances dans le test de rétention ce qui suggère que, malgré l'utilisation de cette stratégie, les souris intactes sont capables de navigation spatiale mais pas les souris double lésées. Quoi qu'il en soit, la réduction drastique tout au long de l'apprentissage du temps nécessaire pour atteindre le trou cible traduirait un niveau de motivation similaire pour s'extraire au dispositif dans l'ensemble de nos 24 groupes expérimentaux.

Durant le test de rétention, les souris témoins des deux génotypes et deux sexes ont de bonnes performances, suggérant que l'*APOE4* n'induit un effet massif sur la cognition chez les individus *middle-aged* qu'en présence de lésions ou de pathologies cérébrales, comme cela a été suggéré chez l'homme (Foster et al. 2013 ; Praetorius et al. 2013). Chez les souris lésées au contraire, les performances au test de rétention diffèrent fortement entre les différents groupes, malgré une étendue de lésion similaire. Chez les mâles, les *hAPP/APOE3* sont modérément déficitaires au délai court de 30 dpl, mais ils récupèrent dès 70 dpl. Au contraire, les *hAPP/APOE4* mâles sont sévèrement déficitaires à la fois à 30 et à 70 dpl, bien qu'ils finissent par récupérer et présenter de bonnes performances à 170 dpl. Chez les femelles, les

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

souris lésées des deux génotypes ne sont jamais déficitaires. Elles ont donc globalement une meilleure récupération fonctionnelle que les mâles, traduisant une moindre sensibilité aux lésions entorhinales chez les femelles, comme cela a été décrit chez le Rat (Roof et al. 1993). Ce résultat est similaire à ce qui est décrit chez l'Homme, les femmes ayant généralement une meilleure récupération après traumatisme crânien (Stein et al. 2001).

Globalement, il apparaît que seuls les *hAPP/APOE4* mâles lésés présentent des déficits sévères de navigation, traduisant un retard de récupération fonctionnelle par rapport aux autres groupes de souris, bien qu'ils parviennent ultimement à compenser la lésion entorhinale.

Bourgeoisements synaptique et récupération fonctionnelle

Les réorganisations synaptiques qui ont été observées sont synthétisées dans le [tableau 12](#). Chez les mâles, seules les souris lésées *hAPP/APOE4* mâles ne présentent pas de bourgeonnement cholinergique quel que soit le délai considéré. Or, il s'avère que se sont également les seules souris dramatiquement déficitaires dans le test de rétention du labyrinthe de Barnes aux mêmes délais, bien qu'elles finissent par présenter de bonnes performances au délai de 170 dpl en lien avec une réinnervation glutamatergique des couches désafférentées. En prenant en compte les résultats obtenus chez les souris *hAPP/APOE3* mâles, il semble que la récupération fonctionnelle soit soutenue dans un premier temps par un bourgeonnement cholinergique rapide mais transitoire, puis, par une réinnervation glutamatergique plus lente et potentiellement homotypique qui prendrait le relais tandis que l'innervation cholinergique retournerait aux niveaux des souris témoins.

Le rôle compensateur du bourgeonnement cholinergique est d'autant plus flagrant si on prend en compte les résultats obtenus chez les souris *hAPP/APOE* femelles ([Tableau 12](#)). En effet, les femelles *hAPP/APOE4* présentent un bourgeonnement cholinergique en absence de réinnervation glutamatergique marquée et elles ne présentent pas de déficit dans le test de rétention du Barnes. Plus globalement, il apparaît que les souris femelles ont en général un bourgeonnement cholinergique plus marqué que chez les mâles, en accord avec la littérature ([Kadish et al. 2002a](#)). Au contraire, la réinnervation glutamatergique ne semble pas être significativement favorisée chez les femelles, celle-ci paraissant même être plus déficitaires chez les souris *hAPP/APOE4* femelles que chez les *hAPP/APOE4* mâles. En effet, contrairement à ces derniers, les femelles *hAPP/APOE4* ne présentent jamais de trace significative de réinnervation glutamatergique, malgré une récupération fonctionnelle efficiente qui serait donc directement associée avec un bourgeonnement cholinergique prépondérant dans les zones de projection du cortex entorhinal.

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

Tableau 12 : réorganisations synaptiques chez les *hAPP/APOE*

Mâles	Principales régions d'origine des terminaisons VGLUT1											
	<i>hAPP/APOE3</i>						<i>hAPP/APOE4</i>					
30 dpl	MEC	LEC	Hile	DG	CA3	CA2	MEC	LEC	Hile	DG	CA3	CA2
DG	MML	OML	IML	Hile	*		MML	OML	IML	Hile	*	
CA3	iLM	oLM		LUC	RAD	OR	iLM	oLM		LUC	RAD	OR
CA2	iLM	oLM		*	RAD	OR	iLM	oLM		*	RAD	OR
CA1	LM				RAD	OR	LM				RAD	OR
70 dpl	MEC	LEC	Hile	DG	CA3	CA2	MEC	LEC	Hile	DG	CA3	CA2
DG	MML	OML	IML	Hile	*		MML	OML	IML	Hile	*	
CA3	iLM	oLM		LUC	RAD	OR	iLM	oLM		LUC	RAD	OR
CA2	iLM	oLM		*	RAD	OR	iLM	oLM		*	RAD	OR
CA1	LM				RAD	OR	LM				RAD	OR
170 dpl	MEC	LEC	Hile	DG	CA3	CA2	MEC	LEC	Hile	DG	CA3	CA2
DG	MML	OML	IML	Hile	*		MML	OML	IML	Hile	*	
CA3	iLM	oLM		LUC	RAD	OR	iLM	oLM		LUC	RAD	OR
CA2	iLM	oLM		*	RAD	OR	iLM	oLM		*	RAD	OR
CA1	LM				RAD	OR	LM				RAD	OR
Femelles	Principales régions d'origine des terminaisons VGLUT1											
	<i>hAPP/APOE3</i>						<i>hAPP/APOE4</i>					
30 dpl	MEC	LEC	Hile	DG	CA3	CA2	MEC	LEC	Hile	DG	CA3	CA2
DG	MML	OML	IML	Hile	*		MML	OML	IML	Hile	*	
CA3	iLM	oLM		LUC	RAD	OR	iLM	oLM		LUC	RAD	OR
CA2	iLM	oLM		*	RAD	OR	iLM	oLM		*	RAD	OR
CA1	LM				RAD	OR	LM				RAD	OR
70 dpl	MEC	LEC	Hile	DG	CA3	CA2	MEC	LEC	Hile	DG	CA3	CA2
DG	MML	OML	IML	Hile	*		MML	OML	IML	Hile	*	
CA3	iLM	oLM		LUC	RAD	OR	iLM	oLM		LUC	RAD	OR
CA2	iLM	oLM		*	RAD	OR	iLM	oLM		*	RAD	OR
CA1	LM				RAD	OR	LM				RAD	OR
170 dpl	MEC	LEC	Hile	DG	CA3	CA2	MEC	LEC	Hile	DG	CA3	CA2
DG	MML	OML	IML	Hile	*		MML	OML	IML	Hile	*	
CA3	iLM	oLM		LUC	RAD	OR	iLM	oLM		LUC	RAD	OR
CA2	iLM	oLM		*	RAD	OR	iLM	oLM		*	RAD	OR
CA1	LM				RAD	OR	LM				RAD	OR

Le tableau présente les principales couches synaptiques ayant été étudiées en fonction de la région d'origine des terminaisons VGLUT1 (colonnes) et de la région d'intérêt hippocampique (lignes). Les cases vides indiquent l'absence d'entrées significatives en provenance des régions correspondantes ; *, malgré la présence avérée de ces entrées, elles n'ont pas été prises en compte dans les analyses du fait de la difficulté à les repérer anatomiquement de manière sûre (pas de repères clairement définis). La couleur des cases est définie en fonction des effets statistiques ($p < 0.05$) et des tendances ($p < 0.10$) de la manière suivante :

↓VGLUT $p < 0,10$	↓VGLUT $p < 0,05$	↓VGLUT, $p < 0,05$ ↑VChT, $p < 0,05$	↓VGLUT, $p < 0,10$ ↑VChT, $p < 0,05$	↑VChT, $p < 0,05$	↑VChT, $p < 0,10$	Ni effet Ni tendance
----------------------	----------------------	---	---	----------------------	----------------------	-------------------------

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

Par conséquent, l'étude comparative des réorganisations dans les principales régions hippocampiques suggère que le bourgeonnement cholinergique dans le DG joue bien un rôle capital dans la compensation des déficits de navigation mesurés dans la tâche du labyrinthe de Barnes, du moins tant que la réinnervation glutamatergique n'est pas pleinement en place. Cette effet cholinergique compensateur a d'ailleurs été depuis confirmé dans des travaux menés chez le Primate (Croxson et al. 2012), et expliquerait pourquoi, chez l'Homme, l'activité cholinergique corrèle positivement avec l'amplitude des mesures de réserve cognitive (Garibotto et al. 2013). Il peut sembler surprenant qu'une récupération fonctionnelle soit possible malgré la perte d'environ la moitié des neurones entorhinaux. Cependant, il faut mentionner que le système des cellules de la grille du cortex entorhinal pourrait être organisé fonctionnelle en modules redondant de traitements de l'information (Stensola et al. 2012), ce qui pourrait faciliter la compensation de lésions entorhinales partielles. De plus, il a été démontré que les lésions entorhinales n'abolissent pas le codage spatial des cellules de lieu hippocampiques, malgré des perturbations de la stabilité de ce codage et une diminution de la quantité d'information codé par chaque cellule de lieu (Brun et al. 2008 ; Van Cauter et al. 2008).

Bourgeonnement cholinergique et réorganisations glutamatergiques

Globalement, le bourgeonnement cholinergique paraît donc être capable de compenser la déconnexion glutamatergique partielle de l'hippocampe. Il faut noter qu'au-delà de la compensation directe de la désafférentation et de la modulation des entrées glutamatergiques néoformées (bourgeonnement dans les couches désafférentées), le bourgeonnement cholinergique participerait également à la régulation des réseaux non-directement impactés par la désafférentation (bourgeonnement dans les couches minoritairement innervées par le cortex entorhinal). En effet, le bourgeonnement cholinergique s'étend notamment dans les zones innervées par les neurones du DG (Hile, CA3 *lucidium*) et de CA2 (stratum *oriens* de CA3, CA2 et CA1). De manière intéressante les neurones principaux du DG et de CA2 représenteraient les entrées majeures de l'entorhinal sur l'hippocampe (Chevaleyre et al. 2010). Il est donc tout à fait probable que le fonctionnement de ces réseaux en aval du cortex entorhinal soit perturbé par la perte partielle des entrées entorhinales du DG et de CA2, ce qui nécessiterait une modulation cholinergique au niveau de leurs propres zones de terminaison (synapses n+1 de l'entorhinal). Par conséquent, le maintien d'une forte innervation cholinergique hippocampique pourrait certes exercer un contrôle direct des entrées entorhinales néoformées et mais aussi des réseaux directement dépendants de ces entrées, d'autant plus que celles-ci sont potentiellement caractérisées par des patrons de décharge anormaux (voir ci-dessous).

Il faut également noter que 30 jours après la lésion, les souris *hAPP/APOE4* mâles présentent des perturbations des réseaux glutamatergiques de l'hippocampe plus étendues que celles de leurs homologues *hAPP/APOE3*. Notamment, des pertes synaptiques secondaires concerneraient les terminaisons en provenance du DG (CA3 *lucidium*) et de CA2 (stratum *oriens* de CA3, CA2 et CA1), les régions de l'hippocampe où les entrées entorhinales seraient les plus puissantes (Chevaleyre et al. 2010), mais aussi les terminaisons des cellules pyramidales de CA3 (stratum *radiatum* de CA3 et CA1). Ce profil de pertes synaptiques traduirait une perturbation globale du fonctionnement des réseaux hippocampiques chez ces

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

souris. Cette perturbation étendue à l'ensemble des circuits de l'hippocampe pourrait être spécifique aux souris *hAPP/APOE4* mâles et pourrait être liée à l'absence de bourgeonnement cholinergique. Indépendamment de ce bourgeonnement, il pourrait également traduire une réinnervation glutamatergique plus lente en provenance des régions fonctionnellement perturbées par la désafférentation. Cependant, en absence de délais post-opératoires plus courts, il n'est pas possible de déterminer si ces pertes glutamatergiques sont des conséquences normales de la désafférentation ou au contraire traduirait un emballement pathologique chez les souris *hAPP/APOE4* mâles.

Si le bourgeonnement cholinergique peut être transitoire et disparaître avec la réinnervation glutamatergique (notamment chez les mâles *APOE3* au délai 170), il reste le plus souvent en place malgré la restauration de la densité de l'innervation glutamatergique (mâles *APOE3* au délai 70, femelles *APOE3* à tous les délais). Ce maintien du bourgeonnement cholinergique en parallèle de la réinnervation glutamatergique pourrait s'expliquer par un soutien cholinergique à la maturation des synapses glutamatergiques néoformées. En effet, au cours du développement, le système cholinergique faciliterait d'une part la synaptogénèse glutamatergique via le récepteur $\alpha 7$ nAChR (Lozada et al. 2012a) et d'autre part la stabilisation des terminaisons glutamatergiques ciblant les épines dendritiques via leurs récepteurs $\beta 2$ nAChR (Lozada et al. 2012b).

Bourgeonnement cholinergique et activités oscillatoires

L'existence du bourgeonnement cholinergique a été remise en cause par plusieurs auteurs après lésions électrolytiques (Aubert et al. 1994) ou après transection des voies perforantes (Henderson et al. 1998 ; Phinney et al. 2004), ces approches induisant une atrophie marquée de la couche moléculaire du DG. Cependant, les résultats obtenus chez nos souris ChAT-ChR2 après lésion excitotoxique partielle suggèrent que le bourgeonnement cholinergique n'est pas un artefact dans ces conditions. En effet, les stimulations optogénétiques du MSDB chez les souris *ChAT-ChR2* lésées démontrent que le bourgeonnement cholinergique est bien associé à une augmentation de la force de la modulation cholinergique dans l'hippocampe. Ainsi, si les stimulations des neurones cholinergiques à 20Hz induisent des effets similaires chez les souris lésées et contrôles (amplification de la puissance des oscillations thêta et diminution de l'amplitude des oscillations gamma), les souris lésées sont plus sensibles à la modulation cholinergique puisqu'elles répondent de la même manière dès les stimulations à 5Hz. Par conséquent, dans nos conditions de lésion entorhinale excitotoxique et partielle, le bourgeonnement cholinergique n'est vraisemblablement pas qu'un épiphénomène généré par une atrophie du tissu.

La modulation des oscillations dans la bande de fréquence thêta par nos stimulations optogénétiques des neurones cholinergiques est globalement cohérente avec la littérature. En effet, le type de thêta qui domine durant le sommeil paradoxal et l'anesthésie à l'uréthane est sensible aux antagonistes muscariniques tel que l'atropine (Vanderwolf 1975). De plus, si les lésions sélectives des neurones cholinergiques n'abolissent pas le thêta hippocampique, elles réduisent son amplitude, ce qui est cohérent avec une influence modulatrice positive de l'acétylcholine sur le thêta (Lee et al. 1994 ; Bassan et al. 1995). Ces effets de l'acétylcholine dépendraient notamment des récepteurs muscariniques mAChRs de type M1 et M3 qui régulent l'activité des interneurons en augmentant notamment la rythmicité de leur comportement de décharge dans la bande thêta (Lawrence et al. 2006). En parallèle,

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

l'acétylcholine modulerait également leurs comportements oscillatoires *via* les nAChRs (Cobb et al. 1999), notamment en augmentant les conductances potassiques dépendant du calcium, ce qui réduirait la fréquence de décharge de certains interneurons (Griguoli et al. 2009). Ainsi, il y aurait une collaboration entre les signalisations *via* les mAChRs (lentes mais toniques) et les nAChRs (rapides mais plus sensibles à la désensibilisation) permettant de réguler l'activation et l'inhibition des interneurons ainsi que leurs propriétés de décharge rythmiques.

L'effet de nos stimulations cholinergiques sur les oscillations gamma paraît moins en accord avec ce qui a été décrit dans la littérature. En effet, sur des tranches d'hippocampe, les oscillations gamma semblent pouvoir être induites par la présence d'agonistes mAChRs (Hajos et al. 2004, Mann et al. 2005), notamment les M1 mAChRs (Fisahn et al. 2002), le même type de résultats ayant été obtenus avec des inhibiteurs de l'AChE (Spencer et al. 2010). Or les résultats de nos stimulations optogénétiques suggèrent que l'effet net de l'acétylcholine *in vivo* inhiberait plutôt l'amplitude des oscillations gamma, au moins au niveau du DG. Les caractéristiques inhérentes aux préparations hippocampe *in vivo* et coupes hippocampiques (absence d'entrées extra-hippocampiques et des projections longitudinales intra-hippocampiques sur les tranches) pourraient expliquer ces différences. En effet, il est possible que dans nos conditions plus physiologiques, les effets de l'acétylcholine passent surtout par la modulation de réseaux neuronaux qui sont détruits sur les tranches hippocampiques plutôt que par une modulation directe des activités dans la bande gamma.

Malgré le peu de données disponibles, les neurones septaux cholinergiques sont probablement des neurones caractérisés par une faible fréquence de décharge basale (Sotty et al. 2003 ; Simon et al. 2006 ; Huh et al. 2010). De plus, il n'y a pas de consensus sur leur comportement de décharge durant les phases d'activité associées au thêta, certaines études suggérant qu'ils n'augmentent pas significativement leurs taux de décharge durant le thêta (Simon et al. 2006) tandis que d'autres argumentent plutôt en faveur d'une augmentation de la fréquence de décharge durant le thêta en association avec l'augmentation des niveaux de choline dans l'hippocampe (Zhang et al. 2010b, 2011). Ainsi, les réponses observées chez les souris témoins avec les stimulations à 20Hz, si elles entraînent la décharge des neurones cholinergiques à une telle fréquence, paraissent *a priori* moins physiologiques que les réponses obtenues dès 5Hz chez les animaux lésés. Cependant, en absence d'enregistrement des neurones cholinergiques du MSDB, nous ne pouvons déterminer la proportion de neurones cholinergiques recrutés, ni à quelle fréquence de décharge ces neurones répondent aux stimulations optogénétiques.

Bourgeonnement cholinergique et bouffées hyper-synchrones dans le DG

Les bouffées d'activité hyper-synchrones dans le DG (*dentate burst*) sont normalement associées au sommeil paradoxal et coïncident avec l'augmentation de l'activité cellulaire dans le DG ainsi que CA1 et plus largement avec la synchronisation de l'activité à travers tout l'hippocampe (Montgomery et al. 2008). Or, nos analyses de CSD chez les animaux lésés montrent que les bouffées d'activité hyper-synchrones ont un profil similaire à celui obtenu après stimulations des voies perforantes. Ainsi, l'augmentation de fréquence de ces bouffées spontanées chez les animaux lésés serait liée à la lésion entorhinal. Ce résultat suggère que la lésion entorhinal partielle entraîne paradoxalement une augmentation aberrante de l'activité hippocampique et notamment du DG.

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

Or, le MCI est également caractérisé par l'augmentation de l'activité du cortex entorhinal et de l'hippocampe (Dickerson et al. 2005 ; Das et al. 2012), un phénomène spécifique au MCI qui finirait par disparaître avec la progression de la pathologie vers la démence (Hämäläinen et al. 2007). De plus, chez le patient aussi, cette hyperactivité toucherait préférentiellement le DG et contribuerait directement au développement des déficits cognitifs (Yassa et al. 2010, 2011a ; Bakker et al. 2012). Si chez l'Homme, l'origine de cette hyperactivité reste obscure, il a été proposé qu'elle serait liée à l'atrophie hippocampique (Putcha et al. 2011) et potentiellement à l'atteinte entorhinale et de ses projections vers l'hippocampe (Yassa et al. 2010 ; 2011a). Nos résultats vont dans ce sens en démontrant qu'une lésion excitotoxique partielle du cortex entorhinal induit une augmentation de l'activité dans le DG. Ainsi, si les études avec des souris transgéniques sur-exprimant l'A β ont suggéré que l'hyperactivité hippocampique est principalement générée par des perturbations des réseaux hippocampiques induits par les accumulations amyloïdes (Palop & Mucke 2010), nos résultats suggèrent que des facteurs structurels tels que le syndrome de déconnexion hippocampique sont suffisant pour générer ces hyperactivités aberrantes.

Plusieurs arguments pourraient expliquer en quoi l'atteinte du cortex entorhinal induit paradoxalement une hyperexcitabilité hippocampique. En effet, chez le Rongeur, la lésion spécifique des neurones de la couche III du cortex entorhinal est connue pour induire une hyperexcitabilité chronique du cortex entorhinal lui-même et de l'hippocampe (Scharfman et al. 1998). Ainsi, la lésion entorhinale pourrait en soi entraîner des perturbations de la circuiterie de la formation hippocampique aptes à générer des patrons d'hyperactivité anormaux. Par ailleurs, des modifications intra-hippocampiques induites par la lésion entorhinale pourraient contribuer à la mise en place de ces activités aberrantes via la perturbation de la balance excitation/inhibition, notamment au niveau du DG. En effet, la désafférentation de l'hippocampe est associée avec une dégénérescence transneurale touchant spécifiquement les interneurons parvalbumine du DG (Nitsch et al. 1992). Or, ces atteintes des réseaux inhibiteurs pourraient faciliter l'émergence des activités hyper-synchrones. Ces pertes spécifiques s'expliqueraient notamment par une sensibilité exacerbée des interneurons parvalbumine à l'inflammation qui accompagne la gliose induite par la dénervation de l'hippocampe (Rappert et al. 2004). De manière intéressante, le même type de perte se retrouve également chez les patients dans le cortex parahippocampique (Inaguma et al. 1992) et dans les différentes sous-régions hippocampiques (Brady et al. 1997). Enfin, l'augmentation de l'excitabilité intrinsèque des cellules granulaires après désafférentation pourrait également avoir contribué à l'augmentation de l'activité dans le DG, là encore en lien avec les réactions inflammatoires et notamment à la libération de NF κ -2 par la gliose réactive accompagnant la désafférentation (Becker et al. 2013).

Le fait que les stimulations optogénétiques des afférences cholinergiques induisent une diminution de la fréquence des bouffées hyper-synchrones suggère une influence compensatrice du bourgeonnement cholinergique sur l'hyperactivité hippocampique. Un soutien indirect à cette hypothèse pourrait venir des résultats obtenus avec les souris *APOE4* mâles lésée à 30 jours. En effet, chez ces souris, l'absence de bourgeonnement cholinergique est associée à une diminution de la densité synaptique glutamatergique dans l'ensemble des circuits intra-hippocampiques, ce qui tendrait à montrer que l'absence de bourgeonnement cholinergique favorise la perturbation globale des réseaux hippocampiques. Or, si l'absence de bourgeonnement cholinergique exacerbe l'hyperactivité associée à la lésion entorhinale, ces patrons aberrants d'activité pourraient expliquer l'étendue plus large des perturbations

La compensation du syndrome de déconnexion hippocampique

synaptiques dans l'hippocampe. En effet, il a été proposé que l'hyperactivation de l'hippocampe et des cortex associés durant le stade de MCI induise une excitotoxicité (abondance de libération de glutamate) qui contribuerait directement aux pertes neuronales et synaptiques ainsi qu'aux déficits mnésiques associés (Morcom et al. 2007). Cependant, il faut noter que chez les souris témoins, la stimulation cholinergique est associée au contraire à une augmentation de la fréquence de décharge en bouffées. Il est donc également possible que l'augmentation de la fréquence des bouffées hyper-synchrones observées chez les souris lésées soit également influencée par l'augmentation du tonus cholinergique induit par le bourgeonnement cholinergique. Du coup, la stimulation optogénétique, en augmentant encore plus les niveaux d'acétylcholine extracellulaire, induirait en fait une désensibilisation des récepteurs ou encore un recrutement d'autres récepteurs ce qui mènerait à la réduction des décharges hyper-synchrones. Quoiqu'il en soit, contrairement aux effets du bourgeonnement sur les activités oscillatoires thêta et gamma où le bourgeonnement cholinergique potentialise simplement l'influence normale du système cholinergique, le bourgeonnement cholinergique inverse diamétralement la direction de l'influence cholinergique normale sur les bouffées hyper-rythmiques.

Conclusion

Globalement, nos résultats obtenus chez les souris *hAPP/APOE* suggèrent que le bourgeonnement cholinergique est bien apte à compenser fonctionnellement la déconnexion hippocampique, au moins du point de vue des capacités de navigation et d'orientation spatiale. De plus, le contrôle exercé par le bourgeonnement cholinergique sur les décharges hyper-synchrones accompagnant la déconnexion hippocampique paraît être un mécanisme crédible contribuant à l'effet compensateur du bourgeonnement cholinergique face à la lésion partielle du cortex entorhinal. Ce contrôle serait notamment prépondérant dans le cadre des activations cholinergiques accompagnant les phases d'encodages en mémoire et de sommeil paradoxal.

Conclusion générale

L'objectif principal de mon travail de thèse était de déterminer en quoi les réorganisations synaptiques dans l'hippocampe participent à la récupération fonctionnelle après lésion entorhinale et en quoi la perturbation de ces phénomènes par l'allèle *APOE4* pourrait contribuer à ses effets sur la cognition au cours du MCI.

Au préalable, mon travail a consisté à déterminer en quoi la lignée de souris *hAPP/APOE* est un modèle satisfaisant des effets cognitifs contrastés de l'allèle *APOE4* sur la cognition.

En effet, chez l'Homme, la présence de l'*APOE4* serait associée à des bénéfices cognitifs durant la petite enfance (Wright et al. 2003) cela jusqu'à la vingtaine (Han et al. 2007a ; Mondadori et al. 2007). Par la suite, l'*APOE4* serait plutôt associée à une influence négative sur la cognition (Schultz et al. 2008). Ces effets opposés de l'*APOE4* seraient ainsi une illustration particulièrement intéressante de phénomène de pléiotropie antagoniste qui expliquerait pourquoi des allèles ayant des effets négatifs sur le vieillissement restent positivement sélectionnés par les mécanismes évolutifs (Williams 1957).

Cependant, l'effet positif de l'*APOE4* durant les jeunes années de vie reste discuté chez l'Homme (Ihle et al. 2012) et n'ont pas été clairement étudié dans les modèles murins. Or, la première étude de ma thèse a permis de confirmer l'existence de cet effet positif de l'*APOE4* sur la cognition spatiale chez la souris *hAPP/APOE* (Publication n°1). Ainsi, cette lignée de souris paraît être un modèle satisfaisant des effets cognitifs de l'*APOE4*, d'autant plus que cet allèle est également associé à des déficits mnésiques subtils apparaissant avec l'âge (Kornecook et al. 2009).

Comme les effets négatifs de l'*APOE4* chez l'Homme seraient essentiellement dus à l'augmentation de l'incidence de pathologies neurodégénératives (Foster et al. 2013 ; Praetorius et al. 2013), j'ai ensuite cherché à déterminer si les souris *hAPP/APOE4* middle-aged (11-16 mois) sont plus sensibles à la lésion du cortex entorhinal. En effet, le cortex entorhinal serait sélectivement touché durant le MCI (Gomez-Isla et al. 1996), la phase clinique où l'*APOE4* induirait le maximum de ces effets négatifs (Corder et al. 1995 ; Growdon et al. 1996 ; Dal Forno et al. 1996 ; Brainerd et al. 2013).

Cette étude ([Publication n°2](#)) m'a permis de déterminer que les souris *hAPP/APOE4* sont effectivement plus sensibles à la lésion entorhinale, notamment du point de vue de la mémoire et de l'orientation spatiale, une fonction qui, chez l'Homme, est sélectivement touchée chez les patients porteurs de l'*APOE4* au cours du MCI ([Laczo et al. 2010](#)). De plus, cette étude suggère que ces déficits spécifiques pourraient être liés à des perturbations de réorganisation synaptique dans le DG en réponse à la désafférentation induite par la lésion entorhinale.

Ayant déterminé que les souris *hAPP/APOE4* modélisent de manière satisfaisante les effets de l'*APOE4*, et que ces souris présentent un déficit de bourgeonnement cholinergique, j'ai pu les utiliser en tant qu'outil afin de déterminer quelle est la contribution du bourgeonnement cholinergique à la récupération fonctionnelle. En effet, si depuis des années il est suggéré que les phénomènes de bourgeonnement synaptique cholinergique et glutamatergique sont impliqués dans la compensation du syndrome de déconnexion hippocampique induit par la lésion entorhinale, aucune preuve expérimentale directe n'a encore pu étayer cette hypothèse. De plus, aucun mécanisme potentiel n'a, à ce jour, pu être avancé pour expliquer en quoi le bourgeonnement cholinergique serait capable de compenser la désafférentation glutamatergique induite par la lésion entorhinale.

La troisième étude de cette thèse ([Publication n°3](#)) suggère que le bourgeonnement cholinergique compense effectivement la déconnexion hippocampique et que ces réorganisations sont en interaction avec un processus plus lent de réinnervation glutamatergique. De plus, il apparaît également que l'effet compensateur du bourgeonnement cholinergique pourrait aller de pair avec le contrôle de l'hyperactivité consécutive à la lésion entorhinale, voire avec la modulation des fluctuations rythmiques de l'excitabilité des réseaux neuronaux dans les bandes de fréquences thêta et gamma. Cependant, l'inhibition de l'hyperactivité représente probablement un mécanisme central de la compensation cholinergique étant donné que, chez le patient MCI, la réduction pharmacologique de l'hyperactivité hippocampique induit une rémission vers un statut cognitif normal ([Bakker et al. 2012](#)). Ainsi, il apparaît que le bourgeonnement cholinergique contribue significativement à la compensation de la déconnexion hippocampique.

Le fait que les souris *hAPP/APOE4* présentent des déficits sévères de bourgeonnement cholinergique pourrait ainsi expliquer pourquoi les patients porteurs de cet allèle expriment des symptômes de désorientation spatiale dès le stade MCI ([Laczo et al. 2010](#)) et également pourquoi ils présentent moins de rémission cognitive spontanée ([Koepsell et al. 2012](#) ; [Roberts et al. 2013](#)) et répondent moins bien aux thérapies basées sur les inhibiteurs de l'activité de l'AChE ([Farlow et al. 1996](#) ; [Wang et al. 2014](#)). Au-delà de la DTA, les effets négatifs de l'*APOE4* sur la compensation cholinergique pourraient également contribuer à son influence négative sur d'autres pathologies neurodégénératives comme les démences liées à Parkinson, à la maladie de Pick et à la maladie d'Huntington celles-ci étant également associées à des atteintes du cortex entorhinal ([Braak et al. 2000](#)).

De plus, nos résultats suggèrent que les hormones sexuelles femelles pourraient complètement reverser les déficits de réorganisation cholinergiques induits par l'*APOE4*. Cet effet qui traduirait une modulation positive globale des œstrogènes sur le bourgeonnement cholinergique ([Kadish et al. 2002a](#)). Cependant, du fait que le MCI se met en place après la ménopause cette compensation hormonale n'a sans doute plus lieu chez les femmes porteuses de l'*APOE4*, celles-ci ayant l'un des plus forts risques de développer une DTA ([Altmann et al.](#)

2014). En faveur d'une interaction privilégiée entre protéine ApoE, œstrogènes et bourgeonnement cholinergique, il faut noter que les thérapies de substitution hormonales améliorent les performances cognitives (Henderson et al. 1996, Schneider & Finch 1997) tout en augmentant la réponse aux inhibiteurs de l'AChE chez les patients DTA (Schneider et al. 1996).

Perspectives

Fondamentalement, ces résultats suggèrent qu'au-delà des accumulations amyloïdes, les pertes neuronales entorhinales contribuent significativement à la pathogénèse du MCI, notamment en contribuant à l'émergence d'une hyperactivité dans les circuits de la formation hippocampique. De plus, il apparaît qu'un déficit de bourgeonnement cholinergique pourrait faciliter le maintien de cette hyperactivité et donc induire une excitotoxicité liée à la libération accrue de glutamate et aux pertes synaptiques qui y sont liées. Un argument en faveur de ce scénario vient du fait que, chez l'Homme, les sujets *APOE4* ont tendance à présenter une plus grande activité hippocampique dès les stades précliniques des DTA (Woodard et al. 2009).

Actuellement, les DTA restent incurables, et la plupart des essais cliniques contemporains ont échoué, potentiellement parce qu'ils ciblent des stades plus avancés de la pathologie que le MCI (Selkoe 2012). Cependant, il faut également noter que la grande majorité de ces essais cliniques reposaient sur des traitements ciblant les accumulations d'A β , or ces accumulations pourraient jouer un rôle moins central dans la pathogénèse qu'actuellement présumé. En effet, l'amyloïdopathie pourrait n'être que l'expression d'un mécanisme protecteur qui s'est emballé plutôt qu'une cause centrale de la pathogénèse (Smith et al. 2002, Maltsev et al. 2013). De plus, l'amyloïdopathie n'est pas spécifique aux DTA et l'existence de nombreux individus asymptomatiques suggèrent que ce n'est pas un facteur suffisant pour déclencher l'expression clinique du MCI ou d'une DTA (Iacono et al. 2014). Au contraire, il apparaît que la présence de pertes neuronales, notamment dans le cortex entorhinal de même que la perte de leurs projections vers l'hippocampe serait l'une des principales caractéristiques distinguant les patients des sujets asymptomatiques (Terry et al. 1991). Or, ces pertes neuronales entorhinales n'entraînent pas nécessairement de symptômes cognitifs, en raison notamment des compensations synaptiques qui prennent place dans l'hippocampe. En effet, si durant le MCI la perte de neurones entorhinaux entraînerait une hyperactivité de la formation hippocampique allant de pair avec l'apparition des symptômes (Dickerson et al. 2005 ; Yassa et al. 2010, 2011a ; Das et al. 2012), nos résultats suggèrent que le bourgeonnement cholinergique peut en limiter l'ampleur.

Par conséquent, si le bourgeonnement cholinergique est bien impliqué dans la limitation de l'hyperactivité hippocampique et de l'excitotoxicité qui l'accompagne durant le MCI, une bithérapie combinant inhibiteurs de l'AChE (iAChE) avec *mémantine* (antagoniste NMDA) paraît potentiellement prometteuse. En effet, si cette approche reposant sur des médicaments déjà validée est sans doute moins séduisante pour les laboratoires pharmaceutiques, il semble qu'une telle bithérapie induit chez des patients DTA modérés un bénéfice cognitif prolongé (Gauthier et al. 2013). Or, nos résultats suggèrent que le recours précoce à cette bithérapie durant le stade de MCI pourrait être encore plus bénéfique. En effet, la combinaison de ces deux médicaments aurait un effet synergique anti-excitotoxique (directement via la mémantine et indirectement via la potentialisation de la transmission cholinergique associée au bourgeonnement) pouvant ralentir significativement l'avancé de la pathologie. De plus, si cela

s'avère judicieux, les effets positifs d'une telle bithérapie pourraient éventuellement encore être renforcés en la combinant avec des traitements antiépileptiques qui réduisent l'hyperactivité hippocampique et induisent une réduction des symptômes cognitifs chez les patients MCI (Bakker et al. 2012).

Malgré tout, s'il s'avère que les déficits de bourgeonnement cholinergique induits par l'*APOE4* sont également présents chez les 40 à 50% de patients porteurs de cet allèle, ils risquent de limiter la portée de telles médications dans cette sous-population. Cependant, de par les effets compensateurs des hormones sexuelles femelles sur le bourgeonnement cholinergique chez les souris *hAPP/APOE4*, il est possible que des thérapies ciblant les voies de signalisations liées aux œstrogènes puissent permettre de contourner le problème de l'inhibition du bourgeonnement cholinergique par l'*APOE4*. Les thérapies de remplacement hormonale n'étant pas sans danger, il est intéressant de remarquer qu'il existe néanmoins des modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes moins problématiques que les traitement classiques et qui sont déjà validés en pratique clinique dans le cadre des traitements du cancer du sein, de l'ostéoporose et des symptômes liées à la ménopause (Acaz-Fonseca et al. 2014). Enfin, chez les patients masculins porteurs de l'*APOE4*, on peut imaginer un traitement visant à contourner les effets négatifs de l'*APOE4* sur le bourgeonnement cholinergique. En effet, il a été récemment démontré chez le Rongeur que des traitements à base d'agonistes exogènes des récepteurs LRP facilitent le bourgeonnement et la réinnervation synaptique dans le système nerveux périphérique (Yoon et al. 2013).

Bibliographie

A.

- Acaz-Fonseca E/Garcia-Segura LM 2014 *Mol Cell Endocrinol* 389(1-2): 48-57. Role for astrocytes in the neuroprotective actions of 17beta-estradiol and selective estrogen receptor modulators.
- Aguire GK/D'Esposito M 1996 *Cereb Cortex* 6: 823-829. The parahippocampus subserves topographical learning in man.
- Akiyama H/Wyss-Coray T 2000 *Neurobiol Aging* 21(3): 383-421. Inflammation and Alzheimer's disease.
- Akram A/Haroutunian V 2010 *Molec Neurodegen* 5; 36: increased expression of RXRalpha in dementia: an early harbinger for the cholesterol dyshomeostasis?
- Alexander DM/Gordon E 2007 *biological psychology* 75(3): 229-238. The contribution of apoE alleles on cognitive performance and dynamic neural activity over six decades.
- Allen TA/Fortin NJ 2013 *PNAS*: the evolution of episodic memory.
- Alonso A/Garcia-Austt E 1987 *exp brain res* 67(3); 502-509. Neuronal sources of theta rhythm in the entorhinal cortex of the rat. II. Phase relation between unit discharges and theta field potentials.
- Altmann A/Greicius MD 2014 *Ann Neurol* 75(4): 563-573. Sex modifies the APOE-related risk of developing Alzheimer's disease.
- Alzheimer's Association, "2010 Alzheimer's disease facts and figures", *Alzheimer's and dementia*, vol6, n2, pp 158-194, 2010.
- Amaral DG/ Kurz J 1985 *J Comp Neurol* 240(1): 37-59. An analysis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat.
- Amaral DG/Lavenex P 2007 *Prog brain res* 163: 3-22. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies).
- Andersen RA & Buneo CA 2002 *Annu Rev Neurosci* 25: 189-220. Intentional maps in posterior parietal cortex.
- Andrade-Moraes CH/Lent R 2013 *brain* 136(12): 3738-3752. Cell number changes in Alzheimer's disease related to dementia, not to plaques and tangles.
- Andrews-Zwilling Y/Huang Y 2010 *J neurosci* 30(41); 13707-13717. Apolipoprotein E4 causes Age- and Tau-dependent impairment of GABAergic interneurons, leading to learning and memory deficits in mice.
- Andrews-Zwilling Y/Huang Y 2012 *PLoS ONE* 7(7):e40555. Hilar GABAergic Interneuron Activity Controls Spatial Learning and Memory Retrieval.
- Anzalone S/Savage L 2009 *Behav Brain Res* 201: 272-278. Acetylcholine efflux from retrosplenial areas and hippocampal sector during maze exploration.
- Apartis /Bassant MH 1998 *J Neurophysiol* 79 : 1633-1642. Loss of rhythmically bursting neurons in rat medial septum following selective lesion of septo hippocampal cholinergic system.

- Arendt T/ Marcova L 1997 *J neurosci* 17(2): 516-129. Plastic neuronal remodeling is impaired in patients with AD carrying apoE ϵ 4 allele.
- Arendt T/Brückner MK 1999 *J Neural Transm* 106(5-6): 513-523. Cortical load of PHF-tau in Alzheimer's disease is correlated to cholinergic dysfunction.
- Arendt T 2001 *Neuroscience* 102(4): 723-765. Alzheimer's disease as a disorder of mechanisms underlying structural brain self-organisation.
- Arendt T 2012 *Mol Neurobiol* 46(1): 125-135. Cell cycle activation and aneuploid neurons in AD.
- Arriagada PV/Hyman BT 1992 *neurology* 42(9): 1681-1688. Distribution of alzheimer-type pathologic changes in nondemented elderly individuals matches the pattern in Alzheimer's disease.
- Astur RS/Sutherland RJ 2002 *Behav Brain Res* 132(1): 77-84. Humans with hippocampus damage display severe spatial memory impairments in a virtual Morris water task.
- Atri A/Growdon JH 2008 *Alzheimer Dis Assoc Disord* 22 : 209-221. Long-term course and effectiveness of combination therapy in Alzheimer disease.
- Aubert I/Quirion R 1994 *J Neurosci* 14(5): 2476-2484. Multiples cholinergic markers are unexpectedly not altered in the rat dentate gyrus following entorhinal cortex lesions.
- Avila J 2009 *Front Aging Neurosci* 1: 1. The tau code.
- Axmacher N/Fell J 2010 *PNAS* 107: 3228-3233. Cross-frequency coupling supports multi-item working memory in the human hippocampus.
- Aztiria E/Leanza G 2007 *Neurosci Lett* 416(2): 133-137. Extensive training in a maze task reduces neurogenesis in the adult rat dentate gyrus probably as a result of stress.
- Aztiria E/Leanza G 2009 *Neurobiol Aging* 30(10): 1614-1625. Septal grafts restore cognitive abilities and amyloid precursor protein metabolism.

B.

- Bachevalier J/Nemanic S 2008 *Hippocampus* 18: 64-80. Memory for spatial location and object-place associations are differently processed by the hippocampal formation, parahippocampal areas TH/TF and perirhinal cortex.
- Bachmeier C/Crawford F 2012 *neurodegener dis* 11(1): 13-21. A multifaceted role for apoE in the clearance of beta-amyloid across the blood-brain barrier.
- Bakker A/Stark CEL 2008 *Science* 319: 1640-1642. Pattern separation in the human hippocampal CA3 and dentate gyrus.
- Bakker A/Gallagher M 2012 *Neuron* 74; 467-474: reduction of hippocampal hyperactivity improves cognition in amnesic mild cognitive impairment.
- Bales KR/Paul SM 2000 *Neurobiol Aging* 21(3): 427-432. Neurionflammation and Alzheimer's disease: critical roles for cytokine/Abeta-induced glial activation, NF-kappaB, and apolipoproteine E.

- Balin BJ/Abrams JT 1998 *Med Microbiol Immunol* 187: 23-42. Identification and localization of *Chlamydia pneumoniae* in the Alzheimer's brain.
- Bandopadhyay R/Thom M 2013 *Neuropathol Appl Neurobiol* 40(2): 177-190. A comparative study of the dentate gyrus in hippocampal sclerosis in epilepsy and dementia.
- Barabash A/Cabranes JA 2009 *Neurobiol Aging* 30: 1254-1264. APOE, ACT and CHRNA7 genes in the conversion from amnesic mild cognitive impairment to Alzheimer's disease.
- Barbeau EJ/Ceccaldi M 2012 *JAD*: 28(4) : 823-837. Extent and neural basis of semantic memory impairment in mild cognitive impairment.
- Barger SW/Mattson MP 1997 *J Neurochem* 69(1):60-67: Isoform-Specific modulation by Apolipoprotein E of the activities of secreted β -Amyloid precursor protein.
- Barnes CA 1979 *J Comp Physiol Psychol* 93 : 74-104. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat.
- Barnes CA/Honig WK 1980 *Can J Psychol* 34(1): 29-39. Spatial memory deficit in senescent rats.
- Barnes CA/O'Keefe J 1983 *Neurobiol Aging* 4(2): 113-119. Loss of place specificity in hippocampal complex spike cells of senescent rat.
- Bartus T/Lippa AS 1982 *Science* 217: 408-417. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction.
- Bartus RT 2000 *Exp Neurol* 163(2): 495-529. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis.
- Barulli D/Stern Y 2013 *Trends in cognitive Science*; September: efficiency, capacity, compensation, maintenance, plasticity: emerging concepts in cognitive reserve.
- Bassan MH /Lamour YA 1995 *Neurodegeneration* 4: 61-70. Selective immunolesion of the basal forebrain cholinergic neurons: effects on hippocampal activity during sleep and wakefulness in the rat.
- Battaglia FP/McNaughton BL 2004 *J Neurosci* 24; 4541-4550. Local sensory cues and place cell directionality: additional evidence of prospective coding in the hippocampus.
- Baxter MG & Gallager M 1996 *Behav Neurosci* 110(3): 460-467. Intact spatial learning in both young and aged rats following selective removal of hippocampal cholinergic input.
- Becher JC/Bell J 2006 *J med genet* 43(5): 414-418. The distribution of apoE alleles in Scottish perinatal deaths.
- Becker D/Vlachos A 2013 *Front in cell neurosci* 7; 257: tumor necrosis factor alpha maintains denervation-induced homeostatic synaptic plasticity of mouse dentate granule cells.
- Beffert U/Herz J 2004 *J Lipid Res* 45(3): 403-409. Functions of lipoprotein receptors in neurons.
- Belinson H/Michalelson DM 2008 *J Neurosci* 28(18): 4690-4701. Activation of the amyloid cascade in apolipoprotein E4 transgenic mice induces lysosomal activation and neurodegeneration resulting in marked cognitive deficits.

- Bell RD/Zlokovic BV 2012 *Nature* 485: 512-516. Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A.
- Bell-McGinty S/Becker JT 2005 *Arch Neurol* 62; 1393-1397: differential cortical atrophy in subgroups of mild cognitive impairment.
- Belzung C/Vogel R 1989 *Psychopharmacology* 97: 388-391. Behavioural effects of the benzodiazepine receptor partial agonist RO 16-6028 in mice.
- Benchenane K/Wiener SI 2010 *Neuron* 66:921–36. Coherent theta oscillations and reorganization of spike timing in the hippocampal- prefrontal network upon learning.
- Bennett et al. 2002 *Neurology* 59:198-205: Natural history of mild cognitive impairment in older persons.
- Bennett RE/Brody DL 2013 *J Neuropathol Exp Neurol* 72(5): 396-403. Human apolipoprotein E4 worsen acute axonal pathology but not amyloid-Beta immunoreactivity after traumatic brain injury in 3xTG-AD mice.
- Berchtold NC/Cotman CW 1998 *Neurobiol Aging* 19(3): 173-189. Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-roma period to the 1960s.
- Berchtold NC/Cotman CW 2014 *Neurobiol Aging* 35(9): 1961-1972. Brain gene expression pattern differentiate mild cognitive impairment from normal aged and Alzheimer's disease.
- Berg RW & Kleinfeld D. 2003 *J. Neurophysiol.* 89:104–17. Rhythmic whisking by rat: retraction as well as protraction of the vibrissae is under active muscular control.
- Bergado JA/Frey JU 2007 *Neurobiol Learn Mem* 88: 331-341. Cholinergic afferents to the locus coeruleus and noradrenergic afferents to the medial septum mediate LTP-reinforcement in the dentate gyrus by stimulation of the amygdala.
- Berger-Sweeney J/ Sharma M 1994 *J Neurosci* 14(7): 4507-4519. Differential effects on spatial navigation of immunotoxin-induced cholinergic lesions of the medial septal area and nucleus basalis magnocellularis.
- Berteau-Pavy F/ Raber J 2007 *neuroscience* 147(1): 6-17. Effects of sex and apoE4 on object recognition and spatial navigation in the elderly.
- Beydoun MA/Zonderman AB 2012 *Neurobiol aging* 33; 720-731: Sex differences in the association of the apolipoprotein E epsilon 4 allele with incidence of dementia, cognitive impairment, and decline.
- Bi GQ & Poo MM. 1998 *J Neurosci* 18: 10464–10472. Synaptic modifications in cultured hippocampal neurons: dependence on spike timing, synaptic strength, and postsynaptic cell type.
- Bien-Ly N/ Huang Y 2012 *J Neurosci* 32(14):4803-4811. Reducing human apolipoprotein E levels attenuates age-dependent A β accumulation in mutant human amyloid precursor protein transgenic mice.
- Bierer LM/Davis KL 1995 *J Neurochem* 64(2) : 749-760. Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits.

- Bird CM/Burgess N 2010 *Hippocampus* 20(10): 1154-1169. Topographical short-term memory differentiates AD from frontotemporal lobar degeneration.
- Blain JF/Poirier J 2004 *Neurobiol Dis* 15(3): 510-509. A role for lipoprotein lipase during synaptic remodeling in the adult mouse brain.
- Blain JF/Poirier J 2006 *Neurobiol Dis* 31(3): 505-514. A deficit in astroglial organization causes the impaired reactive sprouting in human apolipoprotein E4 targeted replacement mice.
- Blanchard RJ & Blanchard DC 1989 *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 13: S3-14. Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion.
- Blennow K, et al. 2006 *Lancet* 368; 387-403. Alzheimer's disease.
- Bloss CS/Bondi MW 2008 *biol psychiatry* 64:904-906. Decreased cognition in children with risk factors for AD.
- Bohbot VD/Nadel L 1998 *Neuropsychologia* 36(11): 1217-1238. Spatial memory deficits in patients with lesions to the right hippocampus and to the right parahippocampal cortex.
- Bokde ALW/Hampel H 2009 *Prog in Neurobiol* 89; 125-133: assessing neuronal networks: understanding Alzheimer's disease.
- Boller F/Forbes MM 1998 *J Neurol Sci* 158: 125-133. History of dementia and dementia in history: An overview.
- Bonnevie T/Moser MB 2013 *Nat neurosci* 16(3): 309-317. Grid cells require excitatory drive from the hippocampus.
- Bookheimer SY/Small GW 2000 *N Engl J Med* 343(7): 450-456. Patterns of brain activation in people at risk for Alzheimer's disease.
- Bordji K/Buisson A 2010 *J Neurosci* 30(47): 15927-15942. Activation of extrasynaptic, but not synaptic NMDAR modifies APP expression pattern and increases A β production.
- Borenstein AR/Mortimer JA 2006 *Alzheimer Dis Assoc Disord* 20(1) : 63-72. Early-life risk factors for Alzheimer disease.
- Bour A/Mathis C 2008 *behavioural brain research* 193: 174–182. Middle-aged human apoE4 tr mice show retention deficits on a wide range of spatial memory tasks.
- Bove R/De Jager PL 2013 *Neurology (dec)*: Age at surgical menopause influences cognitive decline and alzheimer pathology in older women.
- Bowen DM & Davison AN 1980 *Psychol Med* 10(2): 315-319. Biochemical changes in the cholinergic system of the ageing brain and in senile dementia.
- Braak H/Braak E 1991 *acta neuropathol* 82(4): 239-259: neuropathological staging of alzheimer-related changes.
- Braak H & Braak E 1992 *Neurobiol Aging* 15: 355-356. Morphological criteria for the recognition of Alzheimer's disease and the distribution pattern of cortical changes related to this disorder.

- Braak H/Braak E 2000 *Ann NY Acad Sci* 911: 221-239. Pathological changes in the parahippocampal region in select non-Alzheimer's dementias.
- Braak H/Del Tredici K 2006 *acta neuropathologica* 112(4): 389-404. Staging of alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immune-cytochemistry.
- Braak/Del Tredici 2011 *acta neuropathologica* 121(5): 589-595. Alzheimer's pathogenesis: is there neuron-to-neuron propagation?
- Brady DR/Mufson EJ 1997 *Neuroscience* 80(4): 1113-1125. Parvalbumin-immunoreactive neurons in the hippocampal formation of alzheimer's diseases brain.
- Bragin A/Buzsaki G 1995 *Journal of neuroscience* 15(1): 47-60. Gamma (40-100Hz) oscillation in the hippocampus of behaving rat
- Brainerd CJ/Fisher GG 2013 *Neuropsychology* 27(1); 86-94: the apolipoprotein E genotype predicts longitudinal transition to mild cognitive impairment but not to alzheimer's dementia: finding from a nationally representative study.
- Brandon MP/ Hasselmo ME 2011 *Science* 332:595–99. Reduction of theta rhythm dissociates grid cell spatial periodicity from directional tuning.
- Brankack J/Fox SE 1993 *Brain Res* 615: 310–327. Current source density analysis of the hippocampal theta rhythm: associated sustained potentials and candidate synaptic generators.
- Brecht WJ/Huang Y 2004 *J Neurosci* 24(10): 2527-2534. Neuron-specific apolipoprotein e4 proteolysis is associated with increased tau phosphorylation in brains of transgenic mice.
- Brickman AM/Small SA 2010 *hippocampus* 21(9): 923-928. Hippocampal subregion differentially associates with standardized memory tests.
- Brier MR/Ances BM 2014 *Brain* (May). Network Dysfunction in Alzheimer's disease: refining the disconnection hypothesis.
- Brody DL/Holtzman DM 2008 *Science* 321(5893): 1221-1224. Amyloid-beta dynamics correlate with neurological status in the injured human brain.
- Bronfman FC/Van Leuven F 2000 *Neuroscience* 97(3): 411-417. No evidence for cholinergic problems in apolipoprotein E knockout and apolipoprotein E4 transgenic mice.
- Brown JA / Bookheimer SY 2011 *PNAS* 108(51): 20760-5. Brain network local interconnectivity loss in aging APOE-4 allele carriers.
- Brun VH /Moser EI 2002 *Science* 296: 2243–2246. Place cells and place recognition maintained by direct entorhinal-hippocampal circuitry.
- Brun VH/Moser MB 2008 *Neuron* 57(2) : 290-302. Impaired spatial representation in CA1 after lesion of direct input from entorhinal cortex.
- Brunholz S / Morfini G 2011 *Exp Brain Res* 217(3-4): 353-364. Axonal transport of APP and the spatial regulation of APP cleavage and function in neuronal cells.
- Bruns A & Eckhorn R 2004 *Int J Psychophysiol* 51(2) : 97-116. Task-related coupling from high- to low-frequency signals among visual cortical areas in human subdural recordings.

Bu G 2009 Nat Rev Neurosci 10(5) : 333-344. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy.

Bu XL/Wang YJ 2014 Eur J Neurol (june). A study on the association between infectious burden and Alzheimer's disease.

Buckner RL/Mintun MA 2005 J Neuro 25 (34): 7709-7717. Molecular, structural, and functional characterization of Alzheimer's disease: evidence for a relationship between default activity, amyloid, and memory.

Burgess N/O'Keefe J 2002 Neuron 35: 625-641. The human hippocampus and spatial and episodic memory.

Burgess N 2006 Trends Cogn Sci 10(12): 551-557. Spatial memory: how egocentric and allocentric combine.

Burggren AC/Booheimer SY 2011 int J AD; 956053. Thickness in entorhinal and subicular cortex predicts episodic memory decline in mild cognitive impairment

Burke SN/Barnes CA 2012 Hippocampus 22: 2032-2044. Representation of three-dimensional objects by the rat perirhinal cortex.

Burkhardt MS/Martins RN 2004 J Alzheimers Dis 6(3): 221-226. Oestrogen replacement therapy may improve memory functioning in the absence of APOE epsilon4.

Burwell RD & Amaral DG 1998 J Comp Neurol 398: 179-205. Cortical afferents of the Perirhinal, posrrhinal, and entorhinal cortices of the rat.

Busche MA/Konnerth A 2012 PNAS 109(22): 8740-8745. Critical role of soluble amyloid- β for early hippocampal hyperactivity in a mouse model of Alzheimer's disease.

Buttini M/Mahley RW 1999 J Neurosci 59: 4807-4880. Expression of human Apolipoprotein E3 or E4 in the brains of Apoe +/- mice: isoform-specific effects on neurodegeneration.

Buttini M/Mucke L 2000 Neuroscience 97(2); 207-210: dominant negative effects of apolipoprotein E4 revealed in transgenic models of neurodegenerative disease.

Buttini M/Mucke L 2010 Am J Pathol 177(2): 563-569. Cellular source of apoliporototein E4 determines neuronal susceptibility to excitotoxic injury in thransgenic mice.

Buzsaki G/ Vanderwolf CH 1983 Brain Res 287: 139-171. Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat.

C.

Cabalka LM/Van Hoesen GW 1992 Neurobiol Aging 13(2): 283-291: alteration in the pattern of nerve terminal protein immunoreactivity in the perforant pathway in AD and in rats after entorhinal lesions.

Cacucci F/O'Keefe J 2008 PNAS 105(22): 7863-7868. Place cell firing correlates with momory deficits and amyloid plaque burden in Tg2576 Alzheimer mouse model.

- Caillé I/ Prochiantz A. 2004 *Development* 131: 2173–2181. Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone.
- Calhoun ME / Jucker M 1998 *Neurobiol Aging* 19(6): 599-606. Hippocampal neuron and synaptophysin-positive bouton number in aging C57BL/6 Mice.
- Cambon K/Stewart MG 2000 *Neuroscience* 97(4), 685-692: synaptic loss is accompanied by an increase in synaptic area in the dentate gyrus of aged human apolipoprotein E4 transgenic mice.
- Canolty RT/ Knight RT. 2006 *Science* 313: 1626–1628. High gamma power is phase-locked to theta oscillations in human neocortex.
- Canolty RT/Knight RT 2010 *Trends cogn sci* 14(11): 506-515. The functional role of cross-frequency coupling.
- Carmelli D / Christian JC 1999 *Neuroepidemiology* 18(3), 125-133. The effect of apoE4 in the relationships of smoking and drinking to cognitive function.
- Carmichael O/Jones RN 2012 *Neuroimage* 66C: 449-456. Coevolution of brain structures in mild cognitive impairment.
- Carr MF/Frank LM 2012 *Neuron* 75: 700-713. Transient slow gamma synchrony underlies hippocampal memory replay.
- Carter CJ 2010 *neuroscience letters* 483(2): 96-100. APP, APOE, complement receptor 1, clusterin and PICALM and their involvement in the herpes simplex life cycle.
- Carter CJ 2011 *International journal of alzheimer disease* 2010:140539. Alzheimer's disease: a pathogenic autoimmune disorder caused by herpes simplex in a gene-dependent manner.
- Castaldo AM/ Nixon RA 2000 *American journal of pathology* 157(1): 277-286. Endocytic pathway abnormalities precede amyloid beta deposition in sporadic AD and Down syndrome.
- Carmeliet P & De Strooper B 2012 *Nature* 485: 451-452. A breach in the blood-brain barrier.
- Caselli RJ/Reiman EM 2009 *N Engl J Med* 361(3): 255-263. Longitudinal modeling of age-related memory decline and the apoE4 effect.
- Castello MA/Soriano S 2013 *Aging res rev* (October). On the origin of Alzheimer's disease. Trials and tribulations of the amyloid hypothesis.
- Cavedo E/Frisoni GB 2014 *Neurobiol Aging* (March). Medial temporal atrophy in early and late-onset Alzheimer's disease.
- Cea-del Rio CA/McBain CJ 2011 *J Physiol* 589: 609-627. Cholinergic modulation amplifies the intrinsic oscillatory properties of CA1 hippocampal cholecystokinin-positive interneurons.
- Cerasti E/Treves A 2010 *PLOS computational biology*: 6(4)-e1000759. How informative are spatial CA3 representations established by the dentate gyrus?
- Cerf E/ Raussens V 2011 *the FASEB journal* 25(5): 1585-1595. High ability of apoE4 to stabilise A β , the pathological entities responsible for AD.

- Champagne D/Poirier J 2005 *Exp Neurol* 194: 31-42. Effect of apolipoprotein E deficiency on reactive sprouting in the dentate gyrus of the hippocampus following entorhinal cortex lesion: role of the astroglial response.
- Chang Q & Gold PE 2003 *J Neurosci* 23(7): 3001-3005. Switching memory systems during learning: changes in patterns of brain acetylcholine release in the hippocampus and striatum in rats.
- Chaudhary 2012 *Cardiovasc Diabetol* 11(1):36. Apolipoprotein E gene polymorphism: effects on plasma lipids and risk of type 2 diabetes and coronary artery disease.
- Chasseigneaux S &Allinquant B 2012 *Journal of Neurochemistry* 120(s1): 99-108. Functions of A β , sAPP α and sAPP β : similarities and differences.
- Chen, L.L./West, J.R. 1983 *Brain Res.*, 272: 354–359. Enhanced acetylcholinesterase staining in the hippocampal perforant pathway zone after combined lesions of the septum and entorhinal cortex.
- Chen Y. & Dong C. 2009 *Cell Death Differ.* 16: 386–394. Abeta40 promotes neuronal cell fate in neural progenitor cells.
- Chen Y/Herz J 2010 *PNAS* 107(26): 12011-12016. ApoE4 reduces glutamate receptor function and synaptic plasticity by selectively impairing ApoE receptor recycling.
- Chételat G/Baron JC 2009 *Neuroimage* 27(4): 934-946. Using voxel-based morphometry to map the structural changes associated with rapid conversion in MCI: a longitudinal IRM study.
- Chevaleyre/Siegelbaum 2010 *Neuron* 66: 560-572. Strong CA2 pyramidal neuro synapses define a powerful disynaptic cortico-hippocampal loop.
- Cho YH & jaffard R 1995 *Neurobiol Learn Mem* 64(3): 285-290. Spatial location learning in mice with ibotenate lesions of entorhinal cortex or subiculum.
- Cholerton B/Asthana S 2002 *Drugs Aging* 19(6): 405-427. Estrogen and Alzheimer's disease: the story so far.
- Cirrito JR/ Holtzman DM 2005 *Neuron* 48: 913-922. Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid- β levels in vivo.
- Clavaguera/Tolnay 2009 *Nature cell biology* 11(7): 909-914. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain.
- Clayton NS/Dickinson A 2003 *Nat rev Neurosci* 4(8) : 685-691. Can animals recall the past and plan for the future?
- Clément F/Belleville S 2010 *Biol Psych* 68; 894-902: compensation and disease severity on the memory-related activations in mild cognitive Impairment.
- Cobb SR/Davies CH 1999 *J Physiol* 518: 131-140. Activation of nicotinic acetylcholine receptors patterns network activity in the rodent hippocampus.
- Cobb SR &Davies CH 2004 *J Physiol* 562(1); 81-88. Cholinergic modulation of hippocampal cells and circuits.
- Colgin LL/Lynch G 2003 *J Neurophysiol* 90: 2358-2366. Septal modulation of excitatory transmission in hippocampus.

- Colgin LL/ Moser EI 2009 *Nature* 462: 353–357. Frequency of gamma oscillations routes flow of information in the hippocampus.
- Colgin LL/Moser EI 2010 *Psychology* 25: 319-329. Gamma oscillations in the hippocampus.
- Colgin LL 2013 *Annu Rev Neurosci* 36: 295-312. Mechanisms and functions of theta rhythms.
- Colton CA/Vitek MP 2004 *J Neuroimmunol* 147(1-2): 62-67. APOE genotype-specific differences in human and mouse macrophage nitric oxide production.
- Connor SA/Nguyen PV 2012 *Learn Mem* 19(11): 535-542. Conversion of short term potentiation to long-term potentiation in mouse CA1 by coactivation of Beta-adrenergic and muscarinic receptors.
- Corbit LH/Balleine BW 2002 *J Neurosci* 22(24): 10976-10984. Sensitivity to instrumental contingency degradation is mediated by the entorhinal cortex and its efferents via the dorsal hippocampus.
- Corder EH/Pericak-Vance 1993 *Science* 261; 921-923: gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families.
- Corder/Tanzi 1995 *Neurology* 45(7): 1323-1328: Apolipoprotein E, survival in Alzheimer's disease patients, and the competing risks of death and Alzheimer's disease.
- Cornwell BR/Grillon C 2008 *J Neuro* 28(23): 5983-5990. Human hippocampal and parahippocampal theta during goal-directed spatial navigation predicted performance on a virtual morris water maze.
- Cosentino S/Stren Y 2008 *Neurology* 70(2): 1842-1849. APOE epsilon 4 allele predicts faster cognitive decline in mild Alzheimer disease.
- Couey JJ/Witter MP 2013 *nat Neurosci* 16(3): 318-324. Recurrent inhibitory circuit as a mechanism for grid formation.
- Crain BJ & Burger PC 1988 *Acta Neuropathol* 76(1): 87-93. The laminar distribution of neuritic plaques in the fascia dentata of patients with AD.
- Crawford F/Mullan M 2009 *neuroscience* 159(4): 1349-1362. Apolipoprotein E-genotype dependent hippocampal and cortical responses to traumatic brain injury.
- Crean S/Arrighi HM 2011 *dementia and geriatric cognitive disorders* 31(1): 20-30. Apolipoprotein E4 prevalence in Alzheimer's disease patients varies across global populations: a systematic literature review and meta-analysis.
- Crews L/Masliah E 2010 *Brain Struct Funct* 214(2-3): 111-126. APP transgenic modeling of Alzheimer's disease: mechanisms of neurodegeneration and aberrant neurogenesis.
- Croxson PL/Baxter MG 2012 *J Neurosci* 32(40); 13787-13795. Acetylcholine facilitates recovery of episodic memory after brain damage.
- Csicsvari J/Buzsaki G 2003 *Neuron* 37: 311–322. Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat.

Cui Z/Young 3rd WS 2013 *Journal of comparative neurology* 521; 1844-1866. Hypothalamic and other connections with dorsal CA2 area of the mouse hippocampus.

Cushman LA/Duffy CJ 2008 *Neurology* 71(12): 888-895. Detecting navigational deficits in cognitive aging and AD using virtual reality.

D.

Dal Forno G/Kawas CH 1996 *Arch Neurol* 53(4): 345-350. Apolipoprotein E genotype and rate of decline in probable Alzheimer's disease.

Damian M/Visser PJ 2013 *Dement Geriatr Cogn Disord* 36(1-2): 1-19: single domain aMCI identified by cluster analysis predicts AD in the European prospective DESCRIPTA Study

Das SR/Wolk DA 2012 *Hippocampus* 23(1): 1-6. Increased functional connectivity within medial temporal lobe in mild cognitive impairment.

Das U/Roy S 2013 *Neuron* 79: 447-460. Activity-induced convergence of APP and BACE-1 in Acidic microdomains via an endocytosis-dependent pathway.

Dasheiff RM & McNamara JO 1982 *Brain Res* 231: 444-450. Electrolytic entorhinal lesions cause seizures.

Daumas S/Lassalle JM 2005 *Learn Mem* 12(4): 375-382. Encoding, consolidation, and retrieval of contextual memory: differential involvement of dorsal CA3 and CA1 hippocampal subregions.

Davies P & Maloney AJ 1976 *Lancet* 2(8000): 1403. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease.

Day M/ Morris RG 2003 *Nature* 424(6945): 205-209. Glutamate-receptor-mediated encoding and retrieval of paired-associate learning.

Deary IJ / Whalley LJ 2002 *Nature* 418(6801): 932. Cognitive change and the apoE4 allele.

De Calignon A / Hyman BT 2012 *Neuron* 73 : 685-697. Propagation of tau pathology in a model of early AD.

DeCoteau WE/Graybiel AM 2007 *PNAS* 104:5644-49. Learning-related coordination of striatal and hippocampal theta rhythms during acquisition of a procedural maze task.

Deiana S/Riedel G 2011 *Behav Brain Res* 221:389-411. The cholinergic system and spatial learning.

Dekosky ST/Mufson EJ 2002 *Ann Neurol* 51(2); 143-144. Upregulation of choline acetyltransferase activity in HIPP and frontal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment.

Delacourte A/David JP 2002 *Exp Gerontol* 37: 1291-1296. Tau aggregation in the hippocampal formation: an ageing or a pathological process?

De Leonibus E/Mele A 2005 *Learn Mem* 12(5): 491-503. A study on the role of the dorsal striatum and the nucleus accumbens in allocentric and egocentric spatial memory consolidation.

- Deller T/Nitsch R 1996 *J Comp Neurol* 365 : 42-55. Sprouting of crossed entorhinodentate fibers after a unilateral entorhinal lesion: anterograde tracing of fiber reorganization with Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin (PHAL).
- de Leon MJ/Fowler J 2001 *PNAS* 98(19); 10966-10971. Prediction of cognitive decline in normal elderly subjects with 2-[18F] fluoro-2-deoxy-D-glucose/ positron-emission tomography (FDG/PET).
- Delpolyi AR/Gorno-Tempini ML 2007 *Neurology* 69(10): 986-997. Spatial cognition and the human navigation network in AD and MCI.
- Deng W/Gage FH 2013 *eLife* 2: 00312. Selection of distinct populations of dentate granule cells in response to inputs as a mechanism for pattern separation in mice.
- Deshpande A/Busciglio J 2006 *Journal of neurosciences* 26(22): 6011-6018. Different conformations of amyloid β induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons.
- Deshmukh SS & Knierim JJ 2011 *Front Behav Neurosci* 5: 69. Representation of non-spatial and spatial information in the lateral entorhinal cortex.
- Desikan RS/Dale AM 2012 *Arch Neurol* 69(6): 709-713. A β -associated clinical decline occurs only in the presence of elevated p-tau.
- Desmond NL & Levy WB 1997 *Hippocampus* 7: 239-45. Ovarian steroidal control of connectivity in the female hippocampus: An overview of recent experimental findings and speculations on its functional consequences.
- Devanand DP/Peterson BS 2012 *Neuroimage* 60(3): 1622-1629. MRI hippocampal and entorhinal cortex mapping in predicting conversion to Alzheimer's disease.
- Dickerson BC/Sperling RA 2005 *Neurology* 65(3): 404-411. Increased hippocampal activation in mild cognitive impairment compared to normal aging and AD.
- Dickerson BC/Sperling RA 2008 *Neuropsychologia* 46(6): 1624-1635. Functional abnormalities of the medial temporal lobe memory system in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: insights from functional MRI studies.
- Didic M/Ceccaldi M 2011 *JAD* 27(1): 11-22. Which memory system is impaired first in AD?
- Dieni CV/Overstreet-Wadiche L 2013 *J Neuro* 33(49); 19131-19142: distinct determinants of sparse activation during granule cell maturation.
- Di Paola M/Caltagitone C 2007 *journal of neurology* 254: 774-781. Episodic memory impairment in patients with Alzheimer's disease is correlated with entorhinal cortex atrophy.
- Djordjevic J/Chertkow H 2008 *Neurobiol of Aging* 29: 693-706. Olfaction in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease.
- Dodart JC/Ungerer A 2000 *Rev Neurosci* 11(2-3): 75-93. The beta-amyloid precursor protein and its derivatives: from biology to learning and memory processes.
- Dong LM/Agard DA 1994 *J Biol Chem* 269(35): 22358-22365. Human Apolipoprotein E, role of arginine 61 in mediating the lipoprotein preference of the e3 and e4 isoforms.

- Dornan WA/Gunther KL 1997 *Behav Brain Res* 86(2): 181-189. Comparison of site specific injections into the basal forebrain on water maze and radial arm maze performance in the male rat after immunolesioning with 192 IgG saporin.
- Douchamps V/Lever C 2013 *J Neuro* 33(20); 8689-8704. Evidence for encoding versus retrieval scheduling in the hippocampus by theta phase and acetylcholine
- Dragoi G, Buzsaki G. 2006 *Neuron* 50:145–57. Temporal encoding of place sequences by hippocampal cell assemblies.
- Du H/Yan SS 2010 *PNAS* 107(43); 18670-18675. Early deficits in synaptic mitochondria in an AD mouse model.
- Dudek FE & Spitz 1997 *J Clin Neurophysiol* 14: 90-101. Hypothetical mechanisms for the cellular and neurophysiologic basis of secondary epileptogenesis: proposed role of synaptic reorganization.
- Dumanis SB/ Hoe HS 2009 *J Neurosci* 29: 15317-15322. ApoE4 decreases spine density and dendritic complexity in cortical neurons in vivo.
- Dumanis SB / Hoe HS 2011 *plos one* 6(2): e17203. ApoE receptor 2 regulates synapse and dendritic spine formation.
- Dupret D/Csicvari J 2010 *Nature neuroscience* 13(8): 995-1002. The reorganization and reactivation of hippocampal maps predict spatial memory performance
- Duran-Aniotz C/Soto C 2013 *Acta Neuropathol Comm* 1(1): 76. Brains from non-Alzheimer's individuals containing amyloid deposits accelerate Abeta deposition in vivo.
- Dutar P/ Lamour Y 1995 *Physiol Rev* 75 : 393-427. The septohippocampal pathway: structure and function of a central cholinergic system.
- Duyckaerts C/Potier MC 2009 *Acta neuropathol* 118; 5-36: classification and basic pathology of alzheimer disease.

E.

- Egert S/Huebbe P 2012 *proc nutr soc* 71(3): 410-424. ApoE genotype: from geographic distribution to function and responsiveness to dietary factors.
- Eichenbaum H/Ranganath C 2007 *Annu rev Neurosci* 30: 123-152. The medial temporal lobe and recognition memory.
- Eisenberg DT/Hayes MG 2010 *American journal of physical anthropology* 143(1): 100-111. Worldwide allele frequencies of the human apolipoprotein E gene: climate, local adaptations adaptations, and evolutionary history.
- Ekstrom AD/Fried I 2003 *Nature* 425 : 184-188. Cellular networks underlying human spatial navigation.
- Engelborghs S/De Deyn PP 2006 *Neurobiol Aging* 24; 285-292. Dose dependent effect of APOE4 on behavioral symptoms in frontal lobe dementia.

Epstein R/Kanwisher N 1998 *Nature* 392(6676): 598-601. A cortical representation of the local visual environment.

Epstein RA/feiler AM 2007 *J Neurophysiol* 97(5): 3670-3683. Visual scene processing in familiar and unfamiliar environments.

Ergorul C & Eichenbaum H 2004 *Learn Mem* 11(4): 397-405. The hippocampus and memory for “what”, “where” and “when”.

Etienne P/Quirion R 1986 *Neuroscience* 19(4) : 1279-1291. Nucleus basalis neuronal loss, neuritic plaques and choline acetyltransferase activity in advanced Alzheimer's disease.

F.

Fadda F/Stancampiano R 2000 *Neuroreport* 11(10): 2265-2269. Hippocampal acetylcholine release correlates with spatial learning performance in freely moving rats.

Fagan AM/Holtzman DM 1996 *J Biol Chem* 271(47): 30121-30125. Apolipoprotein E-containing High Density Lipoprotein Promotes neurite outgrowth and is a ligand for the low density lipoprotein receptor-related protein.

Fagan AM/Holtzman DM 2002 *Neurobiol dis* 9: 305-318. Human and murine apoE markedly alters A β metabolism before and after plaque formation in a mouse model of AD.

Fanselow MS/Dong HW 2010 *Neuron* 65: 7-19. Are the dorsal and ventral HIPP functionally distinct structures?

Fantie BD & Goddard GV 1982 *Brain Res* 252: 227-237. Septal modulation of the population spike in the fascia dentata produced by perforant path stimulation in the rat.

Farlow/Hui 1996 *Ann N Y Acad Sci* 802: 101-110. Apolipoprotein E genotype and gender influence response to tacrine therapy.

Fass B & ramirez JJ 1984 *J Neurosci Res* 12 : 445-458. Effects of ganglioside treatments on lesion-induced behavioral impairments and sprouting in the CNS.

Fay TB/Wright M 2010 *J Int Neuropsych Soc* 16(1): 94-105. Cognitive reserve as a moderator of postconcussive symptoms in children with complicated and uncomplicated mild traumatic brain injury.

Fell J/ Fernandez G 2001 *Nat Neurosci* 4: 1259–1264. Human memory formation is accompanied by rhinal-hippocampal coupling and decoupling.

Fell J & Awmacher N 2011 *Nat Rev Neurosci* 12(2): 105-118. The role of phase synchronization in memory processes.

Fennema-Notestine C/Dale AM 2009 *human brain mapping* 30(10):3238-3253: structural biomarkers for preclinical and mild AD.

Ferbinteanu J/Shapiro ML 2011 31(25): 9135-9146. Memory modulated journey-dependent coding in the rat hippocampus.

- Ferrari C/Fratiglioni L 2012 *Neurobiol Aging* 34(1): 13-21. How can elderly apoE4 carriers remain free from dementia?
- Ferri CP/ Menezes PR 2005 *Lancet* 366(9503): 2112-2117. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study.
- Ferry B / Majchrzak M 2006 *Behav Neurosci* 120(5): 1180-1186. Selective involvement of the lateral entorhinal cortex in the control of the olfactory memory trace during conditioned odor aversion in the rat.
- Filippini N/Mackay CE 2009 *PNAS* 106(17): 7209-7214. Distinct patterns of brain activity in young carriers of the APOE4 allele.
- Finch CE & Sapolsky RM 1999 *Neurobiol Aging* 20(4): 407-428. The evolution of Alzheimer disease, the reproductive schedule, and apoE isoforms.
- Finch CE, Stanford CB 2004 *Quarterly Review of Biology* 79: 3–50. Meat-adaptive genes and the evolution of slower aging in humans.
- Finch CE 2010 *PNAS* 107: 1718-1724. Evolution of the human lifespan and diseases of aging: roles of infection, inflammation, and nutrition.
- Fisahn A/ McBain CJ 2002 *Neuron* 33 : 615-624. Muscarinic induction of hippocampal gamma oscillations requires coupling of the M1 receptor to two mixed cation currents.
- Foley JM/Hinkin CH 2012 *Appl Neuropsychol Adult* 19(1): 16-25. Cognitive reserve as a protective factor in older HIV-positive patients at risk for cognitive decline.
- Foster TC & Deadwyler SA 1992 *Brain Res* 587 : 95-101. Acetylcholine modulates averaged sensory evoked responses and perforant path evoked field potentials in the rat dentate gyrus.
- Foster JK/Ames D 2013 *Brain* 136; 2201-2216: lack of reliable evidence for a distinctive epsilon4-related cognitive phenotype that is independent from clinical diagnostic status: findings from the Australian imaging biomarkers and lifestyle study.
- Fouquet M/Chételat G 2009 *Brain* 132(8): 2058-2067. Longitudinal brain metabolic changes from aMCI to AD.
- Frank LM/Wilson M 2000 *Neuron* 27(1): 169-178. Trajectory encoding in the hippocampus and entorhinal cortex.
- Frazier CJ/Papke RL 2003 *J Neurophysiol* 89: 3018-3028. Nicotinic receptors on local circuit neurons in dentate gyrus: a potential role in regulation of granule cell excitability.
- Freneau RT Jr/Edwards RH 2004 *Science* 304: 5678-5679. Vesicular glutamate transporters 1 and 2 target to functionally distinct synaptic release sites.
- Freund TF & Antal M 1988 *Nature* 336 : 170-173. GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus.
- Friedman G/Groswasser Z 1999 *Neurology* 52(2): 244-248. Apolipoprotein E4 genotype predicts a poor outcome in survivors of traumatic brain injury.

Fries P/Singer W 2001 *Science* 291: 1560-1563. Desimone R. Modulation of oscillatory neuronal synchronization by selective visual attention.

Fries P. A 2005 *Trends Cogn Sci* 9: 474–480. Mechanism for cognitive dynamics: neuronal communication through neuronal coherence.

Friese U/Gruber T 2012 *Neuroimage* 66C: 642-647. Successful memory encoding is associated with increased cross-frequency coupling between frontal theta and posterior gamma oscillations in human scalp-recorded EEG.

Frotscher M & Leranth C 1985 *J Comp Neurol* 239: 237-246. Cholinergic innervation of the rat hippocampus as revealed by choline acetyltransferase immunocytochemistry: a combined light and electron microscopic study.

Fujioka H/Perry G 2013 *J Health care poor underserved* 24(4); 70-78: Apolipoprotein E4 prevents growth of malaria at the intraerythrocyte stage: implications for differences in racial susceptibility to Alzheimer's disease.

Fukami S/Saido TC 2002 *Neurosci Res* 43(1): 39-56. Abeta-degrading endopeptidase neprilysin in mouse brain: synaptic and axonal localization inversely correlating with Abeta pathology.

Fukutani Y/Cairns NJ 1995 *Neurosc Let* 200; 57-60: neurons, intracellular and extracellular neurofibrillary tangles in subdivisions of the hippocampal cortex in normal ageing and Alzheimer's disease.

Fullerton SM/Sing CF 2000 *Am J Hum Genet* 67: 881-900. Apolipoprotein E variation at the sequence haplotype level: implications for the origin and maintenance of a major human polymorphism.

Fyhn M/Moser MB 2004 *Science*; 305:1258-1264. Spatial representation in the entorhinal cortex.

Fyhn M/Moser EI 2007 *Nature* 446: 190-194. Hippocampal remapping and grid realignment in entorhinal cortex.

Fyhn M/Moser MB 2008 *Hippocampus* 18:1230-1238. Grid cells in mice

G.

Galani R/Kelche C 1998 *Behav Brain Res* 96(1-2): 1-12. Spatial memory, habituation, and reactions to spatial and nonspatial changes in rats with selective lesions of the hippocampus, the entorhinal cortex or the subiculum.

Gallagher et al. 2010 *Curr Alzheimer Res* 7:197-199. Bridging neurocognitive aging and disease modification: targeting functional mechanisms of memory impairment.

Gallardo G/Südhof TC 2008 *Nature Neuro* 11(3): 301-308. A molecular pathway of neurodegeneration linking alpha-synuclein to apoE and Abeta peptides.

Ganguly K& Kleinfeld D. 2004 *PNAS* 101:12348–53. Goal-directed whisking increases phase-locking between vibrissa movement and electrical activity in primary sensory cortex in rat.

Garcia-Segura LM/Chowen JA 1999 *J Neurobiol.* 40(4): 574-84. Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair.

- Garcia-Osta A/Alberini CM 2009 *learning&memory* 16: 267-272. Amyloid beta mediates memory formation.
- Garibotto V/Perani D 2013 *Neurobiol Aging* 34(11): 2694-2698. Cholinergic activity correlates with reserve proxies in Alzheimer's disease.
- Gauthier S/Molinuevo JL 2013 *Alzheimer's & dementia* 9:326-331. Benefits of combined cholinesterase inhibitor and memantine treatment in moderate-severe Alzheimer's disease.
- Gaykema RP/Traber J 1990 *J Comp Neurol* 293(1): 103-124. Cortical projection pattern of the medial septum-diagonal band complex.
- Gaykema RP/ Luiten PG 1991 *neuroscience* 43: 349-360. Patterns of direct projections from the hippocampus to the medial septum-diagonal band complex: anterograde tracing with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin combined with immunohistochemistry of choline acetyltransferase.
- Geddes JW / Chui HC 1985 *science* 230(4730): 1179-1181. Plasticity of hippocampal circuitry in AD.
- Genis L/Michaelson DM 2000 *J neurosci res* 60(4): 559-564. Tau hyperphosphorylation in apoE-deficient and control mice after closed head injury.
- Gerard HC/Hudson AP 2005 *Microb Pathog* 39: 19–26. The load of Chlamydia pneumoniae in the Alzheimer's brain varies with APOE genotype.
- Gerard HC/Balin BJ 2006 *FEMS Immunol Med Microbiol* 48: 355–66. Chlamydia (Chlamydia) pneumoniae in the Alzheimer's brain.
- Ghebremedhin E/Braak H 1998 *Experimental Neurology* 153: 152-155. High frequency of apolipoprotein E epsilon4 allele in young individuals with very mild Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes.
- Gilat-Frenkel M/Michaelson D 2013 *Curr Alzh Res* (November). Involvement of the apoER2 and LRP1 receptors in mediating the pathological effects of ApoE4 in vivo.
- Giannakopoulos P/Bouras C 2000 *Acta Neuropathol* 100(2): 189-195. Neural substrates of spatial and temporal disorientation in AD.
- Gilbert PE/Lee I 2001 *Hippocampus* 11: 626-636. Dissociating hippocampal subregions: a double dissociation between dentate gyrus and CA1.
- Gilbert PE & Kesner RP 2003 *Behav Neurosci* 117(6):1385–1394. Localization of function within the dorsal hippocampus: the role of the CA3 subregion in paired associate learning.
- Gilbert M / Tschanz JT 2014 *Int Psychogeriatr* 15: 1-9. The association of traumatic brain injury with rate of progression of cognitive and functional impairment in a population-based cohort of Alzheimer's disease: the cache county dementia progression study.
- Gilmor ML/Levey AI 1999 *J Comp Neurol* 411(4): 693-704. Preservation of nucleus basalis neurons containing choline acetyltransferase and the vesicular acetylcholine transporter in the elderly with mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease.

- Giovannini MG/Pepeu G 2001 *Neuroscience* 106(1): 43-53. Effects of novelty and habituation on acetylcholine, GABA, and glutamate release from the frontal cortex and hippocampus of freely moving rats.
- Ginsberg SD/Mufson EJ 2006 *J Neurochem* 97: 475-487. Down regulation of trk but not p75^{NTR} gene expression in single cholinergic basal forebrain neurons mark the progression of Alzheimer's disease.
- Girardeau G/Zugaro MB 2009 *Nat neurosci* 12(10): 1222-1223. Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory.
- Giuffrida M. L./ Copani A 2009 *J. Neurosci.* 29: 10582–10587. Beta-amyloid monomers are neuroprotective.
- Glasgow SD & Chapman CA. 2007 *J Neurophysiol* 97: 3868–3879. Local generation of theta-frequency EEG activity in the parasubiculum.
- Glöckner F / Ohm TG 2002 *neuroscience* 114(4): 1103-1114. Genotype-related differences of hippocampal apoE levels only in early stages of neuropathological changes in AD.
- Gold AE & Kesner RP 2005 *Hippocampus* 15(6):808–814. The role of the CA3 subregion of the dorsal hippocampus in spatial pattern completion in the rat.
- Golding NL/Spruston N 2002 *Nature* 418(6895) : 326-331. Dendritic spikes as a mechanism for cooperative long-term potentiation.
- Gomez-Isla T/Hyman BT 1996 *J Neurosc* 16(14); 4491-4500: profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease.
- Gong JS/Michikawa M 2002 *J Biol Chem*: 277(33): 29919-29926. Apolipoprotein E isoform-dependent lipid release from astrocytes prepared from human ApoE3 and ApoE4 Knock-in Mice.
- Goutagny R/Williams S 2003 *Nat Neuro* 12(12): 1491-1493. Self-generated theta oscillations in the hippocampus.
- Grady MS/ Steward O 1989 *J neurosurg* 71(4): 534-537. Synaptic reorganization within the human central nervous system following injury.
- Gray CM/Singer W 1989 *Nature* 338: 334-337. Oscillatory responses in cat visual cortex exhibit intercolumnar synchronization which reflects global stimulus properties.
- Greenberg SM/Hyman BT 1995 *Ann neurol* 38(2): 254-259. Apolipoprotein E epsilon 4 and cerebral hemorrhage associated with amyloid angiopathy.
- Greenstein YJ/Winson J 1988 *Brain res* 438(1-2): 331-334. Long-term potentiation in the dentate gyrus is preferentially induced at theta rhythm periodicity.
- Griffin AL/Hasselmo ME 2007 *J Neuro* 27(9): 2416-2423. Spatial representations of hippocampal CA1 Neurons are modulated by behavioral context in a hippocampus-dependent memory task.
- Griguoli M/Cherubini E 2009 *Eur J Neurosci* 30: 1011-1022. Activation of nicotinic acetylcholine receptors enhance a slow calcium-dependent potassium conductance and reduces the firing of stratum oriens interneurons.

Griguoli M/Cherubini E 2013 J Neuro 33(3) : 1044-1049. In hippocampal oriens interneurons anti-hebbian long-term potentiation requires cholinergic signaling via $\alpha 7$ nAChRs.

Grimm MOW/Hartmann T 2011 Exp brain res 217(3-4): 365-375. The role of APP proteolytic processing in lipid metabolism.

Gritti I Jopnes BE 2006 Neuroscience 143: 1051-1064. Stereological estimates of the basal forebrain cell population in the rat, including neurons containing choline acetyltransferase or phosphate-activated glutaminase and colocalizing vesicular glutamate transporters.

Grön G/Riepe MW 2000 Nature Neurosci 3: 404-408. Brain activation during human navigation: gender-different neural networks as substrate of performance.

Grootendorst J/ Mathis C 2004 Behavioural Brain Research 159(1): 1-14. Human apoE transgenic mouse lines: h-apoE4 and h-apoE3 mice differ on spatial memory performance and avoidance behavior

Growdon JH/Hyman BT 1996 Neurology 47(2): 444-448. Apolipoprotein E genotype does not influence rates of cognitive decline in Alzheimer's disease.

Gu Z/Yakel JL 2011 Neuron 71:155-165. Timing-dependent septal cholinergic induction of dynamic hippocampal synaptic plasticity.

Gu Z/Yakel JL 2012 J Neurosci 32(36): 12337-12348. Cholinergic coordination of presynaptic and postsynaptic activity induces timing-dependent hippocampal synaptic plasticity.

Gupta AS/ Redish AD. 2012 Nat. Neurosci. 15:1032–39. Segmentation of spatial experience by hippocampal theta sequences.

H.

Haase L/Murphy C 2013 Human Brain Mapping 34; 530-542: Functional connectivity during recognition memory in individuals genetically at risk for Alzheimer's disease.

Hafting T/Moser EI 2005 Nature 436: 801-806. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex.

Hafting T/ Moser EI. 2008 Nature 453:1248–52. Hippocampus-independent phase precession in entorhinal grid cells.

Hagan JJ/Morris RG 1988 Behav Brain Res 27(1): 9-20. Place navigation in rats is impaired by lesions of medial septum and diagonal band but not nucleus basalis magnocellularis.

Hagan JJ/Ruigt GS 1992 Physiol Behav 51(2): 255-266. Behavioral and electrophysiological studies of CE lesions in the rat.

Hahn TTG/ Mehta MR 2012 Nat Neurosci 15(11): 1531-1538. Spontaneous persistent activity in entorhinal cortex modulated cortico-hippocampal interaction in vivo.

Hailer/Nitsch 1999 Eur J Neuro 11: 3359-3364. Proliferation of microglia and astrocytes in the dentate gyrus following entorhinal cortex lesion: a quantitative BRDu study.

Hajos N/Freund TF 2004 J Neurosci 24: 9127-9137. Spike timing of distinct types of GABAergic interneuron during hippocampal gamma oscillations in vitro.

- Halliday M/Malluci GR 2014 JBC may. Prions: generation and spread versus neurotoxicity.
- Hämäläinen A/Soininen H 2007 Neurobiol Aging 28(12): 1889-1903. Increased fMRI responses during encoding in mild cognitive impairment.
- Hamos JE/Drachman DA 1989 Neurology 39(3): 355-361: Synaptic loss in Alzheimer's Disease and other dementias.
- Hampstead BM/Sathian K 2011 Neuropsychologia 49; 2349-2361: where did I put that? Patients with amnesic mild cognitive impairment demonstrate widespread reductions in activity during the encoding of ecologically relevant object-location associations.
- Han SD/Bondi MW 2007a Neurobiol Aging 28; 238-247: verbal paired-associate learning by APOE genotype in non-demented older adults: fMRI evidence of a right hemispheric compensatory response.
- Han SD/Bondi MW 2007b J neurol neurosurg psychiatry 78(10): 1103-1108. ApoE and traumatic brain injury in a military population: evidence of a neuropsychological compensatory mechanism?
- Han SD/Bondi MW 2008 Alzheimer's & dementia 4 (2008) 251-254. Revision of the apoE compensatory mechanism recruitment hypothesis.
- Hangya B/Varga V 2009 J Neurosci 29(25): 8094-9102. GABAergic neurons of the medial septum lead the hippocampal network during theta activity.
- Hanger DP/ Noble W 2009 Trends Mol Med 15(3): 112-119. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease.
- Hardman R/Higgins GA 1997 Brain Res 758(1-2): 187-200. Evidence for recovery of spatial learning following entorhinal cortex lesions in mice.
- Hargreaves EL/Knierim JJ 2005 Science 308: 1792-1794. Major dissociation between medial and lateral entorhinal input to dorsal hippocampus.
- Harris M / Huang Y 2003 PNAS 100(19): 10966-10971. Carboxyl-terminal-truncated apolipoprotein E4 causes AD-like neurodegeneration and behavioral deficits in transgenic mice.
- Harris MA/Wolbers T 2012 Hippocampus 22(8): 1770-1780. Ageing effect on path intergration and landmark navigation.
- Hartley T/Burgess N 2003 Neuron 37(5): 877-888. The well-worn route and the path less traveled: distinct neural bases of route following and wayfinding in humans.
- Hartman RE/Holtzman DM 2001 experimental neurology 170(2): 326-344. Behavioral phenotyping of GFAP-apoE3 and apoE4 tg mice: apoE4 mice show profound working memory impairments in the absence of AD-like neuropathology.
- Hashimoto T/Hyman BT 2012 J Neurosci. 32(43):15181-15192. Apolipoprotein E, especially apolipoprotein E4, increases the oligomerization of amyloid β peptide.
- Hasselmo HE/Schnell E 1994 J Neuro 14(6): 3898-3914. Laminar selectivity of the cholinergic suppression of synaptic transmission in rat hippocampal region CA1: computational modeling and brain slice physiology.

- Hasselmo ME/Barkai E 1995 *J Neurosci* 15: 5249-5262. Dynamics of learning and recall at excitatory recurrent synapses and cholinergic modulation in rat hippocampal region CA3.
- Hasselmo ME/Wyble BP 2002 *Neural Comput* 14: 793–817. A proposed function for hippocampal theta rhythm: separate phases of encoding and retrieval enhance reversal of prior learning.
- Hasselmo ME 2006 *Curr Opin Neurobiol* 16: 710-715. The role of acetylcholine in learning and memory.
- Hayashi H/Vance JE 2007 *Journal of Neuroscience* 27(8): 1933-1941. Apolipoprotein E-containing Lipoproteins protect neurons from apoptosis via a signaling pathway involving LRP1.
- Hedden T/Gabrieli JDE 2004 *Nat Rev* 5: 87-96. Insight into the ageing mind: a view from cognitive neuroscience
- Heinonen O/Riekkinen PJ 1995 *Neuroscience* 64(2): 375-384: loss of synaptophysin-like immunoreactivity in the hippocampal formation is an early phenomenon in Alzheimer's disease.
- Henderson VW/White Williams B 1989 *Arch Neurol* 46(4): 391-394. Spatial disorientation in Alzheimer's disease.
- Henderson VW./ Buckwalter JG. 1996 *Psychoneuroendocrinology* 21: 421–30. Cognitive skills associated with estrogen replacement in women with Alzheimer's disease.
- Henderson, Z./ Beeby, J.H. 1998 *Exp. Neurol* 152: 50–63. Density of choline acetyltransferase-immunoreactive terminals in the rat dentate gyrus after entorhinal cortex lesions: a quantitative light microscope study.
- Henriksen EJ/Moser EI 2010 *Neuron* 68; 127-137. Spatial representation along the proximodistal axis of CA1.
- Héraud C/Brion JP 2013 *Neurobiol Dis* 62: 100-112. Increased misfolding and truncation of tau in APP/PS1/tau transgenic mice compared to mutant tau mice.
- Hernandez-ortega K & Arias C 2012 *J neurosci res* 90(11): 2116-2126. ERK activation and expression of neuronal cell cycle markers in the hippocampus after entorhinal cortex lesion.
- Herzog CD/Walsh TJ 2000 *Neurobiol Learn Mem* 73(2): 168-179. Effects of intraseptal zolpidem and chlordiazepoxide on spatial working memory and high-affinity choline uptake in the hippocampus.
- Heys JG/Hasselmo ME 2012 *front in behav neurosci* 6: 32. Effects of acetylcholine on neuronal properties in entorhinal cortex.
- Hirsch-Reinshagen V/Wellington CL 2005 *J Biol Chem* 280(52): 43243-43256. The absence of ABCA1 decreases soluble ApoE levels but does not diminish amyloid deposition in two murine models of Alzheimer disease.
- Hoe HS/Rebeck GW 2006 *Molecular neurodegeneration* 1:18. ApoE decreases tau kinase and phospho-tau levels in primary neurons.
- Hof PR/Morrison JH 2003 *Journal of neuropathology & experimental Neurology* 62(1): 55 Stereologic evidence for persistence of viable neurons in layer II of the entorhinal cortex and CA1 field in AD.
- Hofmann ME/Frazier CJ 2010 *Brain Res* 1318: 42-51. Muscarinic receptor activation modulates the

excitability of hilar mossy cells through the induction of an afterdepolarization.

Hoge J & Kesner RP 2007 *Neurobiol Learn Mem* 88(2):225–231. Role of CA3 and CA1 subregions of the dorsal hippocampus on temporal processing of objects.

Hölscher C 2011 *Bioch Soc Transaction* 39(4); 891-897: Diabetes as a risk factor for Alzheimer's disease: insulin signalling impairment in the brain as an alternative model of Alzheimer's disease.

Holtzman DM/ Schwartz AL 1995 *PNAS* 92: 9480-9484. Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) mediates apolipoprotein E-dependent neurite outgrowth in a central nervous system-derived neuronal cell line.

Holtzman DM/ Paul SM 1999 *J clin invest* 103(6): 15-21. Expression of hAPOE reduces amyloid- β deposition in a mouse model of AD.

Hong XP/Wang JZ 2010 *hippocampus* 20: 1339-1349. Essential role of tau phosphorylation in adult hippocampal neurogenesis.

Honjo K/Verhoeff NP 2009 *Alzheimers Dement* 5(4): 348-360. Alzheimer's disease and infection: do infectious agents contribute to progression of Alzheimer's disease?

Hort J/Vlcek K 2007 *PNAS* 104(10): 4042-4047. Spatial navigation deficit in aMCI.

Howe MW/Graybiel AM 2013a *Nature* 500: 575-579. Prolonged dopamine signaling in striatum signals proximity and value of distant reward.

Howe, W/ Sarter M 2013b *J. Neurosci.* 33, 8742-8752. Prefrontal cholinergic mechanisms instigating shifts from monitoring for cues to cue-guided performance: converging electrochemical and FRMI evidence from rats and humans.

Hoyt BD/Doody RS 2005 *arch Neurol* 62; 454-460: individual growth curve analysis of ApoE4-associated cognitive decline in Alzheimer disease.

Hu J/Van Eldik LJ 1998 *Brain Res* 785(2): 195-206. Amyloid-beta peptide activates cultured astrocytes: morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release.

Huang Y / Mahley R W 2001 *PNAS* 98(15): 8838-8843. Apolipoprotein E fragments present in AD brains induce neurofibrillary tangle-like intracellular inclusions in neurons.

Huang Y 2010 *Trends in Mol Med* 16; 287-294: Abeta-independent roles of apoE4 in the pathogenesis of Alzheimer's disease.

Hubacek JA / Polendne R 2001 *neuropsychology* 43(3): 200-203. A possible role of apoE polymorphism in predisposition to higher education

Huerta PT / Tonegawa S 2000 *Neuron* 25(2): 473-480. Formation of temporal memory requires NMDA receptors within CA1 pyramidal neurons.

Huh CY/Williams S 2010 *J Neurosci* 30: 15951-15961. Glutamatergic neurons of the mouse medial septum and diagonal band of Broca synaptically drive hippocampal pyramidal cells: relevance for hippocampal theta rhythm.

Hultman K/Norris EH 2013 *J Cereb Blood Flow Metab* 33(8): 1251-1258. The apoE e4/e4 genotype potentiates vascular fibrin(ogen) deposition in amyloid-laden vessels in the brain of Alzheimer's disease patients.

Huxter JR/ Csicsvari J 2008 *nature neuroscience* 11(5): 587-594. Theta phase-specific codes for two-dimensional position, trajectory and heading in the hippocampus.

Hyman BT/Barnes CL 1984 *Science* 225(4667): 1168-1170. Alzheimer's Disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation.

Hyman BT/Damasio AR 1986 *Ann neurol* 20(4): 472-481. Perforant pathway changes and the memory impairment of Alzheimer's disease.

Hyman BT/Van Hoesen GW 1987 *Ann neurol* 21(3): 259-267. Reinnervation of the hippocampal perforant pathway zone in Alzheimer's disease.

Hyman B 1996 *Ann Neurol* 40: 135-136. Alzheimer's disease or Alzheimer's diseases? Clues from molecular epidemiology.

Hyman JM/Hasselmo ME 2003 *J Neurosci* 23(37): 11725-11731. Stimulation in hippocampal region CA1 in behaving rats yields long-term potentiation when delivered to the peak of theta and long-term depression when delivered to the trough.

Hyman JM / Hasselmo ME. 2010 *Front. Integr. Neurosci.* 4:2. Working memory performance correlates with prefrontal-hippocampal theta interactions but not with prefrontal neuron firing rates.

Hyman JM/Seamans JK 2011 *Front Neurosci* 5: 24. What is the functional relevance of prefrontal cortex entrainment to hippocampal theta rhythms?

I.

Iacono D/Troncoso JC 2014 *J Neuropathol Exp Neurol* 73(4); 295-304. Mild cognitive impairment and asymptomatic alzheimer disease subjects: equivalent Beta-amyloid and tau loads with divergent cognitive outcomes.

Iaria G/Bohbot VD 2003 *J Neurosci* 23(13): 5945-5952. Cognitive strategies dependent on the hippocampus and caudate nucleus in human navigation: variability and change with practice.

Igarashi KM/Moser EI 2014 *Nature* 510: 143-147. Coordination of entorhinal-hippocampal ensemble activity during associative learning.

Ihle A/Kliegel M 2012 *neuropsychology* 26(3): 267-277. APOE ε4 and cognitive function in early life: a meta-analysis.

Ikonen S/Tanila H 2002 *Hippocampus* 12: 386-397. Cholinergic system regulations of spatial representation by the hippocampus.

Ikonomovic MD/DeKosky ST 2003 *J Alz Dis* 5; 39-48: Cholinergic plasticity in hippocampus of individuals with mild cognitive impairment: correlation with alzheimer's neuropathology.

Inaguma Y/Kato K 1992 *J Neurol Sci* 110(1-2); 57-61. Immunoreactive parvalbumine concentration in parahippocampal gyrus decrease in patients with Alzheimer's disease.

Ishida A./Mattson M. P. 1997 *Neuroreport* 8: 2133–2137. Secreted form of beta-amyloid precursor protein shifts the frequency dependency for induction of LTD, and enhances LTP in hippocampal slices.

Itzhaki RF/Jamieson GA 1997 *Lancet* 349: 241-244. Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's disease.

Iwata N/Saido TC 2002 *J Neurosci Res* 70(3): 493-500. Region-specific reduction of Abeta-degrading endopeptidase neprilysin in mouse hippocampus upon aging.

J.

Jack CR/Trojanowski JQ 2010 *Lancet neurol* 9; 119-128: hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade.

Jack CR/Holtzman DM 2013 *Neuron* 80; 1347-1358: biomarker modeling of Alzheimer's disease.

Jack CR/Petersen RC 2014 *Neurology* 82:1-8. Rates of Beta-amyloid accumulation are independent of hippocampal neurodegeneration.

Jackson J/Redish AD 2007 *hippocampus* 17: 1209-1229. Network dynamics of hippocampal cell-assemblies resemble multiple spatial maps within single tasks.

Jacobs J/Kahana MJ 2009 *Journal of cognitive neuroscience* 22(5): 824-836. Right-lateralized brain oscillations in human spatial navigation.

Jacobs J/Fried I 2010 *PNAS* 107:6487-6492. A sense of direction in human entorhinal cortex.

Jacobs J/Kahana MJ 2013a *Nat Neurosci* 16(9): 1188-1190. Direct recordings of grid-like neuronal activity in human spatial navigation.

Jacobs NS/Fortin NJ 2013b *J Neuro* 33(34): 13888-13893. Critical role of the hippocampus in memory for elapsed time.

Jadhav SP/Frank LM 2012 *Science* 336: 1454-1458. Awake hippocampal sharp-wave ripples support spatial memory.

Janicki SC/Schupf N 2014 *Dement Geriatr Cogn Disord* 38(3-4); 200-213. Estrogen receptor alpha variants affect age at onset of Alzheimer's disease in a multiethnic female cohort.

Jasmin SB /Poirier J 2014 *Brain res* 1562 : 39-51. Differential regulation of ABCA1 and ABGG1 gene expressions in the remodeling mouse hippocampus after entorhinal cortex lesion and liver-X receptor agonist treatment.

Jellinger 2011 *Acta Neuropathologica: neuropathological subtypes of AD.*

Jensen O & Colgin LL 2007 *Trends Cogn Sci* 11: 267–269. Cross-frequency coupling between neuronal oscillations.

Jerman T/ Hunsaker MR 2006 *Learn Mem* 13: 458-464. Disconnection analysis of CA3 and DG in mediating encoding but not retrieval in a spatial maze learning task.

- Jezeck K / Moser MB. 2011 *Nature* 478:246–49. Theta-paced flickering between place-cell maps in the hippocampus.
- Ji Y/Wisniewski T 2003 *Neuroscience* 122: 305-315. Apolipoprotein E isoform-specific regulation of dendritic spine morphology in apolipoprotein E transgenic mice and Alzheimer's disease patients.
- Jinde S/Nakazawa K 2012 *Neuron* 76: 1189-1200. Hilar mossy cell degeneration causes transient dentate granule cell hyperexcitability and impaired pattern separation.
- Johnson DL/Kesner RP 1994 *Behav Brain Res* 61: 1-8. The effects of lesions of the entorhinal cortex and the horizontal nucleus of the diagonal band of Broca upon performance of a spatial location recognition task.
- Johnson A & Redish AD 2007 *J Neurosci* 27: 12176–12189. Neural ensembles in CA3 transiently encode paths forward of the animal at a decision point.
- Jones MW & Wilson MA. 2005 *PLoS Biol.* 3(12):e402. Theta rhythms coordinate hippocampal-prefrontal interactions in a spatial memory task.
- Jonsson T/Stefansson K 2012 *Nature* 488(7409): 96-99. A mutation in APP protects against AD and age-related cognitive decline.
- Jordan BD/Gandy S 1997 *JAMA* 278(2): 136-140. Apolipoprotein E epsilon 4 associated with chronic traumatic brain injury in boxing.
- Josephs KA/Dickson DW 2004 *Arch Neurol* 61; 1579-1584: apolipoprotein E4 is a determinant for Alzheimer-type pathologic feature in tauopathies, synucleinopathies, and frontotemporal degeneration.
- Jung MW/McNaughton BL. 1994 *J Neurosci* 14(12): 7347-7356. Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat.
- Jutras MJ/ Buffalo EA 2009 *J Neurosci* 29: 12521–12531. Gamma-band synchronization in the macaque hippocampus and memory formation.

K.

- Kadish I/van Groen T 2002a *J Neuro* 22(10): 4095-4102. Low levels of estrogen significantly diminish axonal sprouting after entorhinal cortex lesions in the mouse.
- Kadish I/van Groen T 2002b *Brain Res Bull* 57(5): 587-594. Transgenic mice expressing the human presenilin 1 gene demonstrate enhanced hippocampal reorganization following entorhinal cortex lesions.
- Kadish I/van Groen T 2003 *Neuroscience* 116(2): 499-509. Differences in lesion-induced hippocampal plasticity between mice and rats.
- Kadish I/van Groen T 2009 *JAD* 18(2); 429-445. Lesion-induced hippocampal plasticity in transgenic Alzheimer's disease mouse models: influences of age, genotype, and estrogen.
- Kahle JS & Cotman CW 1989 *Brain Res* 482: 159-163. Carbachol depresses synaptic responses in the medial but not the lateral perforant path.

- Kalova E/Bures J 2005 *Behav Brain Res* 159(2): 175-186. Allothetic orientation and sequential ordering of places is impaired in early stages of AD: corresponding results in real place tests and computer tests.
- Kalus P/Kiefer C 2006 *Neuroimage* 30(3): 713-720. Examining the gateway to the limbic system with diffusion tensor imaging: the perforant pathway in dementia.
- Kalmijn S/Kromhout D 1997 *brit med journ* 314(7073): 34-35. Longitudinal study of the effect of apolipoprotein e4 allele on the association between education and cognitive decline in elderly men.
- Kamondi A/ Buzsaki G. 1998 *Hippocampus* 8: 244–261. Theta oscillations in somata and dendrites of hippocampal pyramidal cells in vivo: activitydependent phase-precession of action potentials.
- Katzman R/Peck A 1988 *Ann Neurol* 23(2): 138-144. Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques.
- Kay LM. 2005 *PNAS* 102:3863–68. Theta oscillations and sensorimotor performance.
- Keita MS/Monmaur P 2000 *Brain Res* 887: 323-334. Acetylcholine release in the hippocampus of the urethane anaesthetised rat positively correlates with both peak theta frequency and relative power in the theta band.
- Kelley MS & Steward O 1997 *Rev Neurosci* 8: 147-177. Injury-induced physiological events that may modulate gene expression in neurons and glia
- Kemp K/Scolding N 2014 *Acta Neuropathol* (June). Cell fusion in the brain: two cells forward, one cell back.
- Kennedy PJ/Shapiro ML 2009 *PNAS* 106(26): 10805-10810. Motivational states activate distinct hippocampal representations to guide goal-directed behaviors.
- Kepecs A / Mainen ZF. 2006 *Chem. Senses* 31:167–79. The sniff as a unit of olfactory processing.
- Kerchner GA/Rutt BK 2013 *J Neurosci* 33(42): 16666-16672. Shared vulnerability of two synaptically-connected medial temporal lobe areas to age and cognitive decline: a seven tesla magnetic resonance imaging study.
- Kerr KM/Burwell RD 2007 *hippocampus* 17: 697-708. Functional neuroanatomy of the parahippocampal region: the lateral and medial entorhinal areas.
- Kesner RP/Chiba AA 2001 *Learn Mem* 8(2): 87-95. A neural circuit analysis of visual recognition memory: role of perirhinal, medial and lateral entorhinal cortex.
- Kesner RP 2007 *Learn Mem* 14: 771-781. Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus.
- Khan UA/Small SA 2013 *Nature Neuroscience* 17(2): 304-311: Molecular drivers and cortical spread of lateral entorhinal cortex dysfunction in preclinical Alzheimer's disease.
- Killian NJ/ Buffalo EA 2012 *Nature* 491(7426): 761-764. A map of visual space in the primate entorhinal cortex.
- Kim J/Holtzman DM 2009 *Neuron* 63(3): 287-303. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's

disease.

Kim J/ Lee I. 2011 *J. Neurosci.* 31:16991–7006. Neural correlates of object-in-place learning in hippocampus and prefrontal cortex.

Kim SM, Ganguli S, Frank LM. 2012 *J. Neurosci.* 32:11539–58. Spatial information outflow from the hippocampal circuit: distributed spatial coding and phase precession in the subiculum.

Kitamura HW/Nukina N 2004 *Neuroscience Letters* 369(3): 173-178. Age-dependent enhancement of hippocampal long-term potentiation in KI mice expressing hApoE4 instead of mouse apoE.

Kitt CA/Mobley WC 1984 *Science* 226(4681): 1443-1445. Evidence for cholinergic neurites in senile plaques.

Kjelstrup KB/Moser MB 2008 *Science* 321: 140-143. Finite scale of spatial representation in the hippocampus.

Klausberger T/Somogyi P 2008 *Science* 321(5885): 53-57. Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations.

Klein RC/Sullivan PM 2010 *Neuroscience* 171(4): 1265-1272. Progressive loss of synaptic integrity in human apolipoprotein E4 targeted replacement mice and attenuation by apoE E2.

Klimesch W/Pachinger T 1996 *Neuroreport* 7(7): 1235-1240. Theta band power in the human scalp EEG and the encoding of new information.

Klink R & Alonso A 1997 *J Neurophysiol* 77(4): 1813-1828. Muscarinic modulation of the oscillatory and repetitive firing properties of entorhinal cortex layer II neurons.

Kobayashi M/ Fujita SC 2003 *Neuroreport* 14(5): 699-702. Phosphorylation state of tau in the hippocampus of apoE4 and E3 KI mice.

Kobayashi T/Matsumoto G 2003 *neuroscience* 117: 1025-1035. Contribution of hippocampal place cell activity to learning and formation of goal-directed navigation in rats.

Koenig J/Leutgeb S. 2011 *Science* 332:592–95. The spatial periodicity of grid cells is not sustained during reduced theta oscillations.

Koepsell TD/Monsell SE 2012 *Neurology*: 79: 1591-1598: Reversion from mild cognitive impairment to normal or near-normal cognition.

Koffie RM/Spires-Jones TL 2012 *brain* 135(7): 2155-2168. Apolipoprotein E4 effects in AD are mediated by synaptotoxic oligomeric amyloid-beta.

Kohara K/Tonegawa S 2014 *Nat Neurosci* 17(2): 269-279. Cell type-specific genetic and optogenetic tools reveal hippocampal CA2 circuits.

Kolb B & Walkey J 1987 *Behav Brain Res* 23: 127-145. Behavioural and anatomical studies of the posterior parietal cortex in the rat.

Kordower JH/Mufson EJ 2001 *Ann Neurol* 49: 202-213. Loss and atrophy of layer II entorhinal cortex neurons in elderly people with mild cognitive impairment.

Kornecook TJ/Dodart JC 2009 *Genes, brain, behavior* 9(2): 182-192. Isoform-specific effects of apoE on cognitive performance in targeted-replacement mice overexpressing human APP.

Korwek HW/Weeber EJ 2009 *Mol Neurodegen* 4: 21. ApoE isoform-dependent changes in hippocampal synaptic function.

Kovacs GG/Budka H 2013 *Acta Neuropathol* 126; 365-384. Non-alzheimer neurodegenerative pathologies and their combination are more frequent than commonly believed in the elderly brain: a community-based autopsy series.

Kovari E/Gold G 2013 *Neurology (dec)*: amyloid deposition is decreasing in aging brains: an autopsy study of 1599 older people.

Krafft GA & Klein WL 2010 *Neuropharmacology* 59(4-5): 230-242. ADDLs and the signaling web that leads to Alzheimer's disease.

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

Kraus BJ/Hasselmo ME 2013 *Neuron* 78: 1090-1101. Hippocampal "time cells": time vs path integration.

Kremin T/Hasselmo ME 2007 *Neuroscience* 149: 760-767. Cholinergic suppression of glutamatergic synaptic transmission in hippocampal region CA3 exhibits laminar selectivity: implication for hippocampal network dynamics.

Krstic D/Knuesel I 2013 *Acta neuropathologica communication* 1; 62: the airbag problem-a potential culprit for bench-to-beside translational efforts: relevance for Alzheimer's disease.

Kudrnovsky-Moser S/Fisher P 2013 *JAGS* 61(8); 1416-1415: Recovery from possible late-onset alzheimer's dementia? Evidence from a longitudinal community-based age-cohort study.

Kunitake A/Stewart M 2004 *Hippocampus* 14: 986-999. Differential modulation by carbachol of four separate excitatory afferent systems to the rat Subiculum in vitro.

Kutner KC/Relkin NR 2000 *neurosurgery* 47(3): 651-657. Lower cognitive performance of older football players possessing apolipoprotein E epsilon 4.

L.

Laczo J/Hort J 2009 *Behav brain res* 202(2): 252-259. Spatial navigation testing discriminates two types of aMCI.

Laczo J/Hort J 2010 *neurodegenerative diseases* 8(4): 169-177. Spatial navigation and APOE in Amnesic MCI.

LaDu MJ/van Eldik LJ 2000 *J Biol Chem* 275(43): 33974-33980. Apolipoprotein E receptors mediate the effects of beta-amyloid on astrocyte cultures.

LaDu MJ/Van Eldik LJ 2001 *Neurochem Int* 39(5-6): 427-434. Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors modulate A beta-induced glial neuroinflammatory responses.

Lakatos P/Schroeder CE 2005 *J Neurophysiol* 94(3) : 1904-1911. An oscillatory hierarchy controlling neuronal excitability and stimulus processing in the auditory cortex.

- Lamb BT/Gearhart JD 1993 *Nat Genet* 5(1): 22-30. Introduction and expression of the 400 kilobase amyloid precursor protein gene in transgenic mice.
- Landfield PW/ Tusa RJ. 1972 *Science* 175:87–89. Theta rhythm: a temporal correlate of memory storage processes in the rat.
- Lange KL/Thal LJ 2002 *J Int Neuropsychol Soc* 8(7); 943-955: decline in verbal memory during preclinical Alzheimer's disease: examination of the effect of APOE genotype.
- Lapray D/Klausberger T 2012 *Nat Neurosci* 15(9): 1265-1271. Behavior-dependent specialization of identified hippocampal interneurons
- Larson J/Lynch G. 1986 *Brain Res.* 368:347–50. Patterned stimulation at the theta frequency is optimal for the induction of hippocampal long-term potentiation.
- Laurberg S & Zimmer J 1981 *J Comp Neurol* 200: 433-459. Lesion-induced sprouting of hippocampal mossy fiber collaterals to the fascia dentata in developing and adult rats.
- Lawrence JJ/McBain CJ 2006 *J Physiol* 571: 555-562. Muscarinic receptor activation tunes mouse stratum oriens interneurons to amplify spike reliability.
- Lazarov O/Sisodia SS 2002 *J neurosci* 22(22): 9785-9793. Evidence that synaptically released β -amyloid accumulates as extracellular deposits in the hippocampus of transgenic Mice.
- Leao RN/Kullander K 2012 *Nat Neurosci* 15(11): 1524-1530. OLM interneurons differentially modulate CA3 and entorhinal inputs to hippocampal CA1 neurons.
- Leduc V/Poirier J 2010 *trends in mol med* 16: 469-477. APO and cholesterol homeostasis in Alzheimer's disease.
- Leduc V/Poirier J 2011 *Int J AD*: 974361: Function and comorbidities of apolipoprotein E in Alzheimer's disease.
- Lee MG/Buzsaki G 1994 *Neuroscience* 62: 1033-1047. Hippocampal theta activity following selective lesion of the septal cholinergic system.
- Lee I & Kesner RP 2004 *Hippocampus* 14: 66–76. Encoding versus retrieval of spatial memory: Double dissociation between the dentate gyrus and the perforant path inputs into CA3 in the dorsal hippocampus.
- Lee I/Kesner RP 2005 *Neurobiol Learn Mem* 84(2): 138-147. Disruption of delayed memory for a sequence of spatial locations following CA1- or CA3-lesions of the dorsal hippocampus.
- Lee JW/Jung MW 2009 *Learn & mem* 16: 530-536. Role of dentate gyrus in aligning internal spatial map to external landmark.
- Lee KJ/ Hoe HS 2010 *Neuroscience* 169(1):344-356. Beta amyloid-independent role of amyloid precursor protein in generation and maintenance of dendritic spines.

- Lendon CL / Holtzman DM 2000 *Eur J Neurosci* 12(7) : 2235-2242. No effect of apolipoprotein E on neuronal cell death due to excitotoxic and apoptotic agents in vitro and neonatal hypoxic ischaemia in vivo.
- Leranth C & Hajszan T 2007 *Prog Brain Res* 163: 63-84. Extrinsic afferent systems to the dentate gyrus.
- Leoni V 2001 *clin chem Lab med* 49(3): 375-383. The effect of apoE genotype on biomarkers of amyloidogenesis, tau pathology and neurodegeneration in AD.
- Leutgeb JK/Moser EI 2007 *Science* 315: 961-966. Pattern Separation in the Dentate Gyrus and CA3 of the hippocampus.
- Leutgeb S/Moser MB 2006 *Hippocampus* 16: 765-774. Fast rate coding in hippocampal CA3 cell ensembles.
- Lever C/O'Keefe J 2002 *Nature* 416: 90-94. Long-term plasticity in hippocampal place-cell representation of environmental geometry.
- Levisohn LF/ Isacson O 1991 *brain res* 564(2): 230-244. Excitotoxic lesions of the rat entorhinal cortex. Effects of selective neuronal damage on acquisition and retention of a non-spatial reference memory task.
- Lewis PR & Shute CC 1967 *Brain* 90: 521-540. The cholinergic limbic system : projections to hippocampal formation, medial cortex, nuclei of the ascending cholinergic reticular system, and the subfornical organ and supraoptic crest.
- Li G/Huang Y 2009 *cell stem cell* 5(6): 634-645. GABAergic interneuron dysfunction impairs hippocampal neurogenesis in adult apolipoprotein knockin mice.
- Lilja AM/Marutle A 2011 *J Alz Dis* 23(2): 335-347. Functional interactions of fibrillar and oligomeric amyloid- β with $\alpha 7$ nicotinic receptors in Alzheimer's disease.
- Lim TS/Moon SY 2010 *J Clin Neurol* 6(4): 204-211. Topographical disorientation in mild cognitive impairment: a voxel-based morphometry study.
- Lineweaver TT/Salmon DP 2013 *Am J Psychiatr* 171(2): 201-208. Effect of knowledge of APOE genotype on subjective and objective memory performance in healthy older adults.
- Lippa CF/Drachman DA 1992 *Neurobiol Aging* 13: 405-411. Alzheimer's disease and aging: effects on perforant pathway perikarya and synapses.
- Lipton PA/Eichenbaum H 2007 *J Neuro* 27(21): 5787-5795. Disambiguation of overlapping experiences by neurons in the medial entorhinal cortex.
- Liraz O/Michaelson DM 2013 *Molec Neurodeg* 8; 16: apoE4 induces Abeta42, tau, and neuronal pathology in the hippocampus of young targeted replacement apoE4 mice.
- Lisman JE & Idiart MA 1995 *Science* 267: 1512-1515. Storage of 7 +/- 2 short-term memories in oscillatory subcycles.
- Lisman JE 2007 *Prog Brain Res* 163 : 615-625. Role of the dual entorhinal inputs to hippocampus: a hypothesis based on cue/action (non-self/self) couplets.

- Lisman JE & Jensen O 2013 *Neuron* 77 : 1002-1016. The theta-gamma neural code.
- Lithfous S/Després O 2013 *Ageing Res Rev* 12(1): 201-213. Spatial navigation in normal aging and the prodromal stage of Alzheimer's disease: insights from imaging and behavioral studies.
- Liu Y/Wise PM 2001 *Front Neuroendocrinol* 22: 33-66. Estrogens: trophic and protective factors in the adult brain.
- Liu F/van Duijn CM 2010 *Neurobiol Aging* 31, 1831-1833. The apoE gene and its age-specific effects on cognitive function.
- Liu L / Duff K 2012 *Plos one* 7(2): e31302. Trans-synaptic spread of tau pathology in vivo.
- Liu X/Tonegawa S 2012 *Nature* 484: 381-385. Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall.
- Llorens-martin M/herandez F 2012 *J Alzheimers Dis* 29(4): 921-930. Tau isoform with tree microtubule binding domains is a marker of new axons generated from subgranula zone in the hippocampal dentate gyrus: implications for Alzheimer's disease.
- Llorens-Martin M/DeFelipe J 2014 *Front in Neuroanat* (may). Selective alterations of neuron and circuits related to early memory loss in Alzheimer's disease.
- Loesche J/Steward O 1977 *Brain Res Bull* 2(1): 31-39. Behavioral correlates of denervation and reinnervation of the hippocampal formation of the rat: recovery of alternation performance following unilateral entorhinal cortex lesions.
- Lozada AF/Berg DK 2012a *J Neurosci* 32(22): 7651-7661. Glutamatergic synapse formation is promoted by $\alpha 7$ containing nicotinic acetylcholine receptors.
- Lozada AF/Berg DK 2012b *J Neurosci* 32(24): 8391-9400. Induction of dendritic spines by $\beta 2$ -containing nicotinic receptors.
- Lue LF/Rogers J 1999 *Am J pathol* 155(3): 853-862. Soluble Amyloid β peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease.
- Lynch G/Cotman C 1972 *brain res* 42: 311-318. Induced acetylcholinesterase-rich layer in rat dentate gyrus following entorhinal lesions.
- Lynch G / Cotman C 1976 *Brain Res* 110: 57-71. Changes in the distribution of the dentate gyrus associational system following unilateral or bilateral entorhinal lesions in the adult rat.

M.

- Maaswinkel H/ Whishaw IQ 1999 *Hippocampus* 9:553–561. Hippocampectomized rats are impaired in homing by path integration.
- MacDonald CJ/Eichenbaum H 2011 *Neuron* 71: 737-749. Hippocampal "time cells" bridge the gap in memory for discontinuous events.
- Macrides F/ Forbes WB. 1982 *J. Neurosci.* 2:1705–17. Temporal relationship between sniffing and the limbic theta rhythm during odor discrimination reversal learning.

- Maguire EA/Frith CD 1996 Proc R Soc Lond B, 263:1745-1750. Learning to find your way: a role for the human hippocampal formation.
- Maguire EA/ O'Keefe J 1998 Science 280: 921-924. Knowing where and getting there: a human navigation network.
- Mahley RW 1988 Science 240:622–30. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology.
- Mahley/Huang 2012 Neuron, 76:871-558. Apolipoprotein E sets the stage: response to injury triggers neuropathology.
- Maltsev AV/Galzitskaya OV 2014 J Alzheimers Dis 40(1): 19-32. Activation of Neuronal Defense Mechanisms in Response to Pathogenic Factors triggering induction of amyloidosis in Alzheimer's disease.
- Malchiodi-Albedi F/Falchi M 1997 J Neurosci Res 48(5): 425-438. Protein phosphatase inhibitors induce modification of synapse structure and tau hyperphosphorylation in cultured rat hippocampal neurons.
- Mann EO/Paulsen O 2005 Neuron 45: 105-117. Perisomatic feedback inhibition underlies cholinergically induced fast network oscillations in the rat hippocampus.
- Manning EN/Fox NC 2014 PLOS one 9(5): e97608. APOE4 is associated with disproportionate progressive hippocampal atrophy in AD.
- Manns ID/Jones BE 2001 Neuroscience 107: 249-263. Evidence for glutamate, in addition to acetylcholine and GABA, neurotransmitter synthesis in basal forebrain neurons projecting to the entorhinal cortex.
- Manseau F/Williams S 2008 J Neurosci 28(15): 4096-4107. The hippocamposeptal pathway generates rhythmic firing of GABAergic neurons in the medial Septum and Diagonal Bands: an investigation using a complete septohippocampal preparation in vitro.
- Marcantoni A/Marie H 2013 Eur J Physiol 466(7): 1437-1450. Firing properties of entorhinal cortex neurons and early alterations in an Alzheimer's disease transgenic model.
- Marighetto A / Jaffard R 1989 Pharmacol Biochem Behav 34(3): 553-558. Septal alpha-noradrenergic antagonism in vivo blocks the testing-induced activation of septo-hippocampal cholinergic neurones and produces a concomitant deficit in working memory performance of mice.
- Marighetto A/Jaffard R 1993 Behav Brain Res 56: 133-144. Relationship between testing-induced alterations of hippocampal cholinergic activity and memory performance on two spatial tasks in mice.
- Martin MV/Csernansky JG 2006 Genes Brain Behav 5(8): 614-623. Independent quantitative trait loci influence ventral and dorsal hippocampal volume in recombinant inbred strains of mice.
- Masliah E/Terry R 1994 neuroscience letters 174(1): 67-72. Synaptic and neuritic alterations during the progression of Alzheimer's disease.
- Masliah E/Morris JC 2001 Neurology 56(1): 127-129. Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease.

- Matsuyama S/Nishizaki T 2000 *EJN* 12; 3741-3747. Activation of nicotinic acetylcholine receptors induces long-term potentiation in vivo in the intact mouse dentate gyrus.
- Matsuyama S/Matsumoto A 2003 *J Pharmacol Sci* 93: 180-187. Epibatidine induces LTP via activation of $\alpha 4\beta 2$ nAChRs in vivo in the intact mouse dentate gyrus: both $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nAChRs essential to nicotinic LTP.
- Mauch DH/Pfriegeer FW 2001 *Science* 294(5545): 1354-1357. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol.
- Maurer AP/McNaughton BL 2005 *Hippocampus* 15(7): 841-852. Self-motion and the origin of differential spatial scaling along the septo-temporal axis of the hippocampus.
- May PC/Finch CE 1990 *Neuron* 5(6): 831-839. Dynamics of gene expression for a hippocampal glycoprotein elevated in Alzheimer's disease and in response to experimental lesions in rat.
- Mayeux R/Shelanski M 1995 *Neurology* 45:555-557: synergistic effects of traumatic head injury and apolipoprotein E4 in patients with Alzheimer's disease.
- McDonald RJ/White NM 1994 *Behav neural Biol* 61(3): 260-270. Parallel information processing in the water maze: evidence for independent memory systems involving dorsal striatum and hippocampus.
- McHugh TJ/Tonegawa S 2007 *Science* 317: 94-99. Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network.
- McIlwain KL/Paylor R 2001 *Physiol Behav* 73: 705-717. The use of behavioral test batteries: effects of training history.
- McIntosh AM/Bradley BJ 2012 *PLOS one* 7(10): e47760. The apolipoprotein E (APOE) gene appears functionally monomorphic in chimpanzees.
- McIntyre CK/Gold PE 2003 *Neurobiol Learn Mem* 79(2): 177-183. Patterns of brain acetylcholine release predict individual differences in preferred learning strategies in rats.
- Mizumori SJ/McNaughton BL 1990 *Brain Res* 528(1): 12-20. Reversible inactivation of the medial septum differentially affects two forms of learning in rats.
- McKeon, RJ/Wells J 1989 *Brain Res.*, 503: 317–321. Increase in acetylcholinesterase in the molecular layer of the dentate gyrus in the absence of septal inputs following selective granule cell lesions.
- McQuiston AR 2010 *J Physiol* 588(19): 3727-3742. Cholinergic modulation of excitatory synaptic input integration in hippocampal CA1.
- McNaughton BL/Sutherland RJ 1989 *Exp Brain Res* 76:485-496: Hippocampal granule cells are necessary for normal spatial learning but not for spatially-selective pyramidal cell discharge.
- McNaughton BL/Moser MB 2006a *Nat Rev Neurosci* 7(8): 663-678. Path integration and the neural basis of the cognitive map.
- McNaughton N/Woodnorth MA 2006b *Hippocampus* 16(12): 1102-1110. Restoring theta-like rhythmicity in rats restores initial learning in the Morris water maze.

- Medway CW/Younkin SG 2014 *Mol Neurodegener* 9(1): mar 10. APOE variant p, V236E is associated with markedly reduced risk of Alzheimer's disease.
- Melzer S/Monyer H 2012 *Science* 335: 1506-1510. Long-Range-Projecting GABAergic Neurons Modulate Inhibition in Hippocampus and Entorhinal Cortex.
- Mesulam MM 2000 *annals of the New-York academy of sciences* 924: 42-52. A plasticity-based theory of the pathogenesis of Alzheimer's disease.
- Mesulam M/Weintraub S 2004 *Arch Neurol* 55: 815-828. Cholinergic Nucleus Basalis Tauopathy Emerges early in the Aging-MCI-AD continuum.
- Meyer M/Pääbo S 2012 *Science* 338(6104): 222-226. A high-coverage genome sequence from an archais Denisovan individual.
- Meziane H/Ungerer A. 1998 *PNAS* 95: 12683–12688. Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice.
- Michikawa M/Yanagisawa K 2000 *J Neurochem*: 74(3):1008-1015. Apolipoprotein E exhibits isoform specific promotion of lipid efflux from astrocytes and neurons in culture.
- Miller SL/Dickerson BC 2008 *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79(6): 630-635. Hippocampal activation in adults with mild cognitive impairment predicts subsequent cognitive decline.
- Miller JF/Schulze-Bonhage A 2013 *Science* 342: 1111-1114. Neural activity in human Hippocampal formation reveals the spatial context of retrieved memories.
- Milward EA / Masters CL 1992 *Neuron* 9(1): 129-137. The APP of AD is a mediator of the effects of NGF on neurite outgrowth.
- Mitchell SJ & Ranck JB Jr. 1980 *Brain Res* 189: 49–66. Generation of theta rhythm in medial entorhinal cortex of freely moving rats.
- Mitchell SJ / Olton DS. 1982 *J. Neurosci.* 2:292–302. Medial septal area lesions disrupt theta rhythm and cholinergic staining in medial entorhinal cortex and produce impaired radial arm maze behavior in rats.
- Mizukami K / Armstrong DM 1997 *Neuroreport* 8: 3379-3383. Alterations of GABA (A) beta2/3 immunoreactivity in the dentate gyrus after perforant pathway lesion.
- Mizuseki K/Buzsaki G 2009 *Neuron* 64: 267-280. Theta oscillations provide temporal windows for local circuit computation in the entorhinal-hippocampal loop.
- Moceri VM/Larson EB 2001 *Epidemiology* 12(4): 383-389. Using census data and birth certificates to reconstruct the early-life socioeconomic environment and the relation to the development of Alzheimer's disease.
- Mohapel P/Lindvall O 2005 *Neurobiol aging* 26: 939-946. Forebrain acetylcholine regulates adult hippocampal neurogenesis and learning.
- Molter C/Leinekugel X 2012 *Neuron* 75: 889-903. Rhythmic modulation of theta oscillations supports encoding of spatial and behavioral information in the rat hippocampus.

- Monacelli AM/Duffy CJ 2003 *neurology* 61(11): 1491-1497. Spatial disorientation in Alzheimer's disease: the remembrance of things passed.
- Mondadori CR/Henke K 2007 *cerebral cortex* 17(8): 1934-1947. Better memory and neural efficiency in young apolipoproteinE4 carriers.
- Monsell SE/Kukull W 2013 *Neurology* 80(23): 2121-2129. Comparison of symptomatic and asymptomatic persons with alzheimer disease neuropathology.
- Montarolo F/Tempia F 2013 *PLOS ONE* 8(7): e69381. Early enriched environment exposure protects spatial memory and accelerated amyloid plaque formation in APP^{swe}/PS11166p mice.
- Montgomery KC 1955 *J Comp Physiol Psychol* 48(4): 254-260. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior.
- Montgomery SM/Buzsaki G 2007 *PNAS* 104: 14495-14500. Gamma oscillations dynamically couple hippocampal CA3 and CA1 regions during memory task performance.
- Montgomery SM/Buzsaki G 2008 *J Neurosci* 28(26): 6731-6741. Theta and Gamma Coordination of hippocampal Networks during Waking and Rapid Eye movement Sleep.
- Moreau PH/Mathis C 2008 *Hippocampus* 18(6): 610-622. Neuroanatomical and behavioral effects of a novel version of the cholinergic immunotoxin mu p75-saporin in mice.
- Morcom AM/Rugg MD 2007 *Cerebral Cortex* 17; 2491-2506. Age effects on the neural correlates of episodic retrieval: increased cortical recruitment with matched performance.
- Morishima-kawashima M/Ihara Y 2000 *Am j pathol* 157(6): 2093-2099. Effect of apolipoprotein E allele epsilon4 on the initial phase of amyloid beta-protein accumulation in the human brain.
- Morris RGM/O'Keefe JO 1982 *Nature* 297: 681-683. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions.
- Morris AM/Gilbert PE 2012 *Neurobiol of learning and memory* 97: 326-331. Selective lesions of the dentate gyrus produce disruptions in place learning for adjacent spatial locations.
- Morse JK/Dekosky ST 1986 *exp neurol* 94: 649-658. Gonadal steroids influence axon sprouting in the hippocampal dentate gyrus: a sexually dimorphic response.
- Moser EI/Moser MB 2008 *Annu Rev Neurosci* 31 : 69-89. Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system.
- Mucke L/ Masliah E 1996 *Ann NY acad of science* 777: 82-88. Neurotrophic and neuroprotective effects of hAPP in tg mice.
- Mufson EJ/Kordower JH 2000 *J Comp Neurol* 427(1): 19-30. Loss of nucleus basalis neurons containing trkA immunoreactivity in individuals with mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease.
- Mufson EJ/Kordower JH 2002 *J Comp Neurol* 443(2): 136-153. Loss of basal forebrain p75 (NTR) immunoreactivity in subjects with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease.
- Mufson EJ/Scheff SW 2012 *Acta Neuropathol* 123:13-30: Mild cognitive impairment: pathology and mechanisms.

Muller RU & Kubie JL 1987 *J Neurosci* 7(7) : 1951-1968. The effects of changes in the environment on the spatial firing of hippocampal complex-spike cells.

Murphy C 1999 *Physiol Behav* 66(2): 177-182. Loss of olfactory function in dementing disease.

Musiek ES/Holtzman DM 2012 *Neurology* 25(6); 715-720: origins of Alzheimer's disease: reconciling cerebrospinal fluid biomarker and neuropathology data regarding the temporal sequence of amyloid-beta and tau involvement.

N.

Nadler JV 1981 *Neurosci Lett* 26: 275-281. Desensitization-like changes in GABA receptor binding of rat fascia dentata after entorhinal lesion.

Nagode DA/Alger BE 2011 *PLOS one* 6(11): e27691. Optogenetic release of ACh induces rhythmic burst of perisomatic IPSCs in hippocampus.

Nakashiba T/Tonegawa S 2008 *Science* 319: 1260-1264. Transgenic inhibition of synaptic transmission reveals role of CA3 output in hippocampal learning.

Nakashiba T/Tonegawa S 2012 *Cell* 149: 188-201. Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion.

Nakauchi S/Sumikawa K 2012 *Eur J Neurosci* 35: 1381-1395. Endogenously released ACh and exogenous nicotine differentially facilitate long-term potentiation induction in the hippocampal CA1 region of mice.

Nakazawa K / Tonegawa S 2002 *Science* 297: 211-218. Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall.

Nakazawa K/Tonegawa S 2004 *Nat Rev Neurosci* 5(5): 361-372. NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory.

Nathan BP/ Pitas RE 1994 *Science* 264(850-852). Differential effects of apoE3 and apoE4 on neuronal growth in vitro.

Nathan BP/ Pitas RE 1995 *J biochem chem* 270(34): 19791-19799. The inhibitory effect of apoE4 on neurite outgrowth is associated with microtubule depolymerization.

Nathan BP/Struble RG 2002 *Brain Res* 928: 96-105. Apolipoprotein E4 inhibits, and apolipoprotein E3 promotes neurite outgrowth in cultured adult mouse cortical neurons through the low-density lipoprotein receptor-related protein.

Naumann T/Frotscher M 1997 *Eur J Neurosci* 9(6): 1304-1313. 192 IgG-saporin-induced losses of cholinergic neurons in the septum abolish cholinergic sprouting after unilateral entorhinal lesion in the rat.

Nedelska Z/Hort J 2012 *PNAS* 109(7): 2590-2594. Spatial navigation impairment is proportional to right hippocampal volume.

Negash S/Arnold S 2013 *Curr. Alzheimer Res.*; august: Resilient brain aging: characterization of discordance between Alzheimer's disease pathology and cognition.

- Nerad L & McNaughton N 2006 *Eur J Neurosci* 24: 155–166. The septal EEG suggests a distributed organization of the pacemaker of hippocampal theta in the rat
- Neunuebel JP/Knierim JJ 2012 *Journal of neuroscience* 32(11); 3848-3858: spatial firing correlates of physiologically distinct cell types of the rat dentate gyrus.
- Nilsson LG/Small BJ 2006 *Neuropsychology* 20(6): 645-657. The influence of APOE status on episodic and semantic memory: data from a population-based study.
- Nitsch R/Frotscher M 1992 *PNAS* 89; 5197-5200: reduction of pasttraumatic transneuronal "early gene" activation and dendritic atrophy by the NMDA receptor antagonist MK-801.
- Nitz 2006 *Neuron* 49: 747-756. Tracking route progression in the posterior parietal cortex.
- Nokia MS/Shors TJ 2012 *Plos ONE* 7(2): e31375. Learning to learn: theta oscillations predict new learning, which enhanced related learning and neurogenesis.
- Nordberg 2001 *Biol Psych* 49: 200-210. Nicotinic receptor abnormalities of Alzheimer's disease: therapeutic implications.
- Nordin S & Murphy C 1998 *Ann N Y acad Sci* 855: 686-693. Odor memory in normal aging and Alzheimer's disease.
- Nyakas C/Traber J 1987 *Brain res bul* 1: 533-545. Detailed projection patterns of septal and diagonal band efferents to the hippocampus in the rat with emphasis on innervation of CA1 and dentate gyrus.
- Nyakas C/Spencer DG 1988 *Brain Res Bull* 21: 285-293. Changes in septo-hippocampal projections after lateral entorhinal or combined entorhinal-raphé lesions as studied by anterograde tracing methods.

O.

- O'Brien JL/Sperling RA 2010 *Neurology* 74: 1969-1976. Longitudinal fMRI in elderly reveals loss of hippocampal activation with clinical decline.
- Oddo S/ Laferla FM 2003 *Neuron* 39(3): 409-421. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction.
- O'Donnell HC/Greenberg SM 2000 *N Engl J Med* 342(4): 240-245. Apolipoprotein E genotype and the risk of recurrent lobar intracerebral hemorrhage.
- Ohm TG/März W 1995 *Neuroscience* 66(3): 583-587. Apolipoprotein E polymorphism influences not only cerebral senile plaque load but also Alzheimer-type neurofibrillary tangle formation.
- O'keefe J & Dostrovsky J 1971 *Brain Res* 34(1): 171-175. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat.
- O'Keefe J & Recce ML. 1993 *Hippocampus* 3:317–30. Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm.

O'Leary TP & Brown RE 2009 *Behav Brain Res* 201(1): 120-127. Visuo-spatial learning and memory deficits on the Barnes maze in the 16-month-old APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease.

O'leary TP & Brown RE 2012 *J Neurosci Meth* 203: 315-324. The effects of apparatus design and test procedure on learning and memory performance of C57BL:6J mice on the Barnes maze.

Olivera S/Henley JM 2003 *Molec and Cel Neurosci* 23; 96-106: acetylcholinesterase promotes neurite elongation, synapse formation, and surface expression of AMPA receptors in hippocampal neurones.

Oria RB / Guerrant RL 2005 *Pediatric Research* 57(2): 310-306. ApoE4 protects the cognitive development in children with heavy diarrhea burdens in northeast Brazil.

Orr G/Barnes CA 2001 *Hippocampus* 11(6): 647-654. Hippocampal synaptic plasticity is modulated by theta rhythm in the fascia dentate of adult and aged freely behaving rats.

Oswald CJ/ Good M 2003 *Behav Neurosci* 117(3): 588-595. Entorhinal cortex lesions disrupt the transition between the uses of intra- and extra-maze cues for the navigation in the water maze.

Otero-Millan J/ Martinez-Conde S. 2008 *J. Vis.* 8:1–18. Saccades and microsaccades during visual fixation, exploration, and search: foundations for a common saccadic generator.

Otmakhova NA & Lisman JE 1999 *J neurosci* 19(4) : 1437-1445. Dopamine selectively inhibits the direct cortical pathway to the CA1 hippocampal region.

Otto T / Lynch G 1991 *Behav Neurosci* 105(1): 111-119. Hippocampus and olfactory discrimination learning: effects of entorhinal cortex lesions on olfactory learning and memory in a successive-cue, go-no-go task.

Otto T & Garruto D 1997 *Behav Neurosci* 111(5): 1146-1150. Rhinal cortex lesions impair simultaneous olfactory discrimination learning in rats.

P.

Packard MG/McGaugh JL 1996 *Neurobiol Learn Mem* 65(1): 65-72. Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning.

Pagliardini S/Dickson C 2013 *PLOS ONE* 8(7): e70411. Spontaneous Sleep-Like Brain State Alternations and Breathing Characteristics in Urethane Anesthetized Mice

Paganini-Hill A. 1996 *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 103 (13): 80–86. Estrogen replacement therapy and Alzheimer's disease.

Pai MC & Jacobs WJ 2004 *Int J geriatr Psychiatry* 19(3): 250-255. Topographical disorientation in community-residing patients with Alzheimer's disease.

Palmer A/Good M 2011 *Biochem Soc Trans* 39(4): 902-909. Hippocampal synaptic activity, pattern separation and episodic-like memory: implication for mouse models of AD pathology.

Palop JJ/Mucke L 2010 *Nat Neur* 13(7): 812-818. Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks.

- Panegyres PK/Chen HY 2013 *Am J Neurodegener Dis* 2(4); 300-306: Differences between early and late onset Alzheimer's disease.
- Pankratz N/Nichols WC 2006 *Mov Disord* 21(1):54-59. Presence of an APOE4 allele results in significantly earlier onset of Parkinson's disease and higher risk with dementia.
- Papp EC/ Freund TF 1999 *Neuroscience* 90: 369-382. Medial septal and median raphe innervation of vasoactive intestinal polypeptide-containing interneurons in the hippocampus.
- Parikh, V/ Sarter, M. 2007 *Neuron* 56, 141-154. Prefrontal acetylcholine release controls cue detection on multiple timescales.
- Park JY/ Spruston N 2012 *J Neurosci* 32 (18): 6081-6091. Synergistic actions of metabotropic acetylcholine and glutamate receptors on the excitability of hippocampal CA1 pyramidal neurons.
- Parron C/ Save E 2004 *Exp brain Res* 159(3): 349-359. Evidence for entorhinal and parietal cortices involvement in path integration in the rat.
- Parsons CG / Pulte I 2013 *Neurotox Res* 24: 358-369. Memantine and cholinesterase inhibitors: complementary mechanisms in the treatment of Alzheimer's disease.
- Pavlidis C/Winson J 1988 *Brain Res* 439(1-2): 383-387. Long-term potentiation in the dentate gyrus is induced preferentially on the positive phase of theta-rhythm.
- Pendlebury ST & Rothwell PM 2009 *Lancet Neurol* 8(11): 1006-1018. Prevalence, incidence, and factors associated with pre-stroke and post-stroke dementia: a systematic review and meta-analysis.
- Paxinos G & Franklin KBJ 2004 Gulf Professional publishing. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*.
- Penner MR/Mizumori SJY 2012 *progress in neurobiology* 96: 96-135. Neural systems analysis of decision making during goal-directed navigation.
- Penttonen M/Buasaki G 1998 *Eur J Neurosci* 10: 718-728. Gamma frequency oscillation in the hippocampus of the rat: intracellular analysis in vivo.
- Petersen RC/Winblad B 2001 *Arch Neurol* 58.1985-1992: current concepts in mild cognitive impairment.
- Petersen RC/Jack CR 2009 *Arch Neurol* 66(12): 1447-1455. Mild cognitive impairment, ten years later.
- Petsche H/ Gogolak G. 1962 *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 14:202-11. The significance of the rabbit's septum as a relay station between the midbrain and the hippocampus. I. The control of hippocampus arousal activity by the septum cells.
- Pettigrew C/Albert M 2013 *Cogn Neurosci*; 4(3-4): 136-142. Relationship of cognitive reserve and APOE status to the emergence of clinical symptoms in preclinical Alzheimer's disease.
- Pfeiffer BE & Foster DJ 2013 *Nature* 497(7447): 74-79. Hippocampal place-cell sequences depict future paths to remembered goals.

- Pfriegeer FW 2010 *brain Res Rev* 63: 39-46. Role of glial cells in the formation and maintenance of synapses.
- Pfriegeer FW/Ungerer N 2011 *Progr in Lipid Res* 50: 357-371. Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes.
- Phinney, A.L./ Jucker, M. 2004 *Eur. J. Neurosci.*, 19: 1731–1740. Stereological analysis of the reorganization of the dentate gyrus following entorhinal cortex lesion in mice.
- Pimplikar SW/Tsai LH 2010 *J Neurosci* 30(45): 14946-14954. Amyloid-independent mechanisms in AD pathogenesis.
- Plasman BL/Breitner JCS 2000 *Neurology* 55; 1158-1166: documented head injury in early adulthood and risk of Alzheimer's disease and other dementias.
- Poirier J/Finch CE 1991a *Brain Res Mol Brain Res* 9(3): 191-195. Cloning of hippocampal poly(A) RNA sequences that increase after entorhinal cortex lesion in adult rat.
- Poirier J/Finch CE 1991b *Brain Res Mol Brain Res* 11(2): 97-106. Astrocytic apolipoprotein E mRNA and GFAP mRNA in hippocampus after entorhinal cortex lesioning.
- Poirier J/Gauthier S 1993a *Neuroscience* 55(1): 81-90. Cholesterol synthesis and lipoprotein reuptake during synaptic remodelling in hippocampus in adult rats.
- Poirier J/Gauthier S 1993b *Lancet* 342: 697-699. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease.
- Poirier J/Davignon J. 1995 *Ann Med* 27:663–70. Apolipoprotein E; synaptic plasticity and Alzheimer's disease.
- Poirier J 1999 *J Psychiatry neurosci* 24(2) :147-153. Apolipoprotein E4, cholinergic integrity and the pharmacogenetics of Alzheimer's disease.
- Poletti M/Bonuccelli U 2011 *Parkinson & Relat Disord* 17(8): 579-586. Mild cognitive impairment and cognitive reserve in Parkinson's disease.
- Polydoro M/Hyman BT 2013 *Acta Neuropathol* 127(2): 257-270. Soluble pathological tau in the entorhinal cortex leads to presynaptic deficits in an early Alzheimer's disease model.
- Potter PE/Beach TG 2011 *Acta Neuropathol* 122: 49-60. Pre and post-synaptic cortical cholinergic deficits are proportional to amyloid plaque presence and density at preclinical stages of Alzheimer's disease.
- Praetorius M/Johansson B 2013 *Neurobiol Aging* 34(12): 2734-2739. Substantial effects of apolipoprotein E e4 on memory decline in very old-age: longitudinal findings from a population-based sample.
- Prasad JA/Chudasama Y 2013 *J Neurosci* 33(19) : 8494-8503. Viral tracing identifies parallel disynaptic pathways to the hippocampus.
- Price JL/White DL 1991 *Neurobiol Aging* 12: 295-312. The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease.

Price JL/Morris JC 2001 Arch Neurol 58(9): 1395-1402. Neuron number in the entorhinal cortex and CA1 in preclinical Alzheimer Disease.

Putchá D/Sperling R 2011 J Neurosci 31(48); 17680-17688: hippocampal hyperactivation associated with cortical thinning in Alzheimer's disease signature regions in non-demented elderly adults.

Puttonen S / Keltikangas-Järvinen L 2003 neuropsychobiology 48(1): 35-40. The combined effects of apoE polymorphism and low-density lipoprotein cholesterol on cognitive performance in young adults.

Puzzo D/Arancio O 2008 the journal of neuroscience 28(53): 14537-14545. Picomolar amyloid- β positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus.

Q.

Qian J & Saggau P 1997 Br J Pharmacol 122 : 511-519. Presynaptic inhibition of synaptic transmission in the rat hippocampus by activation of muscarinic receptors: involvement of presynaptic calcium influx.

Querfurth HW/LaFerla FM 2010 the N Engl J Med 362; 329-344: Alzheimer's disease.

Quilichini P/Buzsáki G 2010 J Neuro 30(33): 11128-11142. Intrinsic circuit organization and theta-gamma oscillation dynamics in the entorhinal cortex of the rat.

Quirk GJ/Ranck JB Jr 1992 J Neurosci 12(5): 1945-1936. The positional firing properties of medial entorhinal neurons: description and comparison with hippocampal place cells.

Quiroga RQ/Ben-Shaul Y 2004 Neural Comput 16(8): 1661-1687. Unsupervised spike detection and sorting with wavelets and superparamagnetic clustering.

Quiroga RQ/fried I Nature 2006 435(7045): 1102-1107. Invariant visual representation by single neurons in the human brain.

Quiroz YT/Stern CE 2010 Ann Neurol 68(6): 865-875. Hippocampal hyperactivation in presymptomatic familial Alzheimer's disease.

R.

Raber J/Mucke L 1998 PNAS 95: 10914-10919. Isoform-specific effects of human apolipoprotein E on brain function revealed in ApoE knockout mice: Increased susceptibility of females.

Raber J/Mucke L 2000 Nature 404: 352-354. Apolipoprotein E and cognitive performance.

Raber J/Mucke L 2002 J Neurosci 22(12); 5204-5209: Androgens protect against apolipoprotein E4-induced cognitive deficits.

Raber J/Ashford JW 2004 Neurobiol Aging 25(5): 641-650. ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology.

- Raedler TJ/Dean B 2007 *Mol Psychiatry* 12: 232-246. Towards a muscarinic hypothesis of schizophrenia.
- Rajavashisth TB/Lusis AJ 1985 *PNAS* 82: 8085-8089. Evolution of apolipoprotein E: mouse sequence and evidence for an 11-nucleotide ancestral unit.
- Ramirez JJ/Kelley MS 1996 *PNAS* 93: 15512-15517. Progressive entorhinal cortex lesions accelerate hippocampal sprouting and spare spatial memory in rats.
- Ramirez J 2001 *Restor Neurol & Neurosci* 19: 237-262. The role of axonal sprouting in functional reorganization after CNS injury: lessons from the hippocampal formation.
- Ramirez S/Tonegawa S 2013 *Science* 341; 387-391. Creating a false memory in the hippocampus.
- Rapp A/Hüttinger M 2006 *Biochimie*: 88:473-483. Implication of apoE isoforms in cholesterol metabolism by primary rat hippocampal neurons and astrocytes.
- Rappert A/Kettenmann H 2004 *J Neurosci* 24(39); 8500-8509: CXCR3-Dependent Microglial recruitment is essential for dendrite Loss after brain lesion.
- Ravassard P/Metha MR 2013 *Science* 340(6138): 1342-1346. Multisensory control of hippocampal spatiotemporal selectivity.
- Ravona-Springer R/Beeri MS 2014 *Eur Neuropharm*; (May). The apoE4 genotype modifies the relationship of long-term glycemic control with cognitive functioning in elderly with type 2 diabetes.
- Ray S/Brecht M 2014 *Science* 343(6173): 891-896. Grid-layout and theta-modulation of layer 2 pyramidal neurons in medial entorhinal cortex.
- Reeves TM & Steward O 1986 *Exp Brain Res* 65: 167-175. Emergence of the capacity for LTP during reinnervation of the dentate gyrus: evidence that abnormally shaped spines can mediate LTP.
- Reich D/ Pääbo S 2010 *Nature* 468(7327): 1053-1060. Genetic history of an archaic hominin group from Denisova cave in Siberia.
- Reifenstein ET/Herz AVM 2012 *PNAS* 109(16): 6301-6306. Grid cells in rat entorhinal cortex encode physical space with independent firing fields and phase precession at the single-trial level.
- Reitz C et al. 2010 *archives in neurology*: Association of higher levels of high-density lipoprotein cholesterol in elderly individuals and lower risk of late-onset AD
- Reitz C/Mayeux R 2011 *Nat rev Neurol* 7(3); 137-152. Epidemiology of Alzheimer disease.
- Remondes M & Schuman EM 2004 *Nature* 431(7009):699–703. Role for a cortical input to hippocampal area CA1 in the consolidation of a long-term memory.
- Represa A/ Ben-Ari Y 1988 *Brain Res* 457(2): 355-359. Is senil dementia of the D type associated with hippocampal plasticity?
- Richardson JR/German DC 2013 *JAMA Neurol* 71(3): 284-290. Elevated serum pesticide levels and risk for Alzheimer disease.
- Roberts RO/Petersen RC 2013 *Neurology* December: Higher risk of progression to dementia in mild cognitive impairment cases who revert to normal.

- Rodriguez GA/Rebeck GW 2013 *Learn&mem* 20; 256-266: Young APOE4 targeted replacement mice exhibit poor spatial learning and memory, with reduced dendritic spine density in the medial entorhinal cortex.
- Roe CM/Morris JC 2007 *Neurobiol* 68(3): 223-228. Education and Alzheimer disease without dementia: support for the cognitive reserve hypothesis.
- Rogalski EJ/Mesulam MM 2011 *Alzheimer disease and associated disorders* 25(2): 159-163. ApoE4 is a susceptibility factor in amnesic but not aphasic dementias.
- Roh JH/ Na DL 2011 *Journal of neurology* 258(6): 1013-1020. Volume reduction in subcortical regions according to severity of AD.
- Roland JJ/Savage LM 2008 *Brain Res* 1234: 116-127. Increasing hippocampal acetylcholine levels enhance behavioral performance in an animal model of diencephalic amnesia.
- Roland JJ/Pang KCH 2014 *J Neuro* 34(2): 506-514. Medial septum-diagonal band of Broca (MSDB) GABAergic regulation of hippocampal acetylcholine efflux is dependent on cognitive demands.
- Rollenhagen A & Lübcke JHR 2010 *Front Synaptic Neurosci* 2 : 2. The mossy fiber bouton : the « common » or the « unique » synapse ?
- Rolls ET & Kesner RP 2006 *Prog Neurobiol* 79(1):1-48. A computational theory of hippocampal function, and empirical tests of the theory.
- Rombouts SARB/Scheltens P 2002 *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 73; 665-671: Alterations in brain activation during cholinergic enhancement with rivastigmine in Alzheimer's disease.
- Roof RL/Stein DG 1993 *Behav Brain Res* 57(1): 47-51. Gender-specific impairment on MWM task after EC cortex lesion.
- Roses 1996 *Annu.Rev. Med.* 47: 387-400. ApoE alleles as risk factors in AD
- Rosenthal SL/Kamboh MI 2014 *Curr Genet Med Rep* 2; 85-101: Late-onset Alzheimer's disease Genes and the potentially implicated pathways.
- Roux F & Uhlhaas PJ 2013 *trends cogn sci* 18(1): 16-25. Working memory and neural oscillations: alpha-gamma versus theta-gamma codes for distinct WM information?
- Rowe CC/Villemagne VL 2010 *Neurobiol Aging* 31; 1275-1283: amyloid imaging results from the Australian imaging, biomarkers and lifestyle (AIBL) study of aging.
- Rowland DC/Kentros CG 2013 *J Neuro* 33(37): 14889-14898. Transgenically targeted rabies virus demonstrates a major monosynaptic projection from hippocampal area CA2 to Medial entorhinal Layer II Neurons.
- Rune GM/Frotscher M 2006 *Neurochem Res* 31(2): 145-155. Synaptic plasticity in the hippocampus: effects of estrogen from the gonads or hippocampus?
- Rushworth JV & Hooper NM 2010 *Int J Alzheimers Dis* 2011:603052. Lipid rafts: linking AD amyloid- β production, aggregation and toxicity at neuronal membranes.

Rutishauser U/Schuman EM 2010 Nature 464: 903-907. Human memory strength is predicted by theta-frequency phase-locking of single neurons.

S.

Sabo T/Michaelson DM 2000 neuroscience 101(4): 879-884. Susceptibility of the tg mice expressing human apolipoprotein E to closed head injury: the allele E3 is neuroprotective whereas E4 increases fatalities.

Sachdev SP / Brodaty H 2011 Journal of the American Geriatrics Society 60(1): 24-33. Risk profiles of subtypes of mild cognitive impairment: the Sydney memory and ageing study.

Sadowsky JHLP/Mellor JR 2011 Neural plasticity 2011: 960389. Ripples make waves: binding structured activity and plasticity in hippocampal networks.

Salehi A/Swaab DF 1996 Neuroscience 75(2): 373-387. Co-localization of high-affinity neurotrophin receptors in nucleus basalis of meynert neurons and their differential reduction in Alzheimer's disease.

Sargolini F / Moser EI 2006 Science 312(5774): 758-762. Conjunctive representation of position, direction, and velocity in entorhinal cortex.

Sarter M/Howe WM 2009 Nature reviews 10 383-390. Phasic acetylcholine release and the volume transmission hypothesis: time to move on.

Sato N / Taira M 2006 PNAS 103: 17001-17006. Navigation-associated medial parietal neurons in monkeys.

Save E / Buhot MC 1992 Behav Neurosci 106: 447-456. Object exploration and reactions to spatial and nonspatial changes in hooded rats following damage to parietal cortex of hippocampal formation.

Save E & Poucet B 2009 neurobiol of learn and mem 91: 172-178. Role of the parietal cortex in long-term representation of spatial information in the rat.

Savioz A/Walzer C 2009 Brain Res Bull 80: 309-314. Contribution of neural networks to Alzheimer's disease's progression.

Sauvage MM/Eichenbaum H 2010 J Neurosci 30(46): 15695-15699. The caudal medial entorhinal cortex: a selective role in recollection-based recognition memory.

Scharfman HE/Szwed R 1998 J Neurophysiol 80: 3031-3049. Chronic changes in synaptic responses of entorhinal and hippocampal neurons after amino-oxyacetic acid (AOAA)-induced entorhinal cortical neuron loss.

Scharfman HE 2007 Prog Brain Res 163: 627-637. The CA3 "backprojection" to the dentate gyrus.

Schauwecker PE/McNeill TH 1995 J Neurosci 15: 2462-2470. Lesion-induced sprouting of commissural/associational axons and induction of GAP-43 mRNA in hilar and CA3 pyramidal neurons in the hippocampus are diminished in aged rats.

Scheff SW/Mufson EJ 2006 Neurobiol Aging 27:1372-1384: Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment.

- Scheffzük C/Brankack J 2011 PLoS One 6(12): e28489. Selective coupling between theta phase and neocortical fast gamma oscillations during REM-sleep in mice.
- Schliebs R & Arendt T 2011 Behav Brain Res 221: 555-563. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration.
- Schmidt B/Markus EJ 2012 Behav Brain Res 226(1): 56-65. Disambiguating the similar: the dentate gyrus and pattern separation.
- Schneider LS & Finch CE. 1997 Drugs Aging 1997; 11:87–95. Can estrogen prevent neurodegeneration?
- Schneider LS /Pogoda JM. 1996 Neurology 46:1580–4. Effects of estrogen replacement therapy on response to tacrine in patients with Alzheimer's disease.
- Schneider JA/Bennett DA 2005 Stroke 36(5): 954-959. The apoE4 alleles increase the Odds of Chronic Cerebral Infarction Detected at autopsy in older persons.
- Schon K/Stern CE 2005 J Neurosci 25(40): 9112-9123. Scopolamine reduces persistent activity related to long-term encoding in the parahippocampal gyrus during delayer matching in humans.
- Schuit AJ/Kromhout D 2001 Med Sci Sports Exerc 33(5): 772-777. Physical activity and cognitive decline, the role of the apolipoprotein e4 allele.
- Schultz MR/Kremen WS 2008 Neurology 70 (2008) 1771-1777. ApoE genotype and memory in the sixth decade of life.
- Sederberg PB/Kahana MJ 2007 Psychol Sci 18: 927-932. Gamma oscillations distinguish true from false memories.
- Seidenbecher T/ Pape HC. 2003 Science 301:846–50. Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval.
- Selkoe 2002 Science 298(5594): 789-791. Alzheimer's disease is a synaptic failure.
- Selkoe DJ 2012 Science: 337:1488-1492: Preventing Alzheimer's disease.
- Senior TJ/ Csicsvari J 2008 J Neurosci 28: 2274–2286. Gamma oscillatory firing reveals distinct populations of pyramidal cells in the CA1 region of the hippocampus.
- Sharma G & Vijayaraghavan S 2001 PNAS 98: 4148-4153. Nicotinic cholinergic signaling in hippocampal astrocytes involves calcium-induced calcium release form intracellular stores.
- Shashwath AM/Thornton-Wells 2012 Neurobiol Aging. Genetic interactions associated with 12-month atrophy in hippocampus and entorhinal cortex in Alzheimer's disease neuroimaging initiative.
- Sheng JG/ Koliatsos VE 2002 J Neurosci 22(22): 9794-9799. Disruption of corticocortical connections ameliorates amyloid burden in terminal fields in a transgenic model of A β amyloidosis.
- Sherwin B. B. 1997 Neurology 48, (Suppl. 7) S21–S26. Estrogen effects on cognition in menopausal women.

- Shibuya Y/Otani K 2012 *int j geriatr psychiatry* 28(4): 372-376. Comparison of entorhinal cortex atrophy between early-onset and late-onset Alzheimer's disease using VSRAD, a specific and sensitive voxel-based morphometry.
- Shinohara Y/Hirase H 2012 *Eur J Neurosci* 35(5) : 702-710. Hippocampal CA3 and CA2 have distinct bilateral innervation patterns to CA1 in rodents.
- Shirvankar PR/Shapiro ML 2010 *PNAS* 107: 7054-7059. Bidirectional changes to hippocampal theta-gamma comodulation predict memory for recent spatial episodes.
- Shrager Y/Squire LR 2008 *PNAS* 105(33); 12034-12038: neural basis of the cognitive map: path integration does not require hippocampus or entorhinal cortex.
- Siegel JA/Raber J 2012 *Neurobiol Aging* 33, 345-358.: apoE isoform-dependent effects on anxiety and cognition in female TR mice.
- Simic G / Kostovic I 2005 *Neuroscience* 130(4): 911-925. Hemispheric asymmetry, modular variability and age-related changes in the human entorhinal cortex.
- Simon AP/Bassant MH 2006 *J Neurosci* 26(35) : 9038-9046. Firing properties of anatomically identified neurons in the medial septum of anesthetized and unanesthetized restrained rats.
- Singer AC/Frank LM 2013 *Neuron* 77: 1163-1173. Hippocampal SWR activity predicts correct decisions during the initial learning of an alternation task.
- Sirota A/ Buzsaki G 2008 *Neuron* 60: 683–697. Entrainment of neocortical neurons and gamma oscillations by the hippocampal theta rhythm.
- Sjögren M/Blennow K 2001 *J Neural Transm* 108:451-458: tacrine and rate of progression in Alzheimer's disease – relation to ApoE allele genotype.
- SkaggsWE/Barnes CA. 1996 *Hippocampus* 6:149–72. Theta phase precession in hippocampal neuronal populations and the compression of temporal sequences.
- Slooter AJ/Mayeux R 1997 *JAMA* 277(10) : 818-821. Apolipoprotein E epsilon4 and the risk of dementia with stroke. A population-based investigation.
- Sloviter RS 1992 *Neurosci Lett* 137: 91-96. Possible functional consequences of synaptic reorganization in the dentate gyrus of kainate-treated rats.
- Sloviter RS & Lomo T 2012 *Front Neural Circuits* 6: 102. Updating the lamellar hypothesis of hippocampal organization.
- Small SA/Stern Y 2002 *Ann Neurol* 51(3): 290-295. Imaging hippocampal function across the human life span: is memory decline normal or not?
- Small BJ / Bäckman L 2004 *psychology of aging* *Psychology of aging* 19 (4): 592-600, 2004. ApoE and cognitive performance: a meta-analysis.
- Smith MA/Perry G 2002 *Free radical biol & med* 33(9); 1194-1199. Serial review: causes and consequences of oxidative stress in Alzheimer's disease.
- Snider J/Poizner H 2013 *J Neuro* 33(38); 15056-15068: human cortical theta during free exploration encodes space and predicts subsequent memory.

- Solstad T/Moser EI 2008 *Science* 322(5909): 1865-1868. Representation of geometric borders in the entorhinal cortex.
- Sotty F/Williams S 2003 *J Physiol* 551: 927-943. Distinct electrophysiological properties of glutamatergic, cholinergic and GABAergic rat septohippocampal neurons: novel implications for hippocampal rhythmicity.
- Spencer JP/Davies CH 2010 *Neuropharmacology* 59: 437-443. Investigation into the efficacy of the acetylcholinesterase inhibitor, donepezil, and novel procognitive agents to induce gamma oscillations in rat hippocampal slices.
- Sperling RA/Johnson KA 2009 *Neuron* 63: 178-188. Amyloid deposition is associated with impaired default network function in older persons without dementia.
- Stäubli U/ Lynch G 1984 *PNAS* 81(18): 5885-5887. Hippocampal denervation causes rapid forgetting of the olfactory information in rats.
- Steffenach HA/ Moser MB 2002 *PNAS* 99: 3194-3198. Impaired retention of spatial memory after transection of longitudinally oriented axons of hippocampal CA3 pyramidal cells.
- Stein DG 2001 *Trend neurosci* 24(7): 386-391. Brain damage, sex hormones and recovery: a new role for progesterone and estrogen?
- Stella F & Treves A 2011 *Neural plasticity* 2011: 683961. Associative memory storage and retrieval: involvement of theta oscillations in hippocampal information processing
- Stensola H/Moser EI 2012 *Nature*, 492:72-78. The entorhinal grid map is discretized.
- Steward O/ Lynch GS 1973 *Exp Brain Res* 18(4): 396-414. Re-establishment of electrophysiological functional entorhinal cortical input to the dentate gyrus deafferented by ipsilateral entorhinal lesions: innervations by the contralateral entorhinal cortex.
- Steward O 1976 *Science* 194: 426-428. Reinnervation of dentate gyrus by homologous afferents following entorhinal cortical lesions in adult rats.
- Steward O/Lynch GA 1976 *Brain Res* 114: 181-200. A quantitative autoradiographic and electrophysiological study of the reinnervation of the dentate gyrus by the contralateral entorhinal cortex following ipsilateral entorhinal lesions.
- Steward O & Loesche J 1977 *Brain Res* 125: 11-21. Quantitative autoradiographic analysis of the time course of proliferation of contralateral entorhinal efferents in the dentate gyrus denervated by ipsilateral entorhinal lesions.
- Steward O/Horton WC 1977 *Brain Res Bull* 2(1): 41-48. Behavioral correlates of denervation and reinnervation of the hippocampal formation of the rat: open field activity and cue utilization following bilateral entorhinal cortex lesions.
- Stewart M/Fox SE 1992 *exp brain res* 90(1); 21-28. Firing relation of medial entorhinal neurons to the hippocampal theta rhythm in urethane anesthetized and walking rats.
- Stone DJ/ Finch CE 1997 *Exp Neurol* 143:313– 8. Astrocytes and microglia respond to estrogen with increased apoE mRNA in vivo and in vitro.

- Stone DJ/ Finch CE 1998 *J Neurosci* 18: 3180-3185. Increased synaptic sprouting in response to estrogen via an apoE dependant mechanism: implications for Alzheimer's disease.
- Storm-Mathisen, J. 1974 *Brain Res.*, 80: 181–197. Choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in fascia dentata following lesion of the entorhinal afferents.
- Stoub TR/ de Toledo-Morrell L 2010 *Neurobiol Aging* 31(7): 1089-1098. Rate of entorhinal and hippocampal atrophy in incipient and mild AD: relation to memory function.
- Stranahan AM/Mattson MP 2010 *Neural Plasticity*: 108190. Selective vulnerability of neurons in layer II of the entorhinal cortex during aging and AD.
- Strittmatter WJ/Roses AD 1994 *PNAS* 91(23): 11183-11186. Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau: implications for Alzheimer disease.
- Su Y & Ni B 1998 *J Neurosci res* 53(2): 177-186. Selective deposition of amyloid-beta protein in the entorhinal-dentate projection of a tg mouse model of AD.
- Sugisaki E/Aihara T 2011 *Neuroscience* 192: 91-101. Cholinergic modulation on spike timing-dependant plasticity in hippocampal CA1 network.
- Suh J/Tonegawa S 2011 *Science* 334(6061): 1415-1420. Entorhinal cortex layer III input to the hippocampus is crucial for temporal association memory.
- Sullivan D/Buzsaki G 2011 *J Neuro* 31(23): 8605-8616. Relationships between hippocampal sharp waves, ripples, and fast gamma oscillation: influence of dentate and entorhinal cortical activity.
- Sullivan PM/Maeda N 1997 *J Biol Chem* 272(29): 17972-17980. Targeted replacement of the mouse apolipoprotein E gene with the common human APOE3 allele enhances diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis.
- Sumowski JF/DeLuca J 2009 *J Clin Exp Neuropsychol* 31(8): 913-926. Cognitive reserve protects against cognitive dysfunction in multiple sclerosis
- Suthana N/Fried I 2012 *N Engl J Med* 366 (6): 502-510. Memory enhancement and deep-brain stimulation of the entorhinal area.
- Suzuki WA/Desimone R 1997 *J Neurophysiol* 78: 1062-1081. Object and place memory in the macaque entorhinal cortex.
- Sze CI/Martin LJ 1997 *J neuropathol exp neurol* 56(8): 933-944. Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease.

T.

- Takata N/Mikoshiha K 2011 *J Neurosci* 31: 18155-18165. Astrocyte calcium signaling transforms cholinergic modulation to cortical plasticity in vivo.
- Tamamaki N/Nojyo Y 1988 *Brain Res* 452(1-2) : 255-272. Three-dimensional analysis of the whole axonal arbors originating from single CA2 pyramidal neurons in the rat hippocampus with the aid of a computer graphic technique.

- Tang M. X. / Mayeux R. 1996 *Lancet* 348 : 429–432. Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease.
- Tanila H 1999 *Hippocampus* 9: 235-246. Hippocampal place cells can develop distinct representation of two visually identical environments.
- Taube JS/Ranck JB Jr 1990 *J Neurosci* 10(2) : 420-435. Head-direction cells recorded from the postsubiculum in freely moving rats. I. Description and quantitative analysis.
- Taube JS 2007 *Annu Rev Neurosci* 30 : 181-207. The head direction signal: origins and sensory-motor integration.
- Tardiff BE/ Reves JG 1997 *Ann Thorac Surg* 64(3): 715-720. Preliminary report of a genetic basis for cognitive decline after cardiac operation.
- Tealton T/Perry E 2003 *Glia* 41(2): 207-211. Alzheimer's disease is associated with a selective increase in $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor immunoreactivity in astrocytes.
- Teasdale GM/Fiddes M 1997 *LANCET* 350(9084) : 1069-1071. Association of apolipoprotein E polymorphism with outcome after head injury.
- Teles-Grilo Ruivo LM & Mellor JR 2013 *Front Synaptic Neurosci* 5: 2. Cholinergic modulation of hippocampal network function.
- Terrazas A/ McNaughton BL. 2005 *J. Neurosci.* 25:8085–96. Self-motion and the hippocampal spatial metric.
- Terry RD/Katzman R 1991 *Ann neurol* 30(4): 572-580. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss the major correlate of cognitive impairment.
- Teter B/Cole GM 1999a *neuroscience* 91(3): 1009-1016. Role of apolipoprotein E and estrogen in mossy fiber sprouting in hippocampal slice cultures.
- Teter B/Cole GM 1999b *J Neurochem* 73(6): 2613-2616. Human apolipoprotein E isoform-specific differences in neuronal sprouting in organotypic hippocampal culture.
- Teter B/Cole GM 2002 *J Neurosc Res* 68: 331-336. Defective neuronal sprouting by human apolipoprotein E4 is a gain-of-negative function.
- Teter B & Ashford 2002 *J Neurosci Res* 70: 402-437. Neuroplasticity in Alzheimer's Disease.
- Thal DR/ Schober R 2000 *experimental neurology* 163(1): 98-110: Alzheimer-related tau-pathology in the perforant path target zone and in the hippocampal stratum oriens and radiatum correlates with onset and degree of dementia.
- Thom M/Sisodiva SM 2011 *brain* 134(10): 2969-2981. Neurofibrillary tangle pathology and Braak staging in chronic epilepsy in relation to traumatic brain injury and hippocampal sclerosis: a post-mortem study.
- Tolman EC 1948 *Psychological review*. Cognitive maps in rats and men.
- Tort AB/ Kopell NJ 2008 *PNAS* 105: 20517-20522. Dynamic crossfrequency couplings of local field potential oscillations in rat striatum and hippocampus during performance of a T-maze task.

Tort AB/Eichenbaum H 2009 PNAS 106(49): 20942-20947. Theta-gamma coupling increases during the learning of item-context associations.

Toth K/Freund TF 1993 the journal of neuroscience 13(9): 3712-3724. Postsynaptic targets of GABAergic Hippocampal neurons in the medial septum-diagonal band of Broca complex.

Toumane A/Jaffard R 1988 Behav Brain Res 30: 225-234. Differential hippocampal and cortical cholinergic activation during the acquisition, retention, reversal and extinction of a spatial discrimination in an 8-arm radial maze by mice.

Tsao A/Moser EI 2013 Curr Biol 23(5): 399-405. Traces of experience in the lateral entorhinal cortex.

Tsuang DW/Hamilton RL 2005 Neurology 64: 509-513: genetic association between the apoe4 allele and Lewy bodies in Alzheimer disease.

Tukker JJ/Klausberger T 2007 J Neurosci 27: 8184-8189. Cell type-specific tuning of hippocampal interneuron firing during gamma oscillations in vivo.

Twamley EW/Bondi MW 2006 J Int Neuropsychol Soc 12(5); 707-735: neuropsychological and neuroimaging changes in preclinical Alzheimer's disease.

U.

Uzakov S/Korz V 2005 Learn&Mem 12; 165-171. Reinforcement of rat hippocampal LTP by holeboard training.

V.

Vago DR/ Kesner RP 2007 Hippocampus 17(10):977-987. The role of the direct perforant path input to the CA1 subregion of the dorsal hippocampus in memory retention and retrieval.

Valenzuela ML & Sachdev P 2006 Psychol Med 36(4): 441-454. Brain reserve and dementia: a systematic review.

Vana L/Binder LI 2011 AM J Pathol 179(5): 2533-2550. Progression of tau pathology in cholinergic basal forebrain neurons in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease.

Van Cauter T/Save E 2008 Eur J Neurosci 24(8): 1933-1946. Unstable CA1 place cell representation in rats with entorhinal cortex lesions.

Van Cauter T/Save E 2012 cerebral cortex 23(2): 451-459. Distinct roles of medial and lateral entorhinal cortex in spatial cognition.

Van der Meer MA & Redish AD. 2011 J. Neurosci. 31:2843-54. Theta phase precession in rat ventral striatum links place and reward information.

Vanderwolf CH 1975 J Comp Physiol Psychol 88: 300-323. Neocortical and hippocampal activation relation to behavior: effects of atropine, serine, phenothiazines and amphetamines.

- Van Groen T/Kadish I 2003a *Neuroscience* 119(4): 1185-1197. Diffuse amyloid deposition, but not plaque number, is reduced in APP/PS1 double-tg mice by pathway lesions.
- Van Groen / Kadish I 2003b *hippocampus* 13(1): 133-149. The entorhinal cortex of the mouse: organization to the hippocampal formation.
- Van Meer P/Raber J 2007 *Behavioural Brain Research* 176 (2007) 372–375. Impairments in spatial memory retention of GFAP-apoE4 female mice.
- Van Strien NM/Witter MP 2009 *Nature review* 10: 272-282. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network.
- Van Vugt MK/ Kahana MJ 2010 *J Neurosci* 30: 2694–2699. Hippocampal gamma oscillations increase with memory load.
- Veinbergs I/Masliah E 1999 *Neurosci Letters* 265: 218-222. Differential neurotrophic effects of apolipoprotein E in aged transgenic mice.
- Vemuri P/Jack CR 2010 *Ann Neurol* 67; 308-316: effect of apolipoprotein E on biomarkers of amyloid load and neuronal pathology in alzheimer disease.
- Vergheze PB/Holtzman DM 2011 *Lancet Neurology* 10(3): 241-252. Apolipoprotein E in AD and other neurological disorders.
- Vergheze PB/Holtzman DM 2013 *PNAS* 110(19): 1807-1816. ApoE influences amyloid-beta clearance despite minimal apoE: A beta association in physiological conditions.
- Verret L/Palop JJ 2012 *Cell* 149: 708-721. Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model.
- Vilberg KL/Davachi L 2013 *Neuron* 79; 1232-1242: perirhinal-hippocampal connectivity during reactivation is a marker for object-based memory consolidation.
- Villarreal DM/Derrick BE 2007 *J Neurosci* 27(49): 13457-13467. Modulation of CA3 afferent inputs by novelty and theta rhythm.
- Villemagne VL/Masters CL 2013 *Lancet Neurol* 12; 357-367: Amyloid beta deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study.
- Vivar C/van Praag H 2012 *Nature communication*3: 1107. Monosynaptic inputs to new neurons in the dentate gyrus.
- Vivar C & Van Praag H 2013 *Front Neural Circuits* 25: 7:15. Functional circuits of new neurons in the dentate gyrus.
- Vizi ES/Kiss JP 1998 *Hippocampus* 8(6) : 566-607. Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: synaptic and nonsynaptic interactions.
- Vlachos A/Deller T 2013 *PNAS*: synaptopodin regulates denervation-induced homeostatic synaptic plasticity.
- Von Gunten / Giannakopoulos 2005 *experimental neurology*: stereologic analysis of hippocampal AD pathology in the oldest-old: evidence for sparing of the entorhinal cortex and CA1 field.

Voytek B/Knight RT 2010 *Front Hum Neurosci* 4: 191. Shifts in gamma phase-amplitude coupling frequency from theta to alpha over posterior cortex during visual tasks.

W.

Waite JJ/Thal LJ 1995 *Neuroscience* 65(2) : 463-476. 192 immunoglobulin G-saporin produces graded behavioral and biochemical changes accompanying the loss of cholinergic neurons of the basal forebrain and cerebellar Purkinje cells.

Waite JJ/Power AE 1999 *Neurobiol Learn Mem* 71(3): 325-352. Deficit in selective and divided attention associated with cholinergic basal forebrain immunotoxic lesion produced by 192-saporin; motoric/sensory deficit associated with Purkinje cell immunotoxic lesion produced by OX7-saporin.

Walker LC/Warзок RW 2000 *Acta neuropathol* 100(1): 36-42. Apolipoprotein E4 promotes the early deposition of Abeta42 and then Abeta40 in the elderly.

Walker JM/Schachtman TR 2011 *Behav Brain Res* 222(1): 169-175. Spatial learning and memory impairment and increased locomotion in a transgenic amyloid precursor protein mouse model of Alzheimer's disease.

Wan H/ Brown MW 1999 *J Neurosci* 19: 1142-1148. Different contributions of the hippocampus and Perirhinal cortex to recognition memory.

Wang C/Sullivan PM 2005 *Neurobiol Dis* 18(2): 390-398. Human apoE4-targeted replacement mice display synaptic deficits in the absence of neuropathology.

Wang Y/Lodge D 2006 *Neurosci letters* 406 : 183-188. The alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor agonist TC-2559 induces deficit of LTP in DG in vivo.

Wang HX/Fratiglioni L 2011 *Neurobiol Aging* 33(5): 1-7. Education halves the risk of dementia due to apoE4: a collaborative study from the Swedish brain power initiative.

Wang L/Ances BM 2014 *Alzheimer Dis Assoc Disord* 28: 122-127. The effect of APOE4 allele on cholinesterase inhibitors in patients with Alzheimer disease.

Ward A/Arrighi HM 2012 *Neuroepidemiology*; 38:1-17: prevalence of apoE4 genotype and homozygotes among patients diagnosed with AD: a systematic review and meta-analysis.

Weisgraber KH & Mahley RW 1996 *FASEB J* 10: 148-1494. Human apolipoprotein E: the Alzheimer's disease connection.

Welsby P/Anwyl R 2006 *EJN* 24: 3109-3118. Nicotinic receptor-mediated enhancement of long-term potentiation involves activation of metabotropic glutamate receptors and tyrodine-sensitive calcium stores in the dentate gyrus.

Weniger G/Irle E 2011 *neuropsychologia* 49(3): 518-527. Egocentric and allocentric memory as assessed by virtual reality in individuals with aMCI.

West JR 1984 *Brain res Bull* 12: 323-330. Age-dependent sprouting in the dentate gyrus demonstrated with anterograde HRP.

West MJ / Troncoso JC 2004 *Neurobiol Aging* 25(9): 1205-1212. Hippocampal neurons in pre-clinical Alzheimer's disease.

- Whishaw IQ/Tomie J 1996 *Physiol Behav* 60: 1191-1197. Of mice and mazes: similarities between mice and rats on dry land but not water mazes.
- Whishaw IQ/ Wallace DG 2001 *Behav Brain Res* 127:49–69. Dead reckoning (path integration) requires the hippocampal formation: Evidence from spontaneous exploration and spatial learning tasks in light (allothetic) and dark (idiothetic) tests.
- White F/Horsburgh K 2001a *Exp Neurol* 169:307-318. Alterations in ApoE and ApoJ in relation to degeneration and regeneration in a mouse model of entorhinal cortex lesion.
- White F/Horsburg K 2001b *Neurobiol Dis* 8(4): 611-625. Impaired neuronal plasticity in transgenic mice expressing human apolipoprotein e4 compared to e3 in a model of entorhinal cortex lesion.
- Whitlock JR/Moser EI 2008 *PNAS* 105(39): 14755-14762. Navigating from hippocampus to parietal cortex.
- Williams 1957 *Evolution* 11(4), 398-411: pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence.
- Wilson IA/Tanila H 2006 *Trends Neurosci* 29(12): 662-670. Neurocognitive aging: prior memories hinder new hippocampal encoding.
- Wilson RS/Bennett DA 2009 *Ann of the NY acad of Sci* 1170: 730-735. Olfactory impairment in presymptomatic alzheimer's disease.
- Wilson DI/Ainge JA 2013a *Hippocampus* 23(5): 352-366. Lateral entorhinal cortex is critical for novel object-context recognition.
- Wilson DI/Ainge JA 2013b *Hippocampus* 23(12): 1280-1290. Lateral entorhinal cortex is necessary for associative but not nonassociative recognition memory.
- Winson J. 1974 *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 36:291–301. Patterns of hippocampal theta rhythm in the freely moving rat. .
- Winson J. 1978 *Science* 201(4351): 160-163. Loss of hippocampal theta rhythm results in spatial memory deficit in the rat.
- Wirth S / Di Scala G 1998 *Behav Brain Res* 91(1-2): 46-59. Facilitation of olfactory recognition by lateral entorhinal cortex lesion in rats.
- Witter MP & Amaral DG 1991 *J Comp Neurol* 307: 437-459. Entorhinal cortex of the monkey: V, projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex.
- Wolbers T/Büchel C 2004 *Brain Res Cogn Brain Res* 21(3): 401-411. Neural foundations of emerging route knowledge in complex spatial environments.
- Wolbers T/Büchel C 2005 *J Neurosci* 25(13) : 3333-3340. Dissociable retrosplenial and hippocampal contributions to successful formation of survey representations.
- Wolk DA/Dickerson BC 2010 *PNAS* 107(22):10256-10261: apolipoprotein E (APOE) genotype has dissociable effects on memory and attentional-executive network function in Alzheimer's disease.

Womelsdorf T/Desimone R 2006 *Nature* 439:733–736. Gamma-band synchronization in visual cortex predicts speed of change detection

Woodard JL/Rao SM 2009 *Brain* 132; 2068-2078. Semantic memory activation in amnesic mild cognitive impairment.

Worsley CL/Morris RG 2001 *Neuropsychologia* 39(5): 452-464. Path integration following temporal lobectomy in humans.

Wright RO/Hernandez-Avila M 2003 *pediatric research* 54(6): 819-925. ApoE genotype predicts 24-month bayley scales infant development score.

X.

Xing Y/Tian T 2013 *Prog Neurobiol* 111: 53-74. Estrogen associated gene polymorphisms and their interactions in the progress of Alzheimer's disease.

Xiu-Lian W/Jian-Zhi W 2014 *J ALzheimers Dis Jul*. Helicobacter pylori Filtrate Induces Alzheimer-Like Tau Hyperphosphorylation by Activating Glycogen Synthase Kinase-3 β .

Xu JY/Chen C 2012 *J Physiol* 590(10): 2305-2315. Long-lasting potentiation of hippocampal synaptic transmission by direct cortical input is mediated via eCB.

Xu WL/Fratiglioni L 2013 *J Alzh Dis* 33(2): 507-515. Accelerated progression from mild cognitive impairment to dementia among APOE4 carriers.

Y.

Yamaguchi Y/ McNaughton BL, Lipa P. 2002 *J. Neurophysiol.* 87:2629–42. Bimodality of theta phase precession in hippocampal place cells in freely running rats.

Yasojima K/McGeer PL 2001 *Neurosci Lett* 297(2): 97-100. Reduced neprilysin in high plaque areas of alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of β -amyloid peptide.

Yassa MA / Stark CE 2010 *Neuroimage* 51(3): 1242-1252. High-resolution structural and functional MRI of hippocampal CA3 and dentate gyrus in patients with aMCI.

Yassa MA/Stark CE 2011a *PNAS* 108(21): 8873-8878. Age-related memory deficits linked to circuit-specific disruptions in the hippocampus.

Yassa MA & Stark CE 2011b *Trends Neurosci* 34: 515-525. Pattern separation in the hippocampus.

Yoon C/Campana WM 2013 *J Biol Chem* 288(37): 26557-26568. Low density lipoprotein Receptor-related protein 1 (LRP1) dependent cell signaling promotes axonal regeneration.

Young BJ/ Eichenbaum 1997 *J Neurosci* 17: 5183-5195. Memory representation within the parahippocampal region.

Yu YW/Tsai SJ 2000 *neuroscience letters* 294(3): 179-181. Intelligence and event-related potentials for young female human volunteer apoE4 and non-E4 carriers.

Z.

- Zarkzanis KK/Mraz R 2009 med sci monit 15(4): CR140-150. Age and dementia related differences in spatial navigation within an immersive virtual environment.
- Zepa L/Michaelson DM 2011 Int J Alzheimers Dis 2011:792070. ApoE4 driven accumulation of intraneuronal oligomerized A β 42 following activation of the amyloid cascade in vivo is mediated by a gain of function.
- Zetterberg H/ Blennow K 2002 neuroscience letters 324(3): 189-192. Influence of the apoE4 allele on human embryonic development.
- Zhang XM/ Yan XX 2009 eur J Neurosci 30(12) : 2271-2283. Beta-secretase-1 elevation in transgenic mouse models of Alzheimer's disease is associated with synaptic/axonal pathology and amyloidogenesis: implications for neuritic plaque development.
- Zhang W/Wojtowicz JM 2010a Neurosci Lett 479: 157-160. Biphasic effects of the cholinergic agonist carbachol on long-term potentiation in the dentate gyrus of the mammalian hippocampus.
- Zhang H/Nicolelis MA 2010b J Neurosci 30: 13431-13440. Spatiotemporal coupling between hippocampal acetylcholine release and theta oscillations *in vivo*.
- Zhang H/Nicolelis MA 2011 J Neurophysiol 106: 2749-2763. A distinctive subpopulation of medial septal slow-firing neurons promote hippocampal activation and theta oscillations.
- Zhang SJ/Moser EI 2013 Science 340(6128): 273. Optogenetic dissection of entorhinal-hippocampal functional connectivity.
- Zheng F/Alzheimer C 2012 J Neurophysiol 208: 91-100. M2 muscarinic acetylcholine receptors regulate long-term potentiation at hippocampal CA3 pyramidal cell synapses in an input-specific fashion.
- Zhong N/Weisgraber KH 2009 J Biol Chem 284(10): 6027-6031. Understanding the association of apolipoprotein E4 with Alzheimer disease: clues from its structure.
- Zhou W / Crutcher KA 2008 Journal of neurotrauma 25(4): 279-290. Meta-analysis of apoE4 allele and outcome after traumatic brain injury.
- Zhu XO/Aggleton JP 1995 eur J Neurosci 7: 753-765. Neuronal signalling of information important to visual recognition memory in rat rhinal and neighbouring cortices.
- Zipp F / Frotscher M 1989 brain Res 495: 161-166. Entorhinal fibers form synaptic contacts on parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat fascia dentate
- Zoli, M / Fuxe, K. 1999 Trends Pharmacol. Sci. 20, 142-150. Volume transmission in the CNS and its relevance for neuropsychopharmacology.

Annexes

Publication n°4

Mathis C., **Bott J-B.**, Candusso MP., Simonin F., Cassel J-C.

Impaired striatum-dependent behavior in GASP-1-knock-out mice.

Genes Brain Behav 2011; 10 : 299-308

Impaired striatum-dependent behavior in GASP-1-knock-out mice

C. Mathis^{1,†}, J.-B. Bott¹, M.-P. Candusso¹,
F. Simonin^{2,1} and J.-C. Cassel^{1,1}

¹Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives, FRE 3289 Université de Strasbourg-CNRS, IFR 37 de Neurosciences, GDR 2905 CNRS, 12 rue Goethe, Strasbourg, and ²Institut de Recherche de l'ESBS, UMR 7175 Université de Strasbourg-CNRS, Illkirch, France

[†]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author: C. Mathis, PhD, Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives, FRE 3289 CNRS, Equipe de Neurobiologie Cognitive et Comportementale, UdS, 12 rue Goethe, 67000 Strasbourg, France. Email: chantal.mathis@unistra.fr

G protein-coupled receptor (GPCR) associated sorting protein-1 (GASP-1) is suspected to play a key role in recycling and degradation of several GPCRs. In a previous study, we have shown that GASP-1-knock-out (GASP-1-KO) mice displayed deficits in acquiring a cocaine self-administration task, associated with an exacerbated down-regulation of striatal dopaminergic and cholinergic receptors. Among several possibilities, GASP-1 deficiency could have impaired memory processes underlying the acquisition of the operant conditioning task. Therefore, the present study investigated cognitive performances of GASP-1-KO mice and their wild-type littermates (WT) in a broad variety of memory tasks. Consistent with a deficit in procedural memory, GASP-1-KO mice showed delayed acquisition of a food-reinforced bar-press task. During water-maze training in hidden- or visible-platform paradigms, mutant and WT mice acquired the tasks at the same rate. However, GASP-1 mice exhibited persistent thigmotaxic swimming, longer distance to the platform, and reduced swim speed. There was no deficit in several tasks requiring simple behavioral responses (Barnes maze, object recognition and passive avoidance tasks). Thus, the ability to acquire and/or express complex responses seems affected in GASP-1-deficient mice. Hippocampal functions were preserved, as the retention of an acquired memory in spatial tasks remained unaffected. The pattern of behavioral deficits observed in GASP-1-KO mice is coherent with current knowledge on the role of striatal GPCRs in acquisition/expression of skilled behavior and in motivation. Together with the previous findings, the so far established phenotype of GASP-1-KO mice makes them a potentially exciting tool to study striatal functions.

Keywords: Bar-press task, complex response, G-protein associated sorting protein, procedural memory, reward, spatial memory

Received 12 July 2010, revised 22 October 2010, accepted for publication 20 November 2010

G protein-coupled receptors (GPCRs) form the largest class of cell surface receptors. They are widely distributed in the central nervous system, where they modulate numerous functions including cognition, motivation, appetite and pain (Bockaert et al. 2010; Lim 2007). GPCRs trigger various cellular processes such as receptor desensitization and/or internalization and modification of gene transcription. Partners involved in the rapid desensitization and internalization of GPCRs have been identified, but less is known about the mechanisms regulating their post-endocytic sorting (Moore et al. 2007). Several proteins involved in receptor recycling or degradation interact with the carboxyl-terminal tail of GPCRs (Cong et al. 2001; Wang et al. 2002; Weinman et al. 2006). The discovery of a novel family of GPCR associated sorting protein (GASP) provided new insights on this aspect of GPCR modulation (Abu-Helo & Simonin 2010; Simonin et al. 2004). Particularly, GASP-1 is considered a serious candidate in post-endocytotic sorting of GPCRs (Barlett et al. 2005; Tappe-Theodor et al. 2007; Whistler et al. 2002).

The genes encoding GASP-1 and most members of its family are clustered in a small region of the X chromosome in humans and mice. This region is associated with mental retardation diseases including Allan-Hemond and Partington syndromes. GASP-1 is predominantly expressed in the brain, with highest expression levels in the olfactory bulb, hippocampus, hypothalamus and some thalamic and cortical regions (Simonin et al. 2004). GASP-1 interacts directly with GPCRs including m₃/m₂-cholinergic, β_1 -adrenergic and 5-HT₇-serotonergic and several opioid receptors (Heydorn et al. 2004; Simonin et al. 2004), and is involved in post-endocytic sorting of delta opioid, cannabinoid CB₁ and dopamine D₂ receptors (Barlett et al. 2005; Martini et al. 2007; Whistler et al. 2002). The physiological relevance of GASP-1 has been only very recently explored *in vivo* (Abu-Helo & Simonin 2010). In accordance with GASP-1 modulatory role in CB₁ receptor post-endocytic sorting, Tappe-Theodor and collaborators (2007) have shown *in vivo* that uncoupling GASP-1 from CB₁ in the dorsal horn of the spinal cord reduced the development of cannabinoid antinociceptive tolerance.

The first study using GASP-1-knock-out (KO) mice investigated the role of this protein in acute and chronic behavioral responses to cocaine (Bouf et al. 2009). In these mice, acute and sensitized locomotor effects of cocaine were reduced. Moreover, GASP-1-deficient mice were impaired in acquiring a cocaine self-administration task and showed a pronounced down-regulation of dopaminergic

starting at 16 V with a maximum of 40 V. Mice received shocks of increasing voltage randomly every 15–45 seconds until a shock induced a flight response. This level of footshock was considered the mouse's threshold.

Statistical analysis

Differences between mean values were determined using appropriate analysis of variance for a single factor (ANOVA) or repeated measures (ANOVA). Post hoc comparisons were performed using the Newman-Keuls (NK) test, where necessary. Differences were considered significant at $P < 0.05$. Data given in the text or presented in the graphs are given as mean \pm SEM.

Results

Locomotor activity

Before evaluating the learning and memory performances of WT and GASP-1-deficient animals, we first measured the evolution of their locomotor activity in a new environment (cage and room) over a 24-h period. GASP-1-KO mice and their WT showed a classical reduction of locomotor activity over the 3 h of habituation to their novel environment in the actography system ($F_{2,56} = 83.63$, $P < 0.0001$, Fig. 1). Although mutant mice seemed slightly less active than WT mice, the difference was not significant on this part of the session (no Genotype or Genotype \times Hour effects). On the following 21 h, the two groups showed a higher activity during the dark phase (KO: 21.1 ± 2.9 and WT: 30.3 ± 3.2 transitions/h) than during the light phase (KO: 4.5 ± 0.7 and WT: 7.3 ± 0.8 transitions; Phase effect: $F_{1,20} = 91.75$, $P < 0.0001$; no Genotype \times Phase effect, see Fig. 1 for hour-by-hour evolution). GASP-1-KO mice were less active than their WT littermates (Genotype effect: $F_{1,20} = 6.44$, $P = 0.02$). This effect was more pronounced during the dark phase ($P = 0.005$). Thus, GASP-1 deficiency was associated with a moderate, but significant, reduction of spontaneous locomotor activity.

Detection of a spatial change in object configuration

After a 3-day resting period, memory for objects and their spatial properties was tested in WT and GASP-1-KO mice. Total exploration during the acquisition phase of the spatial novelty task was similar for both genotypes. The mice showed equal interest in *D* and *ND* objects during the last 5 min of the acquisition session (Category effect: $F_{1,27} = 0.025$, $P = 0.87$, no Genotype or Genotype \times Category effects; data not shown). After the rearrangement of the objects, both GASP-1-KO mice and WT mice showed the highest exploration rate during the first 5-min block. Thus, object preference for both groups was compared over this time period. Their spatial index did not differ significantly (KO: $60.1 \pm 7.4\%$; WT: $68.2 \pm 6.0\%$; no Genotype effect). The following day, both GASP-1-KO and WT mice explored preferentially the new object and did not differ significantly from each other (KO: $63.2 \pm 7.0\%$; WT: $63.8 \pm 5.4\%$; no Genotype effect).

Searching for an escape platform in the Morris water maze

After a 10-day resting period, WT and GASP-1-KO mice were tested in three navigation tasks in the water maze. As shown in Fig. 2a, during the 5 days of training in the reference memory task, the mutant mice improved their performance at the same rate than WT mice over the 5 days of training (Day effect on distance and latency: $F_{4,112} > 27.11$, $P < 0.0001$; no Day \times Genotype effect). However, throughout training, GASP-1-KO mice swam a longer distance and showed higher latencies before reaching the platform compared to WT mice (distance: $F_{1,28} = 8.72$, $P = 0.0006$, see Fig. 2a; latency: $F_{1,28} = 10.35$, $P = 0.003$, data not shown). Both WT and KO mice reduced their swimming velocity over the 5 days of training ($F_{4,112} = 7.81$, $P < 0.0001$; mean velocity: KO: 18.3 ± 0.4 cm/second; WT: 19.8 ± 0.3 cm/second). Rodents often remain close to the

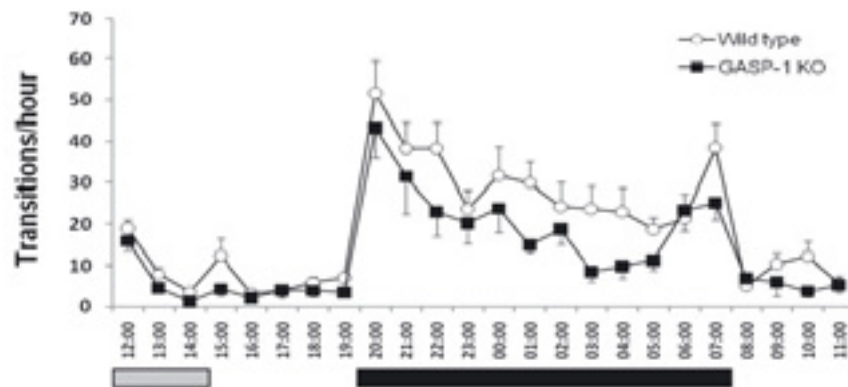


Figure 1: Activity scores during the dark and the light phases of a 24-h recording session. During the 3-h habituation period (gray bar), locomotor activity of GASP-1-KO mice and WT mice decreased similarly. On the remaining 21 h, KO mice were less active than WT mice during the dark phase (lights off between 1900 h and 0700 h; black bar). Data are expressed as the mean number of back-and-forth transitions (\pm SEM) made by the end of each hour in the activity cage.

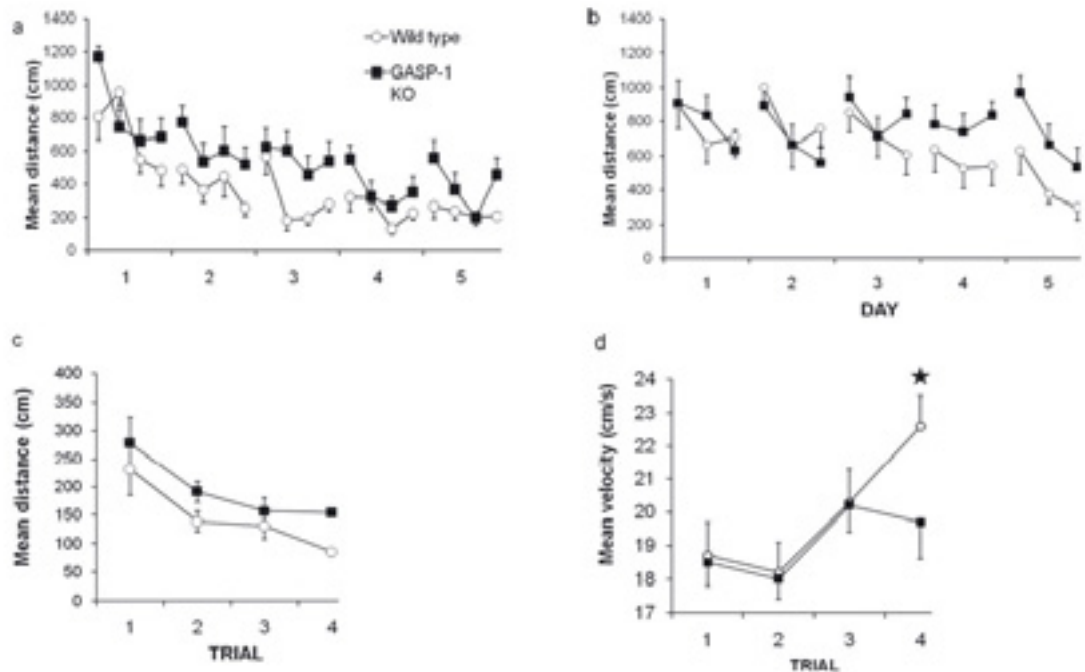


Figure 2: Performance in hidden-platform and visible-platform versions of the water-maze paradigm. Globally, GASP-1 KO swam a longer distance than WT mice, but both genotypes improved similarly their performance (a) over training in the reference memory task, (b) between Trials 1 and 2 in the working memory task, and (c) over the four trials of the visible platform task. Note the scale change on graph c. GASP-1-KO mice did not increase their swimming velocity over the four trials, conversely to WT mice (d). * $P < 0.005$, vs. other trials of the task, NK test.

walls of the pool on the first water-maze trials, but this thigmotaxic swim tends to disappear as training progresses. Interestingly, the distance swum within a 10-cm distance from the wall was already higher in GASP-1-KO mice than in WT mice during the initial 60-second free swim trial without platform (KO: 1344 ± 54 cm and WT: 1074 ± 80 cm; $F_{1,28} = 7.75$, $P = 0.009$). Thigmotaxis decreased markedly over the course of training in WT mice, whereas it diminished only moderately in KO mice (KO: 197 ± 17 cm and WT: 38 ± 5 cm; Genotype effect: $F_{1,28} = 8.15$, $P = 0.008$; Day \times Genotype interaction: $F_{4,112} = 3.05$, $P = 0.02$). It is noteworthy that, despite strong thigmotaxic tendencies in GASP-1-deficient mice, the pattern of improvement of performance was parallel among genotypes. Both groups improved their distance performance essentially within the training sessions (Trial effect: $F_{3,84} = 21.25$, $P < 0.0001$), whereas they showed some loss of performance between the training sessions (Trial 4 of day N to Trial 1 of day $N + 1$: $F_{1,28} = 7.94$, $P = 0.009$). Thus, improvement of performance depended mainly on within-session progresses. During the probe trial, both groups had good performances: they searched for the platform in the goal quadrant for at least twice as much time than the 15-second chance level (KO:

29.9 ± 3.1 seconds, $t_{14} = 4.88$, $P = 0.0002$; WT: 36.2 ± 1.4 seconds, $t_{14} = 15.52$, $P < 0.0001$). Genotype effect: $F_{1,28} = 3.53$, $P = 0.07$).

In the working memory task, the position of the platform changed from day to day. The working memory component of the task is evaluated by comparing the second trial (new platform position) to the first one. Both groups similarly improved their performance between Trials 1 and 2 (latencies and distance: $F_{1,28} \geq 17.15$, $P \leq 0.0005$; no Genotype \times Trial interaction; see Fig. 2b). Again, throughout testing, GASP-1-KO mice took a longer time to reach the platform ($F_{1,28} = 7.41$, $P = 0.011$; data not shown) and swam a longer distance ($F_{1,28} = 4.23$, $P = 0.049$, see Fig. 2b) than WT mice. WT mice showed a high swim speed on the first trial, when they searched for the new platform position (Trial 1: 21.5 ± 0.4 , Trial 2: 20.0 ± 0.3 and Trial 3: 19.5 ± 0.3 cm/second; NK test: $P \leq 0.005$, Trial 1 compared to Trial 2 and to Trial 3), but speed decreased afterwards, whereas GASP-1-KO mice maintained a low swim speed over all trials (Trial 1: 19.6 ± 0.5 , Trial 2: 19.8 ± 0.4 and Trial 3: 18.7 ± 0.4 cm/second; Trials \times Genotype interaction: $F_{2,56} = 3.06$, $P = 0.05$). The initial tendency to search the platform in the area occupied on the previous day (distance

Table 1: Searching for a safe place in the working memory water-maze task and in the Barnes-maze task

Genotype	Working memory task: distance in platform annulus (cm)				Barnes maze task: latency to enter the target hole (seconds)				
	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
WT	143 ± 26	100 ± 21	53 ± 20	68 ± 19	116 ± 12	55 ± 12	34 ± 6	24 ± 6	30 ± 11
GASP-1 KO	153 ± 36	90 ± 19	47 ± 13	69 ± 16	124 ± 13	68 ± 13	56 ± 14	34 ± 8	29 ± 6

In the working memory task, both genotypes initially concentrated their research in the area in which the platform had been placed on the previous day (platform area enlarged by a 10-cm annulus), but GASP-1-KO and WT mice abandoned this unadapted strategy in a comparable way as the training progressed. In the Barnes-maze task, the latency to enter the target hole decreased at a similar rate in the two genotypes. Data are presented as mean performance (\pm SEM) on the first trial of each day (water maze) or on the three daily trials of Days 1–5 (Barnes maze).

swam or time spent in the previous platform area) decreased similarly in the course of the training for both groups (no Genotype or Genotype \times Day effect, distance data shown in Table 1). Thus, shifting every day the platform position affected similarly the searching strategies of GASP-1-KO and WT mice on the first trial of each day, and spatial memory performance was comparable across the genotypes.

In the visible platform task, both groups improved similarly their performance over the four trials (Trial effect for Distance and Latency: $F_{3,36} > 4.53$, $P < 0.005$; no Trial \times Genotype interaction, see Fig. 2c for distance). Although latencies and distances were very short after extensive water-maze training, GASP-1-KO mice swam longer distances and took more time than WT mice to reach the visible platform (Distance: $F_{1,28} = 6.30$, $P = 0.02$, see Fig. 2c; Latency: KO: 11.9 ± 1.3 seconds; WT: 8.0 ± 0.7 seconds; $F_{1,28} = 4.98$, $P = 0.03$). Velocity increased over the four trials ($F_{3,36} = 14.18$, $P < 0.0001$, see Fig. 2d). However, this effect reached significance only in WT mice, not in KO mice ($F_{3,36} = 2.92$, $P = 0.04$). Indeed, velocity was significantly higher on the last trial in WT mice only (NK test: $P < 0.005$, Trial 4 compared to Trials 1, 2 and 3).

Altogether, these water-maze data suggest that GASP-1-KO mice underperform WT mice in terms of distance and latency during training, but both KO and WT mice show good retention performance on the reference memory task and on the working memory task. For each task, GASP-1-KO swim speed remains remarkably stable over trials whether the platform is immersed or visible, whether it has a fixed position or it is moving from trial to trial.

Finding the target hole in the Barnes maze

Spatial memory was also evaluated in the Barnes-maze task which is less stressful than water-maze testing for mice. The mice globally improved their performance over the 5 days of training (for Latency and Errors, Day effect: $F_{4,112} \geq 2.60$, $P \leq 0.04$). The latency to enter the target hole and the number of errors made by the mice decreased at a similar rate in GASP-1-KO mice and in WT mice (no Genotype \times Day effect, latency data shown in Table 1). During the probe test, the mice visited preferentially the target hole and immediately adjacent holes rather than the opposite hole ($F_{5,140} = 24.11$, $P < 0.0001$; Fig. 3b). Knock-out and WT mice made a similar number of hole visits during this probe test (WT: 31.8 ± 4.6 holes; KO: 35.5 ± 4.6 holes).

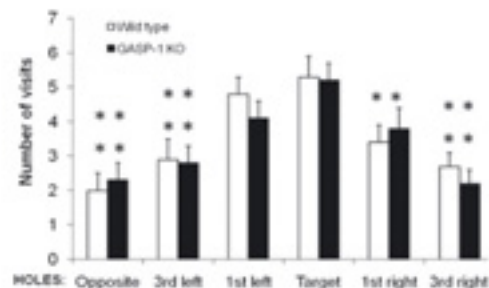


Figure 3: Barnes-maze performance during the probe test. Data are expressed as the mean number of visits (\pm SEM) to the target hole, those directly adjacent (1st left and right) or 90° apart (3rd left and right), and the opposite holes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. the target hole for each genotype, NK test.

Whatever the variable considered, there was no genotype effect or interaction with genotype in this task.

Reinforced bar-pressing

On the day following the Barnes-maze probe test, the mice entered a food restriction period in order to allow procedural memory evaluation in an appetitively reinforced bar-press task. At the beginning of the food restriction period, GASP-1-KO mice were heavier than WT mice (KO: 35.6 ± 0.9 g; WT: 31.4 ± 0.9 g; $F_{1,28} = 10.66$, $P = 0.003$). However, the percentage of weight loss was similar in the two groups over the 6 days of food restriction period and by the end of the food restriction period (last day: KO: $15.9 \pm 0.52\%$; WT: $17.1 \pm 0.58\%$; no Genotype or Genotype \times Day effects). The bodyweight was maintained within 85–80% of ad libitum weight over the 5 days of training (mean loss of weight: KO: $18.7 \pm 0.32\%$; WT: $19.4 \pm 0.56\%$; no Genotype or Genotype \times Day effects). As shown in Fig. 4a, both genotypes performed at similar levels on the first day of training and improved their performance on the following days (Day effect: $F_{4,112} = 80.22$, $P < 0.0001$). However, the progresses of KO mice were much slower than those of WT mice (Day \times genotype interaction: $F_{4,112} = 56.97$, $P = 0.003$). Globally, the number of reinforced bar-presses was significantly lower in the GASP-1-KO mice as compared to

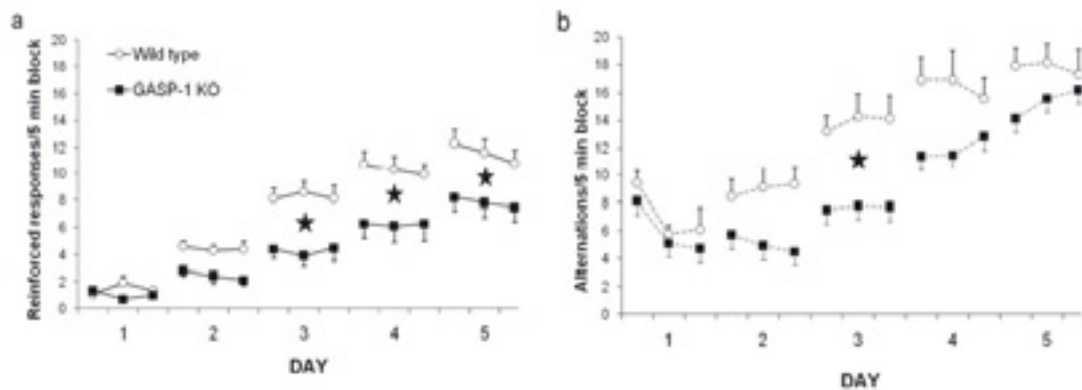


Figure 4: Performance in an appetitively reinforced bar-press task. Evolution of reinforced responses (a) and total alternations (b) performance. Results are presented as mean number of each type of responses (\pm SEM) made by WT and GASP-1-KO mice during each 5-min block of the 15-min sessions given each day over 5 consecutive days. * $P < 0.05$, genotype difference on the daily performance, NK test.

their WT counterparts over the whole training period (Genotype effect: $F_{1,28} = 11.73$, $P = 0.002$). The rate of reinforced bar-presses made over the three 5-min blocks within each session remained quite stable in both genotypes (no effect or interaction with this five-block factor). Thus, the deficit of KO mice was more likely to be related to smaller inter-session improvement of performance. Indeed, the mean increase in the number of reinforced responses between sessions was of 1.9 ± 0.3 in KO mice and of 3.0 ± 0.3 in WT mice ($F_{1,28} = 5.77$, $P = 0.02$, no Inter-session or Inter-session \times Genotype effects). On the last training sessions, both groups showed a slight within-session decrease in reinforced responses when they performed over the rate of about 8 pellets per 5 min, suggesting similar satiation levels.

An alternation from the lever to the food cup may happen spontaneously as the mouse explore actively the box, but it is also part of the reinforced response to be learned in association with the bar-press triggering pellet delivery. Thus, we also analyzed alternation data in order to verify whether the mice explored actively the box and to characterize the evolution of this aspect of their conditioned response (Fig. 4b). In GASP-1-KO mice, the progression of the number of alternations from the lever to the food cup was close to that found in WT mice (Day effect: $F_{4,112} = 44.90$, $P < 0.0001$; Day \times Genotype interaction: $F_{4,112} = 2.13$, $P = 0.08$). GASP-1-KO mice made less alternations only on the third daily session ($F_{1,28} = 6.18$, $P = 0.02$; NK test: $P = 0.009$, KO differs from WT on Day 3). As the training progressed, the latency to make the first reinforced bar-press of the daily session decreased similarly in both groups (Day 1: 411 ± 65 seconds; Day 2: 11 ± 1 seconds; Day effect: $F_{4,112} = 31.18$, $P < 0.0001$; no Genotype or Genotype \times Day effects).

In summary, GASP-1 mice underperform WT mice in terms of their number of reinforced responses and, to a much lesser extent, their number of lever/food cup alternations. This deficit is more pronounced between sessions than

within sessions: the overnight improvement of performance appears reduced in KO mice.

Avoiding the footshock-associated dark compartment

Finally, we investigated contextual memory of GASP-1-KO mice in a passive avoidance task. The mice were given a one-month resting period with food *ad libitum* before testing. During the acquisition session, GASP-1-KO mice and WT mice entered with similar latencies (KO: 6.8 ± 0.8 seconds; WT: 6.8 ± 0.9 seconds) the dark compartment where they received the footshocks. On the following day, the two groups did not differ significantly in terms of latency to enter the dark compartment (KO: 45.9 ± 10.7 seconds; WT: 29.6 ± 6.7 seconds) and the number of transitions between compartments (KO: 13.9 ± 2.0 ; WT: 21.1 ± 3.7). However, GASP-1-KO mice spent less time in the dark compartment than WT mice (KO: 73.1 ± 15.1 seconds; WT: 144.3 ± 19.7 seconds; $F_{1,28} = 8.23$, $P = 0.008$). The better performance of KO mice compared to WT mice is not related to differences in footshock sensitivity. Indeed, mutant mice appeared less reactive to electric shocks because they exhibited a flight response at a higher footshock level than WT mice (KO: 27.5 ± 1.1 V; WT: 23.3 ± 0.9 V; $F_{1,28} = 7.84$, $P = 0.009$).

Discussion

Performance deficits of GASP-1-KO mice in a drug discrimination task based on nose-poke conditioning (Boeuf *et al.* 2009) led us to suspect a possible impairment in procedural memory tasks. Thus, the aim of our current study was to evaluate the specificity of this possible deficit in a large battery of tasks taking several forms of memory. GASP-1-deficient mice showed difficulties in acquiring a food-reinforced bar-press task, which confirmed their impairments

of the hippocampus, and the hippocampus is a key region for learning and memory. We therefore examined the effects of GASP-1-XG on learning and memory. We first examined the effects of GASP-1-XG on the acquisition of a spatial working memory task. Mice were trained to learn a spatial working memory task in a Y-maze. The number of correct choices was recorded. The number of correct choices was significantly higher in the GASP-1-XG group than in the control group. We then examined the effects of GASP-1-XG on the acquisition of a spatial reference memory task. Mice were trained to learn a spatial reference memory task in a Y-maze. The number of correct choices was recorded. The number of correct choices was significantly higher in the GASP-1-XG group than in the control group. We then examined the effects of GASP-1-XG on the acquisition of a spatial working memory task. Mice were trained to learn a spatial working memory task in a Y-maze. The number of correct choices was recorded. The number of correct choices was significantly higher in the GASP-1-XG group than in the control group. We then examined the effects of GASP-1-XG on the acquisition of a spatial reference memory task. Mice were trained to learn a spatial reference memory task in a Y-maze. The number of correct choices was recorded. The number of correct choices was significantly higher in the GASP-1-XG group than in the control group. We then examined the effects of GASP-1-XG on the acquisition of a spatial working memory task. Mice were trained to learn a spatial working memory task in a Y-maze. The number of correct choices was recorded. The number of correct choices was significantly higher in the GASP-1-XG group than in the control group. We then examined the effects of GASP-1-XG on the acquisition of a spatial reference memory task. Mice were trained to learn a spatial reference memory task in a Y-maze. The number of correct choices was recorded. The number of correct choices was significantly higher in the GASP-1-XG group than in the control group.

These results suggest that GASP-1-XG mice have enhanced learning and memory abilities. We then examined the effects of GASP-1-XG on the acquisition of a spatial working memory task. Mice were trained to learn a spatial working memory task in a Y-maze. The number of correct choices was recorded. The number of correct choices was significantly higher in the GASP-1-XG group than in the control group. We then examined the effects of GASP-1-XG on the acquisition of a spatial reference memory task. Mice were trained to learn a spatial reference memory task in a Y-maze. The number of correct choices was recorded. The number of correct choices was significantly higher in the GASP-1-XG group than in the control group. We then examined the effects of GASP-1-XG on the acquisition of a spatial working memory task. Mice were trained to learn a spatial working memory task in a Y-maze. The number of correct choices was recorded. The number of correct choices was significantly higher in the GASP-1-XG group than in the control group. We then examined the effects of GASP-1-XG on the acquisition of a spatial reference memory task. Mice were trained to learn a spatial reference memory task in a Y-maze. The number of correct choices was recorded. The number of correct choices was significantly higher in the GASP-1-XG group than in the control group.

These results suggest that GASP-1-XG mice have enhanced learning and memory abilities. We then examined the effects of GASP-1-XG on the acquisition of a spatial working memory task. Mice were trained to learn a spatial working memory task in a Y-maze. The number of correct choices was recorded. The number of correct choices was significantly higher in the GASP-1-XG group than in the control group. We then examined the effects of GASP-1-XG on the acquisition of a spatial reference memory task. Mice were trained to learn a spatial reference memory task in a Y-maze. The number of correct choices was recorded. The number of correct choices was significantly higher in the GASP-1-XG group than in the control group. We then examined the effects of GASP-1-XG on the acquisition of a spatial working memory task. Mice were trained to learn a spatial working memory task in a Y-maze. The number of correct choices was recorded. The number of correct choices was significantly higher in the GASP-1-XG group than in the control group. We then examined the effects of GASP-1-XG on the acquisition of a spatial reference memory task. Mice were trained to learn a spatial reference memory task in a Y-maze. The number of correct choices was recorded. The number of correct choices was significantly higher in the GASP-1-XG group than in the control group.

References

1. Smith, J. M., & Jones, K. L. (2010). The effects of GASP-1-XG on learning and memory. *Journal of Neuroscience*, 30(12), 4123-4130.

2. Doe, A. B., & Lee, C. D. (2011). GASP-1-XG mice show enhanced spatial working memory. *Behavioral Brain Research*, 218(1-2), 105-112.

3. Kim, H. J., & Park, S. H. (2012). GASP-1-XG mice exhibit improved spatial reference memory. *Neuroscience Letters*, 518(1-2), 105-109.

4. Wang, L., & Zhang, Y. (2013). GASP-1-XG mice have enhanced learning and memory abilities. *PLoS ONE*, 8(12), e81234.

5. Chen, X., & Li, Z. (2014). GASP-1-XG mice show improved spatial working memory. *Neuroscience*, 278(1-3), 105-112.

6. Liu, Y., & Sun, J. (2015). GASP-1-XG mice exhibit enhanced spatial reference memory. *Neuroscience Letters*, 585(1-2), 105-109.

7. Zhang, H., & Wang, M. (2016). GASP-1-XG mice have improved learning and memory. *PLoS ONE*, 11(12), e165432.

8. Sun, J., & Liu, Y. (2017). GASP-1-XG mice show enhanced spatial working memory. *Neuroscience*, 345(1-3), 105-112.

9. Wang, M., & Zhang, H. (2018). GASP-1-XG mice exhibit improved spatial reference memory. *Neuroscience Letters*, 658(1-2), 105-109.

10. Li, Z., & Chen, X. (2019). GASP-1-XG mice have enhanced learning and memory. *PLoS ONE*, 14(12), e0214567.

11. Sun, J., & Liu, Y. (2020). GASP-1-XG mice show improved spatial working memory. *Neuroscience*, 425(1-3), 105-112.

12. Wang, M., & Zhang, H. (2021). GASP-1-XG mice exhibit enhanced spatial reference memory. *Neuroscience Letters*, 725(1-2), 105-109.

13. Li, Z., & Chen, X. (2022). GASP-1-XG mice have improved learning and memory. *PLoS ONE*, 17(12), e0278901.

14. Sun, J., & Liu, Y. (2023). GASP-1-XG mice show enhanced spatial working memory. *Neuroscience*, 475(1-3), 105-112.

15. Wang, M., & Zhang, H. (2024). GASP-1-XG mice exhibit improved spatial reference memory. *Neuroscience Letters*, 775(1-2), 105-109.

16. Li, Z., & Chen, X. (2025). GASP-1-XG mice have enhanced learning and memory. *PLoS ONE*, 20(12), e0312345.

17. Sun, J., & Liu, Y. (2026). GASP-1-XG mice show improved spatial working memory. *Neuroscience*, 525(1-3), 105-112.

18. Wang, M., & Zhang, H. (2027). GASP-1-XG mice exhibit enhanced spatial reference memory. *Neuroscience Letters*, 825(1-2), 105-109.

19. Li, Z., & Chen, X. (2028). GASP-1-XG mice have improved learning and memory. *PLoS ONE*, 23(12), e0345678.

20. Sun, J., & Liu, Y. (2029). GASP-1-XG mice show enhanced spatial working memory. *Neuroscience*, 575(1-3), 105-112.

21. Wang, M., & Zhang, H. (2030). GASP-1-XG mice exhibit improved spatial reference memory. *Neuroscience Letters*, 875(1-2), 105-109.

77

77

21

77

18

NO

81

T

127

56

64

77

13

68

5

11

297

51

Acknowledgments

Publication n°5

Mathis C., Savier E., **Bott J-B.**, Clesse D., Bevins N., Sage-Ciocca D., Geiger K., Gillet A.,
Laux-Biehlmann A., Goumon Y., Lacaud A., Lelièvre V., Kelche C., Cassel J-C.,
Pfrieger FW. Reber M.

Defective response inhibition and collicular noradrenaline enrichment in mice with duplicated retinotopic map in the superior colliculus.

Brain Struct Funct 2014; 10 : 299-308

Defective response inhibition and collicular noradrenaline enrichment in mice with duplicated retinotopic map in the superior colliculus

Chantal Mathis · Elise Savier · Jean-Bastien Bott · Daniel Clesse · Nicholas Bevins · Dominique Sage-Ciocca · Karin Geiger · Anaïs Gillet · Alexis Laux-Biehlmann · Yannick Goumon · Adrien Lacaud · Vincent Lelièvre · Christian Kelche · Jean-Christophe Cassel · Frank W. Pfrieger · Michael Reber

Received: 5 February 2014 / Accepted: 21 February 2014 /
© The Author(s) 2014. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract The superior colliculus is a brain structure necessary for visuospatial orientation, control of gaze movements and attention. The principal functions of the superior colliculus have prompted hypotheses about its involvement in neuropsychiatric conditions, but to date this topic has not been addressed experimentally. We describe experiments on genetically modified mice for *Isl2-EphA3* knockout mice that show a well characterized duplication of the retinal collicular and cortico-collicular axonal projections leading to hyperstimulation of the superior colliculus. To explore the functional impact of collicular hyperstimulation, we compared the

performance of homozygous knockout, heterozygous knockout and wildtype mice in several behavioral tasks requiring collicular activity. The Light/dark Box test and Go/NoGo test using task revealed that homozygous mutant mice exhibit defective response inhibition, a form of impulsivity. This defect was specific to attention as other tests showed no differences in usually driven behavior, motivation, visuospatial learning and self-orientation abilities among the different groups of mice. Monamine quantification and gene expression profiling demonstrated a specific enrichment of noradrenaline only in the superficial layers of the superior colliculus of *Isl2-EphA3* knock-in mice, where the retinotopy is duplicated, whereas transcript levels of receptors, transporters and metabolic enzymes of the monoaminergic pathway were not affected. We demonstrate that the defect in response inhibition is a consequence of noradrenaline imbalance in the superficial layers of the superior colliculus caused by retinotopic map duplication. Our results suggest that structural abnormalities in the superior colliculus can cause defective response inhibition, a key feature of attention-deficit disorders.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00429-014-0745-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

C. Mathis · J.-B. Bott · K. Geiger · A. Gillet · C. Kelche · J.-C. Cassel

Laboratory of Adaptive and Cognitive Neurosciences, CNRS, University of Strasbourg UMR 7364, 67000 Strasbourg, France
e-mail: chantal.mathis@linc.u-strasbg.fr

E. Savier · D. Clesse · A. Laux-Biehlmann · Y. Goumon · A. Lacaud · V. Lelièvre · F. W. Pfrieger · M. Reber (✉)
Institute of Cellular and Integrative Neurosciences, CNRS UPR 3212, University of Strasbourg, 5, rue Naise Pascal, 67084 Strasbourg, France
e-mail: michael.reber@inserm.fr

N. Bevins
Molecular Neurobiology Laboratory, The Salk Institute,
La Jolla, San Diego, CA 92037, USA

N. Bevins
Department of Neurosciences, University of California, La Jolla,
San Diego, CA 92039, USA

D. Sage-Ciocca
Chronobiotron, UMS 3415, CNRS, 67084 Strasbourg, France

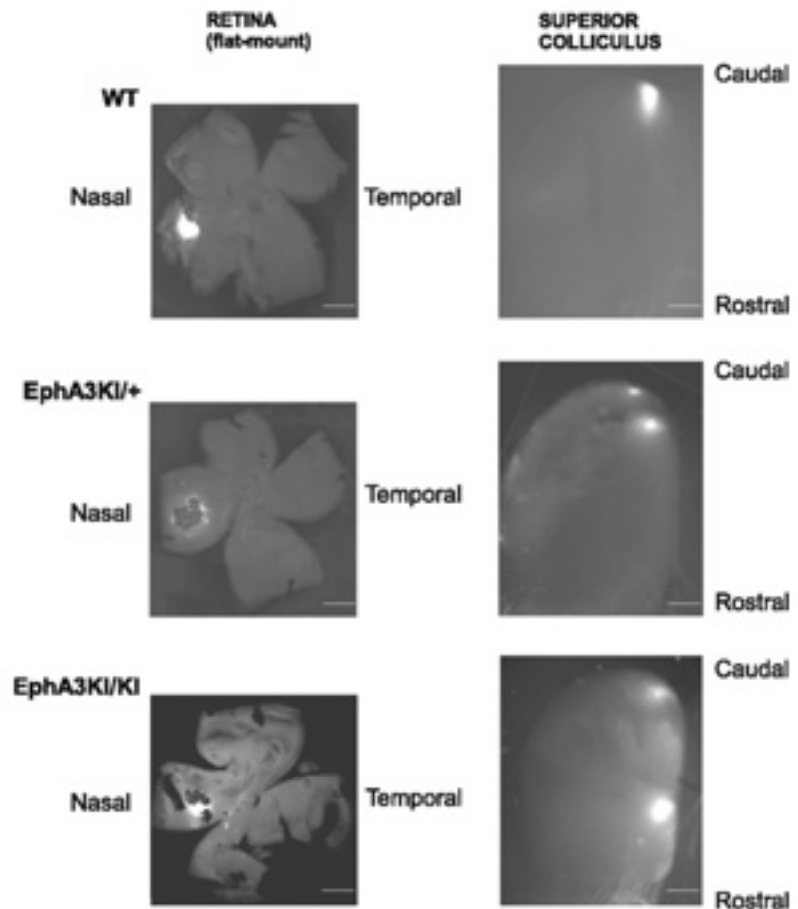
Keywords Retinotopy · Visual system · EphA signaling · Superior colliculus · Noradrenaline · Response inhibition · Attention-deficit disorders

Introduction

The superior colliculus (SC) is a midbrain structure that integrates sensory inputs from multiple modalities (Wallace et al. 1993; Holmes and Spence 2005; May 2006) and plays a central role in visuo-spatial orientation, attention and sensorimotor processing (Stein 1984; May 2006; Gandhi and Katnani 2011). Defects in SC function have

Fig. 1 Topographic retino-collicular projections in WT and Isl2-EphA3KI animals.

Micrographs illustrate nasal 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) injections in P8 retinas and the corresponding termination zone(s) in the SC. *Top* an injection in nasal WT retina leads to a single caudal termination zone in the SC. *Middle* an injection in a nasal EphA3KI/+ retina leads to two caudal termination zones in the SC. *Bottom* an injection in a nasal EphA3KI/KI retina leads to two distant termination zones in the SC. Scale bars 1 mm



been associated with a number of neuropathological and neuropsychiatric disorders including epilepsy (Ross and Coleman 2000), schizophrenia (Fuentes 2001) and autism spectrum disorder (ASD) (Kleinmans et al. 2011). Recently, collicular hyperstimulation has been proposed to underlie attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) symptoms, especially the impulsivity and distractibility associated with the disorder (Overton 2008; Miller 2009; Dommert et al. 2009). However, direct experimental evidence for such a link remains elusive.

The SC presents a particular feature, namely the topographic organization of its sensory inputs (Sperry 1963; Lemke and Reber 2005; May 2006). Axons of retinal ganglion cells (RGCs) project to the superficial layers of the SC along spatial axes reflecting their position along corresponding axes in the retina (the retino-collicular map). Layer V neurons of the V1 cortex also project in a topographic manner to the superficial layers of the SC, the cortico-collicular map, which is in register with the retino-

collicular map (May 2006; Triplett et al. 2012). This creates a topographic representation of the visual field in the superficial layers of the SC, also called retinotopy. Auditory and somatosensory afferents projecting to deep layers of the SC are also aligned with the visual maps (Meredith and Stein 1985; King et al. 1998; May 2006) enhancing perception of salient stimuli and influencing decision and overt behavior (Stein et al. 2009).

We took advantage of a specific disruption of the retinotopy in the superficial layers of the SC that has been observed in the Isl2-EphA3 knock-in mice (Fig. 1; Brown et al. 2000). In this mouse model, the EphA3 tyrosine kinase receptor, which acts as a guidance molecule during map formation, is over-expressed by a subset of RGCs. This leads to a well-characterized duplication of the retino-collicular and cortico-collicular maps along the anterior-posterior axis of the SC. Over-expression of the EphA3 receptor neither affects retinal organization and integrity, nor the topography of collicular somatosensory inputs

(Brown et al. 2000; Reber et al. 2004; Triplett et al. 2009; Bevins et al. 2011; Triplett et al. 2012). The duplicated visual maps are functional as single visual stimuli trigger the activation of two distinct areas in the SC (Triplett et al. 2009). Unlike other mouse models that target Eph/ephrin signaling (Dottori et al. 1998; Feldheim et al. 2000; Feldheim 2004), the genetic modification in the *Isl2-EphA3* knock-in mice affects only a subset of RGCs and does not affect other structures in the brain (Brown et al. 2000; Reber et al. 2004; Thaler et al. 2004).

To determine if hyperstimulation of the SC, due to duplication of the retinotopic projections, influences collicular-related behavior, wild-type (WT), heterozygous (*EphA3^{KI/+}*) and homozygous (*EphA3^{KI/KI}*) *Isl2-EphA3KI* mice were subjected to a series of well-established behavioral tests. As a first approach, we tested general visual ability (cliff test, optokinetic reflex, Morris water maze with visible platform) as the effects of disrupted EphAs gradients in the RGCs and duplicated retinotopy in the SC on visual perception have never been described before. We then focused on general sensorimotor (locomotor activity, circadian rhythmicity, light/dark box test) and integrative features (beam walking test) and on collicular-related behavior, especially visuo-spatial orientation and memory (Morris water maze with hidden platforms) and response inhibition (Go/No-Go task). Our results show that *EphA3^{KI/KI}* mutant mice exhibit defective response inhibition when compared to WT or *EphA3^{KI/+}* littermates. Visual acuity, sensorimotor activity, visuo-spatial learning, motivation and memory were similar in the different genotypes. Molecular characterization demonstrated elevated noradrenaline levels in the superficial layers of the SC in *EphA3^{KI/KI}* animals where the retinotopy is duplicated. Expression levels of receptors, transporters and enzymes of the monoaminergic signaling pathway were similar to WT littermates. Interestingly, these changes resemble specific symptoms of the adult and predominantly inattentive-type of ADHD patients (Diamond 2005; Biederman and Faraone 2005).

Materials and methods

Animals

Mice were bred and housed in our mouse facility (Ursatubioyon, UMS 315, CNRS, Saint-Germain) and tested during the adult phase (21–24 weeks) until 61–63 days, except for indicated experiments. All procedures were in accordance with national (European Directive 87/609, October 1987) and European community (EU Directive 609/86) guidelines. Official agreement numbers for animal experimentation were 65262 for UM, 65215 for JCC and

67-358 for KG. AG was under their responsibility. Mice were genotyped by PCR of genomic DNA from tail biopsies as described previously (Reber et al. 2004). Four- to seven-month-old male littermates of each genotype (*EphA3^{KI/KI}*, *EphA3^{KI/+}* and WT) on a mixed genetic background (C57/Bl6 × 129Sv/J) were subjected to behavioral tests and molecular analyses. Standard laboratory rodent food and water were available ad libitum throughout all experiments, except for the Go/No-Go task, for which all mice were kept at 85 % of their free-feeding weight.

Behavioral tests

Three distinct cohorts of 4- to 7-month-old WT, *EphA3^{KI/+}* and *EphA3^{KI/KI}* males littermates were characterized using fixed sequences of test ranging as much as possible from the least to the most invasive test. Inter-test intervals (ITI) varied along the sequences to limit order effect. The first cohort of 4- to 7-month-old males littermates ($n = 6-9$ per group) was first tested in the light/dark box test (Boeuf et al. 2009) (ITI 5 days) and then only in the Go/No-Go task (Meziane et al. 1993). The second cohort of 4- to 7-month-old males littermates ($n = 7$ per group) was dedicated to sensorimotor evaluations. They were first tested for circadian wheel running activity (Mendoza et al. 2008) and general locomotor activity (Yassine et al. 2013) (ITI 15 days) followed by the Morris water maze paradigm (Moreau et al. 2008) (ITI 15 days), the beam walking test (Moreau et al. 2008) (ITI 3 days) and the visual cliff test (Gibson and Walk 1960) (ITI 21 days). The optokinetic reflex (Douglas et al. 2005) was studied on a third cohort of 4-month-old ($n = 7-10$) male littermates. Detailed descriptions can be found in Online resource 1.

Molecular analysis

Transcript levels were analyzed by semi-quantitative PCR and monoamine levels were measured by high-pressure liquid chromatography as described in the Online resource 1.

Statistical analysis

Unless otherwise indicated, data were analyzed by analysis of variance with repeated measures factors to study interactions between genotype and sex (two days). When two independent variables (ANOVA) ANOVA statistical tests were conducted by a Kruskal–Wallis test applied on the light/dark single factors or within each repeated measure as group sizes in behavioral studies were not homogeneous. When exposed, post hoc analyses were performed with the Newman–Keuls (NKE) and Tukey–Kramer tests.

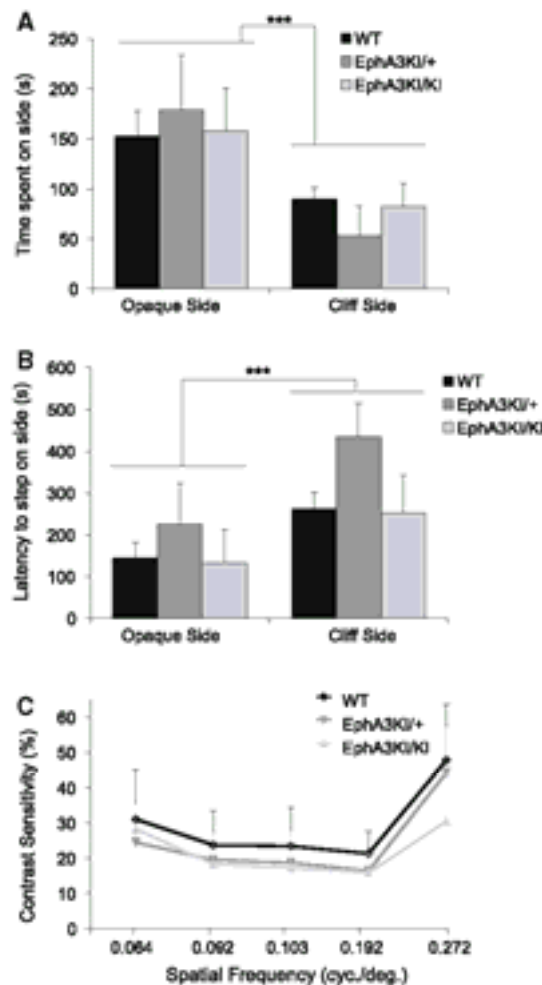


Fig. 2 Visual acuity in 1st2-EphA3 knock-in mice. **a** In the visual cliff test, WT, EphA3KI/+ and EphA3KI/KI mice spent significantly more time on the opaque side compared to the cliff side. The three groups of mice did not differ in terms of mean time (s) spent on the opaque side and cliff side during the 10 min session. **b** The latency to step down toward the opaque side was significantly lowered compared to the cliff side, but similar in all genotypes. **c** In the OKR test, the average contrast sensitivity (threshold contrast as %, y axis) for spatial frequencies ranging from 0.064 to 0.272 cycles/degree (x axis) varies similarly in the three groups of mice. *** $p < 0.0001$

(Statistica 8.0; Statsoft, Inc., Tulsa, OK). The time spent in the goal quadrant of the water maze was compared to the 15-s chance value by means of a t test. The 15-s chance value corresponds to the time spent for random search in four quadrants during the 60 s probe test. All behavioral data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). HPLC and qPCR data were analyzed using the

non-parametric Kruskal–Wallis (KW) test. All expression data are represented using boxplots (min, q1, median, q3, max).

Results

The functional contribution of the SC in specific behavior has been investigated in a variety of experiments, including electrophysiological recording, inactivation and lesion approaches (Binns 1999; Huberman and Niell 2011) but little has been done at a more integrated level in animal models with congenital defects.

Visual acuity

We first asked whether the modified collicular retinotopy affects visual acuity using the visual cliff test, which measures visual depth perception in rodents. Mice from all three experimental groups spent significantly more time on the opaque side compared to the cliff side (side: F1,18 = 10.15, $p = 0.005$; Fig. 2a) and stepped earlier onto the opaque side than onto the cliff side (side: F1,18 = 16.61, $p < 0.001$; Fig. 2b) indicating normal visual perception. There was no significant difference between genotypes for the latency to step down and the time spent on either the checkered side or the cliff side (no genotype effect or genotype \times side interaction). We next tested visual acuity by stimulating and measuring the optokinetic reflex (OKR). This reflex mediates compensatory head motions elicited by moving full-field visual stimuli, to maintain a constant image on the retina. Mice from all three genotypes showed similar threshold values for the minimum contrast that triggers an OKR at spatial frequencies ranging from 0.064 to 0.272 cycles/degree (Fig. 2c). Together, these results indicated normal visual acuity in EphA3^{KI/KI} and EphA3^{KI/+} mice.

General locomotor activity, sensory motor coordination and circadian rhythm

We next tested locomotor activity using horizontal cage activity and wheel running. Mice of each experimental group showed a similar decrease in locomotor activity over the course of a 3-h session corresponding to habituation to the new cage (15-min block: F11,198 = 55.17, $p < 0.0001$; Fig. 3a) and no significant effect of the genotype was observed in total wheel running activity, all three genotypes showing normal rhythmic activity (Fig. 4b, Online resource 2). The key role of the SC in the integration of sensorimotor modalities led us to test sensorimotor coordination. All three genotypes underwent the beam walking test and showed similar latencies to leave the start segment

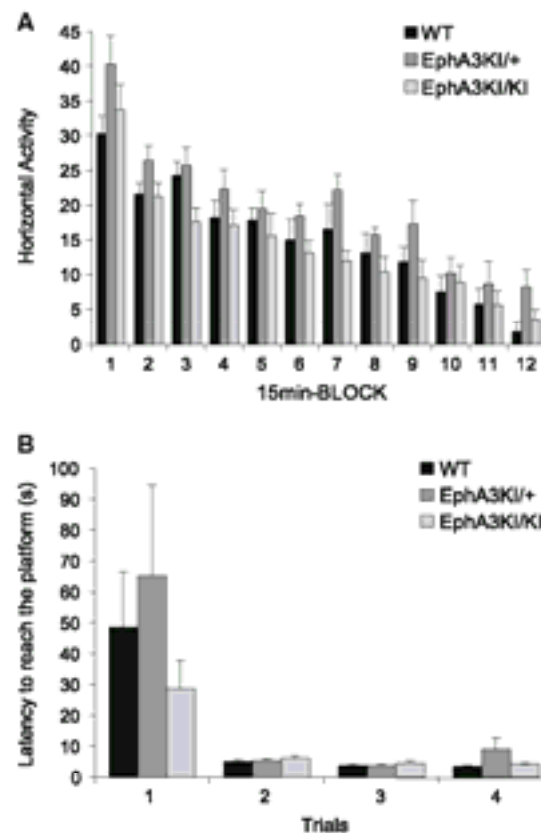


Fig. 3 Locomotor activity and sensorimotor coordination in *Isl2-EphA3* knock-in mice. **a** During the 3-h habituation phase, *EphA3KI/KI* and *EphA3KI/+* mice did not differ from their WT littermates in terms of exploration of a new environment (expressed as mean horizontal activity per 15-min block). **b** *EphA3KI/KI* mice did not differ from their WT littermates in terms of mean time per trial to reach the platform over 4 trials of the beam test. In all three genotypes, this parameter decreased significantly over consecutive trials

(genotype \times trial: $F_{6,54} = 0.65$, $p > 0.10$, not shown) and to reach the platform, which decreased significantly during subsequent trials (trial: $F_{3,54} = 16.48$, $p < 0.0001$; Fig. 3b). Sensorimotor coordination and latency to leave the start segment were similar among genotypes. Moreover, we tested whether the running activity of knock-in mice follows light-entrained and endogenous circadian patterns. All three genotypes showed similar running activity in 12 h light-dark and dark-dark cycles with similar endogenous period (WT: 23.57 ± 0.26 h, *EphA3^{KI/+}*: 23.76 ± 0.35 h and *EphA3^{KI/KI}*: 23.69 ± 0.26 h; Fig. 4). Together these results indicate normal locomotor activity, sensory motor processing and circadian activity in *EphA3^{KI/KI}* and *EphA3^{KI/+}* animals.

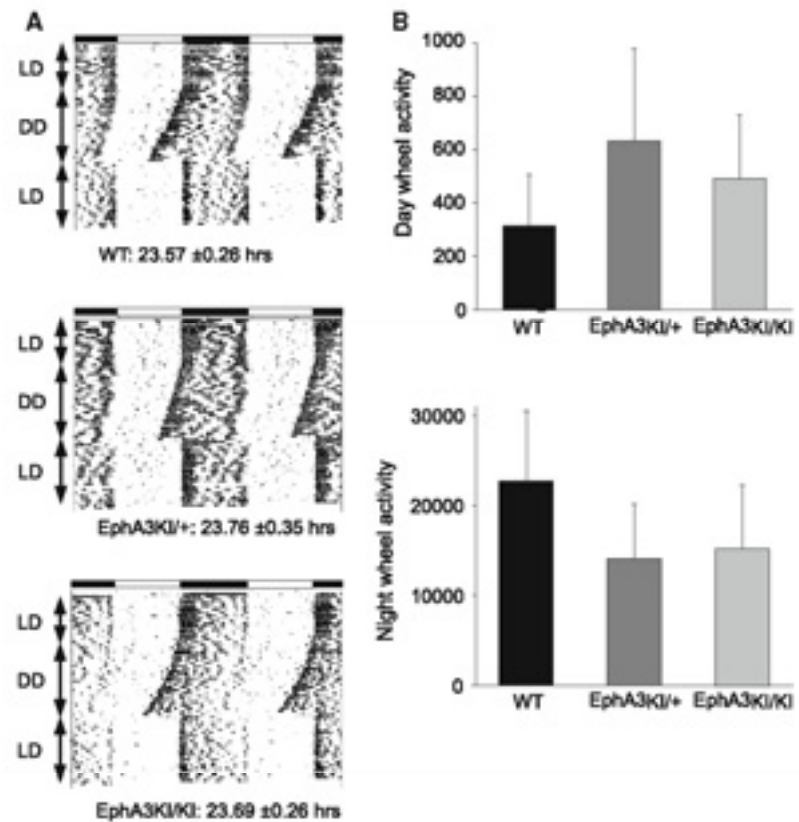
Visuo-spatial orientation and memory

We then tested vision and motor skills using the Morris water maze visible platform test, where mice must locate a cue at close range, and swim toward it. After 2 days of habituation, mice were tested for their performance in reaching a visible platform. Swim speed and distance were measured in four trials. Swim speed remained stable and similar for all groups. Swimming distance was similarly reduced among all groups over the four consecutive trials (trial: $F_{3,54} = 16.07$, $p < 0.0001$). No significant difference was observed among genotypes or genotype \times trial interactions (Fig. 5a). Next we used a variant of the Morris water maze test where the platform is hidden to evaluate visuo-spatial learning and memory. Here, mice must find the hidden platform based on distant visual cues outside the pool. Over the course of the four training days, mice of all three genotypes showed similar swim speeds and learned the position of the hidden platform equally well (day: $F_{3,54} = 20.67$, $p < 0.0001$; Fig. 5b). No difference was observed between genotypes, suggesting that *EphA3^{KI/+}* and *EphA3^{KI/KI}* animals are able to learn a task requiring visuo-spatial orientation abilities. In a probe test performed 24 h later, all mice showed a clear bias toward the target quadrant where they spent significantly more time than the 15-s chance level (WT: $t_6 = 6.68$, $p = 0.0005$, *EphA3^{KI/+}*: $t_6 = 4.62$, $p = 0.004$; *EphA3^{KI/KI}*: $t_6 = 6.01$, $p = 0.001$; Fig. 5c). Taken together, these results indicated normal visuo-spatial orientation, preserved motivation to reach a visible and hidden platform and intact spatial learning and memory in *EphA3^{KI/KI}* and *EphA3^{KI/+}* mice.

Anxiety, response inhibition

As the behavioral output in several tasks (e.g., visual cliff, Go/No-Go and Morris water maze) can be modulated by levels of anxiety, they were determined in the *Isl2-EphA3* knock-in mice using the light/dark box test (Crawley 2007). This conflict test evaluates anxiety based on the tendency of a mouse to explore a novel environment against the aversive effect of a brightly lit open field (the light box). We measured both the time spent in the light box (aversive environment) and the number of attempts to enter this box (defined as an incomplete body entrance). Animals from the three genotypes spent a similar amount of time in the aversive environment (the light box) indicating comparable levels of anxiety (Fig. 6a). In support of that, habituation times in a novel activity cage and latency to leave the start segment in the beam walking test, presented above, did not differ between the three genotypes further suggesting that the *Isl2-EphA3KI* animals exhibit normal levels of anxiety. Surprisingly, *EphA3^{KI/KI}* and *EphA3^{KI/+}* mice made significantly fewer attempts to enter

Fig. 4 Circadian activity in *Isl2-EphA3* knock-in mice. All three groups of mice showed similar endogenous periods after a 15 days of light-dark (LD) cycle followed by 10 days of constant darkness (DD) (a) and similar diurnal and nocturnal wheel running activity (b)



the light box (incomplete body entrances) compared to their WT littermates (attempts: $F_{2,21} = 4.24$, $p < 0.05$, NK post hoc: $p < 0.05$; Fig. 6b). In other words, *EphA3^{KI/KI}* and *EphA3^{KI/+}* mice were less hesitant and entered the light box more readily suggesting that they fail to refrain from exploring an aversive environment. In addition, *EphA3^{KI/KI}* and *EphA3^{KI/+}* mice showed a decreased latency for complete body entrance into the light box compared to WT littermates (latency: $F_{2,21} = 3.24$, $p = 0.06$; Fig. 6c). This provides further evidence that they did not hesitate to enter an aversive environment. However, *EphA3^{KI/KI}* mice showed no increase in time spent in the light box and no impairment in the visual cliff test, optokinetic reflex and both versions of the water maze in which performance depends on intact visual abilities (Yassine et al. 2013). Alternatively, reduced hesitation to enter the light box could be related to a diminished response inhibition, a key feature of impulsivity (Chamberlain and Sahakian 2007).

To confirm defects in response inhibition of knock-in mice, we performed a Go/No-Go task. Go/No-Go paradigms are based on a cue discrimination conditioning and

are commonly used to assess attention and response inhibition, but also learning and memory functions in humans and mice (Meziane et al. 1993; Aron and Poldrack 2005; Gubner et al. 2010; Loos et al. 2010). This test required food restriction, during which the mice were kept at 85 % of their weight to ensure motivation for food reward. Mice of all three genotypes showed similar weight loss and motivation for food during food restriction (not shown) (Meziane et al. 1993). In our version of the task, mice were conditioned to run successively down two runways differing in colors, one color runaway being always baited with food (Go trial) and the other never baited (No-Go trial). Both *EphA3^{KI/+}* and WT littermates progressively learned to discriminate between the reinforced (Go trials) and non-reinforced (No-Go trials) runways as indicated by a significant decrease in running time on Go trials and stable running times on No-Go trials (Go trials: $F_{2,34} = 18.9$, $p < 0.0001$; Fig. 7a, b) as usually observed in this task (Meziane et al. 1993). This suggested normal learning, motivation and response inhibition in *EphA3^{KI/+}* and WT mice. Running duration of *EphA3^{KI/KI}* animals decreased similarly than WT and *EphA3^{KI/+}* littermates on Go trials. Surprisingly, and in

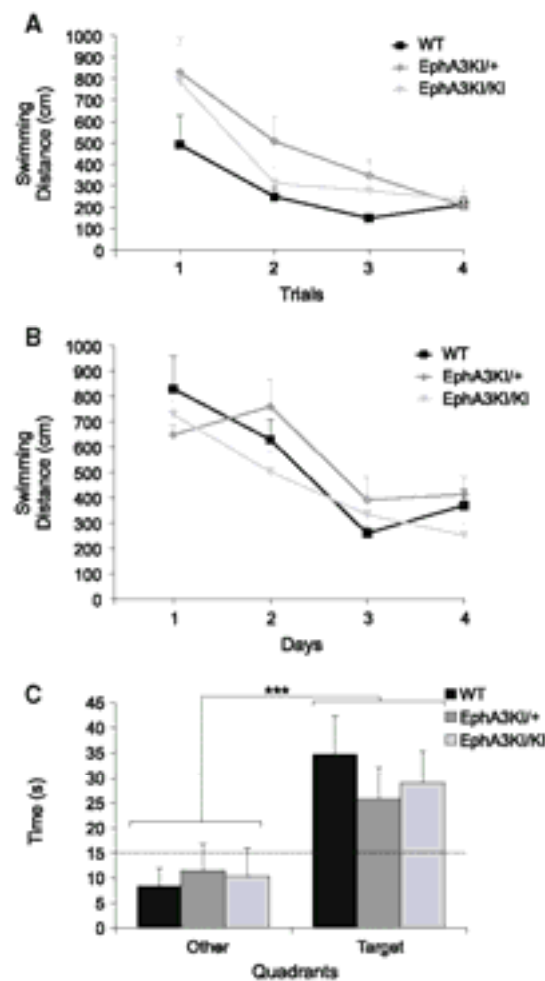


Fig. 5 Visuo-spatial orientation, spatial navigation, learning and memory in Isl2-EphA3 knock-in mice. **a** In the visible platform test of the Morris water maze paradigm, all three groups of mice required similar mean swimming distances per trial to reach the visible platform and showed a similar decrease in the swimming distance over consecutive trials. **b** During the 4-day-long training period in the hidden platform test of the Morris water maze paradigm, Isl2-EphA3 knock-in mice and their WT littermates required similar swimming distances to reach the platform and showed a similar decrease over consecutive trials. **c** In the 60-s probe test without platform, mice spent significantly more time in the target quadrant compared to the mean time in other quadrants regardless of their genotype. *** $p < 0.0001$.

contrast to WT and EphA3^{KI/+}, EphA3^{KI/KI} running times also significantly decreased on No-Go trials (No-Go trials: $F_{4,34} = 4.03$, $p < 0.01$, NK $p < 0.05$; Fig. 7a, b) indicating their failure to refrain themselves from running in the non-reinforced runway on No-Go trials. Preserved performances of the EphA3^{KI/KI} animals on Go trials suggested intact motivation for food and efficient learning. A

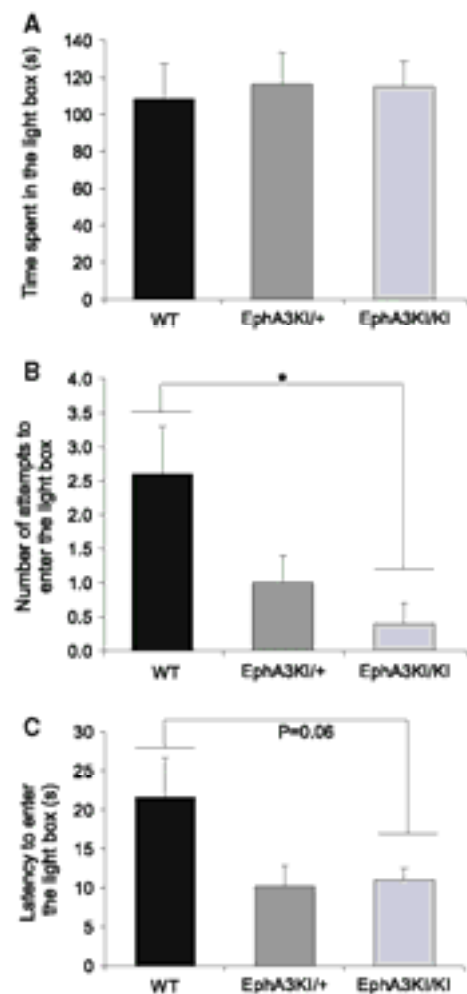
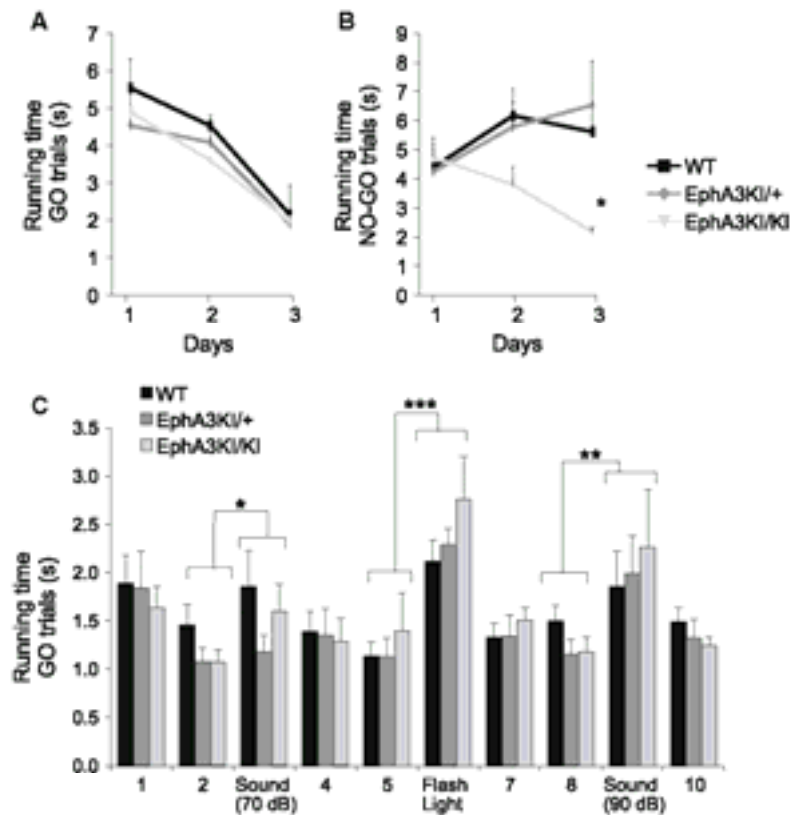


Fig. 6 Anxiety-related behavior in Isl2-EphA3 knock-in mice. **a** In the light/dark box test, Isl2-EphA3 knock-in mice spent the same amount of time (s) in the light box as their WT littermates. **b** EphA3KI/KI animals showed a significant decrease in the number of attempts to enter the light box compared to the WT littermates. **c** EphA3KI/KI and EphA3KI/+ animals showed a tendency to a decreased latency (s) to enter the light box compared to their WT littermates. * $p < 0.05$

discrimination learning deficit in these mice is unlikely since amnesic treatments are known to affect essentially Go running times (Meziane et al. 1993, 1998). In addition, their performance in the visible and hidden versions of the Morris water maze as well as in the visual cliff test and optokinetic reflex suggests that their visual acuity and visuo-spatial memory are comparable to those of WT and EphA3^{KI/+} littermates. Taken together, these results further support the hypothesis of a defective response inhibition in the EphA3^{KI/KI} animals.

Fig. 7 Go/No-Go performance in *Id2-Epa3* knock-in mice. **a** Over the three sessions, WT, *EphA3^{KI/+}* and *EphA3^{KI/KI}* mice reduced their mean running time per trial in the reinforced Go trials. **b** Over the three sessions, WT and *EphA3^{KI/+}* mice show stable mean running time in the non-reinforced No-Go trials, as opposed to *EphA3^{KI/KI}* littermates, which also reduced their running times in No-Go trials NK * $p < 0.05$. **c** Auditory (70, 90 dB tone) and visual (flash light) distractors led to significant increases in the running times in Go trials of all three genotypes. Note that *EphA3^{KI/KI}* mice appeared slightly more sensitive to a visual distractor than their littermates. * $p < 0.05$; ** $p = 0.01$; *** $p < 0.0001$



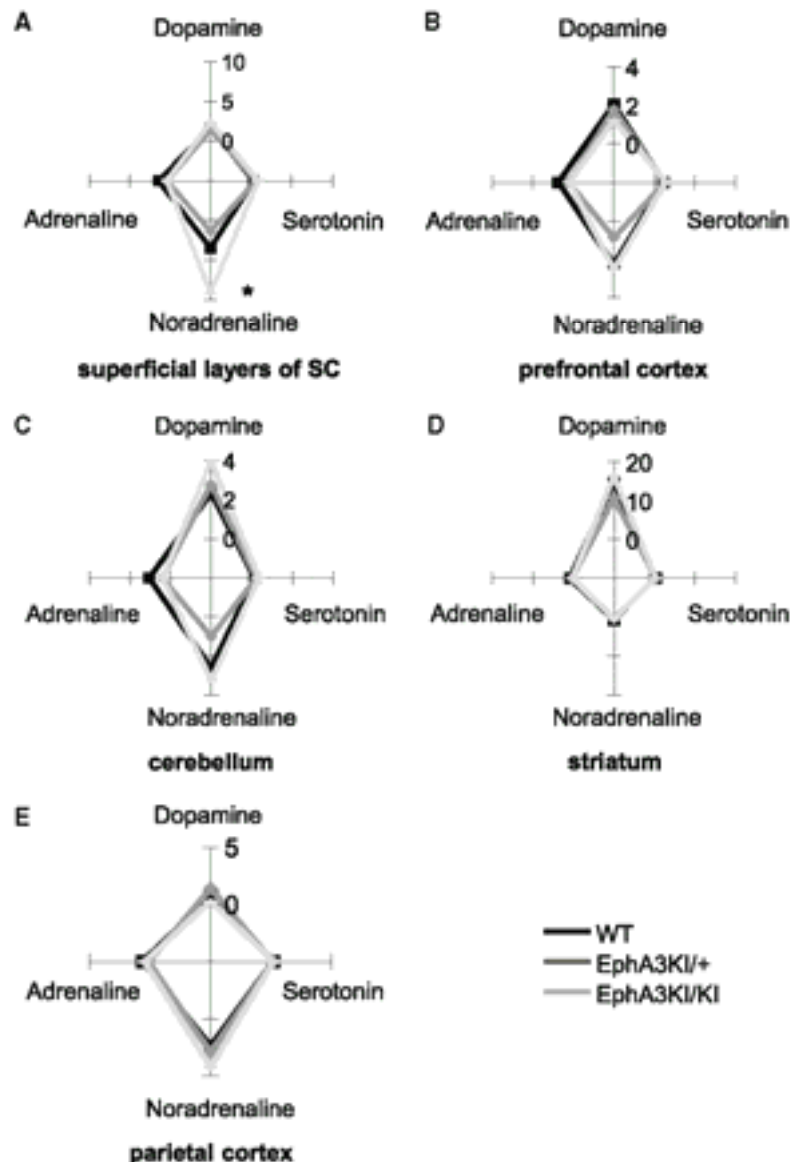
In principle, this defective behavior could be caused by impaired attention or increased distraction (Barkley 2004). To test this possibility, we repeated the reinforced Go task, but added visual (flashing light) and auditory (tone) distractors. Mice of all genotypes showed significantly increased running times by reducing their speed in trials with tones (70 dB tone: $F_{1,18} = 5.48$, $p < 0.05$; 90 dB tone: $F_{1,18} = 9.18$, $p < 0.01$; Fig. 7c) and flash lights ($F_{1,18} = 92.06$, $p < 0.0001$; Fig. 7c) compared to non-distracted trials. Notably, all *EphA3^{KI/KI}* mice increased their running times when exposed to a flashing light, (one mouse stopped to look toward the origin of the stimulus) although the difference between *EphA3^{KI/KI}* and WT littermates did not reach statistical significance (Flash latency: $F_{2,18} = 1.17$, $p = 0.33$; Fig. 7c). These data indicate that a flashing light and loud tones are effective distractors during the Go task.

Analysis of regional monoamine levels

The observed defective response inhibition in *EphA3^{KI/KI}* mice, corresponding to an ADHD phenotypic feature, could

be induced by abnormal catecholamine levels (van der Kooij and Glennon 2007; Sontag et al. 2010). To test this possibility, we determined levels of monoamine neurotransmitters in distinct areas of the mouse brain, namely the superficial layers of the superior colliculus (SC), the prefrontal cortex, the striatum, the parietal cortex and the cerebellum, all involved in attentional processes and motor control (Hemelstein et al. 2000; Aron and Poldrack 2005; Biederman and Faraone 2005; Overton 2008). Levels of dopamine, adrenaline and serotonin were not significantly different between genotypes in the five structures studied (Fig. 8; Online resource 2). In contrast, the levels of noradrenaline were significantly increased in the superficial layers of the SC of *EphA3^{KI/KI}* compared to their *EphA3^{KI/+}* and WT littermates (KW test $p < 0.05$; Figs. 8a, 9). The increase in noradrenaline in the superficial layers of the SC prompted us to examine the expression of receptors, transporters and enzymes that are involved in monoaminergic metabolism and associated with attention-deficit diseases (Hemelstein et al. 2000; Biederman and Faraone 2005). All three genotypes showed similar expression of transporters, metabolic enzymes and downstream receptors of dopamine, noradrenaline, adrenaline and

Fig. 8 Monoamine concentrations in selected brain regions of Isl2-EphA3 knock-in mice. Radar-plot representation of total dopamine, adrenaline, noradrenaline and serotonin content (median values, ng/mg of proteins) in the **a** superficial layers of the SC, **b** prefrontal cortex, **c** cerebellum, **d** striatum and **e** parietal cortex. The noradrenaline content was significantly increased in superficial SC layers of EphA3KI/KI compared to EphA3KI/+ and WT littermates. * $p < 0.05$ KW test. SC superior colliculus



serotonin in the superficial layers of the SC and in other brain regions (Online resource 2).

Discussion

Our study provides first evidence for specific behavioral and molecular changes in mice with genetically altered retinotopy in the superior colliculus and consequently enhanced visual inputs. In the Go/No-Go task, EphA3^{KI/KI} mice performed normally on Go trials by increasing their

running speed, but they were completely unable to inhibit their running response on No-Go trials.

In the light/dark box test, EphA3^{KI/KI} mice entered the aversive light box more readily than control mice. Altogether, our behavioral tests revealed that EphA3^{KI/KI} mice exhibit defective response inhibition, a form of impulsivity. The observation that heterozygous EphA3^{KI/+} mice behave like WT littermates in the Go/No-Go task suggests that a partial duplication of the retino-collicular map (Brown et al. 2000) is not sufficient to trigger defective response inhibition. The observed behavioral changes were remarkably

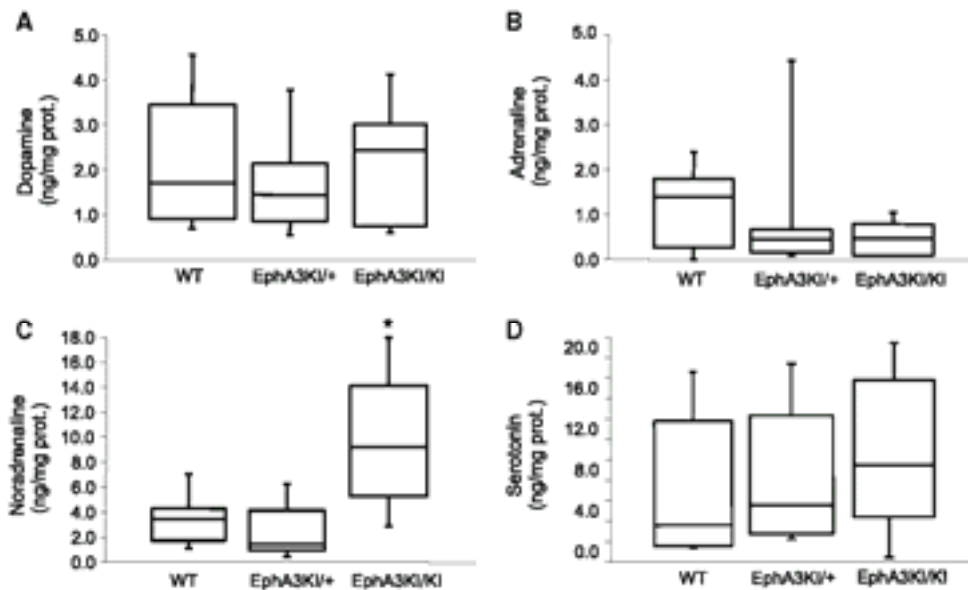


Fig. 9 Monoamine content in the SC of Isl2-EphA3 knock-in mice. Boxplot representation (min, q1, median, q3, max) of total **a** dopamine, **b** adrenaline, **c** noradrenaline and **d** serotonin content (in ng/mg

of proteins) in the superficial layers of the superior colliculus (SC) showing significant increase in noradrenaline in EphA3^{KI/KI} animals compared to EphA3^{KI/+} and WT littermates. * $p < 0.05$ KW test

specific, as all other paradigms tested, namely vision, visuo-spatial orientation, sensorimotor function, motivation, learning and memory as well as exploratory behavior and anxiety were similar in WT, EphA3^{KI/+} and EphA3^{KI/KI} mice. Defective response inhibition could be the consequence of enhanced levels of noradrenaline that we detected in the superficial layers of the SC of EphA3^{KI/KI} mice. Enhanced noradrenaline levels in the SC could alter the behavior of the EphA3^{KI/KI} mice by modulating the signal-to-noise ratio in this structure (Mooney et al. 1990; Tan et al. 1999) and thereby changing its level of activation (Dommett et al. 2009). In hamsters, *in vivo* and *in vitro* studies demonstrated a suppression of collicular neuron response upon noradrenaline application (Mooney et al. 1990; Tan et al. 1999). In rats, Sato and Kayama reported that iontophoretically applied noradrenaline exerts an excitatory action, indicating an increase of the signal-to-noise ratio, in accordance with our hypothesis (Sato and Kayama 1983). Whether noradrenaline increases or decreases the signal-to-noise ratio in the superficial layers of the SC is still debated. However, it clearly affects the processing of salient stimuli in a context-specific manner (Sato and Kayama 1983; Mooney et al. 1990; Tan et al. 1999).

The increase in noradrenaline was specific to the superficial layers of the SC, where the retinotopy is duplicated. Moreover, the increase only concerned noradrenaline, whereas other monoamines including dopamine, serotonin and adrenaline showed similar concentrations for all

genotypes and brain regions. The increase in noradrenaline was not accompanied by changes in transcript levels of genes involved in monoamine metabolism. Therefore, we hypothesize that the increase of noradrenaline in the superficial layers of the SC may be the consequence of the duplication of the RGCs projections, which are functional, as shown by optical intrinsic imaging (Triplett et al. 2009). Previous studies revealed that RGC axons release noradrenaline upon activation (Osborne and Patel 1985). Alternatively, the increase may come from a duplication of projections from the *locus coeruleus* (LC), the major source of noradrenaline in the brain, to the superficial layers of the SC (Takemoto et al. 1978; Fritschy et al. 1990). Whether LC projections to the SC are duplicated is unknown as the mapping of the LC to the SC is hindered by the small size and specific sub-nuclei organization of the LC. However, it appears possible given that cortico-collicular projections are also duplicated in the EphA3^{KI/KI} animals although projecting V1 neurons do not express ectopic EphA3 (Triplett et al. 2009). RGCs project to different brain areas, including lateral geniculate nucleus (LGN) and non-image forming structures such as the suprachiasmatic nucleus (SCN), the medial tegmental nucleus (MTN) or the olivary pretectal nucleus (OPN). Triplett and colleagues show no targeting defects in the LGN of Isl2-EphA3 animals (Triplett et al. 2009). The same group recently demonstrated that among 1 % of RGCs projecting to the SCN (the intrinsically photoreceptive RGCs—ipRGCs), 3 % are

Isl2-positive and that these SCN-targeting Isl2-positive RGCs only transiently innervate the SCN during the development (Triplett et al. 2014). MTN and OPN also show innervation by Isl2-positive RGCs at early postnatal stages which is pruned by P6 (Triplett et al. 2014). The behavioral and molecular changes in EphA3^{KO/KO} mice including defective response inhibition and noradrenergic enrichment in the superficial layers of the SC phenocopy some of the symptoms observed in ADHD patients, specifically the adult and predominantly inattentive-type (Barkley 1997; Aron and Poldrack 2005; Biederman and Faraone 2005; Bekker et al. 2005; Fisher et al. 2011; American Psychiatric Association 2013). These symptoms are also main features of Autism Spectrum Disorder (ASD) (Murray 2010). Our findings support the hypothesis that adult ADHD patients present collicular hyperstimulation leading to the appearance of impulsivity and attentional impairments (Overton 2008; Miller 2009; Donmatt et al. 2009). Moreover, they are in line with the idea that dysregulation of the central noradrenergic systems contributes to the pathophysiology of ADHD (Biederman and Spencer 1999). Currently, progress on the etiology, diagnosis and treatment of ADHD is hindered by the limited number of experimental models. Most of the available rodent models are based on impaired monoaminergic transmission (van der Kooij and Glennon 2007; Sontag et al. 2010) and present some of the phenotypic features of ADHD patients. Our findings suggest that EphA3^{KO/KO} animals may serve as a new model to study ADHD pathology and complement the limited arsenal of ADHD/ADD-related experimental approaches to understand and treat these neuropsychologic diseases.

Acknowledgments The authors thank Dr. Sophie Reibel-Foisset, Nicolas Lethenet and Laurence Huck (Chronobiotron, Unité Mixte de Service 3415, Centre National de la Recherche Scientifique, Strasbourg) for animal care and Pedwin Pallet for help with recordings of the optokinetic reflex. This work was supported by Partner University Fund (M.R.), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and Université de Strasbourg (UdS). Publication costs are supported by the Neurex network (TriNeuron – Program Interreg IV Upper Rhine) <http://www.neurex.org>.

Conflict of interest The authors report no biomedical financial interests or potential conflicts of interest.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

References

American Psychiatric Association (2013) Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 5th edn. doi: 10.1176/appi.books.9780890423349

- Aron AR, Poldrack RA (2005) The cognitive neuroscience of response inhibition: relevance for genetic research in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57:1285–1292. doi:10.1016/j.biopsych.2004.10.026
- Barkley RA (1997) Behavioral inhibition, sustained attention, and executive functions: constructing a unifying theory of ADHD. *Psychol Bull* 121:65–94
- Barkley RA (2004) Driving impairments in teens and adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychiatr Clin North Am* 27:233–260. doi:10.1016/S0193-953X(03)00091-1
- Bekker EM, Overtoom CCE, Kooij JJS et al (2005) Disentangling deficits in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry* 62:1129–1136. doi:10.1001/archpsyc.62.10.1129
- Bevins N, Lemke G, Reber M (2011) Genetic dissection of EphA receptor signaling dynamics during retinotopic mapping. *J Neurosci* 31:10302–10310. doi:10.1523/JNEUROSCI.1652-11.2011
- Biederman J, Faraone SV (2005) Attention-deficit hyperactivity disorder. *Lancet* 366:237–248. doi:10.1016/S0140-6736(05)66915-2
- Biederman J, Spencer T (1999) Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) as a noradrenergic disorder. *Biol Psychiatry* 46:1234–1242. doi:10.1016/S0006-3223(99)00192-4
- Binns KE (1999) The synaptic pharmacology underlying sensory processing in the superior colliculus. *Prog Neurobiol* 59:129–159
- Boetif J, Trigo JM, Moreau P-H et al (2009) Attenuated behavioural responses to acute and chronic cocaine in GASP-1-deficient mice. *Eur J Neurosci* 30:860–868. doi:10.1111/j.1460-9568.2009.06865.x
- Brown A, Yates PA, Burrola P et al (2000) Topographic mapping from the retina to the midbrain is controlled by relative but not absolute levels of EphA receptor signaling. *Cell* 102:77–88. doi:10.1016/S0092-8674(00)00012-X
- Chamberlain SR, Sahakian BJ (2007) The neuropsychiatry of impulsivity. *Curr Opin Psychiatry* 20:255–261. doi:10.1097/YCO.0b013e3280ba4989
- Crawley JN (2007) *What's Wrong With My Mouse: Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice*. Wiley, USA. doi:10.1111/j.1601-183X.2008.00424_1.x
- Diamond A (2005) Attention-deficit disorder (attention-deficit/hyperactivity disorder without hyperactivity): a neurobiologically and behaviorally distinct disorder from attention-deficit/hyperactivity disorder (with hyperactivity). *Dev Psychopathol* 17:807–825. doi:10.1017/S0954579405050388
- Donmatt EJ, Overton PG, Greenfield SA (2009) Drug therapies for attentional disorders alter the signal-to-noise ratio in the superior colliculus. *Neuroscience* 164:1369–1376. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.09.007
- Dottoni M, Hartley L, Galea M et al (1998) EphA4 (Sek1) receptor tyrosine kinase is required for the development of the corticospinal tract. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13248–13253
- Douglas RM, Alam NM, Silver BD et al (2005) Independent visual threshold measurements in the two eyes of freely moving rats and mice using a virtual-reality optokinetic system. *Vis Neurosci* 22:677–684. doi:10.1017/S0952523805225166
- Feldheim DA (2004) Loss-of-function analysis of EphA receptors in retinotectal mapping. *J Neurosci* 24:2542–2550. doi:10.1523/JNEUROSCI.0239-03.2004
- Feldheim DA, Kim YI, Bergemann AD et al (2000) Genetic analysis of ephrin-A2 and ephrin-A5 shows their requirement in multiple aspects of retinocollicular mapping. *Neuron* 25:563–574
- Fisher T, Aharon-Peretz J, Pratt H (2011) Dis-regulation of response inhibition in adult attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): an ERP study. *Clin Neurophysiol* 122:2390–2399. doi:10.1016/j.clinph.2011.05.010

- Fritschy JM, Geffard M, Grzanna R (1990) The response of noradrenergic axons to systemically administered DSP-4 in the rat: an immunohistochemical study using antibodies to noradrenaline and dopamine-beta-hydroxylase. *J Chem Neuroanat* 3:309–321
- Fuentes LJ (2001) Selective attention deficit in schizophrenia. *Rev Neurol* 32:387–391
- Gandhi NJ, Katami HA (2011) Motor functions of the superior colliculus. *Annu Rev Neurosci* 34:205–231. doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113728
- Gibson EJ, Walk RD (1960) The “visual cliff”. *Sci Am* 202:64–71
- Gubner NR, Wilhelm CJ, Phillips TJ, Mitchell SH (2010) Strain differences in behavioral inhibition in a Go/No-go task demonstrated using 15 inbred mouse strains. *Alcohol Clin Exp Res* 34:1353–1362. doi:10.1111/j.1530-0277.2010.01219.x
- Himelstein J, Newcorn JL, Halperin JM (2000) The neurobiology of attention-deficit hyperactivity disorder. *Front Biosci* 5:461–478
- Holmes NP, Spence C (2005) Multisensory integration: space, time and superadditivity. *Curr Biol CB* 15:R762–R764. doi:10.1016/j.cub.2005.08.058
- Huberman AD, Niell CM (2011) What can mice tell us about how vision works? *Trends Neurosci* 34:464–473. doi:10.1016/j.tins.2011.07.002
- King AJ, Schnupp JW, Thompson ID (1998) Signals from the superficial layers of the superior colliculus enable the development of the auditory space map in the deeper layers. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 18:9394–9408
- Kleinmans NM, Richards T, Johnson LC et al (2011) fMRI evidence of neural abnormalities in the subcortical face processing system in ASD. *NeuroImage* 54:697–704. doi:10.1016/j.neuroimage.2010.07.037
- Lemke G, Reber M (2005) Retinotectal mapping: new insights from molecular genetics. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:551–580. doi:10.1146/annurev.cellbio.20.022403.093702
- Loos M, Staal J, Schoffelmeier ANM et al (2010) Inhibitory control and response latency differences between C57BL/6 J and DBA/2 J mice in a Go/No-Go and 5-choice serial reaction time task and strain-specific responsivity to amphetamine. *Behav Brain Res* 214:216–224. doi:10.1016/j.bbr.2010.05.027
- May PJ (2006) The mammalian superior colliculus: laminar structure and connections. *Prog Brain Res* 151:321–378
- Mendoza J, Pévet P, Challet E (2008) High-fat feeding alters the clock synchronization to light. *J Physiol* 586:5901–5910. doi:10.1111/jphysiol.2008.159566
- Meredith MA, Stein BE (1985) Descending efferents from the superior colliculus relay integrated multisensory information. *Science* 227:657–659
- Meziane H, Devigne C, Tramu G, Souzireu-Mourat B (1993) Effects of anti-CCK-8 antiserum on acquisition and retrieval by mice in an appetitive task. *Peptides* 14:67–73
- Meziane H, Dodart JC, Mathis C et al (1998) Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:12683–12688
- Miller L (2009) Perspectives on sensory processing disorder: a call for translational research. *Front Integr Neurosci*. doi:10.3389/fnint.2009.07.022.2009
- Mooney RD, Bennett-Clarke C, Chiaia NL et al (1990) Organization and actions of the noradrenergic input to the hamster's superior colliculus. *J Comp Neurol* 292:214–230. doi:10.1002/cne.902920205
- Moreau P-H, Cosquer B, Jeltsch H et al (2008) Neuroanatomical and behavioral effects of a novel version of the cholinergic immunotoxin mu p75-saporin in mice. *Hippocampus* 18:610–622. doi:10.1002/hipo.20422
- Murray MJ (2010) Attention-deficit/hyperactivity disorder in the context of autism spectrum disorders. *Curr Psychiatry Rep* 12:382–388. doi:10.1007/s11920-010-0145-3
- Osborne NN, Patel S (1985) The presence of dopamine- β -hydroxylase-like enzyme in the vertebrate retina. *Neurochem Int* 7:51–56
- Overton PG (2008) Collicular dysfunction in attention deficit hyperactivity disorder. *Med Hypotheses* 70:1121–1127. doi:10.1016/j.mehy.2007.11.016
- Reber M, Buzrola P, Lemke G (2004) A relative signalling model for the formation of a topographic neural map. *Nature* 431:847–853. doi:10.1038/nature02957
- Ross KC, Coleman JR (2000) Developmental and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates. *Neurosci Biobehav Rev* 24:639–653
- Sato H, Kayama Y (1983) Effects of noradrenaline applied iontophoretically on rat superior collicular neurons. *Brain Res Bull* 10:453–457
- Sonag TA, Tucha O, Walitza S, Lange KW (2010) Animal models of attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD): a critical review. *ADHD Atten Deficit Hyperact Disord* 2:1–20. doi:10.1007/s12402-010-0019-x
- Sperry RW (1963) Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. *Proc Natl Acad Sci USA* 50:703–710
- Stein BE (1984) Development of the superior colliculus. *Annu Rev Neurosci* 7:95–125
- Stein BE, Stanford TR, Rowland BA (2009) The neural basis of multisensory integration in the midbrain: its organization and maturation. *Hear Res* 258:4–15. doi:10.1016/j.heares.2009.03.012
- Takekoshi I, Sasa M, Takaori S (1978) Role of the locus coeruleus in transmission onto anterior colliculus neurons. *Brain Res* 158:269–278
- Tan H, Mooney RD, Rhoades RW (1999) Effects of norepinephrine upon superficial layer neurons in the superior colliculus of the hamster: in vitro studies. *Vis Neurosci* 16:557–570
- Thaler JP, Koo SJ, Kania A et al (2004) A postmitotic role for Isl-class LIM homeodomain proteins in the assignment of visceral spinal motor neuron identity. *Neuron* 41:337–350
- Triplitt JW, Owens MT, Yamada J et al (2009) Retinal input instructs alignment of visual topographic maps. *Cell* 139:175–185. doi:10.1016/j.cell.2009.08.028
- Triplitt JW, Phan A, Yamada J, Feldheim DA (2012) Alignment of multimodal sensory input in the superior colliculus through a gradient-matching mechanism. *J Neurosci* 32:5264–5271. doi:10.1523/JNEUROSCI.0240-12.2012
- Triplitt JW, Wei W, Gonzalez C et al (2014) Dendritic and axonal targeting patterns of a genetically-specified class of retinal ganglion cells that participate in image-forming circuits. *Neural Dev* 9:2. doi:10.1186/1749-8104-9-2
- Van der Kooij MA, Glennon JC (2007) Animal models concerning the role of dopamine in attention-deficit hyperactivity disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 31:597–618. doi:10.1016/j.neubiorev.2006.12.002
- Wallace MT, Meredith MA, Stein BE (1993) Converging influences from visual, auditory, and somatosensory cortices onto output neurons of the superior colliculus. *J Neurophysiol* 69:1797–1809
- Yassine N, Lazaris A, Damer-Ciossek C et al (2013) Detecting spatial memory deficits beyond Bindsch in tg2576 Alzheimer mice. *Neurobiol Aging* 34:716–730. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2012.06.016

Publication n°6

Jesse Jackson, Benedicte Amilhon, Romain Goutagny, **Jean-Bastien Bott**, Frederic Manseau, Christian Kortleven, Steven L. Bressler, & Sylvain Williams

**Reversal of theta rhythm flow through
intact hippocampal circuits.**

Nat Neurosci; manuscript accepté le 04/08/2014

Reversal of theta rhythm flow through intact hippocampal circuits

Jesse Jackson^{1,4}, Bénédicte Amilhon¹, Romain Goutagny², Jean-Bastien Bott², Frédéric Manseau¹, Christian Kortleven¹, Steven L. Bressler³ & Sylvain Williams¹

Activity flow through the hippocampus is thought to arise exclusively from unidirectional excitatory synaptic signaling from CA3 to CA1 to the subiculum. Theta rhythms are important for hippocampal synchronization during episodic memory processing; thus, it is assumed that theta rhythms follow these excitatory feedforward circuits. To the contrary, we found that theta rhythms generated in the rat subiculum flowed backward to actively modulate spike timing and local network rhythms in CA1 and CA3. This reversed signaling involved GABAergic mechanisms. However, when hippocampal circuits were physically limited to a lamellar slab, CA3 outputs synchronized CA1 and the subiculum using excitatory mechanisms, as predicted by classic hippocampal models. Finally, analysis of *in vivo* recordings revealed that this reversed theta flow was most prominent during REM sleep. These data demonstrate that communication between CA3, CA1 and the subiculum is not exclusively unidirectional or excitatory and that reversed inhibitory theta signaling also contributes to intrahippocampal synchrony.

The neural circuitry of the hippocampus is perhaps one of the most extensively studied systems in the brain¹. Hippocampal circuits have a known role in episodic memory function^{2,3} and serve as a model system for studying synaptic transmission and plasticity as a result of the well-described unidirectional organization of excitatory neurotransmission between hippocampal subfields^{4–7}. Both classic and modern anatomical studies have demonstrated the excitatory connections from CA3 to CA1 and from CA1 to the subiculum^{1,3–7}. Physiological evidence also supports this unidirectional excitatory sequence, particularly during hippocampal sharp waves^{8–10}. Theta rhythm synchronization between these regions is thought to be responsible for encoding and retrieval associated with episodic memory^{11–14}. Although theta rhythms are known to flow as a wave across the longitudinal (septo-temporal) axis^{15,16}, less is known regarding the organization of theta synchrony between regions. Thus, an understanding of how hippocampal regions communicate during theta-related brain states is paramount to understanding memory systems. It has been completely assumed that all rhythmic activity flows in a unidirectional manner from CA3 through CA1 to the subiculum. However, the hippocampal network is also made up of a variety of GABAergic interneurons that provide a complex pattern of connectivity that may regulate both forward and backward flow of activity between regions^{17–21}. We found, *in vitro* and *in vivo*, that theta rhythms in the subiculum synchronized activity in CA3, suggesting a previously unappreciated mechanism for long-range intrahippocampal communication.

RESULTS

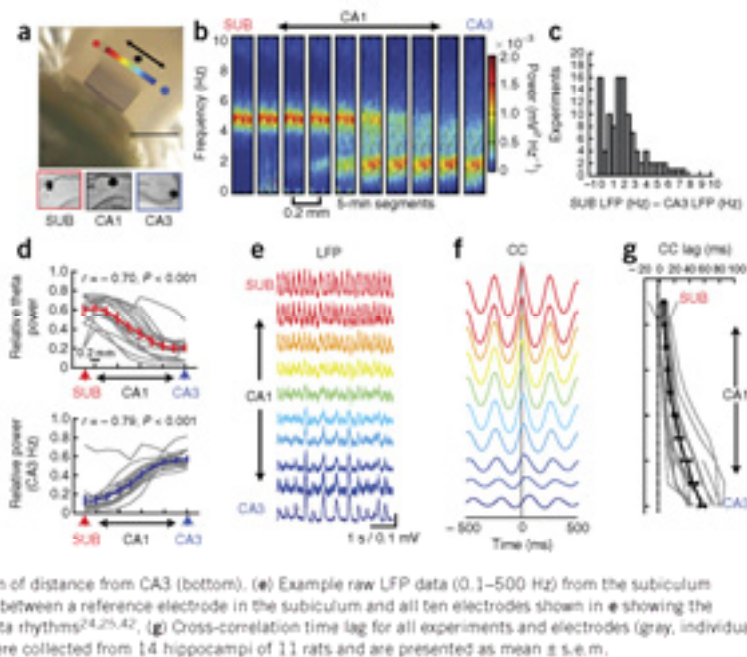
Two independent hippocampal oscillators

We investigated the dynamics of synchronization between CA3, CA1 and subiculum in an isolated hippocampus *in vitro* that contains an intact excitatory-inhibitory network²². We first measured the spontaneous network activity throughout the transverse hippocampal axis from CA3 to the subiculum using simultaneous multi-site local field potential (LFP; 4–14 channels) extracellular single/multi-unit and whole-cell recordings (Online Methods, Fig. 1a and Supplementary Fig. 1). Persistent, spontaneous theta rhythms were generated in the distal CA1 region and in the subiculum (mean \pm s.d. = 4.0 ± 1.5 ; range = 2–9.9 Hz; Fig. 1b,c)^{23,24} and decreased in amplitude toward CA3 (Fig. 1b,d). The theta power of the subicular oscillator decreased as function of distance from the subiculum ($n = 14$ hippocampi, $r = -0.7$, $P < 0.001$; Fig. 1d). Conversely, the CA3 region was found to simultaneously generate a slower network rhythm (mean \pm s.d. = 1.9 ± 0.9 Hz; range = 1–5 Hz; Fig. 1b–d), which decreased in amplitude as a function of distance from CA3 (power versus distance, $r = -0.79$, $P < 0.001$; Fig. 1d,e). Averaged across all experiments, the subicular oscillator frequency was significantly greater than that of CA3 ($n = 109$, $t_{108} = 13.2$, $P = 3.5 \times 10^{-25}$; Fig. 1c). Even in instances in which the peak LFP frequencies in the subiculum and CA3 were similar (<0.25 Hz different, 16 of 109 hippocampi), there was often a smaller slower peak visible in CA3 power spectra, indicative of a different intrinsic CA3 rhythm. The dominant oscillatory frequency of single-unit, multi-unit and

¹Department of Psychiatry, Douglas Mental Health University Institute, McGill University, Montréal, Québec, Canada. ²Laboratoire de neurosciences cognitives et adaptatives (LNCA)-CNRS UMR7364, Université de Strasbourg-CNRS, Strasbourg, France. ³Center for Complex Systems and Brain Sciences, Florida Atlantic University, Boca Raton, Florida, USA. ⁴Present address: Department of Biological Sciences, Columbia University, New York, New York, USA. Correspondence should be addressed to S.W. (sylvain.williams@douglas.mcgill.ca).

Received 8 April; accepted 7 August; published online 31 August 2014; doi:10.1038/nrn.3803

Figure 1 Two independent topographically organized oscillators in the subiculum and CA3. (a) A photomicrograph of the intact *in vitro* rat hippocampus with the multichannel horizontal probe lowered into the transverse axis of CA1 (depth = 200 μ m). Subiculum (SUB, red) and CA3 (blue) are shown on opposite ends of the probe. Filled circles in CA3, CA1 and the subiculum indicate the location of additional glass recording pipettes. Histological sections showing recording positions (dark points, pontamine blue) are shown below. Scale bar represents 1.6 mm. (b) Example LFP spectrograms recorded simultaneously from positions spanning CA3 to the subiculum using a horizontal 16-channel probe (8 channels used) and glass recording pipettes. Glass electrode recordings were made in the most extreme subicular and CA3 positions (far left and right spectrograms in a). (c) Histogram of the difference between subiculum and CA3 frequency for all experiments with LFPs ($n = 109$ from 73 rats). (d) The fraction of spectral power at theta frequencies decreases as a function of distance from the subiculum (top) and the fraction of spectral power at endogenous CA3 frequencies decreases as a function of distance from CA3 (bottom). (e) Example raw LFP data (0.1–500 Hz) from the subiculum (top) to CA3 (bottom). (f) The cross-correlation (CC) between a reference electrode in the subiculum and all ten electrodes shown in e showing the gradual phase shift toward CA3 similar to *in vivo* theta rhythms^{24,25,42}. (g) Cross-correlation time lag for all experiments and electrodes (gray, individual experiments; black, group mean). Data in d and g were collected from 14 hippocampi of 11 rats and are presented as mean \pm s.e.m.



postsynaptic potentials in both regions was not significantly different than their LFP frequency ($P > 0.05$; **Supplementary Fig. 1a–f**). Thus, the subicular network frequency was consistently greater than CA3 at the network, synaptic and spiking level (**Supplementary Fig. 1g**). Physically separating the subiculum and CA3 did not prevent oscillations in either region ($n = 6$; **Supplementary Fig. 2**), indicating that these regions generate independent and spatially distributed neural oscillations, often at different preferred frequencies.

Coupling and synchronization between oscillators

Despite the different oscillator frequencies, there was clear evidence these oscillators were communicating. As the entorhinal cortex and subcortical inputs to the hippocampus are removed, this communication must be arising from intrinsic hippocampal circuits. There was weak, but substantial, spectral coherence between the subiculum and CA3 (**Supplementary Fig. 2**), and a cross-correlation time lag between LFP oscillators of 57 ± 5 ms (**Fig. 1f,g**), similar to the temporal delay between CA1 and CA3 theta rhythms *in vivo*^{33,24,25}. However, these linear within-frequency measures do not accurately assess interactions between the two regions. Thus, the phase-phase coupling between the subiculum and CA3 LFP oscillators was measured to assess the high-order $n:m$ phase locking statistics (see Online Methods and refs. 26–29). In 83 of 95 experiments, the oscillators were significantly phase coupled, suggesting communication using frequency ratio locking ($P < 0.05$, **Fig. 2a,b** and **Supplementary Fig. 2**). This ratio locking has been described numerous times before in other systems of weakly coupled biological oscillators^{27–31}. With this form of phase locking, n cycles of one oscillator (1 CA3 cycle) occur for each m cycles of the other oscillator (3 SUB cycles, for 1:3 phase locking) and, in a two-oscillator system, the phase locking is produced through unidirectional or bidirectional phase perturbation^{27–29}. Extracellular single-unit and multi-unit recordings in the subiculum consistently showed spike phase modulation (SPM) on the rising phase of CA3 just before CA3 spiked in all frequency ratio regimes (81 of 95 significant experiments;

Fig. 2b). CA3 spikes were phase locked to the falling phase of the subicular LFPs ($56 \pm 42^\circ$, 81 of 95 experiments, $P < 0.05$) out of phase with local subicular spiking ($-45 \pm 21^\circ$, $P < 0.001$ difference in phase distribution; **Fig. 2b**), demonstrating cross-oscillator coupling at the cellular level. Not surprisingly, SPM and LFP phase coupling between oscillators all showed a logarithmic decrease as a function of the frequency difference between oscillators (**Supplementary Fig. 2**). Taken together, our data suggest that subicular and CA3 regions have independent oscillators with distinct properties, yet synchronize using oscillator phase locking. According to canonical models of hippocampal circuits, this synchronization is predicted to arise entirely from unidirectional excitatory outputs from CA3.

The subicular influence on CA3

The cross-correlation, time-lags and SPM data suggest that perhaps the subicular theta rhythms guide the intrinsic hippocampal circuits in CA3. To quantitatively assess the origin and directionality of this cross-region phase locking between spikes (multi-unit and single unit) and LFPs, we used an information theory-based approach to calculate the LFP offset (lead or lag) in which the SPM between the two oscillators were most synchronized, similar to previous reports^{32,33}. Contrary to canonical hippocampal circuit models, subicular LFPs were most phase locked to the future of CA3 spiking in 83% of all significantly phase-locked experiments (67 of 81) with a delay of 83 ± 14 ms (one-sample t test, $t_{80} = 5.94$, 6.94×10^{-8} greater than 0 ms; **Fig. 2c**), such that CA3 spike phase locking to the subicular theta rhythms was significantly delayed (not advanced) relative to subicular spikes (**Fig. 2c**). Likewise, CA3 LFPs were most phase locked to the past history of subicular spiking in 93% (75 of 81) of all significantly phase-locked experiments (-147 ± 15 ms, $t_{80} = 9.32$, $P = 2.1 \times 10^{-14}$, less than 0 ms; **Fig. 2d**), such that CA3 spikes again followed subicular spikes even when phase locking to the endogenous CA3 rhythm (**Fig. 2d**). In addition, cross-correlations between subicular and CA3 multi-unit/single-unit recordings also consistently peaked

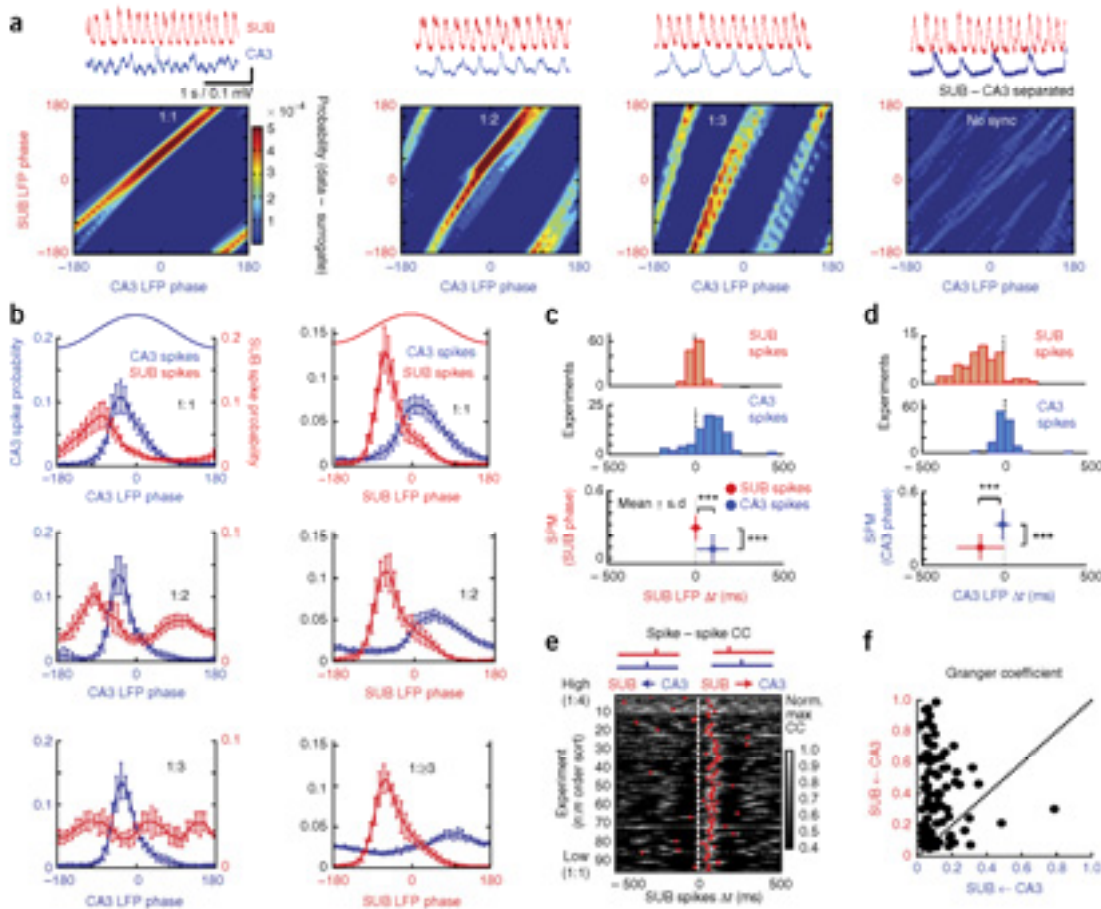
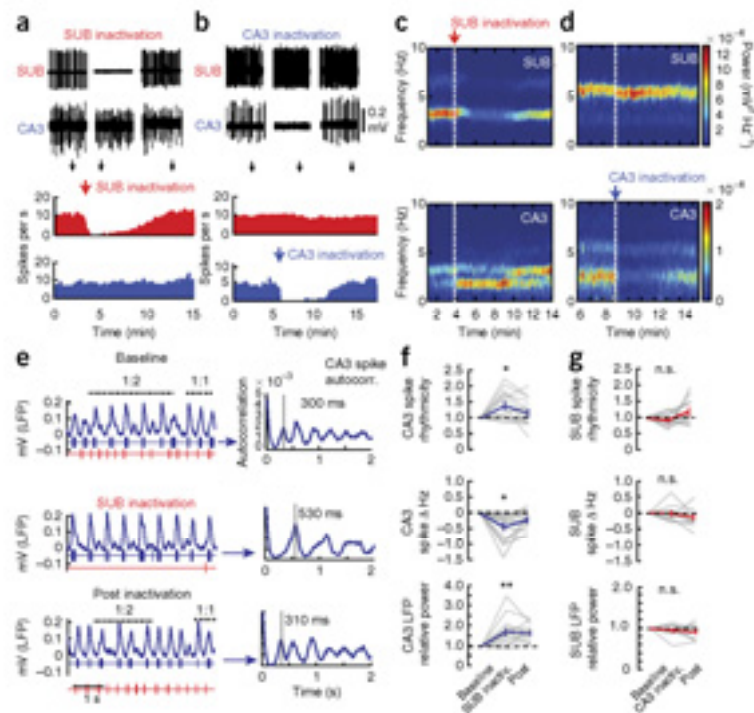


Figure 2 Phase coupling between oscillators is mediated by the subicular rhythms. **(a)** Raw LFP data (top) and joint LFP phase probability density plots (bottom) for representative experiments with different phase-locking regimes or non-phase-locked experiments (oscillators separated, far right). Diagonal bands indicate strong phase locking at different frequency ratios. **(b)** Spike-LFP probability density plots for preparations with 1:1 (top), 1:2 (middle) and 1:3 (bottom) phase locking using CA3 (left) or subicular LFP (right) as a reference. **(c, d)** SUB LFPs showed maximal SPM with the future spiking of CA3 (**c**, unpaired *t* test, $t_{1,74} = 6.01$, $P = 1.6 \times 10^{-6}$), whereas CA3 LFPs showed maximal SPM with the past history of spiking in the subiculum (top, **d**, unpaired *t* test, $t_{1,74} = 6.8$, $P = 10^{-10}$). Local spikes in both regions were phase locked to local LFPs at -0 ms (bottom histograms), whereas CA3 spikes followed the subiculum. **(e)** The subicular-CA3 spike cross-correlation (CC, normalized) for all experiments sorted according the frequency ratio between oscillators. The subicular spikes were shifted across CA3 spikes to find the time (Δt) at which the two spike trains were most correlated. Subicular spikes are most correlated with the future CA3 spike trains ($t_{94} = 11.47$, $P = 7.02 \times 10^{-19}$). **(f)** The peak GC coefficient between the subiculum and CA3 LFP pairs (paired *t* test, $t_{94} = 8.85$, $P = 5 \times 10^{-14}$; Online Methods). $N = 95$ hippocampi, 62 rats. Only significantly phase locked cases are plotted in **b-d**. Data are expressed as mean \pm s.e.m. in **b** and mean \pm s.d. in **c** and **d**. *** $P < 0.001$.

when shifting the subicular spike trains forward (75 ± 6 ms) in 89% of the significantly correlated experiments (76 of 85; **Fig. 2e**). Although cross-correlations often provide ambiguous information regarding directional interactions between oscillators, similar time delays were present across all frequency ratios ranging from 1:1 to 1:4, thereby providing a clear indication that the subicular oscillator was leading in all phase-locking regimes (**Fig. 2e**). Finally, Granger causality (GC) analysis also confirmed that the subiculum has a greater influence on the future activity in CA3 than CA3 has on the subiculum (**Fig. 2f** and **Supplementary Fig. 3**). Collectively, these results support the hypothesis that the subicular theta oscillator sets the timing for all endogenous hippocampal network activity through some previously undescribed form of reversed signaling.

To causally determine if activity in the subiculum influences CA3 activity, we locally inactivated neuronal activity in the subiculum using the sodium channel blocker procaine hydrochloride (1–3%; **Fig. 3**). Under the classic model of hippocampal circuit organization, subicular inactivation should have no influence on CA3. However, our analysis suggested otherwise. Subicular inactivation effectively reduced subicular spiking (9.1 ± 1.1 Hz baseline, 0.7 ± 0.3 Hz during procaine, $t_{12} = 7.35$, $P = 8.8 \times 10^{-6}$; 7.2 ± 0.8 Hz during recovery; **Fig. 3a**), and the power of subicular network LFP activity ($22 \pm 3\%$; $t_{15} = 6.98$, $P = 4.4 \times 10^{-6}$; baseline normalized to 100 percent; **Fig. 3c**). Consistent with the statistical results, subicular inactivation produced a rapid change in CA3 evidenced by an increase in spike train rhythmicity ($139 \pm 11\%$, $t_{15} = 3.5$, $P = 0.002$; **Fig. 3e,f** and Online Methods).

Figure 3 Subicular activity influences intrinsic CA3 rhythms more than CA3 influences the subiculum. **(a)** Simultaneously recorded spike trains (5 s) in both regions during baseline (left), subicular inactivation (middle) and recovery (right). Spike rate histograms are shown below (red, subiculum; blue, CA3). **(b)** Data are presented as in **a** for inactivation of CA3. **(c)** Representative spectrograms of LFPs recorded simultaneously from the subiculum (top) and CA3 (bottom) during subicular inactivation (red arrow). The CA3 rhythm became more regular and slower with subicular inactivation. **(d)** Data are presented as in **c** for CA3 inactivation. **(e)** Example CA3 LFPs, spike times and CA3 spiking autocorrelation (right) data showing subicular (red) and CA3 spike times (blue) together with CA3 LFPs. Note the CA3 changes that accompanied subicular silencing. **(f)** Quantification of CA3 spike train network frequency (top), spike rhythmicity (middle) and LFP peak power during subicular inactivation (gray lines, individual experiments; blue lines, group mean \pm s.e.m.). **(g)** Data are presented as in **f** for CA3 inactivation and subicular recordings. Although a slight increase in subicular theta power was observed in **d**, the effect was not statistically different at the group level. $N = 16$ hippocampi from 12 rats were used for data in **f** and 13 hippocampi from 11 rats were used in **g**. Data are expressed as mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, n.s. indicates not significant (top, $t = 1.69$, $P = 0.12$; middle, $t = 1.02$, $P = 0.32$; bottom, $t = 1.4$, $P = 0.18$; $n = 13$ hippocampi).

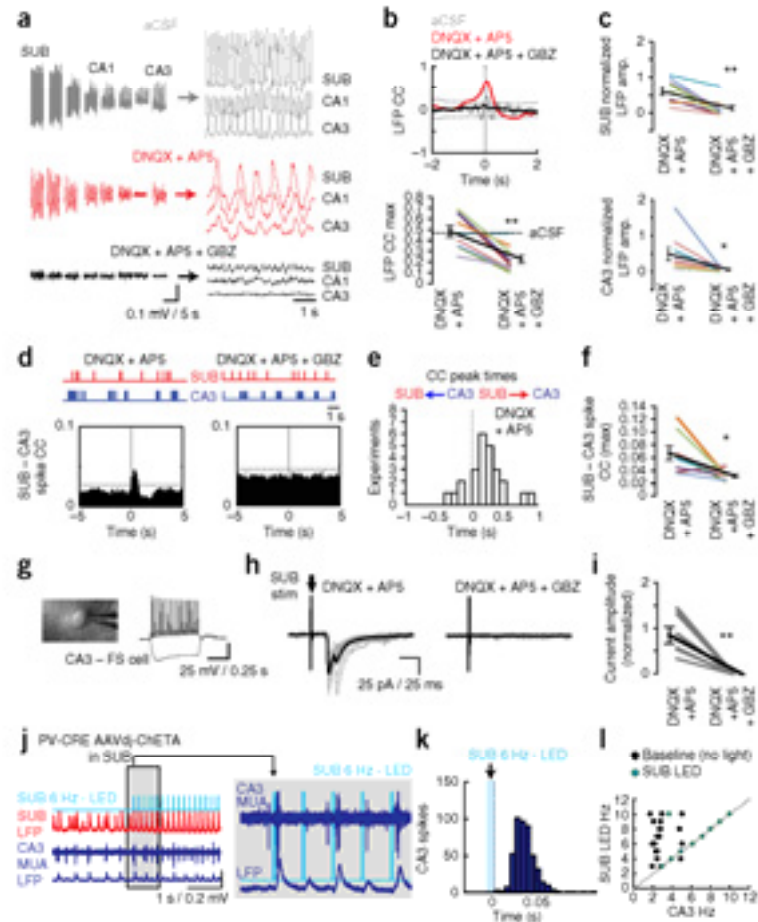


a decrease in the mean CA3 network frequency ($\Delta\text{Hz} = -0.43 \pm 0.11$ Hz, $t_{15} = 3.9$, $P = 0.001$) and an increase in CA3 LFP peak power ($167 \pm 16\%$ relative to baseline, $t_{15} = 3.95$, $P = 0.001$; Fig. 3c,f). The overall spike rate in CA3 was not altered by subicular inactivation (baseline, 10.8 ± 1.5 Hz; procaine, 11.2 ± 1.3 ; $P > 0.05$), demonstrating that the subiculum primarily influences CA3 spike timing. In some cases the effect on CA3 persisted past the washout of subicular inactivation, suggesting intrinsic CA3 excitatory collaterals were undergoing some form of network plasticity that was being suppressed by subicular activity under baseline conditions (Supplementary Fig. 4). The same inactivation procedure in CA3 reduced the peak power of CA3 rhythms as expected ($29 \pm 4\%$ relative to baseline, $t_{12} = -21.5$, $P = 6 \times 10^{-11}$; recovery = $0.74 \pm 0.07\%$; Fig. 3d), and reduced CA3 spiking (Fig. 3b), but did not alter the firing rate, the rhythmicity firing, the frequency of theta or the peak LFP power in the subiculum (all tests $P > 0.05$; Fig. 3d,g). Collectively, these data suggest that the subiculum significantly influences CA3 by modulating and interfering with the endogenous CA3 rhythms, whereas spontaneous activity in CA3 did not significantly affect spiking and network activity dynamics in subiculum. The lack of CA3 influence in the intact preparation was not a result of damage to CA3 outputs, as electrical stimulation of CA3 evoked time locked spikes in the subiculum at delays (20–40 ms, corresponding to a poly-synaptic excitatory relay through CA1; Supplementary Fig. 5). In experiments with CA1 recordings, subicular procaine reduced the faster theta component of the CA1 LFPs, and enhanced the slower rhythm, thus potentiating the coupling from CA3 to CA1 (Supplementary Fig. 6). GC results also show that under these conditions, the subiculum influences CA1 more than the reverse (Supplementary Fig. 6). Therefore, the theta rhythm influence from the subicular region appears to actively suppress rhythmic communication from CA3 to CA1.

GABAergic mechanisms involved in reversed activity flow

Although these results appear paradoxical, anatomical evidence has shown GABAergic interneurons that send backward projecting axons through hippocampal circuits^{19,21,34}. Thus, it is predicted that GABAergic mechanisms have a role in this reversed form of intra-hippocampal communication. Indeed, in the presence of ionotropic glutamate receptor antagonists (10–20 μM DNQX, 10–20 μM AP5), spontaneous slow (<1 Hz) LFP bursts were observed throughout the hippocampus³⁵, and spread from the subiculum to CA3 ($n = 6$ recordings with the multichannel probe; Fig. 4a). Although these network events were slower than theta frequencies, they displayed an amplitude topography that was nearly identical to that of the baseline LFPs in normal artificial cerebrospinal fluid (aCSF; $r > 0.9$, $P < 0.001$ for all cases). The amplitude of LFPs and subiculum-CA3 LFP cross-correlation were abolished by the GABA_A antagonist gabazine (GBZ/SR 95531, 5–10 μM , $n = 9$, $t_8 = 4.9$, $P = 0.001$, Fig. 4b,c), demonstrating that the network correlation between regions relied on GABAergic transmission. Under spontaneous isolated GABAergic conditions (with only DNQX and AP5), spike timing was significantly correlated between pairs of subiculum and CA3 spike multi-unit recordings (25 of 33 significant pairs; cc peak time = 195 ± 50 ms) and was abolished by the subsequent bath application of GBZ or bicuculline ($n = 8$, 0.07 ± 0.01 pre, 0.032 ± 0.002 post, $t_7 = 3.01$, $P = 0.02$; Fig. 4d–f). Subicular electrical stimulation (during bath-applied DNQX + AP5) evoked synaptic currents in CA3 putative pyramidal cells ($n = 3$) and interneurons ($n = 3$) that were abolished by bath application of GBZ ($n = 6/6$ cells with GABAergic responses tested, $t_5 = 4.63$, $P = 0.0057$; Fig. 4g–i and Supplementary Fig. 7). The latency between stimulation and the peak GABAergic current was found to be 10–25 ms (Supplementary Fig. 7). To further explore the nature of this GABAergic interaction, we optogenetically stimulated subicular

Figure 4 Reversed GABAergic synchronization between the subiculum and CA3. **(a)** Spontaneous LFPs simultaneously recorded in aCSF (top), DNQX + AP5 (middle) and DNQX + AP5 + GBZ (bottom). CsCl was added to the bath aCSF to increase interneuron excitability during glutamatergic blockade with DNQX and AP5 (ref. 35). Expanded traces are shown on the right. **(b)** Top, representative LFP cross-correlation (CC) for all conditions. Bottom, mean subicular-CA3 cross-correlation value for all experiments. **(c)** Mean normalized LFP amplitude (baseline aCSF = 1) for the subiculum (top) and CA3 (bottom) ($n = 9$ from 8 rats). **(d)** Subicular-CA3 spiking (top colored) are correlated during DNQX + AP5 (left), but abolished by DNQX + AP5 + GBZ. **(e)** Spike cross-correlation peak times for all significant experiments in DNQX + AP5 ($n = 33$, 18 rats). The distribution was shifted >0 s under isolated GABAergic conditions. **(f)** Group data for cross-correlation maximum values ($n = 8$, 6 rats). **(g, h)** An example putative CA3 fast-spiking interneuron during current injection for spike characterization (**g**), during glutamatergic blockade (DNQX + AP5; gray: individual trials, black: mean; **h**, left) and after glutamatergic + GABA_A blockade with SR95531 (GBZ, **h**, right). High Cl⁻ internal pipette solution was used for voltage-clamp recording; thus, outward currents were negative at -70 mV. **(i)** Group data from three pyramidal and three interneurons ($n = 6$, 5 rats). **(j)** Optogenetic stimulation (10-ms pulses at 6 Hz) of parvalbumin cells in the subiculum modulated the timing of CA3 spikes and network activity. **(k)** The LED-triggered spike histogram in CA3 for an example 30-s trial. **(l)** The preferred frequency of CA3 LFPs was linearly related to the frequency of the SUB LED stimulation. This effect was blocked by GBZ (Supplementary Fig. 10). Data in **l** are from 20 (30s) light trials with different frequencies ($n = 3$ hippocampi, 3 mice). Data are expressed as mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, paired *t* tests.



© 2014 Nature America, Inc. All rights reserved.

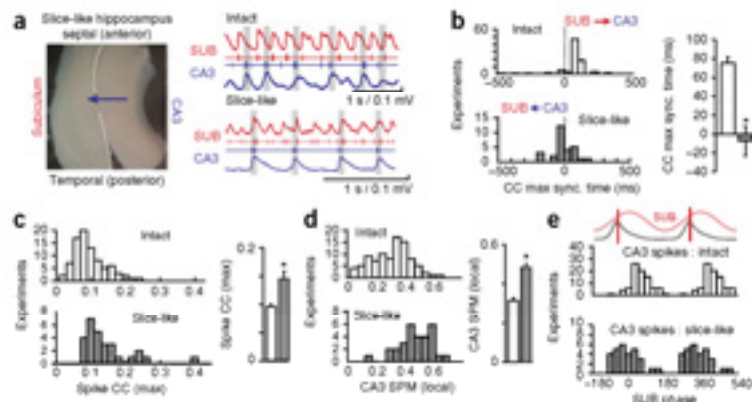
GABAergic neurons in PV-Cre or VGAT-Cre mice while recording LFPs and spikes in CA3 (Fig. 4j) and Online Methods). Optical activation of GABAergic subicular networks at theta frequencies entrained CA3 LFPs and spikes (3 of 3 preparations; Fig. 4k), confirming that GABAergic activity is involved in this reversed form of hippocampal interaction. The entrainment of CA3 networks by subicular activation (Fig. 4l) was abolished by GBZ (Supplementary Fig. 8). Collectively, these results suggest the presence of a previously unknown mechanism for cross-region synchronization using GABAergic in addition to classic glutamatergic transmission.

Reduced hippocampal preparations show classic directionality

These findings contradict current theories regarding the direction of activity flow in hippocampal circuits that predict that CA3 should influence the subiculum^{1,3,5,10}. Perhaps this difference is a result of the widespread use of hippocampal slices for studies of synaptic physiology. Thus, we created 'slice-like' preparations in which CA3 and subiculum oscillators were kept intact but could only interact through a thin lamellar pathway connecting CA3-CA1-subiculum, similar to a hippocampal slice (Fig. 5a). These preparations showed significant spike cross-correlations between the subiculum and CA3 in 28 of

30 experiments, similar to the intact hippocampus ($P < 0.05$, tested against the surrogate data set, Online Methods). In contrast with the intact hippocampus, slice-like preparations showed cross-correlations in which CA3 led the spiking in the subiculum in the majority of cases, consistent with classical hippocampal circuit models (61%, 17 of 28 experiments, compared with 11% in intact hippocampus, binomial test $z = 8.5$, $P = 6.5 \times 10^{-10}$; Fig. 5b-e). Thus, the peak of spike cross-correlation between regions was shifted to negative values (-7 ± 15 ms), significantly reduced relative to intact hippocampus (unpaired *t* test, $t_{131} = 5.6$, $P = 1.1 \times 10^{-7}$; Fig. 5b). In addition, the correlation magnitude was increased (intact, 0.096 ± 0.005 ; slice-like, 0.144 ± 0.014 ; $t_{131} = 4.1$, $P = 7.3 \times 10^{-5}$; Fig. 5c) and the phase locking between CA3 spikes and CA3 LFPs was also increased in slice-like preparations ($SPM_{\text{intact}} = 0.312 \pm 0.014$, $SPM_{\text{slice}} = 0.482 \pm 0.022$, $t_{120} = 6.2$, $P = 8.8 \times 10^{-9}$; Fig. 5d). CA3 spikes fired phase locked to an earlier phase of the subicular cycle in slice-like preparations (Fig. 5e), as expected from the cross-correlation data (Fig. 5b). Subicular spikes did not change their SPM to the local subicular of CA3 LFPs between the intact and slice-like preparations ($P > 0.05$). Peri-oscillation-triggered histograms (POTH) triggered on CA3-LFP peaks also showed the subiculum leading CA3 in the isolated hippocampus but showed

Figure 5 Slice-like hippocampi show forward flow from CA3 to the subiculum. **(a)** An image of the slice-like hippocampal preparation with cuts (dotted lines) made from the septal and temporal ends toward the mid-hippocampus to limit CA3-CA1-subicular connectivity to a thin conduit ~ 0.5 – 1 mm wide (blue arrow), similar to that in a hippocampal slice. Representative LFP and multi-unit spike timing is shown for an intact (top) and slice-like hippocampus. Note the out of phase firing in the intact hippocampus and the near in phase firing in slice-like experiments. **(b–d)** Histograms showing the comparison of cross-correlation (CC) lag **(b)**, maximum cross-correlation value **(c)** and CA3 LFP – CA3 spike phase locking **(d)** in intact (white) and slice-like (gray) hippocampi. Cross-correlation peak times were shifted from positive to negative values in the slice-like experiments relative to the intact hippocampus **(b)**. Spike cross-correlation maximum between regions was increased in slice-like experiments **(c)**. SPM between CA3 spikes and CA3 LFPs was increased in slice-like experiments **(d)**. **(e)** CA3 cells fired earlier in the subicular theta cycle in slice-like hippocampi ($P < 0.01$ Kuiper's test, CircStat toolbox). The gray curve above is the mean spike-phase distribution for subicular firing relative to local subicular LFPs (light red traces). The red lines indicate where subicular cells are most likely to fire. $N = 30$ hippocampi; 18 rats for slice-like experiments, intact hippocampi are the same ones shown in **Figures 1** and **2**. Only experiments with significant CA3-SUB correlations were used for analysis in **b,c** and **e** ($n = 28$). Data are presented as mean \pm s.e.m. * $P < 0.001$, unpaired t tests.



it following in the slice-like preparation (**Supplementary Fig. 9**). Finally, we found that, in intact preparations with global GABAergic blockade (GBZ + CGP46381 to block GABA_A), CA3 spontaneously led and synchronized the subiculum in the majority of cases ($n = 9$ of 11 significant SUB-CA3 paired recordings; **Supplementary Fig. 10**), consistent with the known feedforward excitatory connections. Collectively, these results suggest that a substantial GABAergic subicular output suppresses endogenous CA3 synchrony and restricts the ability of CA3 to synchronize local spiking and influence downstream CA1 and subiculum.

In vivo correlates of intrahippocampal oscillator interactions

To test whether similar intrahippocampal theta dynamics could be detected *in vivo*, we recorded LFPs from the subiculum, CA1 and CA3 during home cage (HC) locomotion, REM sleep and exposure to a novel open field (OF) environment (**Fig. 6a** and **Online Methods**) and quantified theta epochs (15–45 s of persistent theta). Data were pooled from a total of 136 HC, 134 REM sleep and 55 OF epochs in four rats. Averaged across all theta states, CA3 LFPs showed a peak frequency that was variable and switched between delta (3.2 ± 0.04 Hz) and theta frequencies (6.9 ± 0.1 Hz), whereas the subiculum consistently produced theta frequencies (**Fig. 6a–c**). The frequency of peak coherence between subiculum and CA3 (the network frequency) was not different from the peak subicular frequency (0.02 ± 0.3 Hz, $P > 0.05$) and was greater than the endogenous CA3 frequency (2.2 ± 0.4 Hz, $P < 0.001$), similar to *in vitro* data (**Fig. 6d**). This suggests that theta frequency communication between regions involves reversed theta flow rather than theta frequency CA3 outputs. In addition, *in vivo* CA3 exhibited periods of delta frequency LFPs similar to that observed *in vitro* (**Fig. 6d**). This subicular-CA3 frequency mismatch was larger during home cage behavior (SUB/CA3_{th} ratio = 1.7 ± 0.7 , mean \pm s.d.) than during REM sleep (1.2 ± 0.5) or novel OF (1.4 ± 0.08) (**Fig. 6e**). However, high-order coupling between CA3 delta peaks and subicular theta phase were most prominent during REM sleep (**Fig. 6f**) and absent during the novel OF (**Fig. 6g–i**), suggesting state-dependent theta interactions between regions.

Although the subiculum showed relatively stronger theta oscillations than CA3, CA3 showed a prominent slow gamma component in

the LFP spectrum (**Fig. 7a,b**), as reported previously^{36,37}, and strong CA3-subicular slow gamma coherence (**Supplementary Fig. 11**). Thus, we used GC^{38,39} analysis to determine whether there were state- and frequency-specific directionality interactions between the subiculum and CA3 (**Fig. 7c** and **Supplementary Fig. 12**). Averaged across all three theta states, 82% of epochs had a mean theta GC coefficient that was stronger in the subiculum \rightarrow CA3 direction than in the CA3 \rightarrow subiculum direction (**Fig. 7d–f**), whereas co-occurring slow gamma GC was stronger in the CA3 \rightarrow subiculum than in the subiculum \rightarrow CA3 direction in 88% of theta epochs (**Fig. 7c–f**). These same theta and gamma GC trends were observed in all states (**Fig. 7e**), although subtle state-dependent changes in the degree of GC influence were noted. Specifically, the reversed theta GC was stronger during REM (0.37 ± 0.01) than during HC (0.30 ± 0.01) or novel OF exploration (0.31 ± 0.02 , $P < 0.001$ for each unpaired t test; **Fig. 7f**), whereas the gamma frequency coherence and gamma GC from CA3 \rightarrow subiculum were reduced during REM relative to HC, suggesting an antagonistic relationship between theta and gamma frequency bands (**Fig. 7g**). Notably, during REM sleep, there was an increase in CA3 and subicular theta power, a decrease in CA3 delta power, an increase in CA3-subicular theta coherence, a decrease in CA3-subicular gamma coherence and an increase in CA3 delta-subicular theta coupling (**Figs. 6f** and **7f**, and **Supplementary Fig. 11**). These data complement our *in vitro* results (**Fig. 3**), where inactivation of the subiculum shifted the CA3 network to a slower, more dominant delta state. Thus, it seems that the presence of a strong subicular theta influence (*in vitro* or during REM) increases CA3 theta rhythms and shifts the network as close as possible to a 1:1 phase locking regime. When theta in the subiculum is reduced (either via inactivation *in vitro* or through brain state changes *in vivo*), the delta frequency component in CA3 is revealed, resulting from reduced interference from the faster theta rhythm.

Finally, preliminary evidence suggests there can be cross-frequency directional interactions, in which gamma amplitude in CA3 can influence the future dynamics of subicular theta phase and, inversely, subicular theta can influence the timing of CA3 gamma amplitude (**Supplementary Fig. 13**). However, a detailed analysis of these cross-frequency, cross-regional dynamics will require future experiments

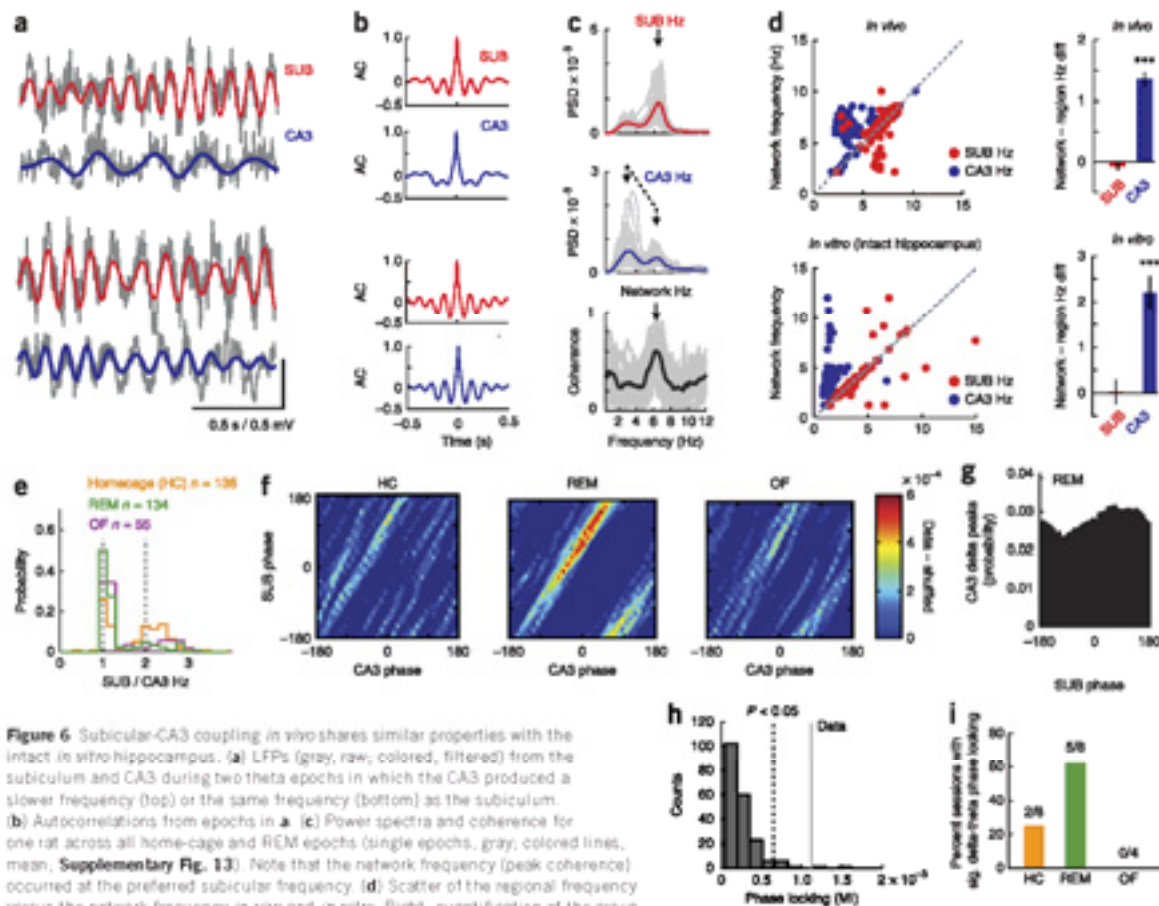


Figure 6 Subicular-CA3 coupling *in vivo* shares similar properties with the intact *in vitro* hippocampus. **(a)** LFPs (gray, raw; colored, filtered) from the subiculum and CA3 during two theta epochs in which the CA3 produced a slower frequency (top) or the same frequency (bottom) as the subiculum. **(b)** Autocorrelations from epochs in **a**. **(c)** Power spectra and coherence for one rat across all home-cage and REM epochs (single epochs, gray; colored lines, mean; **Supplementary Fig. 13**). Note that the network frequency (peak coherence) occurred at the preferred subicular frequency. **(d)** Scatter of the regional frequency versus the network frequency *in vivo* and *in vitro*. Right, quantification of the group differences. **(e)** The subicular/CA3 peak frequency ratio was bimodal during HC theta, but less so during REM and exploration of a novel OF ($t_{268} = 6.22$, $P = 1.9 \times 10^{-9}$, HC - REM, $t_{99} = 2.9$, $P = 0.004$ HC - OF). **(f)** Example joint LFP phase probability density plot for entire sessions in different theta states. **(g)** Example quantification of coupling between CA3 delta peaks and subicular theta phase showing a non-uniform phase distribution indicating phase locking. **(h)** The phase modulation index of the data shown in **g** is compared with the distribution of surrogate time-shifted data. The dashed line represents the significance threshold ($P < 0.05$) and the gray line represents the data modulation index. **(i)** The percentage of sessions with significant CA3 delta-subicular theta coupling. For **d**: *in vivo*, $t_{24} = 11.8$, $P = 5.65 \times 10^{-27}$; *in vitro*, $t_{94} = 9.2$, $P = 1.18 \times 10^{-14}$, paired *t* tests). Data are pooled from 4 rats. *** $P < 0.001$.

with a more controlled task to assess the behavioral correlates of coupling direction. In conclusion, the dynamics of intrahippocampal communication are not likely controlled through classically described unidirectional connectivity. Instead, bidirectional multi-frequency interactions likely control the level of state-dependent forward (CA3→subiculum) or reversed (subiculum→CA3) hippocampal communication *in vivo*.

DISCUSSION

Communication between CA3, CA1, and subiculum is traditionally thought to arise from unidirectional excitatory synaptic transmission¹. However, in the intact isolated hippocampus shown here, spontaneous theta rhythms in the subiculum set the temporal dynamics of network activity in CA3, demonstrating a previously undescribed form of reversed intra-hippocampal theta rhythm signaling. The subiculum appeared to alter the timing of CA3 spiking, and by doing so restricted CA3 neuron firing such that LFP amplitude and spike rhythmicity was

suppressed. This decreased population synchrony likely decreases the coordination of CA3 firing and thereby limits the ability of CA3 to influence downstream CA1 and subiculum. The reversed signaling was a result, at least in part, of GABAergic influences, in accordance with anatomical work showing long-range GABAergic feedback from CA1/subiculum to CA3 (refs. 21,40). This GABAergic signaling likely explains the large time lag between subicular and CA3 spiking, as CA3 spiking would occur only following the recovery from this long-range inhibition. Although these results are contrary to current theory regarding activity flow in the hippocampus¹, we observed the classic form of CA3-mediated excitatory synchronization of CA1 and subiculum when we used hippocampal slice-like preparations. Finally, *in vivo* recordings suggested that this reversed theta influence operates in the majority of theta epochs *in vivo*, and especially during REM sleep, to govern the timing of theta and spiking within CA3. These data collectively suggest that intra-hippocampal communication between subregions can arise from at least two independent

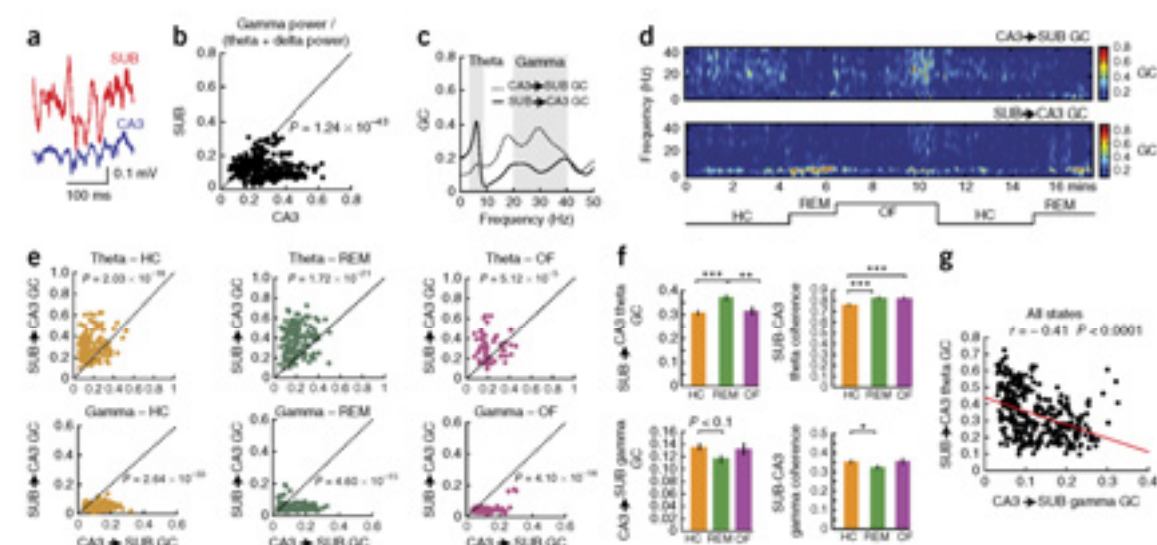


Figure 7 Bidirectional communication between regions using theta and gamma rhythms. (a) Raw data (0.5–400 Hz) showing a burst of gamma rhythm coordination between the subiculum and CA3. (b) The ratio of gamma power to low frequencies (theta + delta) was larger in CA3 ($t_{30,4} = 16.2$, $P = 1.24 \times 10^{-13}$). (c) An example GC spectrum for a 30-s epoch of persistent theta while in the home cage. (d) Theta epochs during HC, REM sleep and exploration of an OF concatenated for one rat to show the changing GC dynamics across states. (e) Group data showing theta GC (top) and gamma GC (bottom) for all states. Each point represents the mean GC value from a single data epoch, and all epochs and animals are shown. (f) Group data for SUB→CA3 theta and gamma GC and coherence during REM, HC and OF (mean \pm s.e.m. are shown in **Supplementary Fig. 11**). (g) Scatter plot showing the negative linear relationship between SUB→CA3 theta GC and CA3→SUB gamma GC across states. Data in e–g are from 136 home cage theta epochs, 134 REM epochs and 55 OF epochs, and pooled from 4 rats. For f, top left, $t = 4.2$, $P = 3.7 \times 10^{-5}$ (HC versus REM), and $t = 2.6$, $P = 0.0097$ (OF-REM); top right, $t = 4.6$, $P = 5.6 \times 10^{-6}$ (HC-REM), and $t = 3.6$, $P = 4.1 \times 10^{-5}$ (HC versus OF); bottom left, $t = 2.2$, $P = 0.07$ with Bonferroni correction (HC-REM); bottom right, $t = 2.6$, $P = 0.01$ (HC versus REM). *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

lines: forward (from CA3 to the subiculum) and reversed (from the subiculum to CA3) using predominantly excitatory and inhibitory mechanisms, respectively.

This form of reversed hippocampal signaling has likely gone undocumented for several reasons. First, hippocampal circuit investigations commonly use hippocampal slices that sever important intrahippocampal connections and, as we found, would eliminate the reversed form of communication. Second, *in vivo* hippocampal-circuit studies rarely record activity simultaneously from the subiculum, CA1 and CA3, instead focusing either on a subicular-CA1 interaction^{34,41–43} or CA3-CA1 interactions^{25,36,37}. In our *in vivo* LFP data, the GC was consistently greater in the subicular/CA1→CA3 direction than in the forward CA3→CA1/subiculum direction. However, gamma rhythms showed the opposite direction preference, consistent with gamma in CA3 synchronizing hippocampal outputs regions^{44–46}. These data suggest that CA3 provides primarily gamma, rather than theta, frequency outputs. Although the *in vivo* GC analysis provides support for our *in vitro* results, the analysis does not take into account input from the entorhinal or medial septum that could provide a common timing signal to the subiculum and CA3 with different delays, potentially influencing the directional coefficients. Despite these caveats, the similarities between our *in vitro* and *in vivo* data suggest that this reversed theta signaling is important for hippocampal function. Future experiments specifically manipulating *in vivo* circuits will be required to investigate the function of this form of communication and the degree to which it regulates hippocampal dynamics in the intact animal.

This reversed GABAergic signaling appears to limit and govern the timing of CA3 cell and network activity. Notably, previous studies using single-neuron recordings *in vivo* have shown that the spiking

and LFP time lags between CA3 and CA1/SUB occur with a similar temporal offset as described by our *in vitro* data^{15,25,47}. During phase precession, CA3 and CA1 place cell assemblies are phase shifted by ~ 60 ms^{14,47}. Perhaps this reversed signaling is involved in allowing independent processing of mnemonic information in each region during theta related behaviors^{36,37}. At the local circuit level, further questions arise. For example, what role does CA1 have in relaying this theta signal back to CA3, and to what degree does this mechanism operate when the hippocampus is perturbed by oscillators in the medial septum and entorhinal cortex? Interestingly, a recent rabies-based tracing study has shown that both pyramidal cells and interneurons in CA1 receive substantial excitatory and inhibitory subicular inputs⁴⁸, supporting the hypothesis that an intrahippocampal network operates backward relative to the classic CA3-CA1-subiculum pathway. Future work using conditional transgenic mouse lines⁴⁹, together with optogenetic activation and silencing, will help to fully explain the mechanism and function underlying this alternative, but seemingly powerful, form of rhythmic hippocampal communication.

In conclusion, our data provide (to the best of our knowledge) the first evidence of reversed hippocampal communication in which rhythmic network activity in the subiculum can influence and synchronize activity in CA1 and CA3. These results challenge the canonical model of hippocampal circuit organization and suggest that communication between CA3, CA1 and subiculum is not exclusively unidirectional or excitatory.

METHODS

Methods and any associated references are available in the [online version of the paper](#).

Note: Any Supplementary Information and Source Data files are available in the online version of the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to M. Sievers and the Integrated Program in Neuroscience at McGill for the continued support and encouragement and G. Ducharme for comments on the project and manuscript. This work was supported by the Canadian Institute of Health Research and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). It was supported by the Ann and Richard Sievers Innovation in Neuroscience award, the Sir James Loughheed Award of Distinction from the Government of Alberta, and the NSERC Michael Smith award. B.A. was a recipient of Pysen and Fonds de la Recherche en Santé du Québec postdoctoral fellowships. R.G. was supported by the Projet International de Coopération de Scientifique from CNRS and a Marie-Curie reintegration grant from the European Research Council.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

II, R.G. and S.W. designed the project. II and R.G. collected *in vitro* data. B.A. designed and carried out the optogenetic experiments. R.G. and I.B.-B. performed the *in vivo* experiments. EM. collected electrophysiological and pharmacological data. C.K. collected optogenetic data. S.L.B. assisted in data analysis and interpretation. II analyzed the data. II and S.W. wrote the paper.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

- Andersen, P., Morris, R.M., Amaral, D.G., Bliss, T. & O'Keefe, J. *The Hippocampus Book* (Oxford University Press, 2007).
- Squire, L.R. & Zola-Morgan, S. The medial temporal lobe memory system. *Science* **253**, 1380–1389 (1991).
- Amaral, D.G., Dolorico, C. & Alvarez-Royo, P. Organization of CA1 projections to the subiculum: a PHAL analysis in the rat. *Hippocampus* **1**, 415–425 (1991).
- Andersen, P., Blackstad, T.W. & Lomo, T. Location and identification of excitatory synapses on hippocampal pyramidal cells. *Exp. Brain Res.* **1**, 236–248 (1966).
- Lu, X.G., Somogyi, P., Yin, A. & Buzsáki, G. The hippocampal CA3 network: an *in vivo* intracellular labeling study. *J. Comp. Neurol.* **339**, 181–208 (1994).
- Ishizuka, N., Weber, J. & Amaral, D.G. Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J. Comp. Neurol.* **295**, 580–623 (1990).
- Blackstad, T.W. Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. *J. Comp. Neurol.* **105**, 417–527 (1956).
- Chrobak, J.J. & Buzsáki, G. High-frequency oscillations in the output networks of the hippocampal-entorhinal axis of the freely behaving rat. *J. Neurosci.* **16**, 3056–3066 (1996).
- Behrens, C.J., van den Boom, L.P., de Hoz, L., Friedman, A. & Heinemann, U. Induction of sharp wave-ripple complexes *in vitro* and reorganization of hippocampal networks. *Nat. Neurosci.* **8**, 1560–1567 (2005).
- Both, M., Bahner, F., von Bohlen und Halbach, O. & Draguhn, A. Propagation of specific network patterns through the mouse hippocampus. *Hippocampus* **18**, 899–908 (2008).
- Rolls, E.T. & Kesner, R.P. A computational theory of hippocampal function, and empirical tests of the theory. *Prog. Neurobiol.* **79**, 1–48 (2006).
- Buzsáki, G. The hippocampo-neocortical dialogue. *Cereb. Cortex* **6**, 81–92 (1996).
- Marr, D. Simple memory: a theory for archicortex. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **262**, 23–81 (1971).
- Hasselmo, M.E., Bodelon, C. & Wyble, B.P. A proposed function for hippocampal theta rhythm: separate phases of encoding and retrieval enhance reversal of prior learning. *Neural Comput.* **14**, 790–817 (2002).
- Patel, J., Fujisawa, S., Berenyi, A., Royer, S. & Buzsáki, G. Traveling theta waves along the entire septotemporal axis of the hippocampus. *Neuron* **73**, 410–417 (2012).
- Lubenov, E.V. & Sapiro, A.G. Hippocampal theta oscillations are traveling waves. *Nature* **439**, 534–539 (2009).
- Amaral, D.G. & Witter, M.P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* **31**, 571–591 (1989).
- van Strien, N.M., Cappaert, N.L. & Witter, M.P. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 272–282 (2009).

- Sik, A., Yin, A., Penttonen, M. & Buzsáki, G. Inhibitory CA1–CA3– hilar region feedback in the hippocampus. *Science* **265**, 1722–1724 (1994).
- Klausberger, T. & Somogyi, P. Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* **321**, 53–57 (2008).
- Gulyás, A.I., Hajos, N., Katona, I. & Freund, T.F. Interneurons are the local targets of hippocampal inhibitory cells which project to the medial septum. *Eur. J. Neurosci.* **17**, 1863–1872 (2003).
- Goutagny, R., Jackson, J. & Williams, S. Self-generated theta oscillations in the hippocampus. *Nat. Neurosci.* **12**, 1491–1493 (2009).
- Jackson, J., Goutagny, R. & Williams, S. Fast and slow gamma rhythms are intrinsically and independently generated in the subiculum. *J. Neurosci.* **31**, 12104–12117 (2011).
- Brand, B.H. & Whistler, J.G. Generators and topography of hippocampal theta (PTA) in the anesthetized and freely moving rat. *Brain Res.* **118**, 259–280 (1976).
- Montgomery, S.M., Belancur, M.I. & Buzsáki, G. Behavior-dependent coordination of multiple theta dipoles in the hippocampus. *J. Neurosci.* **29**, 1281–1294 (2009).
- Schäfer, C., Rosenblum, M.G., Kurths, J. & Abel, H.H. Heartbeat synchronized with ventilation. *Nature* **392**, 239–240 (1999).
- Tass, P. et al. Detection of *n:m* phase locking from noisy data: application to magnetoencephalography. *Phys. Rev. Lett.* **81**, 3297–3294 (1998).
- deGuzman, G.C. & Kelso, J.A. Multifrequency behavioral patterns and the phase attractive circle map. *Biol. Cybern.* **64**, 485–495 (1991).
- Palva, J.M., Palva, S. & Kaila, K. Phase synchrony among neuronal oscillations in the human cortex. *J. Neurosci.* **25**, 3962–3972 (2005).
- Fujisawa, S. & Buzsáki, G. A 4 Hz oscillation adaptively synchronizes prefrontal, VTA and hippocampal activities. *Neuron* **72**, 153–165 (2011).
- Nadim, F., Manor, Y., Nusbaum, M.P. & Marder, E. Frequency regulation of a slow rhythm by a fast periodic input. *J. Neurosci.* **18**, 5053–5067 (1998).
- Szapot, A.G., Lubenov, E.V. & Wilson, M.A. Prefrontal phase locking to hippocampal theta oscillations. *Neuron* **46**, 141–151 (2005).
- Hangya, B., Borhegyi, Z., Szilágyi, N., Freund, T.F. & Varga, V. GABAergic neurons of the medial septum lead the hippocampal network during theta activity. *J. Neurosci.* **29**, 8094–8102 (2009).
- Desaiyer, S.A. & Hampson, R.E. Differential but complementary mnemonic functions of the hippocampus and subiculum. *Neuron* **42**, 465–476 (2004).
- Zhang, Y. et al. Slow oscillations (δ 1 H δ) mediated by GABAergic interneuronal networks in rat hippocampus. *J. Neurosci.* **18**, 9256–9268 (1998).
- Lee, I., Rao, G. & Kierkm, J.J. A double dissociation between hippocampal subfields: differential time course of CA3 and CA1 place cells for processing changed environments. *Neuron* **42**, 803–815 (2004).
- Leutgeb, S., Leutgeb, J.K., Treves, A., Moser, M.B. & Moser, E.I. Distinct ensemble codes in hippocampal areas CA3 and CA1. *Science* **305**, 1295–1298 (2004).
- Browell, A. et al. Beta oscillations in a large-scale sensorimotor cortical network: directional influences revealed by Granger causality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 9849–9854 (2004).
- Cui, J., Xu, L., Bressler, S.L., Ding, M. & Liang, H. BSMART: a Matlab/C toolbox for analysis of multichannel neural time series. *Neural Netw.* **21**, 1094–1104 (2008).
- Sik, A., Penttonen, M., Yin, A. & Buzsáki, G. Hippocampal CA1 interneurons: an *in vivo* intracellular labeling study. *J. Neurosci.* **15**, 6651–6665 (1995).
- Chang, E.H. & Huerta, P.T. Neurophysiological correlates of object recognition in the dorsal subiculum. *Front. Behav. Neurosci.* **6**, 46 (2012).
- Commins, S., Aggleton, J.P. & O'Mara, S.M. Physiological evidence for a possible projection from dorsal subiculum to hippocampal area CA1. *Exp. Brain Res.* **146**, 155–160 (2002).
- Kim, S.M., Ganguli, S. & Frank, L.M. Spatial information outflow from the hippocampal circuit: distributed spatial coding and phase precession in the subiculum. *J. Neurosci.* **32**, 11539–11558 (2012).
- Montgomery, S.M. & Buzsáki, G. Gamma oscillations dynamically couple hippocampal CA3 and CA1 regions during memory task performance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 14495–14500 (2007).
- Montgomery, S.M., Svota, A. & Buzsáki, G. Theta and gamma coordination of hippocampal networks during waking and rapid eye movement sleep. *J. Neurosci.* **28**, 6731–6741 (2008).
- Colgin, L.L. et al. Frequency of gamma oscillations routes flow of information in the hippocampus. *Nature* **462**, 353–357 (2009).
- Dragoi, G. & Buzsáki, G. Temporal encoding of place sequences by hippocampal cell assemblies. *Neuron* **50**, 145–157 (2006).
- Sun, Y. et al. Cell type-specific circuit connectivity of hippocampal CA1 revealed through cre-dependent rabies tracing. *Cell Reports* **7**, 269–280 (2014).
- Nakajima, T., Young, J.Z., McHugh, T.J., Boni, D.L. & Tonegawa, S. Transgenic inhibition of synaptic transmission reveals role of CA3 output in hippocampal learning. *Science* **319**, 1260–1264 (2008).

ONLINE METHODS

The intact hippocampal preparation. All procedures were performed according to protocols and guidelines approved by the McGill University Animal Care Committee and the Canadian Council on Animal Care. Prior to experiments, animals were housed under a 12-h/12-h light/dark cycle. Experiments were performed during the light cycle. Male and female Sprague-Dawley rats (P15–21) were decapitated and the brain was rapidly removed from the skull and placed in ice-cold high-sucrose aCSF solution (252 mM sucrose, 3 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 24 mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄, 1.2 mM CaCl₂, and 10 mM glucose) and bubbled with carbogen (95% O₂ and 5% CO₂). The isolated hippocampi from each hemisphere were removed from the remainder of the brain tissue as described previously²². This procedure removed subcortical and cortical afferent inputs to the hippocampus while keeping all intrinsic hippocampal circuits intact. For the experimental recordings the hippocampi were placed in a custom submerged chamber and perfused using a high-flow paradigm (18–20 ml min⁻¹) with normal aCSF (containing 126 mM NaCl, 24 mM NaHCO₃, 10 mM glucose, 4.5 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 1.25 mM NaH₂PO₄, and 2 mM CaCl₂; pH 7.4, with 95% O₂/5% CO₂) via a gravity fed perfusion system and maintained at 30–32 °C. The baseline data for network activity in the intact hippocampus is summarized from 14 preparations using only LFPs (10–12 channels), 95 preparations with LFPs and single units (3–6 channels), and 26 preparations with whole-cell recordings in either CA3 or the subiculum during spontaneous network rhythms (no pharmacology). Additional preparations were used for oscillator separation (*n* = 6), slice-like experiments (*n* = 30), and isolated GABA (*n* = 39 for LFPs and multi-unit, *n* = 15 for whole-cell recording) and isolated glutamate (*n* = 11) experiments.

LFP and spike recording. LFPs and single- and multi-unit activity were recorded using glass electrodes and silicon probes. The data used for analysis was restricted to that recorded between 45–120 min following the time the hippocampus was placed in the chamber. To simultaneously record the activity in the transverse hippocampal plane (SUB to CA3), we used a 16-channel horizontal probe (Neuronexus), which was lowered into the intermediate hippocampus perpendicular to the long axis of the hippocampus to record activity across CA1 from the subiculum to CA3. Only 8–12 channels of the probe were digitized due to space on the 16-channel analog-to-digital converter and the need to record additional LFP and multi-unit recordings (MUA) data from glass pipettes. The probe was moved slowly into the tissue to a depth corresponding to stratum radiatum where the LFP recordings were made. Separate glass pipettes were used to record single-unit and MUA from the pyramidal layer from each region. Signals were amplified (A-M systems and Plexon), filtered (0.1–500 Hz for LFPs, 0.1–5 kHz for spikes), digitized (5–20 kHz) and stored for analysis offline. Aside from the recordings performed across the transverse axis of CA1, the majority of recordings were performed in CA3a/b and the proximal subiculum. The proximal subiculum appeared to share the same properties of theta rhythm generation as the nearby distal CA1 (refs. 22,23). However, we found more units with higher firing rate in the subiculum, so we restricted our recording mainly to this region. Single units and MUA were performed in both regions. All units were filtered (>250 Hz) and spikes were detected by threshold crossing (>4.5 s.d. above baseline). Single-unit recordings were identified as those in which no spikes occurred in the 1- and 2-ms bins of the interspike interval histogram. The majority of cells were pyramidal cells from each region, as identified by spike width, often high-frequency bursting and phase locking on the rising phase of the locally generated rhythm as shown previously in this preparation²². In cases in which multiple single neurons were recorded simultaneously during the same experiment (usually 2–3 neurons), spike times from all neurons were used in the analysis but only entered into the statistical analysis as a single experiment.

Intracellular recording. Whole-cell recordings in the subiculum and CA3 during spontaneous rhythms were performed using the blind patch technique as described previously²⁰. Data from the subicular cells were recorded for a previous study²⁷ and reanalyzed here. Pipettes were pulled using borosilicate glass with a resistance of 3–8 MΩ when filled with 144 mM potassium gluconate, 3 mM MgCl₂, 0.2 mM EGTA, 10 mM HEPES, 2 mM ATP and 0.3 mM GTP, pH 7.2 (285–295 mOsm). Recordings were performed using a patch-clamp amplifier PC-505A (Warner Instruments). Cell characterization was performed by injecting 0–100-pA, 2-s-long, depolarizing and hyperpolarizing current steps.

For experiments with subicular stimulation, whole-cell patch-clamp recordings were performed on visually identified CA3 neurons from hippocampal preparations after performing a transverse cut (45° angle) to expose cell layers. Patch electrodes were filled with a high-chloride intrapipette solution containing 70 mM potassium gluconate, 70 mM KCl, 2 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 1 mM EGTA, 4 mM MgATP and 0.3 mM Na₂GTP, pH 7.3 (290 mOsm). The estimated E_{Cl} was approximately -17 mV based on the Nernst equation, without correction for liquid junction potential. Stimulation was performed using single-current pulses (0.1–0.3 ms, 50–300 μA) delivered every 12 s with a A360 stimulus isolator (WPI) through a bipolar stimulating electrode (tungsten wire, FHC) placed in the subiculum. DNQX and AP5 were added to identify GABAergic currents, after stable recordings were obtained.

Spike cross-correlation analysis. For each experiment, 3–10 min of spontaneous data were analyzed (*n* = 95, CA3 = 2,213 ± 164 spikes per experiment, subiculum = 2,185 ± 168). To perform the cross-correlation between spike trains, we first binned spike times in 5-ms bins creating a vector of spike counts as a function of time for both SUB and CA3 data. Next the sliding dot product of the two vectors (*x* and *y*) was calculated at time points ($\tau = -1$ to 1 s in 5-ms, 1-bin steps) giving the cross-correlation at every lag

$$CC(\tau) = \frac{\sum_i x_i y_{i+\tau}}{\sqrt{\sum_i x_i^2 \cdot \sum_i y_i^2}}$$

Here the numerator expresses the dot product of the two vectors and the denominator denotes the product of the Euclidean length of both vectors used to normalize the maximum value of the cross-correlation to 1. The CC was calculated at 401 points by shifting the SUB vector in both the negative and positive directions. Maximal values in the positive range suggest that spike synchrony occurs because the subiculum is influencing CA3 after some time delay, whereas peaks at negative time lags suggest that CA3 is influencing the timing of SUB spikes after some delay. We are aware of the dangers of relying on cross-correlations to infer directional interactions, so other analyses (below) were also performed.

Spike-LFP phase modulation (SPM). To test if a neuron was significantly modulated by the phase of the ongoing oscillation in either region, we first band-pass filtered the LFP in a ±1.5-Hz range centered on the dominant frequency of the oscillation and the phase of the oscillation was determined using the Hilbert transform (Matlab). Every spike time was assigned a phase value indexed from the Hilbert transform. For each experiment, a spike-phase probability density function was generated using 36 phase bins range from -180 to +180 degrees. We wanted to know whether a spike fires phase locked to the LFP. However, due to the fact that the LFPs have phase asymmetries, their phase values are not uniformly distributed. Specifically, LFPs recorded in the molecular layer of the subiculum and stratum radiatum of CA3 were asymmetric with large troughs (near -180 and +180 in this study). Thus, even randomly generated artificial spike trains will be non-uniformly distributed and give the impression of phase locking. To correct for LFP asymmetry, we calculated the divergence between the spike-LFP phase distribution (*P*) and the LFP phase distribution itself (*Q*) using the Kullback-Leibler divergence

$$D_{KL} = \sum_{j=1}^N P_j \log \left[\frac{P_j}{Q_j} \right]$$

where *n* = 36 phase bins and *P_j* and *Q_j* are values of the probability distributions (*P* and *Q*) in phase bins *j*. This *D_{KL}* assumes a value ≥0, where 0 indicates the two distributions are equal. This difference is normalized by entropy of the distribution of *Q*

$$H_q = - \sum_{j=1}^N Q_j \log Q_j$$

The normalized measure of SPM is then expressed as $SPM = D_{KL} / H_q$. This normalized measure assumes a value between 0 and 1, where greater values indicate a greater divergence between the observed spike phase distribution and the distribution expected with random spike times, and therefore reflects the strength

of SPM. This entropy approach was used to quantify phase locking rather than circular statistics due to the fact that circular statistics cannot deal with multi-peaked spike-phase distributions, which is the case here for spike phase locking between the subiculum spikes and CA3 phase.

LFP phase-phase locking. We calculated the phase locking between the LFPs recorded from the two oscillators as a measure of their communication. Due to the fact that the two oscillators had different frequencies, we used an approach applied previously to test the phase locking between oscillators of different frequencies. Here we quantify the phase difference between the SUB and CA3 oscillators $\phi_{n,m} = \phi_{SUB}(t) - m\phi_{CA3}(t)$, where ϕ_{SUB} is the phase of the SUB LFP and ϕ_{CA3} is the phase of CA3 and n and m are integers reflecting the frequency ratio that maximizes phase locking. If the two oscillators are phase synchronized, then $\phi_{n,m}$ will have a non-uniform distribution of phase values. To quantify the phase locking value (PLV), we calculated the entropy of the phase difference distribution (p) using

$$H(\phi_{n,m}) = - \sum_{j=1}^N p_j \log p_j$$

and then expressed this entropy value as a function of the maximum entropy of the uniform distribution: $PLV = (H_{max} - H(\phi_{n,m})) / H_{max}$. Here $H_{max} = \log(N)$, and $N = 72$ phase bins in the distribution p . The PLV is limited between 0 and 1, with 1 indicating that all the values of the phase difference distribution fall in a single phase bin, whereas a value of 0 indicates a uniform distribution. Note that an $n:m$ ratio of 1:1 does not necessarily imply that the two oscillators were oscillating at the same frequency but simply that the other different ratios did not improve the phase locking measure. For example, 30 experiments were found to have a 1:1 ratio, but only 18 were matched (50.5 Hz) in frequency.

Time-lagged spike-phase synchrony. We measured the degree of spike-LFP synchrony as a function of the time lag introduced into one signal³². If spikes from one region have a role in phase-synchronizing activity in another region, then shifting the LFP by negative time lags will yield the maximum value in the SPM index calculated using the D_{21} divergence (above). We shifted the LFP signals in 5-ms steps from -1 s to $+1$ s relative to original spike trains, creating 401 SPM estimates. The time lag at which maximum SPM was observed was recorded. If activity generating the LFP influences the spiking of a distant neuron, then shifting the LFP forward will achieve maximal phase locking. However, if the spike is influencing the phase dynamics of the LFP, then shifting the LFP backwards (negative lags) will produce maximal phase locking. We compared the time lag of maximal synchronization between pairs of signals using $LFP_{SUB} - spike_{SUB}$, $LFP_{SUB} - spike_{CA3}$, $LFP_{CA3} - spike_{SUB}$, $LFP_{CA3} - spike_{CA3}$.

Surrogate data. The statistical significance for all cases of phase locking between pairs of data (LFP-LFP; spike-LFP; spike-spike) was evaluated using shuffled surrogate data from one of the two time series to obtain 200–400 surrogate values. Each shuffled data set was obtained by shifting one time series by a randomly selected time interval between 5 s to the full length of the signal. The mean and s.d. of shuffled surrogate distributions were used to determine the confidence intervals for testing the significance of the original measures of synchrony. For the experiments where time lagged synchrony was calculated (401 estimates), the P value used to estimate the significance was adjusted by reducing P to 0.05/402 for bidirectional tests (spike-spike cross-correlation) and $P = 0.05/401$ for unidirectional tests (spike-LFP phase locking), which gave a corresponding critical z value for 3.84. Therefore, synchrony measures above the mean $+3.84$ s.d. of the surrogate set were considered statistically significant for two-tailed tests. For the spike-spike cross-correlation (CC) analyses, we ensured that the CC remained statistically significant for more than one time bin, and any CC where this was not the case was considered statistically non-correlated.

Inactivation experiments. We silenced neuronal populations in both the SUB and CA3 using procaine hydrochloride (1–3%, dissolved in aCSF), which blocks Na^+ channels and spiking. Procaine was picro-spritzed into the isolated hippocampal tissue with brief 10–30-ms pulses (3–8 psi) using a glass pipette with tip diameter of 5–10 μ m. A recording pipette was located nearby to record spiking activity to confirm the silencing of activity. The region of inactivation was roughly

estimated at 1 mm, as spikes recorded further away generally were not suppressed. In addition, we included Chicago blue dye in the pipette in pilot experiments to watch the extent of the injection and found that the small amount of procaine rarely spread a noticeable amount even across CA1. Often, multiple injections were performed in the same experiment following washout. However, for analysis, only those where we could verify a local decrease in activity, together with some washout of spiking, were used for analysis. In the final analysis of the results, only one injection trial was used for each experiment. In preliminary experiments, we used larger volumes of sodium channel blockers, and observed even greater changes in CA3, but as the subiculum did not recover from inactivation, these data were not used for analysis.

Isolation of GABAergic network activity. It has been previously shown that blocking excitatory neural transmission with DNQX and AP5 together with the addition of low millimolar CaCl generates GABAergic slow oscillations in CA1 (ref. 35). We added 2 mM CaCl to the bath together with the AMPA/kainate and NMDA blockers, and spontaneous GABAergic-dependent network activity was generated without the need for additional pharmacology, allowing the study of GABAergic synchronization between regions. GABAergic responses in all cases were blocked by 5 μ M SR95531 (GBZ) or 10–20 μ M bicuculline.

Optogenetic experiments. For optogenetic experiments, postnatal day 15 PV-cre (2 mice) or VGAT-cre pups (1 mouse) (bred in house from Jackson Laboratory) were used. Homozygote PV-cre mice were bred with Cre-reporter R26-tTomato (Jackson Laboratory, stock number 007905) homozygote mice to generate PV-Tom animals. Mice were housed in a temperature-controlled room with a 12:12-h dark/light cycle with food and water provided *ad libitum*. Mice were injected with AAV1j-ChETA-eYFP virus (Vollum Vector Core, Oregon Health and Science University, 0.6 μ l at a rate of 0.06 μ l min^{-1} , injection coordinates aimed at the subiculum: anteroposterior = 2.70 mm from bregma, lateral \pm 3.00 mm, dorsoventral = 2.05 mm). The viral vector was delivered just above the hippocampus to preserve intact the hippocampal network, midway between the septal and temporal extremities. 3 weeks later, the isolated hippocampus was dissected and data recorded during 5- or 10-ms light pulses delivered above the subiculum for 30 s at 3–10 Hz (473-nm blue light, custom-made LED system). The measured LED power was 40 mW at the end of a 3-mm light guide.

GC analysis. GC analysis was used to assess the directional influence of each region on the other as done previously with neocortical LFPs^{36,37} to estimate the Granger coefficients in the frequency domain in the range from 0.1–20 Hz for *in vitro* and 0.1–50 Hz for *in vivo* data. For *in vitro* experiments, the data were first down sampled to 200 Hz and z scored. GC estimates were assessed in 5-s segments and moved through the data in 2.5-s increments. Each experiment therefore yielded the grand mean GC spectra in two directions between each pair of regions. The GC was estimated by the peak value across the mean spectrum ($GC_{CA3 \rightarrow SUB}$ and $GC_{SUB \rightarrow CA3}$) for each experiment. The autoregressive model order was set to 15 for each experiment as this would account for the time lags of up to 75 ms as most of our other analysis suggested the two regions communicate on this timescale. Changing the model order did not yield different trends in the data. A directionality index was calculated using $[GC_{CA3 \rightarrow SUB} - GC_{SUB \rightarrow CA3}] / [GC_{CA3 \rightarrow SUB} + GC_{SUB \rightarrow CA3}]$, which gives a single value reflecting the overall directionality estimate between the two oscillators and is bound between -1 (SUB Granger causing CA) and 1 (CA3 Granger causing the SUB). For *in vivo* experiments, data were resampled from 10 kHz to 1 kHz as gamma rhythm (20–45 Hz) GC coefficients were also measured. In this case, a model order of 60 was used. The GC analysis was also performed on optogenetic experiments, where causality is experimentally controlled. In all cases, the GC analysis showed the subiculum to significantly influence CA3 in accordance with the known experimental manipulation (Supplementary Fig. 10). Gamma coherence and GC was not measured *in vitro* as the subiculum and CA3 are not coherent at gamma frequencies in this *in vitro* preparation³³. The BSMART tool-box³⁸ and algorithms therein were used for these analyses.

CA3 stimulation. CA3 stimulation was performed using a bipolar platinum or tungsten electrode positioned in CA3 to activate Schaffer collaterals. Stimulation pulses (0.1–0.3 ms, 50–600 μ A) were administered every



5–10 s. Spiking and LFPs were simultaneously recorded in both CA3 and the subiculum during stimulation trials.

In vivo recordings and analysis. Four adult rats were implanted with two tungsten microelectrodes (50 μ m, impedance \sim 1 M Ω at 1 kHz) in CA3, CA1 and subiculum at coordinates in millimeters from bregma (SUB: A/R: -6.12 ; M/L: 3.2 ; D/V: -2.8 ; CA1: A/R: -6.12 ; M/L: 5.6 ; D/V: -2.8 ; CA3: D/V: -5.2 ; M/L: 4.6 ; D/V: -4.6). Electrodes were aimed to target just beyond the cell layers in CA1 and CA3, and into the molecular layer of the subiculum. The tip of the tungsten wire was covered with Dyl for subsequent localization of the recording sites. Two neck muscle stainless steel wires were used to record electromyogram signals. Two screws were inserted in posterior and anterior portions of the skull as ground and reference, respectively. All electrodes and wires were fixed to the skull using Super-Bond (Sun Medical). Wires were soldered to two 6-pin circular connectors (Plastic One) that were secured to the skull using acrylic cement. Rats were allowed to recover from surgery for at least 1 week before starting recordings. Recordings were made in the home cage, and during a 10-min exposure to a novel environment (open field, $48 \times 48 \times 33$ cm). Animals were connected via a rotating commutator (Plastic One) to individual animal bioamps (AD instruments). LFPs were amplified (1,000 \times), filtered (0.1–1000 Hz) and digitized at 10 kHz. Differential recordings were made relative to the reference electrode. For analysis, we selected epochs of continuous theta activity in the subicular or CA1 electrode lasting 15–45 s and denoted these theta epochs. Data were down-sampled (10 kHz to 1 kHz), highpass filtered (>1 Hz) and a notch filter was applied to attenuate electrical noise (50 Hz) before performing all analyses. REM epochs were characterized by the presence of strong theta rhythm together with muscle atonia. The GC analysis was conducted on 5-s increments and then averaged to obtain a single GC spectrum for each theta epoch (Fig. 7c). In total, 325 theta epochs were analyzed from four rats (136 during home cage, 134 during REM and 55 during exposure to a novel environment) with two sessions in the home

cage and one session in the open field. Each of the home cage sessions was separated into wake and REM epochs, making eight total home cage sessions, eight REM sessions and four open field sessions in the data set. For analysis of delta peaks–theta coupling, data from entire session were used to test the significance of phase locking between CA3 delta peaks and subicular theta phase. For this analysis, CA3 was filtered in the delta range (1.5–4.5 Hz) and the timing of the largest amplitude peaks (peaks >1 s.d. of the mean) were detected. Data were compared against 200 surrogate data sets where the subicular phase signal was shifted by randomly selected times ranging from 10 s to the length of the session. The modulation index of the delta peaks–subicular phase histogram was measured as described earlier.

Statistical analyses. Paired and unpaired *t* tests were used as indicated to compare groups. Circular statistics were conducted using the CircStat toolbox⁵¹. Sample sizes were chosen based on previously published work²³ and are similar to most papers in the field. The data were assumed to be normally distributed but were not formally tested for normality. No randomization was implemented in how animals were assigned to groups. The data collection and analysis were not performed blind to the conditions of the experiment. All data plots display the mean \pm s.e.m. unless otherwise indicated, in which case s.d. is shown. All tests were two sided except in instances where phase locking indices (spike–LFP; LFP–LFP; Fig. 2b) were tested against a surrogate distribution of values, in which case one-sided tests were used.

A Supplementary Methods Checklist is available.

50. Manseau, F., Goutagny, R., Danik, M. & Williams, S. The hippocamposeptal pathway generates rhythmic firing of GABAergic neurons in the medial septum and diagonal bands: an investigation using a complete septohippocampal preparation. *In vitro J. Neurosci.* **28**, 4096–4107 (2008).

51. Berens, P. CircStat: a MATLAB toolbox for circular statistics. *J. Stat. Softw.* **31**, 1–21 (2009).



Jean-Bastien BOTT

REORGANISATIONS SYNAPTIQUES DANS L'HIPPOCAMPE ET RECUPERATION FONCTIONNELLE APRES LESION DU CORTEX ENTORHINAL.

La maladie d'Alzheimer est souvent précédée de troubles cognitifs légers (MCI) associés à la lésion du cortex entorhinal, une région interconnectée avec l'hippocampe. Cependant, un tiers des patients MCI présentent une rémission cognitive suggérant l'action de mécanismes compensatoires. Ces mécanismes pourraient être déficitaires chez les patients porteurs de l'allèle *APOE4* présentant un MCI plus agressif.

Par des approches multidisciplinaires chez la Souris, ce travail a démontré que la lésion entorhinale induit des déficits comportementaux et une hyperactivité de l'hippocampe. Or, le bourgeonnement des fibres cholinergique dans l'hippocampe compense ces déficits. Comme le bourgeonnement cholinergique est inhibé en présence de l'*APOE4*, cela pourrait contribuer au déclin cognitif exacerbé de ces patients.

Par conséquent, l'inhibition de l'hyperactivité hippocampique chez les 50% de patients *APOE4* représente une alternative prometteuse pour le traitement symptomatique du MCI.

APOE4 – bourgeonnement cholinergique – maladie d'Alzheimer

Mild Cognitive Impairments (MCI) often precedes Alzheimer's disease (AD) and is characterized by the loss of entorhinal neurons leading to a hippocampal disconnection. However, MCI patients also revert to normal cognition, suggesting compensatory mechanisms that alter the disease progression. This compensation may be impaired in patients bearing the *APOE4* allele that are more prone to MCI, present less cognitive reversion and faster transition to AD.

This work in mice, demonstrated that the sprouting of cholinergic fibers compensates entorhinal lesions through the reduction of the related hippocampal hyperactivity. As in *APOE4* mice the cholinergic sprouting was altered in association with cognitive impairments, such impaired synaptic compensation may contribute to the faster cognitive decline of these patients.

Therefore, supporting or mimicking the cholinergic control on hippocampal hyperactivity may represent a promising alternative therapeutic strategy for *APOE4*-carriers.

APOE4 – cholinergic sprouting – Alzheimer's disease