**N°d'ordre : 4210**

**THESE**

PRESENTEE A

# L'UNIVERSITE DE BORDEAUX

*ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE*

PAR

**Laurent BRAYDA-BRUNO**

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

**DOCTEUR**

SPECIALITE NEUROSCIENCES

---

# ETUDE DES DEFICITS DE MEMOIRE RELATIONNELLE/DECLARATIVE AU COURS DU VIEILLISSEMENT CHEZ LA SOURIS : APPROCHE SYSTEMIQUE

---

Thèse soutenue le : 17 décembre 2010

*Après avis de :*
**Mme Catherine THINUS-BLANC** (DR, CNRS UMR 6146, Univ. Méditerranée)
**Mme Nadine RAVEL** (CR, CNRS UMR 5020, Univ. Lyon 1)

*Devant la commission d'examen formée de :*
**Mme Catherine THINUS-BLANC** (DR, UMR 6146, Univ. Méditerranée)..... Rapporteur
**Mme Nadine RAVEL** (CR, CNRS UMR 5020, Univ. Lyon 1)..... Rapporteur
**M. Pascal ROULLET** (MCU, CNRS UMR 5169, Univ. Toulouse 3) .....Examinateur
**Mme Aline MARIGHETTO** (CR, CNRS UMR 5228, Univ. Bordeaux) .....Examinateur
**M. Jacques MICHEAU** (Pr., CNRS UMR 5228, Univ. Bordeaux) .....Directeur de Thèse
**M. Robert JAFFARD** (Pr., CNRS UMR 5228, Univ. Bordeaux) .....Président de Jury

- 2010 -

# Avant-propos

Le travail de recherche présenté dans cette thèse a été effectué au sein du Centre de Neurosciences Intégratives et Cognitives (CNRS UMR5225) pour être présenté à et en vue de l'obtention d'un Doctorat de l'Université de Bordeaux. La direction scientifique a été effectuée par les Drs Jacques MICHEAU (Pr) et Aline MARIGHETTO (CR). L'ensemble de ces études fait l'objet d'une publication soumise, une communication orale et trois communications affichées, dont le détail est présenté ci-après, conjointement aux travaux en collaboration.

***Publications avec comité de lecture***

- Relatives au travail présenté dans cette thèse :

**Brayda-Bruno L.**, Mons N., Micheau J., Noguès X. and Marighetto A. Aging-like removal of septo-hippocampal cholinergic neurons induces CA3 hyperactivation in relational/declarative memory expression in mice. *Neurobiol Aging* ***(Soumis)***.

**Brayda-Bruno L.**, Etchamendy N., Mons N. and Marighetto A. A critical CA1 episodic buffer in declarative memory formation and its aging-related failure. ***(En préparation)***.

- En collaboration au cours de la thèse :

Blanchard J., Martel G., **Brayda-Bruno L.**, Noguès X. and Jacques Micheau. Detection of age-dependent working memory deterioration in $APP_{751SL}$ mice. *Behav Brain Res* ***(En revision)***.

Boucher A., Viviera L., Metna-Laurent M., **Brayda-Bruno L**., Mons N., Arnold J. and Micheau J. Chronic treatment with D9-tetrahydrocannabinol impairs spatial memory and reduces zif268 expression in the mouse forebrain. *Behavioural Pharmacology* **(2009) 20 :** 45-55.

***Communication orale***

**Brayda-Bruno L.** A critical CA1 episodic buffer in long term declarative memory formation. *Bordeaux Neuroscience Institute Annual Meeting.* Bordeaux, April 15th 2010.

***Communications affichées***

**Brayda-Bruno L.**, Micheau J. and Marighetto A. Circadian rhythm and declarative memory in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's Disease. *GDR NeuroMem*. Aussois, December 15-17th 2008.

**Brayda-Bruno L.**, Baudonnat M., Etchamendy N., Micheau J., Mons N. and Marighetto A. Declarative memory and hippocampal function in encoding temporally discontiguous events: beneficial effects of donepezil in aged mice. *French Neuroscience Society Colloque*. Bordeaux, May 27-29th 2009.

**Brayda-Bruno L.**, Etchamendy N., Mons N. and Marighetto A. A critical episodic buffer in long term memory formation. *1st Neurocenter Annual Symposium.* Bordeaux, September 9-10th 2010.

# Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu le Docteur Aline Marighetto, co-directrice de ma thèse, qui a dirigé et fiancé ce travail. Car sans elle, cette thèse n'aurait pas pu être réalisée. Aline est une personne généreuse dans tout ce qu'elle entreprend, aussi bien sur le plan scientifique que sur le plan humain. Elle m'a fait bénéficier de toutes ses connaissances théoriques et pratiques qu'elle m'a offertes sans retenue. Elle a également su m'écouter et me soutenir dans les moments difficiles.
Je la remercie de m'avoir initié au labyrinthe radiaire, magnifique appareil dont je suis devenu un « vieux routier » de son utilisation. J'en suis devenu un de ses plus grands fans, souhaitant sans cesse l'améliorer tant au niveau des réglages qu'au niveau matériel. Pour tout ce que vous m'avez apporté, Aline, je vous remercie du fond du cœur.

Je tiens en second lieu à remercier le Professeur Jacques Micheau, mon directeur de thèse « officiel ». C'est grâce à Jacques que j'ai découvert le monde de la recherche en Neurosciences au cours de mes stages de Master 1 et de Master 2, réalisés sous son encadrement. C'est également sous son impulsion que je me suis décidé à réaliser cette thèse. Pour tout ce que nous m'avez apporté, Jacques, je vous dit un grand MERCI.

Je tiens à remercier le Docteur G. Di Scala, directeur du Centre de Neurosciences Intégratives et Cognitives (CNIC UMR 5228), pour m'avoir accueilli dans ce laboratoire dès le stage de première année de Master.

Je tiens à remercier le Professeur Robert Jaffard qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse. Les cours qu'il m'a dispensé et la qualité de ses interventions orales m'ont toujours émerveillé. J'éprouve pour M. Jaffard une très grande admiration et le plus profond respect.

Je tiens à remercier les Docteurs Catherine Thinus-Blanc et Nadine Ravel qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteur de cette thèse, ainsi que le Docteur Pascal Roullet qui m'a fait l'honneur d'être examinateur de cette thèse. Les remarques qu'ils m'ont formulés témoignent de l'intérêt qu'ils ont accordé à ce manuscrit. Je leur en suis très reconnaissant.

Je tiens à remercier les membres de l'ancienne équipe 1 du CNIC : Aline Marighetto qui la dirige, Jacques Micheau (même si je viens de le faire pour tous les deux, mieux vaut deux fois qu'une !), Xavier Noguès, Nicole Mons et Aline Desmedt pour leur interaction scientifique et humaine, toujours dans la bonne humeur !

Je tiens également à remercier les membres de la future équipe « Physiopathologie de la Mémoire Déclarative » : Aline Marighetto qui la dirigera, (non, je ne me répète pas !), Xavier Noguès, Aline Desmedt (là non plus !), Catherine Bennetau, Mylène Potier, Svitlana Poix, Valérie Lamothe et Shaam Al Abed pour les mêmes raisons que précédemment, bonne humeur comprise, bien entendu !

Je tiens à remercier tous mes camarades étudiants du CNIC. En particulier Delphine Tran Tu Yen et Nadia Kaouane qui ont passé leur thèse en même temps que moi et avec qui nous avons partagé nos moments de joie et de déprime. Je remercie également les autres étudiants du bureau ou associé : Yves Porte qui est pour moi un mentor. Je le remercie pour ses nombreux conseils, son aide à la fois technique et théorique. Fabien Naneix et Malorie Dagnas pour leur aide et qui ont également partagé mon quotidien. Je remercie Yves et

Malorie pour l'aide précieuse qu'ils m'ont apporté lors du sprint final avant la remise du manuscrit. Vous vous en souviendrez de cette nuit là ! Yves, Nadia, Fabien, Delphine et Malorie, je vous remercie pour les bons moments passés ensemble, votre bonne humeur, sympathie, gentillesse, et votre patience à supporter mon humour un peu lourd (j'hésite à retirer le un peu…).

Je tiens à remercier Dominique Panzeri, Nathalie Argenta et Jennifer Huard qui se sont si bien occupées de mes petites bébêtes (paix à leurs âmes) dans l'animalerie et de s'être préoccupée de ma forme physique. Tirer des palettes sur du lino, ça entretient ! De la même façon, je tiens également à remercier Laurence Decorte et Angélique Faugère pou leur aide et assistance en histologie et immunologie. J'espère ne pas vous avoir perdu trop de dixièmes à votre vue, au regard du nombre que cerveau que nous avons monté…

Je tenais également à remercier les stagiaires de Master 1 et Master 2 qui ont participé (de près ou de loin) à ces travaux : Marie Basquin, Julie Blanchard, Emmanuelle Launay et Florian Jacquot (vive le rugby !).

J'ai également une pensée enfin pour tous les autres, techniciens, chercheurs que j'ai pu côtoyer dans le laboratoire.

Enfin, je tenais à remercier tous mes amis (« bordelais » et « beaucerons ») qui m'on soutenu et diverti au cours de ces trois dures années de thèse. Juste une précision : l'excuse « ce week end je ne peux pas, je suis en manip » n'était pas une excuse bidon, je vous le jure ! Une mention spéciale pour l'ami Pierre : je pense que Saint Emilion et le camping le Cro-Magnon se souviennent encore de nous ! A mes frangins, Thibault et Aurélien et à mes parents pour leur soutien sans faille et ce même avec la distance qui nous séparait et qui bien des fois m'a pesée…

A vous tous, je dirai simplement : MERCI

PS : je tiens également à remercier les laboratoires SERVIER qui, par l'intermédiaire d'Aline, ont contribué à la réalisation de cette thèse.

# Résumé

Le vieillissement se caractérise par le déclin des fonctions cognitives. Une forme particulière de mémoire, dite déclarative est particulièrement atteinte. Les causes de l'atteinte de cette mémoire sont multiples et encore mal comprises. Il est connu que la mémoire déclarative est dépendante de l'intégrité de l'hippocampe, dont la fonction s'altère avec l'âge. Nous savons également qu'un hypofonctionnement du système cholinergique intervient dans l'apparition des troubles, ce qui a servi de base au développement de substances pharmacologiques procholinergiques afin de réduire le déficit mnésique associé aux formes pathologiques de vieillissement (comme la Maladie d'Alzheimer). Cependant, l'identification des bases neurobiologiques du déclin mnésique lié au vieillissement se heurte à deux difficultés principales : 1) la modélisation animale de la mémoire déclarative, forme de mémoire typiquement humaine et 2) le manque d'intégration des différents niveaux d'analyse du fonctionnement cérébral. Ainsi, les altérations fonctionnelles décrites à l'échelle des structures et des systèmes chez l'Homme sont peu reliées aux altérations cellulaires et moléculaires décrites chez l'animal.

Pour améliorer notre compréhension des bases neurobiologiques du vieillissement mnésique, notre travail visait à identifier des altérations intracellulaires se produisant au sein du réseau intégré des systèmes de mémoire lors des activités mnésiques. Nous avons utilisé un modèle souris de l'altération préférentielle de la mémoire déclarative liée à l'âge parce que ce modèle, développé au cours des dernières années, est en cours de validation chez l'Homme. Sur ce modèle, nous avons utilisé une approche d'imagerie fonctionnelle basée sur l'expression de la protéine Fos, combinée à différentes approches par intervention (pharmacologie, lésion cholinergique ou inactivation par injection locale de lidocaine).

La première partie de ce travail a consisté à étudier l'implication de la fonction cholinergique dans le déficit de mémoire déclarative lié au vieillissement, par deux approches complémentaires. 1) Par une approche pharmacologique, nous avons montré qu'un traitement « procholinergique » avec le donépézil restaure partiellement le déficit de mémoire déclarative des souris âgées et normalise l'activité des systèmes de mémoire dans la phase d'acquisition de la mémoire déclarative. 2) Par une lésion sélective et partielle de la voie septo hippocampique cholinergique mimant les effets du vieillissement, nous avons montré que la diminution du nombre de neurones cholinergiques septaux n'entraîne pas de déficit mnésique, mais produit une réorganisation de l'activité des différents systèmes de mémoire dans l'expression de la mémoire déclarative. Cette réorganisation, caractérisée notamment par une hyper-activation du CA3 hippocampique, suggère une implication cholinergique dans les mécanismes sous-tendant la progression vers la pathologie d'Alzheimer.

Dans une seconde partie, nous nous sommes focalisés sur la phase d'acquisition et les mécanismes sous-tendant la formation d'une représentation mnésique unifiée, ou relationnelle, qui autorise la flexibilité d'expression caractéristique de la mémoire déclarative, altérée par le vieillissement. En particulier, nous avons exploré les mécanismes de *liaison temporelle*. Nos résultats montrent que la *liaison temporelle* critique à la formation de la mémoire déclarative implique l'intervention d'un système de stockage à court terme de capacité limitée, tel que décrit par le concept de tampon épisodique de Baddeley. A l'interface entre les systèmes de mémoire à court terme et de mémoire à long terme, ce système permet le maintien et la liaison d'informations distantes de plusieurs secondes en une représentation épisodique unifiée. Nous avons observé une réduction de sa capacité au cours du vieillissement, expliquant le déficit de flexibilité mnésique (i.e. de mémoire déclarative) observé. Au niveau systémique, nos résultats montrent que l'activité de la sous-région CA1 de l'hippocampe est critique pour le fonctionnement du tampon épisodique, l'absence d'activation du CA1 étant reliée au déficit mnésique observé au cours du vieillissement.

# Abstract

Aging is characterized by a cognitive decline. One particular form of memory known as declarative is particularly affected. The causes of this memory decline are multiple and still misunderstood. It is well known that declarative memory depends on the integrity of the hippocampus, which function is altered with aging. Moreover, we know that a hypofunctioning of the cholinergic system is part of the causes of the aging cerebral disorders. This was the basement of the developing of procholinergic pharmacological drugs aiming at reducing mnemonic deficiency associated with pathological aging (such as Alzheimer disease). However, the identification of the neurobiological bases of aging mnemonic decline faces two principal difficulties: 1) the animal modeling of a typically human memory and 2) the lack of integration of the different levels of cerebral functioning analysis. Indeed, functional alterations described at the structural and systemic levels in human are weakly related to cellular and molecular alterations described in animals.

To gain insights into the neurobiological bases of age related mnemonic decline, our work aimed at identifying intracellular alterations occurring in the integrated network of memory systems during mnemonic activities. We specifically used a mouse model of the age related declarative memory alteration developed over the past years in the team because it is being validated in human. In this model, we used a functional imagery approach based on the expression of Fos protein, combined with various interventionist approaches (pharmacology, cholinergic lesion, inactivation by local lidocain injection).

The first part of this work consisted in studying the implication of the cholinergic function in the declarative memory deficit observed during aging. This was carried out by the use of two complementary approaches. 1) Thanks to a pharmacological technique, we demonstrated that a “procholinergic” treatment by donepezil partially restores the deficit of declarative memory in aged mice and normalizes the memory systems activity during the acquisition phase. 2) By a selective and partial lesion of the septo-hippocampal cholinergic pathway mimicking aging effects, we showed that a decrease in the septal cholinergic neurons number does not induce mnemonic deficits, but produces a reorganization of the different memory systems in the expression of declarative memory. This reorganization, characterized by a hippocampal CA3 hyperactivation, suggests a cholinergic implication in the mechanisms underlying the Alzheimer’s desease progression.

In the second part, we focused our attention on the acquisition phase and the mechanisms underlying the formation of a unified mnemonic representation, known as relational, that allows the characteristic flexible expression of declarative memory, altered during aging. In particular, we explored the temporal binding mechanisms. Our results show that the temporal binding, critical for declarative memory formation, implies the intervention of a limited capacity short term storage system, as described by Baddeley’s episodic buffer concept. At the interface of short term and long term memory systems, this concept permits the maintaining and the binding of informations that are separated by several seconds in a unified representation. We observed the reduction of its capacity during aging, explicating the mnemonic flexibility deficit (i.e. declarative memory) observed. At the systemic level, our results show that the hippocampal CA1 activity is critical for the functioning of the episodic buffer, the absence of CA1 activation being related to the mnemonic deficit observed during aging.

# SOMMAIRE

Introduction générale ..... 17

Préambule ..... 19

**Partie I – Les systèmes de mémoire ..... 21**

I.A – La mémoire à court terme/de travail : le modèle de Baddeley ..... 22

- *Le modèle initial ..... 22*
- *Evolution du modèle : le tampon épisodique (ou* episodic buffer*) ..... 22*
- *Bases anatomiques du tampon épisodique : implication de l'hippocampe ? ..... 24*

I.B – Mémoires à long terme déclarative et non déclarative : le modèle de Squire ..... 25

- *Définitions ..... 26*
- *Dissociations au sein de la mémoire déclarative : modèle Serial Parallel Independant de Tulving, une alternative au modèle de Squire ..... 27*

I.C –Limites du concept de système de mémoire : les interactions ..... 29

- *Interactions entre mémoire à court terme et mémoire à long terme ..... 29*
- *Interactions entre mémoire déclarative et mémoire non déclarative : la théorie MPMS (Multiple Parallel Memory Systems) ..... 30*

I.D – Modélisation de la mémoire déclarative chez l'animal ..... 31

- *La mémoire « episodic-like » : le quoi-où-quand ? ..... 31*
- *L'hippocampe et la théorie des cartes spatiales ..... 32*
- *Généralisation des cartes spatiales aux représentations relationnelles : le modèle d'Eichenbaum et Cohen ..... 33*
- *La théorie relationnelle appliquée au labyrinthe radiaire ..... 35*

**Partie II – Mémoire et vieillissement ..... 37**

II.A – Les formes de mémoire altérées ..... 37

- *La mémoire à court terme/de travail..... 37*
- *La mémoire déclarative..... 38*
- *La mémoire non déclarative..... .39*

II.B Les altérations systémiques : données d'imagerie fonctionnelle chez l'homme ..... 39

- *Quelques généralités..... 39*
- *Réduction de l'activation asymétrique au cours du vieillissement ..... 40*
- *L'hypothèse de la dédifférenciation liée au vieillissement..... 41*
- *La désactivation ..... 42*

II.C – Etudes chez l'animal : altérations hippocampiques cellulaires et moléculaires ..... 43

- *Au plan neuropsychologique* ..... 43
- *Altérations des propriétés des cellules de lieu..... 44*
- *Altérations morphologiques..... 44*
- *Altérations de la plasticité synaptique ..... 45*
- *Altérations moléculaires ..... 46*

II.D – Rôle de l'acétylcholine dans le vieillissement mnésique ..... 47

- *Hypothèse cholinergique classique ..... 47*
- *Remise en question de l'hypothèse cholinergique classique..... 49*
- *Reformulation de l'hypothèse : rôle modulateur dans la coordination des systèmes multiples de mémoire ..... 49*
- *Intérêt de l'hypothèse cholinergique reformulée dans le contexte du vieillissement... 51*

**Partie III - Rappels anatomiques : la formation hippocampique et le système de neurotransmission cholinergique ..... 52**

III.A – L'hippocampe..... 52

- *Position et cytoarchitecture de l'hippocampe ..... 53*
- *Les connections intra-hippocampiques : le circuit trisynaptique ..... 54*
- *Les connexions extrinsèques à l'hippocampe ..... 55*

III.B – Le système cholinergique central ..... 55

- *Généralités ..... 55*
- *Distribution des neurones cholinergiques dans le cerveau ..... 56*
- *Les voies cholinergiques principales ..... 57*
- *Les récepteurs cholinergiques ..... 58*

**Partie IV – Problématique ..... 61**

Chapitre I – Cholinergie et vieillissement : modulation et coordination des systèmes de mémoire. ..... 65

**Expérience 1 : effets d'un traitement « procholinergique » sur le déficit de mémoire relationnelle/déclarative et les patrons d'activité au sein des systèmes mnésiques chez la souris âgée. ..... 69**

Introduction ..... 69
Matériel et Méthodes ..... 69
Résultats ..... 75
Discussion ..... 79

**Expérience 2 : effets d'une lésion partielle de la voie cholinergique septo-hippocampique sur les patrons d'activité cérébrale associés à l'expression de la mémoire relationnelle/déclarative chez la souris adulte. ..... 85**

Introduction ..... 85
Méthodologie ..... 85

Principaux résultats et conclusions ..... 85

*Article 1 : Aging-like removal of septo-hippocampal cholinergic neurons induces CA3 hyperactivation in relational/declarative memory expression in mice.*
Brayda-Bruno L., Mons N., Micheau J., Nogues X., Marighetto A. ..... 89

Conclusion..... 115

Chapitre II – Fonction hippocampique dans la formation de la mémoire relationnelle/déclarative : interaction entre mémoires de travail et à long terme. ..... 117

Résumé..... 119

*Article 2 : Aging-related decline in declarative memory: role of a CA1 episodic buffer*
Brayda-Bruno L,Etchamendy N., Mons N., Marighetto A. ..... 121

Discussion générale..... .....157

1 – Hippocampe, *binding* temporel et leurs altérations au cours du vieillissement ..... .... 159

- *Contexte, objectifs et principaux résultats ..... 159*
- *Hippocampe, mémoire à court terme et mémoire à long terme : avancées psychologiques..... 160*
- *Hippocampe, mémoire à court terme et mémoire à long terme : intégration au niveau cellulaire et moléculaire..... 161*

2 – Cholinergie et vieillissement : modulation et coordination des systèmes de mémoire.... 165

- *Contexte, objectifs et principaux résultats ..... 165*

- Hypothèse cholinergique reformulée : éléments nouveaux quant au rôle de la transmission cholinergique dans la coordination des systèmes de mémoire ..... *166*
- Projections GABAergiques septo-hippocampiques, mémoire et vieillissement : une explication alternative..... 169

3 – Pertinence des approches utilisées ..... 171

- *Modélisation de la mémoire déclarative en labyrinthe radiaire..... 171*
- *Pertinence de la protéine Fos pour les études d'imagerie cérébrale ..... 172*

4 - Relativiser le déclin mnésique lié à l'âge ..... 173

Références bibliographiques ..... .....175

Annexes ..... .....197

Annexe 1 :
*Detection of age-dependant working memory deterioration in $APP_{751SL}$ mice*
Blanchard J., Martel G., Brayda-Bruno L ; Noguès X., Micheau J. ..... 199

Annexe 2 :
*Chronic treatment with Δ9-tetrehydrocannabinol impairs spatial memory and reduces zif268 expression in the mouse forebrain.*
Boucher A.A., Vivier L., Metna-Laurent M., Brayda-Bruno L., Mons N.,
Arnold J.C., Micheau J. ..... 231

# INTRODUCTION GENERALE

Le travail présenté dans ce mémoire vise contribue à l'élucidation des bases psychobiologiques du vieillissement mnésique.

Ce travail s'inscrit dans un domaine de recherche extrêmement productif et qui s'intensifie depuis plusieurs décennies pour répondre à une très forte demande sociétale du fait du vieillissement rapide de la population. En France, un habitant sur cinq était âgé de plus de 60 ans en 2005. Cette proportion devrait atteindre un habitant sur trois d'ici à 2050, générant un coût considérable de prise en charge des pathologies cognitives associées. La maladie d'Alzheimer, dont l'incidence est la plus élevée parmi les pathologies du vieillissement, se caractérise par une détérioration sévère de la mémoire. Le développement de stratégies de prévention et de traitement des pathologies de la mémoire liées au vieillissement est donc urgent.

En dépit d'une activité de recherche intense, la compréhension des bases neurobiologiques du vieillissement mnésique est encore insuffisante. Parmi les nombreuses difficultés auxquelles se heurte la recherche dans ce domaine, nous avons identifié deux limitations importantes et partiellement liées l'une à l'autre.

Une première limitation tient à la rupture entre les études menées chez l'Homme et celles menées chez l'animal, limite elle-même liée au type de mémoire altérée par le vieillissement. En effet, parce qu'elle est dépendante des capacités de conscience et de verbalisation, la mémoire dite « déclarative » qui décline avec le vieillissement est difficile à étudier chez l'animal. La première limitation est donc celle des modèles animaux de mémoire déclarative.

La deuxième limitation tient au manque d'intégration des différents niveaux d'analyse du fonctionnement cérébral. En particulier, les altérations identifiées à l'échelle cellulaire et moléculaire chez l'animal sont insuffisamment reliées aux altérations observées à l'échelle des systèmes (structure et relations entre structures) chez l'homme.

Pour tenter de dépasser ces difficultés, nous avons choisi d'utiliser un modèle souris du déclin de la mémoire déclarative lié au vieillissement, préalablement développé au laboratoire dans l'objectif d'homogénéiser les concepts et méthodes d'analyse de la mémoire entre l'homme et l'animal. Sur ce modèle comportemental, nous tenterons d'identifier des altérations intracellulaires au sein des systèmes neuronaux en fonctionnement.

Avant de détailler nos objectifs de recherche spécifiques, nous tenterons, dans la partie introductive de ce mémoire, de présenter les éléments bibliographiques principaux qui, de près ou de loin, ont fondé notre travail de thèse. La première partie porte sur les systèmes de mémoire. Il s'agit là de présenter les concepts principaux qui sous tendent la recherche

neurobiologique contemporaine sur cette fonction polymorphe qu'est la mémoire. La mémoire est en effet conçue comme un ensemble hétérogène de processus d'acquisition et conservation d'information qui recrutent des régions et des mécanismes cérébraux au moins partiellement distincts. La seconde partie concerne plus spécifiquement le vieillissement mnésique. Les données de l'imagerie fonctionnelle chez l'homme y seront plus particulièrement considérées, notre objectif de recherche se situant à l'échelle systémique, peu ou pas considérée chez l'animal jusqu'ici.

# Partie I – Les systèmes de mémoire

La mémoire n'est pas une entité unifiée mais un ensemble hétérogène de « modules de stockages » connus sous le nom de systèmes. Ces systèmes sont caractérisés (i) par la nature des informations ou des traitements qu'ils effectuent sur ces informations (associations de type stimulus-stimulus, stimulus-réponse ou stimulus-renforcement), ou encore par leur durée de rétention (ii) par les structures cérébrales impliquées dans ce traitement.

L'identification et la classification systématique des différents types de mémoire, tant chez l'homme que dans le cadre de l'expérimentation animale, repose en grande majorité sur des dissociations : la lésion d'une structure cérébrale perturbe un type de mémoire, mais pas un autre. Le point de départ de cette classification dichotomique repose sur la description du cas H.M. faite par Scoville et Milner (Scoville et Milner, 1957). Ce patient, âgé de 27 ans à l'époque, et ayant une intelligence normale, a subi une ablation bilatérale et totale des parties antérieures des lobes temporaux médians afin de supprimer de sévères crises d'épilepsie. A la suite de cette opération, H.M. développa une amnésie antérograde totale, l'empêchant de former de nouveaux souvenirs à long terme, ainsi qu'une amnésie rétrograde portant sur période de 1 à 10 ans avant l'opération. Ses autres capacités cognitives (sociales, verbales, émotionnelles, personnalité,…) étaient préservées. Il présentait également un rappel immédiat intact et conservait une capacité à acquérir et à retenir certaines informations sous certaines conditions, lorsque la récupération de l'information se faisait sous forme implicite (Gabrieli et al., 1993).

La description des capacités mnésiques préservées et perdues chez H.M. est à l'origine des classifications modernes de la mémoire. Classiquement, cette fonction est divisée en deux grandes catégories : la mémoire à court terme ou mémoire de travail (qui semblait préservée chez H.M.), et la mémoire à long terme qui elle-même divisée en deux sous-ensembles (i) la mémoire dépendante de l'intégrité du lobe temporal médian, consciente, verbalisable et le plus souvent appelée mémoire déclarative (ii) la mémoire non déclarative regroupant diverses formes d'habileté et de mémoires inconscientes préservées chez H.M. Nous allons brièvement décrire chacune de ces catégories.

## I.A – La mémoire à court terme ou de travail : le modèle de Baddeley

- *Le modèle initial*

Le concept de mémoire de travail a été proposé en 1974 par Baddeley et Hitch (Baddeley et Hitch, 1974). C'est une forme de mémoire à court terme essentielle à l'ensemble des activités cognitives permettant le stockage temporaire de l'information provenant de différentes modalités sensorielles, en vue de son traitement. Elle nécessite toute l'attention immédiate du sujet (Baddeley et al., 1986). Elle est impliquée de manière critique dans l'accomplissement de nombreuses tâches cognitives et a des relations complexes avec les systèmes de mémoire à long terme.

D'après le modèle de Baddeley et Hitch (1974, Figure 3), la mémoire de travail s'organiserait autour de trois composantes en interaction. Tout d'abord un système de contrôle des ressources attentionnelles, l'administrateur central, qui contrôlerait deux systèmes esclaves que sont la boucle phonologique et le calepin visuo-spatial. Ces deux systèmes esclaves auraient une capacité de stockage limitée et seraient responsables du maintien temporaire de l'information. La boucle phonologique permettrait la rétention d'informations de nature verbale ou acoustique par l'intermédiaire d'un système de stockage temporaire et d'un processus de répétition verbale, le blocage de la répétition altérant le rappel. L'accès au stock phonologique serait relativement direct pour les informations auditives verbales, alors que les informations visuelles nécessiteraient d'être ré-encodées par la boucle phonologique. Les études lésionnelles et d'imagerie la suggèrent associée aux aires 40 et 44 de Brodmann. Le calepin visuospatial permettrait le maintien temporaire d'informations visuospatiales qui pourraient être fractionnées en composantes visuelles et spatiales. Il serait principalement sous-tendu par certaines aires de l'hémisphère droit (aires 6, 19, 40 et 47). Enfin, l'administrateur central est le sous-système le moins bien connu et semble fortement requérir les lobes frontaux (Baddeley, 2000 pour revue).

- *Evolution du modèle : le tampon épisodique (ou* episodic buffer*)*

Le modèle initial de Baddeley a permis de guider les recherches sur la mémoire de travail pendant près de 30 ans. Cependant, il présente plusieurs limites. La première est que ce

modèle ne fournit pas d'explication au fait que des sujets soient capables de rappeler davantage de mots lorsque ceux-ci peuvent former des phrases par rapports à des mots qui ne peuvent pas être reliés entre eux. De façon similaire, ce modèle n'explique pas le mécanisme permettant de rassembler des items individuels sous forme d'unités plus larges. Une deuxième limite est que ce modèle n'offre aucune explication des relations que peut avoir la mémoire de travail avec la mémoire à long terme. Enfin, il n'explique pas comment les informations issues des deux systèmes esclaves peuvent être reliées entre elles (Repovs and Baddeley, 2006).

Suite à ce constat, Baddeley a récemment fait évolué son modèle afin d'expliquer la préservation des capacités de certains patients. Il a ainsi rajouté un quatrième composant au modèle tripartite, le « tampon épisodique » (Baddeley, 2000 Figure 1). Il se définit comme un système de stockage de l'information ayant une capacité limitée et utilisant un code multimodal. Il serait capable de lier et d'associer les informations (« *binding* » en anglais) provenant des systèmes esclaves ainsi que des sites de stockage de l'information à long terme afin de former des représentations épisodiques unitaires. Ainsi, ce tampon épisodique se situerait à l'interface entre les systèmes de mémoire à court terme et de mémoire à long terme (Quinette et al., 2006; Eustache et Desgranges, 2008).

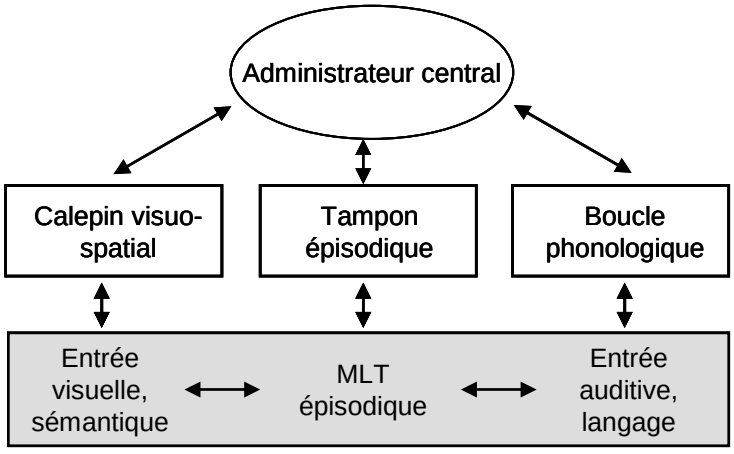



Figure 3 : Le modèle de mémoire de travail d'A. Baddeley. La surface grisée représente des systèmes cognitifs « cristallisés » capables d'accumuler des connaissances à long terme. Les surfaces non grisées représentent des capacités « fluides » (comme l'attention et le stockage temporaire) qui ne sont pas modifiées par l'apprentissage (d'après Baddeley, 2000). MLT : mémoire à long terme.

- *Bases anatomiques du tampon épisodique : implication de l'hippocampe ?*

La question du substrat neuro-anatomique sous-tendant la fonction de *binding* en mémoire de travail correspondant au tampon épisodique est débattue (Baddeley et al., 2010). En effet, Baddeley postule au départ que le tampon épisodique se situe dans le cortex préfrontal, comme l'est l'administrateur central (Baddeley, 2000; Repovs et Baddeley, 2006). Une étude d'imagerie cérébrale montre une augmentation de l'activité du cortex préfrontal lorsque les sujets sont testés dans une tâche de mémoire de travail sollicitant la fonction de *binding* (Prabhakaran et al., 2000).

Cependant, quelques études d'imagerie cérébrale effectuées récemment suggèrent que l'hippocampe sous-tend également les fonctions de *binding* et de maintien du tampon épisodique. Une première étude effectuée chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Berlingeri et al., 2008) montre que seuls les sujets qui développent une atrophie hippocampique présentent également un déficit du tampon épisodique (tâche de rappel immédiat d'histoire, en anglais *prose recall*, classiquement utilisée pour étudier le tampon épisodique). Deux autres études montrent une altération des fonctions sous-tendues par le tampon épisodique associée à un dysfonctionnement hippocampique. Elles utilisent une tâche de *binding* à court terme lors de laquelle les sujets doivent associer une information verbale et une information spatiale. Des sujets sains montrent une activation hippocampique lors de l'encodage et du maintien des informations liées (Luck et al., 2010a), alors que des patients schizophrènes ayant une hypoactivation hippocampique présentent un déficit de maintien des informations liées (Luck et al., 2010b).

Toutefois, l'idée que l'hippocampe sous-tende le tampon épisodique ne fait pas l'unanimité. Elle est contredite par une récente étude publiée par Baddeley (Baddeley et al., 2010) dans laquelle un patient amnésique souffrant depuis la naissance d'une lésion hippocampique associée à un syndrome amnésique, ne présente aucun déficit du tampon épisodique.

Comme nous allons le voir, le problème du *binding* des informations est au cœur de notre travail de thèse. Nous essaierons de montrer que le tampon épisodique, par définition à l'interface entre mémoire de travail et mémoire à long terme, joue un rôle important dans la formation de la mémoire déclarative et sa détérioration liée à l'âge. A cette occasion, nous reviendrons sur la question de l'implication éventuelle de l'hippocampe dans cette fonction spécifique de la mémoire de travail.

## I.B – Mémoires à long terme déclarative et non déclarative : le modèle de Squire

Depuis les travaux effectués sur le cas H.M, de nombreuses tentatives de classification de la mémoire à long terme ont été réalisées (Sherry et Schacter, 1987; Baddeley, 1988; Tulving, 1995; Squire, 2004; Henke, 2010). Une des classifications les plus communément utilisées de nos jours est celle de Larry Squire (Squire, 1992). Cette classification se base sur de nombreuses observations effectuées sur des patients amnésiques, ainsi que des données obtenues chez le singe et le rongeur. Ce modèle met en opposition mémoire déclarative et mémoire non déclarative, principalement sur le critère d'un rappel conscient ou non conscient des informations. Cette classification repose principalement sur les caractéristiques psychologiques des informations à stocker et sur les structures dont l'intégrité est nécessaire lors de l'encodage de ces informations. Elle présente l'avantage de rapprocher les données biologiques et neuropsychologiques et bénéficie d'une certaine souplesse. Ainsi, bien que la pertinence des notions de verbalisation et conscience pour caractériser la mémoire dépendante du lobe temporal médian soit régulièrement discutée et de nouvelles classifications toujours proposées (Henke, 2010), le modèle de Squire reste le plus utilisé.

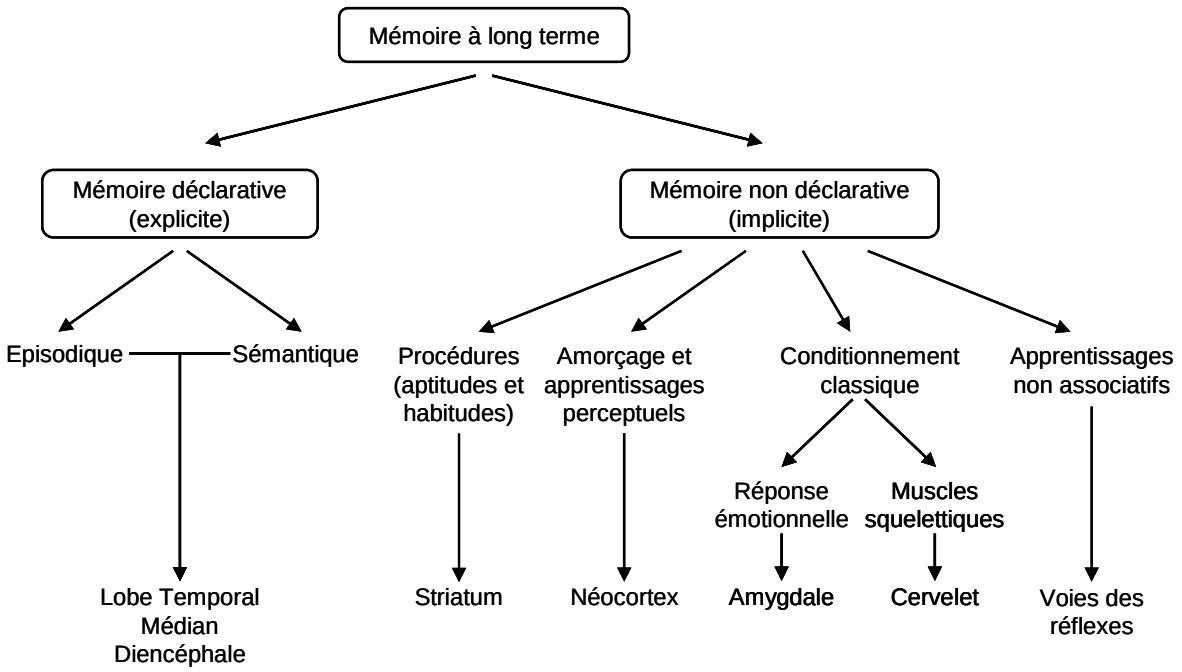



Figure 2 : Taxonomie des systèmes de mémoire à long terme (d'après Squire, 2004). Cette dichotomie a été effectuée sur la base des caractéristiques opérantes et du type d'informations traitées par chaque système, ainsi que des structures qui les sous-tendent.

- *Définitions*

La mémoire déclarative fait référence à ce que nous considérons communément comme la « Mémoire » dans notre vie de tous les jours. Elle permet le stockage des faits et des événements, personnels ou non, ainsi que leur récupération intentionnelle, consciente. Chez l'homme, ce type de mémoire est verbalisable d'où le terme de déclaratif. La mémoire déclarative dépend de l'intégrité du lobe temporal médian et elle est sélectivement perturbée chez les sujets amnésiques (Squire, 2004).

*La mémoire non déclarative* représente un ensemble hétérogène de capacités dépendantes de systèmes cérébraux multiples. Le terme de mémoire implicite proposé par Schacter a une signification comparable à celle de mémoire non déclarative utilisée par Squire (Squire, 1992, 2004). Cependant, Schacter considère la mémoire sémanitique comme une mémoie implicite.

Parmi ces mémoires implicites, (i) la mémoire procédurale concerne l'apprentissage de nombreux types d'habiletés et d'algorithmes comportementaux et cognitifs. Elle opère à un niveau automatique plutôt que sciemment contrôlé, elle peut s'exprimer de façon normale sans requérir l'intégrité des structures hippocampiques, mais elle est dépendante du striatum (Squire, 1987). Par exemple, le fait de conduire nécessite certains automatismes sensori-moteurs qui sont liés à la mémoire procédurale, et permettent de rendre la tâche automatique sans requérir une conscience permanente des gestes à accomplir.

(ii) Le système PRS ou de représentation perceptive est un terme créé par Schacter (1994) pour désigner les processus mis en œuvre dans les effets d'amorçage. L'amorçage joue un rôle très important dans l'identification des mots et des objets, il opère à un niveau pré-sémantique et implicite (non conscient). L'amorçage est un phénomène de facilitation de l'identification perceptive à partir d'indices réduits renvoyant à un stimulus préalablement rencontré (par exemple une tâche consistant à compléter une liste de mots avec seulement la première lettre comme indice). C'est la forme de mémoire implicite la plus étudiée. Ce système dépend de l'intégrité du néocortex.

(iii) Le conditionnement classique ou Pavlovien est un apprentissage associatif défini et théorisé par Ivan P. Pavlov à partir de 1889. Il consiste en l'acquisition d'une association conditionnée entre un stimulus conditionnel initialement neutre, et un stimulus inconditionnel, qui génère toujours une réponse automatique. Après plusieurs présentations associées des

stimuli neutre et inconditionnel, le stimulus neutre devient conditionnel car il peut générer seul l'expression de la réponse. Le conditionnement d'une réponse de peur, ou conditionnement « émotionnel », est dépendant de l'intégrité de l'amygdale alors que le conditionnement d'une réponse musculo-squelettique est dépendant de l'intégrité du cervelet.

(iv) Enfin, l'apprentissage non associatif correspond à la modification de réponses réflexes suite à la présentation répétée du stimulus qui les déclenche. On en distingue deux types : l'habituation, lorsque la répétition du stimulus conduit à une diminution de l'intensité de la réponse réflexe, et la sensibilisation, lorsqu'elle aboutit à une intensification de la réponse.

*La mémoire déclarative* se subdivise en deux composantes que sont la mémoire épisodique et la mémoire sémantique. La mémoire épisodique contient les souvenirs autobiographiques, elle nous permet de rappeler explicitement les événements personnels qui jalonnent notre propre histoire. Les informations rappelées sont vécues comme un souvenir, avec leur contexte spatial, temporel et émotionnel particulier. C'est cette forme de mémoire qui nous permet de « voyager mentalement dans l'espace et le temps » d'après Tulving (Tulving, 2002). On suppose que la mémoire épisodique est le système qui a évolué le plus récemment à partir de la mémoire sémantique par l'intermédiaire de la mémoire à court terme/mémoire de travail (Schacter et Tulving, 1994).

La mémoire sémantique est la mémoire des connaissances et des faits appris, comme ceux que l'on acquiert durant la scolarité. Cette mémoire permet, par un vaste réseau d'associations, de constituer notre connaissance du monde, au sens le plus large. Elle est utilisée au quotidien (les règles du code de la route, les règles de grammaire et de conjugaison), dans certains jeux (Trivial Poursuit, l'émission « Questions pour un champion »)… Contrairement à la mémoire épisodique, elle est décontextualisée, c'est-à-dire qu'elle ne nécessite pas le rappel du contexte (où, quand, comment) de l'apprentissage pour être utilisée.

- *Dissociations au sein de la mémoire déclarative : modèle Serial Parallel Independant de Tulving, une alternative au modèle de Squire*

Dans le modèle de Squire, les mémoires sémantique et épisodique sont liées tant au niveau neurobiologique (elles dépendent toutes les deux du lobe temporal médian), que fonctionnel, la mémoire épisodique étant sous la dépendance de la mémoire sémantique pour certaines de

ses opérations. Cependant, il existerait des dissociations fonctionnelles entre ces deux types de mémoire (Schacter et Tulving, 1994), ce que nous allons développer maintenant.

La théorie de Squire implique que l'élaboration de nouvelles connaissances sémantiques est impossible si la mémoire épisodique est altérée. Cette théorie est compatible avec de nombreuses observations de patients cérébro-lésés (Squire, 2004). Cependant, dans la littérature, il existe des données qui montrent que des informations sémantiques (des faits) peuvent être acquises sans intervention de la mémoire épisodique. Ces données contredisent la vision d'un système déclaratif unitaire. (Vargha-Khadem et al., 1997) décrivent trois cas cliniques de jeunes patients ayant une atteinte précoce du lobe temporal médian. Ils présentent de lourds déficits de mémoire épisodique (désorientation spatio-temporelle), mais ont un niveau de connaissances générales comparables à la moyenne, signe d'une mémoire sémantique préservée.

Dans ses travaux, Tulving présente à maintes reprises le cas d'un patient (K.C.), dont le lobe temporal médian fut lésé. Bien que présentant une amnésie antérograde majeure pour les deux versants de la mémoire déclarative, ce patient présente une claire asymétrie concernant le versant rétrograde de l'amnésie. Sa mémoire épisodique est plus sévèrement touchée que sa mémoire sémantique (Tulving et al., 1988; Tulving et al., 1991; Rosenbaum et al., 2005). Sur la base de ces observations, Tulving propose un modèle d'organisation monohiérarchique des systèmes de mémoire fondé sur cinq systèmes (Figure 2), représentant une alternative à la classification de Squire. Selon ce modèle, l'encodage comporte une dimension sérielle (l'encodage dans un système va dépendre de la qualité de l'encodage dans le ou les systèmes inférieurs), et le stockage va s'effectuer en parallèle dans les différents systèmes où les mêmes informations peuvent être encodées sur des modes différents. Enfin, la récupération des informations stockées se ferait dans le système le plus adapté et serait indépendante des autres systèmes. De façon concrète, ce système permet d'expliquer l'amnésie rétrograde asymétrique. En effet, au moment de l'encodage ou formation de la mémoire déclarative, le système sémantique (dépendant de la région parahippocampique) interviendrait antérieurement au système épisodique (dépendant de l'hippocampe).

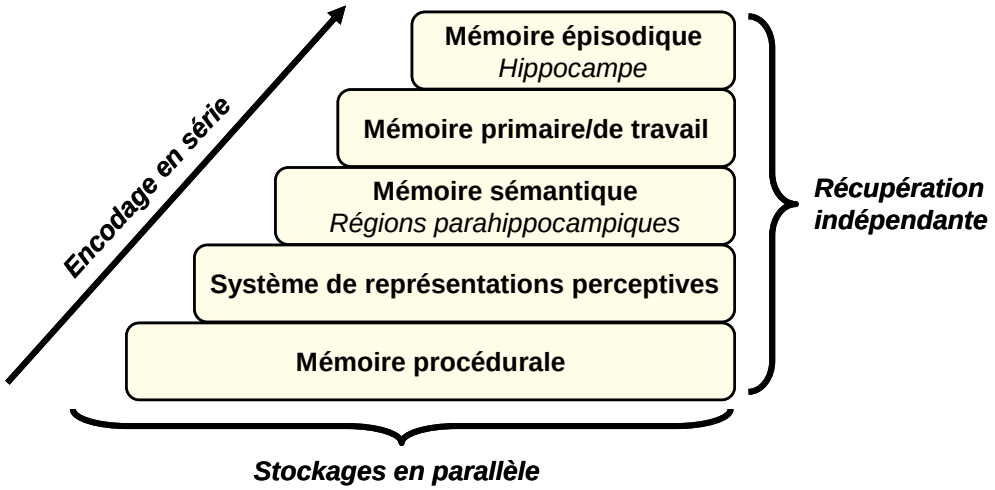



Figure 2 : Modèle théorique SPI (Serial Parallel Independant) de l'organisation des systèmes de mémoire selon Tulving (1995).

## I.C –Limites du concept de systèmes de mémoire : les interactions

L'idée que la fonction mnésique repose sur des systèmes distincts est fondatrice de la neurobiologie de la mémoire contemporaine. Pourtant, cette conception présente des limites, car la mémoire n'est pas une entité figée, mais un processus dynamique qui suppose que les différents systèmes qui la produise travaillent ensemble, interagissent.

- *Interactions entre mémoire à court terme et mémoire à long terme*

Le modèle princeps proposé par Atkinson et Shiffrin en 1968 (Atkinson et Shiffrin, 1968) supposait un continuum entre mémoire à court terme et mémoire à long terme. Les informations sensorielles en mémoire à court terme donnent lieu soit à une réponse, soit à un stockage en mémoire à long terme. Les informations en mémoire à long terme peuvent être rappelées dans le stock à court terme si une situation particulière le requiert.

Cependant, ce modèle ne permettait pas d'expliquer pourquoi des patients ayant un important déficit de mémoire à court terme avaient apparemment une mémoire à long terme normale avec des capacités d'apprentissage, de compréhension et de raisonnement préservées (Baddeley et Hitch, 1974). Le modèle de mémoire de Baddeley précédemment cité permet d'expliquer une telle différence. Originellement, ce modèle traitait séparément les mémoires de travail et à long terme car les patients étudiés montraient un clair déficit de mémoire à

court terme phonologique sans atteinte de la mémoire à long terme (Baddeley et Hitch, 1974). Mais la poursuite des travaux a montré que ces patients possédaient également un déficit de rétention à long terme d'informations phonologiques (Baddeley, 2000), mettant à mal la séparation couramment admise entre les systèmes à court et à long terme. Comme nous l'avons vu, le modèle de Baddeley récemment modifié comprend un nouveau composant, appelé tampon épisodique, qui aurait précisément une position centrale à l'interface de la mémoire de travail et de la mémoire à long terme (de type épisodique).

Plus globalement, un ensemble de travaux récents remettent explicitement en question l'idée de la séparation des systèmes de mémoire à court terme et de mémoire à long terme, et suggère une implication de l'hippocampe dans les deux formes de mémoire. En effet, les sujets présentant une atteinte du lobe temporal médian peuvent présenter, outre le déficit de mémoire déclarative, des déficits dans certaines tâches de mémoire de travail ciblant le tampon épisodique (Berlingeri et al., 2008; Luck et al., 2010b). Par ailleurs, des études d'imagerie fonctionnelle montrent que l'hippocampe est « activé » pendant l'exécution de tâche mémoire à court terme/de travail (Hales et Brewer, 2010; Luck et al., 2010a). Enfin, des enregistrements électrophysiologiques montrent que l'hippocampe est le lieu d'interactions compétitives entre mémoire de travail et mémoire à long terme (Axmacher et al., 2010b).

A ce jour, le débat se poursuit entre les partisans du dogme de la séparation et donc de la non implication de l'hippocampe dans la mémoire à court terme (Squire et Knowlton, 1996; Baddeley et al., 2010; Jeneson et al.) et les opposants au dogme, qui défendent l'idée que des représentations de même nature, et dont certaines reposent sur le traitement hippocampique, transitent de la mémoire de travail vers la mémoire déclarative à long terme (Hannula et al., 2006; Ranganath, 2010). Comme nous le verrons, un des objectifs de notre travail sera de contribuer à ce débat, en montrant qu'une interaction spécifique entre mémoire de travail et mémoire déclarative est sous-tendue par la région CA1 hippocampique au moment de l'apprentissage, et que l'altération de cette interaction est à l'origine du déficit de mémoire déclarative lié au vieillissement.

- *Interactions entre mémoire déclarative et mémoire non déclarative : la théorie MPMS (Multiple Parallel Memory Systems)*

S'il existe bien différents systèmes d'acquisition et de conservation de l'information, ceux-ci doivent alors être capables de communiquer entre eux afin de fonctionner de façon cohérente dans le but de produire un comportement adapté à une situation donnée. Cette

notion d'interaction entre les systèmes de mémoire a été évoquée par plusieurs auteurs (Jaffard et Meunier, 1993; White et McDonald, 2002; Poldrack et Packard, 2003), et suppose que les différents systèmes puissent fonctionner de façon indépendante, en coopérant ou en compétition.

La théorie MPMS établie par White et McDonald en 2002 reprend l'idée qu'il existe plusieurs systèmes de mémoire dépendants de territoires cérébraux distincts. Chaque système présente une structure cérébrale centrale et se caractérise par sa capacité à ne traiter qu'un seul type d'information. Sans exclure la présence d'autres systèmes, les auteurs se concentrent sur trois principaux systèmes : le système hippocampique traitant les associations stimulus-stimulus, le système striatal encodant les associations stimulus-réponse et le système amygdalien associant un stimulus à un renforcement. Chaque événement ou procédure expérimentale est composé de différents éléments (stimulus, réponse ou renforcement) dont la relation va déterminer la stratégie de réponse utilisée. Ainsi, dans une situation donnée, ces trois systèmes sont activés en même temps au départ et fonctionnent en parallèle. La sélection du système prépondérant dans la réponse se ferait a posteriori par évaluation de la pertinence du type d'association. Chaque situation d'apprentissage et mémorisation serait caractérisée par une « configuration » particulière d'activité au sein et entre ces différents systèmes.

## I.D – Modélisation de la mémoire déclarative chez l'animal

Le concept de mémoire déclarative ne peut être transposé tel quel aux études effectuées chez l'animal. La limite évidente à une transposition est que les animaux ne peuvent justement pas exprimer leurs souvenirs par des déclarations verbales, accréditant la thèse que la mémoire déclarative est une forme de mémoire exclusivement humaine. La mémoire déclarative ne peut donc qu'être modélisée. Deux stratégies non exclusives peuvent être utilisées pour cette modélisation : (i) réduire la mémoire déclarative à des opérations ou des propriétés élémentaires indépendantes des capacités de verbalisation (ii) étudier la fonction de la structure cérébrale essentielle à cette mémoire, c'est-à-dire la fonction hippocampique.

- *La mémoire « episodic-like » : le quoi-où-quand ?*

De nombreux auteurs (Wheeler et al., 1997; Roberts, 2002; Tulving, 2002) remarquent que la mémoire épisodique suppose la possibilité de « voyage mental spatio-temporel », cette capacité étant réduite à l'homme. En effet, l'homme est la seule espèce qui possède une conscience auto-noétique, c'est-à-dire la possibilité qu'a l'individu de prendre conscience de sa propre identité dans un temps subjectif (le « Soi ») qui s'étend du passé au futur et lui permet une impression subjective du souvenir.

Afin de modéliser la mémoire épisodique, plusieurs études l'ont redéfinie en la réduisant à ses caractéristiques les plus simples, les auteurs parlant alors de mémoire « *episodic-like* » (Morris, 2001). Ainsi, l'étude de la mémoire épisodique chez l'animal tente-t-elle de vérifier la capacité de certaines espèces à manipuler le *quoi ?* (« que s'est-il passé »), le *où ?* (« à quel endroit cela s'est-il passé ») et le *quand ?* (« à quel moment cela s'est-il passé ») d'un épisode vécu récemment.

Dans cette optique, les travaux les plus cités sont sans conteste ceux de l'équipe de N. Clayton (1998) concernant le comportement de cache de la nourriture chez le geai. Dans cette expérience, les geais doivent initialement cacher dans deux cupules différentes soit des vers, leur nourriture préférée mais périssable, soit des cacahuètes non périssables. Après un délai court ou long, les oiseaux sont remis en présence des deux cupules ayant servi à cacher la nourriture. Lorsque le délai est court, les geais visitent préférentiellement la cupule ayant servi à cacher des vers. En revanche, lorsque le délai est long, les geais préfèrent visiter la cupule ayant servi à cacher les cacahuètes. Cet oiseau semble donc capable d'intégrer les trois éléments caractérisant la mémoire épisodique : le *quoi* (quel type de nourriture a été cachée ?) ; le *où* (à quel endroit chaque type de nourriture a été cachée ?) ; le *quand* (à quel moment est intervenu la cache de nourriture ?) (Clayton et Dickinson, 1998; Griffiths et al., 1999; Clayton et al., 2003). Cette étude montre avec élégance la capacité des geais à manifester un comportement *flexible* à partir de plusieurs données mises en mémoire.

Récemment, le même type d'expérience fut adapté chez le rat qui semble capable, dans un labyrinthe radiaire, de manipuler le *quoi ?*, le *où ?* et, de façon plus controversée, le *quand ?* de l'épisode mémorisé (Bird et al., 2003; Babb et Crystal, 2006a, 2006b; Naqshbandi et al., 2007). En définitive, même en réduisant la mémoire épisodique à ses plus simples opérations cognitives, il s'avère que très peu d'études ont réussi à modéliser conjointement les trois aspects principaux d'un épisode chez l'animal.

- *L'hippocampe et la théorie des cartes spatiales*

Une autre approche du problème est de s'intéresser au rôle de la structure essentielle de ce système chez l'homme, plutôt que d'essayer de définir la mémoire déclarative chez l'animal. Dans cette perspective, la découverte chez le rat des cellules de lieu en 1971 (O'Keefe et Dostrovsky, 1971) fût d'une importance majeure. Ces cellules déchargent spécifiquement lorsque l'animal se situe dans un lieu précis d'un environnement nouveau et conservent cette spécificité de champs lorsque l'animal est replacé dans ce même environnement.

Cette découverte permit en effet à O'Keefe et Nadel (O'Keefe et Nadel, 1978) de formuler, dès 1978, l'hypothèse selon laquelle l'hippocampe serait nécessaire à l'encodage et au stockage des informations spatiales sous une forme proche de celle d'une carte cognitive spatiale. Cette carte contient les éléments principaux d'un environnement et leurs positions relatives (associations complexes de type stimulus-stimulus). Elle sous-tend les capacités très développées chez le rongeur d'optimisation d'un trajet par l'utilisation de détours, ou de raccourcis (Alvernhe et al., 2008). Ces capacités qui correspondent à une utilisation flexible de la connaissance d'un environnement sont toutes abolies par la lésion de l'hippocampe (Morris et al., 1982; Packard et McGaugh, 1992). Cette lésion préserve, en revanche les stratégies de guidage (aller vers…, tourner à gauche…) basées sur le *taxon system* (associations de type stimulus-réponse) qui permet l'apprentissage d'un trajet stéréotypé, mais n'autorise aucune flexibilité.

Cette théorie a permis le développement des nombreuses tâches dites spatiales qui sont le plus souvent utilisées pour étudier la fonction hippocampique, c'est-à-dire l'équivalent de la mémoire déclarative chez l'animal ((Sharma et al.) pour revue).

- *Généralisation des cartes spatiales aux représentations relationnelles : le modèle d'Eichenbaum et Cohen*

Parce que l'amnésie « hippocampique » chez l'homme ne se cantonne pas aux aspects spatiaux des épisodes, Eichenbaum et Cohen ont généralisé la théorie spatiale d'O'Keefe et Nadel à partir de la notion de flexibilité qui distingue les cartes spatiales du *taxon system*.

En effet, dans sa définition des mémoires déclarative et procédurale, N. Cohen (Cohen, 1984) précise qu'en dehors de toute verbalisation ou conscience, la mémoire déclarative est caractérisée par son expression flexible. Il suggère qu' « un code déclaratif »

offre la capacité de comparer et d'opposer des informations issues de différents processus ou systèmes. Il donne la capacité d'inférences ou de généralisation à partir d'expériences acquises séparément. A l'inverse, les apprentissages procéduraux reflètent l'acquisition d'habiletés, d'adaptations comportementales n'autorisant aucune extrapolation à une situation nouvelle.

Selon la théorie d'Eichenbaum (Figure 4), cette flexibilité caractéristique de la mémoire déclarative repose sur une représentation mnésique de nature particulière, dite relationnelle. Cette représentation comprend les éléments principaux des expériences passées ainsi que les relations possibles entre ces expériences (Eichenbaum et al., 1988; Eichenbaum et al., 1989). Ce qui fait la spécificité de ces représentations, c'est qu'elles sont insérées dans un réseau de relations et d'associations qui permettent de réactiver tout ou partie d'un souvenir dans des contextes très variés, et donc d'en faire un usage flexible. Les mémoires non déclaratives, en revanche, reposeraient sur des représentations isolées non flexibles, établies par la répétition (mémoire procédurale), et ne pouvant être réactivées que dans le cadre initial de l'apprentissage (Squire et al., 1984).

L'hippocampe est essentiel au traitement relationnel des informations. Plusieurs études lésionnelles ont démontré son implication dans l'utilisation flexible d'informations (Eichenbaum et al., 1988; Eichenbaum et al., 1989; Eichenbaum et al., 1990; Marighetto et al., 1999; Etchamendy et al., 2003; Mingaud et al., 2007). En outre, la position particulière de l'hippocampe dans le cerveau et les propriétés associatives spécifiques des synapses hippocampiques confère à cette structure des propriétés computationnelles a priori adaptées à la formation de représentations relationnelles. En effet, l'hippocampe reçoit des afférences convergentes issues des différents cortex associatifs, et ces entrées sont largement distribuées au sein des différentes subdivisions de l'hippocampe (Amaral et Witter, 1995) qui jouerait un rôle d'intégrateur (Wallenstein et al., 1998; Eichenbaum, 1999; Shohamy et Wagner, 2008) pour revue). Comme nous le verrons ultérieurement, les propriétés synaptiques intrinsèques à l'hippocampe permettraient la formation de représentations associatives ainsi que l'organisation séquentielle des représentations permettant la formation des représentations relationnelles (Levy, 1996; Wallenstein et al., 1998; Eichenbaum, 2004).

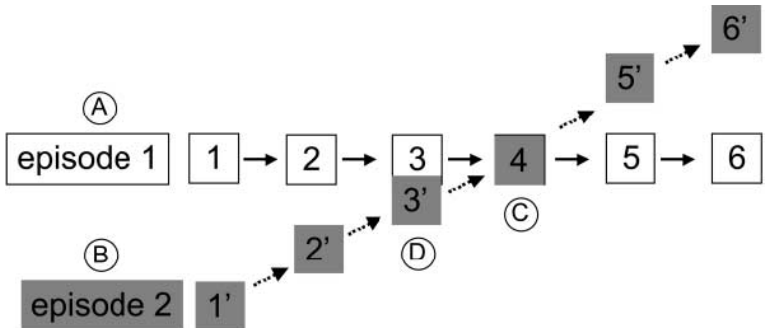



Figure 4 : Schéma d'un réseau relationnel simple. Le réseau est composé de deux souvenirs épisodiques (A et B), chacun étant constitué par une séquence d'éléments (de 1 à 6) qui représentent la conjonction d'un événement et du lieu où il s'est produit. C est un élément qui contient les mêmes caractéristiques entre les deux épisodes. D est un élément qui contient seulement quelques informations communes (repris de Eichenbaum, 2004). De ce réseau relationnel se dégagent deux propriétés principales. Tout d'abord, les différents éléments vont pouvoir être comparés et contrastés, rendant la mémoire flexible. Ensuite, les caractéristiques communes entre ces éléments vont former des représentations sémantiques indépendantes du temps, car toujours vraies.

- *La théorie relationnelle appliquée au labyrinthe radiaire*

Partant de cette théorie, A. Marighetto et R. Jaffard ont développé un paradigme comportemental en labyrinthe radiaire modélisant la mémoire relationnelle/déclarative chez la souris (Marighetto et al., 1999). La tâche comprend deux étapes : l'acquisition (en plusieurs séances) d'informations séparées concernant la position de la nourriture dans le labyrinthe (3 bras sont toujours appâtés, 3 autres ne le sont jamais) suivie d'un test de flexibilité mnésique, nécessitant de combiner ou recombiner les informations acquises séparément pour effectuer un choix adapté.

Deux versions de la tâche ont été développées. Dans une première version, les six bras sont présentés individuellement lors de l'acquisition (selon une procédure dite de discrimination en « go/no-go »), puis ils sont combinés en trois paires de bras adjacents pour le test de flexibilité. Dans le second protocole, les six bras sont d'abord présentés par paires (chacune des trois paires possédant un bras appâté et un bras non appâté); dans la phase test, une paire est « recombinée » à partir de deux paires initiales pour tester la flexibilité mnésique, la troisième paire apprise sert de contrôle positif (inchangé), une nouvelle paire de bras non appris sert de contrôle négatif.

La capacité comparer et contraster les informations indirectement reliées qu'ils ont appris au cours de l'acquisition (Eichenbaum, 2004) est un exemple d'expression mnésique flexible, et permet donc de modéliser la mémoire relationnelle/déclarative. Les travaux réalisés antérieurement sur ce modèle ont mis en évidence l'altération préférentielle de la

mémoire relationnelle/déclarative (c'est-à dire acquisition apparemment normale mais déficit lors du test de flexibilité) suite à une atteinte hippocampique et au cours du vieillissement (Marighetto et al., 1999; Etchamendy et al., 2003).

Les résultats de ces études sont conformes à l'idée que l'hippocampe joue un rôle critique dans le traitement relationnel (ou *binding*) des informations nécessaire à la flexibilité de la mémoire. En outre, ils ont montré que le traitement hippocampique essentiel à la formation de représentations flexibles est effectué online pendant l'apprentissage. En effet, l'hippocampe n'est pas nécessaire à l'acquisition initiale des informations séparées mais l'apprentissage sous inactivation transitoire de l'hippocampe (injection locale de lidocaïne juste avant chaque séance d'acquisition) aboutit à une mémoire inflexible (Mingaud et al., 2007). Cette implication de l'hippocampe dans le traitement « *online* » des informations suggère une mise en jeu de la mémoire de travail dans la formation de la mémoire déclarative. Cette hypothèse fera l'objet d'une partie de notre travail de thèse.

# Partie II – Mémoire et vieillissement

Le vieillissement correspond à l'ensemble des processus physiologiques et psychologiques qui modifient la structure et les fonctions de l'organisme à partir de l'âge mûr. Il est la résultante des effets intriqués de facteurs génétiques (vieillissement intrinsèque) et de facteurs environnementaux auxquels est soumis l'organisme tout au long de sa vie. Ce processus est lent, progressif et se caractérise par une augmentation de la variabilité interindividuelle rendant parfois difficile la distinction entre vieillissement normal et vieillissement pathologique. Un de nos organes principaux, le cerveau, est particulièrement sensible aux effets du vieillissement. Parmi les atteintes cérébrales, la mémoire sous sa forme déclarative est une fonction particulièrement touchée. Son atteinte est particulièrement flagrante et exacerbée dans le cas du vieillissement pathologique de type maladie d'Alzheimer. Ce déficit serait la résultante d'altérations multiples aboutissant à une perturbation du fonctionnement hippocampique, principal substrat neurobiologique de la mémoire déclarative. Le vieillissement affecte également le système cholinergique central, dont l'altération a été décelée au cours des années 1970. Ces premières observations sur le déficit cholinergique furent à l'origine de l'hypothèse cholinergique du vieillissement mnésique (Bartus et al., 1982). Cette hypothèse a orienté les recherches pendant plusieurs décennies et a aboutit aux premiers traitements pharmacologiques (anti-cholinestérasiques) ayant pour but de restaurer les capacités mnésiques altérées chez les personnes âgées atteintes de la pathologie Alzheimer.

Au cours de cette deuxième partie introductive, nous décrirons brièvement les déficits apparaissant dans les différents types de mémoire, puis successivement les altérations du fonctionnement cérébral à l'échelle structurale et systémique (données chez l'homme), et aux niveaux cellulaire et moléculaire (données chez l'animal). Dans une dernière partie, nous décrirons les perturbations du système cholinergique observées au cours du vieillissement.

## II.A – Les formes de mémoire altérées

- *La mémoire à court terme/de travail*

L'altération de la mémoire de travail est l'une des caractéristiques principales du vieillissement normal. La mémoire de travail comprend deux dimensions essentielles, la

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

Depuis plus de 40 ans, de nombreuses théories ont été proposées pour rendre compte du déclin de la mémoire de travail et des fonctions exécutives au cours du vieillissement. Ces théories mettent, selon le cas, l'accent sur la vitesse de traitement, la gestion des ressources attentionnelles, ou le défaut d'auto-initiation de processus de traitement et/ou organisation des informations (Salthouse, 1996; Grady et Craik, 2000).

- *La mémoire déclarative*

D'une manière générale, la composante épisodique de la mémoire déclarative se révèle particulièrement affectée par le vieillissement normal et dans les phases précoces de la maladie d'Alzheimer, la composante sémantique étant relativement épargnée (Grady et Craik, 2000; Hedden et Gabrieli, 2004). Ainsi, les événements autobiographiques récents sont moins bien mémorisés chez les personnes âgées (Piolino et al., 2002). Ces dernières sont également très affectées dans leur capacité à se rappeler consciemment des souvenirs d'évènements passés, et en particulier du contexte dans lequel ils ont eu lieu. Elles présentent des difficultés dans l'association des événements entre eux (Naveh-Benjamin, 2000) et dans l'association des différentes informations composant un événement afin d'en construire une représentation cohérente (Chalfonte et Johnson, 1996).

Parmi les différentes capacités épargnées par le vieillissement, on peut citer la mémoire de reconnaissance (Nyberg et al., 1996; Piolino et al., 2002) ou la reconnaissance d'objets (Grady et Craik, 2000).

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

- *La mémoire non déclarative*

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

## II.B Les altérations systémiques : données de l'imagerie fonctionnelle chez l'homme

- *Quelques généralités*

L'imagerie cérébrale est un moyen permettant de « voir notre esprit ». Plusieurs techniques ont été développées dans le but d'étudier de façon non invasive notre cerveau lorsque nous sommes en train de « penser ». Ces approches permettent d'observer les variations d'activité des régions cérébrales au cours d'une tâche. Ces approches ont ainsi pu être utilisées afin de caractériser les modifications d'activité cérébrales survenant au cours du vieillissement afin de les relier aux déficits mnésiques constatés, notamment concernant la mémoire déclarative de type épisodique. En effet, cette forme de mémoire est, nous l'avons vu dans le paragraphe introductif, préférentiellement altérée au cours du vieillissement. La question est de savoir quelles sont les structures impliquées dans ce déficit.

Tout d'abord, nous devons définir ce que nous entendons par « variation d'activité cérébrale ». Contrairement à ce que l'on pourrait communément penser, l'activité basale du cerveau, c'est-à-dire l'activité sans aucune forme de sollicitation extérieure, n'est pas nulle. Au contraire, lors de cet état basal, un réseau défini de régions cérébrales s'avère actif. Ce réseau, plus connu sous le nom de *Default Network* ou *Default mode Network* (Buckner et al., 2008), comprend les régions temporales médianes, préfrontales médianes, cingulaires postérieures/rétrospléniales, ainsi que d'autres cortex de la région cérébrale médiane. A partir de cet état de base, deux types d'activité peuvent être distingués : l'activation, lorsque la

région cérébrale concernée est plus sollicitée par rapport à l'état de base ; la désactivation, lorsque la région cérébrale concernée est moins activée par rapport au niveau de base. Il semble que la désactivation du *Default mode Network* se produise lorsque le sujet effectue un tâche requérant son attention (Daselaar et al., 2004). Cette dynamique cérébrale est au cœur des processus mnésiques liés aux mémoires explicites comme la mémoire épisodique ou la mémoire de travail. Son altération semble être reliée aux déficits mnésiques observés au cours du vieillissement.

- *Réduction de l'activation asymétrique au cours du vieillissement*

De nombreuses études ont montré que l'activité du cortex préfrontal est asymétrique lorsque la mémoire épisodique est mise en jeu. En effet, il a été observé chez les individus jeunes une augmentation de l'activité du cortex préfrontal gauche lors de l'encodage d'informations épisodiques, alors qu'aucune activation n'est observée dans le cortex préfrontal droit. Au contraire, au cours du rappel des informations, une activation du cortex préfrontal droit est remarquée. Cette asymétrie dans l'activité du cortex préfrontal dans les processus d'encodage et de rappel de la mémoire épisodique est plus connue sous le nom de modèle HERA, pour *hemispheric encoding/retrieval asymetry* (Tulving et al., 1994).

Cependant, cette asymétrie observée chez les sujets jeunes ne semble pas pouvoir être transposée aux sujets âgés. En effet, Cabeza et collaborateurs (Cabeza, 2002) ont noté que la latéralisation du cortex préfrontal diminue chez les personnes âgées que ce soit dans l'encodage ou le rappel des informations épisodiques, ou dans une tâche de mémoire de travail (Reuter-Lorenz et al., 2000). Ce phénomène, connu sous le nom de modèle HAROLD (pour *hemispheric asymetry reduction in older adults*) peut être interprété comme un phénomène de compensation cognitive afin de contrer le déclin neuronal et cognitif lié à l'âge (Cabeza, 2002; Manenti et al., 2010). En effet, les individus âgés ayant de bonnes performances mnésiques présentent cette diminution d'asymétrie du cortex préfrontal, alors que les individus ayant de mauvaises performances restent latéralisés.

Cette activation préfrontale compensatrice chez certains sujets âgés avait déjà été observée par Grady et ses collaborateurs (Grady et al., 1994; Grady et al., 1995) lors d'une étude d'imagerie utilisant deux tâches, de perception de visages et de localisation. Ces auteurs remarquèrent que dans les deux tâches, les sujets âgés présentent une activité des régions occipito-temporales plus faibles que les sujets jeunes. Par ailleurs, les sujets âgés activent davantage des régions antérieures, incluant le cortex préfrontal. Ce phénomène, nommé

PASA (pour *posterior anterior shift in aging*) est considéré comme étant une compensation fonctionnelle du défaut d'activation des régions occipito-temporales (Davis et al., 2008).

Contrairement à ce qui peut être observé dans le cortex préfrontal, une diminution de l'activité hippocampique au moment de l'encodage est plus systématiquement associée à un déficit de restitution des informations épisodiques chez la personne âgée (Grady et al., 1995). Par ailleurs, l'activité hippocampique ne semble pas être toujours latéralisée. Il existe certes quelques exemples de latéralisation, mais qui sont fonction de la tâche mnésique utilisée et/ou du type de mémoire sollicitée (Grady et al., 1995; Mitchell et al., 2000a; Maguire et Frith, 2003). Par ailleurs, la réduction d'asymétrie prédite par le modèle HAROLD n'a pas véritablement été explorée dans l'hippocampe lors de l'exécution de tâches épisodiques. Néanmoins, une étude effectuée par Grady et collaborateurs évoque cette possibilité (Grady et al., 2002). Ces auteurs montrent que dans une tâche de mémorisation de visages (tâche épisodique), une corrélation positive entre l'activité temporale médiane et les performances mnésiques dans l'hémisphère gauche est trouvée chez des sujets jeunes. Chez les sujets âgés, de telles corrélations ont été trouvées dans les deux hémisphères.

Enfin, s'il existe au cours du vieillissement des phénomènes de suractivations dans l'hippocampe, comme dans le cortex préfrontal, il semble toutefois que la signification fonctionnelle de la suractivation soit différente entre les deux structures. Alors qu'elle apparait compensatrice dans le cortex préfrontal et assurant un maintien des capacités mnésiques, il semble que les suractivations hippocampiques reflètent davantage un déclin des capacités cognitives. Plus précisément, la littérature montre qu'une sur-activation hippocampique chez des sujets âgés MCI lors d'une tâche de mémoire épisodique prédirait un développement futur de la maladie d'Alzheimer (Sperling, 2007; Miller et al., 2008a; O'Brien et al., 2010).

- *L'hypothèse de la dédifférenciation liée au vieillissement*

Nous venons de voir que la réduction d'asymétrie dans l'activité cérébrale du sujet âgé pouvait refléter un mécanisme compensatoire. Ce phénomène pourrait également refléter une incapacité à recruter des territoires spécialisés au sein du cortex préfrontal, selon l'hypothèse de la dédifférenciation (Grady et al., 2002). La dédifférenciation ne touche pas uniquement le cortex préfrontal, elle semble concerner également les systèmes de mémoire déclarative et procédurale. En effet, une étude récente effectuée par (Dennis et Cabeza, 2010) montre que les sujets jeunes recrutent logiquement le lobe temporal médian lors d'un apprentissage

explicite, et le striatum au cours d'un apprentissage implicite. Ces activations se trouvent réduites chez les individus âgés qui, en revanche, recrutent le lobe temporal médian dans les deux apprentissages, c'est-à-dire aussi lors de l'apprentissage implicite. Cette dédifférenciation suggère que des régions cérébrales fortement spécialisées pour certains processus cognitifs chez les individus jeunes deviennent moins spécialisées avec l'âge.

Cette hypothèse de la dédifférenciation est compatible avec celle de la coopération des systèmes. En effet, la dédifférenciation entraînerait une réduction de la compétition entre les systèmes de mémoire (Dennis et Cabeza, 2010). Ainsi, ces derniers pourraient agir ensemble au cours d'un apprentissage, leur activation mutuelle permettant de compenser la perte de fonction au sein d'une région spécifique.

- *La désactivation*

Bien que la majorité des études s'intéresse aux activations cérébrales, la désactivation est également importante pour de nombreux processus cognitifs (Mazoyer et al., 2001). Il a été montré que la désactivation du cortex postérieur médian durant l'encodage était associée à de bonnes performances mnésiques (Daselaar et al., 2004), alors que l'absence de désactivation observée chez les personnes âgées a été reliée aux déficits mnésiques (Miller et al., 2008b). Par ailleurs, une étude effectuée par l'équipe de Sperling (Vannini et al., 2010) montre chez des individus jeunes, à l'aide d'une tâche d'association visage-nom (requérant la mémoire épisodique), que les cortex postéro-médian (incluant le cortex parietal postero-latéral, le precuneus, et le cortex cingulaire postérieur/retrosplénial) sont désactivés lors d'un encodage réussi, alors qu'ils sont activés pendant un rappel réussi. Au cours de ces deux processus, l'hippocampe et le cortex préfrontal sont activés bilatéralement. Ce résultat est intéressant car nous avons pu voir que ces cortex postéro-médians font partie intégrante du *Default Mode Network*, le réseau de structures actives au repos, et qui se désactivent lors de la réalisation d'une tâche avec attention dirigée vers des stimuli externes.

L'étude précédente suggère l'existence de deux modes opposés de fonctionnement cérébral. Un premier mode « d'attention orientée vers l'intérieur » incluant le rappel mnésique, la restitution ou le souvenir, lors duquel le *Default Mode Network* est requis. Un second mode « d'attention orientée vers l'extérieur » incluant l'encodage, qui nécessite une désactivation du *Default Mode Network* (Daselaar et al., 2004; Buckner et al., 2008; Vannini et al., 2010).

Ces deux modes de fonctionnement se révèlent particulièrement intéressants dans la perspective du vieillissement. Comme nous l'avons vu, il a été remarqué qu'une moindre désactivation du *Default Mode Network* chez les sujets âgés était corrélée au déclin mnésique (Miller et al., 2008b). Selon Sperling, (Vannini et al., 2010), le défaut d'inhibition du *Default Mode Network* résulterait d'une incapacité à supprimer le mode « d'attention orientée vers l'intérieur », et expliquerait le manque de ressources attentionnelles et le ralentissement du traitement de l'information, deux mécanismes généraux suggérés depuis longtemps comme étant à l'origine du vieillissement cognitif (Salthouse, 1996; Grady et Craik, 2000). De ce fait, la perturbation mnésique est d'autant plus importante que la tâche requiert un effort important et une forte demande en ressources cognitives.

## II.C – Etudes chez l'animal : altérations hippocampiques cellulaires et moléculaires

- *Au plan neuropsychologique*

Les études du vieillissement menées essentiellement chez le singe et les rongeurs confortent globalement l'ensemble des observations rapportées chez l'homme. Comme le résume la revue de (Gallagher et Rapp, 1997), les animaux âgés présentent tout d'abord des déficits dans toutes les tâches spatiales ou relationnelles sensibles à la lésion de l'hippocampe. Ils sont également moins performants que leurs congénères jeunes dans des tâches impliquant la mémoire à court terme/de travail et son utilisation stratégique, reposant sur le cortex préfrontal (Cruz et al., 2004; Schoenbaum et al., 2006). Comme chez l'homme, la variabilité interindividuelle augmente chez les animaux âgés aboutissant dans certains cas à la séparation du groupe âgé entre « unimpaired » et « impaired ». Cette distinction n'est cependant pas observée dans toutes les tâches. Par exemple, le déficit de mémoire relationnelle/déclarative dans le modèle de Marighetto et collaborateurs (Marighetto et al., 1999), révèle un déficit de flexibilité mnésique pour l'ensemble du groupe âgé. Ceci amène à penser que, comme suggéré chez l'homme, le vieillissement pourrait affecter de façon systématique certains processus, mais pas tous. Le traitement relationnel ou « *binding* » des informations pourrait être un des processus dégradé chez tous les sujets. Les déficits observés uniquement sur une sous-population de sujets âgés pourraient en revanche être le signe d'un vieillissement pathologique. Ces observations suggèrent qu'au moins dans certaines conditions, l'animal

pourrait être considéré comme un modèle de vieillissement pathologique de type Alzheimer (cf (Gallagher et Rapp, 1997)).

Toutefois, c'est essentiellement au plan cellulaire et intracellulaire que les études menées chez l'animal ont apporté le plus de connaissances nouvelles sur le vieillissement. Précisément, outre quelques modifications morphologiques, ces études ont mis en évidence des altérations des propriétés biophysiques, de l'expression génique, affectant la dynamique des ensembles cellulaires (cellules de lieu et plasticité synaptique ; (Burke et Barnes, 2006) pour revue).

- *Altérations des propriétés des cellules de lieu*

Le vieillissement affecte également les cellules de lieu, ces cellules impliquées dans la formation des cartes spatiales et permettant une navigation flexible. Ces cellules sont localisées dans le CA1 et le CA3 et augmentent leur fréquence de décharge lorsque l'animal se situe à un endroit particulier de l'espace (O'Keefe et Dostrovsky, 1971). Chez des rats jeunes, on observe une expansion de la zone associée à la décharge d'une cellule de lieu du CA1 lorsque ces derniers empruntent un chemin répétitif (un chemin circulaire par exemple). Chez des rats âgés, l'amplitude de cette expansion est significativement réduite (Shen et al., 1997). Les cellules de lieu des animaux âgés sont à la fois moins stables lors d'expositions répétées à un même environnement et moins flexibles lorsque des modifications de l'environnement entrainent une refonte de la cartographie chez les animaux jeunes (Wilson et al., 2006). De même, quand de jeunes rats sont placés dans deux environnements différents, ils encodent rapidement un patron de décharge spécifique de chaque environnement (*pattern separation*). Au contraire, les animaux âgés conservent des patrons de décharges similaires dans les deux environnements, ce qui traduirait une altération du *pattern separation* au profit du *pattern completion* (Wilson et al., 2003; Wilson et al., 2006).

- *Altérations morphologiques*

Le vieillissement s'accompagne d'une modification de la densité des synapses et des épines dendritiques, mais qui ne semble pas concerner l'intégralité du cerveau. Tout d'abord, les synapses voient leur nombre diminuer avec l'âge. Une étude de microscopie électronique montre que chez le rat âgé on observe une diminution de 27% du nombre de synapses axo-dendritiques dans le gyrus denté en comparaison avec des jeunes rats (Bondareff et

Geinisman, 1976). De plus, il a été montré que des déficits de mémoire spatiale seraient reliés à une réduction des synapses entre cellules granulaires et voie perforante (Geinisman et al., 1986).

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

- *Altérations de la plasticité synaptique*

La mise en évidence de l'existence de la plasticité synaptique vient de la découverte du phénomène de potentialisation à long terme (PLT), décrit pour la première fois en 1973 par Bliss et Lomo (Bliss et Lomo, 1973). Les auteurs montrent qu'à la suite d'un court train de stimulation électrique à haute fréquence (« stimulation tétanique ») de la voie perforante, se produit une augmentation rapide et durable de l'amplitude des potentiels post-synaptiques excitateurs enregistrés dans le gyrus denté, ainsi qu'une diminution du seuil d'induction des potentiels d'action. Ce phénomène, qualifié de PLT et observé dans la formation hippocampique, fut la première preuve de l'existence d'une plasticité synaptique chez les mammifères et fut rapidement proposé comme modèle cellulaire de stockage de l'information (Teyler et DiScenna, 1985; Lynch et al., 2007).

De nombreuses études ont montré des altérations de cette plasticité chez les animaux âgés. Plus précisément, les études électrophysiologiques menées sur tranches d'hippocampe montrent qu'au cours du vieillissement, se produit une augmentation du seuil d'induction ainsi qu'un déficit de maintien de la PLT (Barnes, 1979; Barnes et McNaughton, 1985; Geinisman et al., 1995; Norris et al., 1996; Foster, 1999), alors qu'une diminution du seuil d'induction de la DLT (dépression à long terme) est constatée (Norris et al., 1996; Foster, 1999). De plus, des travaux ont mis en évidence que le déficit de maintien de la PLT était significativement corrélé avec l'atteinte mnésique dans des tâches évaluant la mémoire spatiale (Barnes, 1979; Barnes et McNaughton, 1985).

De façon similaire, des travaux menés sur la plasticité des potentiels de champ chez l'animal vigile montrent une moindre plasticité chez le rat âgé (Landfield et Lynch, 1977; Massicotte et Baudry, 1991; Muller et al., 1991).

- *Altérations moléculaires*

De nombreuses études ont rapporté une forte perturbation de l'homéostasie calcique chez le sujet âgé (Norris et al., 1996; Foster et Norris, 1997; Foster, 1999). Une augmentation de la conductance calcique dans les neurones « âgés » a été mise en évidence (Campbell et al., 1996). Les cellules pyramidales du CA1 dans l'hippocampe de rats âgés présentent une augmentation de la densité de canaux calciques de type L (Thibault et Landfield, 1996) qui pourrait conduire à la perturbation de l'homéostasie calcique (Toescu et al., 2004) et contribuer aux déficits de plasticité qui interviennent au cours du vieillissement (Norris et al., 1996; Foster et Norris, 1997; Foster, 1999). Cette augmentation en calciques de type L pourrait également être responsable des augmentations de l'hyperpolarisation consécutive à la décharge (AHP). La perturbation de ce phénomène est associée au déficit d'association (*trace conditioning*) des animaux âgés (Moyer et al., 1992). Dans le même ordre d'idée, il a également pu être mis en évidence une diminution de l'expression des protéines dont l'activité est régulée par le calcium, comme la calcium calmoduline kinase de type 2 (CaMK2, (Zhang et al., 2009) ou certaines adénylates cyclases (AC). La diminution de l'expression de la forme AC1 dans le CA1 est d'ailleurs directement corrélée aux déficits de performances en mémoire spatiale de souris âgées testées en piscine de Morris (Mons et al., 2004).

Parmi les facteurs situés en aval du $Ca^{2+}$, le facteur de transcription CREB (pour cAMP Responsive Element Binding protein) est également affecté par le vieillissement. Des travaux effectués chez le rat montrent que des individus âgés ayant un déficit de mémoire spatiale de référence présentent une diminution de l'expression de la protéine CREB (Brightwell et al., 2004). Au contraire, l'augmentation des niveaux de CREB par transfert somatique de gène peut contrer les effets délétères du vieillissement normal dans des tâches de navigation spatiale ou d'évitement chez le rat (Mouravlev et al., 2006). Une étude effectuée chez la souris au sein de l'équipe précise l'importance de ce facteur de transcription. Elle démontre que le vieillissement est accompagné d'une diminution de la forme active (phosphorylée) de CREB dans la sous-région CA1 de l'hippocampe lorsque les animaux sont testés dans une procédure de mémoire spatiale de référence en piscine de Morris. Cette altération moléculaire corrèle avec les faibles performances des individus âgés (Porte et al.,

2008a). Cette dérégulation touche également les protéines dont l'expression est régulée par CREB et qui sont impliquées dans la consolidation de la mémoire. En effet, l'étude effectuée par Porte et collaborateurs (2008) montre également que, à l'instar de CREB, la protéine Fos voit son expression diminuée chez les individus âgés (Porte et al., 2008a). Ce constat a été également effectué au sein de l'équipe en utilisant une procédure en labyrinthe radiaire testant la mémoire relationnelle/déclarative (Touzani et al., 2003).

Cette altération d'expression se répercute sur d'autres facteurs situés plus en avant comme la neurotrophine BDNF (pour Brain Derived Neurotrophic Factor) ou le facteur de transcription c/EBPβ (pour CCAAT Enhencer Binding Protein bêta, (Monti et al., 2005). Il en va de même pour le gène précoce *arc*, qui montre une expression réduite dans le gyrus denté chez des rats et des singes âgés suite à une exploration spatiale hippocampo-dépendante (Small et al., 2004).

## II.D – Rôle de l'acétylcholine dans le vieillissement mnésique

- *Hypothèse cholinergique classique*

L'implication du système cholinergique central dans les processus d'apprentissage et de mémorisation a été suggérée par Deutsch en 1971 (Deutsch, 1971). Par ailleurs, le vieillissement se caractérise par une diminution des marqueurs cholinergiques centraux accompagnée d'un déclin mnésique, chez l'homme comme chez l'animal. Ces observations ont mené à l'« *hypothèse cholinergique* » du vieillissement mnésique qui suppose que le déclin de la mémoire serait secondaire à la baisse de la transmission cholinergique centrale (Bartus et al., 1985). Cette hypothèse repose essentiellement sur deux ensembles d'arguments principaux.

(1) *Déclin des marqueurs cholinergiques corrélé au déclin mnésique.* Des altérations spécifiques des marqueurs cholinergiques (comme la choline acétyltransférase ou ChAT) ont été trouvés dans le cerveau de sujets souffrant de pertes de mémoire liées au vieillissement (Bowen et al., 1976; Whitehouse et al., 1982; Gill et al., 2007). Ces pertes cholinergiques sont associées au degré de perturbation cognitive des patients Alzheimer (Perry et al., 1978; DeKosky et al., 1992). De telles observations ont également pu être rapportées chez les animaux et particulièrement chez des rats âgés

(Sherman et al., 1981; Wu et al., 1988), les résultats suggérant une diminution de l'activité des neurones septo-hippocampiques.

(2) *Approches par intervention (pharmacologie ou lésions).* Chez des individus jeunes, la perturbation pharmacologique du système cholinergique par un antagoniste cholinergique (la scopolamine) semble induire des déficits cognitifs qui miment ceux observés au cours du vieillissement. (Drachman et Leavitt, 1974); (Drachman et al., 1980; Sperling et al., 2002; Lindner et al., 2006; Blin et al., 2009). Des observations similaires ont d'ailleurs pu être faites chez de jeunes singes ayant reçu également de la scopolamine (Bartus et Johnson, 1976; Savage et al., 1996; Plakke et al., 2008). A l'inverse, l'augmentation de l'activité cholinergique centrale chez des sujets âgés, soit par augmentation de la biodisponibilité en précurseurs de l'acétylcholine dans l'alimentation (Cohen et Wurtman, 1975; Hirsch et Wurtman, 1978; Chung et al., 1995), soit par inhibition pharamacologique de l'acétylcholinestérase (ou AchE ; (Davis et al., 1978; Christensen et al., 1992; Marighetto et al., 2000; Marighetto et al., 2008a), semble réduire les déficits cognitifs liés à l'âge.

En l'absence de toxines spécifiques des neurones cholinergiques, des lésions non sélectives ont pu produire des déficits mnésiques et cognitifs de différentes natures selon la voie concernée. La lésion de la voie septo-hippocampique produisait plutôt des déficits mnésiques, alors que celle de la voie noyau basal magnocellulaire (NBM)-néocorticale induisait plutôt des déficits attentionnels (Hodges et al., 1991; Dunnett et Fibiger, 1993; Everitt et Robbins, 1997) cf revues (Collerton, 1986; Fibiger, 1990). A l'inverse, la greffe de neurones cholinergiques fœtaux au sein de l'hippocampe ou du cortex préfrontal suite à une lésion du septum médian restaure les performances de rats testés dans des épreuves de mémoire spatiale de référence ou de travail en labyrinthe radiaire (Hodges et al., 1991). Enfin, la suppression des récepteurs cholinergiques α7 par injection d'oligonucléotides antisens chez le rat provoque une perturbation des performances en piscine de Morris (Curzon et al., 2006). A l'inverse, la stimulation pharmacologique sélective de ces récepteurs entraine une amélioration des performances de mémoire de travail et de mémoire relationnelle de souris âgées testées en labyrinthe radiaire (Marighetto et al., 2008a), ainsi qu'une amélioration des performances de mémoire de travail chez le singe âgé (Castner et al., 2010).

L'hypothèse cholinergique est à l'origine du développement des traitements pharmacologiques procholinergiques visant à réduire les effets du vieillissement sur la mémoire. De nombreux composés ont ainsi pu voir le jour tels que la tacrine, la rivastigmine, la galantamine ou le donépézil (Pepeu et Giovannini, 2009, 2010). Cependant, le développement d'approches lésionnelles spécifiques des neurones cholinergiques a fait naitre une controverse quant à l'implication de ce système dans les phénomènes d'apprentissage et de mémorisation.

- *Remise en question de l'hypothèse cholinergique classique*

Le rôle du système cholinergique dans les processus d'apprentissage et de mémoire, ainsi que son rôle dans les déficits mnésiques au cours du vieillissement, ont été remis en question après la publication d'études démontrant que des lésions de ce système n'entrainaient que peu ou pas de perturbation de la mémoire. Notamment, les travaux effectués par Wenk et ses collaborateurs démontrent qu'une perte quasi-totale des neurones cholinergiques du complexe basal antérieur (CBA) suite à des lésions iboténiques (et par conséquent la chute des taux d'acétylcholine) ne perturbe pas les performances des rats testés dans une tâche de labyrinthe radiaire (Wenk et Engisch, 1986). Par ailleurs, le développement de la technique de lésion immunotoxique utilisant l'$^{192}$IgG couplée à la saporine (Schliebs et al., 1996), technique sélective ciblant les neurones cholinergiques, alimente cette controverse. En effet, l'injection de cette toxine au niveau septal produit une diminution des taux d'acétylcholine (Chang et Gold, 2004), mais n'altère pas ou peu la mémoire spatiale de référence en piscine de Morris ou en labyrinthe radiaire chez le rat (Torres et al., 1994; Baxter et al., 1995; Baxter et al., 1996; Baxter et Gallagher, 1996). Certaines études rapportent même une facilitation de l'utilisation d'une mémoire spatiale dans un test de compétition en piscine de Morris (utilisation d'une stratégie spatiale hippocampo-dépendante ou d'une stratégie de guidage striato-dépendante), suite à une lésion du septum médian-NBM. (Cahill et Baxter, 2001; Bizon et al., 2003).

- *Reformulation de l'hypothèse : rôle modulateur dans la coordination des systèmes multiples de mémoire*

Pour tenter de dépasser les contradictions de la littérature sur la question du rôle de l'acétylcholine dans la mémoire, de nouvelles hypothèses partageant de nombreux points

communs ont été proposées (Hasselmo et Bower, 1993; Marighetto et al., 1993; Gold, 2003, 2004; Parent et Baxter, 2004). Partant de là, nous pouvons proposer une reformulation de l'hypothèse cholinergique classique. Selon cette hypothèse, les voies cholinergiques ne seraient plus essentielles à la mémorisation, mais elles moduleraient l'activité de leurs structures cibles, qui se trouvent être les structures essentielles des différents systèmes de mémoire. Précisément, le niveau d'acétylcholine libérée au sein d'une structure déterminerait le degré d'implication de cette structure dans les processus mnésiques en cours. De ce fait, l'acétylcholine coordonnerait le recrutement des différents systèmes de façon adaptée à la tâche et à la phase mnésique concernée ; elle déterminerait la configuration des activités cérébrales (au sein des systèmes mnésiques) spécifique de la tâche.

Cette reformulation postulant un rôle modulateur dans la coordination des systèmes de mémoire repose sur les arguments suivants. Tout d'abord, en mesurant la libération d'acétylcholine *in vivo* (microdialyse intracérébrale) ou *ex vivo* (capture de la choline), différentes études ont mis en évidence des variations d'activité cholinergique hippocampique dont la direction (augmentation ou diminution) et l'amplitude étaient dépendantes de la tâche (mémoire de travail ou mémoire spatiale de référence à long terme), de la phase de mémorisation (acquisition *vs* consolidation), du niveau d'entrainement, et/ou de la performance de l'animal (Raaijmakers, 1982; Decker et al., 1988; Marighetto et al., 1993). Ces observations ont amené deux hypothèses principales (Marighetto, 1991; Marighetto et al., 1993). D'une part, une augmentation d'activité cholinergique sous-tendrait l'acquisition des informations alors qu'une inhibition de cette activité serait nécessaire à la consolidation. Cette hypothèse était cohérente avec le modèle de formation de la trace mnésique en deux modes de fonctionnement hippocampique de Buzaki (Buzsaki, 1989). Elle a été reprise et développée par Hasselmo (Hasselmo et Bower, 1993) et confirmée par des études pharmacologiques chez l'homme (Gais et Born, 2004). D'autre part, l'activité de la voie septo-hippocampique cholinergique déterminerait le degré de participation relative des systèmes de mémoire déclarative et non déclarative. Cette hypothèse a été reprise et développée par Gold.

P. Gold suggère que la quantité d'ACh libérée dans un système neural pourrait déterminer le niveau de contribution de ce système dans les processus d'apprentissage et de mémoire (Gold, 2003, 2004) voir aussi (von Linstow Roloff et al., 2007). Une première expérience en labyrinthe en croix dissociant apprentissage spatial dépendant de l'hippocampe et apprentissage de type stimulus-réponse, dépendant du striatum, montre que les taux d'acétylcholine libérée dans l'hippocampe et dans le striatum sont prédictifs de la stratégie utilisée par le rat (McIntyre et al., 2003). Une autre étude complète ces résultats en montrant

qu'au cours de l'apprentissage, les rats changent de stratégie (initialement spatiale, puis de type stimulus-réponse). Cette transition est reliée à des modifications du ratio d'ACh hippocampique et striatale (Chang et Gold, 2003). En effet, les résultats montrent une augmentation des quantités d'ACh dans l'hippocampe dès le début de l'apprentissage, qui se maintient tout au long de la tâche. Dans le striatum, l'augmentation intervient plus tardivement et atteint un niveau asymptotique, coïncidant avec la transition vers une stratégie de type stimulus-réponse. Par ailleurs, il a été démontré que l'amélioration des performances en labyrinthe radiaire est positivement corrélée à l'augmentation de la libération d'ACh durant les douze jours d'apprentissage de la tâche (Fadda et al., 2000).

- *Intérêt de l'hypothèse cholinergique reformulée dans le contexte du vieillissement*

L'hypothèse selon laquelle l'acétylcholine module la coordination des systèmes de mémoire permet de rendre compte des effets subtils de lésions cholinergiques sélectives. La perte cholinergique dans un système mnésique pourrait en effet être compensée par une réorganisation fonctionnelle sollicitant d'avantage les autres systèmes.

Dans le cadre de cette hypothèse, la diminution de certaines populations de neurones cholinergiques pourrait jouer un rôle dans les altérations fonctionnelles complexes qui, comme nous l'avons vu, accompagnent le vieillissement. Cette vue est confortée par des études d'imagerie fonctionnelle montrant les modifications induites par des traitements cholinergiques au niveau notamment du cortex préfrontal, des aires sensorielles et de l'hippocampe sous forme de réduction ou d'augmentation d'activité selon la tâche et la région considérée (Furey et al., 1997; Freo et al., 2002; Freo et al., 2005; Dickerson, 2006).

Un des objectifs de cette thèse sera d'étayer l'hypothèse reformulée en étudiant chez la souris l'impact de manipulations cholinergiques (pharmacologique mais aussi lésionnelle) sur les patrons d'activité associés à la mémoire déclarative au sein des différents systèmes de mémoire.

# Partie III - Rappels anatomiques : la formation hippocampique et le système de neurotransmission cholinergique

Dans cette partie, nous effectuerons quelques brefs rappels anatomiques concernant les structures et systèmes qui seront au cœur de ces travaux de thèse. Dans un premier volet, nous décrirons l'anatomie de la formation hippocampique et dans un deuxième volet, nous décrions l'anatomie des systèmes cholinergiques centraux.

## III.A – L'hippocampe

Comme nous avons pu le voir précédemment, la dichotomie entre mémoire déclarative et mémoire non déclarative repose essentiellement sur le fait que ces mémoires requièrent ou non l'intégrité du lobe temporal médian (Squire, 2004). Les travaux exposés au cours de cette thèse seront largement centrés sur l'hippocampe. C'est pourquoi nous nous bornerons à décrire les bases neuro-anatomiques de la formation hippocampique, tant dans son fonctionnement intrinsèque que ses liens avec les structures impliquées dans les phénomènes mnésiques.

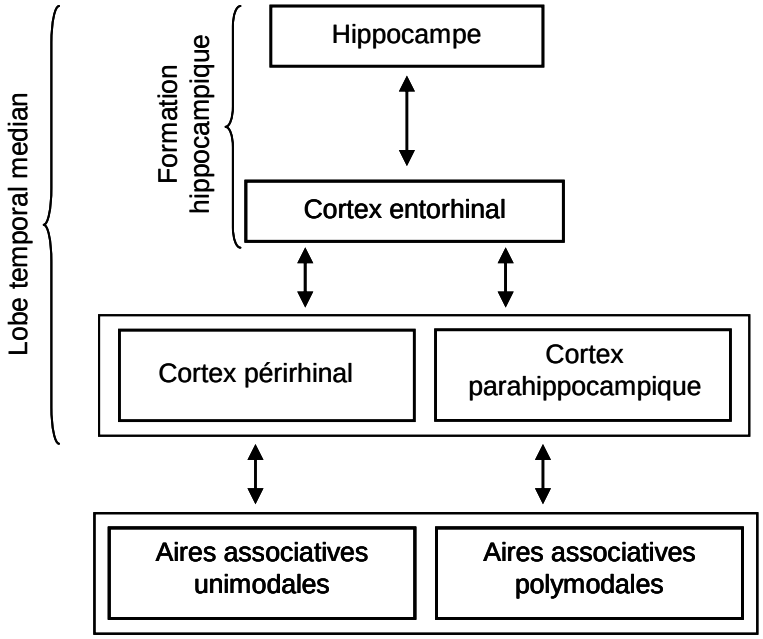



Figure 5 : Représentation schématique du lobe temporal médian et des interactions entre les régions cérébrales le composant (Lavenex et Amaral, 2000).

- *Position et cytoarchitecture de l'hippocampe*

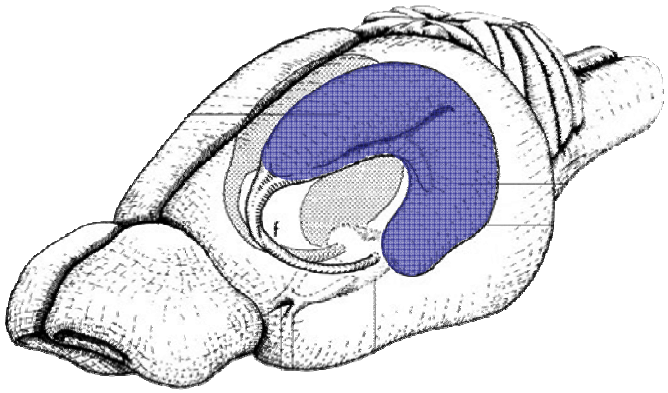


Figure 6 : positionnement de l'hippocampe (en bleu) dans le cerveau des rongeurs (d'après Amaral et Witter, 1995).

Le lobe temporal médian se compose d'une structure centrale, la formation hippocampique et des cortex périrhinal et parahippocampique qui constituent les principales voies d'entrée des informations provenant des aires associatives néocorticales (Figure 5). La formation hippocampique se décompose en quatre régions distinctes cytoarchitectoniquement : le gyrus denté, l'hippocampe proprement dit (subdivisé en trois Champs Amoniques que sont le CA3, le CA2 et le CA1), le subiculum et le cortex entorhinal. La position tridimensionnelle de la formation hippocampique dans le cerveau est complexe. Elle « *apparait grossièrement comme une structure allongée dont l'axe long* (dit septotemporal) *s'étend, avec une forme de C, du noyau septal basal en rostro-dorsal, par-dessus et devant le diencéphale, jusqu'au lobe temporal en caudo ventral* » (Amaral et Witter, 1995); Figure 6). Il s'agit d'une structure sous-corticale du système limbique qui est située à la croisée des structures néocorticales et diencéphaliques.

Sur le plan cytoarchitectural, le gyrus denté comprend trois couches. La couche moléculaire est principalement constituée des dendrites des cellules granulaires, de terminaisons axoniques provenant de différentes sources et d'interneurones GABAergiques. La couche granulaire qui correspond à la couche principale est constituée principalement de cellules granulaires et de neurones GABAergiques et contrôle les sorties du gyrus denté. Enfin, la couche polymorphe (ou hilus) qui comprend une grande variété de types cellulaires.

Les différents champs de la corne d'Ammon ont une organisation en couche similaire. On distingue une couche principale de cellules pyramidales, en dessous de laquelle se trouve le stratum oriens (relativement dépourvu de cellules). Au dessus des cellules pyramidales du CA3 se trouve le stratum lucidum qui est occupé par les axones des fibres moussues issues du gyrus denté. Superficiellement au stratum lucidum du CA3 et immédiatement au-dessus des cellules pyramidales du CA2 et CA1 se trouve le stratum radiatum. Il est défini comme étant

une région dans laquelle se font les connections auto-associatives (récurrentes) CA3-CA3, ainsi que les connexions collatérales CA3-CA1 des fibres de Schaffer.

- *Les connections intra-hippocampiques : le circuit trisynaptique*

L'organisation cellulaire et de la connectivité intrinsèque de l'hippocampe fut initialement décrite par le neuroanatomiste Ramón Y Cajal en 1911. Les cellules granulaires du gyrus denté reçoivent des entrées du cortex entorhinal et projettent sur les cellules du CA3 via les fibres moussues. Le CA3 projette à son tour sur les cellules pyramidales du CA1 via les collatérales de Schaffer. En plus de ce système, des connections locales sont régies par de nombreux interneurones auxquelles s'ajoutent des connexions CA3-CA3 via des fibres récurrentes. De nombreux auteurs ont d'ailleurs signalé l'importance fonctionnelle de ces projections récurrentes du CA3, notamment dans le *pattern completion* ou l'acquisition rapide d'informations (Rolls et Kesner, 2006). Enfin, il faut ajouter des projections directes du cortex entorhinal sur le CA3 et le CA1. Le CA1 est par ailleurs la seule région du circuit à projeter directement en retour sur le cortex entorhinal (Figure 7).

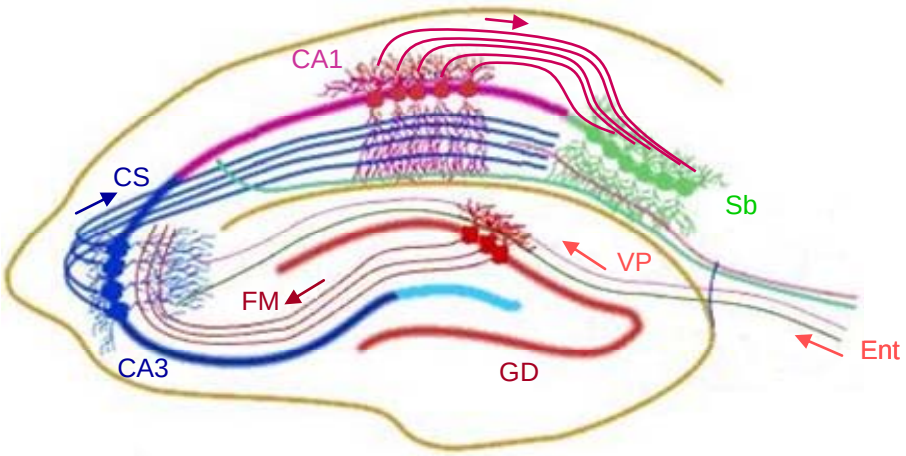



Figure 7 : schéma représentant les connexions intrahippocampiques du circuit trisynaptique. La voie d'entrée principale de la formation hippocampique est le cortex entorhinal (Ent) dont les neurones, via la voie perforante (VP), font synapse avec les cellules granulaires du gyrus denté (GD). Ces derniers, via les fibres moussues (FM), projettent sur la couche pyramidale de la région CA3. Les neurones pyramidaux du CA3 vont à leur tour projeter sur les cellules pyramidales du CA1, via les collatérales de Schaffer (CS). La voie de sortie du circuit est le subiculum (Sb). La conduction du signal au sein de ce circuit est unidirectionnelle.

- *Les connexions extrinsèques à l'hippocampe*

**Les afférences :**

Comme nous l'avons vu précédemment, la grande majorité des afférences corticales passe par le cortex entorhinal qui reçoit lui-même des projections des cortex périrhinal, piriforme, insulaire, rétrosplénial, préfrontal, ainsi que du bulbe olfactif. L'ensemble de l'hippocampe reçoit des projections issues du septum médian. Cette voie septo-hippocampique est majoritairement cholinergique, mais présente également des projections GABAergiques. L'hippocampe reçoit également des projections noradrénergiques provenant du locus coeruleus, sérotoninergiques provenant des noyaux du raphé et dopaminergiques provenant de l'aire tegmentale ventrale. De manière plus spécifique, le CA1 reçoit des afférences thalamiques et amygdaliennes (noyau baso-latéral ; (Amaral et Witter, 1995) pour revue).

**Les efférences :**

Le subiculum est l'une des principales voies de sortie de la formation hippocampique. Il projette sur différentes aires corticales comme les cortex préfrontal médian, orbitofrontal, infralimbique, prélimbique, rétrosplénial et entorhinal. La région septale et les corps mammillaires constituent les régions sous-corticales recevant le plus de projections hippocampiques. Enfin l'hippocampe projette également sur les noyaux et bulbes olfactifs, le noyau accumbens, l'hypothalamus et l'amygdale (Amaral et Witter, 1995) pour revue).

En résumé, la position centrale de la formation hippocampique dans le cerveau, ainsi que ses connexions extrinsèques avec des structures telles que l'amygdale et le cortex préfrontal laissent à penser que cette structures pourrait jouer un rôle d'intégrateur, de lien entre les différents systèmes de mémoire décrits précédemment.

## III.B – Le système cholinergique central

- *Généralités*

L'acétylcholine (ACh) est le premier neurotransmetteur à avoir été découvert par Otto Loewi en 1921. Cette molécule fut originellement nommée « Vagustoff », puisque libérée suite à la stimulation du nerf vague. Elle est synthétisée à partir de l'acétyl-Coenzyme A, issu

du cycle de Krebs, et de la choline ou de la lécithine, provenant de l'alimentation, grâce à l'action de l'enzyme ChAT. L'ACh est principalement synthétisée dans le soma et transportée jusqu'aux terminaisons synaptiques via un flux axonal lent. Au niveau présynaptique, les molécules d'ACh sont séquestrées dans des vésicules synaptiques dans lesquelles elles entrent sous l'action d'un transporteur vésiculaire. Lorsque le neurone est stimulé, elle est libérée dans la fente synaptique, cette libération se faisant sous forme quantique et dépendante de l'intensité de stimulation. Une fois libérées, les molécules diffusent et se fixent aux récepteurs post-synaptiques. Enfin, l'ACh est métabolisée en acétate et choline par l'enzyme acétylcholine estérase (AChE), la choline étant recapturée par la terminaison présynaptique.

La cartographie des neurones cholinergiques dans le cerveau fut effectuée grâce à l'utilisation de différents marqueurs permettant leur détection. Une première cartographie a pu être établie à partir de la détection cytochimique de l'AChE avec la publication de la méthode Koelle-Friedenwald en 1949 permettant la détection de cette enzyme. Cependant, la caractérisation des neurones cholinergiques par cette méthode s'est révélée peu fiable, lorsque l'AChE fut détectée dans les neurones dopaminergiques (Butcher et Bilezikjian, 1975). Par la suite, se sont développées les méthodes permettant de détecter la ChAT soit par immunohistochimie (Mesulam et al., 1983a), soit par hybridation in situ (Butcher et al., 1992). Enfin, plus récemment a été mise au point la détection immunohistochimique du transporteur vésiculaire de l'ACh (Roberson et al., 1999), ces différentes techniques ayant permis d'établir une cartographie définitive de la localisation des neurones cholinergiques cérébraux.

L'anatomie du système cholinergique est relativement conservée au sein des mammifères et présente de nombreuses analogies entre les rongeurs, le singe et l'Homme (Mesulam et al., 1983b; Mesulam et al., 1983a; Nagai et al., 1983). C'est pourquoi nous ne ferons aucune distinction inter-espèces dans les paragraphes suivants.

- *Distribution des neurones cholinergiques dans le cerveau*

Un premier groupe de neurones cholinergiques se situe au niveau basal du télencéphale et correspond au *complexe du cerveau basal antérieur* (CBA). Il s'étend du noyau septal médian en rostral jusqu'à l'hypothalamus en caudal. Ce complexe est formé de plusieurs groupes, Ch1 à Ch4 selon la terminologie utilisée par Mesulam et ses collaborateurs (Mesulam et al., 1983a). On distingue le septum médian (groupe Ch1), qui se prolonge verticalement par les

noyaux verticaux (groupe Ch2) et les noyaux horizontaux (groupe Ch3) de la bande diagonale de Broca. Le dernier groupe cholinergique du CBA, et le plus caudal correspond au noyau basal magnocellulaire (groupe Ch4 ; dénommé aussi noyau de Meynert chez l'homme). Deux autres groupes se distinguent en position plus caudale par rapport au CBA, dans la région pontomésencéphalique : le noyau tegmental pédonculo-pontin (groupe Ch5) et le noyau latéro-dorsal du tegmentum (groupe Ch6). Enfin, le striatum possède également des interneurones cholinergiques en faible densité (Figure 8).

- *Les voies cholinergiques principales*

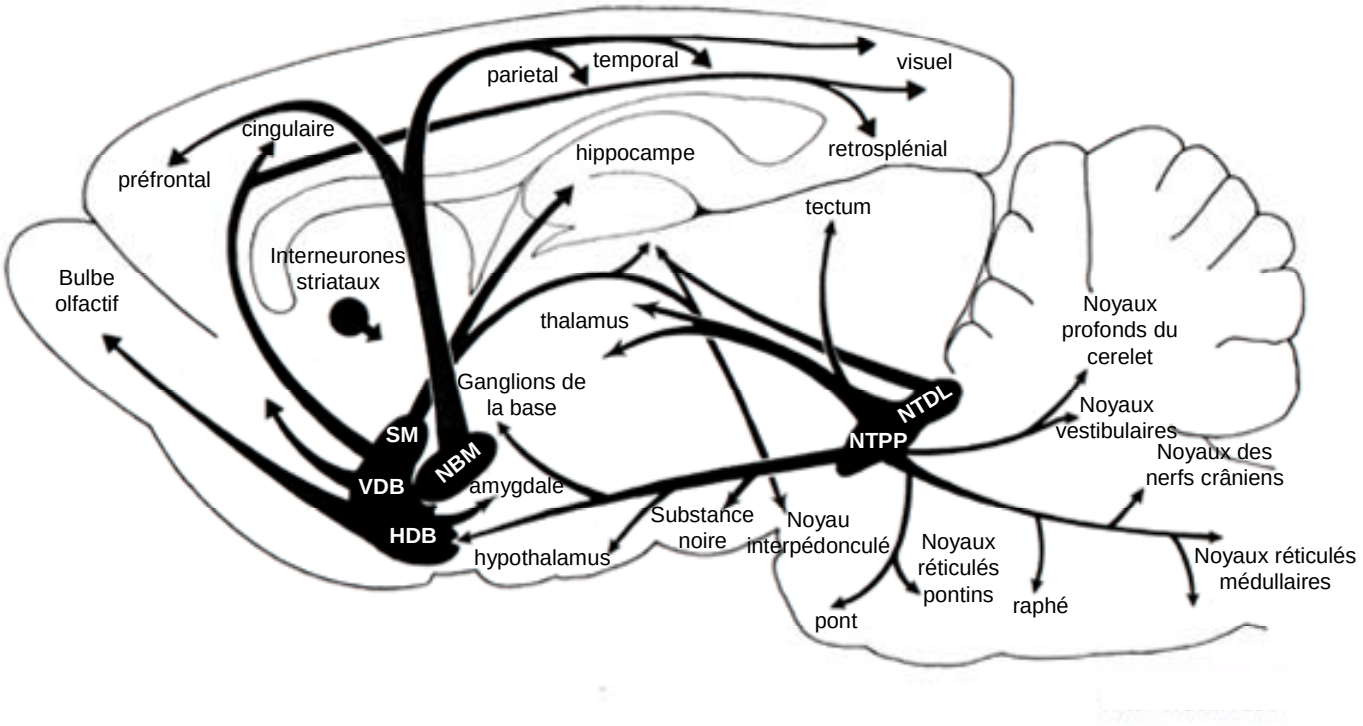



Figure 8 : représentation schématique des principales voies cholinergiques chez les rongeurs (d'après Mesulam et al., 1983). SM : septum médian ; VDB : noyau vertical de la bande diagonale de Broca ; HDB : noyau horizontal de la bande diagonale de Broca ; NBM : noyau basal magnocellulaire ; NTPP : noyau tegmental pédonculo-pontin ; NTDL : noyau tegmental dorsolatéral.

Globalement, les neurones du CBA (Ch1-Ch4) innervent l'intégralité du manteau néocortical, ainsi que la plupart des structures limbiques et olfactives. Les neurones issus de la région septale (régions Ch1 et Ch2) projettent majoritairement vers l'hippocampe via la fimbria et le fornix (Mesulam et al., 1983a). Ces neurones cholinergiques sont connectés aux neurones pyramidaux des différents champs ammoniques, ainsi qu'aux cellules granulaires du

gyrus denté et à certains neurones GABAergiques hippocampiques (Frotscher, 1989; Dougherty et Milner, 1999). Cependant, notons que cette voie dite septo-hippocampique n'est pas constituée uniquement de projections cholinergiques. Environ 50% des projections utilisent le GABA comme neurotransmetteur (Rye et al., 1984; Brauer et al., 1991) et contactent principalement les interneurones GABAergiques de l'hippocampe (Freund et Antal, 1988; Gulyas et al., 1991). L'hippocampe projette en retour directement sur le septum (Alonso et Kohler, 1982), refermant ainsi une boucle septo-hippocampo-septale qui semble être impliquée dans la genèse du rythme theta hippocampique (Uchida et al., 2001). Certains neurones issus du noyau vertical de la bande diagonale de Broca (groupe Ch2) n'empruntent pas la voie septo-hippocampique. Ceux-ci transitent ventralement par la région amygdalienne ou dorsalement en longeant la surface dorsale du corps calleux et projettent notamment sur le cortex entorhinal (Milner et Amaral, 1984).

Le noyau horizontal de la bande diagonale de Broca (groupe Ch3) est la principale source d'innervation du bulbe olfactif.

Le noyau basal magnocellulaire (groupe Ch4) est la principale source d'innervation pour l'amygdale et les aires néocorticales. 90% des neurones projetant sur ces aires sont de nature cholinergique (Rye et al., 1984).

Enfin, les noyaux tegmental pédonculo-pontin (groupe Ch5) et tegmental dorsolatéral (groupe Ch6) innervent majoritairement le thalamus.

- *Les récepteurs cholinergiques*

Deux grandes classes de récepteurs sous-tendent les effets physiologiques de l'acétylcholine dans le cerveau : les récepteurs nicotiniques et les récepteurs muscariniques.

**Les récepteurs nicotiniques** (Figure 9) font partie de la famille des récepteurs ionotropiques constitués de cinq sous-unités identiques (homopentamères) ou différentes (hétéropentamères). Il existe deux types de sous-unités : les sous-unités α, recensées au nombre de neuf (α2 à α10), et les sous-unités β, recensées au nombre de trois (β2 à β4). Ces différents récepteurs possèdent différentes propriétés pharmacologiques et biophysiques et différentes localisations dans le cerveau, les plus fréquemment rencontrés dans l'hippocampe étant les récepteurs α7 et α4β2. La liaison des molécules d'ACh sur leurs sites de fixation (deux sites pour les récepteurs hétéropentamériques et cinq sites pour les récepteurs

homopentamériques) provoque un changement de conformation du récepteur ouvrant un canal qui devient perméable aux ions Na+ et Ca2+ (Gotti et al., 2006) pour revue).

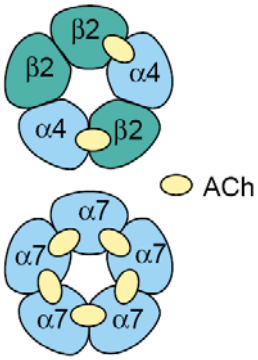



Figure 9 : illustration de deux types de récepteurs nicotiniques que l'on trouve dans l'hippocampe et le cortex. Le premier est le récepteur hétéropentamérique α4β2. Celui-ci possède deux sites de liaisons à l'acétylcholine (ACh). Le second est le récepteur homopentamérique α7. Celui-ci possède cinq sites de liaisons à l'ACh.

**Les récepteurs muscariniques** (Figure 10) font partie de la famille des récepteurs métabotropiques possédant sept domaines transmembranaires. Ils sont couplés à différentes protéines G qui définissent les deux sous familles de ces récepteurs. La première famille est constituée des récepteurs M1, M3 et M5 qui ont une activité excitatrice. Ils sont couplés aux protéines Gq/G11, activatrices de la phospholipase C qui induit une mobilisation du Ca2+ intracellulaire. La deuxième famille est constituée des récepteurs M2 et M4 qui ont une activité inhibitrice. Ils sont couplés aux protéines Gi/Go, qui inhibent l'adenylate cyclase, entrainant une diminution de la concentration cytoplasmique d'AMPc (Eglen et al., 2001) pour revue).

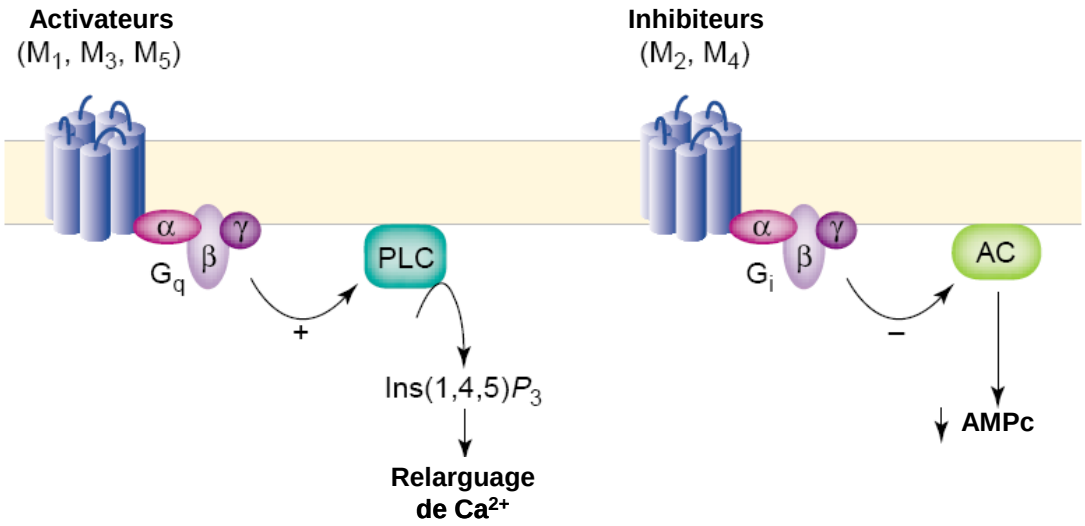



Figure 10 : illustration des deux sous familles de récepteurs muscariniques, respectivement excitatrices et inhibitrices.

# Partie IV – Problématique

Suite à la revue de la littérature effectuée au cours de cette introduction, nous pouvons faire le constat que l'identification des bases neurobiologiques du déclin mnésique lié au vieillissement se heurte à de nombreuses difficultés parmi lesquelles nous retiendrons:

(1) la modélisation animale de la mémoire déclarative qui, comme nous l'avons vu, est une forme de mémoire typiquement humaine

(2) le manque d'intégration des différents niveaux d'analyse du fonctionnement cérébral. En effet, les altérations fonctionnelles décrites à l'échelle des structures et des systèmes chez l'homme sont peu reliées aux altérations cellulaires et moléculaires décrites chez l'animal.

***Au plan psychologique*** en effet, le vieillissement normal comme les phases précoces de la maladie d'Alzheimer, s'accompagne d'une détérioration préférentielle de la mémoire déclarative. Toutefois, cette détérioration ne concerne pas toutes les composantes de la mémoire déclarative et elle peut être très variable entre les sujets. Au total, la complexité de la littérature sur ce sujet amène à penser que l'élucidation des bases neurobiologiques du vieillissement mnésique requiert en premier lieu des approches comportementales pointues, permettant d'identifier la signification psychologique des déficits observés. De ce fait, chez l'animal, l'utilisation d'un modèle de mémoire déclarative basé sur les propriétés psychologiques élémentaires de cette mémoire, et pas seulement sur la sensibilité de la tâche au dysfonctionnement hippocampique, nous semblait nécessaire.

Notre hypothèse générale est que le déclin de la mémoire déclarative est lié à un défaut du traitement relationnel qui permet d'encoder les expériences vécues au sein d'un réseau élargi d'associations et relations sous-tendant l'expression flexible de la mémoire. Cette hypothèse est basée sur la théorie d'(Eichenbaum et al., 1992), selon laquelle la flexibilité mnésique est une caractéristique non verbale fondamentale de la mémoire déclarative, et repose sur des représentations relationnelles formées par l'hippocampe.

Nous avons choisi la procédure comportementale en labyrinthe radiaire développée par (Marighetto et al., 1999) précisément sur la base de la théorie relationnelle. Cette procédure modélise le déclin préférentiel de la mémoire déclarative par un déficit spécifique de flexibilité mnésique chez la souris âgée. En outre, le test souris a été adapté à l'homme

(Etchamendy et al, en révision Hippocampus) selon une démarche translationnelle visant à valider ce modèle de mémoire relationnelle/déclarative. A terme, cette démarche devrait permettre de réduire la rupture conceptuelle et méthodologique existant à ce jour entre les recherches menées chez l'homme et chez l'animal, et profiter à une meilleure compréhension du vieillissement mnésique.

***Au plan neurobiologique***, le déclin mnésique lié au vieillissement est associé à des modifications complexes du fonctionnement cérébral identifiées tant à l'échelle des structures et systèmes qu'au niveau cellulaire et moléculaire. Au plan structural et systémique, ces modifications apparaissent sous forme de défaut d'activation, de défaut de désactivation, ou encore sous forme d'activation aberrante (structures non activées chez les sujets jeunes), selon la structure cérébrale, la tâche et la phase mnésique, le niveau de dégradation du sujet étudié.

Nous pensons que l'avancée de la recherche nécessite d'intégrer les altérations fonctionnelles mises en évidence à l'échelle cellulaire et moléculaire à ces modifications complexes de l'activité des structures et systèmes. Pour cela, nous avons choisi une approche permettant de visualiser des altérations intracellulaires au sein des systèmes de mémoire en fonctionnement, c'est-à-dire pendant la formation ou le rappel de la mémoire déclarative.

Nous avons donc combiné notre approche comportementale à une approche d'imagerie cérébrale basée sur l'immunodétection de la protéine Fos. En effet, *c-fos* est un gène précoce, suffisamment ubiquitaire pour que son expression soit utilisée comme indicateur indirect d'activité neuronale, permettant de cartographier les régions cérébrales activées au cours de l'exécution d'une tâche (Guzowski et al., 2001). Nous pourrons ainsi étudier les effets du vieillissement sur les variations d'activité neuronale se produisant *au sein* des systèmes de mémoire pendant l'acquisition ou l'expression de la mémoire déclarative.

Cette approche a été utilisée pour tenter d'apporter des éléments de réponse à deux questions qui concernent à la fois le vieillissement et la formation de la mémoire déclarative et qui, comme nous l'avons vu précédemment, suscitent (ou continuent de susciter) un débat dans la littérature. La première question est celle du rôle de l'acétylcholine et fait l'objet du premier chapitre de cette thèse. La deuxième question est celle de l'interaction mémoire déclarative-mémoire de travail et de l'implication potentielle de l'hippocampe dans cette interaction ; elle fait l'objet du chapitre II.

***Concernant la première question***, nous avons vu qu'une reformulation de l'hypothèse cholinergique a été proposée (Marighetto et al., 1993; Gold, 2003, 2004; Parent et Baxter, 2004) pour tenter de dépasser les contradictions de la littérature sur la question cholinergique. Selon cette hypothèse, **les voies cholinergiques moduleraient l'activité de leurs structures cibles, qui se trouvent être les structures essentielles des systèmes de mémoire, et coordonneraient ainsi les différents systèmes de façon adaptée à la tâche et à la phase mnésique concernée**. Précisément, **le niveau d'acétylcholine libérée au sein d'une structure déterminerait le degré d'implication de cette structure dans les processus mnésiques en cours**. Ainsi donc, tout traitement cholinergique est susceptible de modifier la configuration d'activité des différents systèmes mnésiques, configuration spécifique de la tâche mnésique considérée.

Dans le cadre de cette hypothèse, nous étudierons l'impact de manipulations cholinergiques sur les patrons d'activité associés à la mémoire déclarative au sein des différents systèmes mnésiques. (i) En administrant un traitement « pro-cholinergique » (l'anticholinestreasique, donépezil) qui réduit le déficit de mémoire relationnelle/déclarative des souris âgées, nous tenterons de vérifier que cet effet promnésiant s'accompagne d'une « normalisation » des patrons d'activité Fos (ii) Par une lésion immunotoxique partielle, nous mimerons la perte des neurones cholinergiques septo-hippocampiques qui accompagne le vieillissement. Nous tenterons de montrer que cette lésion sélective partielle suffit à modifier les patrons d'activation des différents systèmes mnésiques.

***Concernant la deuxième question***, nous avons déjà mentionné le vif débat existant entre les tenants du dogme de la séparation des systèmes de mémoire à court et à long-terme et les opposants à ce dogme, soutenant l'idée d'une implication de l'hippocampe dans les deux mémoires. En accord avec l'opposition au dogme, la revue des données de l'imagerie fonctionnelle du vieillissement montrent que les déficits de mémoire de travail et de mémoire épisodique ont en commun un dysfonctionnement hippocampique lors de l'étape d'encodage (Grady et al., 1995; Mitchell et al., 2000a; Dickerson et al., 2004; Hales et Brewer, 2010). L'idée que les déficits de mémoire de travail et de mémoire déclarative peuvent être reliés, a été également suggérée par plusieurs études antérieures sur le déficit de mémoire relationnnelle/déclarative chez les souris âgées (Marighetto et al., 2008a; Marighetto et al., 2008b; Mingaud et al., 2008). Enfin et surtout, une expérience du laboratoire (Mingaud et al., 2007) a montré que le traitement hippocampique nécessaire à la mémoire relationnelle/déclarative se déroulait « *on line* » pendant l'apprentissage, rendant ainsi très

vraisemblable **l'implication de la mémoire de travail dans la formation de la mémoire déclarative**. Notre travail visera à tester cette hypothèse.

Précisément notre hypothèse est qu'**un dysfonctionnement hippocampique chez les individus âgés serait à l'origine de l'altération d'un système d'association et de maintien à court terme de l'information correspondant au tampon épisodique décrit par Baddeley, nécessaire à l'encodage d'une représentation relationnelle des événements temporellement éloignés (*temporal binding*)**. Pour tester cette hypothèse, nous avons manipulé pendant l'apprentissage, l'éloignement temporel entre les informations à apprendre au sein, et au-delà, du domaine temporel de la mémoire de travail (i.e. entre 0 et 60 secondes). Nous avons combiné notre approche comportementale à des approches interventionnelles (pharmacologique et inactivation intracérébrale) et d'imagerie cérébrale par l'immunodétection de la protéine Fos.

# Chapitre I
# Cholinergie et vieillissement : modulation et coordination des systèmes de mémoire

L'une des principales caractéristiques du vieillissement est l'atteinte du système cholinergique central, particulièrement exacerbée chez les personnes souffrant de la maladie d'Alzheimer. Les observations effectuées chez l'homme et chez l'animal ont montré que le déclin mnésique lié à l'âge est corrélé à une baisse de transmission cholinergique, conduisant au fondement de l'«***hypothèse cholinergique du vieillissement*** »(Bartus et al., 1982; Bartus et al., 1985). Cette hypothèse est à l'origine du développement de nombreux composés procholinergiques, le plus souvent basés sur l'inhibition de l'acétylcholinestérase, enzyme de dégradation de l'ACh et ayant pour but de compenser fonctionnellement la perte des neurones cholinergiques (Pepeu et Giovannini, 2009, 2010).

Pourtant, l'impact de la perte cholinergique sur la fonction mnésique au cours du vieillissement normal et de la phase précoce de la maladie d'Alzheimer reste mal compris. En effet, dans de nombreuses études, les lésions cholinergiques ne reproduisent pas les déficits mnésiques observés chez les animaux âgés (Parent et Baxter, 2004). En particulier, la lésion sélective de l'innervation cholinergique hippocampique ne provoque pas ou peu d'effet dans les tâches de mémoire spatiale, hippocampo-dépendantes (Baxter, 2001; Cahill et Baxter, 2001; Bizon et al., 2003; Jonasson et al., 2004; Parent et Baxter, 2004). A ce jour donc, nous savons que la perte cholinergique liée au vieillissement ne peut expliquer à elle seule les déficits de mémoire associés.

Néanmoins, une reformulation de l'hypothèse cholinergique que nous avons évoquée au cours de l'introduction générale, permet d'envisager un impact de la perte cholinergique à l'échelle systémique. En effet, selon cette hypothèse, les voies cholinergiques moduleraient l'activité de leurs structures cibles, et coordonneraient ainsi l'implication des différents systèmes en fonction de la tâche et de la phase mnésique concernée. La diminution de certaines populations de neurones cholinergiques pourrait donc jouer un rôle dans les réorganisations fonctionnelles qui accompagnent le vieillissement.

Le vieillissement se caractérise en effet, comme nous l'avons décrit dans l'introduction, par des modifications des patrons d'activité cérébrale et de la connectivité fonctionnelle sous-tendant la formation de la mémoire (Andrews-Hanna et al., 2007; Grady, 2008). Dans certains cas, ces altérations fonctionnelles pourraient même représenter des signes précliniques des formes de vieillissement pathologique (Sperling, 2007). C'est le cas de l'hyperactivation hippocampique qui a été observée dans l'encodage de l'information épisodique chez les seuls sujets MCI (pour Mild Cognitive Impairment) qui vont développer la maladie d'Alzheimer (Dickerson et al., 2004; Miller et al., 2008a; O'Brien et al., 2010).

Ces observations soulignent le besoin d'identifier les mécanismes responsables de ces altérations fonctionnelles. Dans ce contexte, nous testerons l'hypothèse de l'implication du système cholinergique : la perte partielle de certaines populations de neurones cholinergiques serait impliquée dans les réorganisations fonctionnelles qui accompagnent le vieillissement. Si l'hypothèse est valide, un traitement « procholinergique » chez l'âgé devrait réduire ces altérations fonctionnelles, alors que la lésion partielle d'une voie cholinergique chez le jeune adulte devrait induire une réorganisation fonctionnelle des systèmes mnésiques, simulant potentiellement l'effet du vieillissement.

Nous étudierons donc l'impact de deux manipulations opposées de la transmission cholinergique sur les patrons d'activité Fos associés à la mémoire déclarative au sein des principaux systèmes mnésiques. Tout d'abord, un traitement avec l'anticholinestérasique donépézil qui a déjà montré des effets bénéfiques sur le déficit de mémoire relationnelle/déclarative (Mingaud et al., 2008) sera administré à des souris âgées. Nous tenterons de vérifier que l'effet promnésiant du traitement s'accompagne d'une « normalisation » des patrons d'activité dans les régions essentielles aux différentes formes de mémoires. Ces travaux font l'objet de l'**expérience 1**. Ensuite, nous étudierons l'impact d'une lésion immunotoxique partielle, mimant la perte des neurones cholinergiques septo-hippocampiques qui accompagne le vieillissement. Nous tenterons de montrer que cette lésion cholinergique, bien que partielle et limitée à la voie septo-hippocampique, induit une réorganisation fonctionnelle des principaux systèmes mnésiques. Ces travaux font l'objet de l'**expérience 2**.

# Expérience 1 : effets d'un traitement procholinergique sur le déficit de mémoire relationnelle/déclarative et les patrons d'activité au sein des systèmes mnésiques chez la souris âgée

## Introduction

Dans cette étude, nous avons voulu tester l'hypothèse qu'***une augmentation de la transmission cholinergique par le donépézil, capable de réduire le déficit de mémoire relationnelle/déclarative des animaux âgés, était également capable de normaliser, pendant l'apprentissage, les activités des régions cérébrales essentielles aux différentes formes de mémoire.***

Pour y parvenir, nous avons choisi une version de la tâche de mémoire relationnelle/déclarative en labyrinthe radiaire qui n'avait pas encore été utilisée pour étudier le donépézil (Marighetto et al., 2008a). Ce choix avait pour objectif de mettre en parallèle ce travail avec des études actuellement menées chez l'Homme. En effet, cette version de la tâche a fait l'objet d'une adaptation chez l'Homme, et elle est actuellement utilisée pour étudier l'effet du donépézil chez des sujets âgés normaux et MCI (Etchamendy et al., travaux en cours).

Nous avons combiné l'approche comportementale et pharmacologique (traitement chronique avec le donépézil) à une approche d'imagerie utilisant l'immunodétection de la protéine Fos. Nous avons ainsi mesuré l'activation induite par l'apprentissage dans les régions impliquées dans la formation des formes déclaratives et non déclaratives de mémoire à long-terme. Comme dans toutes nos expériences d'imagerie Fos, l'activation induite par l'apprentissage a été évaluée relativement à l'activité mesurée chez des groupes soumis à un entraînement en tapis-roulant de même durée (contrôles « locomoteurs »)

## Matériel et Méthodes

### Sujets

L'étude a été réalisée avec des souris mâles, de souche C57/BL6 jeunes adultes (3-4 mois ; n=24) et âgées (20-23 mois ; n=56) obtenues chez Charles River (L'Arbresle, France). Dès leur arrivée, les souris ont été mises en cage collective dans une animalerie climatisée

respectant un cycle jour : nuit (12h : 12h) et une température ambiante constante (21°C). Elles ont ensuite été isolées en cages individuelles, une semaine avant le début des traitements. Pendant cette période, la nourriture était disponible *ad libitum*. Les tests mnésiques étant basés sur le renforcement alimentaire, les souris ont été soumises à une privation partielle et progressive de nourriture jusqu'à perdre 12-15% de leur poids d'origine. Cette procédure débuta trois jours avant le début des épreuves comportementales et les souris ont été maintenues à ce niveau de privation tout au long de l'expérience.

**Traitement**

Les souris âgées ont reçu, suivant leur groupe d'appartenance, une injection quotidienne sous-cutanée de *donépézil* à la dose de 1mg/kg (groupe Agé Donépézil, AD), ou de solution saline (groupe Agé Saline, AS). Les souris jeunes ont toutes reçu une injection de solution saline (groupe Jeune Saline, JS). La dose de *donépézil* a été choisie sur la base d'études antérieures ayant montré qu'elle était efficace pour réduire le déficit de mémoire déclarative/relationnelle (Marighetto et al., 2008). Les traitements ont débuté une semaine avant le début de l'épreuve et se sont poursuivis durant les phases d'apprentissage et de rétention à raison d'une injection par jour une heure avant le début de chaque séance.

**Comportement**

*Appareillage :* la procédure a été réalisée dans un labyrinthe radiaire à huit bras, surélevé et automatisé. Le labyrinthe est fait de plexiglas gris et comprend une plate-forme centrale (de 30 cm de diamètre) d'où partent 8 bras (longueur : 55 cm x largeur : 11 cm). Chaque bras est équipé d'une porte à l'entrée et d'un distributeur de granules de nourriture à son extrémité extérieure. Ce dispositif, couplé à un système d'analyse d'images (IMETRONIC), permet le pilotage automatique de l'appareil et le recueil des données. Le labyrinthe en lui-même ne contenant pas d'indices, la discrimination des bras les uns par rapport aux autres repose sur l'utilisation des indices extérieurs au labyrinthe (e.g : indices visuels, arrangement du mobilier).

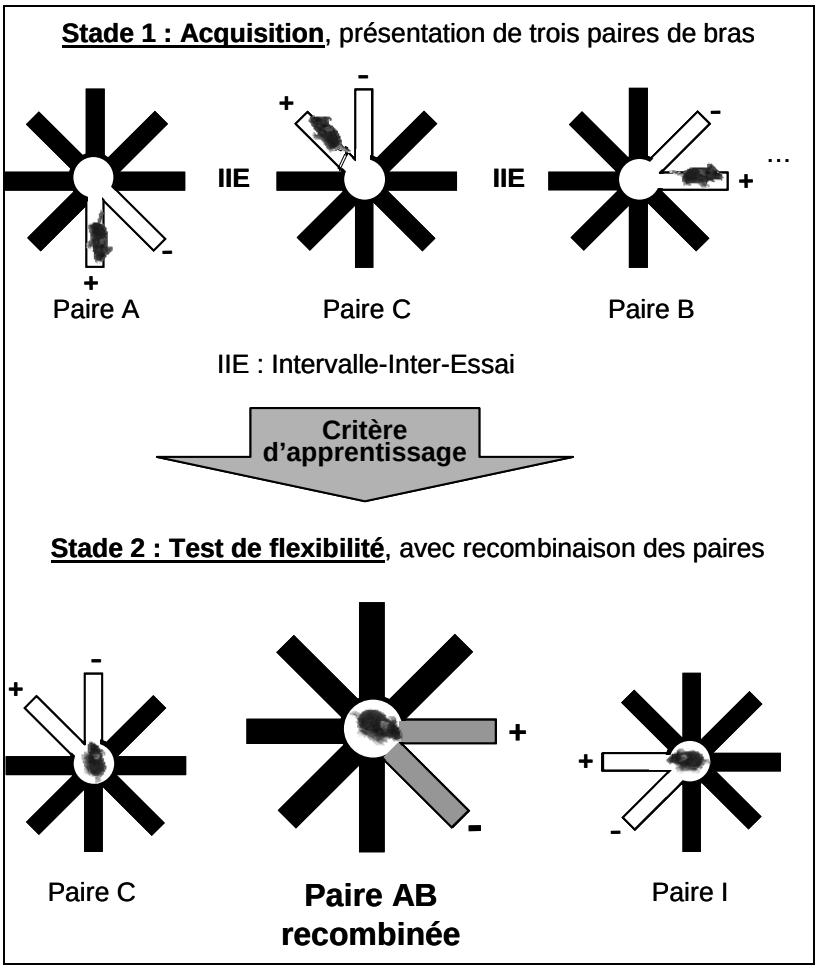



Figure 11 : schéma explicatif de la procédure expérimentale utilisée. Lors de l'acquisition (stade 1), trois paires de bras sont présentées aux souris. L'acquisition se poursuit jusqu'à atteinte du critère d'apprentissage. Les animaux sont alors soumis à la phase de test (stade 2- 24h plus tard). Trois types de paires sont présentées : une paire recombinée (AB), qui permet de tester la flexibilité mnésique, caractéristique de la mémoire déclarative ; une paire « connue » (C) qui sert de contrôle positif ; et une paire inconnue (I) qui sert de contrôle négatif.

*Principe* : la tâche comprend 2 étapes. Au stade 1, l'animal apprend à discriminer les bras qui sont toujours appâtés de ceux qui ne contiennent jamais de nourriture. Au stade 2, la flexibilité mnésique est évaluée en modifiant la façon de présenter les bras, sans modifier leur valeur récompensante (bras appâté ou non).

*Déroulement :* l'ensemble des animaux a été divisé en deux cohortes. La première cohorte a subi l'intégralité de la procédure comportementale (stade 1 + stade 2). Elle se compose de trois groupes : Jeunes traités avec une solution saline (JS ; n=10) ; Agés traités avec une

solution saline (AS ; n=8) ; Agés traités au donépézil (AD ; n=8). Les animaux n'ayant pas atteint le critère d'apprentissage ont été exclus des analyses : AS (n=3) ; AD (n=3).
La deuxième cohorte a été utilisée afin de réaliser l'analyse immunohistochimique. Les animaux ont été sacrifiés lors de la troisième séance d'acquisition (stade 1). Elle se compose de six groupes, dont trois groupes de contrôle locomoteur: Jeunes contrôles locomoteurs traités avec une solution saline (n=6) ; Agés contrôles locomoteurs traités avec une solution saline (n=6) ; Agés contrôles locomoteurs traités au donépézil (n=6) ; et trois ayant effectué le comportement : JS (n=8) ; AS (n=7) ; AD (n=8).

*Habituation :* les souris ont préalablement été habituées au labyrinthe durant 2 jours au cours desquels chaque animal a visité librement tous les bras, ceux-ci étant tous appâtés. L'animal doit comprendre qu'une pastille de nourriture se trouve à chaque extrémité des bras. Une séance dure environ 10 minutes lors desquelles l'expérimentateur vérifie que les souris visitent chacun des bras du labyrinthe et mangent les pastilles de nourriture se trouvant à chaque extrémité.

*Acquisition (stade 1) :* chaque souris se voit attribuer 3 paires (A, B et C) de bras adjacents du labyrinthe radiaire (Figure 11). Chaque paire contient un bras appâté et un bras non appâté. La souris doit apprendre lequel des deux bras de chaque paire est appâté. A chaque essai, une des trois paires est ouverte et la souris doit entrer dans l'un des deux bras présentés. Dès que la souris est arrivée à l'extrémité du bras choisi, la porte de l'autre bras se ferme. Une fois la souris revenue sur la plate-forme centrale, la porte du bras choisi est à son tour fermée et la souris est confinée pendant 20 secondes (correspondant à l'intervalle-inter-essai ITI) avant l'essai suivant. Chaque session quotidienne comprend 20 essais au cours desquels les trois paires sont présentées selon une séquence prédéterminée. Les entraînements quotidiens se poursuivent jusqu'à ce que le sujet atteigne le critère d'apprentissage (75 % de réussite sur les deux dernières séances et 67 % de réponses correctes sur chaque paire). Le pourcentage de réussite (entrées dans les bras positifs) est analysé lors de cette étape.

*Test (stade 2) :* deux des paires apprises au stade 1 (paires A et B) sont recombinées en une nouvelle paire (AB) pour tester la flexibilité de la mémoire formée (Figure 11). La troisième paire apprise (C) reste inchangée et sert de contrôle positif. Une quatrième paire formée par les bras non utilisés au stade 1 (paire Inconnue, I) sert de contrôle négatif. Le protocole

d'ouverture et de fermeture des bras se déroule comme lors du stade 1. Ce second stade comprend une séance test de 20 essais. Les résultats sont exprimés en pourcentage de réponses correctes pour chacune des paires. Au cours de l'expérience, 15 animaux âgés ont été éliminés des analyses, ceux-ci étant morts (n=8) ou n'ayant pas atteint le critère de performance (n=6).

*Groupe de contrôle locomoteur :* les animaux « tapis roulants » constituent un groupe de contrôle locomoteur pour l'analyse immunohistochimique. Les animaux ont été placés chaque jour sur un tapis roulant situé dans la même pièce que le labyrinthe radiaire pendant une durée égale à celle d'une séance complète d'entraînement. Ils ont donc été entrainés pendant 5 jours (équivalent à deux jours d'habituation et trois jours d'acquisition).

**Immunohistochimie**

Sur la base des données précédentes montrant l'implication de l'hippocampe en début d'acquisition de la tâche chez la souris (Mingaud et al., 2007) ou chez l'homme (Etchamendy et al, en révision, Hippocampus), nous avons choisi de sacrifier les animaux au début de l'acquisition. Ainsi, les animaux prévus à cet effet ont été sacrifiés 90 minutes après le début de la troisième séance d'acquisition (en labyrinthe radiaire ou en tapis roulant) en vue de l'analyse immunohistochimique de la protéine Fos, classiquement utilisée comme indicateur de l'activité neuronale (Guzowski et al., 2001). Pour cela, les souris ont été anesthésiées par une injection d'avertine intra-péritonéale, puis perfusées en intracardiaque avec 100 mL de paraformaldéhyde 4 % dilué dans du tampon phosphate (TP 0,1 M ; pH 7,4). Les cerveaux ont été prélevés et post-fixés à 4°C pendant une nuit. Nous avons réalisé des coupes frontales sériées (50 µm) à l'aide d'un Vibratome (Leica) dans du TP froid, et nous les avons conservées à -20°C dans un liquide de cryoprotection (30 % de glycerol / 30% d'ethylène glycol dans du tampon phosphate 0,1M final) en prévision de l'immunohistochimie.

L'ensemble des étapes décrites ci-après a été effectué sous agitation dans des puits de boîtes de cultures dans des volumes de 4 à 6 mL pour chaque lot de coupe : chaque rinçage dure 12 minutes et s'effectue à 4°C. Suite à 4 lavages au TP, les coupes ont été incubées en présence d'$H_2O_2$ diluée à 0,5% dans du TP à 4°C pendant 30 minutes (inhibition des peroxydases endogènes). Après 4 rinçages au TPS 0.1M (tampon phosphate + 0,9% de NaCl), les coupes ont été incubées dans une solution de saturation à 4°C pendant deux heures (TPS

0,1M ; albumine sérique bovine 1% ; sérum de chèvre 3% ; Triton X100 0,2%) puis dans l'anticorps primaire polyclonal de Lapin (anti-c-Fos, Santa-Cruz Biotechnologies-USA) dilué au 1/10000 dans la solution de saturation, à 4°C pendant 36 heures. Après 4 nouveaux rinçages au PBS 0,1M, les coupes ont été mises en présence de l'anticorps secondaire (couplé à la peroxydase, Jackson Immunoresearch-USA) dilué au 1/2000 dans la solution de saturation, pendant deux heures à température ambiante. Ensuite, afin d'amplifier le signal, les coupes ont été mises en présence d'une solution permettant la formation du complexe avidine-biotine (Vectastain Elite kit, Vector Laboratories-USA) pendant deux heures à température ambiante puis rincées 4 fois au tampon Tris (TT 0,1M). Enfin les coupes ont été incubées dans une solution de TT contenant un mélange de 2,3 diaminobenzidine (0,025%) / H2O2 (0,03%) à 4°C dont la réaction avec la biotine produit un précipité brun révélant la présence de la protéine d'intérêt. Cette étape de révélation a été arrêtée avec 4 rinçages au TT 0.05M. Les coupes ont été étalées sur lame de verre puis déshydratées dans deux bains successifs de toluène et montées entre lame et lamelle avec une résine (Eukitt). La quantification du marquage a été effectuée par microscopie (OLYMPUS BX 50, Biocom, Visiolab 2000, V4.50) grâce à un logiciel d'acquisition et de traitement d'images (Biocom Visiolab 2000). Pour chaque individu et chaque structure, le comptage a été réalisé sur trois à quatre coupes successives et dans les deux hémisphères afin d'effectuer une moyenne. Les données pour chaque groupe expérimental ont été exprimées en pourcentage de neurones immunopositifs/$mm^2$ par rapport au niveau des groupes contrôles « tapis roulant » selon la formule [(Expérimental x 100 / TR) – 100]. L'activité de base due aux effets locomoteurs est donc 0%. La quantification a été réalisée dans les sous-régions de l'hippocampe dorsal (CA1, CA3 et gyrus denté) le striatum dorso-médian, le noyau latéral de l'amygdale et le cortex préfrontal médian (CPF).

**Analyses statistiques**

Les données ont été soumises à des analyses de variance (ANOVA) avec un seuil de confiance placé à $p<0,05$. Les comparaisons ont été réalisées pour les groupes JS et AS d'une part (effet *Age*), et pour les groupes AS et AD d'autre part (effet *Traitement*). Le cas échéant, un test-t de Student a été effectué par rapport au niveau de hasard (50%) avec un seuil de confiance placé à $p<0,05$.

## Résultats

*Données comportementales*

Les données obtenues pendant l'acquisition de la tâche (Figure 12) montrent que tous les animaux, quelles que soient les conditions d'âge et de traitement, ont atteint le même niveau de performance avant de passer le test (stade 2). En effet, les ANOVAs avec mesures répétées ne montrent aucun effet de l'âge ($F_{1,16}$=0,82 ; p=0,38), du traitement ($F_{1,14}$=0,07 ; p=0,8), ou de leurs interactions avec les séances ($F_{5,80}$=0,23 ; p=0,95 et $F_{5,70}$=0,93 ; p=0,46, respectivement ; Figure 12-A). Cependant, il y a une forte tendance à ce que les individus jeunes (groupe JS) atteignent le critère d'apprentissage plus rapidement que les individus âgés non traités (groupes AS vs JS, ANOVA effet *âge* : $F_{1,16}$=4,24 ; p=0,056). Au contraire, le traitement n'affecte pas ce paramètre chez les individus âgés (groupes AS vs AD, ANOVA effet *traitement* : $F_{1,14}$=0,18 ; p=0,68 ; Figure 12-B).

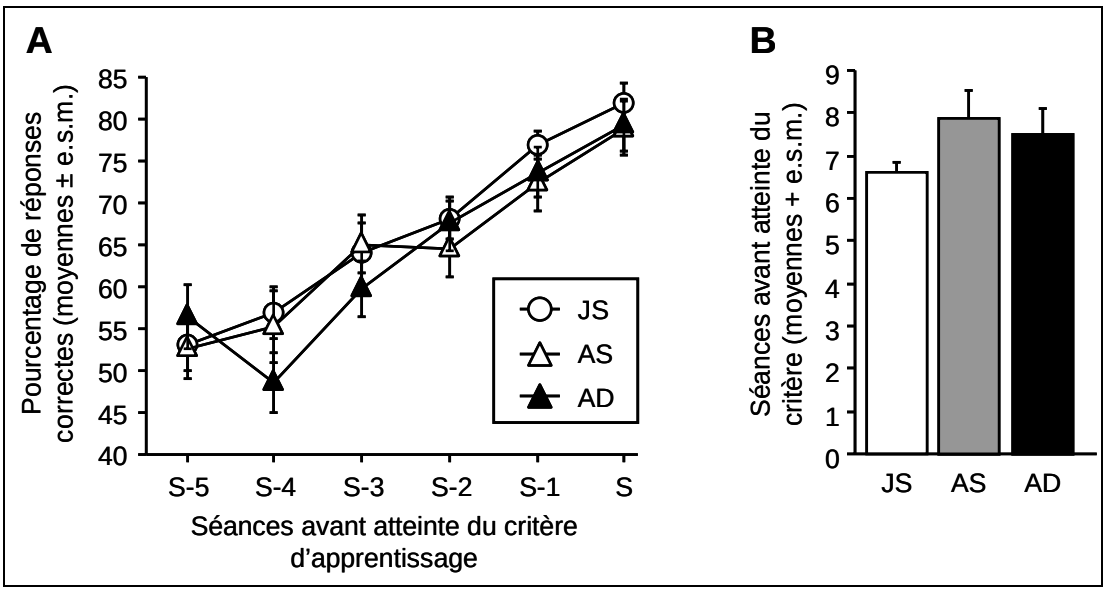



Figure 12 : (A) Evolution des pourcentages de réponses correctes lors des six dernières séances d'acquisition (stade 1) chez les souris jeunes traitées avec une solution saline (JS), âgées traitées avec une solution saline (AS) et âgées traitées au donépézil (AD). (B) Nombre moyen de séances avant atteinte du critère d'apprentissage pour les trois groupes cités précédemment. Dans les deux cas, aucune différence n'est observée entre les groupes.

Les résultats obtenus lors du test sur la paire recombinée mesurant la flexibilité mnésique (stade 2 – Figure 13-A) révèlent un effet de l'âge, les individus AS ne pouvant pas

utiliser leur mémoire de façon flexible contrairement aux individus jeunes adultes. Ainsi, l'analyse statistique montre un effet *âge* très significatif (groupes JS vs AS, $F_{1,16}$=23,52 ; p<0,001). Ce résultat est d'ailleurs confirmé par des performances statistiquement supérieures au niveau de hasard (50%) pour les souris du groupe JS (p<0,0001) mais pas pour les souris du groupe AS (p=0,98). Cependant, la figure 13-A montre que le traitement pharmacologique au donépézil restaure partiellement les performances en flexibilité mnésique chez les individus âgés, ce qui est confirmé par un effet *traitement* significatif (groupes AS vs AD, $F_{1,14}$=6,7 ; p=0,02), les performances du groupe AD devenant significativement supérieures au hasard (Student t-test ; p<0,001).

Par ailleurs, les résultats obtenus sur les paires contrôles dites « connue » (Figure 13-B) et « inconnue » (Figure 13-C) ne révèlent aucune différence significative, quelles que soient les conditions d'âge (groupe JS vs AS, effet *âge* : paire connue, $F_{1,16}$=0,74 ; p=0,4 ; paire inconnue , $F_{1,16}$=0,23 ; p=0,64) et de traitement (groupes AS vs AD, effet *traitement* : paire connue, $F_{1,14}$=0,08 ; p=0,78 ; paire inconnue, $F_{1,14}$=0,63 ; p=0,44). L'ensemble des individus montre des performances qui se situent au-dessus du niveau de hasard (50%) pour la paire familière (tests t de Student par rapport au hasard, tous les p≤0,001), confirmant que toutes les souris conservent leur capacité à restituer leurs connaissances lorsque les paires ne sont pas recombinées. A l'inverse, l'ensemble des individus présente des performances qui se situent au niveau du hasard pour la paire inconnue, les animaux ne montrant logiquement aucun biais pour une paire qui ne leur a jamais été présentée auparavant (pour tous les groupes, t-tests de Student: p>0,3)

Pour résumer, les individus âgés présentent un déficit de flexibilité mnésique associé à la mémoire déclarative qui est partiellement corrigé par le traitement au donépézil.

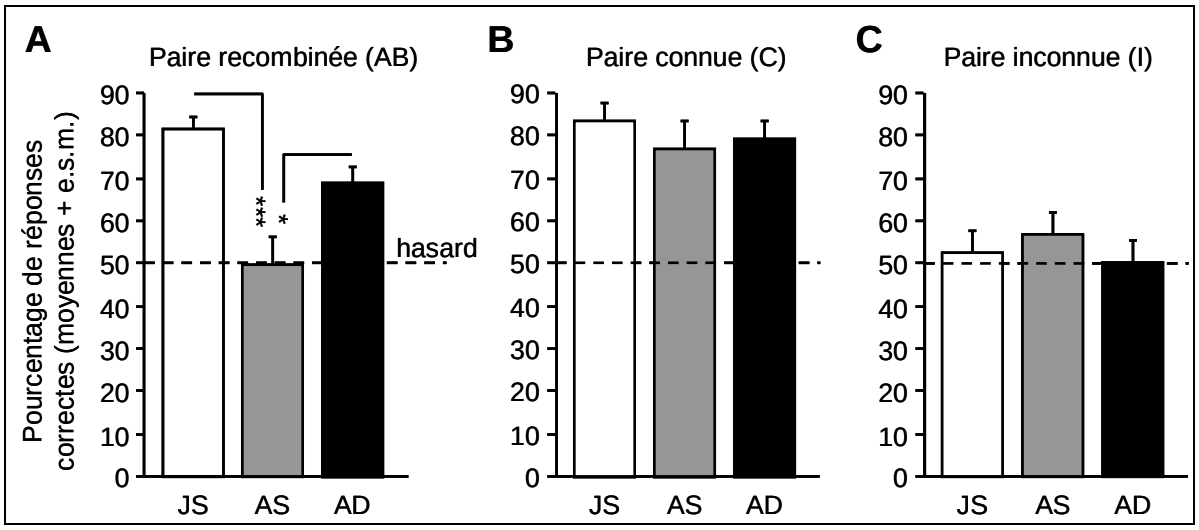



Figure 13 : Performances obtenues lors du test (stade 2) pour les paires recombinée AB mesurant la flexibilité mnésique (A), connue C (B) et inconnue I (C) chez les souris jeunes avec une solution saline (JS), âgées traitées avec une solution saline (AS) et âgées traitées au donépézil (AD). Les performances sont exprimées en pourcentage de réponses correctes (moyenne + ESM). *,*** : $p<0.5$, $p<0.001$.

*Données immunohistochimiques dans l'hippocampe*

L'analyse des niveaux d'activité des structures durant l'acquisition de la tâche (stade 1) a été réalisée par immunodétection de la protéine Fos. L'ensemble des données a été représenté en pourcentage de noyaux Fos immuno-positifs par mm² par rapport au niveau des groupes contrôles locomoteurs (tapis roulant) respectifs. La figure 14-A montre que les souris du groupe JS présentent une augmentation d'activité dans le CA1 qui est absente chez les animaux du groupe AS. Ce résultat est confirmé par l'analyse de variance montrant un effet *âge* significatif ($F_{1,12}$=6,17 ; p=0,04). En contrepartie, le traitement au donépézil semble restaurer cette augmentation de l'activité dans le CA1 des individus du groupe AD par rapport à ceux du groupe AS, même si l'ANOVA ne révèle qu'une forte tendance pour l'effet traitement (AS vs AD : $F_{1,12}$=3,8 ; p =0,07). Comme le montre la figure 14-B, le gyrus denté suit le même patron d'activité que le CA1. En effet, les souris du groupe JS présentent une augmentation significative de l'activité Fos dans le gyrus denté qui est absente chez les souris du groupe AS (Effet *âge* $F_{1,12}$=5.32 ; p=0,04), et de la même manière que précédemment, le traitement des souris âgées au donépézil tend à restaurer l'activation observée chez les jeunes (AS vs AD, effet *traitement* : $F_{1,12}$=3,7 ; p=0,08). Enfin, dans le CA3, les individus jeunes ne montrent aucune activité Fos, alors que les individus âgés présentent une hypo-activation par rapport à leurs contrôles moteurs respectifs. Le traitement des animaux âgés au donépézil tend à abolir cette hypo-activation, en ramenant le niveau de protéine Fos à celui des animaux

« *tapis roulant »*, ce qui est confirmé par le fait que seul le groupe AS montre une différence significative par rapport au niveau de base des contrôles moteurs (test t de Student, $p<0,05$ ; Figure 14-C).

*Données immunohistochimiques dans les autres structures*

Dans le cortex préfrontal, l'analyse immunohistochimique révèle le même patron d'activité que dans le CA1 et le gyrus denté. Les souris du groupe JS présentent une augmentation de l'activité Fos, alors que les souris AS présentent une hypo-activation préfrontale, et cette différence se révèle statistiquement significative (effet *âge* : $F_{1,12}=7,13$ ; $p=0,02$). Le traitement des individus âgés au donépézil (groupe AD) restaure l'activité dans le cortex préfrontal (groupes AS vs AD, effet *traitement* : $F_{1,12}=29,11$ ; $p<0,001$ ; Figure14-D).

Dans le striatum dorso-médian (Figure 14-E), les individus du groupe JS présentent une augmentation d'activité, qui n'est pas présente chez les souris âgées. Bien que l'ANOVA ne confirme pas cette observation (effet *âge* non significatif), un test t de Student révèle une différence significative par rapport au niveau de base moteur uniquement chez les animaux du groupe JS ($p<0,05$). Le traitement des animaux âgés avec le donépézil restaure l'activation à un niveau au moins équivalent à celui des individus jeunes. L'analyse statistique montre ainsi une activation Fos dans le striatum dorso-médian significativement plus élevée chez les individus du groupe AD que chez ceux du groupe AS (effet *traitement :* $F_{1,12}=6,25$ ; $p=0,03$) et des contrôles moteurs (test t de Student *vs* 0, $p<0,001$).

Enfin, dans l'amygdale, aucune modification de l'activité Fos n'est observée, quelles que soient les conditions d'âge ou de traitement (Figure 14-F).

Pour résumer dans l'ensemble des structures « activées » par l'apprentissage, le donépézil administré aux souris âgées, tend à ramener l'activation de ces structures à un niveau comparable à celui observé chez les individus jeunes.

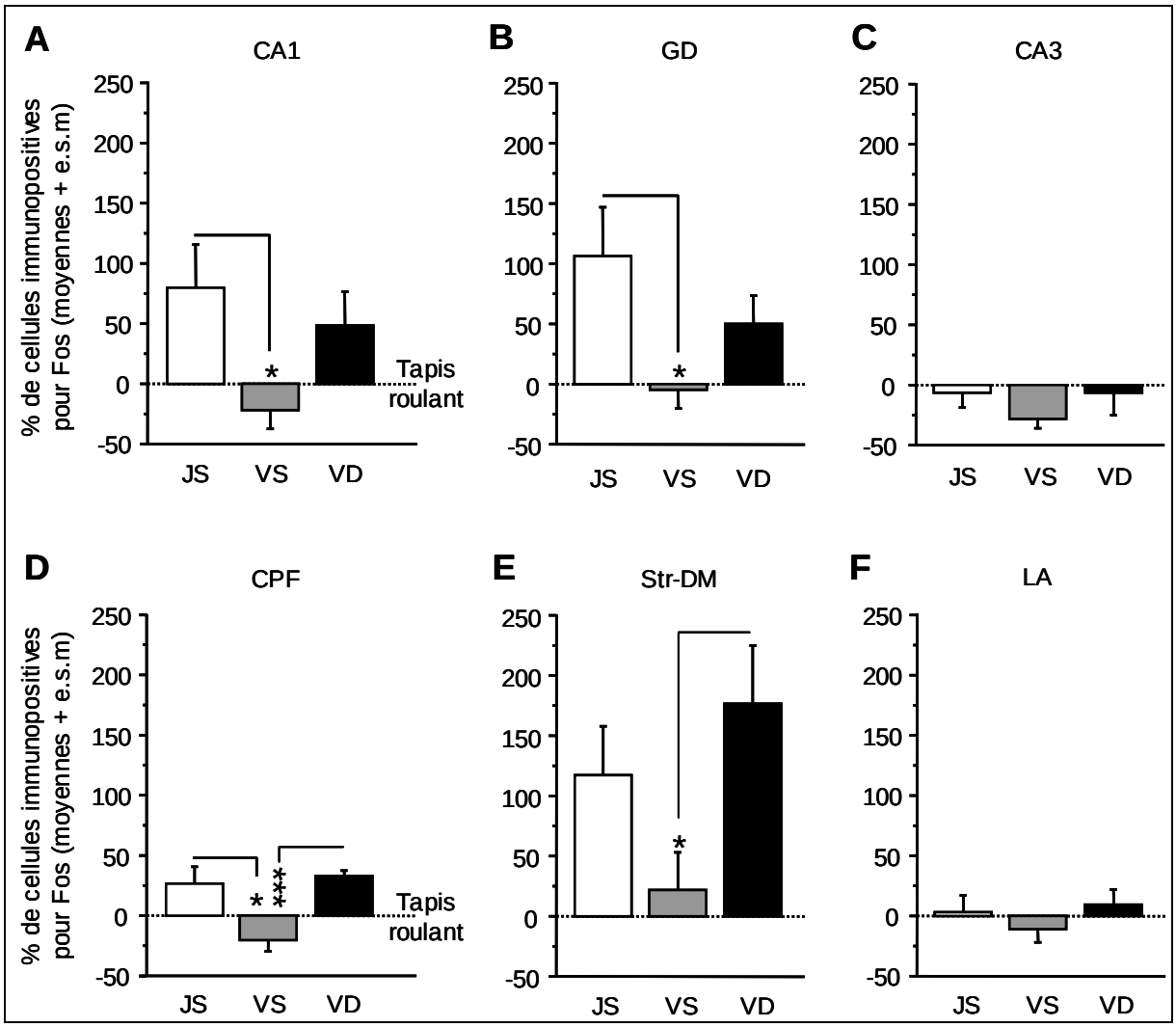



Figure 14 : Pourcentage de variation du nombre de cellules immunoréactives pour la protéine c-Fos par rapport aux contrôles locomoteurs dans le CA1 (**A**), le gyrus denté (GD - **B**), le CA3 (**C**), le cortex préfrontal (CPF - **D**), le striatum dorso-médian (Str-DM - **E**) et le noyau latéral de l'amygdale (LA -**F**) chez les souris jeunes *saline* (JS), âgées *saline* (AS) et âgées traitées au donépézil (AD). *,*** : p<0,5, p<0,001.

## Discussion

L'objectif de notre étude était de tester la validité de l'hypothèse selon laquelle la perte cholinergique pourrait contribuer aux réorganisations fonctionnelles associées au vieillissement. Pour cela nous avons cherché à montrer qu'une augmentation de la transmission cholinergique centrale ayant un effet promnésiant chez les individus âgés se traduirait également par une normalisation des activités cérébrales associées à la formation de la mémoire déclarative. Les résultats obtenus sont globalement conformes à l'hypothèse. Ils montrent que 1) le déficit de performance des animaux âgés dans le test critique de la

mémoire relationnelle/déclarative est associé à un défaut d'activation au moment de l'apprentissage, des régions CA1 et GD de l'hippocampe, ainsi que du cortex préfrontal et dans une moindre mesure du striatum dorso-médian (tendance seulement); 2) l'activation de ces mêmes structures est rétablie par le traitement au donépézil (tendance seulement pour le CA1 et le GD) qui réduit significativement le déficit de mémoire relationnelle/déclarative.

**Le déficit de mémoire relationnelle/déclarative des souris âgées est associé à une perturbation de l'activité des systèmes de mémoire**

Au plan comportemental, cette expérience reproduit et confirme les observations antérieures de l'équipe concernant l'inflexibilité mnésique des animaux âgés qui modélise le déclin préférentiel de la mémoire déclarative au cours du vieillissement (Marighetto et al., 1999; Etchamendy et al., 2001; Marighetto et al., 2008a; Mingaud et al., 2008). En effet, les résultats obtenus dans le test critique de mémoire relationnelle/déclarative (paire recombinée, stade 2) montrent que si les souris jeunes sont tout à fait capables d'utiliser de façon flexible les informations spatiales qu'elles ont acquises, ce n'est pas le cas des souris âgées, qui se comportent dans ce test comme si elles n'avaient rien appris au stade 1 (performances égales au niveau du hasard).

Au niveau de l'activité cérébrale pendant l'apprentissage, l'expérience confirme également à l'exception du striatum, les données antérieures mais obtenues à partir d'une autre version de la tâche. Avant de préciser et discuter cette conclusion, rappelons que dans l'autre version de la tâche, le stade 1 consiste en l'acquisition d'une discrimination en go/no-go, au cours de laquelle les bras sont appris un par un successivement; au stade 2, les bras sont combinés en paires (Marighetto et al, 1999).

Ainsi donc, chez les témoins jeunes tout d'abord, l'apprentissage des 3 paires dans notre expérience, comme l'apprentissage « en go/no-go » dans l'expérience antérieure (Mingaud et al, 2008), entraîne une activation significative des régions hippocampiques CA1 et gyrus denté, du cortex préfrontal (prélimbique) et du striatum (dorso-médian). Ces observations sont en accord avec les données de l'imagerie fonctionnelle chez l'homme, qui montrent que l'encodage réussi de la mémoire déclarative s'accompagne d'une activation hippocampique et préfrontale (Grady et al., 1995; Staresina et Davachi, 2006, 2009). L'activation striatale est également en accord avec les données de la littérature qui montrent que l'hippocampe et le striatum, sous-tendant respectivement les mémoires déclarative et

procédurale, peuvent être tous deux recrutés pendant l'apprentissage, et interagir de façon coopérative (Micheau et al., 2004) ou compétitive selon la tâche et/ou le niveau d'entrainement considérés (White et McDonald, 2002; Gold, 2003, 2004).

Egalement en accord avec les données antérieures, les animaux âgés traités au placebo ne présentent aucune activation dans l'hippocampe, ni dans le cortex préfrontal pendant l'apprentissage. Le défaut d'activation hippocampique est à mettre en parallèle avec le déficit de flexibilité de ces animaux. Il est cohérent avec l'observation d'une même inflexibilité mnésique chez des animaux jeunes dont l'hippocampe est lésé de façon permanente (Etchamendy et al., 2003), ou qui ont appris la tâche (stade 1) sous l'effet d'inactivation transitoire de l'hippocampe (Mingaud et al., 2007). Il est également en accord avec l'étude antérieure (Mingaud et al, 2008) montrant qu'à l'inverse, un traitement qui normalise l'activation hippocampique (vitamine A), restaure également une flexibilité mnésique normale chez des animaux âgés. Enfin, prises ensembles, ces observations confortent la valeur de notre modèle comportemental pour étudier le déclin de la mémoire relationnelle/déclarative. En effet, le défaut d'activation hippocampique est également associé au déficit d'encodage de la mémoire déclarative (Geinisman et al., 1995; Grady, 2000; Daselaar et al., 2006) chez l'homme âgé sain ou malade. Précisément, des défauts d'activation hippocampique pendant l'encodage mnésique ont été observés chez les sujets âgés non déficitaires, ainsi qu'à un stade avéré de la maladie d'Alzheimer, même si à l'inverse, des hyper-activations hippocampiques peuvent être observées dans les phases intermédiaires, c'est-a-dire à un stade précoce de la pathologie (Sperling, 2007; Miller et al., 2008a; O'Brien et al., 2010). Concernant le cortex préfrontal, les données obtenues chez l'homme, montrent que l'altération fonctionnelle de cette structure prend des formes plus variables encore que celle de l'hippocampe. Les sujets âgés peuvent en effet présenter des défauts d'activation préfrontale mais également des hyper-activations, ou des activations aberrantes de régions non activées chez les sujets jeunes (Cabeza, 2002; Grady et al., 2002; Miller et al., 2008b). Nos études chez la souris âgée, n'ont jusqu'ici mis en évidence qu'un défaut d'activation du cortex prélimbique au moment de l'acquisition.

La seule observation qui diffère de l'étude antérieure portant sur une version différente de la tâche, concerne le striatum. Même si l'effet de l'âge n'atteint pas le seuil de signification statistique, nos résultats montrent que l'activation du striatum observée chez les souris jeunes, est absente chez les souris âgées, alors qu'elle était normale dans l'étude précédente. Cette observation peut laisser penser que les interactions hippocampo-striatales ne sont pas tout à

fait identiques dans les deux versions de l'apprentissage, une idée qui sera reprise ci-dessous, dans la discussion des effets du donépézil.

**Le traitement procholinergique restaure partiellement la mémoire relationnelle/déclarative et tend à normaliser l'activité des systèmes de mémoire**

Au plan comportemental, nos résultats montrent un effet bénéfique du donépézil sur le déficit de mémoire relationnelle/déclarative qui est en accord avec les données antérieures obtenues par l'équipe et la littérature montrant chez les sujets âgés, les effets promnésiants de traitements à visée pro-cholinergique. Le traitement des souris âgées avec le donépézil provoque une restauration partielle des performances de flexibilité mnésique, sans affecter la vitesse ou la performance d'acquisition. Cet effet bénéfique sur la flexibilité mnésique avait déjà été observé avec le donépézil à la même dose, ou avec d'autres composés procholinergiques dans l'autre version de la tâche de mémoire relationnelle/déclarative (Marighetto et al., 2000; Marighetto et al., 2008a). Dans ces derniers cas toutefois, l'effet des inhibiteurs d'acétylcholinesterase (donépézil ou tacrine) étaient moins sélectifs, et ces composés amélioraient ou tendaient à améliorer l'apprentissage du « go/no-go ». Cette différence observée au plan comportemental sera discutée ci-dessous avec les effets du donépézil sur l'activité striatale. L'effet bénéfique du donépézil a également été montré par d'autres équipes dans des tâches hippocampo-dépendantes telles la discrimination sérielle et contextuelle (Tronche et al., 2010). Plus généralement, le donépézil et d'autres inhibiteurs d'acétylcholinesterase, étaient jusqu'à très récemment les seules drogues utilisées en clinique dans le traitement des symptômes cognitifs de la maladie d'Alzheimer, même si l'efficacité réelle de ces composés est parfois discutée (Pepeu et Giovannini, 2009, 2010).

Au plan de l'activité cérébrale, le donépézil normalise ou tend à normaliser les altérations fonctionnelles associées au vieillissement dans plusieurs régions cérébrales, ce qui conforte l'idée que l'hypocholinergie joue un rôle dans ces altérations. Précisément, nos résultats montrent que les activations du cortex préfrontal et du striatum sont rétablies au niveau des jeunes témoins par le donépézil, et celles du CA1 et du GD sont partiellement restaurées. Cette restauration partielle de l'activité hippocampique peut être reliée à la restauration partielle des performances de flexibilité, puisque cette dernière est fortement dépendante de la fonction hippocampique pendant l'apprentissage (Etchamendy et al., 2003; Mingaud et al., 2007).

Plus globalement, l'effet bénéfique du donépézil observé à l'échelle des systèmes peut être interprété comme une récupération du rôle modulateur et coordinateur de la transmission cholinergique sur les systèmes de mémoire (Gold, 2003, 2004; Parent et Baxter, 2004). En effet, si la mémoire déclarative est dépendante de l'intégrité fonctionnelle de l'hippocampe, elle ne peut être la résultante de l'activation seule de cette structure. On peut penser qu'au contraire, la formation de la mémoire déclarative requiert ou est optimisée par une activité coordonnée des systèmes de mémoire (White and McDonald, 2002), de façon adaptée à la tâche et peut-être aussi à chaque phase mnésique (Hasselmo, 2006). En conclusion, nos résultats suggèrent qu'une ***coordination optimale des systèmes de mémoire serait tributaire de la transmission cholinergique***.

L'interprétation précédente implique que la configuration d'activité des systèmes de mémoire, tout comme les interactions entre systèmes régulées par l'ACh, soient spécifiques de chaque situation d'apprentissage. Pour aller dans ce sens, mentionnons ici les différences que nous avons observées entre les deux versions de la tâche de mémoire relationnelle/déclarative. Nous avons déjà rapporté que les effets comportementaux du donépézil (ou de la tacrine) étaient moins spécifiques que ceux que nous observons ici. Au niveau des patrons d'activité Fos induits par l'apprentissage, nous verrons (cf chapitre 2) que dans la version dite « go/no-go » de la tâche de mémoire relationnelle/déclarative, les effets bénéfiques du donépézil sont essentiellement observés au niveau du champ CA1 de l'hippocampe. Le traitement n'a pas d'effet significatif sur l'activité du cortex préfrontal et surtout n'affecte aucunement le striatum, qui dans cet apprentissage du « go/ no-go », tend à être suractivé chez les animaux âgés. Ces différences suggèrent que les interactions entre systèmes de mémoire et leur modulation par l'ACh ne sont pas identiques entre les deux procédures d'apprentissage.

# Expérience 2 : effets d'une lésion partielle de la voie cholinergique septo-hippocampique sur les patrons d'activité cérébrale associés à l'expression de la mémoire relationnelle/déclarative chez la souris adulte.

## Introduction

Les données issues de l'expérience précédente et le recoupement des différentes données de la littérature nous amène à penser que la perte partielle de certaines populations de neurones cholinergiques pourrait être impliquée dans les modifications d'activité cérébrale fonctionnelle observées au cours du vieillissement. Pour étayer cette idée, nous tenterons de montrer qu'une lésion partielle de la voie septo-hippocampique mimant la perte associée au vieillissement, peut entrainer ***une modification des activités fonctionnelles au sein des systèmes de mémoire.*** Nous avons donc combiné chez la souris adulte une approche lésionnelle (par immunotoxine) à une analyse d'imagerie Fos, nous permettant d'évaluer l'activité des principales régions cérébrales impliquées dans l'expression de la mémoire relationnelle/déclarative.

## Méthodologie

Une expérience préliminaire nous a permis d'évaluer chez des souris âgées une diminution de 20-25% de la densité des neurones cholinergiques dans la région septale. Suite à cette expérience, nous avons induit une lésion d'amplitude comparable par une injection intraseptale d'$^{192}$IgG-saporine chez des souris jeunes. Les animaux ont ensuite été soumis à la tâche de mémoire relationnelle/déclarative en labyrinthe radiaire dans sa version la plus utilisée (Marighetto et al., 1999). Le stade 1 consiste en l'acquisition d'une discrimination en « go/no-go », au cours de laquelle les six bras sont présentés un par un successivement ; au stade 2, les bras sont combinés en trois paires, constituant le test de flexibilité évaluant l'expression de la mémoire relationnelle/déclarative. Pour les besoins de l'étude d'imagerie, une tâche de contrôle a été utilisée pour évaluer l'activité des régions cérébrales lors de l'expression de la mémoire non déclarative. Dans cette tâche de contrôle, les six bras sont

présentés simultanément au stade 2. L'utilisation combinée de la tâche de mémoire relationnelle/déclarative et de la tâche de contrôle permet d'évaluer deux types de mémoire par le biais de deux procédures identiques quant au nombre de bras présentés, à la position de la nourriture dans le labyrinthe, et à la phase d'acquisition initiale. La seule différence porte sur le nombre de bras accessibles à chaque essai : par paires pour le premier et les six en même temps pour le second (Etchamendy et al., 2003; Touzani et al., 2003; Mingaud et al., 2007). L'immunodétection de la protéine Fos a été effectuée après chaque test dans les régions essentielles aux principaux systèmes de mémoire (CA1, CA3, gyrus denté, striatum dorso-médian et amygdale latérale). Les données immunohistochimiques ont été soumises à une analyse comparant la connectivité fonctionnelle (Boucard et al., 2009) des systèmes dans chaque condition (de test et de lésion). Cette analyse établit le lien fonctionnel entre les structures cérébrales au moyen de coefficients de corrélation, mais sans nécessairement tenir compte de leurs connexions anatomiques.

## Principaux résultats et conclusions

Les données comportementales montrent que les souris lésées ne présentent aucun déficit dans cette procédure. Elles apprennent normalement la tâche de discrimination en « go / no-go » et ne présentent aucun déficit au stade 2, que le test soit celui de mémoire relationnelle/déclarative ou la tâche de contrôle de mémoire non-déclarative. Ces données sont en accord avec celles de la littérature, qui ne montrent pas ou peu de déficits mnésiques suite à la lésion spécifique de la voie septo-hippocampique (Baxter, 2001; Cahill et Baxter, 2001; Jonasson et al., 2004; Parent et Baxter, 2004).

Les données d'imagerie Fos montrent en revanche des effets significatifs de la lésion et confirment la dissociation entre le test de mémoire relationnelle/déclarative et la tâche de contrôle. En premier lieu, les patrons d'activation Fos hippocampiques et amygdaliens induits par les deux tests diffèrent. Le recrutement différentiel concerne le CA1, le gyrus denté et l'amygdale latérale qui sont sélectivement activés par le test de mémoire relationnelle/déclarative seulement. En outre, la connectivité fonctionnelle entre les structures cérébrales étudiées diffère également entre les deux tests. Ces résultats complètent les études comportementales antérieures qui dissociaient les deux tests de mémoire par leur sensibilité différente au effets du vieillissement et de la lésion/inactivation de l'hippocampe (Etchamendy et al., 2003; Touzani et al., 2003; Mingaud et al., 2007). En second lieu, la

lésion partielle des neurones cholinergiques septo-hippocampiques modifie les patrons d'activation induits par le test de mémoire relationnelle/déclarative, mais pas ceux du test non déclaratif. L'étude de la connectivité fonctionnelle montre que les patrons d'activation après lésion sont, quelque soit le test auquel les animaux ont été soumis, plus proches des patrons d'activation induits par la tâche de contrôle que de ceux induits par la tâche de mémoire déclarative/relationnelle. Ces résultats constituent un premier argument expérimental accréditant l'hypothèse selon laquelle ***le système cholinergique coordonne l'activité des différents systèmes de mémoire*** (Gold, 2003, 2004; Parent et Baxter, 2004). Et précisément, ils montrent que la voie cholinergique septo-hippocampique est particulièrement impliquée dans la coordination des systèmes sous-tendant l'expression de la mémoire relationnelle/déclarative.

De façon plus précise, la lésion perturbe les structures normalement activées par le test de mémoire relationnelle/déclarative comme le CA1 (tendance) et l'amygdale latérale, mais produit une hyper-activation anormale du CA3 et du striatum (tendance). L'hyper-activation du CA3 suite à la lésion cholinergique rejoint deux questions importantes de la littérature : celle de **la régulation cholinergique des propriétés computationnelles de l'hippocampe**, et celle de **l'hyperactivation hippocampique comme signe préclinique de la pathologie d'Alzheimer.**

Concernant la première question, l'ACh régulerait les propriétés de *pattern separation/pattern completion* de l'hippocampe. En effet, selon certains modèles computationnels, la lésion de la voie cholinergique septo-hippocampique entrainerait une perturbation des mécanismes sous-corticaux régulant l'activité récurrente du CA3 (Hasselmo et al., 1995) et serait impliquée dans la régulation de la balance entre les processus d'encodage et de rappel (Hasselmo, 2006). En parallèle, l'étude des cellules de lieu montre une augmentation du taux de décharge des cellules du CA3 chez les rats âgés (Wilson et al., 2005a) et que, lors de l'exposition à un environnement nouveau, les représentations spatiales des rats âgés ou lésés au niveau de la voie septo-hippocampique s'avèrent plus rigides que celles des rats jeunes et pseudo-lésés (Ikonen et al., 2002; Wilson et al., 2003; Wilson et al., 2005a; Wilson et al., 2005b). Selon les auteurs, plutôt que de former une représentation nouvelle de chaque environnement (*pattern separation*) les animaux âgés ou lésés « réactiveraient » la représentation d'un environnement connu. Les rats âgés utiliseraient donc préférentiellement la fonction de *pattern completion* (Gallagher et al., 2010), sous-tendue par le CA3 (Kesner et al., 2000), au détriment du *pattern separation*, préférentiellement sous-

tendue par le gyrus denté (Kesner et al., 2000; Leutgeb et al., 2007; Fellini et al., 2009). Les données humaines s'accordent d'ailleurs avec les données obtenues chez le rat puisque les sujets âgés présentent également un déficit de la fonction de *pattern separation* (Toner et al., 2009; Yassa et al., 2010) en lien avec une hyper-activation du CA3 (Yassa et al., 2010). Par ailleurs, il a été montré que le système cholinergique contribuait à ce changement de stratégie (Sava et Markus, 2008). Ainsi, la sur-activation du CA3 observée chez nos souris lésées est-elle en accord avec l'hypothèse d'un ***changement de stratégie menant à une utilisation excessive du pattern completion*** (Gallagher et al., 2010). Cette analyse permet d'expliquer que la lésion septo-hippocampique cholinergique n'induise pas de déficit dans notre procédure comme dans beaucoup d'autres tâches hippocampo-dépendantes utilisées dans d'autres études.

Concernant la deuxième question, cette hyper-activation du CA3 peut être rapprochée de certaines observations faites dans le cadre de la pathologie d'Alzheimer. En effet, l'altération du système cholinergique semble jouer un rôle crucial dans les détériorations fonctionnelles aboutissant à cette maladie (Ibach et Haen, 2004; Goekoop et al., 2006). Des études d'imagerie effectuées chez l'homme rapportent une hyper-activation de l'hippocampe chez des patients MCI (Mild Cognitive Impairment), qui correspond à un stade prodromique de la maladie (Dickerson et al., 2004; Sperling, 2007; Miller et al., 2008a), mais également chez des individus ne présentant pas de signes de démence (O'Brien et al., 2010). Dans ces études, l'hyper-activation hippocampique semble être prédictive du développement futur de la pathologie. D'après nos observations, cette hyper-activation pourrait résulter du dysfonctionnement du système cholinergique septo-hippocampique. La signification fonctionnelle de l'hyperactivation reste à préciser, mais elle pourrait représenter un mécanisme compensatoire en réponse à une dégradation générale de la fonction hippocampique (Sperling, 2007).

Pour conclure, ***la lésion du système cholinergique septo-hippocampique pourrait donc permettre de modéliser les réorganisations fonctionnelles apparaissant au stade prodromique de la maladie d'Alzheimer.***

**Aging-like removal of septo-hippocampal cholinergic neurons induces CA3 hyperactivation in relational/declarative memory expression in mice**

Laurent Brayda-Bruno, Nicole Mons, Jacques Micheau, Xavier Nogues & Aline Marighetto

Centre de Neurosciences Intégratives & Cognitives, CNRS UMR 5228, Université Bordeaux 1, Avenue des Facultés, 33405 Talence Cedex, France.

**Corresponding author:** Dr. A. Marighetto e.mail: a.marighetto@cnic.u-bordeaux1.fr

**Abstract**

The impact of cholinergic loss in aging-related decline in hippocampus-dependent, relational/declarative memory (R/DM) is poorly understood. Here we examined whether an aging-like removal of the septo-hippocampal cholinergic (SHC) neurons could change functional activity patterns within brain circuits underlying R/DM as naturally occurring in aging. Mice with a partial SHC lesion were trained in a radial-maze learning task and then submitted to an R/DM or non-R/DM test. Fos immunodetection in critical brain areas showed that the lesion changed functional activities associated with R/DM but not non-R/DM expression. After R/DM testing, cholinergic lesion enhanced Fos activity in hippocampal CA3 and to a lesser extend in dorso-medial striatum, but disrupted lateral amygdala activation. The present study identifies cholinergic loss as a likely mechanism contributing to functional reorganization typically seen in aging. Specifically, the fact that an aging-mimicking removal of SHC neurons resulted in CA3 overactivity may be relevant to the pathophysiology of Alzheimer's disease (AD) given that hippocampal hyperactivation is found in prodromal AD subjects.

**Key words:** P75 saporin immunotoxin; Fos expression; radial maze; cholinergic system

## 1. Introduction

Cholinesterase inhibitors are currently used as memory enhancers in AD to compensate functional alterations caused by loss in cholinergic neurons (Bartus et al., 1982; Pepeu et Giovannini, 2009). However, cholinergic involvement in characteristic degradation of hippocampus-dependent, R/DM occurring in early AD is poorly understood. Indeed, selective cholinergic deafferentation of the hippocampus by intraseptal injection of immunotoxin saporin often failed to produce memory degradation resembling the one seen in aged/hippocampectomized animals (Parent et Baxter, 2004).

Hence, we know that partial loss in SHC neurons occurring in aging cannot account for concomitant decline in R/DM by itself, but new investigations are needed to understand the role of these neurons in aging. In particular, the functional consequences of a partial loss in SHC neurons are unknown at system level, yet alteration in activity patterns and functional connectivity within brain structures involved in memory is one major characteristic of cognitive aging.

Brain aging has been associated with both reduced and increased neural activity during execution of memory task (Grady, 2008) and the direction of activity changes in specific brain structures may help detecting pathological aging long before the clinical stage (Sperling, 2007). Indeed, in the hippocampus, less activity at R/DM encoding has been consistently found in cognitively impaired aged subjects, but increased activation was found in recent fMRI studies of subjects at risk for AD, by virtue of their genetics or evidence of mild cognitive impairment (MCI). Because hippocampal hyper-activation was found to precede and predict pathological R/DM decline (Miller et al., 2008a; O'Brien et al., 2010), it may represent a preclinical sign of AD.

These observations highlight the need to identify basic mechanisms underlying functional alterations of memory systems occurring in aging, and current views of cholinergic function suggest that cholinergic loss might be involved. Indeed, acetylcholine is believed to act as a modulator of its target-structures (Parent et Baxter, 2004), differentially affecting encoding, consolidation and retrieval functions (Hasselmo, 2006), and possibly coordinating R/DM and non-R/DM systems' activity (Gold, 2003, 2004); (Marighetto et al., 1993; White et McDonald, 2002). In particular, evidence from animal learning studies indicate that hippocampal cholinergic transmission influences the relative contribution of the hippocampus and other brain structures, like the amygdala (McIntyre et al., 2002; Calandreau et al., 2006) or striatum (Chang et Gold, 2003; McIntyre et al., 2003; Pych et al., 2005), underlying non-R/DM (White et McDonald, 2002). Moreover, cholinergic drugs can affect sensorial processing- and memory-related functional activity patterns in both young and aged human subjects (Freo et al., 2002; Dickerson, 2006).

In the present study, we used a mouse model of R/DM to explore at neural system level, the functional consequences of an aging-like removal of SHC neurons, and thereby examined whether cholinergic loss may contribute to functional alterations occurring in aging. We hypothesized that even moderate removal of SHC neurons would alter functional activities within memory systems, and tested this hypothesis by combining partial SHC saporin lesion to Fos imaging within critical brain areas involved in R/DM and non-R/DM expression in mice.

**2. Material and methods** (*cf* Supplementary methods for detailed description)

First, we compared the density of ChAT immunopositive medial septum neurons, the main source of the cholinergic innervation of the hippocampus (Mesulam et al., 1983a) in young

and aged mice (3-4 *vs* 20-22 months). Then, we produced an aging-mimicking loss of the same amount of cells in young mice by intraseptal injection of the p75-IgG-saporin (0.2 M, 0.3 µl, phosphate buffered saline).

*2.1. Behavioral procedure:* Saporin-injected mice and their Sham controls were submitted to behavioral training either in a radial-maze discrimination learning task previously designed to modeling aging-related preferential decline in R/DM (Marighetto et al., 1999), or treadmill serving as locomotor activity control condition (*cf* (Touzani et al., 2003).

The critical advantage of the radial-maze task is assessment of aging-sensitive, hippocampus-dependent R/DM *vs* non-R/DM expression by means of two tests which are identical in every aspect, except the number of arms accessible at a time (Etchamendy et al., 2003; Mingaud et al., 2007). Namely, radial-maze training comprised two phases (*Supplementary Figure 1*). In the acquisition phase (stage 1), all mice learnt the constant location of food-reward among a set of six arms (3 baited, 3 non-baited) according to a successive go/no-go discrimination procedure, until reaching the acquisition criterion. On the following day (stage 2), the mice were submitted to a memory test-session before being sacrificed for Fos immunohistochemistry (90 minutes later, idem for treadmill controls after the last training session). Half of the mice were submitted to the hippocampus-dependent memory test, therefore considered as R/DM probe, where the arms were rearranged into three pairs presented in turn (i.e., successive "two-choice" tests). The second half was submitted to a non-R/DM test, where all the six arms were made accessible at a time (i.e., successive "six-choice" tests).

*2.2. Fos immunohistochemistry* was performed following the procedure described in (Mingaud et al., 2008). The density of Fos positive cells was counted in critical brain structures for R/DM and non-R/DM, *i.e.* CA1, CA3 and DG subfields of the hippocampus, the dorso-medial striatum, and the lateral amygdala. For each structure, Fos data were

submitted to ANOVAs including the between-subject factor *Memory test* (Treadmill, non-R/DM and R/DM) to identify activation induced by one specific task, and with the factor *Lesion* (Sham *vs* Saporin) to identify significant lesion-induced alteration in brain activities. Fos data were also submitted to statistical analyses of functional connectivity, following a (bootstrapping) procedure developed by (Boucard et al., 2009); *cf* supplementary methods).

## 3. Results

***ChAT immunohistochemistry*** showed that aging is associated with a moderate (17.5%) decrease in the density of cholinergic neurons in the medial septum (One-way ANOVA, *Age* effect: $F_{1,19}$=5.87; p=0.026; Figure 1A). The saporin lesion in young mice induced a 19.7% decrease in the density of these SHC neurons, hence producing neuronal loss of the same amplitude as the one observed in aged mice (*Lesion* effect: $F_{1,34}$=4.99; p=0.032; Figure 1B).

***Behavioral results*** showed that the aging-like cholinergic lesion did not affect the performance, whichever the stage and the memory test considered. In Stage 1 (Figure 2A), the Sham and Saporin groups reached the acquisition criterion in the "go/no-go" task with the same amount of training sessions (*Lesion* effect: $F_{1,34}$<1). Similarly, in Stage 2 (Figure 2B), the percentages of correct choices (of baited arms) were similar among the Sham and Saporin groups, either in the R/DM task (*Lesion* effect: $F_{1,15}$=1.05; p=0.32) or non-R/DM task (*Lesion* effect: $F_{1,17}$<1).

Regarding ***Fos immunohistochemical results***, two observations can be made. 1) Neural systems were differentially recruited by the two memory tests in normal conditions (Figures 2C-G, left side). Indeed, the CA1, DG and lateral amygdala exhibited a selective R/DM-dependent activation in Sham mice. This observation was supported by one-way ANOVAs on Sham data which revealed a significant effect of *Memory Test* in CA1 ($F_{2,23}$=4.89, p=0.017) , DG ($F_{2,23}$=6.66, p=0.005) and lateral amygdala ($F_{2,23}$=8.71, p=0.0015), but not in other

structures. 2) The aging-mimicking removal of SHC neurons modified brain activity patterns associated with R/DM but not non-R/DM expression (Figures 2C-G, right side). Namely, the lesion disrupted CA1 and lateral amygdala's activation seen in Sham mice, while it led to an abnormal activation of hippocampal CA3 and dorso-medial striatum structures, which were not recruited by the R/DM test in the Sham condition. This observation was supported by statistical analyses. First, one-way ANOVAs on Saporin data revealed a significant effect of *Memory Test* in CA3 ($F_{2,19}$=4.81, p=0.02), DG ($F_{2,19}$=6.94, p=0.006) and medio-dorsal striatum ($F_{2,19}$=11.279, p=0.0006) but not in CA1 and lateral amygdala. Second, two-way ANOVAs revealed that the *Memory Test x Lesion* interaction was significant in CA3 ($F_{2,43}$=3.14, p=0.05) and lateral amygdala ($F_{2,43}$=4.5, p=0.02), and close to statistical significance in the dorso-medial striatum (p=0.06).

Finally, analyses of functional connectivity based on bootstrapping tests of Fos inter-structure correlation matrices (*cf* supplementary data: bootstrapping results and Figure 2) led to two principal conclusions. First, the functional connectivity within structures differed between the R/DM and non-R/DM memory tests in normal (Sham) conditions, hence further dissociating these two tests at the system level. Second, the SHC neurons normally contribute to triggering functional connectivity pattern of R/DM. Indeed, functional connectivity did not varied as a function of the memory test in Saporin groups, and was closer to the non-R/DM Sham group than to the R/DM Sham one.

## 4. Conclusion

As a first investigation on the effect of a selective immunotoxic cholinergic lesion at system level, our study identifies SHC loss as a likely contributor to aging-related functional reorganization in brain systems underlying R/DM. Indeed, present Fos neuroimaging demonstrated that an aging-mimicking lesion disrupted functional activity in structures

selectively activated during execution of the R/DM task, while leading to an abnormal hyperactivation of hippocampal CA3 and to a lesser extent dorso-medial striatum, which were not recruited by this task in normal conditions.

The finding that a partial SHC lesion induced CA3 subfield's hyperactivity leads to raise two specific points. First, it can explain why selective SHC lesion often fails to produce memory degradation, and fits with the view originating from computational models (Buzsaki, 1989; Hasselmo et Bower, 1993) that cholinergic loss may contribute to imbalance between R/DM encoding and recall processes. Second, it is potentially relevant for understanding pathological aging as paradoxical increase in hippocampal activity occurs in an early phase of prodromal AD.

*4.1. CA3 hyperactivation after partial removal of SHC neurons fits with the view of computational shift* (*cf* (Gallagher et al., 2010). Numerous studies in animals with saporin SHC lesions have questioned the cholinergic hypothesis of memory-decline in aging by showing apparently normal hippocampus-dependent memory after cholinergic deafferentation (Parent et Baxter, 2004). However, an increasing body of evidence indicates that acetylcholine influences in opposite directions two complementary computational functions of the hippocampus, favoring encoding but hindering retrieval of memory representations. Thus, cholinergic loss should not result in obligatory deficit in all memory tasks, but nevertheless affect R/DM processes in a manner leading to encoding defects, as typically seen in aged subjects. In particular, similar "rigidity" of place cells found in aged and saporin lesioned rats submitted to an unfamiliar environment suggests that cholinergic loss may contribute to disruption of hippocampal function required for encoding distinctive representations of new experiences, i.e. pattern separation (Ikonen et al., 2002; Wilson et al., 2005b). Instead of creating distinctive representations of different environments, aged rats tended to retrieve the same representation, a process known as generalization/pattern

completion. Older human subjects indeed exhibited an increased tendency to engage in pattern completion at the expense of pattern separation (Toner et al., 2009). The idea that cholinergic hypofunction contributes to such computational shift was further demonstrated by a pharmacological manipulation of place cells' properties where an activation of SHC neurons reversed new representations' encoding defect in aged rats, and impaired retrieval of stored representations in young rats (Sava et Markus, 2008). According to computational models, a shift in the balance between external cortical inputs into DG/CA3 that drive pattern-separation and CA3 autoassociative control that mediates pattern-completion could both elevate CA3 activity and prevent encoding of new information. Thus, in addition to a previous report on enhanced activity in aged CA3 cells (Wilson et al., 2005a), present CA3 hyperactivation seen in saporin lesioned mice fits with the view that cholinergic loss contributes to a computational shift leading to excessive pattern-completion (Wilson et al., 2004; Gallagher et al., 2010).

*4.2. Relevance to the pathophysiology of prodromal AD.* The appearance of CA3 hyperactivation following partial SHC lesion also complements the literature which suggests a key role of the cholinergic system in the functional processes that lead to Alzheimer's disease (Ibach et Haen, 2004; Goekoop et al., 2006). Indeed, while reduced hippocampal activity during memory tasks' execution is typically found in cognitively impaired subjects, recent fMRI studies have found a paradoxical increase in hippocampal activity at prodromal stage of AD (*cf* introduction). The significance of such hippocampal hyperactivation is not known yet. It may be consecutive to a shift in network properties as discussed above or rather represent a compensatory phenomenon in response to a failing memory system (Sperling, 2007). Whatever might be the case, the present finding shows that moderate cholinergic loss can potentially contribute to normal aging conversion into AD.

Finally, present demonstration that altering hippocampal activity resulted in concomitant changes in amygdalar and striatal functional activities provides new leads that will help us to

understand the view that multiple memory systems work in an interactive manner (White et McDonald, 2002). Altogether our findings highlight the potential interest of approaches at system level in animal models in order to identify underlying mechanisms of cognitive aging.

**Acknowledgements:** This work was supported by the C.N.R.S, Conseil Régional d'Aquitaine, Fondation NRJ-Institut de France & GIS longévité.

**Disclosure Statement:** No author has any conflict of interest relative to this manuscript.

**Bibliography**:

Bartus R.T., Dean R.L., 3rd, Beer B., Lippa A.S., 1982. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. Science 217, 408-414.

Boucard A., Mons N., Micheau J., Nogues X., 2009. Activating a memory system focuses connectivity toward its central structure. Behav Brain Res 204, 226-234.

Buzsaki G., 1989. Two-stage model of memory trace formation: a role for "noisy" brain states. Neuroscience 31, 551-570.

Calandreau L., Trifilieff P., Mons N., Costes L., Marien M., Marighetto A., Micheau J., Jaffard R., Desmedt A., 2006. Extracellular hippocampal acetylcholine level controls amygdala function and promotes adaptive conditioned emotional response. J Neurosci 26, 13556-13566.

Chang Q., Gold P.E., 2003. Switching memory systems during learning: changes in patterns of brain acetylcholine release in the hippocampus and striatum in rats. J Neurosci 23, 3001-3005.

Dickerson B.C., 2006. Functional magnetic resonance imaging of cholinergic modulation in mild cognitive impairment. Curr Opin Psychiatry 19, 299-306.

Etchamendy N., Desmedt A., Cortes-Torrea C., Marighetto A., Jaffard R., 2003. Hippocampal lesions and discrimination performance of mice in the radial maze: sparing or impairment depending on the representational demands of the task. Hippocampus 13, 197-211.

Freo U., Pizzolato G., Dam M., Ori C., Battistin L., 2002. A short review of cognitive and functional neuroimaging studies of cholinergic drugs: implications for therapeutic potentials. J Neural Transm 109, 857-870.

Gallagher M., Bakker A., Yassa M.A., Stark C.E., 2010. Bridging neurocognitive aging and disease modification: targeting functional mechanisms of memory impairment. Curr Alzheimer Res 7, 197-199.

Goekoop R., Scheltens P., Barkhof F., Rombouts S.A., 2006. Cholinergic challenge in Alzheimer patients and mild cognitive impairment differentially affects hippocampal activation--a pharmacological fMRI study. Brain 129, 141-157.

Gold P.E., 2003. Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. Neurobiol Learn Mem 80, 194-210.
Gold P.E., 2004. Coordination of multiple memory systems. Neurobiol Learn Mem 82, 230-242.
Grady C.L., 2008. Cognitive neuroscience of aging. Ann N Y Acad Sci 1124, 127-144.
Hasselmo M.E., 2006. The role of acetylcholine in learning and memory. Curr Opin Neurobiol 16, 710-715.
Hasselmo M.E., Bower J.M., 1993. Acetylcholine and memory. Trends Neurosci 16, 218-222.
Ibach B., Haen E., 2004. Acetylcholinesterase inhibition in Alzheimer's Disease. Curr Pharm Des 10, 231-251.
Ikonen S., McMahan R., Gallagher M., Eichenbaum H., Tanila H., 2002. Cholinergic system regulation of spatial representation by the hippocampus. Hippocampus 12, 386-397.
Marighetto A., Micheau J., Jaffard R., 1993. Relationships between testing-induced alterations of hippocampal cholinergic activity and memory performance on two spatial tasks in mice. Behav Brain Res 56, 133-144.
Marighetto A., Etchamendy N., Touzani K., Torrea C.C., Yee B.K., Rawlins J.N., Jaffard R., 1999. Knowing which and knowing what: a potential mouse model for age-related human declarative memory decline. Eur J Neurosci 11, 3312-3322.
McIntyre C.K., Marriott L.K., Gold P.E., 2003. Cooperation between memory systems: acetylcholine release in the amygdala correlates positively with performance on a hippocampus-dependent task. Behav Neurosci 117, 320-326.
McIntyre C.K., Pal S.N., Marriott L.K., Gold P.E., 2002. Competition between memory systems: acetylcholine release in the hippocampus correlates negatively with good performance on an amygdala-dependent task. J Neurosci 22, 1171-1176.
Mesulam M.M., Mufson E.J., Wainer B.H., Levey A.I., 1983. Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). Neuroscience 10, 1185-1201.
Miller S.L., Fenstermacher E., Bates J., Blacker D., Sperling R.A., Dickerson B.C., 2008. Hippocampal activation in adults with mild cognitive impairment predicts subsequent cognitive decline. J Neurol Neurosurg Psychiatry 79, 630-635.
Mingaud F., Le Moine C., Etchamendy N., Mormede C., Jaffard R., Marighetto A., 2007. The hippocampus plays a critical role at encoding discontiguous events for subsequent declarative memory expression in mice. Hippocampus 17, 264-270.
Mingaud F., Mormede C., Etchamendy N., Mons N., Niedergang B., Wietrzych M., Pallet V., Jaffard R., Krezel W., Higueret P., Marighetto A., 2008. Retinoid hyposignaling contributes to aging-related decline in hippocampal function in short-term/working memory organization and long-term declarative memory encoding in mice. J Neurosci 28, 279-291.
O'Brien J.L., O'Keefe K.M., LaViolette P.S., DeLuca A.N., Blacker D., Dickerson B.C., Sperling R.A., 2010. Longitudinal fMRI in elderly reveals loss of hippocampal activation with clinical decline. Neurology 74, 1969-1976.
Parent M.B., Baxter M.G., 2004. Septohippocampal acetylcholine: involved in but not necessary for learning and memory? Learn Mem 11, 9-20.
Pepeu G., Giovannini M.G., 2009. Cholinesterase inhibitors and beyond. Curr Alzheimer Res 6, 86-96.
Pych J.C., Chang Q., Colon-Rivera C., Haag R., Gold P.E., 2005. Acetylcholine release in the hippocampus and striatum during place and response training. Learn Mem 12, 564-572.

Sava S., Markus E.J., 2008. Activation of the medial septum reverses age-related hippocampal encoding deficits: a place field analysis. J Neurosci 28, 1841-1853.

Sperling R., 2007. Functional MRI studies of associative encoding in normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. Ann N Y Acad Sci 1097, 146-155.

Toner C.K., Pirogovsky E., Kirwan C.B., Gilbert P.E., 2009. Visual object pattern separation deficits in nondemented older adults. Learn Mem 16, 338-342.

Touzani K., Marighetto A., Jaffard R., 2003. Fos imaging reveals ageing-related changes in hippocampal response to radial maze discrimination testing in mice. Eur J Neurosci 17, 628-640.

White N.M., McDonald R.J., 2002. Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. Neurobiol Learn Mem 77, 125-184.

Wilson I.A., Ikonen S., Gallagher M., Eichenbaum H., Tanila H., 2005a. Age-associated alterations of hippocampal place cells are subregion specific. J Neurosci 25, 6877-6886.

Wilson I.A., Ikonen S., Gureviciene I., McMahan R.W., Gallagher M., Eichenbaum H., Tanila H., 2004. Cognitive aging and the hippocampus: how old rats represent new environments. J Neurosci 24, 3870-3878.

Wilson I.A., Ikonen S., Gurevicius K., McMahan R.W., Gallagher M., Eichenbaum H., Tanila H., 2005b. Place cells of aged rats in two visually identical compartments. Neurobiol Aging 26, 1099-1106.

**Figure and legends:**

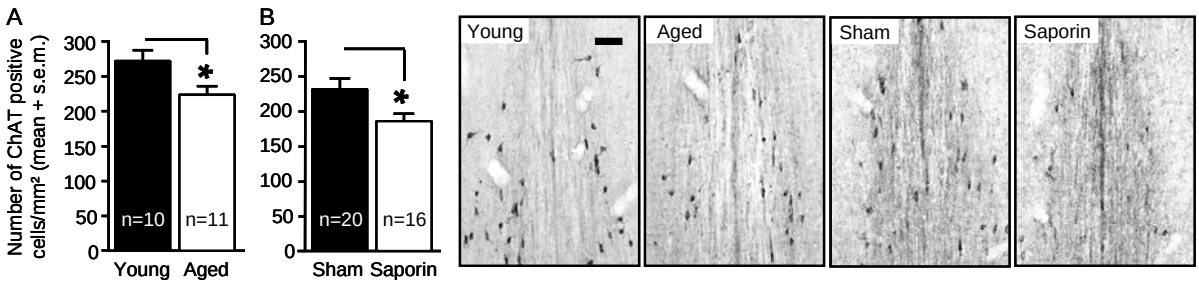



**Figure 1**: ChAT immunopositive cells' density in the medial septum (A: aging effect, B: saporin lesion effect, *: $p<0.05$) and photomicrographs (Scale bar: 50 µm).

**Figure 1**

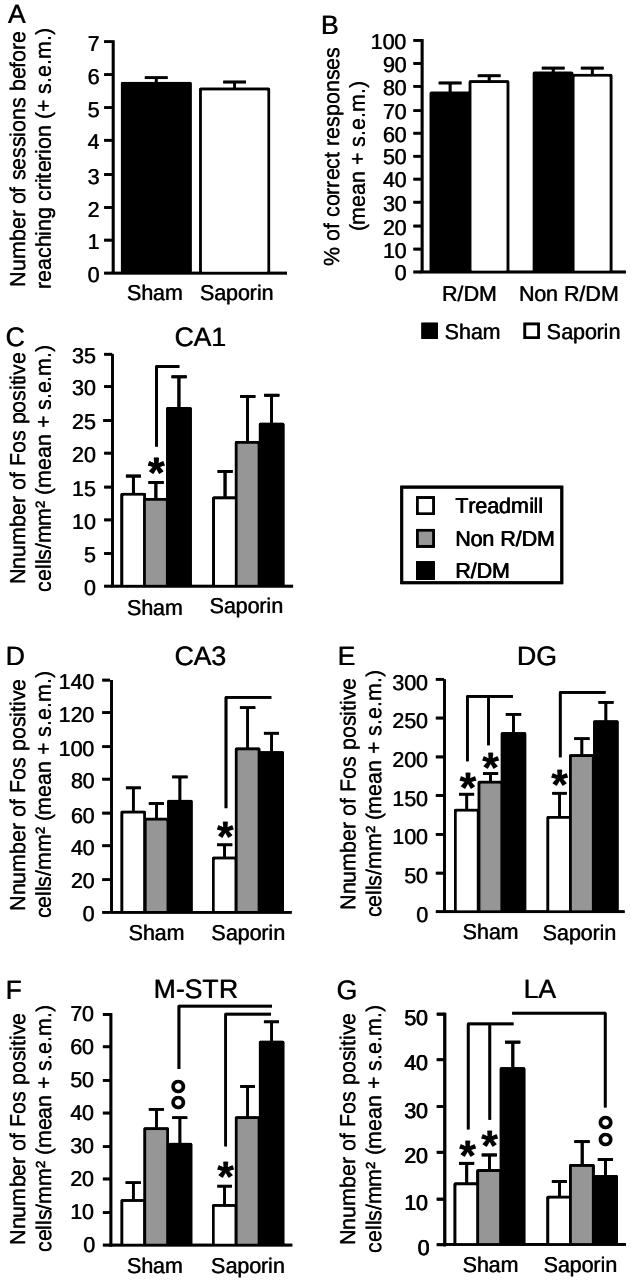



**Figure 2**: Effects of the aging-like lesion on behavior (A: task acquisition, B: memory tests) and post-testing Fos levels in the hippocampal subfields (C, D, E), dorso-medial striatum (F) and lateral amygdala (G). °°: $p<0.01$ between *Lesion* conditions; *: $p<0.05$ between two *Memory Test* conditions.

**Figure 2**

## 1. Supplementary Material and Methods

### *1.1 Subjects*

Naive male mice of the C57/bl6 Jico inbred strain obtained from Charles River (Lyon, France) and housed in standardized animal room conditions were used at the age of 4~5 months (n=66) or 20-22 months (n=11). 10 young and all 11 aged mice were used for immunohistochemical detection of ChAT containing cells in the medial septum. The 56 remaining young mice were used for studying the effects of a partial saporin lesion of SHC neurons (mimicking the aging-related loss in these neurons) on memory and memory-related Fos expressions in critical brain areas. They were put into single cages one week before the beginning of experiments. They were submitted to progressive and partial food deprivation four days before the beginning of behavioral training and maintained around 90% of their free feeding weight throughout the duration of training. All experimental manipulations were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of the 24 November 1986 (86/609/EEC).

### *1.2 Surgical procedure and saporin lesion*

Lesions were partial to mimic the about 20% loss of cholinergic neurons in the medial septum seen in aged mice of the same strain (see Figure 1). Mice were deeply anesthetized with a mixture of ketamine (80 mg/kg body weight, i.p.) and xylazine (16 mg/kg body weight, i.p.) (Bayer, Wuppertal, Germany). P75-IgG-saporin (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA) diluted in phosphate buffered saline (0.2 M, 0.3 µl) was injected in the medial septum area (A/P: +1000 µm and L: 0 µm relative to bregma; D/V: -4500 µm relative to dura) under classical surgical procedure (control of body temperature and presence of respiratory movements) ten days before behavioral training. Because all previous studies with the same

toxin have employed bilateral intracerebroventricular injections (Moreau et al., 2008; Ho et al., 2009) the concentration and volume for the present study were chosen on the basis of pilots. Saporin-injected mice (Saporin, n=27) were compared to pseudo-injected ones (Sham, n=29). Pseudo-injected mice received brain cannulae like lesioned mice, but no solution was administered.

*1.3 Behavior*

Experimental groups were trained in a discrimination learning paradigm which can dissociate R/DM and non-R/DM expressions (Marighetto et al., 1999; Marighetto et al., 2000; Etchamendy et al., 2001; Etchamendy et al., 2003; Touzani et al., 2003; Mingaud et al., 2007; Marighetto et al., 2008a) while non-learning groups were submitted to treadmill training as control condition (as in(Touzani et al., 2003; Mingaud et al., 2007; Mingaud et al., 2008).

*1.3.1 Equipment*

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

For the non-learning control condition, we used an electrical treadmill made of grey Plexiglas (28 cm long x 5 cm large x 20 cm high) which was placed on a table in the same room as the radial-maze.

*1.3.2 Principle of memory testing*

Briefly, each mouse was separately assigned six adjacent arms of which three served as positive (baited) arms and the remaining three served as negative (unbaited) arms. The reward contingency of the arms remained unchanged during the entire experiment, but the manner of presenting the arms was modified between the acquisition (Stage 1) and the memory probe (Stage 2) in order to assess different expressions of acquired knowledge about arm-valence (see in Supplementary Figure 1). The six arms were presented one by one successively during the acquisition phase ("go-no/go" discrimination, Stage 1), and depending on the groups, either by pairs or all-six at a time during the memory test in Stage 2.

The different tasks used in this radial maze paradigm tax different forms of memory: the "go-no/go" task in stage 1 is ambiguous as learning can rely on a hippocampus-dependent strategy or not; in stage 2, only the test by pairs depends on the integrity of hippocampus (it is the R/DM test), the "six-choice" test does not (it is the non R/DM task). Indeed, previous experiments have shown that aged mice or hippocampectomized adult mice can acquire the go/nogo discrimination task and perform normally in the "six-choice" test, but they display a deficit in the R/DM task (pair discrimination; (Etchamendy et al., 2003; Touzani et al., 2003; Mingaud et al., 2007). This dissociation between the two memory tests in stage 2 is explained as follows. The two-choice test requires characteristic flexibility of R/DM defined by (Cohen et al., 1985), i.e. the capability to compare and contrast information acquired separately. In contrast, the "six-choice" test does not require R/DM flexibility as it can be broken into successive "go/no-go decisions" relying on the same "go/no-go" responses as learnt in stage 1 (see behavioral analyses and correlation in (Etchamendy et al., 2003). The reason might be that above a certain amount (more than 2) of opened arms, the rapidly increasing number of possible two-by-two comparisons would promote the shift to using a "non comparison-based" but "response-based" non-R/DM strategy.

*1.3.3 Radial-maze training*

It started with 2 sessions of habituation to the maze (one session/day) during which all the 8 arms were opened and the mouse was free to visit them in whichever order and collect the food pellet within a maximum of 10 minutes.

*In stage 1*, all the mice were trained in the go/no-go discrimination task until reaching the acquisition criterion. Each session consisted of 24 trials (inter-trial interval: 20 seconds spent in the central platform) with four presentations of each arm in a pseudo-randomized sequence, and one session per day, limited to 40 min. On each trial, one arm was opened and we recorded the time taken by the mouse to enter into the arm, *i.e. latency.* Acquisition criterion was reached when median latency for negative arms was at least 30% higher than the one for positive arms over two consecutive sessions. Discriminative performance was measured by a normalized ratio of median latencies for negative arms relative to positive ones [(negative-positive)/(negative+positive)].

*Stage 2* comprised only one test session which, depending on the groups, was either the "R/DM" task or the "non R/DM" task. In the R/DM task, the six arms used in stage 1 were featured into three pairs of adjacent arms (one positive, one negative) and these pairs were presented in turn within the session. Once the mouse had entered one of the two arms, the door of the non chosen arm was closed. The test session comprised a minimum of twelve trials (four trials/ pair) with a 20 second-inter trial interval, and was limited to 20 min. duration. In the non R/DM task, all the six arms used in stage 1 were opened simultaneously on each trial, and the arms were visited freely until all the three baited arms have been explored by the subject. Then the doors were closed. A session comprised a minimum of four trials separated by a 20 second-inter-trial interval and was limited to 20 min. duration. During each trial, the sequence of visited-arms and the running times were recorded. In Stage 2,

performance was measured by the mean percentage of correct responses (choices of a baited arm) over the trials in the R/DM task, and along the first three visits of each trial in the non-R/DM task.

### *1.3.4 Treadmill training*

It comprised the same amount of locomotor activity training sessions in the treadmill.

### *1.4 Immunohistochemistry*

Animals were sacrificed by lethal *i.p.* injection of Avertin (tribromoethanol stabilized in tertiary amyl hydrate) given at a dose of 5 mg of tribromoethanol per 10g of body weight. They were perfused with 4% paraformaldehyde for immunohistochemistry. Brains were removed, post-fixed overnight, and then coronal sections were prepared using a vibratome (50 µm). Sections were kept at -20°C in a 30% glycerol/30% ethylene glycol/25% PB 0.1M/15% $H_20$ mixture for further immunohistochemistry.

Mice that were behaviorally trained were submitted to the same sacrifice procedure, but only 90 minutes after the beginning of last ("radial-maze" or "treadmill", TM) training session. For radial-maze groups, the last session consisted in either the R/DM task or non-R/DM task depending on the groups. The duration time of testing was 20 minutes for all mice.

Mice were divided into six groups: Sham-Treadmill (locomotor control; n=6), Sham-R/DM (n=12), Sham-non R/DM (n=8), Saporin-Treadmill (n=7), Saporin-R/DM (n=7), and Saporin-non R/DM (n=9). A total of 7 mice were rejected either because of non specific lesions or problem of perfusion.

### *1.4.1 ChAT immunohistochemistry*

Free-floating sections were rinsed in phosphate buffer (PB with 0.9% NaCl), and incubated in PBS with 0.5% $H_2O_2$ for 30 min and then in a blocking solution containing 3% bovine serum albumin and 0.2%, Triton X-100. Sections were incubated with anti-ChAT goat polyclonal antibody (1:1000; Chemicon International) in a PBS–BSA–Triton X-100 solution for 24 h at 4°C. After extensive washes in PBS, sections were incubated with biotinylated donkey anti-goat IgG (1:2000; Jackson Immunoresearch) for 2 h at room temperature followed by avidin–biotinylated horseradish peroxidase complex (Vectastain Elite kit; Vector Laboratories) for 2 h at room temperature. After sections were rinsed, the peroxidase reaction end product was visualized in 0.05 M PB containing diaminobenzidine tetrahydrochloride (0.025%) and 0.03% $H_2O_2$. Finally, sections were mounted on gelatin-coated glass slides, dehydrated through a graded series of ethanol, cleared in toluene, and coverslipped with Eukitt mounting medium.
For each animal, the number of ChAT-immunoreactive neurons was counted bilaterally using three to four consecutive sections (one of three sections is taken) per mouse in the medial septum. Contours of the structure were determined by using *the mouse brain in stereotaxic coordinates*, 2nd edn. San Diego: Academic press. The number of ChAT-positive cells was quantified by a blind experimenter using a computerized imaging analysis system (Visiolab 2000 version 4.50; Biocom, Paris, France). Results were expressed as the number of positive cells per mm² and averaged for each group.

*1.4.2 Fos Immunohistochemistry*

*Fos* expression is currently used as a marker for neuronal activity to map changes in brain structures involved in specific memory tasks (Guzowski et al., 2001)**.** Fos immunohistochemistry was performed to the same way as described above for ChAT immunohistochemistry. Antibodies used were the following: anti-c-Fos rabbit polyclonal antibody (1:20000; Santa Cruz Biotechnology); biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:2000;

Jackson Immunoresearch). Counts were made as described above in ChAT immunohistochemistry in the following structures: CA1, CA3, dentate gyrus (DG) of the hippocampus; medial and lateral parts of the dorsal striatum; lateral and baso-lateral nucleus of the amygdala. Results were expressed as the mean number of positive cells per $mm^2$.

*1.5 Statistical analyses*

Behavioral and immunohistochemical (Fos and ChAT) data were submitted to analyses of variance (ANOVAs). When appropriate, post-hoc comparisons were performed using Tukey/Kramer test..

Fos data were also submitted to specific statistical analyses of functional connectivity. The matrices of between structure correlations were compared by using two indices in order to demonstrate potential between-group difference in functional connectivity within memory systems. The two indices were the difference between the two matrices, i.e. the mean of the difference between the correlations of the lower triangular part of the matrices, and the Euclidian distance between the lower triangular part of the two matrices. The complementarity of the quadratic (Euclidian distance) and non quadratic (difference) indices have been discussed earlier (Boucard et al., 2007). Like covariance, these two indices have no metric; therefore, statistical tests are needed to interpret them, and to draw conclusions about a putative effect of an experimental factor. Given that the distribution of these two parameters is unknown, we used a bootstrap procedure (Efron and Tibshirani 1993; (Horwitz et al., 1987; Efron, 1993; Boucard et al., 2009), to test their statistical significance. Specific information that may change between bootstrap tests is given here. Schematically, bootstrap procedure consists in generating a set of artificial samples possessing the same characteristics as the original samples in terms of sample size, number of variables, and distribution of data under the null hypothesis that the studied factor has no influence. In the present experiment, the null

hypothesis is that the functional connectivity (and therefore the set of correlation coefficients) is the same in both populations from which each sample is extracted. Subjects of both groups to compare were pooled in a single source population, and artificial samples were constructed by randomly selecting subjects from this source population with replacement. For each statistical comparison, 10,000 pairs of artificial groups were generated. We then traced the empirical probability distribution and evaluated the significance level of the parameter calculated from the real data. This is done by counting the percentage of parameters (from artificial couples) bypassing the parameter calculated from the real data.

**2. Supplementary Results: analysis of functional connectivity**

The aging-like lesion of SHC neurons also affected the task-dependent functional connectivity within memory systems. Indeed, comparisons of inter-structure correlation matrices showed that functional connectivity varied as a function of the memory test for the Sham groups (R/DM *vs* non-R/DM: $p<0.02$ in the difference and Euclidian distance indices), but not Saporin ones ($p>0.14$ for both indices). It was noticeable that functional connectivity of both R/DM and non-R/DM Saporin groups was closer to the non-R/DM Sham group than to the R/DM Sham one (whichever the indices considered, *cf* supplementary Figure 2). This observation suggests that the SHC neurons normally contribute to triggering functional connectivity pattern of R/DM.

## 3. Bibliography

Boucard A, Marchand A, Nogues X (2007) Reliability and validity of structural equation modeling applied to neuroimaging data: a simulation study. J Neurosci Methods 166:278-292.

Boucard A, Mons N, Micheau J, Nogues X (2009) Activating a memory system focuses connectivity toward its central structure. Behav Brain Res 204:226-234.

Cohen NJ, Eichenbaum H, Deacedo BS, Corkin S (1985) Different memory systems underlying acquisition of procedural and declarative knowledge. Ann N Y Acad Sci 444:54-71.

Efron B and Tibshirani R (1993) An introduction to bootstrap. Chapman & Hall, Inc., New York (NY), London, pp225

Etchamendy N, Desmedt A, Cortes-Torrea C, Marighetto A, Jaffard R (2003) Hippocampal lesions and discrimination performance of mice in the radial maze: sparing or impairment depending on the representational demands of the task. Hippocampus 13:197-211.

Etchamendy N, Enderlin V, Marighetto A, Vouimba RM, Pallet V, Jaffard R, Higueret P (2001) Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling. J Neurosci 21:6423-6429.

Guzowski JF, Setlow B, Wagner EK, McGaugh JL (2001) Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268. J Neurosci 21:5089-5098.

Ho NF, Han SP, Dawe GS (2009) Effect of voluntary running on adult hippocampal neurogenesis in cholinergic lesioned mice. BMC Neurosci 10:57.

Horwitz B, Grady CL, Schlageter NL, Duara R, Rapoport SI (1987) Intercorrelations of regional cerebral glucose metabolic rates in Alzheimer's disease. Brain Res 407:294-306.

Marighetto A, Valerio S, Desmedt A, Philippin JN, Trocme-Thibierge C, Morain P (2008) Comparative effects of the alpha7 nicotinic partial agonist, S 24795, and the cholinesterase inhibitor, donepezil, against aging-related deficits in declarative and working memory in mice. Psychopharmacology (Berl) 197:499-508.

Marighetto A, Etchamendy N, Touzani K, Torrea CC, Yee BK, Rawlins JN, Jaffard R (1999) Knowing which and knowing what: a potential mouse model for age-related human declarative memory decline. Eur J Neurosci 11:3312-3322.

Marighetto A, Touzani K, Etchamendy N, Torrea CC, De Nanteuil G, Guez D, Jaffard R, Morain P (2000) Further evidence for a dissociation between different forms of mnemonic expressions in a mouse model of age-related cognitive decline: effects of tacrine and S 17092, a novel prolyl endopeptidase inhibitor. Learn Mem 7:159-169.

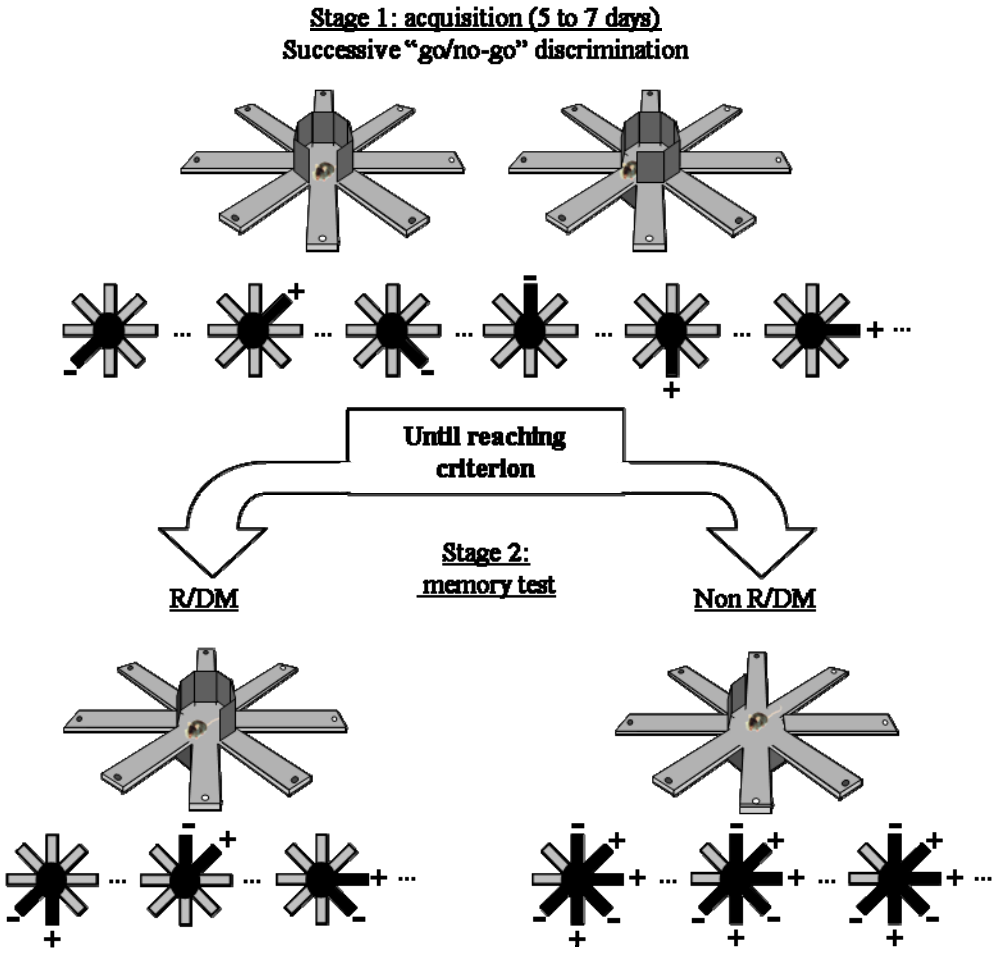
Mingaud F, Le Moine C, Etchamendy N, Mormede C, Jaffard R, Marighetto A (2007) The hippocampus plays a critical role at encoding discontiguous events for subsequent declarative memory expression in mice. Hippocampus 17:264-270.

Mingaud F, Mormede C, Etchamendy N, Mons N, Niedergang B, Wietrzych M, Pallet V, Jaffard R, Krezel W, Higueret P, Marighetto A (2008) Retinoid hyposignaling contributes to aging-related decline in hippocampal function in short-term/working memory organization and long-term declarative memory encoding in mice. J Neurosci 28:279-291.

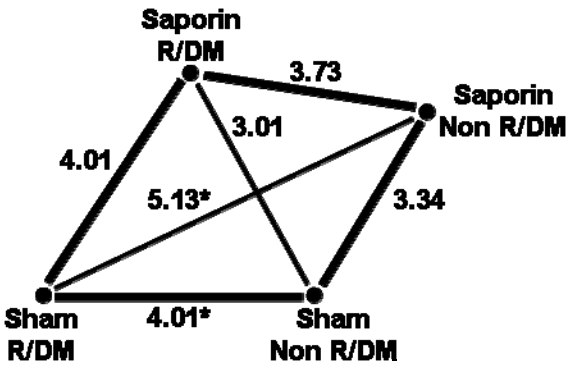
Moreau PH, Cosquer B, Jeltsch H, Cassel JC, Mathis C (2008) Neuroanatomical and behavioral effects of a novel version of the cholinergic immunotoxin mu p75-saporin in mice. Hippocampus 18:610-622.

Touzani K, Marighetto A, Jaffard R (2003) Fos imaging reveals ageing-related changes in hippocampal response to radial maze discrimination testing in mice. Eur J Neurosci 17:628-640.

White NM, McDonald RJ (2002) Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. Neurobiol Learn Mem 77:125-184.




Supplementary Figure 1: Schematic representation of the radial-maze procedure.




Supplementary Figure 2: Functional connectivity. Schematic representation of the Euclidian distances between the correlation matrices of each group: the bigger the distance, the bigger the between-group difference in functional connectivity within studied structures. Basically, the four points are located in a three-dimensional space. Therefore, Saporin R/DM vs Sham Non R/DM, and Sham R/DM vs Saporin Non R/DM distances are shorter than shown on the figure (as compared to the four other distances), but their relative length ratio have been respected. * : $p< 0.03$.

# Conclusion

L'étude de l'implication du système cholinergique dans les processus d'apprentissage et de mémoire est, comme nous l'avons vu lors de l'introduction, une question très complexe. Les résultats obtenus dans les deux expériences se complémentent et ont permis de montrer le rôle modulateur et coordinateur du système cholinergique lors de la formation de la mémoire relationnelle/déclarative par l'utilisation de deux approches opposées. La première visait à restaurer les niveaux d'acétylcholine chez des individus âgés alors que la seconde visait à reproduire la réduction de la transmission cholinergique septo-hippocampique observée lors du vieillissement. Cependant, nos résultats montrent qu'une lésion du système cholinergique modélisant la perte neuronale observée chez les individus âgés n'est pas suffisante pour reproduire le déficit mnésique observé chez ces derniers. Comme nous l'évoquions dans la discussion de la première expérience, le vieillissement est également caractérisé par des dysfonctionnements intrinsèques à l'hippocampe, pouvant expliquer ces différences de résultats. Dans la deuxième partie de cette thèse, nous nous attacherons à étudier les altérations hippocampiques responsables des déficits de mémoire déclarative observée au cours du vieillissement.

# Chapitre II

# Fonction hippocampique dans la formation de la mémoire relationnelle/déclarative : interaction entre mémoires de travail et à long-terme

# Résumé

Au cours de l'introduction générale, nous avons souligné l'existence d'un vif débat dans la littérature entre les tenants du dogme de la séparation des systèmes de mémoire à court et à long-terme et les opposants à ce dogme, soutenant l'idée d'une implication de l'hippocampe dans les deux mémoires. En accord avec cette notion, la revue des données de l'imagerie fonctionnelle montre que chez les sujets âgés, les déficits de mémoire de travail et de mémoire épisodique ont en commun un dysfonctionnement hippocampique lors de l'étape d'encodage(Grady, 2000; Mitchell et al., 2000a; Dickerson et al., 2004; Hales et Brewer, 2010). L'hypothèse que les déficits de mémoire de travail et de mémoire déclarative peuvent être reliés, a été également suggérée à travers plusieurs études réalisées par l'équipe et montrant un déficit de mémoire relationnelle/déclarative chez les souris âgées (Marighetto et al., 2008a; Marighetto et al., 2008b; Mingaud et al., 2008). Enfin, un travail de Marighetto et collaborateurs (Mingaud et al., 2007) a montré que le traitement hippocampique nécessaire à la mise place des représentations relationnelles s'effectuait « *on line* » dés l'acquisition des information séparées, suggérant l'implication de la mémoire de travail dans la formation de la mémoire déclarative. Notre travail visera à tester cette hypothèse.

Précisément notre hypothèse suppose qu'un dysfonctionnement hippocampique chez les individus âgés serait à l'origine de l'altération d'un système d'association et de maintien à court terme de l'information, processus correspondant au tampon épisodique décrit par Baddeley, nécessaire à l'encodage d'une représentation relationnelle des événements temporellement éloignés (*temporal binding*). Ce tampon épisodique se définit comme un système de stockage temporaire d'informations multimodales permettant la liaison spatio-temporelle d'évènements discontigus afin de former une représentation unifiée. La mémoire déclarative supportant la formation de représentions unifiées, le tampon épisodique devrait jouer un rôle dans la formation cette mémoire.

Pour tester cette hypothèse, nous avons manipulé pendant l'apprentissage, l'éloignement temporel entre les informations à apprendre au sein, et au-delà, du domaine temporel de la mémoire de travail (i.e. entre 0 et 60 secondes). En d'autres termes, nous avons considéré qu'un intervalle entre essais (ou ITI) de 0 seconde était assimilable à des évènements contigus, puis nous avons choisi des ITIs croissants jusqu'à 60 secondes, intervalle de temps excédant les capacités de stockage de la mémoire de travail (Misane et al., 2005; Jeneson et al., 2010). Cette procédure devrait nous permettre d'apprécier la nature du

dysfonctionnement hippocampique chez l'animal âgé. Nous formulons l'hypothèse qu'une altération hippocampique conduit à une absence de déficit pour l'IE de 0 seconde (évènements contigus qui ne nécessitent pas l'intervention du tampon épisodique) mais à une détérioration croissante des performances qui est fonction de l'IE (mise en jeu du tampon épisodique). Nous avons combiné notre approche comportementale à des approches interventionnelles (pharmacologique et inactivation intracérébrale) et d'imagerie cérébrale par l'immunodétection de la protéine Fos.

***Les principaux résultats*** de cette étude montrent l'existence chez les souris jeunes d'un système d'association et de maintien à court terme de l'information lorsque la fonction de *binding* temporel est sollicitée (ITI 20 secondes) et correspondant au tampon épisodique. La capacité de ce tampon s'avère réduite chez les individus âgés. La mise en jeu de ce tampon repose sur une forte activité du CA1 chez les souris jeunes, activité absente chez les souris âgées. Cette activité est spécifique de la formation de la mémoire relationnelle/déclarative à long terme puisqu'elle est absente lorsque les souris sont soumises à une tâche contrôle lors de laquelle aucune information pertinente à long terme ne peut être apprise. De plus, dans les conditions sollicitant le tampon épisodique chez les jeunes (ITI 20 secondes), le traitement pharmacologique d'animaux âgés avec un composé promnésiant (Donépézil) améliore les performances de flexibilité en mémoire déclarative et restaure spécifiquement l'activité dans le CA1. Au contraire, dans ces mêmes conditions, l'inactivation transitoire du CA1 chez des individus jeunes durant l'acquisition mime les effets du vieillissement sur la flexibilité mnésique. Ainsi, en accord avec notre hypothèse, l'ensemble de ces résultats montrent que le CA1 sous-tendrait directement et spécifiquement la fonction de tampon épisodique dans la formation de la mémoire déclarative et qu'un dysfonctionnement de cette fonction serait à la base des effets du vieillissement sur la mémoire déclarative. Ces résultats argumentent donc l'idée que la mémoire de travail et la mémoire relationnelle/déclarative sont reliées et partagent une structure commune, l'hippocampe. Cependant, cette structure serait requise en mémoire de travail seulement lorsque sa sollicitation aboutit sur la formation d'une mémoire à long terme, pouvant expliquer la controverse existant quant à l'implication ou non de l'hippocampe en mémoire de travail.

# A critical CA1 episodic buffer in declarative memory formation and its aging-related failure

L. Brayda-Bruno, N. Etchamendy, N. Mons, A. Marighetto

Centre de Neurosciences Intégratives et Cognitives, Université Bordeaux 1,2-UMR 5228
Avenue des facultés 33405 Talence, France

**Article type: Research Paper**

**Key words: working memory, declarative memory, hippocampus, episodic buffer, radial maze, mouse.**

**Text pages:** 17
**Figures:** 5
**Supplementary figures:** 5
**Tables:** 0
**Abstract:** 94 words**; Introduction:** 990 words**; Results:** 2614 words**; Discussion:** 1216 words**; Methods:** 1457 words

**Correspondence should be addressed to:** Dr A. Marighetto, Centre de Neurosciences Intégratives et Cognitives, Université Bordeaux 1,2-UMR 5228, Avenue des facultés 33405 Talence, France
**E-mail:** a.marighetto@cnic.u-bordeaux1.fr

**ABSTRACT**

Having established that different forms of memory rely on largely distinct brain systems, cognitive neuroscience research must now explain how these multiple memory systems work together. In particular, a current debate concerns potential involvement of one major structure for long-term memory, the hippocampus in the interaction between short-term and long-term memory. Using a mouse model allowing combination of neuroimaging and interventional approaches, we demonstrated that a short-term memory function relying on hippocampal CA1's activity, and corresponding to Baddeley's episodic buffer is implicated in the formation of declarative long-term memory (DM) and its aging-related decline.

## INTRODUCTION

Since the pioneer report on the amnesic patient HM, suffering severe loss in long-term memory with normal immediate remembering, decades of research have founded a dogma that short-term and long-term memory functions rely on distinct brain structures and systems [1-3]. Thus, long-term memory in its declarative components (DM) which was lost in HM, i.e. conscious memory of every day facts and events requires functional integrity of medial temporal lobe structures, in particular the hippocampus. Non declarative forms of long-term memory, such as implicit bias and habits can rely on striatum, amygdala and sensorial cortices depending on the specific form concerned [4]. In parallel, short-term or working memory (WM), the ability to hold information online in an active state critically depends on the prefrontal cortex and its interaction with the striatum [5,6]. Recently though, the dogma of separation between short-term and long-term memory systems has been challenged by conflicting findings in amnesic patients, and brain activity imaging of memory formation and retrieval showing that WM and DM can also share underlying brain structures. Indeed, it was recently found that amnesic patients with medial temporal lobe lesions can be impaired in certain WM tasks [7] [8-13]. Furthermore, hippocampal activity has been found to increase during execution of WM tasks [8,14-18], suggesting that the hippocampus might play a role in WM, especially in working memory maintenance.

Despite increasing amount of evidence questioning classical view that hippocampal function is limited to long-term DM, the contribution of the hippocampus to WM remains strongly debated. One controversial issue relates to relatively vague definition of WM duration. This uncertainty underlies a debate on whether or not the tasks in which patients with hippocampal lesions are impaired are truly WM (rather than long-term memory) tasks [19,20]. Other debated issues come from controversial findings on correlation between hippocampal activation and WM maintenance [21,22]. Hence, it is yet unclear which specific WM function the hippocampus is involved in, and whether this involvement is causal or not (epiphenomenon).

To improve our understanding of interaction between WM and DM, and identify the neurobiological bases of such interaction we need to combine behavioral analyses of memory with both interventional and neuroimaging approaches of brain function. Such combination of approaches can be achieved in animals. This is why in the present study we used a mouse model of aging-related DM decline to explore the role of a specific WM function in DM formation.

Our mouse model of aging-related DM decline is based on the two DM properties that can be studied in animals: DM is flexible and hippocampus-dependent. DM is assessed by means of a simple radial-maze discrimination task designed in two stages (*cf* Supplementary Figure 1). In

stage 1, the mouse must learn that certain arms always contain food at their end while others never contain any, through repetition of separated exposures to each individual arm. In stage 2, memory flexibility (i.e. DM) is tested by changing the manner of presenting the arms, and facing the mouse with two-choice decisions between a food-containing arm and a no food-containing one. Aged mice as well as young hippocampectomized ones can learn the task (stage 1) but failed to choose the positive arm among a pair in the flexibility probes (stage 2). Such a selective deficit in hippocampus-dependent and flexible memory expression is proposed as a model for preferential loss in DM.

Previous findings with this model support current conception of hippocampal function according to which the hippocampus binds spatially or temporally discontiguous elements of information into a unitary representation of the different elements and their relations [23,24]. Such "relational representation" of past events would guarantee characteristic flexibility of DM expression [25]. Critical implication of the hippocampus in our task can be related to either or both of its spatial and temporal binding functions, since individual arm exposures in learning are both spatially and temporally (20 seconds) apart.

Moreover, we know that a critical hippocampal processing of information in our radial-maze task is sustained *online* during learning. Indeed, the hippocampus is not required for acquiring the radial-maze task, but learning under transitory inactivation of the hippocampus led to inflexible memory expression [26]. Such "online" requirement during learning suggests that WM might be involved.

Hence, in the present experiments, we tested the hypothesis that *online* binding of information sustained by the hippocampus during DM learning relies on WM. Specifically, we examined whether DM formation implicates the "episodic buffer" (EB) component of WM as originally defined by A. Baddeley [27]. Indeed, according to this definition, the EB provides temporary storage for multimodal information allowing spatio-temporal binding of events into unitary memory representation. Since characteristic flexibility of DM is believed to rely on unitary relational representation of past events, the EB should play a role in DM formation.

*Method: Manipulating online temporal binding demand within the WM domain and outside*

To achieve our goal, we manipulated the demand on *online* binding within the WM domain and outside, and so by varying the temporal separation of the "to-be-learnt" information between 0 and 60 seconds. Thus, we trained independent groups of mice under different conditions of inter-trial interval (ITI) between successive exposures to each individual arm during learning

(stage 1). The 0 sec.-ITI condition corresponded to the *null demand* on online temporal binding as successive arm-visits were temporally contiguous. The 20 sec.-ITI condition corresponded to the *high within WM demand*, and the 60 sec.-ITI condition to the *outside WM demand* since the temporal gap between information exceeded retention capacity of WM. Even though there is no agreement in the literature on precise WM duration, it indeed appeared to us that above 30-40 second intervals could be considered *a priori* as outside the WM domain.

After having demonstrated that temporal binding staying within the WM domain, i.e. corresponding to Baddeley's EB was required for DM formation and responsible for its aging-related degradation, we tried to identify its neuroanatomical bases by combining behavioral, (Fos) neuroimaging and (by drug or transitory inactivation) interventional approaches.

## RESULTS

### *A WM component corresponding to Baddeley's EB is required in DM formation and degraded in aging*

To demonstrate the EB's implication in DM formation, we first examined the consequences of ITI-duration in learning on subsequent memory flexibility (DM) in young and aged mice (Figure 1).

Three independent groups of young (3-4 month old, n= 24) and aged (19-22 month old, n=28) mice were trained under different (0, 20 or 60 sec.-) ITI conditions in stage 1, and then submitted to the flexibility probes in stage 2. The ITI manipulation did not change task acquisition whichever the age (*cf* Supplementary Figure 2A and 2B) but it affected DM flexibility in an age-dependent manner (Figure 1; Age X ITI-condition: $F_{2,46} = 4.975$; $p = 0.011$).

In the young mice, flexibility was equally good with the 20sec.- and 0 sec.-ITI, i.e. when temporal binding demand was *null* and *high within WM* but it dropped to chance level when the ITI exceeded WM capacity (60sec-ITI, *outside WM demand*). This observation indicated that temporal binding function required to encode discontiguous events into a DM representation involves WM. Online temporal binding of information would rely on transient traces of (arm-visit) events in WM, and be limited by WM trace decay.

The conclusion that WM maintenance contributes to DM formation was further supported by a complementary experiment in (n=20) young mice trained with 20, 40 and 60 sec.- ITI showing that flexibility declined progressively as ITI was increased above 20 seconds (Figure 1- Complementary experiment in young mice: ITI effect: $F_{2,18} = 4.7$; $p = 0.023$). Thus, progressive WM decay would prevent binding of events separated by more than 40 seconds into a flexible DM representation.

In the aged mice, flexibility was as good as in the young group when temporal binding demand was *null* (0 sec-ITI), but at chance level for both the *high within WM* (20 sec.-ITI) and *outside WM* (60 sec.-ITI) *demanding* conditions. In other words, the aged group trained under the *null demand* learning condition did not show the DM deficit which was seen in aged mice trained under the *high within WM* condition (Figure 1. Between-age difference significant for the 20 sec.-ITI condition only: p=0.0001).

To examine whether the aging deficit corresponded to a primary loss in binding capability or was secondary to a reduction in WM capacity, other (n=30) aged mice were trained with intermediate 0, 5, 10 and 20 sec.-ITI. As shown in Figure 1, DM decline was progressive as ITI increased from 5 to 20 seconds (Figure 1- Complementary experiment in aged mice, ITI effect:

$F_{3,26} = 5.01$; $p = 0.007$). This observation indicated that the aging-related DM decline resulted from a reduction in WM maintenance. In aging, accelerated decay of WM would prevent binding of above 10 second-distant (arm-visit) events.

Our first experiment therefore supports the conclusion that a WM function corresponding to Baddeley's EB is critical for DM formation, and aging-related DM decline can result from a reduced capacity of this buffer. Indeed, when the temporal gap between "to be learnt" information exceeded the retention capacity of the EB (above 40 seconds in young mice and 10 seconds in aged mice) only non flexible, i.e. non DM was formed.

***WM function in DM formation correlates with Fos activity in hippocampal CA1***

To identify the anatomical bases of EB function in DM formation, we examined the effects of the ITI–duration on learning-related activities in critical brain areas, using Fos expression as an indicator of neural activation [28,29]. Post-training Fos immunohistochemistry was performed in young (n = 54) and aged (n = 58) mice divided into three (0, 20 or 60 sec.-) ITI learning conditions and a treadmill control condition. Again, the 0, 20 and 60 sec.-ITI represented respectively the *null, high and outside WM demanding* learning condition. Fos positive cells were counted in the CA1, CA3 and DG of the hippocampus and prefrontal cortex (PFC) as obvious structures of interest for DM and WM, but also in the striatum as it is known to be involved in both WM and procedural non DM. Analyses of Fos variation from treadmill in the different structures showed that the CA1 hippocampal subfield, PFC and dorso-medial striatum presented more specific interest (Figure 2A).

CA1 and PFC were the sole areas preferentially recruited under the *high WM demanding* learning condition in the young but not aged mice. However, the patterns of activation were not identical between the two structures and showed that only Fos activity in CA1 correlated with the EB function.

In the CA1 area of the young mice, learning induced significant activation in both the *null* and *high WM demanding* conditions with bigger activation in the second (*cf* Supplementary Figure 3), and there was no activation in the *outside WM demanding* condition. In the aged mice, there was no CA1 activation, whichever the ITI (Age X ITI-condition: $F_{1,74} = 8.002$; $p = 0.0007$). Hence, CA1's activity correlated with EB function and dysfunction in DM formation.

In the PFC, the amplitudes of Fos activation were overall much smaller than in the CA1 area. Furthermore, the activation was significant in the sole *high WM demanding* condition in the young mice, but *null WM demanding* condition in the aged mice (Age X ITI-condition: $F_{1,74} =$

3.412; p = 0.038). Thus, there was a significant aging defect in *high WM demanding* condition only. However, PFC being activated in the *null WM demanding* in the aged mice, PFC activation did not consistently correlate with the EB function.

The dorso-medial striatum was the only structure in which learning-induced activations were overall bigger in the aged mice than in the young ones (Age effect: p= 0.023, Age X ITI: ns). This observation suggests that learning relies more on the dorso-medial striatum in aged mice than young ones. The dorso-medial striatum was also the only structure for which the groups of mice having performed a smaller amount of trials (see in methods and figure 3's legend for details) displayed significantly lower activity. This observation suggests that dorso-medial striatum sustains a "trial-and-error based-" learning corresponding to procedural learning.

Altogether, our Fos findings suggest the conclusion that the EB function in DM formation relies on hippocampal CA1 activity in interaction with the PFC. When temporal binding demand exceeds EB's capacity (60 sec. -ITI in the young mice) or when activity within the PFC-CA1 circuit is abnormal (aging), only striatum-based learning could occur, producing an inflexible, non DM.

The above conclusion was further supported by inter-structure correlation analyses (cf supplementary Figure 5). Indeed, we found strong positive correlation between CA1 and PFC activities in young mice trained under the *high WM demanding* condition (20 sec.-ITI: R = .765, p=.0002) but not *outside WM demanding* condition (60 sec.-ITI: R = -.192, ns). In the later case, i.e. when only non DM was formed, CA1 was strongly correlated with dorso-medial striatum (R = .874, p<.0001). Furthermore, in the aged mice, we found no correlation between CA1 and PFC activities but positive correlation between these structures and the (dorso-medial and dorso-lateral) striatum whether in the *high EB demanding* condition or the *outside EB demanding* one.

So far, our findings demonstrated that the EB component of WM was critically involved in DM formation, and suggested that this EB's function relied on cooperative activation of the hippocampal CA1 area and PFC. Before addressing the crucial issue of causality links between CA1 activity and the EB's function, we examined whether CA1 activation by *high WM demanding* learning was or not specific of long-term memory.

***WM-related CA1 activation is specific of long-term memory formation***

As mentioned in introduction, the view that the hippocampus might play a role in WM remains debated, partly because it challenges a longstanding dogma of partition between long-

term and short-term memory systems. In view of this context, we attempted to specify the learning conditions under which a relation between hippocampal CA1 activity and WM function could be found. Specifically, was CA1 activity related to the EB function in general or to EB function in long-term memory formation only?

One way of answering this question was to search whether a learning task with no demand on long-term memory could induce the same (ITI-dependent) WM-related Fos activation in CA1. Hence, we designed a radial-maze learning task consisting in repetition of (by ITI-) separated exposures to individual arms, like the one used in the above experiments, but taxing short-term retention only. In this new task, food location among the arms varied between successive trials, each arm being baited once over two times. Hence, on each trial, the mouse should remember the previous trial with the same arm to predict whether the arm contained food or not. The task was therefore identical to the previous one regarding online WM demand, but it lacked the requirement on long-term memory of (constant) food location that was present in the previous task. Hence, we named it, the "no long-term" learning task (cf Supplementary Figure 4).

Fos neuroimaging of this "no long-term" task was performed following the same procedure as in the above experiment, young (n = 38) and aged (n = 36) mice being divided into three (0, 20 or 60 sec.-) ITI learning conditions and a treadmill one. The patterns of activation induced by the "no long-term" learning task were different from those observed with the previous ("long-term") one in almost all studied structures, and more specifically in CA1 and PFC where the activations were unrelated to the WM demand (Figure 2B).

Indeed, in the young mice, CA1 and PFC activations were not specific of the *high WM demanding* (20sec.-ITI) condition as in the previous task, but produced also by the *outside EB demanding* (60 sec.-ITI) condition and they were actually bigger in the later. Furthermore, in CA1, these activations were of much smaller amplitude than the one seen in the previous task, and there was no significant difference between the ages (Age effect: ns. ITI effect: $F_{2,51} = 4.754$; $p = 0.01$. Age X ITI: ns). These findings suggested the conclusion that the CA1 activation seen in the previous task was linked to the long-term memory component of the task, and thereby reflected specific implication of the EB component of WM in the formation of *long-term* memory.

Regarding the aging effect, the same activation defect as found in the previous task was seen in the PFC, i.e. in the *high WM demanding* condition only (Age X ITI: $F_{2,51} = 3.738$; $p = 0.03$; aged significantly below young in 20 sec.-ITI). Thus, aging-related degradation in WM-related PFC activity was seen whether in "long-term" or "no long-term" learning. This observation

agrees with well established knowledge that PFC is known to underlie WM function in general, not only for DM formation, this PFC function being degraded in aging.

Finally, unlike what we found previously with the "long-term" task, the dorso-medial striatum was not over-activated by the "no long-term" learning in the aged mice (all effects: ns). This observation suggests that the previous over-activation seen in aged mice was linked to the formation of long-term (non DM) memory.

Analyses of inter-structure correlations indicated that functional connectivity was also different between the two tasks (Supplementary Figure 5). Namely, in the young mice trained under the *high WM demanding* condition we found no correlation between PFC and CA1 unlike in the previous task, but correlation between PFC and striatum instead.

Altogether our findings so far suggested the conclusion that the EB function relied on CA1 activity in interaction with PFC only when long-term memory is being formed. When long-term memory is not involved, WM function must be sustained by PFC-striatum circuits as already known.

***CA1 activation is a necessary condition for DM formation in WM- demanding learning***

Our findings showed to this point that the aging-related decline in DM is secondary to WM degradation, and this degradation correlated with activation defect in both CA1 and PFC areas. In order to specify whether one (or both) of CA1 and PFC activation was a necessary condition for DM formation in WM demanding learning condition, we examined to what extend pharmacological restoring the aging deficit in DM would also normalize functional (Fos) activities in CA1 and/or PFC. We studied the effects of the cholinesterase inhibitor, donepezil as this drug has the potential to improve the aging-related DM impairment [30].

The beneficial effect of donepezil at 1 mg/kg (but not 0.3 mg/kg) on the DM deficit seen in aged mice trained under the *high WM demanding* learning condition (20 sec.-ITI) is presented in Figure 3A. For post-learning Fos neuroimaging, other groups of young (+ vehicle: n=24) and aged (+ vehicle: n=21, + 0.3 mg/kg: n=19, + 1 mg/kg: n=21) mice were divided into treadmill and 0 sec. and 20 sec.-ITI learning condition. Fos data are presented in Figure 3B.

The results showed that the efficacy of the cholinergic drug against the DM deficit correlated with its capability to restore CA1 (but not PFC) Fos activation in animals trained under the *high WM demanding* condition. Indeed, in the aged mice treated with donepezil at the memory active dose (1 mg/kg) but not memory inactive one (0.3 mg/kg), the level of Fos CA1 activation under the 20 sec.-ITI condition (visually) approached the one seen in the young group, and was

(statistically) above the other aged groups (Treatment effect: $p< 0.015$; 1mg/kg *vs* vehicle and 0.3 mg/kg: $p<0.05$). In contrast, in the same group, activation in the PFC remained at the same level as in the other aged groups (Treatment effect: ns) and below the level of the young 20 sec.-ITI group. Donepezil had no effect on Fos activity in the *null demanding* condition, whichever the dose and the brain structure considered.

Thus, our pharmacological findings suggest the conclusion that CA1 activation during learning is a necessary condition for EB function in DM formation. The issue of whether a defect in CA1 activation is a sufficient condition for observing an aging-like deficit was addressed in the following experiment.

***CA1 activity sustains the EB function in DM formation***

To demonstrate that CA1 activity was causally involved in the EB function in DM formation, we tried to show that transitory CA1 inactivation in *high WM demanding* learning was sufficient to produce a DM deficit. CA1 inactivation was produced by bilateral intra-CA1 infusion of (0.2µl) lidocaine immediately before each learning session. Correct injection-cannulae positioning was attested by histological control afterwards: cannulae traces must be found in the middle of dorsal CA1 and all mice with incorrect or uncertain injection sites were rejected from analyses.

Pseudo-injected (n= 22) and lidocaine-injected (n= 20) mice were submitted to six learning sessions under 0, 20 or 60 sec.-ITI condition and then submitted to the flexibility test on the following day without pre-test injection. Twelve other mice (n=6 by injection condition) were trained under the critical 20 sec.-ITI condition and prepared for post-training Fos immunohistochemistry after the third session to assess selective inactivation of the CA1 hippocampal subfield by lidocaine injection (cf Supplementary Figure 6A)

Behavioral results showed that the CA1 inactivation did not prevent task acquisition but it selectively degraded EB function in DM memory. Indeed, performance levels were not different between the different injection and ITI conditions in the last training session of stage 1, all groups reaching above chance level performance (cf supplementary figure 6B). In contrast, performance in the stage 2- flexibility probes differed as a function of both the ITI- and injection- learning conditions (Figure 4: Injection X ITI: $F_{2,36}= 4.364$; $p = 0.02$), the CA1 inactivation producing a significant deficit in DM flexibility in the sole group trained under the *high EB demanding* condition ($p<0.0001$ vs Pseudo-inj.).

Our findings supported the conclusion the CA1 activity during learning is causally involved in

the EB function in DM formation

## DISCUSSION

Our study supports two principal conclusions. First, hippocampal CA1 underlies interaction between WM and DM under the form of online temporal binding of short-term information in DM encoding. Second, aging-related decline in DM can result from degradation in this CA1-dependent specific WM function. As discussed in the followings, these findings represent a significant contribution to current debate on the role of the hippocampus in WM, and the aging literature.

### *Understanding hippocampal function*

We found that hippocampal CA1 sustains a WM function, corresponding to Baddeley's EB, which is specific of long-term memory encoding and critical for DM expression. Specifically, the CA1-dependent WM function is needed whenever to-be learnt (arm-visit) experiences are several second-distant, likely because it enables the formation of relational, and thereby flexible representation of such discontiguous events. We believe that our study improves our understanding of hippocampal function in memory for three main reasons.

- *Hippocampus and temporal binding*

First, we provide unique validation of the temporal binding hypothesis of hippocampal function in DM formation thanks to the complementarities of approaches allowed by our mouse model. Indeed, it has long been suggested that a critical dimension of hippocampal function was to overcome discontiguity between incoming information by associating items that do not temporally overlap [23,31]. In line with this view, aging, lesion and genetic experiments in animals have shown that temporal discontiguity was a major factor in delineating hippocampal function [32-35]. However, direct assessment of the temporal binding hypothesis by functional neuroimaging in humans has initially provided controversial results [36,37]. Thus, the demonstration that hippocampal activity correlates with bridging temporal gap between information was provided only recently [38,39]. Present findings complement these previous studies by showing hippocampal subfield selectivity and causality link: CA1 activity correlates with successful temporal binding while CA1 inactivation prevents it. Hence, not only does our study validate the temporal binding hypothesis, but it also provides potential account for controversial findings by previous functional neuroimaging approaches lacking hippocampal subfield selectivity.

- *Hippocampus and WM*

We demonstrate that CA1-dependent temporal binding function relies on WM maintenance, but this CA1 function is recruited only if *long-term* memory is being formed. Thereby, our findings not only support previous literature on interaction between WM and DM within the hippocampus [14,40-44] but they can reconcile conflicting findings on hippocampal contribution to WM and EB.

Firstly, our results demonstrate that the CA1-dependent binding function stays within the domain of WM and invalidate one frequent line of discussion in literature on whether it is truly WM (and not "already" long-term memory) which the hippocampus is involved in [19,20]. Indeed, we observed that temporal binding looses its efficiency above 20 second delays and cannot extend above 40 seconds, every other thing being equal between the different delay conditions, in terms of amount of information and potential interferences. Hence, the present delay effect demonstrates the implication of *short-term* memory. It is noticeable that our results are in accordance with a previous finding showing that mice were not able to make short term associations over 40 second-interval in trace conditioning [45].

Second, a critical point of our findings is that the WM-related, CA1-dependent function appears to be specific of long-term declarative memory encoding, hence providing a potential explanation for existing discordances in the literature. In particular, several neuroimaging studies have shown that the binding process in WM is related to hippocampal activity [39 ,46-49]. However, other recent studies have invalidated the view that the hippocampus was causally involved in these processes by showing that EB function [50] and WM [19,20] was intact in amnesic patients with hippocampal damage. The fact that present temporal binding-dependent Fos activity in hippocampal CA1 was only observed when *long-term* memory was being formed can explain this apparent contradiction. Thus, functional integrity of the hippocampus would not be critically required for temporal binding in WM in general, but for temporal binding in WM sustaining long-term DM encoding only. This conclusion finds supports in previous studies showing that short-term memory–related activity in the hippocampus was associated with long term relational memory remembering [7,39 ,51] When there is no demand on long-term memory as in our "no long term" learning task, our (inter-structure correlation) results suggest that WM may rely on prefronto-striatal interaction as already described in the literature [5,52].

Finally, the finding that the activation of Fos protein expression in CA1 was needed to encode a long-term but not short-term memory representation of discontiguous events fits with current knowledge on hippocampal cellular or molecular bases of long-term memory. Indeed, although ubiquitous enough to be currently used as an indicator of neuronal activation (e.g [28]), the *c-fos*

gene is part of a specific intracellular signaling cascade underlying long-term plasticity and memory consolidation [53,54]. We found that Fos protein expression was activated in CA1 when several second-distant short-term memory traces must be consolidated into a long-term memory representation, while no such activation was found when long-term retention was not required. This dissociation is consistent with the general view that activation of specific molecular pathways can switch on or off long-term memory formation [55]**.** Furthermore, it can explain that selective disruption of hippocampal cellular or molecular processes underlying long-term memory was sometimes found to result in paradoxical improvement of WM [56-58]. Indeed, this paradoxical improvement was found when using WM tasks with high level of between-trial interference, in which preventing long-term retention of information related to any specific trial can therefore improve WM.

***Understanding aging-related DM decline***

With respect to the aging issue, our study gives support to longstanding views that the degradation in DM comes, at the psychological level from cognitive defects in the encoding phase [59,60] at the brain level from hippocampal dysfunction in memory encoding [61]. In fact, our findings provide a unique opportunity to integrate pieces of the aging literature in humans and animals based on approaches at all different levels from molecules to behavior, thanks again to complementariness of approaches allowed by our mouse model.

At neuropsychological level, our findings demonstrate that the selective deficit in relational/declarative memory seen in our aged mice comes from a reduction in the capacity of the EB component of WM, in relation with hippocampal dysfunction. Accelerated decay of short-term memory traces would prevent the binding of above 5 second- distant information into a long-term DM representation. It has long been known that WM capacity is reduced in aged subjects [62,63], and a few studies have shown more specifically that the binding capacity in WM is reduced in relation with hippocampal activation defects [46,47]. Our study confirms these observations and links them to the aging deficit in long-term relational/declarative memory. Precisely, our findings demonstrate causality links between the EB component of WM, long-term DM decline and hippocampal dysfunction, links that were previously suggested by [64].

Regarding lower levels of brain organization, our findings suggest that the DM deficit comes from aging defects in CA1 processes that sustain association and consolidation of transient memory traces into a long-term representation. It was previously shown that biophysical properties of CA1 pyramidal cells were critically required for associating temporally

discontiguous items [65], and deteriorated in aging [32-34]. Our study suggest that these alterations contribute to the aging-related degradation in EB's function in DM formation, as well as those observed in the intracellular pathways leading to Fos expression and involved in long-term synaptic plasticity [66].

## METHODS

### *Animals*

The subjects were naïve young adult (4-5 month old) and aged (21-23 month old) C57Bl/6 Jico male mice obtained from Charles River (Lyon, France). They were housed singly in a climatized (23°C) animal room and submitted to a partial food deprivation (85-88% of their free feeding weight) throughout the duration of training. All experimental manipulations were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of the 24 November 1986 (86/609/EEC).

### *Behavioral tests*

*Apparatus.*

The long-term declarative memory (LTDM) and "no long term" learning tasks were run in an eight-arm radial maze, fully automatized by videotracking (IMETRONIC, Pessac, France). The diameter of the central platform is 30 cm and the arms are 55 cm long by 10 cm large. Each arm is equipped with a door at its entrance and a food-pellet delivering system at its end. The doors are individually controlled (raised up or dropped down) by the computerized system which also controls pellets availability in the food tray at the end of each arm individually, according to the schedule of the task. The maze is placed in an empty room (next the computer room) containing visual cues to enable spatial discrimination. In both tasks, each mouse was separately attributed a set of six adjacent arms.

*LTDM task.*

A two-stage discrimination learning paradigm was used to assess the characteristic flexible expression of LTDM [67] exemplified in the capability to make a choice decision in a novel or a changed situation by comparing and contrasting elements of information which have been learnt separately, so. The food location among the six arms (three baited, three non baited) remained constant over the entire experiment but the arm-presentation was changed between the learning phase (Stage 1) and the test phase (Stage 2) to assess memory flexibility (i.e. LTDM ; Supplementary Figure 1). In Stage 1, the arms were opened one by one, with a waiting-time, inter-trial interval (ITI) separating the 24 successive arm-visits made within a session, and a 24 hour-interval between sessions. Training-sessions (minimum: 6, maximum: 12) were repeated until reaching the acquisition criterion when latency to enter non-baited arms was at least 30% longer than for baited ones. The latency differential indicated that the

mouse discriminated between baited and non baited arms and was expressed in results using a normalized ratio [(non baited arms – baited arms) / (non baited arms + baited arms)]. Memory flexibility was tested 24-hour later in Stage 2 (one session), when the same arms were opened by adjacent pairs (one baited, one non-baited). LTDM flexibility was exemplified in the capability to correctly choose the food-containing arm among each pair. The test-session was made of 20 pair-presentations and performance was indexed by percentage correct choices (for more details, see ref. [68]. For Fos neuroimaging experiments, mice were sacrificed after the third session of the learning phase (stage 1) in order to map brain regions activated during the acquisition (see below). For CA1 inactivation experiment, the learning phase (stage 1) was limited to 5 sessions for experimental conveniences. Mice which did not reach the acquisition criterion were eliminated of statistical analysis.

*"No long term" learning task.*

A control task was designed in order to specify the variations of neural activity seen with the LTDM task**.** The principle is identical regarding to leaning phase of the LTDM task, except for food location. Six arms were presented individually separated by an ITI which split the 24 successive arms-visit of a session. However, food location is not constant across the trials. During the successive presentation of one arm, the food is present only one over two times (Supplementary Figure 4). Consequently, mice didn't have the possibility to learn constant food positions as they did in the LTDM task. The task is composed of three acquisition sessions, each separated by a 24 hour interval. Mice were sacrificed after the third session of the learning in order to perform Fos immunohistochemistry (see below).

*Treadmill control.*

For Fos neuroimaging experiments, groups trained in one of the two radial-maze memory tasks were compared to treadmill control mice. These mice were submitted to a repeated locomotor activity in a treadmill (28 cm long x 5 cm large x 20 cm high) placed in the same room as the radial-maze. These treadmill mice were maintained in the same conditions (including partial food deprivation) and submitted to the same amount and duration of training-sessions as the memory groups (2 days corresponding to habituation plus 3 days corresponding to acquisition).

***Local intra-hippocampal drug administration***

*Surgery.*

Young adult mice used for the CA1 inactivation experiment were deeply anesthetized with a mixture of ketamine (80 mg/kg body weight, i.p.; Vibrac France) and xylazine (16 mg/kg body weight, i.p.; Bayer, Wuppertal, Germany). Stainless-steel guide cannulae (26-gauge, 8 mm length) were implanted bilaterally above the dorsal hippocampus one week before behavioral training with the following coordinates: AP -2.0, L ±1.3, DV -0.8, according to the atlas of Franklin and Paxinos [69].

*Local drug injections.*

Stainless-steel cannulae (32 gauge, 9 mm) attached to 1 µl Hamilton syringes with polyethylene catheter tubing were insered through the guide cannulae. The syringes were left in place for a total duration of 7-8 min. For temporary inactivation of the CA1, 0.25µl of lidocaïne (4%, diluted in artificial cerebro-spinal fluid ; Sigma) was injected bilaterally. This local anesthetic was chosen for his short-lasting effect (full recovery after 30 min) and is recommended for repeated injections [70], and for memory experiments [71]. Each training-session typically lasts 20-25 min, i.e., largely within the time-window of lidocaïne efficacy, with no risk of direct interference on postencoding processes. For pseudo-injected groups, cannulea were inserted through the guides, and left in place, but no liquid was infused.

*Analysis of cannulae placements and drug spreading.*

The histological verification of the sites of injection and drug spreading was performed by mean of Fos immunohistochemistry (see below and Results). Drug spreading was also verified by mean of the spherical volume of diffusion [72]. Mice were eliminated of statistical analysis if their cannulae placements were not satisfying.

***Fos immunohistochemistry***

A neuroimaging approach based on the activity-dependant expression of the Fos protein is used to map changes in brain structures involved in specific memory tasks [28]. Mice were killed for Fos immunohistochemistry 90 minutes after the beginning of the training-session (the third session of Stage 1 in the LTDM and the "no long term" learning tasks), which was limited to 20 minute-total time for each mouse. Animals were rapidly sacrificed by lethal *i.p.* injection of Avertin (tribromoethanol stabilized in tertiary amyl hydrate) given at a dose of 5 mg of tribromoethanol per 10g of body weight. Then, they were perfused with 4%

paraformaldehyde in a 0.1 M phosphate buffer (PB), pH7.4. Brains were removed, postfixed overnight, and then sectioned on a vibratome (50 µm). Sections were stocked in a cryoprotective solution (ethylene glycol/glycerol/PB) until proceeded for immunodetection of Fos protein. Free-floating sections were rinsed in PBS (PB with 0.9% NaCl), and they were incubated in PBS with 0.5% $H_2O_2$ for 30 min and then in a blocking solution containing 1% bovine serum albumin (BSA), 3% goat serum (GS), and 0.2% Triton X-100 in PBS. Sections were incubated with the rabbit polyclonal antibody anti-c-Fos (1:10,000; #D1508; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) in a PBS-BSA-GS-Triton X-100 solution during 24 h at 4°C. After extensive washes in PBS, sections were incubated with the biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:2,000; Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) in a PBS-BSA-GS-Triton X-100 solution for 2 h at room temperature. Sections were then incubated in avidin–biotinylated horseradish peroxidase complex (ABC, Vectastain Elite kit, Vector Laboratories) for 2 h at room temperature. After, sections were rinsed, the peroxidase reaction end product was visualized in 0.05 M PB containing 0.025% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma) and 0.03% $H_2O_2$. Finally, sections were mounted on gelatin-coated glass slides, dehydrated through a graded series of ethanol, cleared in toluene, and coverslipped with Eukitt mounting medium. For each animal, the number of Fos-immunoreactive neurons was counted bilaterally using three to four sections. The number of positive nuclei was quantified using an Olympus BX50 microscope equipped with a computerized imaging analysis system (Visiolab 2000 version 4.50; Biocom, Paris, France). Density of Fos immunopositive cells was counted among critical areas for long-term memory formation [CA1, CA3, and dentate gyrus (DG) of the dorsal hippocampus and prefrontal cortex (PFC) regarding relational/declarative memory; the dorso-medial (Str-DM) and dorso-lateral striatum (Str-DL) regarding procedural memory [73]]. For each ITI conditions, results were expressed as the percentage of positive Fos cells regarding to their respective non-learning condition (treadmill control).

***Statistical analysis***

Data were analyzed using one or two-way ANOVA (using *age*, *ITI*, *learning,* and *injection* as variables). When appropriate, *post-hoc* comparisons were achieved by a Tukey/Kramer test with a significance level at $P < .05$.

**REFERENCES**


1. Wickelgren, W. A. Testing two-state theories with operating characteristics and a posteriori probabilities. *Psychol Bull* **69**, 126-31 (1968).
2. Milner, B. Disorders of learning and memory after temporal lobe lesions in man. *Clin Neurosurg* **19**, 421-46 (1972).
3. Squire, L. R. Memory and brain systems: 1969-2009. *J Neurosci* **29**, 12711-6 (2009).
4. Squire, L. R. & Zola, S. M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13515-22 (1996).
5. Voytek, B. & Knight, R. T. Prefrontal cortex and basal ganglia contributions to visual working memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 18167-72 (2010).
6. Muller, N. G. & Knight, R. T. The functional neuroanatomy of working memory: contributions of human brain lesion studies. *Neuroscience* **139**, 51-8 (2006).
7. Hannula, D. E., Tranel, D. & Cohen, N. J. The long and the short of it: relational memory impairments in amnesia, even at short lags. *J Neurosci* **26**, 8352-9 (2006).
8. Nichols, E. A., Kao, Y. C., Verfaellie, M. & Gabrieli, J. D. Working memory and long-term memory for faces: Evidence from fMRI and global amnesia for involvement of the medial temporal lobes. *Hippocampus* **16**, 604-16 (2006).
9. Olson, I. R., Moore, K. S., Stark, M. & Chatterjee, A. Visual working memory is impaired when the medial temporal lobe is damaged. *J Cogn Neurosci* **18**, 1087-97 (2006).
10. Olson, I. R., Page, K., Moore, K. S., Chatterjee, A. & Verfaellie, M. Working memory for conjunctions relies on the medial temporal lobe. *J Neurosci* **26**, 4596-601 (2006).
11. Hartley, T. et al. The hippocampus is required for short-term topographical memory in humans. *Hippocampus* **17**, 34-48 (2007).
12. Ezzyat, Y. & Olson, I. R. The medial temporal lobe and visual working memory: comparisons across tasks, delays, and visual similarity. *Cogn Affect Behav Neurosci* **8**, 32-40 (2008).
13. Finke, C. et al. The human hippocampal formation mediates short-term memory of colour-location associations. *Neuropsychologia* **46**, 614-23 (2008).
14. Nee, D. E. & Jonides, J. Dissociable contributions of prefrontal cortex and the hippocampus to short-term memory: Evidence for a 3-state model of memory. *Neuroimage* (2010).

15. Ranganath, C., Cohen, M. X., Dam, C. & D'Esposito, M. Inferior temporal, prefrontal, and hippocampal contributions to visual working memory maintenance and associative memory retrieval. *J Neurosci* **24**, 3917-25 (2004).
16. Ranganath, C., Cohen, M. X. & Brozinsky, C. J. Working memory maintenance contributes to long-term memory formation: neural and behavioral evidence. *J Cogn Neurosci* **17**, 994-1010 (2005).
17. Ranganath, C. & D'Esposito, M. Medial temporal lobe activity associated with active maintenance of novel information. *Neuron* **31**, 865-73 (2001).
18. Piekema, C., Kessels, R. P., Mars, R. B., Petersson, K. M. & Fernandez, G. The right hippocampus participates in short-term memory maintenance of object-location associations. *Neuroimage* **33**, 374-82 (2006).
19. Jeneson, A., Mauldin, K. N. & Squire, L. R. Intact working memory for relational information after medial temporal lobe damage. *J Neurosci* **30**, 13624-9 (2010).
20. Shrager, Y., Levy, D. A., Hopkins, R. O. & Squire, L. R. Working memory and the organization of brain systems. *J Neurosci* **28**, 4818-22 (2008).
21. Zarahn, E., Rakitin, B., Abela, D., Flynn, J. & Stern, Y. Positive evidence against human hippocampal involvement in working memory maintenance of familiar stimuli. *Cereb Cortex* **15**, 303-16 (2005).
22. Karlsgodt, K. H., Shirinyan, D., van Erp, T. G., Cohen, M. S. & Cannon, T. D. Hippocampal activations during encoding and retrieval in a verbal working memory paradigm. *Neuroimage* **25**, 1224-31 (2005).
23. Wallenstein, G. V., Eichenbaum, H. & Hasselmo, M. E. The hippocampus as an associator of discontiguous events. *Trends Neurosci* **21**, 317-23 (1998).
24. Staresina, B. P. & Davachi, L. Object unitization and associative memory formation are supported by distinct brain regions. *J Neurosci* **30**, 9890-7.
25. Eichenbaum, H., Otto, T. & Cohen, N. J. The hippocampus--what does it do? *Behav Neural Biol* **57**, 2-36 (1992).
26. Mingaud, F. et al. The hippocampus plays a critical role at encoding discontiguous events for subsequent declarative memory expression in mice. *Hippocampus* **17**, 264-70 (2007).
27. Baddeley, A. et al. The brain decade in debate: I. Neurobiology of learning and memory. *Braz J Med Biol Res* **33**, 993-1002 (2000).

28. Guzowski, J. F., Setlow, B., Wagner, E. K. & McGaugh, J. L. Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268. *J Neurosci* **21**, 5089-98 (2001).
29. Touzani, K., Marighetto, A. & Jaffard, R. Fos imaging reveals ageing-related changes in hippocampal response to radial maze discrimination testing in mice. *Eur J Neurosci* **17**, 628-40 (2003).
30. Marighetto, A. et al. Comparative effects of the alpha7 nicotinic partial agonist, S 24795, and the cholinesterase inhibitor, donepezil, against aging-related deficits in declarative and working memory in mice. *Psychopharmacology (Berl)* **197**, 499-508 (2008).
31. Rawlins, J. N., Feldon, J. & Butt, S. The effects of delaying reward on choice preference in rats with hippocampal or selective septal lesions. *Behav Brain Res* **15**, 191-203 (1985).
32. Disterhoft, J. F. & Oh, M. M. Alterations in intrinsic neuronal excitability during normal aging. *Aging Cell* **6**, 327-36 (2007).
33. McEchron, M. D., Weible, A. P. & Disterhoft, J. F. Aging and learning-specific changes in single-neuron activity in CA1 hippocampus during rabbit trace eyeblink conditioning. *J Neurophysiol* **86**, 1839-57 (2001).
34. Rosenzweig, E. S. & Barnes, C. A. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog Neurobiol* **69**, 143-79 (2003).
35. Schmitt, W. B. et al. The role of hippocampal glutamate receptor-A-dependent synaptic plasticity in conditional learning: the importance of spatiotemporal discontiguity. *J Neurosci* **24**, 7277-82 (2004).
36. Luo, J. & Niki, K. Does hippocampus associate discontiguous events? Evidence from event-related fMRI. *Hippocampus* **15**, 141-8 (2005).
37. Qin, S. et al. Probing the transformation of discontinuous associations into episodic memory: an event-related fMRI study. *Neuroimage* **38**, 212-22 (2007).
38. Staresina, B. P. & Davachi, L. Mind the gap: binding experiences across space and time in the human hippocampus. *Neuron* **63**, 267-76 (2009).
39. Hales, J. B. & Brewer, J. B. Activity in the hippocampus and neocortical working memory regions predicts successful associative memory for temporally discontiguous events. *Neuropsychologia* **48**, 3351-9 (2010).

40. Oztekin, I., Davachi, L. & McElree, B. Are representations in working memory distinct from representations in long-term memory? Neural evidence in support of a single store. *Psychol Sci* **21**, 1123-33 (2010).
41. Axmacher, N. et al. Cross-frequency coupling supports multi-item working memory in the human hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 3228-33 (2010).
42. Axmacher, N., Lenz, S., Haupt, S., Elger, C. E. & Fell, J. Electrophysiological signature of working and long-term memory interaction in the human hippocampus. *Eur J Neurosci* **31**, 177-88 (2010).
43. Axmacher, N., Elger, C. E. & Fell, J. Working memory-related hippocampal deactivation interferes with long-term memory formation. *J Neurosci* **29**, 1052-960 (2009).
44. Cassel, J. C., Lazaris, A., Birthelmer, A. & Jackisch, R. Spatial reference- (not working- or procedural-) memory performance of aged rats in the water maze predicts the magnitude of sulpiride-induced facilitation of acetylcholine release by striatal slices. *Neurobiol Aging* (2006).
45. Misane, I. et al. Time-dependent involvement of the dorsal hippocampus in trace fear conditioning in mice. *Hippocampus* **15**, 418-26 (2005).
46. Mitchell, K. J., Johnson, M. K., Raye, C. L., Mather, M. & D'Esposito, M. Aging and reflective processes of working memory: binding and test load deficits. *Psychol Aging* **15**, 527-41 (2000).
47. Mitchell, K. J., Johnson, M. K., Raye, C. L. & D'Esposito, M. fMRI evidence of age-related hippocampal dysfunction in feature binding in working memory. *Brain Res Cogn Brain Res* **10**, 197-206 (2000).
48. Luck, D. et al. The right parahippocampal gyrus contributes to the formation and maintenance of bound information in working memory. *Brain Cogn* **72**, 255-63 (2010).
49. Luck, D. et al. Abnormal medial temporal activity for bound information during working memory maintenance in patients with schizophrenia. *Hippocampus* **20**, 936-48 (2010).
50. Baddeley, A., Allen, R. & Vargha-Khadem, F. Is the hippocampus necessary for visual and verbal binding in working memory? *Neuropsychologia* **48**, 1089-95 (2010).
51. Hannula, D. E. & Ranganath, C. Medial temporal lobe activity predicts successful relational memory binding. *J Neurosci* **28**, 116-24 (2008).

52. McNab, F. & Klingberg, T. Prefrontal cortex and basal ganglia control access to working memory. *Nat Neurosci* **11**, 103-7 (2008).
53. Fleischmann, A. et al. Impaired long-term memory and NR2A-type NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in mice lacking c-Fos in the CNS. *J Neurosci* **23**, 9116-22 (2003).
54. Zhang, J. et al. c-Fos facilitates the acquisition and extinction of cocaine-induced persistent changes. *J Neurosci* **26**, 13287-96 (2006).
55. Costa-Mattioli, M. Eppendorf winner. Switching memories ON and OFF. *Science* **322**, 874-5 (2008).
56. Saxe, M. D. et al. Paradoxical influence of hippocampal neurogenesis on working memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4642-6 (2007).
57. Malleret, G. et al. Bidirectional regulation of hippocampal long-term synaptic plasticity and its influence on opposing forms of memory. *J Neurosci* **30**, 3813-25 (2010).
58. Bannerman, D. M. Fractionating spatial memory with glutamate receptor subunit-knockout mice. *Biochem Soc Trans* **37**, 1323-7 (2009).
59. Salthouse, T. A. The processing-speed theory of adult age differences in cognition. *Psychol Rev* **103**, 403-28 (1996).
60. Chalfonte, B. L. & Johnson, M. K. Feature memory and binding in young and older adults. *Mem Cognit* **24**, 403-16 (1996).
61. Grady, C. L. Functional brain imaging and age-related changes in cognition. *Biol Psychol* **54**, 259-81 (2000).
62. Bowles, R. P. & Salthouse, T. A. Assessing the age-related effects of proactive interference on working memory tasks using the Rasch model. *Psychol Aging* **18**, 608-15 (2003).
63. McCabe, D. P., Robertson, C. L. & Smith, A. D. Age differences in stroop interference in working memory. *J Clin Exp Neuropsychol* **27**, 633-44 (2005).
64. Piolino, P. et al. Reduced specificity of autobiographical memory and aging: do the executive and feature binding functions of working memory have a role? *Neuropsychologia* **48**, 429-40 (2010).
65. Huerta, P. T., Sun, L. D., Wilson, M. A. & Tonegawa, S. Formation of temporal memory requires NMDA receptors within CA1 pyramidal neurons. *Neuron* **25**, 473-80 (2000).

66. Porte, Y., Buhot, M.-C. & Mons, N. Alteration of CREB phosphorylation and spatial memory deficits in aged 129T2/Sv mice. *Neurobiology of Aging* **29**, 1533-1546 (2008).
67. Cohen, N. J. in *Neuropsychology of Memory* (eds. Squire, L. R. & Butters, N.) 83-103 (Guilford Press, New York, 1984).
68. Etchamendy, N. et al. Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling. *J Neurosci* **21**, 6423-9 (2001).
69. Paxinos, G. & Franklin, K. B. J. *The mouse brain in stereotaxic coordinates* (Academic Press, 2001).
70. Malpeli, J. G. Reversible inactivation of subcortical sites by drug injection. *J Neurosci Methods* **86**, 119-28 (1999).
71. Cimadevilla, J. M., Lopez, F., Nieto, L., Aguirre, M. J. & Fernandez, R. Lidocaine, tetrodotoxin and their effect on consolidation of spatial memory. *Psicothema* **21**, 471-4 (2009).
72. Daumas, S., Halley, H., Frances, B. & Lassalle, J. M. Encoding, consolidation, and retrieval of contextual memory: differential involvement of dorsal CA3 and CA1 hippocampal subregions. *Learn Mem* **12**, 375-82 (2005).
73. White, N. M. & McDonald, R. J. Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol Learn Mem* **77**, 125-84 (2002).

**FIGURE AND LEGENDS**

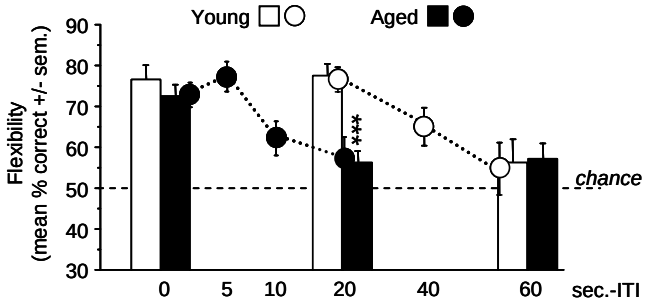



**Figure 1. DM expression in young and aged mice is affected by the temporal distance between learning events**. Histograms represent performance in the young and aged groups trained under 0, 20 or 60 sec.-ITI condition in the first experiment. Line plots represent performances for aged groups trained under 0, 5, 10 or 20 sec.-ITI and young groups trained under 20, 40 and 60 sec.-ITI conditions in two complementary experiments. DM expression declines above 20 sec. intervals in the young mice, above 5 sec. intervals in the aged groups, showing that a WM function sustains "online" temporal binding in DM acquisition and the aging deficit in DM expression is secondary to a defect in this WM function. N=6-10 per group.
***, $p<0.001$ between ITI- learning conditions.

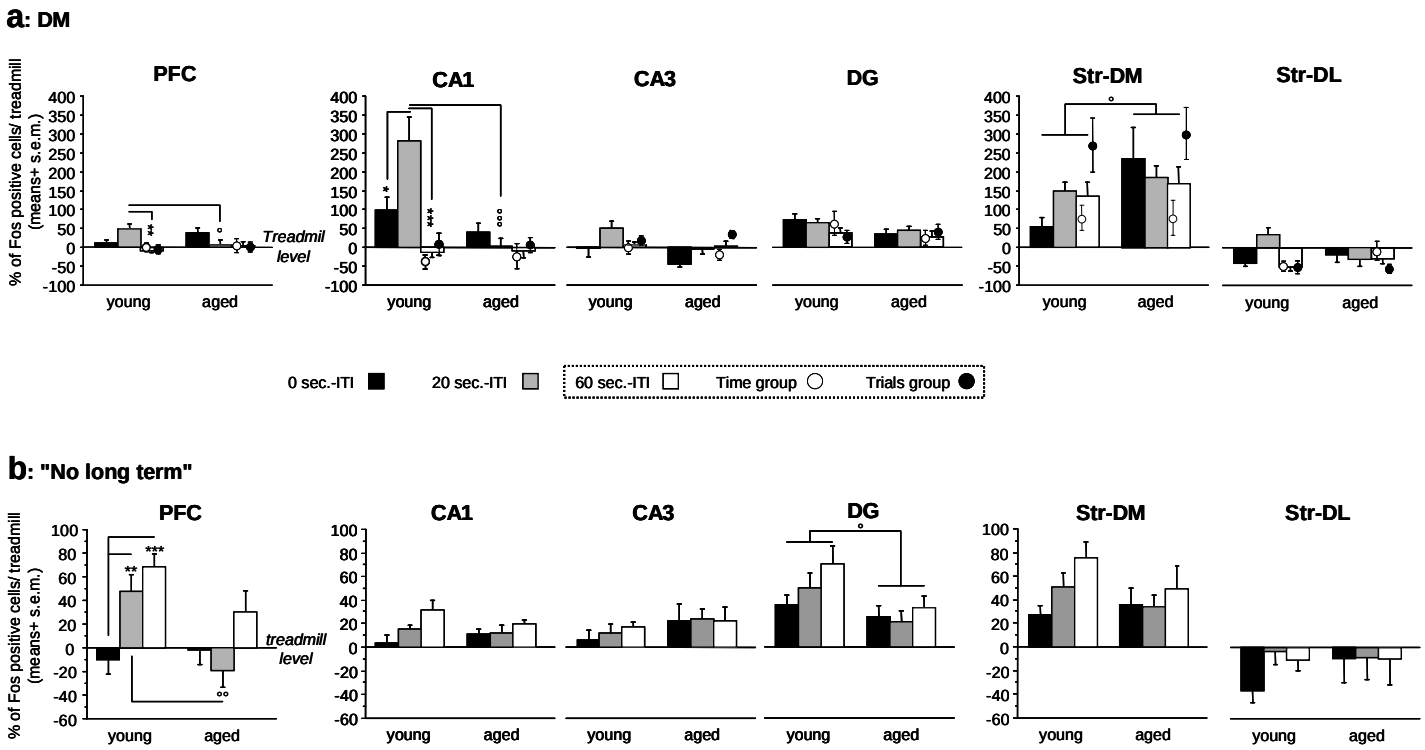



**Figure 2. A WM-related CA1 activation specific of long-term memory formation.** Density of Fos immunopositive cells was measured after the 3rd session of learning among critical areas (prefrontal cortex-PFC; CA1; CA3; dentate gyrus-DG; dorso-medial striatum-Str-DM; dorso-lateral striatum-Str-DL) for memory formation. Young and aged groups were trained under contiguous conditions (0-sec ITI), "*high MW demand*" (20-sec ITI), or "*outside MW demand*" (60-sec ITI) and compared to a no-learning (treadmill) control condition. (**a**) Data for long term DM condition. (**b**) Data for no long term learning condition. Results for each group were expressed as the percentage of Fos immunopositive cells regarding to their respective locomotors (treadmill) control. N=6-10 per group

*, **, *** $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$ between learning conditions.

°, °°: $p<0.05$, $p<0.01$ between ages.

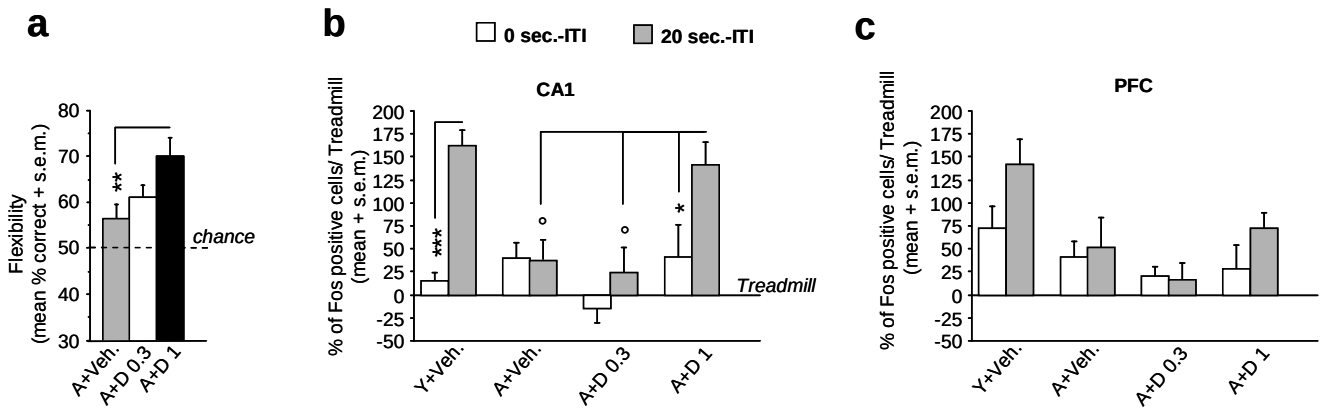



**Figure 3. Donepezil treatment restores LTDM flexibility and hippocampal CA1 activation during acquisition in aged mice.** Mice were treated by subcutaneous injections of one of two doses of Donepezil (0.3 and 1 mg/kg,). (**a**) Behavioral results. All mice were tested in the 20s ITI-condition. Only the higher dose restored memory flexibility in aged mice. N=7-11 per group. **P < 0.01. Mice tested in two critical ITI-conditions (0 or 20 seconds) were sacrificed after the third session of DM learning for Fos immunohistochemical analysis. (**b**) Fos immunoreactivity in the hippocampal CA1. (**c**) Fos immunoreactivity in the prefrontal cortex. The higher dose of donepezil restored only CA1 activation in aged compared to young adult mice. Results for each group were expressed as the percentage of Fos immunopositive cells regarding to their respective locomotor (treadmill) control.s N=4-8 per group. *P < 0.05, ***P < 0.001 between *learning* conditions.

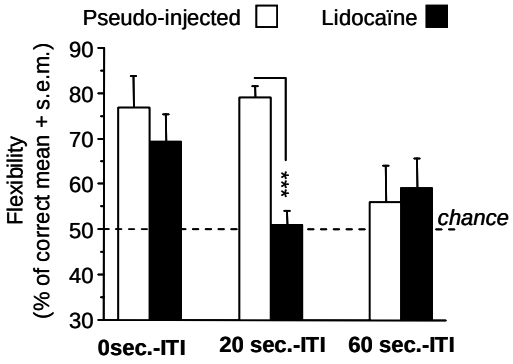
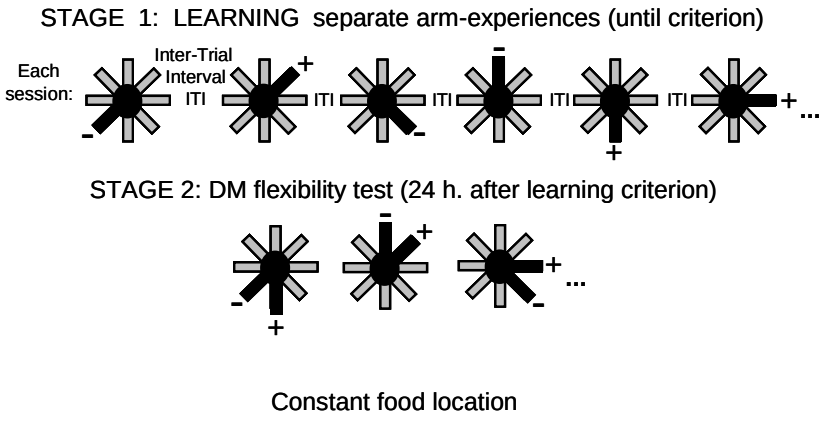


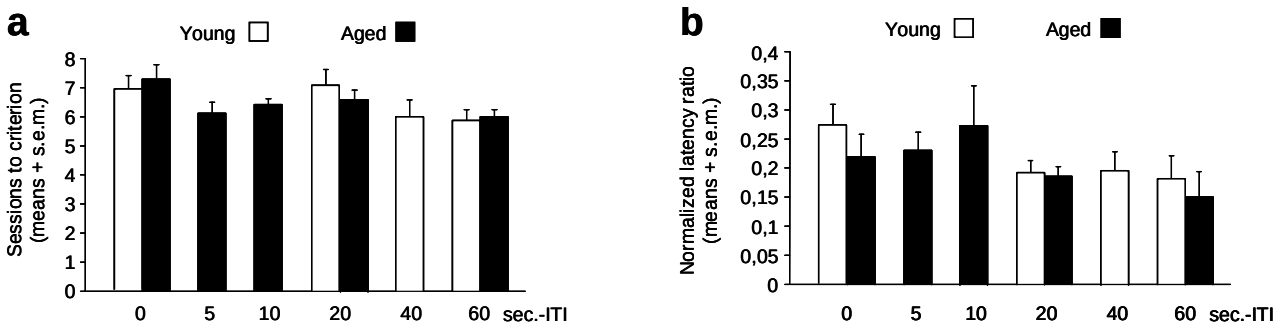

**Figure 4. Hippocampal CA1 inactivation in young adult mice impaired DM performance, mimicking the age-related memory decline.** Performances of pseudo-injected controls and lidocaïne inactivated mice in the Stage 2 of the LTDM task as a function of their respective ITI-conditions of learning (in Stage 1). Injection of lidocaïne in the CA1 induced a memory flexibility deficit specifically for the 20 seconds, but not for the 0 and 60 seconds ITI-conditions. N=9-10 per group.

***$p < 0.001$ between *learning* conditions.

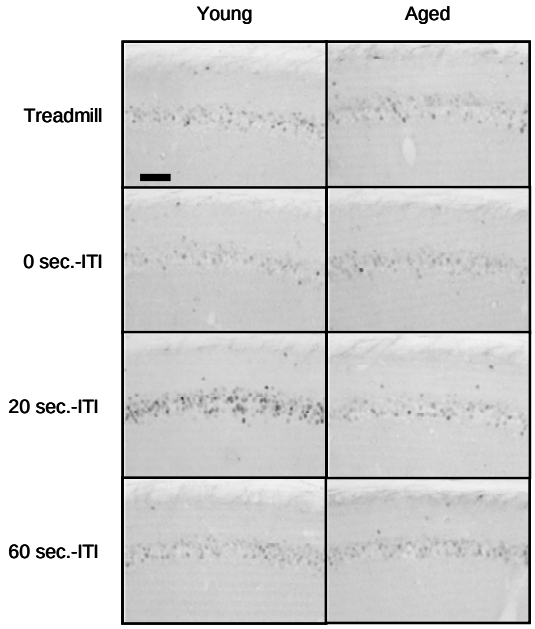
**SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS**



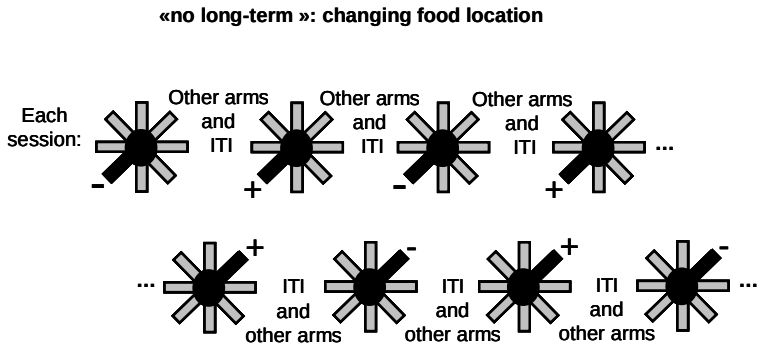

**Supplementary figure 1. Schematic representation of the LTDM paradigm.** The food location among the arms (three baited, three non baited) remained constant over the entire experiment but the arm-presentation was changed between the learning-phase (Stage 1) and the test-phase (Stage 2) to assess the characteristic flexibility property of declarative memory expression. In Stage 1, the arms were presented one by one successively, with an inter-trial-interval (ITI) during which the mouse was maintained in the central platform. This ITI allowed manipulate the online temporal binding. In Stage 2, the same arms were presented by pairs of opposite valence.




**Supplementary figure 2. Learning (stage 1) of the LTDM task is comparable in all groups.** Young and aged groups were trained under the different ITI conditions (0, 20 and 60 seconds). Two parameters were assessed during learning: (**a**) the number of learning sessions and (**b**) the normalized discriminative latency ratio averaged in the two last session of acquisition.




**Supplementary figure 3. Fos immunostaining in the CA1 region of the hippocampus.** Representative photomicrographs for the young (left panel) and aged (right panel) groups trained under 0, 20 or 60 seconds ITI condition. Scale bar, 50 μm.




**Supplementary figure 4. Schematic representation of the "no long term" learning paradigm.** The food location in the arms is not constant across the session and the entire experiment. For a given arm, the food is present one over two times. In this test, mice did not have the possibility to learn any constant food locations in the maze.

**DM**

**0 sec-ITI Young**

| | CA1 | CA3 | DG | DM | DL |
|---|---|---|---|---|---|
| CA3 | -,746 | | | | |
| DG | ,623 | -,041 | | | |
| DM | -,306 | ,270 | ,249 | | |
| DL | ,468 | -,401 | ,444 | ,002 | |
| CPF | -,723 | ,216 | -,550 | ,600 | -,042 |

**20 sec.-ITI Young**

| | CA1 | CA3 | DG | DM | DL |
|---|---|---|---|---|---|
| CA3 | ,587* | | | | |
| DG | ,224 | ,069 | | | |
| DM | -,334 | -,066 | ,391 | | |
| DL | ,212 | ,236 | -,073 | -,332 | |
| CPF | ,765*** | ,312 | ,477 | -,266 | ,304 |

**60 sec.-ITI Young**

| | CA1 | CA3 | DG | DM | DL |
|---|---|---|---|---|---|
| CA3 | ,524* | | | | |
| DG | ,366 | ,423 | | | |
| DM | ,874*** | ,459 | ,206 | | |
| DL | -,052 | -,370 | ,058 | ,077 | |
| CPF | -,192 | ,255 | ,088 | -,089 | -,032 |

**0 sec.-ITI Aged**

| | CA1 | CA3 | DG | DM | DL |
|---|---|---|---|---|---|
| CA3 | ,325 | | | | |
| DG | -,450 | -,734 | | | |
| DM | -,354 | ,349 | ,316 | | |
| DL | ,230 | ,543 | -,437 | -,008 | |
| CPF | ,046 | ,097 | ,009 | -,129 | -,024 |

**20 sec.-ITI Aged**

| | CA1 | CA3 | DG | DM | DL |
|---|---|---|---|---|---|
| CA3 | ,081 | | | | |
| DG | ,140 | ,037 | | | |
| DM | ,516* | ,095 | -,021 | | |
| DL | ,597* | -,244 | -,028 | ,169 | |
| CPF | ,249 | -,338 | -,011 | ,545* | ,430 |

**60 sec.-ITI Aged**

| | CA1 | CA3 | DG | DM | DL |
|---|---|---|---|---|---|
| CA3 | ,528* | | | | |
| DG | ,753*** | ,390 | | | |
| DM | ,620** | ,752*** | ,621** | | |
| DL | -,231 | -,305 | -,075 | -,277 | |
| CPF | -,031 | ,038 | ,182 | ,162 | ,612** |

**" No long term"**

**0 sec-ITI Young**

| | CA1 | CA3 | DG | DM | DL |
|---|---|---|---|---|---|
| CA3 | ,578 | | | | |
| DG | ,681* | ,679* | | | |
| DM | ,652* | ,367 | ,325 | | |
| DL | ,612 | ,414 | ,347 | ,541 | |
| CPF | ,438 | ,469 | ,119 | ,222 | -,051 |

**20 sec.-ITI Young**

| | CA1 | CA3 | DG | DM | DL |
|---|---|---|---|---|---|
| CA3 | ,330 | | | | |
| DG | ,365 | -,428 | | | |
| DM | ,504 | -,164 | ,061 | | |
| DL | ,154 | ,103 | ,329 | ,247 | |
| CPF | ,188 | -,661 | ,437 | ,761* | ,156 |

**60 sec.-ITI Young**

| | CA1 | CA3 | DG | DM | DL |
|---|---|---|---|---|---|
| CA3 | ,212 | | | | |
| DG | ,416 | ,362 | | | |
| DM | ,126 | ,256 | ,687* | | |
| DL | ,356 | ,499 | ,298 | ,372 | |
| CPF | -,076 | ,065 | ,143 | ,337 | ,378 |

**0 sec.-ITI Aged**

| | CA1 | CA3 | DG | DM | DL |
|---|---|---|---|---|---|
| CA3 | ,458 | | | | |
| DG | ,579 | ,187 | | | |
| DM | ,488 | ,509 | ,102 | | |
| DL | ,786** | ,107 | ,258 | ,433 | |
| CPF | ,482 | ,627 | ,456 | ,576 | -,036 |

**20 sec.-ITI Aged**

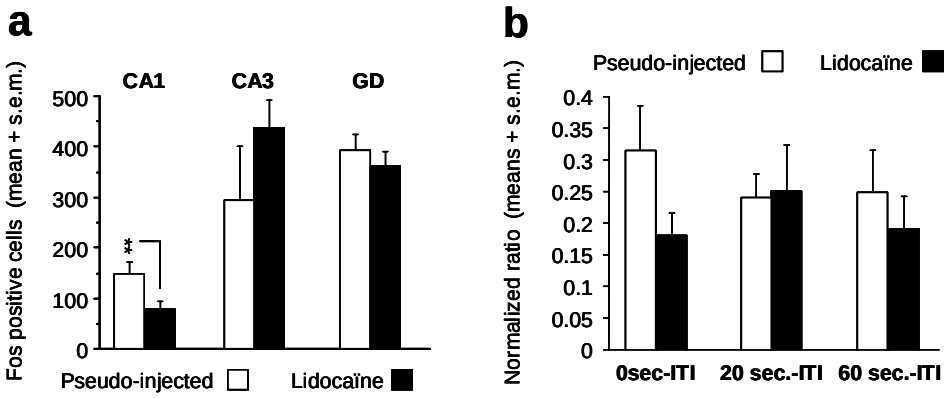
| | CA1 | CA3 | DG | DM | DL |
|---|---|---|---|---|---|
| CA3 | ,117 | | | | |
| DG | ,345 | -,580 | | | |
| DM | ,644 | -,163 | ,575 | | |
| DL | ,724* | -,330 | ,798** | ,589 | |
| CPF | ,494 | ,241 | ,465 | ,051 | ,553 |

**60 sec.-ITI Aged**

| | CA1 | CA3 | DG | DM | DL |
|---|---|---|---|---|---|
| CA3 | ,161 | | | | |
| DG | ,604 | ,275 | | | |
| DM | ,343 | ,446 | ,685 | | |
| DL | ,691* | ,337 | ,716* | ,741* | |
| CPF | ,501 | -,205 | ,729* | ,596 | ,488 |

**Supplementary figure 5. Correlation matrices.** Correlations were made between Fos immunoreactivity data of cerebral regions analyzed for each ITI (0, 20, 60 seconds), age (young and aged), and learning (DM and no long term) conditions.

*, **, *** $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$ for significant correlation.




**Supplementary figure 6. Lidocaïne injections did not affect the learning performance and were restricted to CA1.** (**a**) Normalized discriminative latency ratio of young and aged mice in the last session of acquisition (stage 1) as a function of their respective ITI-conditions (0, 20 or 60 seconds). (**b**) Fos immunoreactivity was measured in the three hippocampal regions [CA1, CA3, dentate gyrus (DG)] after the third session of learning (Stage 1) in *pseudo-injected* and *lidocaïne* injected young adult mice tested under the 20 seconds ITI-condition. *P < 0.05

# Discussion générale

L'identification des bases neurobiologiques du déclin mnésique lié au vieillissement est un domaine de recherche très productif qui vise à répondre à une demande sociétale pressante. Cette recherche se heurte toutefois à de nombreuses difficultés liées à la complexité et à l'hétérogénéité des effets du vieillissement. Dans ce contexte, nous avons identifié deux sources de difficultés que notre travail visait à dépasser :

(1) La rupture entre les recherches menées chez l'homme et chez l'animal, notamment liée au fait que les mémoires les plus sensibles au vieillissement sont typiquement humaines. Cette rupture amène à la question de la modélisation de la mémoire déclarative et de la nécessaire sophistication des outils d'analyse de la mémoire chez l'animal pour appréhender la complexité psychologique du vieillissement mnésique.

(2) le manque d'intégration entre les différents niveaux d'analyse du fonctionnement cérébral, partiellement liée à la rupture homme-animal.

Notre objectif était double :

- améliorer la compréhension du déclin de la mémoire déclarative au niveau psychologique en identifiant le/les processus cognitifs altérés.
- apporter des éléments d'intégration des différents niveaux d'analyse en appréhendant le niveau structural et systémique dans sa dynamique grâce à un marqueur d'activité cellulaire.

1 – Hippocampe, *binding* temporel et leurs altérations au cours du vieillissement

- **Contexte, objectifs et principaux résultats :**

Une très large littérature montre que le déficit de mémoire à long terme lié au vieillissement est lié à un défaut d'encodage. Des données d'imagerie fonctionnelle chez l'homme et des données antérieures de l'équipe montrent un défaut d'activation hippocampique dans l'encodage de la mémoire déclarative au cours du vieillissement. Ce n'est que très récemment que des données ont montré que l'hippocampe pourrait sous-tendre le processus de *binding* lors de l'encodage de représentations basées sur des associations complexes (représentations relationnelles). Ces données suggèrent que ce processus de *binding* hippocampique pourrait être commun à la mémoire déclarative et à la mémoire de travail. Parce qu'elle s'oppose au dogme de la séparation entre systèmes de mémoire à court terme et à long terme, cette suggestion suscite un vif débat dans la littérature.

Notre contribution à ce débat a consisté à éprouver l'hypothèse d'une implication de la mémoire de travail dans le déficit d'encodage de la mémoire déclarative. Précisément, nous avons cherché à montrer (i) que le *binding* temporel est l'une des fonctions hippocampiques nécessaire à la formation de la mémoire relationnelle/déclarative, (ii) que cette fonction implique la mémoire de travail, et (iii) que son altération au cours du vieillissement est à l'origine du déclin de la mémoire relationnelle/déclarative. Pour cela, nous avons manipulé pendant l'apprentissage, l'éloignement temporel entre les informations à apprendre au sein, et au-delà, du domaine temporel de la mémoire de travail (i.e. entre 0 et 60 secondes).

Les résultats obtenus sont conformes aux hypothèses. Ils mettent en évidence que le *binding* temporel est une fonction sous-tendue par le tampon épisodique, un composant de la mémoire de travail, et repose sur l'activité du CA1 hippocampique. Cette fonction est nécessaire à la formation de la mémoire relationnelle/déclarative, montrant que l'hippocampe est une structure engagée dans les deux formes de mémoire. De plus, nos résultats montrent qu'un défaut d'activation du CA1 est responsable de l'altération du *binding* hippocampique, induisant le déficit de mémoire relationnelle/déclarative caractéristique du vieillissement.

- **Hippocampe, mémoire à court terme et mémoire à long terme : avancées psychologiques**

Nos travaux indiquent que la mémoire de travail et la mémoire à long terme partagent une structure commune, l'hippocampe. Nous montrons que le rôle de cette structure est crucial pour la fonction de *binding* des informations à court terme. Ces résultats sont en accord avec les données d'imagerie chez l'homme, montrant que l'hippocampe est activé lors de la réalisation de tâches de mémoire de travail nécessitant d'associer des informations (Hales et Brewer, 2010; Luck et al., 2010a). De plus, nos résultats montrent que cette fonction est altérée chez des souris âgées, ce qui est aussi le cas chez l'homme (Mitchell et al., 2000a; Mitchell et al., 2000b).

Cependant, des études menées chez des patients amnésiques par les partisans de la séparation entre mémoire à court terme et mémoire à long terme invalident l'idée. Elles montrent une implication de l'hippocampe dans le *binding* des informations en mémoire de travail en montrant que cette fonction du tampon épisodique est préservée après lésion de l'hippocampe (Baddeley et al., 2010) tout comme la mémoire de travail (Jeneson et al., 2010; Shrager et al., 2008). Nos résultats permettent une interprétation différente qui réconcilie les deux courants. En effet, nous montrons que l'activation du CA1 sous-tendant la fonction de

tampon épisodique n'est présente que lorsque des informations sont à retenir à long terme. Dans le cas contraires, comme dans la tâche de contrôle (« no long-term »), seule une activation préfrontale est observée. Ainsi, la fonction hippocampique ne serait requise que lorsque les opérations de *binding* s'effectuent sur des informations implémentant la mémoire à long-terme. Cette analyse est en accord avec les données de la littérature, montrant que l'activité hippocampique à court terme permet la formation d'une mémoire relationnelle à long terme (Hannula, 2006).

Nos résultats permettent de faire le lien entre les arguments de la littérature concernant le vieillissement. En effet, il est connu que le vieillissement est accompagné d'un dysfonctionnement hippocampique pouvant être responsable du déclin de la mémoire déclarative (Grady, 2000). Le vieillissement affecte également la mémoire de travail, et particulièrement la fonction de *binding* hippocampique (Mitchell et al., 2000a; Mitchell et al., 2000b), comme nous l'évoquions précédemment. Cependant, peu d'études ont fait le lien entre les déficits de mémoire de travail et les déficits de mémoire déclarative lors du vieillissement. Seule l'étude de Piolino et al. (2010) suggère un possible lien entre l'altération du tampon épisodique et l'altération de la mémoire épisodique autobiographique. A l'instar de cette étude, nos travaux suggèrent que l'altération de la mémoire déclarative liée à l'âge est consécutive à un dysfonctionnement d'un système de mémoire à court terme, le tampon épisodique, permettant le *binding* des informations. De plus, nous montrons que l'altération du tampon épisodique provient d'une perturbation de l'activité du CA1.

- **Hippocampe, mémoire à court terme et mémoire à long terme : intégration au niveau cellulaire et moléculaire**

Nos résultats montrent que l'hippocampe est impliqué dans les interactions entre mémoire à court terme et mémoire à long terme que nous pouvons reconsidérer sur le plan des mécanismes cellulaires et moléculaires. Précisément, nous avons observé que la fonction de *binding* temporel à court terme entraînait une augmentation de l'expression de la protéine Fos dans la région CA1 uniquement lorsque des informations éloignées de quelques secondes devaient être encodées en mémoire à long terme. Fos ayant un rôle physiologique au sein du neurone, en particulier dans les mécanismes de plasticité synaptique à long-terme et la consolidation des traces mnésiques (Fleischmann et al., 2003; Katche et al., 2010), nos résultats sont en accord avec la conception d'une dissociation entre les mécanismes de la mémoire à long-terme et ceux de la rétention à court-terme. Nous développerons deux points :

le premier traitant des mécanismes hippocampiques dissociant et montrant les interactions entre mémoire à long terme, et à mémoire à court terme, le second traitant du déficit de plasticité synaptique au cours du vieillissement.

→ *Mécanismes de la plasticité hippocampique dissociant mémoire à court terme et mémoire à long terme*

Le récepteur NMDA est un des acteurs majeurs du développement de la plasticité synaptique au sein de l'hippocampe. Il a été démontré que les différentes sous-unités de ce récepteur jouaient un rôle différentiel dans les processus de mémoire à court terme et de mémoire à long terme. En effet, la PLT se trouve complètement abolie lorsqu'une invalidation de la sous-unité NR1 du récepteur NMDA est réalisée dans la région CA1 chez la souris. Cette invalidation provoque également un déficit de mémoire spatiale à long terme en piscine de Morris (Tsien et al., 1996), ainsi qu'un déficit dans une tâche « *episodic-like* » dans le « starmaze » (Rondi-Reig et al., 2006). Par ailleurs, l'invalidation de la sous-unité NR2B dans l'hippocampe entraine une diminution de la PLT chez la souris, associée à un déficit de mémoire spatiale à court terme/de travail (von Engelhardt et al., 2008). De façon cohérente, la surexpression de cette sous-unité facilite la PLT et améliore la mémoire à long terme (Tang et al., 1999). Enfin, il semble que la sous-unité NR2A ait un rôle plus ambigu. Il a été montré que l'invalidation de la sous-unité NR2A dans l'hippocampe réduisait la PLT chez la souris et était associée à des déficits de mémoire spatiale à court terme/de travail (von Engelhardt et al., 2008) et de référence (Sakimura et al., 1995).

Une telle dissociation semble se retrouver également au sein des récepteurs AMPA, bien que les informations dans la littérature ne soient pas très étoffées. En effet, il a été montré que la délétion de la sous-unité GluR1 était associée à la perte d'un usage flexible des informations en mémoire à court terme/de travail, alors que la flexibilité en mémoire à long terme ne se trouve pas affectée (Schmitt et al., 2004b). Cependant, cette sous-unité semble impliquée dans l'encodage d'éléments temporellement discontigus (Schmitt et al., 2004a).

Enfin, il semble exister une activité différentielle dans l'hippocampe lorsque des informations sont traitées en mémoire de travail ou en mémoire à long terme. Les travaux d'Axmacher et collaborateurs vont dans ce sens, révélant que les assemblées neuronales hippocampiques ont une activité électrique particulière lors du maintien d'informations multiples en mémoire de travail (Axmacher et al., 2010b), qui interfère avec la formation de la mémoire à long terme (Axmacher et al., 2010a). Ces données montrent que l'hippocampe

est le siège d'interactions parfois « compétitives » entre la formation de la mémoire de travail et de la mémoire à long-terme.

L'ensemble de ces données bibliographiques nous montrent qu'il existe une plasticité liée aux récepteurs glutamatergiques dans l'hippocampe qui diffère entre la mémoire à court terme et la mémoire à long terme. Ce clivage semble se poursuivre au niveau des acteurs moléculaires de la mémoire, comme nous allons le développer dans la partie suivante.

→ *Mécanismes moléculaires contrôlant le passage d'une mémoire à court terme vers une mémoire à long terme dans l'hippocampe*

La littérature rapporte que de nombreux acteurs moléculaires sont impliqués dans la formation d'une mémoire à long terme, et que leur invalidation n'affecte pas ou améliore la mémoire à court terme. Par exemple, la phosphatase calcineurine présente ce type de dissociation. Son inhibition facilite la formation d'une mémoire à long terme et la PLT (Malleret et al., 2001). Au contraire, son altération ne provoque aucun déficit en mémoire à court terme (Mansuy et al., 1998), lui suggérant un rôle de senseur dans la transition entre mémoire à court terme et mémoire à long terme. La calcineurine est connue pour réguler la PKA. Des travaux portant sur cette kinase ont montré son implication différentielle entre les formes de mémoire à court terme et de mémoire à long terme. Il est en effet bien connu que la PKA joue un rôle déterminant dans la consolidation de la trace mnésique dans différentes tâches hippocampo-dépendantes, telles que l'apprentissage spatial ou la peur conditionnée au contexte (pour revue :Abel et Nguyen, 2008). Au contraire, la suppression de l'activité de cette protéine à l'aide d'une forme dominante négative entraine une amélioration des performances en mémoire de travail, particulièrement lors de la présence d'interférences proactives (Malleret et al., 2010).

Des résultats similaires ont été obtenus en inhibant la neurogénèse hippocampique. En effet, une telle inhibition entraine une perturbation de la mémoire à long terme, mais provoque une amélioration des performances de mémoire de travail (Saxe et al., 2007). Ces résultats montrent que l'inhibition de la PKA ou de la neurogénèse empêche la rétention à long terme des informations, permettant un oubli accéléré et diminuant ainsi les effets d'interférence en mémoire de travail.

En aval de l'action de la PKA, le facteur CREB permet la transcription de gènes précoces puis tardifs aboutissant à la synthèse de protéines permettant le passage d'une

mémoire à court terme vers une mémoire à long terme (Pittenger et al., 2002). Cependant, cette néosynthèse protéique n'est pas toujours impliquée dans cette consolidation de la mémoire à long terme. Ainsi, Costa-Mattioli et collaborateurs montrent l'implication d'un facteur d'initiation de la transcription (eIF2α) dans le passage d'une mémoire à court terme vers une mémoire à long terme. De façon paradoxale, ce facteur d'initiation de la transcription active la synthèse d'une molécule répresseur de la formation de la mémoire à long terme (nommée ATF4). Ces auteurs montrent que la diminution d'activité d'eIF2α entraine une augmentation de la durée de la PLT, associée à un apprentissage plus rapide. Au contraire, l'activation de cette protéine perturbe la PLT et l'apprentissage (Costa-Mattioli, 2008). Des résultats similaires ont été observés en agissant sur la protéine kinase phosphorylant eIF2α (Costa-Mattioli et al., 2005; Costa-Mattioli et al., 2007).

En conclusion, les travaux précédemment discutés témoignent de l'existence de mécanismes permettant le contrôle du passage de la mémoire à court-terme vers la mémoire à long-terme.

→ *Altérations de la plasticité synaptique au cours du vieillissement*

En montrant que le défaut de *binding* hippocampique lié au vieillissement a pour origine une altération de l'expression de la protéine Fos dans la région CA1, nos résultats, sont en accord avec une abondante littérature montrant un déficit de plasticité synaptique lié au vieillissement. En effet, il a été montré que l'induction de la PLT est perturbée (Bodhinathan et al., 2010). La composante NMDA de la réponse synaptique est diminuée chez des animaux âgés (Barnes et al., 1997; Billard et Rouaud, 2007 ), suggérant que les déficits mnésiques liés à l'âge sont dus à une diminution de la plasticité synaptique impliquant ces récepteurs (Rosenzweig et Barnes, 2003).

Les modifications d'efficacité synaptique peuvent être attribuées à la constitution même du récepteur. En effet, le vieillissement s'accompagne de modifications de l'expression des sous-unités et de la composition du récepteur NMDA, touchant en particulier les sous-unités NR1 et NR2 (Magnusson et al., 2005; Magnusson et al., 2006 ; Das et Magnusson, 2008). L'implication du récepteur NMDA dans la formation de la mémoire de travail et de la mémoire à long terme, ainsi que son altération au cours du vieillissement, nous mène à penser que le défaut de PLT NMDA dépendante pourrait être à l'origine du dysfonctionnement de l'encodage de la mémoire relationnelle/ déclarative que nous avons observé chez nos animaux âgés.

Des modifications des propriétés biophysiques des synapses hippocampiques ont également pu être rapportées au cours du vieillissement. En effet les synapses du CA1 qui sont critiques pour l'association d'informations temporellement discontigues s'avèrent détériorées au cours du vieillissement (McEchron et Disterhoft, 1999; Knuttinen et al., 2001). Dans le même ordre d'idées, l'hyperpolarisation consécutive à la décharge (ou AHP) est allongée chez les individus âgés et reliée à des déficits d'apprentissages hippocampo-dépendants (Disterhoft et Oh, 2007).

Enfin, les altérations hippocampiques de l'expression et/ou de la phosphorylation de la protéine CREB sont observées au cours du vieillissement (Brightwell et al., 2004). L'étude de (Porte et al., 2008a) décrit qu'une altération de la phosphorylation (forme active) de CREB, ainsi qu'une altération d'expression de la protéine Fos dans le CA1 sont associées aux déficits de mémoire spatiale à long terme.

Dans ce cadre il serait intéressant d'explorer plus avant les mécanismes moléculaires pouvant sous-tendre la fonction de tampon épisodique dans l'hippocampe. En effet, si nos résultats suggèrent l'implication de la protéine Fos, de nombreux acteurs moléculaires tels les récepteurs NMDA, les protéines kinases ou encore les facteurs de transcription peuvent mener à sa production. Ces mêmes acteurs moléculaires ont d'ailleurs été impliqués dans les altérations mnésiques liées au vieillissement. Nous proposons, dans un avenir proche, de tester l'implication des récepteurs NMDA dans la fonction de tampon épisodique à l'aide d'un modèle de souris transgéniques testé dans notre procédure de labyrinthe radiaire.

2 – Cholinergie et vieillissement : modulation et coordination des systèmes de mémoire

- **Contexte, objectifs et principaux résultats :**

Les données de la littérature montrent que les traitements procholinergiques qui visent à compenser la perte cholinergique liée au vieillissement sont utilisés en clinique pour réduire les déficits mnésiques des patients souffrant de la maladie d'Alzheimer. Pourtant les lésions cholinergiques sélectives n'ont peu ou pas d'effet sur la mémoire. Donc, la perte cholinergique ne peut expliquer en elle-même les déficits du vieillissement, mais à ce jour, l'impact de cette perte sur la fonction mnésique demeure mal compris.

Une reformulation de l'hypothèse cholinergique permet d'envisager une implication de la perte cholinergique sur le fonctionnement cérébral à l'échelle systémique. Sur la base de cette hypothèse, nous avons étudié l'impact de deux manipulations opposées de la

transmission cholinergique, un traitement pharmacologique « procholinergique » chez l'animal âgé et une lésion partielle de la voie cholinergique septo-hippocampique, sur les patrons d'activité Fos associés à (la formation ou l'expression de) la mémoire déclarative au sein des principaux systèmes mnésiques.

Tout d'abord, nos résultats confortent les données principales de la littérature : le traitement procholinergique réduit le déficit de mémoire relationnelle/déclarative des animaux âgés, mais la lésion cholinergique n'a pas d'effet visible sur ce comportement mnésique chez l'animal jeune. Globalement conformes à l'hypothèse cholinergique reformulée, nos résultats apportent également des éléments d'information nouveaux que nous allons décrire dans une première section. Dans une seconde section, nous élargirons l'interprétation de nos résultats en considérant l'implication de la voie GABAergique septo-hippocampique comme explication alternative.

- **Hypothèse cholinergique reformulée : éléments nouveaux quant au rôle de la transmission cholinergique dans la coordination des systèmes de mémoire**

→ *Le traitement procholinergique normalise les activités cérébrales associées à la formation de la mémoire relationnelle/déclarative*

Cette observation, répétée dans les deux versions de notre procédure d'apprentissage, étaye l'hypothèse que l'hypocholinergie contribue aux altérations de l'activité fonctionnelle des systèmes mnésiques qui caractérisent le vieillissement. En outre, les différences d'effet du traitement entre les deux procédures confortent l'idée que l'acétylcholine coordonne l'activité des systèmes de façon différentielle et adaptée à chaque situation d'apprentissage. Cette idée est également confortée par les effets complexes des drogues procholinergiques sur l'activité cérébrale induite par différentes tâches mnésiques, tels qu'ils ont pu être observés chez l'homme (Freo et al., 2005; Ricciardi et al., 2009). Par exemple, lorsque les sujets âgés effectuent une tâche de mémoire de travail visuelle, l'augmentation de l'activité du système cholinergique par la physostigmine (inhibiteur de l'AChE) entraine une diminution de l'activité préfrontale, conjointement à une augmentation de l'activité des régions pariétales impliquées dans le traitement des informations sensorielles. Au contraire, chez des patients MCI ou atteints de la maladie d'Alzheimer exécutant une tâche de mémoire de travail, les traitements procholinergiques entraînent une augmentation de l'activité des régions préfrontales (Rombouts et al., 2002; Saykin et al., 2004).

Cependant, si un traitement procholinergique est capable de normaliser les activités cérébrales chez les souris âgées, comment expliquer que les traitements « procholinergiques » aient une efficacité limitée en clinique ? Deux éléments de réponses peuvent être considérés : 1) la normalisation est incomplète 2) l'ACh est différentiellement impliquée dans les différentes phases de mise en mémoire.

Nous avons en effet observé que le traitement au donépézil ne permet de normaliser complètement l'activité hippocampique, ni d'ailleurs de rétablir des performances comparables aux individus jeunes. Cette restauration partielle pourrait être expliquée par une restauration insuffisante de la transmission cholinergique ou par la diminution de l'expression des récepteurs cholinergiques au sein de l'hippocampe (Woodruff-Pak et al., 2010). Elle pourrait également être liée à la transmission GABAergique, cet aspect étant développé dans la section suivante.

Comme nous l'avons vu en introduction générale, un certain nombre d'observations soutiennent l'idée qu'une augmentation d'activité cholinergique est nécessaire à l'acquisition des informations alors qu'une inhibition de cette activité serait nécessaire à la consolidation (Gais et Born, 2004 ; Hasselmo, 2006). Le traitement procholinergique ne permet pas de restaurer la dynamique de la modulation cholinergique dans les différentes phases mnésiques, expliquant la restauration partielle des capacités mnésiques. Nous n'avons étudié que la phase d'acquisition, pas celle de consolidation. Nous ne pouvons donc pas conclure sur ce point, mais nous pouvons penser que les effets du traitement en phase de consolidation pourraient avoir un effet délétère, et accroitre les différences liées à l'âge plutôt que de les réduire comme en phase d'acquisition.

→ *La lésion partielle de la voie cholinergique septo-hippocampique altère les activités fonctionnelles au sein des principaux systèmes de mémoire.*

Nos résultats suite à une lésion cholinergique partielle mimant l'effet du vieillissement démontrent que l'ACh permet la coordination de l'activité des systèmes lors de l'expression de la mémoire relationnelle/déclarative. En effet, l'altération seule de la voie cholinergique septo-hippocampique a des conséquences non seulement sur la principale structure sous-tendant cette forme de mémoire, mais sur les autres systèmes, en particulier l'amygdale et le striatum. Ces résultats démontrent que la voie SHC est sélectivement impliquée dans la coordination des systèmes sous-tendant l'expression de la mémoire déclarative.

Toutefois, les effets observés ne vont pas dans le sens de l'hypothèse de Gold (Gold, 2003, 2004), qui suppose qu'une augmentation de l'activité cholinergique dans la structure cible. Dans notre cas l'hippocampe, promeut l'utilisation d'une stratégie ou d'une mémoire sous-tendue par cette structure, la mémoire déclarative. En effet, la lésion cholinergique septo-hippocampique ne réduit pas l'activité hippocampique. Au contraire, elle accroit significativement l'activité du champ CA3 alors qu'elle réduit celle de l'amygdale. Cependant, parce que notre lésion est partielle et que nous n'avons pas mesuré les quantités d'ACh libérées dans l'hippocampe, nous devons toutefois limiter la portée de cette observation.

→ *Hyperactivation du CA3 induite par la lésion : des propriétés computationnelles à l'activité des systèmes au stade prodromique de la maladie d'Alzheimer.*

L'hyperactivation du CA3 que nous observons suite à la lésion cholinergique septo-hippocampique nous permet d'intégrer les données cellulaires et systémiques de la littérature qui pourraient avoir en commun la perturbation du système cholinergique.

En premier lieu, l'ACh régulerait les propriétés de *pattern separation/pattern completion,* sous tendues en partie par le CA3 de l'hippocampe. En effet, l'étude des cellules de lieu montre une augmentation du taux de décharge des cellules du CA3 chez les rats âgés (Wilson et al., 2005a) et que, lors de l'exposition à un environnement nouveau, les représentations spatiales des rats âgés ou lésés au niveau de la voie septo-hippocampique s'avèrent plus rigides que celles des rats jeunes et sains (Ikonen et al., 2002; Wilson et al., 2003; Wilson et al., 2005a; Wilson et al., 2005b). Selon les auteurs, plutôt que de former une représentation nouvelle de chaque environnement (*pattern separation*) les animaux âgés ou lésés « réactiveraient » la représentation d'un environnement connu. Les rats âgés utiliseraient donc préférentiellement la fonction de *pattern completion* (Gallagher et al., 2010), au détriment du *pattern separation*. Les données humaines s'accordent d'ailleurs avec les résultats obtenus chez le rat puisque les sujets âgés présentent également un déficit de la fonction de *pattern separation* (Toner et al., 2009; Yassa et al., 2010) en lien avec une hyper-activation du CA3 (Yassa et al., 2010). Par ailleurs, il a été montré que le système cholinergique contribuait à ce changement de stratégie (Sava et Markus, 2008). Ainsi, la sur-activation du CA3 observée chez nos souris lésées est-elle en accord avec l'hypothèse d'un changement de stratégie menant à une utilisation excessive du *pattern completion* (Gallagher et al., 2010). Cette analyse pourrait permettre d'expliquer que la lésion septo-hippocampique

cholinergique n'induise pas de déficit dans notre procédure comme dans beaucoup d'autres tâches hippocampo-dépendantes utilisées dans d'autres études.

En second lieu, cette hyper-activation du CA3 peut être rapprochée des études d'imagerie faites chez des patients MCI (Mild Cognitive Impairment). En effet, certaines études rapportent une hyper-activation de l'hippocampe durant l'encodage chez ces patients, et correspondrait à un signe préclinique du développement futur de la pathologie d'Alzheimer. (Dickerson et al., 2004; Sperling, 2007; Miller et al., 2008a; O'Brien et al., 2010). Le rôle de cette hyperactivation reste à être précisé. Elle pourrait cependant représenter un mécanisme compensatoire en réponse à une dégradation générale de la fonction hippocampique (Sperling, 2007). Nos résultats précisent ces observations, suggérant que cette hyperactivation hippocampique observée chez les patients MCI pourrait avoir pour origine un dysfonctionnement du système cholinergique, en particulier de la voie septo-hippocampique.

- ***Projections GABAergiques septo-hippocampiques, mémoire et vieillissement : une explication alternative***

Au cours de l'introduction générale, nous avons pu faire état de la controverse régnant quant à l'implication du système cholinergique dans la formation de la mémoire, ayant conduit à la reformulation de l'hypothèse cholinergique. Sans contredire la portée de nos résultats quant au rôle du système cholinergique dans la coordination des systèmes de mémoire, l'absence d'effets comportementaux direct des lésions cholinergiques sélectives, et en particulier concernant la mémoire déclarative, reste une question en suspend. De plus, l'action systémique du traitement procholinergique laisse sous-entendre l'intervention de mécanismes indirects participant à son effet promnésiant chez les individus âgés. Dans cette partie, nous évoquerons une explication alternative à cet effet, que nous transposerons à la perspective du vieillissement. Chaque point sera abordé successivement dans cet ordre.

→ *Implication de la voie septo-hippocampique dans la formation de la mémoire : une possible synergie des neurones GABAergiques et cholinergiques*

Le septum médian possède deux populations majoritaires de neurones, la première cholinergique et la seconde GABAergique. Jusqu'à présent, très peu d'études se sont intéressées au rôle de ces neurones GABAergiques dans les processus mnésiques et encore moins à leur possible altération au cours du vieillissement. De la même manière que pour le

système cholinergique, la lésion sélective des neurones GABAergiques septo-hippocampiques ne semble pas toujours provoquer de déficit mnésique. En effet, alors qu'une première étude ne rapporte aucun déficit chez des rats lésés soumis à une épreuve de mémoire spatiale à long terme en piscine de Morris (Pang et al., 2001), une seconde étude constate un déficit d'acquisition des animaux lésés dans cette même tâche (Smith et Pang, 2005). Ce dernier résultat trouve un appui dans la littérature, car la lésion iboténique, qui semble en grande partie épargner les neurones cholinergiques et affecter les neurones GABAergiques, provoque un déficit d'acquisition d'une tâche de discrimination spatiale en labyrinthe en croix (Cahill et Baxter, 2001).

D'un autre côté, il a été montré que la destruction commune des neurones cholinergiques et GABAergiques du septum médian entraînait un déficit d'acquisition et de restitution dans une épreuve de mémoire spatiale de référence en piscine de Morris (Pang et al., 2001 ; Smith et Pang, 2005). Il est à noter que les deux systèmes ont un effet activateur des cellules hippocampiques. L'acétylcholine active directement les neurones pyramidaux (Mesulam et al., 1983a), alors que les neurones GABAergiques septaux inhibent les interneurones hippocampiques, rendant les cellules pyramidales plus excitables (Freund et Antal, 1988). On peut ainsi penser que ces deux populations de neurones agissent en synergie sur l'hippocampe. Ainsi, les divergences de données s'expliqueraient-elles par la spécificité des lésions effectuées.

A la suite de cette considération, nous pouvons supposer que l'effet de la lésion cholinergique sur la mémoire relationnelle/déclarative pourrait être masqué par une compensation GABAergique. Cependant, il ne faut pas oublier que l'hippocampe reçoit de nombreuses autres afférences, noradrénergiques, sérotoninergiques, glutamatergiques, qui pourraient être impliquées dans ces mécanismes compensatoires.

→ *Altération de la voie GABAergique septo-hippocampique au cours du vieillissement*

Dans le premier chapitre de cette thèse, nous avons montré que le vieillissement s'accompagnait d'une diminution du nombre de neurones cholinergiques dans le septum médian. Il a été montré que le vieillissement s'accompagnait d'une réduction du nombre de neurones GABAergiques dans le septum médian (Madhusudan et al., 2009). Suite à ce constat et à la revue faite dans le paragraphe précédent, nous pouvons penser que la diminution conjointe du nombre de neurones cholinergiques et GABAergiques pourraient rendre compte des déficits mnésiques constatés, comme l'illustrent les lésions septales de ces deux types

cellulaires (Pang et al., 2001; Smith et Pang, 2005; Lecourtier et al., 2010). De plus, la restauration des performances observée chez nos souris âgées traitées au donépézil, pourrait également être la résultante de son action sur les neurones GABAergiques septo-hippocampiques. En effet, l'augmentation de la quantité d'acétylcholine suite au traitement entraînait une activation des neurones GABAergiques, via les récepteurs muscariniques de type 3 (Wu et al., 2003). Nous pouvons ainsi supposer que la normalisation de l'activité hippocampique et des performances en mémoire relationnelle/déclarative des animaux âgés que nous observons dans les deux versions de notre tâche comportemental (voir Chapitre 1 – Expérience 1 et Chapitre 2) pourrait provenir à la fois d'une restauration de la transmission cholinergique au niveau hippocampique et d'une augmentation de la transmission GABAergique qui, comme nous l'avons vu précédemment, activerait l'hippocampe.

3 – Pertinence des approches utilisées

Notre thèse visait à dépasser deux difficultés que sont la modélisation de la mémoire déclarative chez l'animal et le manque d'intégration des différents niveaux d'analyse du fonctionnement cérébral. Nous discuterons maintenant de la pertinence des approches comportementale et de neuroimagerie que nous avons choisies pour pallier ces difficultés.

- **Modélisation de la mémoire déclarative en labyrinthe radiaire**

Nous avons choisi une approche comportementale basée sur un cadre théorique qui unifie les concepts psychologiques de mémoire déclarative entre l'homme et l'animal, et définit la mémoire déclarative par ses propriétés élémentaires hors conscience et verbalisation (Cohen, 1984). Dans ce cadre, la propriété fondamentale de la mémoire déclarative est sa flexibilité d'expression illustrée notamment par la capacité d'utiliser des informations dans un contexte différent du contexte d'apprentissage. Nous avons utilisé une procédure en labyrinthe radiaire qui avait été précédemment établie au laboratoire et qui dissocie chez les mêmes souris âgées, une expression de la mémoire déclarative qui est altérée, et une forme non déclarative d'expression mnésique qui, elle, reste intacte (Marighetto et al., 1999; Marighetto et al., 2000; Touzani et al., 2003). Cette thèse a permis de poursuivre le développement de ce modèle.

Afin de valider définitivement notre modèle, des études sont en cours chez l'homme en l'adaptant en réalité virtuelle. Le test développé utilise une procédure comparable à la

première version développée dans cette thèse (Chapitre I – Expérience 1), à savoir une présentation des bras par paires lors de l'acquisition et une recombinaison des paires permettant de mesurer la flexibilité mnésique. Les résultats obtenus chez les sujets humains âgés mettent en lumière un déficit sélectif de flexibilité mnésique dans la phase de test (Etchamendy et al, en révision). Ce déficit est associé à un défaut d'activation hippocampique lors de l'encodage d'évènements temporellement discontigus, suggérant également un défaut de *binding* des informations (données non publiées). Les résultats obtenus jusqu'à présent sont donc d'une similarité frappante avec les observations faites chez la souris et attestent de la pertinence de notre modèle. Un des objectifs futurs de l'équipe est de poursuivre le développement de cette approche translationnelle « homme-souris » dans le but de réduire la rupture conceptuelle et méthodologique existant à ce jour entre les recherches menées chez l'homme et chez l'animal, et profiter à une meilleure compréhension du vieillissement mnésique.

- **Pertinence de la protéine Fos pour les études d'imagerie cérébrale**

Nous avons combiné l'approche comportementale visant à modéliser la mémoire déclarative à une approche d'imagerie fonctionnelle basée sur l'expression de la protéine Fos, qui est classiquement utilisée pour cartographier les différentes régions cérébrales sollicitées (Guzowski et al., 2001).

Dans cette perspective et d'un point de vue purement pratique, un des principaux avantages de l'utilisation de ce marqueur est qu'il présente un faible taux d'expression chez des animaux en conditions basales (éveillés ou au repos ; Kovacs, 1998; Ko et al., 2005). Il peut être rapidement induit par une large gamme de stimuli, et notamment dans différentes situations comportementales (Touzani et al., 2003; Mingaud et al., 2007; Porte et al., 2008a). En ce sens, nos données montrent qu'une tâche locomotrice peut induire l'expression de cette protéine, attestant de la sensibilité de son expression et justifiant la présence d'animaux contrôles locomoteurs dans nos différentes études plutôt que naïfs.

La réalisation de tâches cognitives peut induire l'activation de *c-fos* et ce de façon différentielle en fonction du système de mémoire sollicité. Par exemple, la protéine Fos est détectée dans l'hippocampe suite à un apprentissage spatial en piscine de Morris chez le rat, alors qu'un apprentissage indicé n'active pas cette protéine dans cette structure (Teather et al., 2005). Les résultats obtenus au cours de cette thèse s'ajoutent aux études antérieures pour

attester de la pertinence de l'expression de la protéine Fos dans l'étude des différents systèmes de mémoire.

Cependant l'utilisation de la protéine Fos comme marqueur d'activation neuronale présente des limites. En effet, nous devons être conscients que nos résultats n'auraient peut-être pas été exactement les mêmes si nous avions utilisé un autre marqueur neuronal comme la protéine CREB, qui est également classiquement utilisée dans un but similaire, et dont la dynamique d'activation semble refléter différentiellement les processus d'encodage et de consolidation de la mémoire (Porte et al., 2008b; Porte et al., 2008a). De la même manière, une étude récente révèle que la consolidation à long terme et le stockage de l'information dans un protocole d'évitement passif, hippocampo-dépendant, nécessitent deux vagues d'expression du gène *c-fos*. La première intervient une heure après l'apprentissage et permet la formation de la trace alors que la deuxième vague intervient 24 heures après l'apprentissage et est nécessaire à la persistance à long terme de la trace (Katche et al., 2010}. Alors, le délai de sacrifice de nos animaux choisi arbitrairement à 90 minutes et se situant dans le pic de production de Fos classiquement étudié (Guzowski et al., 2001) pourrait ne révéler qu'une seule face de la fonction de cette protéine dans les phénomènes mnésiques.

4 - Relativiser le déclin mnésique lié à l'âge

Au cours de l'introduction, nous avons pu voir qu'il existait chez l'homme une activité cérébrale basale, connue sous le nom de « *Default Mode Network* ». Les données de la littérature rapportent l'importance de la désactivation de ce réseau pour que l'encodage épisodique soit efficace (Miller et al., 2008b ; Vannini et al., 2010). Cette désactivation est bien présente chez les sujets jeunes, alors qu'un déficit d'encodage épisodique serait relié à un défaut de désactivation chez les sujets âgés (Miller et al., 2008b). Ce défaut semble être la résultante d'une perturbation générale de la connectivité cérébrale chez la personne âgée (Andrews-Hanna et al., 2007). Cependant, une hypothèse plus adaptative pourrait relativiser ces données. En effet, selon l'approche contextuelle du vieillissement (Hess, 2005), les chercheurs ont tendance à surestimer le déclin mnésique lié au vieillissement en négligeant certains facteurs sociaux pouvant affecter les performances. Une expérience d'Adams et al. (2002) illustre ce propos. Au cours de cette expérience, les sujets âgés doivent rappeler une histoire soit à un expérimentateur adulte, soit à un jeune enfant. Dans la seconde condition seulement, aucun déficit lié à l'âge n'est observé. Le déficit face à l'adulte proviendrait d'un effet « blouse blanche ». En effet, le fait de dire à la personne âgée que sa mémoire va être

évaluée le mène à penser qu'il est déficitaire. Ce type de comportement exacerberait un possible déficit. Au contraire, lorsqu'elle est face à un enfant, la personne âgée n'est pas soumise à ce biais, mais transmet de façon simple le fruit de son expérience.

L'expérience d'Adams soulève également une autre différence importante à prendre en compte entre les individus jeunes et âgés ; ceux-ci ne sont pas orientés vers les mêmes objectifs, les mêmes perspectives. Alors que les individus jeunes ont besoin d'acquérir des connaissances dans la perspective de produire des réponses adaptées lorsqu'ils seront exposés à des situations nouvelles, les individus âgés ont moins besoin d'accumuler de l'expérience, mais auraient pour « mission » de transmettre celle qu'ils ont acquise. Cette hypothèse semble trouver crédit auprès des données d'imagerie que nous avons mentionnées plus haut. En effet, ces observations suggèrent l'existence de deux modes d'activité cérébrale, un premier « d'attention orientée vers l'intérieur », correspondant à l'activité du « *Default Mode Network* » et un second « d'attention orientée vers l'environnement » lors duquel le *Default Mode Network* serait au contraire désactivé (Buckner et al., 2008; Vannini et al., 2010).

Ces idées peuvent être rapprochées de nos observations. En effet nos résultats montrent que la modélisation de la perte cholinergique liée au vieillissement entraine une suractivation du CA3, de façon similaire à ce qui a pu être observé chez l'homme (Yassa et al., 2010). La région CA3 étant impliquée dans le phénomène de *pattern completion*, nos résultats suggèrent que les individus âgés utilisent préférentiellement cette fonction au détriment du *pattern separation*. Cet argument est appuyé par de récentes données électrophysiologiques chez le rat (Gallagher et al., 2010), ainsi que des travaux d'imagerie chez l'homme (Toner et al., 2009; Yassa et al., 2010). Sur la base de nos résultats et des données de la littérature, nous pouvons émettre l'hypothèse que lors de l'exposition à une nouvelle situation, les individus âgés se reposeraient d'avantage sur leur expérience acquise en essayant de retrouver une situation déjà vécue auparavant, au lieu de construire une nouvelle représentation. Il en résulterait une expression rigide des souvenirs, comme l'illustre le déficit de flexibilité mnésique observé à maintes reprises chez nos souris âgées.

# Références Bibliographiques

# A

Abel T., Nguyen P.V., 2008. Regulation of hippocampus-dependent memory by cyclic AMP-dependent protein kinase. Prog Brain Res 169, 97-115.

Adams C., Smith M.C., Pasupathi M., Vitolo L., 2002. Social context effects on story recall in older and younger women: does the listener make a difference? J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci 57, P28-40.

Alonso A., Kohler C., 1982. Evidence for separate projections of hippocampal pyramidal and non-pyramidal neurons to different parts of the septum in the rat brain. Neurosci Lett 31, 209-214.

Alvernhe A., Van Cauter T., Save E., Poucet B., 2008. Different CA1 and CA3 representations of novel routes in a shortcut situation. J Neurosci 28, 7324-7333.

Amaral D.G., Witter M.P., 1995. The rat nervous system, 2nd ed., in: (Paxinos G, ed) Academic Press New York pp 443-493.

Andrews-Hanna J.R., Snyder A.Z., Vincent J.L., Lustig C., Head D., Raichle M.E., Buckner R.L., 2007. Disruption of large-scale brain systems in advanced aging. Neuron 56, 924-935.

Atkinson R.C., Shiffrin R.M., 1968. Human memory: a proposed system and its control processes, in: K. W. Spence, J. T. Spence Edition Psychology of Learning and Motivation: Advances in Research and Theory, Academic New York pp 89-195.

Axmacher N., Lenz S., Haupt S., Elger C.E., Fell J., 2010a. Electrophysiological signature of working and long-term memory interaction in the human hippocampus. Eur J Neurosci 31, 177-188.

Axmacher N., Henseler M.M., Jensen O., Weinreich I., Elger C.E., Fell J., 2010b. Cross-frequency coupling supports multi-item working memory in the human hippocampus. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 3228-3233.

# B

Babb S.J., Crystal J.D., 2006a. Discrimination of what, when, and where is not based on time of day. Learn Behav 34, 124-130.

Babb S.J., Crystal J.D., 2006b. Episodic-like memory in the rat. Curr Biol 16, 1317-1321.

Baddeley A., 1988. Cognitive psychology and human memory. Trends in Neurosciences 11, 176-181.

Baddeley A., 2000. The episodic buffer: a new component of working memory? Trends Cogn Sci 4, 417-423.

Baddeley A., Allen R., Vargha-Khadem F., 2010. Is the hippocampus necessary for visual and verbal binding in working memory? Neuropsychologia 48, 1089-1095.

Baddeley A., Logie R., Bressi S., Della Sala S., Spinnler H., 1986. Dementia and working memory. Q J Exp Psychol A 38, 603-618.

Baddeley A., Bueno O., Cahill L., Fuster J.M., Izquierdo I., McGaugh J.L., Morris R.G., Nadel L., Routtenberg A., Xavier G., Da Cunha C., 2000. The brain decade in debate: I. Neurobiology of learning and memory. Braz J Med Biol Res 33, 993-1002.

Baddeley A.D., Hitch G.J., 1974. Working memory, in: Bower, G.A. Edition The Psychology of Learning and Motivation, Academic Press pp 47-89.

Barnes C.A., 1979. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. J Comp Physiol Psychol 93, 74-104.

Barnes C.A., McNaughton B.L., 1985. An age comparison of the rates of acquisition and forgetting of spatial information in relation to long-term enhancement of hippocampal synapses. Behav Neurosci 99, 1040-1048.

Barnes C.A., Rao G., Shen J., 1997. Age-related decrease in the N-methyl-D-aspartateR-mediated excitatory postsynaptic potential in hippocampal region CA1. Neurobiol Aging 18, 445-452.

Bartus R.T., Johnson H.R., 1976. Short-term memory in the rhesus monkey: disruption from the anti-cholinergic scopolamine. Pharmacol Biochem Behav 5, 39-46.

Bartus R.T., Dean R.L., 3rd, Beer B., Lippa A.S., 1982. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. Science 217, 408-414.

Bartus R.T., Dean R.L., Pontecorvo M.J., Flicker C., 1985. The cholinergic hypothesis: a historical overview, current perspective, and future directions. Ann N Y Acad Sci 444, 332-358.

Baxter M.G., 2001. Effects of selective immunotoxic lesions on learning and memory. Methods Mol Biol 166, 249-265.

Baxter M.G., Gallagher M., 1996. Intact spatial learning in both young and aged rats following selective removal of hippocampal cholinergic input. Behav Neurosci 110, 460-467.

Baxter M.G., Bucci D.J., Gorman L.K., Wiley R.G., Gallagher M., 1995. Selective immunotoxic lesions of basal forebrain cholinergic cells: effects on learning and memory in rats. Behav Neurosci 109, 714-722.

Baxter M.G., Bucci D.J., Sobel T.J., Williams M.J., Gorman L.K., Gallagher M., 1996. Intact spatial learning following lesions of basal forebrain cholinergic neurons. Neuroreport 7, 1417-1420.

Bergerbest D., Gabrieli J.D., Whitfield-Gabrieli S., Kim H., Stebbins G.T., Bennett D.A., Fleischman D.A., 2009. Age-associated reduction of asymmetry in prefrontal function and preservation of conceptual repetition priming. Neuroimage 45, 237-246.

Berlingeri M., Bottini G., Basilico S., Silani G., Zanardi G., Sberna M., Colombo N., Sterzi R., Scialfa G., Paulesu E., 2008. Anatomy of the episodic buffer: a voxel-based morphometry study in patients with dementia. Behav Neurol 19, 29-34.

Billard J.M., Rouaud E., 2007. Deficit of NMDA receptor activation in CA1 hippocampal area of aged rats is rescued by D-cycloserine. Eur J Neurosci 25, 2260-2268.

Bird L.R., Roberts W.A., Abroms B., Kit K.A., Crupi C., 2003. Spatial memory for food hidden by rats (Rattus norvegicus) on the radial maze: studies of memory for where, what, and when. J Comp Psychol 117, 176-187.

Bizon J.L., Han J.S., Hudon C., Gallagher M., 2003. Effects of hippocampal cholinergic deafferentation on learning strategy selection in a visible platform version of the water maze. Hippocampus 13, 676-684.

Blin O., Audebert C., Pitel S., Kaladjian A., Casse-Perrot C., Zaim M., Micallef J., Tisne-Versailles J., Sokoloff P., Chopin P., Marien M., 2009. Effects of dimethylaminoethanol pyroglutamate (DMAE p-Glu) against memory deficits induced by scopolamine: evidence from preclinical and clinical studies. Psychopharmacology (Berl) 207, 201-212.

Bliss T.V., Lomo T., 1973. Long lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. J Physiol 232, 331-356.

Bodhinathan K., Kumar A., Foster T.C., 2010. Intracellular redox state alters NMDA receptor response during aging through Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II. J Neurosci 30, 1914-1924.

Bondareff W., Geinisman Y., 1976. Loss of synapses in the dentate gyrus of the senescent rat. Am J Anat 145, 129-136.

Boucard A., Marchand A., Nogues X., 2007. Reliability and validity of structural equation modeling applied to neuroimaging data: a simulation study. J Neurosci Methods 166, 278-292.

Boucard A., Mons N., Micheau J., Nogues X., 2009. Activating a memory system focuses connectivity toward its central structure. Behav Brain Res 204, 226-234.

Bowen D.M., Smith C.B., White P., Davison A.N., 1976. Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. Brain 99, 459-496.

Brauer K., Schober A., Wolff J.R., Winkelmann E., Luppa H., Luth H.J., Bottcher H., 1991. Morphology of neurons in the rat basal forebrain nuclei: comparison between NADPH-diaphorase histochemistry and immunohistochemistry of glutamic acid decarboxylase, choline acetyltransferase, somatostatin and parvalbumin. J Hirnforsch 32, 1-17.

Brightwell J.J., Gallagher M., Colombo P.J., 2004. Hippocampal CREB1 but not CREB2 is decreased in aged rats with spatial memory impairments. Neurobiol Learn Mem 81, 19-26.

Buckner R.L., Andrews-Hanna J.R., Schacter D.L., 2008. The brain's default network: anatomy, function, and relevance to disease. Ann N Y Acad Sci 1124, 1-38.

Burke S.N., Barnes C.A., 2006. Neural plasticity in the ageing brain. Nat Rev Neurosci 7, 30-40.

Butcher L.L., Bilezikjian L., 1975. Acetylcholinesterase-containing neurons in the neostriatum and substantia nigra revealed after punctate intracerebral injection of di-isopropylfluorophosphate. Eur J Pharmacol 34, 115-125.

Butcher L.L., Oh J.D., Woolf N.J., Edwards R.H., Roghani A., 1992. Organization of central cholinergic neurons revealed by combined in situ hybridization histochemistry and choline-O-acetyltransferase immunocytochemistry. Neurochem Int 21, 429-445.

Buzsaki G., 1989. Two-stage model of memory trace formation: a role for "noisy" brain states. Neuroscience 31, 551-570.

# C

Cabeza R., 2002. Hemispheric asymmetry reduction in older adults: the HAROLD model. Psychol Aging 17, 85-100.

Cahill J.F., Baxter M.G., 2001. Cholinergic and noncholinergic septal neurons modulate strategy selection in spatial learning. Eur J Neurosci 14, 1856-1864.

Campbell L.W., Hao S.Y., Thibault O., Blalock E.M., Landfield P.W., 1996. Aging changes in voltage-gated calcium currents in hippocampal CA1 neurons. J Neurosci 16, 6286-6295.

Castner S.A., Smagin G.N., Piser T.M., Wang Y., Smith J.S., Christian E.P., Mrzljak L., Williams G.V., 2010. Immediate and Sustained Improvements in Working Memory After Selective Stimulation of alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptors. Biol Psychiatry.

Chalfonte B.L., Johnson M.K., 1996. Feature memory and binding in young and older adults. Mem Cognit 24, 403-416.

Chang Q., Gold P.E., 2003. Switching memory systems during learning: changes in patterns of brain acetylcholine release in the hippocampus and striatum in rats. J Neurosci 23, 3001-3005.

Chang Q., Gold P.E., 2004. Impaired and spared cholinergic functions in the hippocampus after lesions of the medial septum/vertical limb of the diagonal band with 192 IgG-saporin. Hippocampus 14, 170-179.

Christensen H., Maltby N., Jorm A.F., Creasey H., Broe G.A., 1992. Cholinergic 'blockade' as a model of the cognitive deficits in Alzheimer's disease. Brain 115 ( Pt 6), 1681-1699.

Chung S.Y., Moriyama T., Uezu E., Uezu K., Hirata R., Yohena N., Masuda Y., Kokubu T., Yamamoto S., 1995. Administration of phosphatidylcholine increases brain acetylcholine concentration and improves memory in mice with dementia. J Nutr 125, 1484-1489.

Churchill J.D., Stanis J.J., Press C., Kushelev M., Greenough W.T., 2003. Is procedural memory relatively spared from age effects? Neurobiol Aging 24, 883-892.

Clayton N.S., Dickinson A., 1998. Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. Nature 395, 272-274.

Clayton N.S., Bussey T.J., Dickinson A., 2003. Can animals recall the past and plan for the future? Nat Rev Neurosci 4, 685-691.

Cohen E.L., Wurtman R.J., 1975. Brain acetylcholine: increase after systemic choline administration. Life Sci 16, 1095-1102.

Cohen N.J., 1984. Preserved learning capacity in amnesia: evidence for multiple memory systems., in: (Squire LR, Butters N, Eds) Neuropsychology of Memory, Guilford Press New York pp 83-103.

Collerton D., 1986. Cholinergic function and intellectual decline in Alzheimer's disease. Neuroscience 19, 1-28.

Costa-Mattioli M., 2008. Eppendorf winner. Switching memories ON and OFF. Science 322, 874-875.

Costa-Mattioli M., Gobert D., Stern E., Gamache K., Colina R., Cuello C., Sossin W., Kaufman R., Pelletier J., Rosenblum K., Krnjevic K., Lacaille J.C., Nader K., Sonenberg N., 2007. eIF2alpha phosphorylation bidirectionally regulates the switch from short- to long-term synaptic plasticity and memory. Cell 129, 195-206.

Costa-Mattioli M., Gobert D., Harding H., Herdy B., Azzi M., Bruno M., Bidinosti M., Ben Mamou C., Marcinkiewicz E., Yoshida M., Imataka H., Cuello A.C., Seidah N., Sossin W., Lacaille J.C., Ron D., Nader K., Sonenberg N., 2005. Translational control of hippocampal synaptic plasticity and memory by the eIF2alpha kinase GCN2. Nature 436, 1166-1173.

Cruz L., Roe D.L., Urbanc B., Cabral H., Stanley H.E., Rosene D.L., 2004. Age-related reduction in microcolumnar structure in area 46 of the rhesus monkey correlates with behavioral decline. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 15846-15851.

Curzon P., Anderson D.J., Nikkel A.L., Fox G.B., Gopalakrishnan M., Decker M.W., Bitner R.S., 2006. Antisense knockdown of the rat alpha7 nicotinic acetylcholine receptor produces spatial memory impairment. Neurosci Lett 410, 15-19.

# D

Das S.R., Magnusson K.R., 2008. Relationship between mRNA expression of splice forms of the zeta1 subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor and spatial memory in aged mice. Brain Res 1207, 142-154.

Daselaar S.M., Prince S.E., Cabeza R., 2004. When less means more: deactivations during encoding that predict subsequent memory. Neuroimage 23, 921-927.

Daselaar S.M., Fleck M.S., Dobbins I.G., Madden D.J., Cabeza R., 2006. Effects of healthy aging on hippocampal and rhinal memory functions: an event-related fMRI study. Cereb Cortex 16, 1771-1782.

Davis K.L., Mohs R.C., Tinklenberg J.R., Pfefferbaum A., Hollister L.E., Kopell B.S., 1978. Physostigmine: improvement of long-term memory processes in normal humans. Science 201, 272-274.

Davis S.W., Dennis N.A., Daselaar S.M., Fleck M.S., Cabeza R., 2008. Que PASA? The posterior-anterior shift in aging. Cereb Cortex 18, 1201-1209.

Decker M.W., Pelleymounter M.A., Gallagher M., 1988. Effects of training on a spatial memory task on high affinity choline uptake in hippocampus and cortex in young adult and aged rats. J Neurosci 8, 90-99.

DeKosky S.T., Harbaugh R.E., Schmitt F.A., Bakay R.A., Chui H.C., Knopman D.S., Reeder T.M., Shetter A.G., Senter H.J., Markesbery W.R., 1992. Cortical biopsy in Alzheimer's disease: diagnostic accuracy and neurochemical, neuropathological, and cognitive correlations. Intraventricular Bethanecol Study Group. Ann Neurol 32, 625-632.

Dennis N.A., Cabeza R., 2010. Age-related dedifferentiation of learning systems: an fMRI study of implicit and explicit learning. Neurobiol Aging.

Deutsch J.A., 1971. The cholinergic synapse and the site of memory. Science 174, 788-794.

Dickerson B.C., 2006. Functional magnetic resonance imaging of cholinergic modulation in mild cognitive impairment. Curr Opin Psychiatry 19, 299-306.

Dickerson B.C., Salat D.H., Bates J.F., Atiya M., Killiany R.J., Greve D.N., Dale A.M., Stern C.E., Blacker D., Albert M.S., Sperling R.A., 2004. Medial temporal lobe function and structure in mild cognitive impairment. Ann Neurol 56, 27-35.

Disterhoft J.F., Oh M.M., 2007. Alterations in intrinsic neuronal excitability during normal aging. Aging Cell 6, 327-336.

Dougherty K.D., Milner T.A., 1999. Cholinergic septal afferent terminals preferentially contact neuropeptide Y-containing interneurons compared to parvalbumin-containing interneurons in the rat dentate gyrus. J Neurosci 19, 10140-10152.

Drachman D.A., Leavitt J., 1974. Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging? Arch Neurol 30, 113-121.

Drachman D.A., Noffsinger D., Sahakian B.J., Kurdziel S., Fleming P., 1980. Aging, memory, and the cholinergic system: a study of dichotic listening. Neurobiol Aging 1, 39-43.

Duan H., Wearne S.L., Rocher A.B., Macedo A., Morrison J.H., Hof P.R., 2003. Age-related dendritic and spine changes in corticocortically projecting neurons in macaque monkeys. Cereb Cortex 13, 950-961.

Dunnett S.B., Fibiger H.C., 1993. Role of forebrain cholinergic systems in learning and memory: relevance to the cognitive deficits of aging and Alzheimer's dementia. Prog Brain Res 98, 413-420.

# E

Eglen R.M., Choppin A., Watson N., 2001. Therapeutic opportunities from muscarinic receptor research. Trends Pharmacol Sci 22, 409-414.

Eichenbaum H., 1999. The hippocampus and mechanisms of declarative memory. Behav Brain Res 103, 123-133.

Eichenbaum H., 2004. Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. Neuron 44, 109-120.

Eichenbaum H., Mathews P., Cohen N.J., 1989. Further studies of hippocampal representation during odor discrimination learning. Behav Neurosci 103, 1207-1216.

Eichenbaum H., Stewart C., Morris R.G., 1990. Hippocampal representation in place learning. J Neurosci 10, 3531-3542.

Eichenbaum H., Otto T., Cohen N.J., 1992. The hippocampus--what does it do? Behav Neural Biol 57, 2-36.

Eichenbaum H., Fagan A., Mathews P., Cohen N.J., 1988. Hippocampal system dysfunction and odor discrimination learning in rats: impairment or facilitation depending on representational demands. Behav Neurosci 102, 331-339.

Etchamendy N., Desmedt A., Cortes-Torrea C., Marighetto A., Jaffard R., 2003. Hippocampal lesions and discrimination performance of mice in the radial maze: sparing or impairment depending on the representational demands of the task. Hippocampus 13, 197-211.

Etchamendy N., Enderlin V., Marighetto A., Vouimba R.M., Pallet V., Jaffard R., Higueret P., 2001. Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling. J Neurosci 21, 6423-6429.

Etchamendy N., Konishi K., Pike B.G., Marighetto A., Bohbot V., en revision. Evidence for a virtual human analog of a rodent relational task: a study of aging and fMRI in young adults. Hippocampus.

Eustache F., Desgranges B., 2008. MNESIS: towards the integration of current multisystem models of memory. Neuropsychol Rev 18, 53-69.

Everitt B.J., Robbins T.W., 1997. Central cholinergic systems and cognition. Annu Rev Psychol 48, 649-684.

# F

Fadda F., Cocco S., Stancampiano R., 2000. Hippocampal acetylcholine release correlates with spatial learning performance in freely moving rats. Neuroreport 11, 2265-2269.

Fellini L., Florian C., Courtey J., Roullet P., 2009. Pharmacological intervention of hippocampal CA3 NMDA receptors impairs acquisition and long-term memory retrieval of spatial pattern completion task. Learn Mem 16, 387-394.

Fibiger H.C., 1990. Central cholinergic systems and memory, in: Stuttgart Edition (Squire LR, Lindenlaub E, Eds) The Biology of Memory, New York pp 381-394.

Fleischmann A., Hvalby O., Jensen V., Strekalova T., Zacher C., Layer L.E., Kvello A., Reschke M., Spanagel R., Sprengel R., Wagner E.F., Gass P., 2003. Impaired long-term memory and NR2A-type NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in mice lacking c-Fos in the CNS. J Neurosci 23, 9116-9122.

Foster T.C., 1999. Involvement of hippocampal synaptic plasticity in age-related memory decline. Brain Res Brain Res Rev 30, 236-249.

Foster T.C., Norris C.M., 1997. Age-associated changes in Ca(2+)-dependent processes: relation to hippocampal synaptic plasticity. Hippocampus 7, 602-612.

Freo U., Pizzolato G., Dam M., Ori C., Battistin L., 2002. A short review of cognitive and functional neuroimaging studies of cholinergic drugs: implications for therapeutic potentials. J Neural Transm 109, 857-870.

Freo U., Ricciardi E., Pietrini P., Schapiro M.B., Rapoport S.I., Furey M.L., 2005. Pharmacological modulation of prefrontal cortical activity during a working memory task in young and older humans: a PET study with physostigmine. Am J Psychiatry 162, 2061-2070.

Freund T.F., Antal M., 1988. GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. Nature 336, 170-173.

Friedman D., Nessler D., Johnson R., Jr., 2007. Memory encoding and retrieval in the aging brain. Clin EEG Neurosci 38, 2-7.

Frotscher M., 1989. Central cholinergic synapses: the septohippocampal system as a model. Exs 57, 33-41.

Furey M.L., Pietrini P., Haxby J.V., Alexander G.E., Lee H.C., VanMeter J., Grady C.L., Shetty U., Rapoport S.I., Schapiro M.B., Freo U., 1997. Cholinergic stimulation alters performance and task-specific regional cerebral blood flow during working memory. Proc Natl Acad Sci U S A 94, 6512-6516.

# G

Gabrieli J.D., Corkin S., Mickel S.F., Growdon J.H., 1993. Intact acquisition and long-term retention of mirror-tracing skill in Alzheimer's disease and in global amnesia. Behav Neurosci 107, 899-910.

Gais S., Born J., 2004. Low acetylcholine during slow-wave sleep is critical for declarative memory consolidation. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 2140-2144.

Gallagher M., Rapp P.R., 1997. The use of animal models to study the effects of aging on cognition. Annu Rev Psychol 48, 339-370.

Gallagher M., Bakker A., Yassa M.A., Stark C.E., 2010. Bridging neurocognitive aging and disease modification: targeting functional mechanisms of memory impairment. Curr Alzheimer Res 7, 197-199.

Geinisman Y., de Toledo-Morrell L., Morrell F., 1986. Loss of perforated synapses in the dentate gyrus: morphological substrate of memory deficit in aged rats. Proc Natl Acad Sci U S A 83, 3027-3031.

Geinisman Y., Detoledo-Morrell L., Morrell F., Heller R.E., 1995. Hippocampal markers of age-related memory dysfunction: behavioral, electrophysiological and morphological perspectives. Prog Neurobiol 45, 223-252.

Geraci L., Barnhardt T.M., 2010. Aging and implicit memory: examining the contribution of test awareness. Conscious Cogn 19, 606-616.

Gill S.K., Ishak M., Dobransky T., Haroutunian V., Davis K.L., Rylett R.J., 2007. 82-kDa choline acetyltransferase is in nuclei of cholinergic neurons in human CNS and altered in aging and Alzheimer disease. Neurobiol Aging 28, 1028-1040.

Goekoop R., Scheltens P., Barkhof F., Rombouts S.A., 2006. Cholinergic challenge in Alzheimer patients and mild cognitive impairment differentially affects hippocampal activation--a pharmacological fMRI study. Brain 129, 141-157.

Gold P.E., 2003. Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. Neurobiol Learn Mem 80, 194-210.

Gold P.E., 2004. Coordination of multiple memory systems. Neurobiol Learn Mem 82, 230-242.

Gotti C., Zoli M., Clementi F., 2006. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. Trends Pharmacol Sci 27, 482-491.

Grady C.L., 2000. Functional brain imaging and age-related changes in cognition. Biol Psychol 54, 259-281.

Grady C.L., 2008. Cognitive neuroscience of aging. Ann N Y Acad Sci 1124, 127-144.

Grady C.L., Craik F.I., 2000. Changes in memory processing with age. Curr Opin Neurobiol 10, 224-231.

Grady C.L., Bernstein L.J., Beig S., Siegenthaler A.L., 2002. The effects of encoding task on age-related differences in the functional neuroanatomy of face memory. Psychol Aging 17, 7-23.

Grady C.L., Maisog J.M., Horwitz B., Ungerleider L.G., Mentis M.J., Salerno J.A., Pietrini P., Wagner E., Haxby J.V., 1994. Age-related changes in cortical blood flow activation during visual processing of faces and location. J Neurosci 14, 1450-1462.

Grady C.L., McIntosh A.R., Horwitz B., Maisog J.M., Ungerleider L.G., Mentis M.J., Pietrini P., Schapiro M.B., Haxby J.V., 1995. Age-related reductions in human recognition memory due to impaired encoding. Science 269, 218-221.

Griffiths D., Dickinson A., Clayton N., 1999. Episodic memory: what can animals remember about their past? Trends Cogn Sci 3, 74-80.

Gulyas A.I., Seress L., Toth K., Acsady L., Antal M., Freund T.F., 1991. Septal GABAergic neurons innervate inhibitory interneurons in the hippocampus of the macaque monkey. Neuroscience 41, 381-390.

Guzowski J.F., Setlow B., Wagner E.K., McGaugh J.L., 2001. Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268. J Neurosci 21, 5089-5098.

# H

Hales J.B., Brewer J.B., 2010. Activity in the hippocampus and neocortical working memory regions predicts successful associative memory for temporally discontiguous events. Neuropsychologia 48, 3351-3359.

Hannula D.E., Ranganath C., 2008. Medial temporal lobe activity predicts successful relational memory binding. J Neurosci 28, 116-124.

Hannula D.E., Tranel D., Cohen N.J., 2006. The long and the short of it: relational memory impairments in amnesia, even at short lags. J Neurosci 26, 8352-8359.

Hasselmo M.E., 2006. The role of acetylcholine in learning and memory. Curr Opin Neurobiol 16, 710-715.

Hasselmo M.E., Bower J.M., 1993. Acetylcholine and memory. Trends Neurosci 16, 218-222.

Hasselmo M.E., Schnell E., Barkai E., 1995. Dynamics of learning and recall at excitatory recurrent synapses and cholinergic modulation in rat hippocampal region CA3. J Neurosci 15, 5249-5262.

Hedden T., Gabrieli J.D., 2004. Insights into the ageing mind: a view from cognitive neuroscience. Nat Rev Neurosci 5, 87-96.

Henke K., 2010. A model for memory systems based on processing modes rather than consciousness. Nat Rev Neurosci 11, 523-532.

Hess T.M., 2005. Memory and aging in context. Psychol Bull 131, 383-406.

Hirsch M.J., Wurtman R.J., 1978. Lecithin consumption increases acetylcholine concentrations in rat brain and adrenal gland. Science 202, 223-225.

Ho N.F., Han S.P., Dawe G.S., 2009. Effect of voluntary running on adult hippocampal neurogenesis in cholinergic lesioned mice. BMC Neurosci 10, 57.

Hodges H., Allen Y., Sinden J., Lantos P.L., Gray J.A., 1991. Effects of cholinergic-rich neural grafts on radial maze performance of rats after excitotoxic lesions of the forebrain cholinergic projection system--II. Cholinergic drugs as probes to investigate lesion-induced deficits and transplant-induced functional recovery. Neuroscience 45, 609-623.

# I

Ibach B., Haen E., 2004. Acetylcholinesterase inhibition in Alzheimer's Disease. Curr Pharm Des 10, 231-251.

Ikonen S., McMahan R., Gallagher M., Eichenbaum H., Tanila H., 2002. Cholinergic system regulation of spatial representation by the hippocampus. Hippocampus 12, 386-397.

# J

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

Jeneson A., Mauldin K.N., Squire L.R., 2010. Intact working memory for relational information after medial temporal lobe damage. J Neurosci 30, 13624-13629.

Jonasson Z., Cahill J.F., Tobey R.E., Baxter M.G., 2004. Sexually dimorphic effects of hippocampal cholinergic deafferentation in rats. Eur J Neurosci 20, 3041-3053.

# K

Katche C., Bekinschtein P., Slipczuk L., Goldin A., Izquierdo I.A., Cammarota M., Medina J.H., 2010. Delayed wave of c-Fos expression in the dorsal hippocampus involved specifically in persistence of long-term memory storage. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 349-354.

Kennedy K.M., Rodrigue K.M., Raz N., 2007. Fragmented pictures revisited: long-term changes in repetition priming, relation to skill learning, and the role of cognitive resources. Gerontology 53, 148-158.

Kesner R.P., Gilbert P.E., Wallenstein G.V., 2000. Testing neural network models of memory with behavioral experiments. Curr Opin Neurobiol 10, 260-265.

Knuttinen M.G., Gamelli A.E., Weiss C., Power J.M., Disterhoft J.F., 2001. Age-related effects on eyeblink conditioning in the F344 x BN F1 hybrid rat. Neurobiol Aging 22, 1-8.

Ko S.W., Chatila T., Zhuo M., 2005. Contribution of CaMKIV to injury and fear- induced ultrasonic vocalizations in adult mice. Mol Pain 1, 10.

Kovacs K.J., 1998. c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. Neurochem Int 33, 287-297.

# L

Landfield P.W., Lynch G., 1977. Impaired monosynaptic potentiation in in vitro hippocampal slices from aged, memory-deficient rats. J Gerontol 32, 523-533.

Lecourtier L., de Vasconcelos A.P., Leroux E., Cosquer B., Geiger K., Lithfous S., Cassel J.C., 2010. Septohippocampal pathways contribute to system consolidation of a spatial memory: Sequential implication of gabaergic and cholinergic neurons. Hippocampus.

Leigland L.A., Schulz L.E., Janowsky J.S., 2004. Age related changes in emotional memory. Neurobiol Aging 25, 1117-1124.

Leutgeb J.K., Leutgeb S., Moser M.B., Moser E.I., 2007. Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. Science 315, 961-966.

Levy W.B., 1996. A sequence predicting CA3 is a flexible associator that learns and uses context to solve hippocampal-like tasks. Hippocampus 6, 579-590.

Lindner M.D., Hogan J.B., Hodges D.B., Jr., Orie A.F., Chen P., Corsa J.A., Leet J.E., Gillman K.W., Rose G.M., Jones K.M., Gribkoff V.K., 2006. Donepezil primarily attenuates scopolamine-induced deficits in psychomotor function, with moderate effects on simple conditioning and attention, and small effects on working memory and spatial mapping. Psychopharmacology (Berl) 188, 629-640.

Luck D., Danion J.M., Marrer C., Pham B.T., Gounot D., Foucher J., 2010a. The right parahippocampal gyrus contributes to the formation and maintenance of bound information in working memory. Brain Cogn 72, 255-263.

Luck D., Danion J.M., Marrer C., Pham B.T., Gounot D., Foucher J., 2010b. Abnormal medial temporal activity for bound information during working memory maintenance in patients with schizophrenia. Hippocampus 20, 936-948.

Lynch G., Rex C.S., Gall C.M., 2007. LTP consolidation: substrates, explanatory power, and functional significance. Neuropharmacology 52, 12-23.

# M

Madhusudan A., Sidler C., Knuesel I., 2009. Accumulation of reelin-positive plaques is accompanied by a decline in basal forebrain projection neurons during normal aging. Eur J Neurosci 30, 1064-1076.

Magnusson K.R., Bai L., Zhao X., 2005. The effects of aging on different C-terminal splice forms of the zeta1(NR1) subunit of the N-methyl-d-aspartate receptor in mice. Brain Res Mol Brain Res 135, 141-149.

Magnusson K.R., Kresge D., Supon J., 2006. Differential effects of aging on NMDA receptors in the intermediate versus the dorsal hippocampus. Neurobiol Aging 27, 324-333.

Maguire E.A., Frith C.D., 2003. Lateral asymmetry in the hippocampal response to the remoteness of autobiographical memories. J Neurosci 23, 5302-5307.

Malleret G., Alarcon J.M., Martel G., Takizawa S., Vronskaya S., Yin D., Chen I.Z., Kandel E.R., Shumyatsky G.P., 2010. Bidirectional regulation of hippocampal long-term synaptic plasticity and its influence on opposing forms of memory. J Neurosci 30, 3813-3825.

Malleret G., Haditsch U., Genoux D., Jones M.W., Bliss T.V., Vanhoose A.M., Weitlauf C., Kandel E.R., Winder D.G., Mansuy I.M., 2001. Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin. Cell 104, 675-686.

Manenti R., Cotelli M., Miniussi C., 2010. Successful physiological aging and episodic memory: A brain stimulation study. Behav Brain Res.

Mansuy I.M., Mayford M., Jacob B., Kandel E.R., Bach M.E., 1998. Restricted and regulated overexpression reveals calcineurin as a key component in the transition from short-term to long-term memory. Cell 92, 39-49.

Marighetto A., 1991 Modifications de l'activité de neuones cholinergiques septo-hippocampiques induites par les activités mnésiques chez la souris : signification fonctionnelle et identification des mécanismes de contrôle septal. In: UFR Sciences de la Vie. Bordeaux: Université de Bordeaux 1.

Marighetto A., Micheau J., Jaffard R., 1993. Relationships between testing-induced alterations of hippocampal cholinergic activity and memory performance on two spatial tasks in mice. Behav Brain Res 56, 133-144.

Marighetto A., Valerio S., Desmedt A., Philippin J.N., Trocme-Thibierge C., Morain P., 2008a. Comparative effects of the alpha7 nicotinic partial agonist, S 24795, and the cholinesterase inhibitor, donepezil, against aging-related deficits in declarative and working memory in mice. Psychopharmacology (Berl) 197, 499-508.

Marighetto A., Etchamendy N., Touzani K., Torrea C.C., Yee B.K., Rawlins J.N., Jaffard R., 1999. Knowing which and knowing what: a potential mouse model for age-related human declarative memory decline. Eur J Neurosci 11, 3312-3322.

Marighetto A., Valerio S., Jaffard R., Mormede C., Munoz C., Bernard K., Morain P., 2008b. The AMPA modulator S 18986 improves declarative and working memory performances in aged mice. Behav Pharmacol 19, 235-244.

Marighetto A., Touzani K., Etchamendy N., Torrea C.C., De Nanteuil G., Guez D., Jaffard R., Morain P., 2000. Further evidence for a dissociation between different forms of mnemonic expressions in a mouse model of age-related cognitive decline: effects of tacrine and S 17092, a novel prolyl endopeptidase inhibitor. Learn Mem 7, 159-169.

Massicotte G., Baudry M., 1991. Triggers and substrates of hippocampal synaptic plasticity. Neurosci Biobehav Rev 15, 415-423.

Mather M., Carstensen L.L., 2003. Aging and attentional biases for emotional faces. Psychol Sci 14, 409-415.

May C.P., Hasher L., Kane M.J., 1999. The role of interference in memory span. Mem Cognit 27, 759-767.

Mazoyer B., Zago L., Mellet E., Bricogne S., Etard O., Houde O., Crivello F., Joliot M., Petit L., Tzourio-Mazoyer N., 2001. Cortical networks for working memory and executive functions sustain the conscious resting state in man. Brain Res Bull 54, 287-298.

McEchron M.D., Disterhoft J.F., 1999. Hippocampal encoding of non-spatial trace conditioning. Hippocampus 9, 385-396.

McIntyre C.K., Marriott L.K., Gold P.E., 2003. Cooperation between memory systems: acetylcholine release in the amygdala correlates positively with performance on a hippocampus-dependent task. Behav Neurosci 117, 320-326.

McNab F., Klingberg T., 2008. Prefrontal cortex and basal ganglia control access to working memory. Nat Neurosci 11, 103-107.

Mesulam M.M., Mufson E.J., Wainer B.H., Levey A.I., 1983a. Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). Neuroscience 10, 1185-1201.

Mesulam M.M., Mufson E.J., Levey A.I., Wainer B.H., 1983b. Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey. J Comp Neurol 214, 170-197.

Micheau J., Riedel G., Roloff E.L., Inglis J., Morris R.G., 2004. Reversible hippocampal inactivation partially dissociates how and where to search in the water maze. Behav Neurosci 118, 1022-1032.

Miller S.L., Fenstermacher E., Bates J., Blacker D., Sperling R.A., Dickerson B.C., 2008a. Hippocampal activation in adults with mild cognitive impairment predicts subsequent cognitive decline. J Neurol Neurosurg Psychiatry 79, 630-635.

Miller S.L., Celone K., DePeau K., Diamond E., Dickerson B.C., Rentz D., Pihlajamaki M., Sperling R.A., 2008b. Age-related memory impairment associated with loss of parietal deactivation but preserved hippocampal activation. Proc Natl Acad Sci U S A 105, 2181-2186.

Milner T.A., Amaral D.G., 1984. Evidence for a ventral septal projection to the hippocampal formation of the rat. Exp Brain Res 55, 579-585.

Mingaud F., Le Moine C., Etchamendy N., Mormede C., Jaffard R., Marighetto A., 2007. The hippocampus plays a critical role at encoding discontiguous events for subsequent declarative memory expression in mice. Hippocampus 17, 264-270.

Mingaud F., Mormede C., Etchamendy N., Mons N., Niedergang B., Wietrzych M., Pallet V., Jaffard R., Krezel W., Higueret P., Marighetto A., 2008. Retinoid hyposignaling contributes to aging-related decline in hippocampal function in short-term/working memory organization and long-term declarative memory encoding in mice. J Neurosci 28, 279-291.

Misane I., Tovote P., Meyer M., Spiess J., Ogren S.O., Stiedl O., 2005. Time-dependent involvement of the dorsal hippocampus in trace fear conditioning in mice. Hippocampus 15, 418-426.

Mitchell K.J., Johnson M.K., Raye C.L., D'Esposito M., 2000a. fMRI evidence of age-related hippocampal dysfunction in feature binding in working memory. Brain Res Cogn Brain Res 10, 197-206.

Mitchell K.J., Johnson M.K., Raye C.L., Mather M., D'Esposito M., 2000b. Aging and reflective processes of working memory: binding and test load deficits. Psychol Aging 15, 527-541.

Mons N., Segu L., Nogues X., Buhot M.C., 2004. Effects of age and spatial learning on adenylyl cyclase mRNA expression in the mouse hippocampus. Neurobiology of Aging 25, 1095-1106.

Monti B., Berteotti C., Contestabile A., 2005. Dysregulation of memory-related proteins in the hippocampus of aged rats and their relation with cognitive impairment. Hippocampus 15, 1041-1049.

Morris R.G., 2001. Episodic-like memory in animals: psychological criteria, neural mechanisms and the value of episodic-like tasks to investigate animal models of neurodegenerative disease. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 356, 1453-1465.

Morris R.G., Garrud P., Rawlins J.N., O'Keefe J., 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. Nature 297, 681-683.

Moser M.B., Trommald M., Andersen P., 1994. An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. Proc Natl Acad Sci U S A 91, 12673-12675.

Mouravlev A., Dunning J., Young D., During M.J., 2006. Somatic gene transfer of cAMP response element-binding protein attenuates memory impairment in aging rats. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 4705-4710.

Moyer J.R., Jr., Thompson L.T., Black J.P., Disterhoft J.F., 1992. Nimodipine increases excitability of rabbit CA1 pyramidal neurons in an age- and concentration-dependent manner. J Neurophysiol 68, 2100-2109.

Muller R.U., Kubie J.L., Saypoff R., 1991. The hippocampus as a cognitive graph (abridged version). Hippocampus 1, 243-246.

# N

Nagai T., McGeer P.L., Peng J.H., McGeer E.G., Dolman C.E., 1983. Choline acetyltransferase immunohistochemistry in brains of Alzheimer's disease patients and controls. Neurosci Lett 36, 195-199.

Nakamura S., Akiguchi I., Kameyama M., Mizuno N., 1985. Age-related changes of pyramidal cell basal dendrites in layers III and V of human motor cortex: a quantitative Golgi study. Acta Neuropathol 65, 281-284.

Naqshbandi M., Feeney M.C., McKenzie T.L., Roberts W.A., 2007. Testing for episodic-like memory in rats in the absence of time of day cues: replication of Babb and Crystal. Behav Processes 74, 217-225.

Naveh-Benjamin M., 2000. Adult age differences in memory performance: tests of an associative deficit hypothesis. J Exp Psychol Learn Mem Cogn 26, 1170-1187.

Norris C.M., Korol D.L., Foster T.C., 1996. Increased susceptibility to induction of long-term depression and long-term potentiation reversal during aging. J Neurosci 16, 5382-5392.

Nyberg L., Backman L., Erngrund K., Olofsson U., Nilsson L.G., 1996. Age differences in episodic memory, semantic memory, and priming: relationships to demographic, intellectual, and biological factors. J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci 51, P234-240.

# O

O'Brien J.L., O'Keefe K.M., LaViolette P.S., DeLuca A.N., Blacker D., Dickerson B.C., Sperling R.A., 2010. Longitudinal fMRI in elderly reveals loss of hippocampal activation with clinical decline. Neurology 74, 1969-1976.

O'Keefe J., Dostrovsky J., 1971. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. Brain Res 34, 171-175.

O'Keefe J., Nadel L., 1978. The hippocampus as a cognitive map.: Oxford University Press.

# P

Packard M.G., McGaugh J.L., 1992. Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: further evidence for multiple memory systems. Behav Neurosci 106, 439-446.

Pang K.C., Nocera R., Secor A.J., Yoder R.M., 2001. GABAergic septohippocampal neurons are not necessary for spatial memory. Hippocampus 11, 814-827.

Parent M.B., Baxter M.G., 2004. Septohippocampal acetylcholine: involved in but not necessary for learning and memory? Learn Mem 11, 9-20.

Pepeu G., Giovannini M.G., 2009. Cholinesterase inhibitors and beyond. Curr Alzheimer Res 6, 86-96.

Pepeu G., Giovannini M.G., 2010. Cholinesterase inhibitors and memory. Chem Biol Interact 187, 403-408.

Perry E.K., Tomlinson B.E., Blessed G., Bergmann K., Gibson P.H., Perry R.H., 1978. Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. Br Med J 2, 1457-1459.

Peters M., Bletsch M., Catapano R., Zhang X., Tully T., Bourtchouladze R., 2009. RNA interference in hippocampus demonstrates opposing roles for CREB and PP1alpha in contextual and temporal long-term memory. Genes Brain Behav 8, 320-329.

Piolino P., Desgranges B., Benali K., Eustache F., 2002. Episodic and semantic remote autobiographical memory in ageing. Memory 10, 239-257.

Piolino P., Coste C., Martinelli P., Mace A.L., Quinette P., Guillery-Girard B., Belleville S., 2010. Reduced specificity of autobiographical memory and aging: do the executive

and feature binding functions of working memory have a role? Neuropsychologia 48, 429-440.

Pittenger C., Huang Y.Y., Paletzki R.F., Bourtchouladze R., Scanlin H., Vronskaya S., Kandel E.R., 2002. Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus-dependent spatial memory. Neuron 34, 447-462.

Plakke B., Ng C.W., Poremba A., 2008. Scopolamine impairs auditory delayed matching-to-sample performance in monkeys. Neurosci Lett 438, 126-130.

Poldrack R.A., Packard M.G., 2003. Competition among multiple memory systems: converging evidence from animal and human brain studies. Neuropsychologia 41, 245-251.

Porte Y., Buhot M.-C., Mons N., 2008a. Alteration of CREB phosphorylation and spatial memory deficits in aged 129T2/Sv mice. Neurobiology of Aging 29, 1533-1546.

Porte Y., Buhot M.C., Mons N.E., 2008b. Spatial memory in the Morris water maze and activation of cyclic AMP response element-binding (CREB) protein within the mouse hippocampus. Learn Mem 15, 885-894.

Prabhakaran V., Narayanan K., Zhao Z., Gabrieli J.D., 2000. Integration of diverse information in working memory within the frontal lobe. Nat Neurosci 3, 85-90.

# Q

Quinette P., Guillery-Girard B., Noel A., de la Sayette V., Viader F., Desgranges B., Eustache F., 2006. The relationship between working memory and episodic memory disorders in transient global amnesia. Neuropsychologia 44, 2508-2519.

# R

Raaijmakers W.G.M., 1982. High affinity choline uptake in hippocampal synaptosomes and learning in the rat., in: (Ajmone-Marsan C, Matthies H, Eds) Neuronal plasticity and memory formation., New York pp 373-385.

Ranganath C., 2010. A unified framework for the functional organization of the medial temporal lobes and the phenomenology of episodic memory. Hippocampus 20, 1263-1290.

Repovs G., Baddeley A., 2006. The multi-component model of working memory: explorations in experimental cognitive psychology. Neuroscience 139, 5-21.

Reuter-Lorenz P.A., Jonides J., Smith E.E., Hartley A., Miller A., Marshuetz C., Koeppe R.A., 2000. Age differences in the frontal lateralization of verbal and spatial working memory revealed by PET. J Cogn Neurosci 12, 174-187.

Ricciardi E., Pietrini P., Schapiro M.B., Rapoport S.I., Furey M.L., 2009. Cholinergic modulation of visual working memory during aging: a parametric PET study. Brain Res Bull 79, 322-332.

Roberson E.D., English J.D., Adams J.P., Selcher J.C., Kondratick C., Sweatt J.D., 1999. The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus. J Neurosci 19, 4337-4348.

Roberts W.A., 2002. Are animals stuck in time? Psychol Bull 128, 473-489.

Rolls E.T., Kesner R.P., 2006. A computational theory of hippocampal function, and empirical tests of the theory. Prog Neurobiol 79, 1-48.

Rombouts S.A., Barkhof F., Van Meel C.S., Scheltens P., 2002. Alterations in brain activation during cholinergic enhancement with rivastigmine in Alzheimer's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry 73, 665-671.

Rondi-Reig L., Petit G.H., Tobin C., Tonegawa S., Mariani J., Berthoz A., 2006. Impaired sequential egocentric and allocentric memories in forebrain-specific-NMDA receptor knock-out mice during a new task dissociating strategies of navigation. J Neurosci 26, 4071-4081.

Rosenbaum R.S., Kohler S., Schacter D.L., Moscovitch M., Westmacott R., Black S.E., Gao F., Tulving E., 2005. The case of K.C.: contributions of a memory-impaired person to memory theory. Neuropsychologia 43, 989-1021.

Rosenzweig E.S., Barnes C.A., 2003. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. Prog Neurobiol 69, 143-179.

Rye D.B., Wainer B.H., Mesulam M.M., Mufson E.J., Saper C.B., 1984. Cortical projections arising from the basal forebrain: a study of cholinergic and noncholinergic components employing combined retrograde tracing and immunohistochemical localization of choline acetyltransferase. Neuroscience 13, 627-643.

# S

Sakimura K., Kutsuwada T., Ito I., Manabe T., Takayama C., Kushiya E., Yagi T., Aizawa S., Inoue Y., Sugiyama H., et al., 1995. Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. Nature 373, 151-155.

Salthouse T.A., 1996. The processing-speed theory of adult age differences in cognition. Psychol Rev 103, 403-428.

Sava S., Markus E.J., 2008. Activation of the medial septum reverses age-related hippocampal encoding deficits: a place field analysis. J Neurosci 28, 1841-1853.

Savage U.C., Faust W.B., Lambert P., Moerschbaecher J.M., 1996. Effects of scopolamine on learning and memory in monkeys. Psychopharmacology (Berl) 123, 9-14.

Saxe M.D., Malleret G., Vronskaya S., Mendez I., Garcia A.D., Sofroniew M.V., Kandel E.R., Hen R., 2007. Paradoxical influence of hippocampal neurogenesis on working memory. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 4642-4646.

Saykin A.J., Wishart H.A., Rabin L.A., Flashman L.A., McHugh T.L., Mamourian A.C., Santulli R.B., 2004. Cholinergic enhancement of frontal lobe activity in mild cognitive impairment. Brain 127, 1574-1583.

Schacter D.L., Tulving E., 1994. What are memory systems of 1994? Cambridge: MIT Press.

Schliebs R., Rossner S., Bigl V., 1996. Immunolesion by 192IgG-saporin of rat basal forebrain cholinergic system: a useful tool to produce cortical cholinergic dysfunction. Prog Brain Res 109, 253-264.

Schmitt W.B., Arianpour R., Deacon R.M., Seeburg P.H., Sprengel R., Rawlins J.N., Bannerman D.M., 2004a. The role of hippocampal glutamate receptor-A-dependent synaptic plasticity in conditional learning: the importance of spatiotemporal discontiguity. J Neurosci 24, 7277-7282.

Schmitt W.B., Deacon R.M., Reisel D., Sprengel R., Seeburg P.H., Rawlins J.N., Bannerman D.M., 2004b. Spatial reference memory in GluR-A-deficient mice using a novel hippocampal-dependent paddling pool escape task. Hippocampus 14, 216-223.

Schoenbaum G., Setlow B., Saddoris M.P., Gallagher M., 2006. Encoding changes in orbitofrontal cortex in reversal-impaired aged rats. J Neurophysiol 95, 1509-1517.

Scoville W.B., Milner B., 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. J Neurol Neurosurg Psychiatry 20, 11-21.

Sharma S., Rakoczy S., Brown-Borg H., Assessment of spatial memory in mice., 2010. Life Sci 87, 521-536.

Shen J., Barnes C.A., McNaughton B.L., Skaggs W.E., Weaver K.L., 1997. The effect of aging on experience-dependent plasticity of hippocampal place cells. J Neurosci 17, 6769-6782.

Sherman K.A., Kuster J.E., Dean R.L., Bartus R.T., Friedman E., 1981. Presynaptic cholinergic mechanisms in brain of aged rats with memory impairments. Neurobiol Aging 2, 99-104.

Sherry D.F., Schacter D.L., 1987. The evolution of multiple memory systems. Psychol Rev 94, 439-454.

Shohamy D., Wagner A.D., 2008. Integrating memories in the human brain: hippocampal-midbrain encoding of overlapping events. Neuron 60, 378-389.

Shrager Y., Levy D.A., Hopkins R.O., Squire L.R., 2008. Working memory and the organization of brain systems. J Neurosci 28, 4818-4822.

Small S.A., Chawla M.K., Buonocore M., Rapp P.R., Barnes C.A., 2004. Imaging correlates of brain function in monkeys and rats isolates a hippocampal subregion differentially vulnerable to aging. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 7181-7186.

Smith H.R., Pang K.C., 2005. Orexin-saporin lesions of the medial septum impair spatial memory. Neuroscience 132, 261-271.

Sperling R., 2007. Functional MRI studies of associative encoding in normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. Ann N Y Acad Sci 1097, 146-155.

Sperling R., Greve D., Dale A., Killiany R., Holmes J., Rosas H.D., Cocchiarella A., Firth P., Rosen B., Lake S., Lange N., Routledge C., Albert M., 2002. Functional MRI detection of pharmacologically induced memory impairment. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 455-460.

Squire L.R., 1987. The organization and neural substrates of human memory. Int J Neurol 21-22, 218-222.

Squire L.R., 1992. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. Psychol Rev 99, 195-231.

Squire L.R., 2004. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. Neurobiol Learn Mem 82, 171-177.

Squire L.R., Knowlton B., 1996. Memory, Hippocampus and Brain Systems, in: (press M, ed) The cognitive neurosciences., G. MS. Cambridge.

Squire L.R., Cohen N.J., Zouzounis J.A., 1984. Preserved memory in retrograde amnesia: sparing of a recently acquired skill. Neuropsychologia 22, 145-152.

Staresina B.P., Davachi L., 2010. Object unitization and associative memory formation are supported by distinct brain regions. J Neurosci 30, 9890-9897.

Staresina B.P., Davachi L., 2006. Differential encoding mechanisms for subsequent associative recognition and free recall. J Neurosci 26, 9162-9172.

Staresina B.P., Davachi L., 2009. Mind the gap: binding experiences across space and time in the human hippocampus. Neuron 63, 267-276.

# T

Tang Y.P., Shimizu E., Dube G.R., Rampon C., Kerchner G.A., Zhuo M., Liu G., Tsien J.Z., 1999. Genetic enhancement of learning and memory in mice. Nature 401, 63-69.

Teather L.A., Packard M.G., Smith D.E., Ellis-Behnke R.G., Bazan N.G., 2005. Differential induction of c-Jun and Fos-like proteins in rat hippocampus and dorsal striatum after training in two water maze tasks. Neurobiol Learn Mem 84, 75-84.

Teyler T.J., DiScenna P., 1985. The role of hippocampus in memory: a hypothesis. Neurosci Biobehav Rev 9, 377-389.

Thibault O., Landfield P.W., 1996. Increase in single L-type calcium channels in hippocampal neurons during aging. Science 272, 1017-1020.

Toescu E.C., Verkhratsky A., Landfield P.W., 2004. Ca2+ regulation and gene expression in normal brain aging. Trends Neurosci 27, 614-620.

Toner C.K., Pirogovsky E., Kirwan C.B., Gilbert P.E., 2009. Visual object pattern separation deficits in nondemented older adults. Learn Mem 16, 338-342.

Torres E.M., Perry T.A., Blockland A., Wilkinson L.S., Wiley R.G., Lappi D.A., Dunnet S.B., 1994. Behavioural, histochemical and biochemical consequences of selective immunolesions in discrete regions of the basal forebrain cholinergic system. Neuroscience 63, 95-122.

Touzani K., Marighetto A., Jaffard R., 2003. Fos imaging reveals ageing-related changes in hippocampal response to radial maze discrimination testing in mice. Eur J Neurosci 17, 628-640.

Tronche C., Lestage P., Louis C., Carrie I., Beracochea D., 2010. Pharmacological modulation of contextual "episodic-like" memory in aged mice. Behav Brain Res 215, 255-260.

Tsien J.Z., Huerta P.T., Tonegawa S., 1996. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. Cell 87, 1327-1338.

Tulving E., 1995. Organisation of memory: quo vadis?, in: (Gazzaniga MS, ed) The cognitive neurosciences, Mass: MIT Press Cambridge pp 839-847.

Tulving E., 2002. Episodic memory: from mind to brain. Annu Rev Psychol 53, 1-25.

Tulving E., Hayman C.A., Macdonald C.A., 1991. Long-lasting perceptual priming and semantic learning in amnesia: a case experiment. J Exp Psychol Learn Mem Cogn 17, 595-617.

Tulving E., Schacter D.L., McLachlan D.R., Moscovitch M., 1988. Priming of semantic autobiographical knowledge: a case study of retrograde amnesia. Brain Cogn 8, 3-20.

Tulving E., Kapur S., Craik F.I., Moscovitch M., Houle S., 1994. Hemispheric encoding/retrieval asymmetry in episodic memory: positron emission tomography findings. Proc Natl Acad Sci U S A 91, 2016-2020.

# UV

Uchida S., Maehara T., Hirai N., Okubo Y., Shimizu H., 2001. Cortical oscillations in human medial temporal lobe during wakefulness and all-night sleep. Brain Res 891, 7-19.

Vannini P., O'Brien J., O'Keefe K., Pihlajamaki M., Laviolette P., Sperling R.A., 2010. What Goes Down Must Come Up: Role of the Posteromedial Cortices in Encoding and Retrieval. Cereb Cortex.

Vargha-Khadem F., Gadian D.G., Watkins K.E., Connelly A., Van Paesschen W., Mishkin M., 1997. Differential effects of early hippocampal pathology on episodic and semantic memory. Science 277, 376-380.

von Bohlen und Halbach O., Zacher C., Gass P., Unsicker K., 2006. Age-related alterations in hippocampal spines and deficiencies in spatial memory in mice. J Neurosci Res 83, 525-531.

von Engelhardt J., Doganci B., Jensen V., Hvalby O., Gongrich C., Taylor A., Barkus C., Sanderson D.J., Rawlins J.N., Seeburg P.H., Bannerman D.M., Monyer H., 2008. Contribution of hippocampal and extra-hippocampal NR2B-containing NMDA receptors to performance on spatial learning tasks. Neuron 60, 846-860.

von Linstow Roloff E., Harbaran D., Micheau J., Platt B., Riedel G., 2007. Dissociation of cholinergic function in spatial and procedural learning in rats. Neuroscience 146, 875-889.

# W

Wallenstein G.V., Eichenbaum H., Hasselmo M.E., 1998. The hippocampus as an associator of discontiguous events. Trends Neurosci 21, 317-323.

Wenk G.L., Engisch K.L., 1986. [3H]ketanserin (serotonin type 2) binding increases in rat cortex following basal forebrain lesions with ibotenic acid. J Neurochem 47, 845-850.

Wheeler M.A., Stuss D.T., Tulving E., 1997. Toward a theory of episodic memory: the frontal lobes and autonoetic consciousness. Psychol Bull 121, 331-354.

White N.M., McDonald R.J., 2002. Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. Neurobiol Learn Mem 77, 125-184.

Whitehouse P.J., Price D.L., Struble R.G., Clark A.W., Coyle J.T., Delon M.R., 1982. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. Science 215, 1237-1239.

Wilson I.A., Gallagher M., Eichenbaum H., Tanila H., 2006. Neurocognitive aging: prior memories hinder new hippocampal encoding. Trends Neurosci 29, 662-670.

Wilson I.A., Ikonen S., Gallagher M., Eichenbaum H., Tanila H., 2005a. Age-associated alterations of hippocampal place cells are subregion specific. J Neurosci 25, 6877-6886.

Wilson I.A., Ikonen S., McMahan R.W., Gallagher M., Eichenbaum H., Tanila H., 2003. Place cell rigidity correlates with impaired spatial learning in aged rats. Neurobiol Aging 24, 297-305.

Wilson I.A., Ikonen S., Gurevicius K., McMahan R.W., Gallagher M., Eichenbaum H., Tanila H., 2005b. Place cells of aged rats in two visually identical compartments. Neurobiol Aging 26, 1099-1106.

Woodruff-Pak D.S., Lehr M.A., Li J.G., Liu-Chen L.Y., 2010. Young and older good learners have higher levels of brain nicotinic receptor binding. Neurobiol Aging 31, 1032-1043.

Wu C.F., Bertorelli R., Sacconi M., Pepeu G., Consolo S., 1988. Decrease of brain acetylcholine release in aging freely-moving rats detected by microdialysis. Neurobiol Aging 9, 357-361.

Wu M., Newton S.S., Atkins J.B., Xu C., Duman R.S., Alreja M., 2003. Acetylcholinesterase inhibitors activate septohippocampal GABAergic neurons via muscarinic but not nicotinic receptors. J Pharmacol Exp Ther 307, 535-543.

# YZ

Yassa M.A., Lacy J.W., Stark S.M., Albert M.S., Gallagher M., Stark C.E., 2010. Pattern separation deficits associated with increased hippocampal CA3 and dentate gyrus activity in nondemented older adults. Hippocampus.

Zacks R.T., Hasher L., Li K., Z,H, 1999. Human memory, in: Lawrence Erlbaum Associates Inc Edition (Craik FI, Salthouse TA, Mahwah NJ, Eds) The Handbook of Aging and Cognition, pp 200-230.

Zhang G.R., Cheng X.R., Zhou W.X., Zhang Y.X., 2009. Age-related expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II A in the hippocampus and cerebral

cortex of senescence accelerated mouse prone/8 mice is modulated by anti-Alzheimer's disease drugs. Neuroscience 159, 308-315.

# Annexes

# Detection of age-dependent working memory deterioration in $APP_{751SL}$ mice

Julie Blanchard[1,2,*], Guillaume Martel[1,3], Laurent Brayda-Bruno[1], Xavier Noguès[1] and Jacques Micheau[1]

[1] Centre for Integrative and Cognitive Neuroscience, University of Bordeaux, CNRS UMR 5228, Talence, France.

[2] Institute for Basic Research in Developmental Disabilities, Department of neurochemistry, Staten Island, NY 10314

[3] Rutgers University, Department of genetics, Piscataway, NJ 08854

*** Corresponding author:**
Julie Blanchard
NYS Institute for Basic Research
Department of Neurochemistry
Chemical Neuropathology Lab
1050 Forest Hill Road
Staten Island, NY 10314
USA
Tel. 718-494-5393
Fax. 718-494-1080
Email: julie.blanchard.ibr@gmail.com

**Abstract**

Despite huge advances on Alzheimer's disease (AD) etiology, the clinical diagnosis remains the unique commonly used tool to detect the onset of the disease. For instance, epidemiological studies report that the combination of episodic and working memory disorders represents the most consistent sign of progression from mild cognitive impairment to AD. However, such working memory disorders failed to be observed early in transgenic mouse models of AD because the behavioral procedures used do not tackle properly crucial components of working memory. The aim of the present work was to assess early occurrence of working memory impairments in $APP_{751SL}$ mice. Therefore, we designed a new behavioral task in the water-maze, based on the principle of a delayed matching to place task, where spatial recognition was assessed for four different platform locations within a single session. First, we showed that dorsal hippocampal but not medial prefrontal cortex lesions in C57Bl6 mice induced a time-dependent impairment of spatial recognition. Then, the hippocampal-like memory alterations were reproduced in 7-8 month-old $APP_{751SL}$ mice but not in younger animals (5-6 month-old). We also demonstrated that these working memory deficits are consequent to progressive Aβ accumulation in the hippocampus, but not in the other selected brain structures.

**Key words:** $APP_{751SL}$ mice, working memory, hippocampal lesion, prefrontal cortex lesion, Alzheimer's disease

## 1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a dementia affecting cognitive spheres and resulting from a long and progressive prodromal phase when cognitive deficits, depressive symptoms and functional impairments gradually emerged [1]. The AD brain is characterized by a loss of synapses and neurons at specific sites [61], the presence of parenchymal and cerebrovascular amyloid-β peptide (Aβ) deposits [35, 50] and neuronal neurofibrillary tangles of hyperphosphorylated tau protein [36]. The most severe changes occur in the hippocampal formation [67] and cortical structures [3, 13, 14]. To study AD-like pathogenic mechanisms *in vivo*, transgenic mice expressing mutations identified from

patients with familial AD have been generated. Given the central role attributed to Aβ neurotoxicity as a trigger mechanism for neurodegeneration [61], mice overexpressing the human-mutated-Amyloid-Precursor-Protein (*hAPP*) are of particular interest. Several studies showed that prior the onset of amyloid plaque formation, insoluble or soluble Aβ accumulation interferes with synaptic mechanisms and with memory function [8, 54, 55].

One major focus of the current research on AD is to identify the disease at a clinical stage when pathological injury is not too severe to prevent functional recovery. However, no relevant preclinical diagnosis is available and the clinical diagnosis remains the unique tool to diagnose AD. Specifically, episodic and working memory deficits represent a strong predictor and a consistent indicator of AD progression [6, 7, 56].

Nevertheless, it is difficult to highlight early working or episodic-like memory alteration *per se* in *hAPP* transgenic animals [2, 27, 37, 46, 59]. In addition, careful consideration of the paradigms used to assess working memory in rodents shows several limitations and biases [29]. These tasks do not required *stricto sensus* manipulation and maintenance of information within short delays and it cannot be excluded that animals used a navigational strategy to solve tasks [28]. To specifically assess working memory and detect its deterioration onset in the $APP_{751SL}$ animals, we designed a new behavioral paradigm. We considered working memory as a type of short-term memory involving active manipulation of information and maintenance of its representation over a delay period to make a subsequent response [31, 41, 65].

We first demonstrated that the information stored is relevant for the ongoing trial, but must then be forgotten or ignored on subsequent trials. We then carried out a lesional study targeting the dorsal hippocampus or the medial prefrontal cortex because current literature supports the view that these regions are critically and specifically involved in working memory [20, 34, 62, 64], but also because they are the first displaying Aβ immunoreactivity in $APP_{751SL}$ mice [9]. We finally demonstrated that $APP_{751SL}$ animals exhibited early time-dependent working memory impairment mirrored by an age-associated dramatic increase of Aβ load in the hippocampus and frontal cortex.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Subjects

*2.1.1. Animals:* Male mice of the C57Bl/6 by JIco strain (IFFA CREDO Lyon, France) and of the $APP_{751SL}$ transgenic line were used. The APP transgenic mice were heterozygous overexpressing the *hAPP751* fragment with the double Swedish and London (KM670/671NL and V717I) mutation under the control of a mThy1 promoter [11, 58, 70] and wild type (WT) littermates with a hybrid genetic background (C57BL/6 [87.5%] x CBA [12.5%]) and backcrossed to C57BL/6 mice for 6 generations. These animals were provided by Aventis Centre de Recherches de Paris (Vitry sur Seine, France). To detect precisely when working memory impairments appeared in $APP_{751SL}$ mice, we tested mice of 5-6 months and 7-8 months.

C57Bl/6 lesioned animals (dorsal hippocampal lesioned, n=7; dorsal hippocampal sham, n=8; medial prefrontal cortex lesioned, n=9; medial prefrontal sham, n=12) were tested at 3-4 months of age and $APP_{751SL}$ and their WT littermates mice were tested at 5-6 ($APP_{751SL}$, n=11; WT, n=12) or 7-8 months ($APP_{751SL}$, n=10; WT, n=13) of age.

Animals were acclimatized to our holding conditions for 3 weeks before the experiment. They were group-housed in an animal room equipped with air-conditioning (23 ± 1°C) and with an artificial light/dark cycle of 12 hours (7:00 a.m. on). Ten days prior to behavioral testing or surgery, mice were separated into individual home cages with *ad libitum* access to food and water. Before testing, mice were handled gently for 2-3 min/day during a 3 day period to minimize non-specific stress.

Experiments were carried out in accordance with the guidelines on the ethical use of animals from the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

*2.1.2 Surgery:* All mice were anaesthetized with a mixture (100 mg/kg i.p.) of Xylaxine (0.1%) and Ketamine (10%). Brain lesions were made using standard stereotaxic procedures. Flat skull stereotaxic coordinates were derived from the atlas of Franklin and Paxinos [32] using bregma as the reference point. The coordinates for dorsal hippocampus (dHPC) lesions were 2mm posterior (P), 1.3mm lateral (L) and 2mm ventral (V). Coordinates for medial prefrontal cortex (mPFC) lesions were 2mm anterior

(A), 0.3mm L and 2.7mm V. Lesions were made by injecting 0.3µl of ibotenic acid in the dHPC or 0.2µl of ibotenic acid in the mPFC with injection cannulae (0.2mm diameter and 9mm long) linked to 1µl Hamilton syringes via polyethylene catheter tubing [48]. The syringes were held in a constant-rate infusion pump and bilateral injections were conducted over a 3-minutes period. In all cases, correct injection flow rates were visually controlled. The cannulae were left in place for additional 2 minutes before removal. Sham operated animals received 0.3µl or 0.2µl artificial cerebrospinal fluid (see [39], for the composition) in the dHPC and mPFC respectively.

Upon completion of the experiments, mice were sacrificed and the lesion accuracy of dHPC and mPFC was controlled with a Thionine staining procedure.

Following surgery, the mice remained in the animal room for a recovery period of 10 days before the experimental phase began.

**2.2. Behavioral procedure**

*2.2.1. Apparatus:* The apparatus was a water maze measuring 150cm in diameter and 55cm in height. The pool was elevated 20cm above the floor in a room containing many stationary cues. The pool was filled with 21±1°C water and made opaque by adding white non-toxic paint. The submerge platform was made of transparent Plexiglas (13cm in diameter) and was submerged 1cm below water surface. A cylinder structure (15cm in high x 3cm in diameter) with black-white striped patterns can be placed on the platform centre to indicate its location. Swim latencies and distance covered were recorded and analyzed by an automated tracking system (Videotrack, Champagne au Mont d'Or, France).

*2.2.2. Procedure:* The behavioral procedure was split into a matching to place task (MPT) and a delayed matching to place task (DMPT). The MPT consisted of 5 sessions distributed on 5 successive days. One session was composed of 4 pairs of trials, the first being the presentation trial and the second being the test trial. Platform position was constant within each pair of trials but was randomly changed for each pair (Fig. 1A). Therefore, the platform location was different for a given trial between experiments preventing direct comparison. A black-white striped cue indicated the platform position

during the presentation trial and then was removed for the test trial (Fig.1B). For each trial mice were released facing the wall at a pseudo-randomized start position and allowed to swim until they found and climbed onto the platform or 90s had elapsed. If a mouse did not find the platform within 90s, it was gently guided to the platform by hand, where it was left for 30s and then dried and returned to its home cage. The inter-trial interval (ITI) within the same pair of trials lasted 30s, and the inter-pair interval was about 25min. Mice were trained in squads of 5 animals and counterbalanced with respect to lesion or sham and genotype.

Two days after the last session of the MPT, animals performed the DMPT which also consisted of 5 daily sessions (Fig. 1C). During one session, the same procedure was applied except that the ITI varied across the successive pairs, i.e. 30s for the 1$^{st}$ pair, 5min for the 2$^{nd}$ pair, 1h for the 3rd pair and 30s for the 4$^{th}$ pair. Increased ITIs were introduced to enhance memory load between the presentation trial and the test trial to challenge memory capacities. In order to demonstrate working memory engagement in the task, a control experiment was conducted. A subgroup of C57Bl6 mice were trained in the MPT, but then performed a delayed non-matching to place task (DNMPT). These animals received an instruction for a "wrong" place during the presentation trials (unpaired group), and were compared to animals performing the DMPT (paired group).

**2.3. Measurement of Aβ levels: sandwich-type ELISA**

After behavioral testing, $APP_{751SL}$ mice were sacrificed to dissect 3 brain structures (i.e. the hippocampus, the frontal cortex and the striatum). Samples were homogenized in an ice-cold buffer containing 5M guanidine-HCl and phosphate buffered saline (PBS) containing 1x protease inhibitor cocktail (pH=8.0; Calbiochem, San Diego, CA). Homogenates were then mixed for 3-4 hours at room temperature and centrifuged at 16000*g* for 20min at 4°C. Supernatants were diluted tenfold in Dulbecco's PBS (pH=7.4) containing 5% bovine serum albumin and 0.03% Tween20. Quantification of Aβ was performed with a commercially available sandwich-type ELISA kit (Biosource International, Camarillo, CA).

### 2.4. Statistical analyses

Statistical analyses were made with SAS v5 (SAS Institute, Cary, NC) and SYSTAT v9.01 (SPSS Inc.). ANOVA's with lesion (sham or lesion) or genotype (WT or $APP_{751SL}$) conditions as the between-groups factor and trials as the repeated-measure factor (with conservative dfs) were computed for the escape distance and swim speed measured. Additional Student t-tests were conducted for comparison of certain condition (i.e. to compare animal's performance for a given delay). Because platform locations were randomly assigned, and therefore different for a given trial between experiments, animals' performance cannot be compared between experiments. Statistical analyses of the ELISA measurements of Aβ were performed separately for each brain structure using t-test with the age as between group factors (with conservative dfs). Regression analyses (r coefficient of Spearman) were conducted to study correlations between the $A\beta_{total}$ or $A\beta_{1-42}$ load in each brain structure and the mean performance for each type of trial in the DMPT. A probability of $p<0.05$ was considered significant.

## 3. Results

### 3.1. Demonstration of working memory engagement in the new behavioral paradigm

To test whether working memory is actually engaged in the behavioral paradigm designed, we compared animals performing the DMPT (n=11) to a sub-group of mice (n=11) submitted to the DNMPT.

*3.1.1. Swim speed*: To make sure that potential deficits observed in the task would not be due to locomotor impairments we analyzed swim speed animals displayed during the task. Two-way ANOVAs were performed separately for cued and spatial trials over the 10 days of training. These analyses did not reveal any difference of swim speed between groups ($F<0.103$; $p>0.751$, for global swim speed levels, see Fig. 2A).

*3.1.2. MPT training phase*: As illustrated in Figure 2B and 2C, animals significantly improved performance across days during both presentation trials (Fig. 2B, $F_{(4,84)}=106.708$; $p<0.001$) and test trials (Fig. 2C, $F_{(4,84)}=7.936$; $p<0.001$), confirming that animals learned the rule of the task.

*3.1.3. DMPT testing phase*: As shown in Figure 2D, mice from the unpaired group were significantly impaired in exhibiting place response compared to mice from the paired group during the first three pairs of trials. A two-way ANOVA indicated a significant group effect ($F_{(1,20)}$=32.689; p<0.001). Student t-tests, conducted on each pair of trials for specific ITI, revealed that animals from the unpaired group displayed worse performance than mice from the paired group during the first three pairs of trial (first 30s. ITI, $t_{(df=20)}$=3.772; p=0.001; 5min ITI, $t_{(df=20)}$=3.687; p=0.002; 1h ITI, $t_{(df=20)}$=2.593; p=0.017). Moreover, animals from the unpaired group crossed significantly more potential platform locations than mice from the paired group (Fig. 2E, Global analysis: $t_{(df=86)}$=4.317; p<0.001; first 30s. ITI, $t_{(df=20)}$=2.975; p=0.008; 5min ITI, $t_{(df=20)}$=2.178; p=0.045; 1h ITI, $t_{(df=20)}$=3.123; p=0.005), but without preference for the previous platform location (Fig. 2F, t<0.428; p>0.673.

For the paired group, increased ITIs did not alter performance in test trials when compared to the first pair of 30s ITI (Fig. 2D, 5min ITI, $t_{(df=20)}$=0.588; p=0.563; 1h ITI, $t_{(df=20)}$=1.067; p=0.299) . However, during the last pair of 30s ITI, during the test trial, animals performance degraded compared to other test trials (t>2.289; p<0.033). These results suggested that increasing the delay between the presentation and the test trial did not alter response accuracy in normal mice. But, at some point, previous information processed within the same session seemed to interfere with the information currently in process. Indeed, analyses of the number of crossing of the former platform location during the ongoing trial showed that, during the last pair of trials, mice from the paired group visited significantly more the previous platform location than in the first pair of trials (Fig. 2F, $t_{(df=20)}$=3.066; p=0.006). Similarly, these animals also crossed significantly more potential platform locations than in the first pair of trials (Fig. 2E, $t_{(df=20)}$=3.037; p=0.007). Figure 2G represents examples of mice trajectories in the water maze during the DMPT. These tracks illustrate results described above and showed that, despite the crossing of potential platforms due to the numerous possibilities and distribution in the water maze of platform position, animals performing the DMPT used an accurate spatial strategy. Animals performing the DNMPT displayed a navigational strategy less efficient.

Overall, these data indicated that animals used a spatial strategy to solve the task and that working memory was engaged since the instruction delivered during the presentation trial was used to find the platform during the subsequent test trial.

### 3.2. Lesion of the dHPC or the mPFC in the spatial working memory task

*3.2.1. Histology*: Figure 3 illustrates maximum and minimum extent of mPFC (A) and dHPC (C) lesions and shows representative pictures of lesioned mPFC (B) and dHPC (D) versus sham. Animals which did not display such lesions of the dHPC or the mPFC (i.e. equivalent damage in both hemispheres and no significant damage to the neighboring areas) were discarded from the study.

*3.2.2. Swim speed*: These analyses revealed that both types of lesion alter slightly but nevertheless significantly, swim speed in both types of trial (Presentation trials: mPFC lesions: $F>5.461$; $p<0.010$; dHPC lesions, $F>5.781$; $p<0.032$. Test trials: mPFC lesions: $F>6.766$; $p<0.019$; dHPC lesions: $F>5.541$; $p<0.035$; for global swim speed levels, see Fig. 4A and 4E). Nevertheless global swim speed levels were similar in all groups ($p>0.740$) and swim speed increased across sessions for all animals ($F>8.860$; $p<0.001$).

*3.2.3. MPT training phase*: Strikingly, animals harboring mPFC lesion appeared impaired during the presentation trials (Fig. 4B). A two-way ANOVA showed a significant main group effect ($F_{(1,17)}=5.438$; $p=0.032$) but no significant group x session interaction ($p=0.270$) as both groups similarly improved performance ($F_{(4,68)}=6.946$; $p<0.001$). During test trials (Fig. 4C), both groups significantly improve performance across days ($F_{(4,76)}=31.347$; $p<0.001$) and despite the impairment during presentation trials, mPFC lesioned mice exhibited the same patterns of learning and levels of performance as sham control animals ($p>0.371$).

As illustrated in Figures 4F and 4G dHPC lesioned mice displayed a similar learning curve compared to sham animals either during presentation trials or test trials. Indeed, two-way ANOVAs revealed that both groups improved performance during MPT presentation and test trials (Fig. 4F, $F_{(4,52)}=48.973$; $p<0.001$, Fig. 4G, $F_{(4,52)}=2.74$; $p=0.038$) and these progressions were similar between groups (Fig. 4F, $p>0.660$; Fig. 4G, $p>0.086$).

Data from the training phase indicated that both mPFC and dHPC lesioned animals were able to learn and perform the working memory task.

*3.2.4. DMPT testing phase*: As shown in Figure 4D increased ITIs did not alter performance in test trials in mPFC lesioned mice. A two-way ANOVA confirmed that mPFC lesioned animals displayed similar pattern and level of performance as sham control ($p>0.736$). On the contrary, as shown in Figure 4H, dHPC lesioned mice were significantly impaired exhibiting place response compared to sham controls when the ITI was increased. A two-way ANOVA indicated a significant group effect ($F_{(1,13)}=8.71$; $p=0.010$) and a significant genotype x trial interaction ($F_{(3,39)}=3.64$; $p=0.030$). Student t-tests, conducted on each pair of trials for specific ITI, revealed that this overall group effect was due to an impairment in dHPC lesioned animals for ITIs of 5min and 1h (5min ITI, $t_{(df=13)}=2.351$; $p=0.035$; 1h ITI, $t_{(df=13)}=2.264$; $p=0.041$).

Overall, these data indicated that, surprisingly, massive lesions of the mPFC did not induce any detrimental effect in learning the MPT nor in performing the DMPT, but that substantial lesions of the dHPC altered animal's capabilities in the DMPT whereas execution of the MPT was preserved.

### 3.3. $APP_{751SL}$ mice in the spatial working memory task

*3.3.1. Swim speed*: Like previously, swim speed were analyzed using two-way ANOVAs, performed separately for each type of trial over the 10 days of training. As shown in figure 5A and 5E for each age and each type of trial, global swim speed levels did not differ between $APP_{751SL}$ mice and their WT littermates ($p>4.417$). Moreover, these analyses revealed that in both ages, swim speed increased smoothly across sessions ($p<0.001$).

*3.3.2. MPT training phase*: As shown in the Figures 5B and 5F, $APP_{751SL}$ mice of 5-6 and 7-8 month and their WT littermates learned quickly to swim to the cued platform during presentation trials. Two-way ANOVAs conducted for each group of age confirmed that transgenic mice and WT littermates behaved similarly (Fig. 5B, $p>0.476$; Fig. 5F, $p>0.161$). During test trials all groups of animals significantly learned to return to the previously indicated platform location across sessions (Fig. 5C, $F_{(4,84)}=6.808$; $p<0.001$, and 5G, $F_{(4,60)}=3.427$; $p=0.014$) and two-way ANOVAs showed that $APP_{751SL}$ displayed

similar patterns of learning and levels of performance compared to age matched WT littermates (Fig. 5C, $p>0.302$; Fig. 5G, $p>0.136$).

These data clearly showed that $APP_{751SL}$ mice of both ages learned and performed the working memory task similarly as their WT littermates.

*3.3.3. DMPT testing phase*: As depicted in Figure 5D 5-6 month-old $APP_{751SL}$ mice performed like their WT littermates (two-way ANOVA, $p>0.440$). In contrast, as shown in Figure 5H 7-8 month-old $APP_{751SL}$ mice were significantly impaired in exhibiting place response compared to their WT littermates. Two-way ANOVA indicated a significant group effect ($F_{(1,21)}=12.465$; $p=0.002$) and a nearly significant genotype x trial interaction ($p=0.057$). These data showed that in 7-8 month-old $APP_{751SL}$ mice spatial recognition performance declined with longer ITIs. Student t-tests, conducted on each pair of trials for specific ITI, confirmed the impairment for the ITIs of 5min and 1h (5min ITI, $t_{(df=21)}=2.268$; $p=0.034$; 1h ITI, $t_{(df=21)}=2.197$; $p=0.039$).

This suggested that, although the 7-8 month-old transgenic mice were able to learn the matching procedure, the working memory deficit was related to an inability to hold the spatial information for long ITIs.

### 3.4. β-amyloid load in $APP_{751SL}$ mice trained in the working memory task

Transgenic mice of 5-6 and 7-8 months of age were sacrificed after the DMPT to measure the β-amyloid load in the hippocampus, the frontal cortex and the striatum. Analysis of Aβ levels with ELISA assay showed that in 5-6 month-old mice, $A\beta_{1-42}$ was already detected in these three brain structures with a higher expression in the frontal cortex (Fig. 6A, $t>3.784$; $p<0.005$). In older animals, $A\beta_{1-42}$ levels were significantly increased in the three brain structures (Fig. 6A, $t>2.610$; $p<0.034$) compared to 5-6 month-old animals although $A\beta_{1-42}$ level in the striatum was by far lower than in the two other structures (Fig. 6A, $t>5.161$; $p<0.001$). Interestingly, regression analyses conducted on both groups of $APP_{751SL}$ mice and their performance in the DMPT revealed a significant positive correlation between Aβ load in the hippocampus and path length at the 1h-ITI test trial (Fig. 6B, $r=0.49$; $p=0.040$). Similarly a tendency was found with the peptide $A\beta_{1-40}$ ($r=0.44$; $p=0.064$) but no other significant correlations were observed. Therefore, the time-dependent deficit detected in the 7-8 month-old $APP_{751SL}$ mice could

be attributed to increased accumulation of Aβ within the hippocampus and consequently an alteration of hippocampal function.

## 4. Discussion

The aim of this work was to detect the onset of working memory disorders in the $APP_{751SL}$ transgenic mouse model. Therefore, we designed an original behavioral procedure to assess working memory in rodents. The relevance of this task and the working memory engagement was demonstrated using normal adult mice and with a lesional experiment showing a differential involvement of the dHPC and mPFC in working memory processing. We reported that 7-8 month-old $APP_{751SL}$ mice developed working memory deterioration similar to dHPC lesion and correlated with hippocampal Aβ load.

### 4.1. Assessment of working memory in rodents

Although behavioral tasks traditionally used in rodent to assess working memory operationalize components of working memory, several limitations and biases remain [29]. A major inconvenience is that the information to deal with varies between sessions and not within sessions. Accordingly, the most innovative aspect of our procedure is the requirement for each animal to memorize, within the same session, four different pieces of spatial information and to segregate the relevant one for the ongoing trial. Theoretically, this task first entails encoding of the environment as a spatial map, an aspect that belongs to reference memory abilities. But during the same session, animals have to episodically adjust spatial coordinates of the relevant information because it changes every two trials. Therefore, this behavioral paradigm handles working memory as defined by manipulation and active maintenance of information hold in short-term memory [31, 41, 53]. Once used, the on hand spatial information is no longer valuable and should be forgotten or ignored to avoid proactive interferences. If the encoding is non-adequate or fragile, the restitution can be impaired when the delay between the encoding and the restitution increases, probably due to the occurrence of proactive interferences.

The first experiment run showed that normal adult C57Bl6 mice getting a non-matching place instruction during the presentation trial performed significantly worse than mice

getting the correct place instruction about the platform location. These results also demonstrated that animals performing the DNMPT used a strategy of navigation whereas mice subjected to the DMPT displayed a spatial strategy using the instruction delivered during the presentation trial. Therefore, the representation of the presentation trial was manipulated and maintained over a delay to make the subsequent response. This experiment clearly demonstrated that working memory is engaged in this task and that the stored information is spatial. Introduction of longer ITIs increases the task complexity and had deleterious effects on the process of subsequent information, probably arousing interferences. Thereby, challenging memory capacities by increasing the memory load allowed to highlight working memory impairments in mouse model of hippocampal dysfunctioning and mouse model of AD.

**4.2. Brain systems involved in the working memory task**

It is widely reported that both the mPFC and the dHPC are implicated in working memory. Specifically, it has been hypothesized that the mPFC is primarily engaged in the temporal storage and process of information within second unit time scale, while the dHPC becomes more critical as the working memory demand extends into longer temporal scales [44].

By damaging either of these two brain regions, our aim was to dissociate qualitatively different aspects of this working memory task. Damage to the mPFC did not impair the upholding of the information in the present task whatever the ITI was. Numerous studies show a delay-dependent deterioration of working memory associated with a disruption of the mPFC [22, 23, 62, 66]. However, in most studies the impairment was reported in operant conditioning tasks [62, 17] whereas delayed matching to place task was scarcely affected by PFC damage [21, 43]. As stressed by Delatour and Gisquet-Verrier [22, 34] the mPFC does not seem to play a crucial role in the maintenance of specific items over a delay period but is rather involved in goal-directed behavior on the basis of previously acquired information. On the other hand, the delay-dependant involvement of the PFC could result from mechanisms other than short-term storage, such as attention functions [18, 19, 26, 38] or behavioral flexibility [23, 25, 43, 57]. Recently, McNab and collaborator [51] reported that, in humans, the PFC and basal ganglia should exert attentional control over access to working memory storage in the parietal cortex,

suggesting a role of filter of irrelevant items during the encoding of working memory. The transient impairment we observed during the MPT for cued trials may result from attention deficits delaying the mPFC-lesioned mice to focus on the cue signaling the platform. Interestingly, a similar impairment following mPFC damage was reported by De Bruin and colleagues [21]. Nevertheless, the lack of deficit in the DMTP task suggests that mPFC does not contribute essentially in the processes necessary to handle working memory in this task and/or at these particular delays.

Data from dHPC-lesioned animals revealed a perturbation in the DMPT that was delay-dependent. Surprisingly, we did not observe any impairment during the MPT phase. This suggests that the dHPC lesion did not alter learning of a rule consisting in manipulating spatial information during short delay although it is widely demonstrated that the hippocampus is crucial for spatial information processing. However, results showed that with extensive training, mice with dHPC lesions are able to develop a spatial strategy of navigation [47, 48]. Moreover, several reports demonstrated that ventral hippocampus in conjunction with adjacent brain areas (e.g. entorhinal cortex) or other brain areas (e.g. medial caudate putamen) contributes to navigational strategies [24, 33, 40]. Therefore, in the present study, because only the dHPC was damaged and because animals were extensively exposed to the spatial environment, alternative brain structures might have take over the process of spatial information. Nevertheless, dHPC-lesioned mice were impaired with longer ITIs (5min and 1h) showing the requirement of hippocampal integrity for extended delays. In line with this finding several reports have shown that HPC lesions produce none or mild deficits at short time intervals but induce pronounced disruptions as a function of increasing delay [30, 42, 49, 60, 65]. Accordingly, the HPC may serve the role of episodic buffer (i.e., integrate present and preceding information to properly anticipate future experience), a newly added component of working memory [4, 5, 12]. The present results thus provide additional evidence to the specific engagement of the HPC for the short-term upholding of the information according to the task demands.

### 4.3. Working memory impairments in $APP_{751SL}$ mice

In a transgenic mouse model of AD, while spatial reference memory impairments have been extensively reported, working memory alterations have been stated to a lesser extent and predominantly reported at late stages of the pathogenesis [2, 15, 16, 52, 59].

However, in humans, clinical reports showed that working memory disorders are the earliest specific cognitive symptoms of AD [45, 63, 68]. The difficulty of detecting early working memory impairments in those animal models could result of a lack of sensitivity and specificity of the behavioral paradigms used. Moreover, in most of these studies, the age stratification may not be accurate enough to successfully demonstrate subtle cognitive deterioration. Indeed, at the beginning of the pathogenesis, the disease expansion is highly variable among subjects consequently inducing variability of the symptoms observed. Westerman and coll. [69] pointed out that addressing the relationship between Aβ plaques and memory performance requires careful adjustment for age. We thus have studied two close ages of $APP_{751SL}$ mice (5-6 and 7-8 months) and, although the behavioral procedure used in the present work still has some limitations, we have demonstrated that working memory deficits appeared at 7-8 months of age in this *hAPP* mouse model. These findings, along with previous results, strongly suggest that those impairments are due to an alteration of the hippocampal function. First, the pattern of impairment detected for 7-8 month-old $APP_{751SL}$ mice is similar to those of HPC-lesioned animals. Second, we have observed a significant correlation between Aβ load in the HPC and memory deficit in the DMPT for the 1h-ITI.

To properly characterize the nature of impairments presently observed in 7-8 month-old $APP_{751SL}$ mice, it is important to also consider other alteration of spatial information processing these animals displayed. In previous studies, we reported hippocampal-dependent deficits of long-term consolidation of spatial information for 7-8 month-old $APP_{751SL}$ mice, associated with reduced hippocampal plasticity as measured by Zif268 immunoreactivity [10, 11]. Importantly, we have also stated earlier that these animals were impaired 24h, but not 1h post-training in a spatial reference memory paradigm [10]. Here we showed that the $APP_{751SL}$ mice presented deficits when spatial information has to be uphold for 5min or 1h when working memory was engaged. Together, these results point out that the cognitive deficits appearing at 7-8 months of age in the $APP_{751SL}$ transgenic mouse line consist in alterations of two different hippocampal-based mechanisms resulting in long-term memory consolidation and working memory deteriorations.

Finally, considering the consistent Aβ deposition in 7-8 month-old mice [9], the altered hippocampal synaptic plasticity [10] and the correlation between the Aβ load and working memory deficits, our results strongly corroborate reports of the literature considering the hippocampus as a primary target of the pathology development with direct consequences on cognitive functions.

**Conclusion**

In the present study, we reported the development of a behavioral procedure to assess working memory in mice. We also provided additional evidence on the role of the dHPC in working memory processing which may serve as a "short term episodic buffer". Finally, we have completed the cognitive "clinical" characterization of the $APP_{751SL}$ mouse model, demonstrating early working memory deteriorations in the time course of the AD-like pathology.

**Acknowledgement:** We thank Aventis Pharma for providing the $APP_{751SL}$ mice. This work was supported by grants of Aventis Pharma (JB), CNRS and Conseil Régional d'Aquitaine.

**Bibliography**

[1] Amieva H, Le Goff M, Millet X, Orgogozo JM, Peres K, Barberger-Gateau P, Jcqmin-Gadda H, Dartigues JF. (2008) Prodromal Alzheimer's Disease: Successive emergence of the clinical symptoms. Ann Neurol 64:492-498.

[2] Arendash, GW, King DL, Gordon MN, Morgan D, Hatcher JM, Hope CE, Diamond DM. (2001) Progressive, age-related behavioral impairments in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin-1 transgenes. Brain Res 891, 42-53.

[3] Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW. (1991) The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. Cereb Cortex. 1:103-16.

[4] Baddeley A. (2000) The episodic buffer: a new component of working memory? Trends Cogn Sci. 4(11):417-423.

[5] Baddeley A. (2003) Working memory: looking back and looking forward. Nat Rev Neurosci. 4(10):829-39.

[6] Baudic S, Barba GD, Thibaudet MC, Smagghe A, Remy P, Traykov L. (2006) Executive function deficits in early Alzheimer's disease and their relations with episodic memory. Arch Clin Neuropsychol. 21(1):15-21.

[7] Belleville S, Sylvain-Roy S, de Boysson C, Ménard MC. (2008) Characterizing the memory changes in persons with mild cognitive impairment. Prog Brain Res. 169:365-75.

[8] Billings LM, Oddo S, Green JL, McGaugh, LaFerla FM. (2005) Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. Neuron 45, 675-88.

[9] Blanchard J, Decorte L, Nogues X Micheau J (2009) Characterization of cognition alteration across the course of the disease in APP751SL mice with parallel estimation of cerebral Aβ deposition. Behav Brain Res. 66: 573-82.

[10] Blanchard J, Martel G, Guillou JL, Nogues X, Micheau J. (2008) Impairment of spatial memory consolidation in APP751SL mice results in cue-guided response. Neurobiol Aging. 29: 1011-1021.

[11] Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, Touchet N, Bonici B, Planche M, Canton T, Jedidi I, Gohin M, Wirths O, Bayer TA, Langui D, Duyckaerts C, Tremp G, Pradier L. (2003) Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with Abeta deposits in APP/PS1 transgenic mice. Exp Neurol. 184, 247-63.

[12] Blumenfeld RS, Ranganath C. (2007) Prefrontal cortex and long-term memory encoding: an integrative review of findings from neuropsychology and neuroimaging. Neuroscientist. 13(3):280-91.

[13] Braak H, Braak E. (1995) Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. Neurobiol Aging. 16(3):271-8.

[14] Braak, H, Braak E. (1997) Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. Neurobiol Aging 18, 351-7.

[15] Chapman PF, White GL, Jones MW, Cooper-Blacketer D, Marshall VJ, Irizarry M, Younkin L, Good MA, Bliss TV, Hyman BT, Younkin G, Hsiao KK. (1999) Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. Nat Neurosci. 2: 271-6.

[16] Chen G, Chen KS, Knox J, Inglis J, Bernard A, Martin SJ, Justice A, McConlogue L, Games D, Freedman SB, Morris RG. (2000) A learning deficit related to age and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. Nature. 408: 975-9.

[17] Chudasama Y, Muir JL. (1997) A behavioural analysis of the delayed non-matching to position task: the effects of scopolamine, lesions of the fornix and of the prelimbic region on mediating behaviours by rats. Psychopharmacology (Berl). 134(1):73-82.

[18] Chudasama Y, Nathwani F, Robbins TW. (2005) D-amphetamine remediates attentional performance in rats with dorsal prefrontal lesions. Behav Brain Res. 158: 97-107.

[19] Dalley JW, Theobald DE, Bouger P, Chudasama Y, Cardinal RN, Robbins TW. (2004) Cortical cholinergic function and deficits in visual attentional performance in rats

following 192 IgG-saporin-induced lesions of the medial prefrontal cortex. Cereb Cortex. 14: 922-32.

[20] Daselaar SM, Veltman, DJ, Rombouts SARB, Raaijmakers JGW, Jonker C. (2003) Neuroanatomical correlates of episodic encoding and retrieval in young and elderly subjects. Brain. 126: 43-56.

[21] De Bruin JPC, Moita MP, de Brabander HM, Joosten RN (2001) Place and response learning of rats in a Morris water maze: differential effects of fimbria fornix and medial prefrontal cortex lesions. Neurobiol Learn Mem. 75: 164-178.

[22] Delatour B and Gisquet-Verrier P. (1999) Lesions of the prelimbic-infralimbic cortices in rats do not disrupt response selection processes but induce delay-dependent deficits: evidence for a role in working memory? Behav Neurosci. 113: 941-55.

[23] Delatour B and Gisquet-Verrier P. (2000) Functional role of rat prelimbic-infralimbic cortices in spatial memory: evidence for their involvement in attention and behavioural flexibility. Behav Brain Res. 109: 113-28.

[24] Devan BD and White NM. (1999) Parallel information processing in the dorsal striatum: relation to hippocampal function. J Neurosci. 19: 2789-98.

[25] Dias R and Aggleton JP. (2000) Effects of selective excitotoxic prefrontal lesions on acquisition of nonmatching- and matching-to-place in the T-maze in the rat: differential involvement of the prelimbic-infralimbic and anterior cingulate cortices in providing behavioural flexibility. Eur J Neurosci. 12: 4457-66.

[26] Dias R and Honey RC. (2002) Involvement of the rat medial prefrontal cortex in novelty detection. Behav Neurosci. 116: 498-503.

[27] Dodart JC, Mathis C, Saura J, Bales KR, Paul SM, Ungerer A. (2000) Neuroanatomical abnormalities in behaviorally characterized APP(V717F) transgenic mice. Neurobiol Dis. 7(2):71-85.

[28] Dudchenko PA. (2001) How do animals actually solve the T maze? Behav Neurosci. 115: 850-60.

[29] Dudchenko PA. (2004) An overview of the tasks used to test working memory in rodents. Neurosci Biobehav Rev. 28: 699-709.

[30] Eichenbaum H. (2000) A cortical-hippocampal system for declarative memory. Nat Rev Neurosci. 1(1):41-50.

[31] Eichenbaum H and Cohen NJ. (2001) From conditioning to conscious recollection: memory systems of the brain. Oxford: Oxford University Press.

[32] Franklin KB and Paxinos G. (1996) The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego, CA.

[33] Fyhn M, Molden S, Witter MP, Moser EI, Moser MB. (2004) Spatial representation in the entorhinal cortex. Science. 305(5688):1258-64

[34] Gisquet-Verrier P and Delatour B. (2006) The role of the rat prelimbic/infralimbic cortex in working memory: not involved in the short-term maintenance but in monitoring and processing functions. Neuroscience. 141: 585-96.

[35] Glenner GG, Wong CW. (1984) Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. Biochem Biophys Res Commun. 122(3):1131-5.

[36] Goedert M, Wischik CM, Crowther RA, Walker JE, Klug A. (1988) Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. Proc Natl Acad Sci USA. 85(11):4051-5.

[37] Gordon MN, King DL, Diamond DM, Jantzen PT, Boyett KV, Hope CE, Hatcher JM, DiCarlo G, Gottschall WP, Morgan D, Arendash GW. (2001) Correlation between cognitive deficits and Aβ deposits in transgenic APP + PS1 mice. Neurobiol Aging. 22: 377-386.

[38] Granon S, Passetti F, Thomas KL, Dalley JW, Everitt BJ, Robbins TW. (2000) Enhanced and impaired attentional performance after infusion of D1 dopaminergic receptor agents into rat prefrontal cortex. J Neurosci. 20: 1208-15.

[39] Guillou JL, Micheau J, Jaffard R (1999) Intrahippocampal injections of cysteamine improve the retention of a bar-pressing task in mice. Behav Brain Res. 103:113–117.

[40] Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser MB, Moser EI. (2005) Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. Nature. 436(7052):801-6.

[41] Honig WK. (1978) Studies of working memory in the pigeon. In: Honig WK, editor. Cognitive processes in animal behavior: 211–48.

[42] Jarrard LE. (1993) One the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. Behav Neural Biol. 60:9–26.

[43] Lacroix L, White I, Feldon J (2002) Effects of excitotoxic lesions of rat medial prefrontal cortex on spatial memory. Behav. Brain Res. 133: 69-81.

[44] Lee I, Kesner RP. (2003) Differential roles of dorsal hippocampal subregions in spatial working memory with short versus intermediate delay. Behav Neurosci. 117(5):1044-53.

[45] Locascio JJ, Growdon JH, Corkin S. (1995) Cognitive test performance in detecting, staging, and tracking Alzheimer's disease. Arch Neurol. 52: 1087-99.

[46] Lovasic L, Bauschke H, Janus C. (2005) Working memory impairment in a transgenic amyloid precursor protein TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. Genes Brain Behav. 4:197-208.

[47] Matus-Amat P, Higgins EA, Barrientos RM, Rudy JW. (2004) The role of the dorsal hippocampus in the acquisition and retrieval of context memory representations. J Neurosci. 24: 2431-2439.

[48] Martel G, Blanchard J, Mons N, Gastambide F, Micheau J, Guillou JL. (2007) Dynamic interplays between memory systems depend on practice: The hippocampus is not always the first to provide solution. Neuroscience. 150: 743–753.

[49] Maruki K, Izaki Y, Hori K, Nomura M, Yamauchi T. (2001) Effects of rat ventral and dorsal hippocampus temporal inactivation on delayed alternation task. Brain Res. 895:273-6.

[50] Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. Proc Natl Acad Sci USA. 82:4245-9.

[51] McNab F, Klingberg T. (2008) Prefrontal cortex and basal ganglia control access to working memory. Nat Neurosci. 11:103-7.

[52] Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, DiCarlo G, Wilcock D, Connor K, Hatcher J, Hope C, Gordon M, Arendash GW. (2000) A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. Nature. 408: 982-5.

[53] Morris RG, Hagan JJ, Rawlins JN. (1986) Allocentric spatial learning by hippocampectomised rats: a further test of the 'spatial mapping' and 'working memory' theories of hippocampal function. Q J Exp Psychol B: Comp Physiol Psychol. 38:365–95.

[54] Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kayed R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. Neuron 39, 409-21.

[55] Palop JJ, Chin J, Roberson ED, Wang J, Thwin MT, Bien-Ly M, Too J, Ho KO, Yu G, Kreitzer A, Finkbeiner S, Noebels JL, Mucke L. (2007) Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. Neuron 55, 697-711.

[56] Petersen RC. (2001) Current concepts in mild cognitive impairment. Arch Neurol. 58: 1985-1992.

[57] Ragozzino ME, Detrick S, Kesner RP. (1999) Involvement of the prelimbic-infralimbic areas of the rodent prefrontal cortex in behavioral flexibility for place and response learning. J Neurosci. 19: 4585-94.

[58] Rockenstein E, Mallory M, Mante M, Sisk A, Masliaha E. (2001) Early formation of mature amyloid-beta protein deposits in a mutant APP transgenic model depends on levels of Abeta(1-42). J Neurosci Res. 66: 573-82.

[59] Savonenko A, Xu GM, Melnikova T, Morton JL, Gonzales V, Wong MP, Price DL, Tang F, Markowska AL, Borchelt DR. (2005) Episodic-like memory deficits in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease: relationships to beta-amyloid deposition and neurotransmitter abnormalities. Neurobiol Dis. 18: 602-17.

[60] Scoville WB, Milner B. (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 20: 11-21.

[61] Selkoe DJ. (2002) Deciphering the genesis and fate of amyloid beta-protein yields novel therapies for Alzheimer disease. J Clin Invest. 110: 1375-81.

[62] Sloan HL, Good M, Dunnett SB. (2006) Double dissociation between hippocampal and prefrontal lesions on an operant delayed matching task and a water maze reference memory task. Behav Brain Res. 171(1):116-26.

[63] Small BJ, Mobly JL, Laukka EJ, Jones S, Backman L. (2003) Cognitive deficits in preclinical Alzheimer's disease. Acta Neurol Scand Suppl. 179: 29-33.

[64] Starr JM, Loeffler B, Abousleiman Y, Simonotto E, Marshall I, Goddard N, Wardlaw JM. (2005) Episodic and semantic memory tasks activate different brain regions in Alzheimer disease. Neurology. 65: 266-269.

[65] Steele RJ, Morris RG. (1999) Delay-dependent impairment of a matching-to-place task with chronic and intrahippocampal infusion of the NMDA-antagonist D-AP5. Hippocampus. 9: 118-36.

[66] Taylor CL, Latimer MP, Winn P. (2003) Impaired delayed spatial win-shift behaviour on the eight arm radial maze following excitotoxic lesions of the medial prefrontal cortex in the rat. Behav Brain Res. 147: 107-14.

[67] Thal DR, Rub U, Orantes M, Braak H. (2002) Phases of Abeta deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. Neurology 58: 1791-800.

[68] Welsh K, Butters N, Hughes J, Mohs R, Heyman A. (1991) Detection of abnormal memory decline in mild cases of Alzheimer's disease using CERAD neuropsychological measures. Arch Neurol. 48: 278-81.

[69] Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, Kotilinek L, Kawarabayashi T, Younkin LH, Carlson GA, Younkin SG, Ashe KH. (2002) The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. J Neurosci. 22(5):1858-67.

[70] Wirths O, Multhaup G, Czech C, Blanchard V, Moussaoui S, Tremp G, Pradier L, Beyreuther K, Bayer TA. (2001) Intraneuronal Abeta accumulation precedes plaque formation in beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice. Neurosci Lett. 306: 116-20.

**Figure legends**

**Figure 1:** Procedure of the working memory task. **A**: During each session of training the platform location randomly changed for each pair of trial (i.e. 4 times per session). **B**: One pair of trial was constituted of a presentation trial during when the platform was indicated by a cue, and a test trial during when the location of the platform was the same but not signaled anymore. **C**: Sequence of ITI applied between presentation and test trials for one session of the DMPT training.

**Figure 2:** Panel **A** represents global level of swim speed during presentation and test trials. Panels **B** and **C** represent animals' performance, expressed as distance covered to reach the platform, during the presentation trials (**B**) and the test trials (**C**) of the MPT. Panel **D** represents animals' performance during the DMPT. Panel **E** represents the number of crossing of the previous platform location during the DMPT. Panel **F** represents the number of potential platform location crossed during the DMPT. Panel **G** shows examples of mice trajectories in the water maze during the DMPT.

**Figure 3:** Illustration of maximum and minimum extent of mPFC (**A**) and dHPC (**C**) lesions and representative photomicrographs of mPFC lesions (**B**) and dHPC (**D**) compared to sham.

**Figure 4:** Panels **A** and **E** represents global level of swim speed of animals with mPFC (**A**) or dHPC lesions (**E**) with corresponding sham controls in the working memory task. Statistical analyses revealed that both mPFC and dHPC lesioned animals displayed significantly lower swim speed than sham controls although the global swimming pattern was similar for all groups. Panels **B**,**C**,**D** and **F**,**G**,**H** represent performances of animals with mPFC or dHPC lesions respectively with corresponding sham controls in the working memory task expressed as distance covered to reach the submerged platform during the training phase (presentation trials: **B** for mPFC and **F** for dHPC; test: **C** for mPFC and **G** for dHPC) and the testing phase (**D** for mPFC and **H** for dHPC). Animals with mPFC lesions were impaired during the presentation trials of the training phase compared to sham controls (**B**). Animals with dHPC lesions were impaired in the testing phase when the ITI increase (**H**).

**Figure 5:** Panels **A** and **E** represent global level of swim speed of $APP_{751SL}$ mice and their WT littermates in the working memory task. Statistical analyses showed that both 5-6 months (**A**) and 7-8 months old (**E**) $APP_{751SL}$ mice displayed similar swim patterns as WT control littermates. Panels **B**,**C**,**D** and **F**,**G**,**H** represent performances of $APP_{751SL}$ mice and their WT littermates in the working memory task expressed as distance covered to reach the submerged platform during the training phase (presentation trials: **B** for 5-6 months and **F** for 7-8 months of age; test trials: **C** for 5-6 months and **G** for 7-8 months of age) and the testing phase (**D** for 5-6 months and **H** for 7-8 months of age). $APP_{751SL}$ mice of 7-8 months of age were impaired in the testing phase when the ITI increase (**H**).

**Figure 6:** Analysis of β-amyloid load in $APP_{751SL}$ mice. $A\beta_{1-42}$ levels were significantly higher for $APP_{751SL}$ mice of 7-8 months of age compared to 5-6 months of age transgenic animals in the hippocampus, the frontal cortex and the striatum (**A**). A significant positive correlation was observed between the $A\beta_{total}$ levels in the hippocampus and animals' performances in the DMPT for the 1h-ITI (**B**).

Figure 1

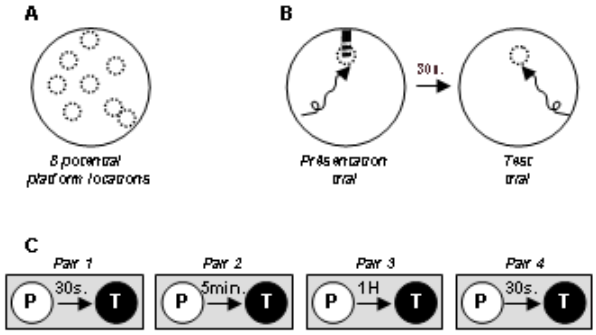

A
8 potential
platform locations
B
30s.
Presentation
trial
Test
trial
C
Pair 1
30s.
P
T
Pair 2
5min.
P
T
Pair 3
1H
P
T
Pair 4
30s.
P
T

Figure 2

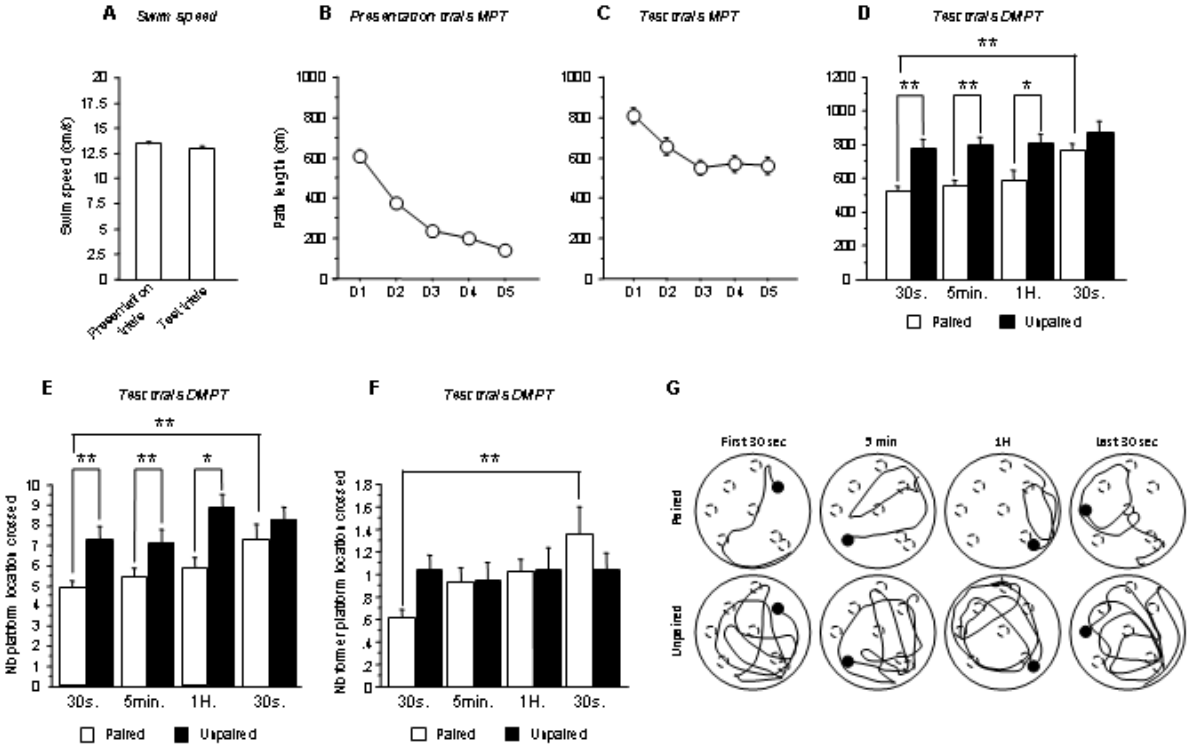

A Swim speed
Swim speed (cm/s)
Presentation trials
Test trials
B Presentation trials MPT
Path length (cm)
D1 D2 D3 D4 D5
C Test trials MPT
D1 D2 D3 D4 D5
D Test trials DMPT
30s. 5min. 1H. 30s.
Paired
Unpaired
E Test trials DMPT
Nb platform location crossed
30s. 5min. 1H. 30s.
Paired
Unpaired
F Test trials DMPT
Nb former platform location crossed
30s. 5min. 1H. 30s.
Paired
Unpaired
G
First 30 sec
5 min
1H
last 30 sec
Paired
Unpaired

Figure 3

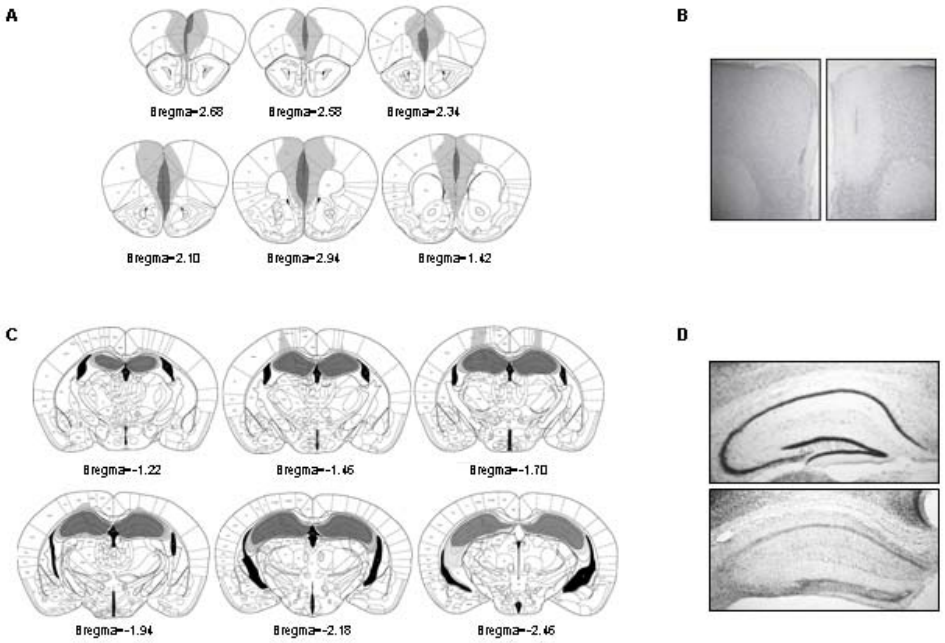

A
Bregma=2.68
Bregma=2.58
Bregma=2.34
Bregma=2.10
Bregma=2.94
Bregma=1.42
B
C
Bregma=-1.22
Bregma=-1.46
Bregma=-1.70
Bregma=-1.94
Bregma=-2.18
Bregma=-2.46
D

Figure 4

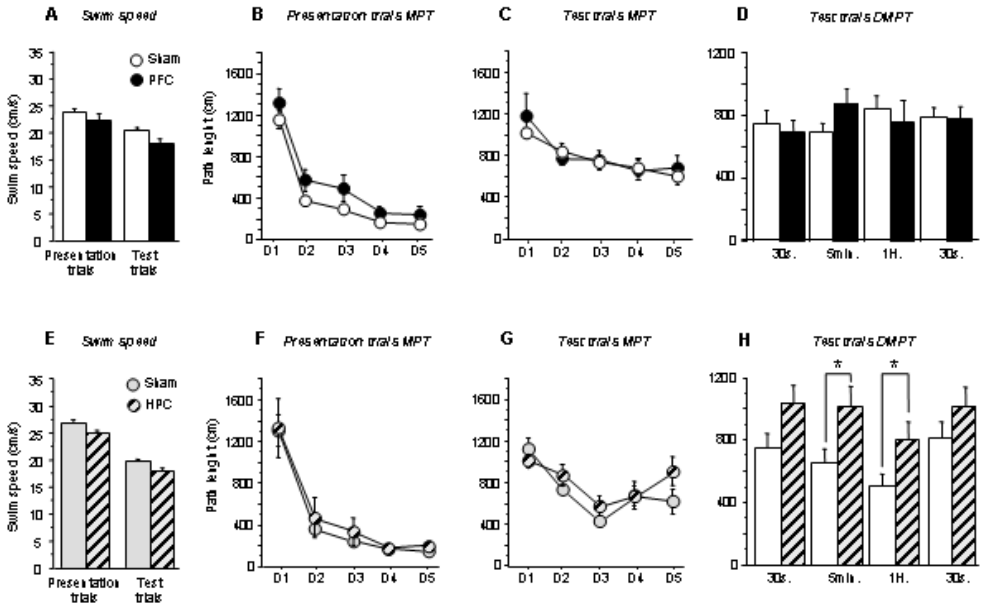

A
Swim speed
Sham
PFC
Swim speed (cm/s)
Presentation trials
Test trials
B
Presentation trials MPT
Path lenght (cm)
D1 D2 D3 D4 D5
C
Test trials MPT
D1 D2 D3 D4 D5
D
Test trials DMPT
30s.
5min.
1H.
30s.
E
Swim speed
Sham
HPC
Swim speed (cm/s)
Presentation trials
Test trials
F
Presentation trials MPT
Path lenght (cm)
D1 D2 D3 D4 D5
G
Test trials MPT
D1 D2 D3 D4 D5
H
Test trials DMPT
*
*
30s.
5min.
1H.
30s.

Figure 5

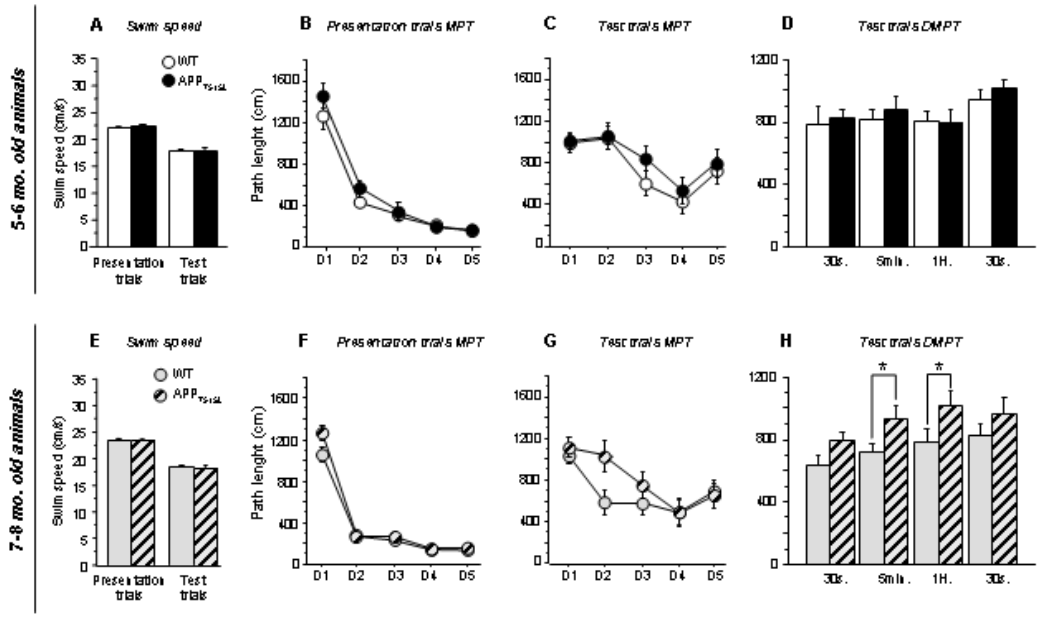
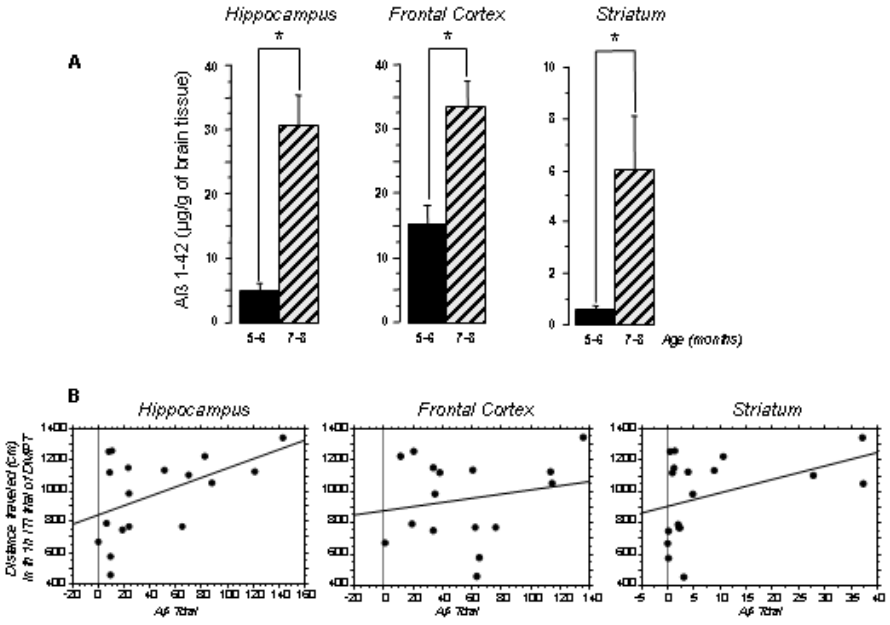

5-6 mo. old animals
7-8 mo. old animals
A Swim speed
B Presentation trials MPT
C Test trials MPT
D Test trials DMPT
E Swim speed
F Presentation trials MPT
G Test trials MPT
H Test trials DMPT
WT
APP
Swim speed (cm/s)
Path lenght (cm)
Presentation trials
Test trials
D1 D2 D3 D4 D5
30s.
5min.
1H.
30s.
*

Figure 6


A
Hippocampus
Frontal Cortex
Striatum
*
Aß 1-42 (µg/g of brain tissue)
5-6
7-8
Age (months)
B
Hippocampus
Frontal Cortex
Striatum
Aß Total

# Chronic treatment with $\Delta^9$-tetrahydrocannabinol impairs spatial memory and reduces zif268 expression in the mouse forebrain

Aurélie A. Boucher[a,b,c], Lucie Vivier[a], Mathilde Metna-Laurent[a], Laurent Brayda-Bruno[a], Nicole Mons[a], Jonathon C. Arnold[b,c] and Jacques Micheau[a]

**Few studies have investigated the effects of chronic cannabinoid exposure on memory performance and whether tolerance occurs to cannabinoid-induced memory impairment. Here, we studied the effects of repeated exposure to $\Delta^9$-tetrahydrocannabinol (THC: 1 mg/kg) on spatial memory and zif268 expression in mice. One group of animals was not pretreated with THC, whereas another group was injected with 13 daily injections of THC before memory testing in the Morris water maze. Both groups were administered with THC throughout the memory-testing phase of the experiment. THC decreased spatial memory and reversal learning, even in animals that received the THC pretreatment and were tolerant to the locomotor suppressant effects of the drug. Zif268 immunoreactivity was reduced in the CA3 of the hippocampus and in the prefrontal cortex only in non-pretreated animals, indicating that although tolerance to the effects of THC on neuronal activity was evident, cannabinoid-induced memory impairment in these animals persisted even after 24 days of exposure. This study shows that after extended administration of THC, its spatial memory-impairing effects are resistant to tolerance. *Behavioural Pharmacology* 20:45–55 © 2009 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.**

Behavioural Pharmacology 2009, 20:45–55

Keywords: cannabinoid, chronic, hippocampus, memory, mouse, tolerance, zif268

[a]CNIC, Université de Bordeaux, CNRS UMR, Talence, France, [b]School of Medical Sciences (Pharmacology) and Bosch Institute, The University of Sydney and [c]Schizophrenia Research Institute, Sydney, New South Wales, Australia

Correspondence to Dr Jacques Micheau, PhD, CNIC, CNRS UMR 5228, Université de Bordeaux, Talence 33405, France
E-mail: j.micheau@cnic.u-bordeaux1.fr

Received 15 September 2008 Accepted as revised 3 November 2008

## Introduction

Cannabis is the most widely used illicit drug in the world. Apart from its extensive recreational use, it also has some potential therapeutic relevance (Rog *et al.*, 2005; Smith, 2005). One limitation of cannabis use is that its consumption induces cognitive impairments (Solowij *et al.*, 1995; Fletcher *et al.*, 1996), as well as structural and functional brain alterations (Jentsch *et al.*, 1998; Kanayama *et al.*, 2004; Yucel *et al.*, 2008). Thus, developing a better insight of the chronic effects of cannabinoids on cognition is of critical importance for understanding the adverse effects of this drug.

Long-term cannabis users exhibit neuropsychological deficits such as impairments in memory and attention (Solowij *et al.*, 2002; Messinis *et al.*, 2006). In laboratory animals, the acute administration of the main psychoactive constituent of cannabis, $\Delta^9$-tetrahydrocannabinol (THC), induces deficits in cognitive processes (Lichtman and Martin, 1996; Varvel *et al.*, 2001; Da and Takahashi, 2002). Although the acute effects of cannabinoids are well documented, the long-term effects of the drug on learning and memory have received less attention. With chronic treatment, many of the effects of cannabinoids are diminished – a phenomenon known as tolerance. Tolerance develops to the characteristic effects of cannabinoids at different rates; for example, it develops more rapidly to cannabinoid-induced hypothermia than locomotor suppression (Whitlow *et al.*, 2003; Gonzalez *et al.*, 2005). Little is known about tolerance to the memory disruptive effects of cannabinoids, with a few human and animal studies suggesting that cannabinoid-induced memory impairment is more resistant to the development of tolerance (Nakamura *et al.*, 1991; Deadwyler *et al.*, 1995; Nava *et al.*, 2001; Solowij *et al.*, 2002; Hampson *et al.*, 2003). This difference in the time-course of the development of tolerance to the effects of cannabinoids is of particular interest in animal models of behaviour, given that it is often difficult to dissociate the specificity of learning perturbations from the confounding effects of these drugs on motor activity.

The memory impairments promoted by cannabinoids seem to more strongly impact spatial memory (Ferrari *et al.*, 1999; Varvel *et al.*, 2001; Da and Takahashi, 2002; Fadda *et al.*, 2004). This hippocampus-mediated form of learning can be evaluated in animals using the Morris water maze. Using this paradigm, different tasks can be examined to differentiate between reference and working memory (Varvel *et al.*, 2001). Reference memory is

0955-8810 © 2009 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins

DOI: 10.1097/FBP.0b013e3283242f6a

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

evaluated in the place version of the water maze where the platform remains at a constant location, whereas working memory is usually studied by changing the location of the platform to assess behavioural flexibility, a process that is impaired with cannabinoid administration (Egerton *et al.*, 2005; Hill *et al.*, 2006). As memory is strongly regulated by the hippocampus, we also aimed to evaluate the chronic effects of THC on the brain by measuring zif268 expression. Zif268 (also known as krox-24, NGFI-A or egr-1) is an immediate early gene that is involved in learning and memory processes (Bozon *et al.*, 2002). This transcription factor is abundant in the hippocampus where cannabinoids normally increase its expression (Derkinderen *et al.*, 2003), an effect postulated to subserve the memory impairments promoted by these drugs (Lichtman *et al.*, 1995; Egashira *et al.*, 2002).

The doses of THC used by earlier mouse studies to promote deficits in working memory range were between 3 and 10 mg/kg (Varvel *et al.*, 2001; Da and Takahashi, 2002; Varvel *et al.*, 2005; Niyuhire *et al.*, 2007). Here, we aimed to assess whether deficits in reversal learning in mice also occur using a lower dose of THC (1 mg/kg) that is more relevant to those administered by humans. Furthermore, we aimed to evaluate whether the extended administration of THC induces memory deficits that persist even after the animals have developed tolerance to the locomotor suppressant effects of the drug. In addition, we measured the underlying neuronal substrates that may be responsible for such effects by analysing zif268 expression in the brain.

## Methods

### Subjects

Male adult C57BL/6J mice (weighing 23–28 g at the beginning of the experiment) were obtained from Charles River (Lyon, France). Animals were housed at 22–23°C under a 12-h light/dark cycle (07.00 h on) with food and water freely available. One week before the experiment, animals were separated into individual home cages and handled for 2–3 min/day during all the experiment to minimize nonspecific stress. Experiments were performed in accordance with the guidelines on the ethical use of animals from the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

### Apparatus

Learning in the Morris water maze was evaluated using a pool that measured 150 cm in diameter and 55 cm in height, placed in a room maintained at 23–25°C under constant lighting with many extra-maze cues posted on walls. It was filled with 21 ± 1°C water up to 15 cm of the top and made opaque by addition of white nontoxic paint. A hidden platform of 13 cm in diameter was submerged 5 mm below the surface. Its location could be indicated to the animals by placing a 15-cm high and 4-cm diameter intramaze cue on the submerged platform. A video camera mounted above the pool was used to record swim trials. Swim speed, escape latency (time to reach the platform), time spent in the target quadrant (where the platform should be during the probe trial) and animals' paths were recorded and analysed using an automated tracking system (Videotrack, Lyon, France).

A different set of animals was tested for locomotor activity using an activity meter (Imetronic, Pessac, France). Animals were placed individually in the boxes of the apparatus immediately after the injection with THC or vehicle (Veh), for 1 h under light exposure and without food or water availability.

### Memory testing in the water maze

For this experiment, mice were separated into two groups (Fig. 1). Animals in the non-pretreated (NPT) group were administered with daily injections of THC (1 mg/kg) or Veh, 30 min before testing in the water maze on days 1–11 (behavioural testing phase). Animals in the pretreated (PT) group received 13 daily injections of THC (1 mg/kg) or Veh before the behavioural testing phase where, such as NPT animals, these animals continued to receive THC or Veh on each day of testing. Therefore, such a design yields four treatment groups: PT-Veh, PT-THC, NPT-Veh and NPT-THC.

On this first day of the behavioural testing phase, animals received a pretraining session consisting of two cued trials where the hidden platform was indicated by a visual intramaze cue. Then the acquisition started and mice were tested for spatial reference memory. Each animal was trained to find the hidden platform kept at the same location for one session of four trials per day for 9 days. Mice were released from a random location and were allowed to swim until they found and climbed on the platform or until a maximum of 90 s has elapsed. If a mouse did not find the platform, it was gently guided to the platform by hand where it was left for 20 s and then dried and returned to its home cage placed in a heating box. Mice were trained in groups of four animals, allowing an intertrial interval of 15 min for each mouse. One hour after the end of the last session of the acquisition, mice were tested in a probe trial during 60 s where the platform was removed from the water maze.

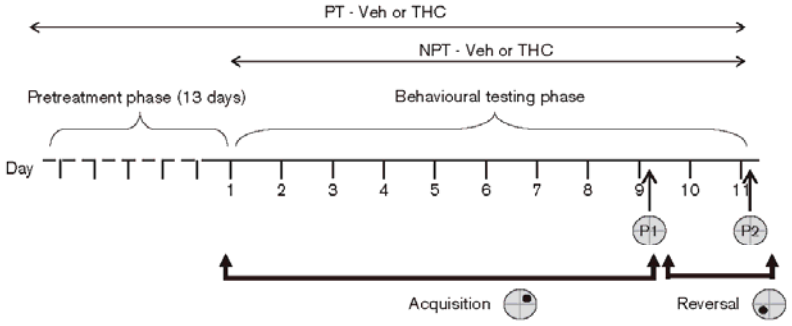
After 9 days of acquisition, mice were submitted to a reversal test where the platform location was moved to the opposite quadrant to evaluate the behavioural and cognitive flexibility of the animals. Mice were tested in two sessions of four trials separated by 24 h. One hour after the end of these reversal trials, mice were again submitted to a probe trial during 60 s where the platform was removed from the water maze.

### Immunohistochemistry

Home cage control animals (quiet cont group) did not receive any injections and were not behaviourally tested.

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

**Fig. 1**




Animals were separated in two groups: non-pretreated (NPT) mice were administered with vehicle (Veh) or $\Delta^9$-tetrahydrocannabinol (THC) (1 mg/kg) during the behavioural testing phase in the water maze ($n=12$ per group). Pretreated (PT) animals were administered with Veh or THC (1 mg/kg) for 13 days before the behavioural testing phase and, like the NPT group, until the end of the experiment ($n=12$ per group). The behavioural testing phase consisted of 9 days of acquisition of the spatial reference memory task where the location of the platform remained constant, followed by 2 days of reversal where the location of the platform was changed. Animals were also tested in the first probe trial (P1) at the end of the acquisition on day 9, and for the second probe trial (P2) at the end of the reversal on day 11.

Ninety minutes after the last probe trial, animals were anaesthetized with an intraperitoneal injection of avertin and perfused transcardially with 100 ml of 4% paraformaldehyde in 0.1 mol/l phosphate buffer (PB) at pH 7.4. Brains of animals kept in their home cages were also harvested as controls. The brains were removed and postfixed in paraformaldehyde for 20 h. For cryoprotection, brains were placed in 30% sucrose until they sunk. Brains were then sliced into 50 µm in a frozen microtome.

Tissues were stored in cryoconservation solution at −20°C until the staining was performed. For immunohistochemistry, free-floating sections were washed four times for 10 min in PB before being incubated in 0.5% hydrogen peroxide for 30 min. After four washes in 0.9% NaCl, sections were incubated in 1% bovine serum albumin (BSA), 0.2% Triton X100 (TX) (PB–BSA–TX) for 30 min at room temperature. Sections were then stained with the zif268 primary antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) diluted at 1 : 5000 in PB–BSA–TX for 24 h at 4°C under shaking. After four washes in PB containing 0.2% TX (PB–TX), sections were incubated in biotinylated antirabbit secondary antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA) diluted at 1 : 2000 in PB–BSA–TX for 2 h at room temperature while undergoing shaking. Sections were washed again four times in PB–TX and transferred to an avidin-biotin-peroxydase solution (Sigma, France) for 2 h at room temperature and protected from the light. Sections were washed four times in PB and three times in 0.05 mol/l Tris–HCL (pH 7.5). The peroxidase activity was visualized by placing the tissue in 0.037% diaminobenzidine tetrahydrochloride diluted in Tris–HCl and 0.015% hydrogen peroxidase for 5–15 min protected from light. The reaction was terminated by four washes in 0.05 mol/l Tris–HCl and tissues were stored in PB containing 0.2 g/l Azide (Sigma). Sections were then mounted onto slides, air dried, dehydrated in toluene and coverslipped. Quantitative densitometry was performed on the images of digitized brain sections using Biocom Visiolab 2000 software (Biocom, Paris, France). Each structure was counted five to eight times depending on the quality of the section. Results are indicated by number of reactive cells by unit of surface.

### Drug treatment

THC (25 mg/ml; Sigma) was dissolved at 5 mg/ml in ethanol. This preparation was emulsified in a solution at 2.5 mg of polysorbate 80 (Sigma) per ml of ethanol. Ethanol was then evaporated at room temperature using a rotary concentrator–evaporator (SpeedVac System, Fisher Scientific, Illkirch, France) for 20 min under a pressure of 5.1 bars. The residue was resuspended in NaCl (0.9%) and sonicated for a final THC concentration of 0.1 mg/ml. The same protocol where ethanol was used in replacement of THC was used to prepare the Veh. THC (1 mg/kg) or Veh were administered intraperitoneally at a volume of 10 ml/kg.

### Statistical analysis

Data from the water maze were analysed using two-way repeated-measures analysis of variance (ANOVA) where the between-subjects factors were treatment (Veh or THC) and group (PT or NPT), and trial or session (day) were the repeated measure. When needed, data were examined for each day separately by two-way ANOVA and further analysed using Tukey's post-hoc test. Data from locomotor activity were analysed using one-way repeated-

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

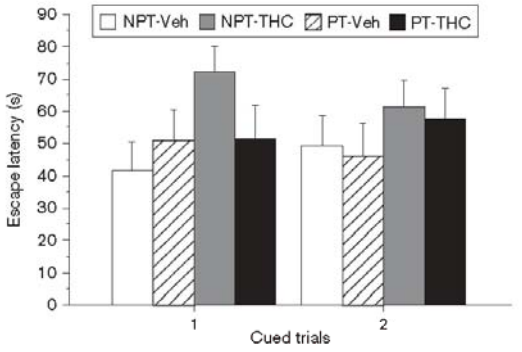
measures ANOVA where the between-subjects factor was treatment (Veh or THC), and day as the repeated measure. Data from immunohistochemistry were analysed using a Student's *t*-test. A significant level of *P* value of less than 0.05 was chosen for all comparisons.

## Results

### Swim speed

As cannabinoids have sedative effects, we analysed the swim speed of the animals during all phases of the water maze test to assess whether motor impairment would persist when animals were placed in the water and forced to swim (data not shown). No overall effect of THC treatment was observed on swim speed over days of testing [$F(1,44) = 1.32$, NS] whether the animals were pretreated or not. When analysing the different days separately, no effect of THC on swim speed was observed as measured on the first trial of each day. As observed during the tasks, all animals were able to swim and climb onto the platform. Taken together, these results show that THC treatment did not alter the swimming capability of the animals.

**Fig. 2**




Escape latency in the two cued trials before the beginning of the acquisition on the 1st day of the behavioural testing phase in animals ($n = 12$ per group) pretreated (PT) or non-pretreated (NPT) with either vehicle (Veh) or $\Delta^9$-tetrahydrocannabinol (THC) (1 mg/kg). Data are presented as mean + SEM.

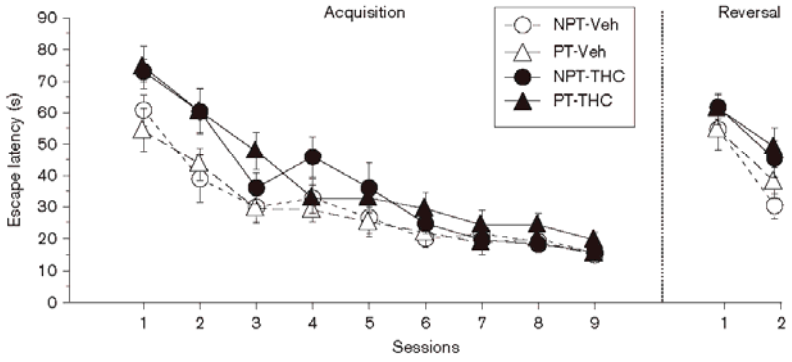
### Cued trials

On the first day of behavioural testing before the beginning of the acquisition task, animals received a pretraining session consisting of two cued trials where the platform was indicated by a visual cue (Fig. 2). A trend for THC treatment to increase escape latency was observed during the first cued trial [$F(1,44) = 2.88$, $P = 0.097$]. Tukey's post-hoc test revealed that THC only reduced escape latency in NPT mice ($P < 0.05$). However, this effect was transient as it was not observed on the second trial, and all animals were able to perform the task, suggesting that THC did not impair visual ability and the procedural aspect of the experiment.

### Acquisition of the spatial reference memory task

Escape latencies for all sessions (average of the four trials per day) of acquisition and reversal are shown in Fig. 3. During acquisition, animals learnt where to find the platform, as highlighted by a decreased escape latency over days [session: $F(8,352) = 58.27$, $P < 0.001$]. Interestingly, THC increased escape latency over days [treatment: $F(1,44) = 9.62$, $P < 0.01$] and a significant treatment by

**Fig. 3**




Escape latency for each session (four trials per day) of acquisition of the spatial memory task (days 1–9) and reversal of the platform location (days 10–11) in animals ($n = 12$ per group) pretreated (PT) or non-pretreated (NPT) with either vehicle (Veh) or $\Delta^9$-tetrahydrocannabinol (THC) (1 mg/kg). Data are presented as mean ± SEM.

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

session interaction was also observed [$F(8,352) = 2.29$, $P < 0.05$]. To increase the accuracy of these results, we then analysed each session separately. We observed that THC impaired acquisition of the task on days 1 [$F(1,44) = 8.13$, $P < 0.01$], 2 [$F(1,44) = 8.14$, $P < 0.01$] and 3 [$F(1,44) = 5.17$, $P < 0.05$], with no difference observed on the other days. These results show that, independently of whether they received a pretreatment or not, THC-treated animals learnt the location of the platform slower than Veh-treated animals.

**Reversal of the spatial memory**

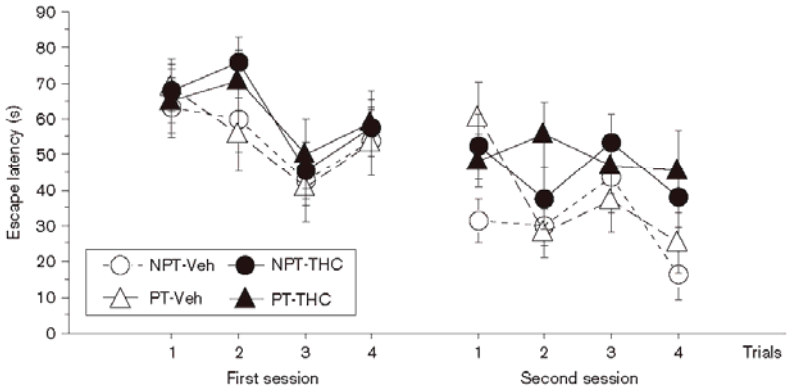
During the reversal phase (Fig. 3), the platform location was changed to assess learning flexibility of the animals. On the first session of the reversal on day 10, all animals showed an increased latency to reach the platform, compared with the last session of acquisition, as they had to learn a new position of the platform. This is highlighted by a significant session effect between days 9 and 10 [$F(1,44) = 260.83$, $P < 0.001$]. On the second session of reversal (day 11), the escape latency of all animals decreased compared with the first one, as shown by a significant effect of the session between days 10 and 11 [$F(1,44) = 27.34$, $P < 0.001$]. This shows that the animals started to learn the new location of the platform. Interestingly, although no effect of THC was observed on the last days of acquisition, the reversal of the platform triggered a learning deficit in THC-treated animals during the reversal [treatment: $F(1,44) = 5.93$, $P < 0.05$]. When analysing the sessions of reversal separately, a treatment effect was observed on day 11 [$F(1,44) = 6.03$, $P < 0.05$], showing that THC impaired performance in the reversal phase, reducing the ability of the animals to learn the new location of the platform. Similarly, to the beginning of the acquisition, THC treatment impaired the escape latency whether the animals received a pretreatment or not.

To gain a more detailed insight into our results, we then analysed the different trials of the two sessions of reversal separately (Fig. 4). A trend for an effect of THC treatment was observed on the second trial of the first session of reversal [$F(1,44) = 3.01$, $P=0.09$], but not on the first trial when animals had to find the new location of the platform. This THC-induced impairment in performance observed on the second trial of the first day of reversal was accentuated on the second day, as highlighted by a significant effect of THC treatment on trials two [$F(1,44) = 5.19$, $P < 0.05$] and four [$F(1,44) = 5.31$, $P < 0.05$] of the second session. These results are consistent with the interpretation that THC impaired working memory during the reversal.

**Probe trials**

The results from the probe trials are shown in Fig. 5. The first probe trial was carried out 1 h after the end of the acquisition on day 9. The platform was removed from the water maze and we measured the time spent in the target quadrant where the platform was formerly located during the acquisition. Consistent with results from escape latencies on the last days of acquisition, all animals spent the same time in the target quadrant as shown by the absence of treatment effect [$F(1,44) = 0.12$, NS]. In addition, all animals were above chance level in the time spent exploring the target quadrant ($P < 0.001$), showing that all animals had learnt the location of the platform at the end of the acquisition (Fig. 5a; P1 TQ1). We also measured the latency for the first platform location crossing (Fig. 5b). In the first probe test, we observed that THC-treated mice exhibited a significant increased latency

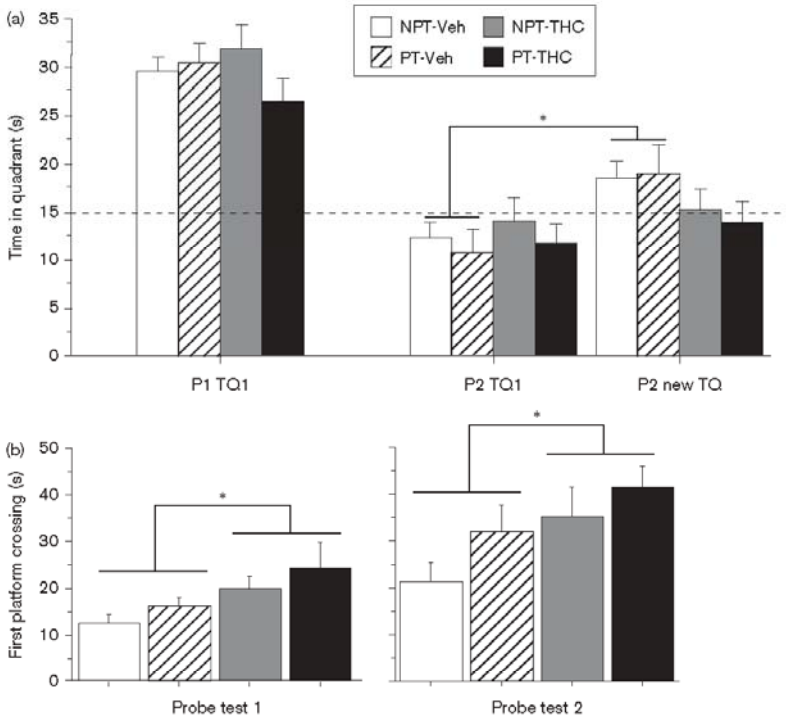
**Fig. 4**




Detail of the four trials of the two sessions of reversal in animals ($n = 12$ per group) pretreated (PT) or non-pretreated (NPT) with either vehicle (Veh) or $\Delta^9$-tetrahydrocannabinol (THC) (1 mg/kg). Data are presented as mean ± SEM.

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

**Fig. 5**

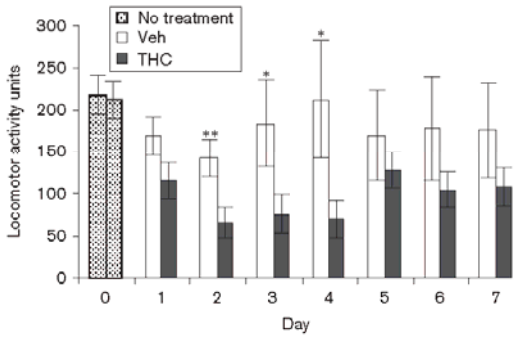



(a) Time spent in the different target quadrants (TQ) during the two probe trials. The first probe (P1) occurred 1 h after the end of the acquisition (i.e. on day 9) and the second probe (P2) occurred 1 h after the end of the reversal (i.e. on day 11). (b) Latency to cross the platform location for the first time in animals ($n=12$) pretreated (PT) or non-pretreated (NPT) with either vehicle (Veh) or $\Delta^9$-tetrahydrocannabinol (THC) (1 mg/kg). Data are presented as mean + SEM. Significant effects are indicated by $^*P<0.05$. The dashed line represents chance level.

to cross the platform compared with Veh-treated animals [$F(1,44) = 5.3$, $P < 0.05$] and this effect was independent of the treatment condition [$F(1,44) = 2.53$, NS].

One hour after the end of the second session of reversal on day 11, a second probe trial was carried out to compare whether animals swam in the new target quadrant or in the old one where the platform was during the acquisition. No effect of THC was observed on the time spent in the old target quadrant [$F(1,44) = 0.47$, NS]. In addition, as shown in Fig. 5a (P2 TQ1) all animals, irrespective of treatment group, explored this quadrant below chance level. This shows that all mice stopped exploring the quadrant where the platform was located during the acquisition. In the new target quadrant, THC increased the latency to first cross the location of the platform [$F(1,44) = 4.8$, $P < 0.05$] (Fig. 5b; probe test 2). Supporting this result, a trend for THC to decrease the time spent in the new target quadrant was observed [$F(1,44) = 3.38$, $P = 0.07$] (Fig. 5a; P2 newTQ).

**Fig. 6**




Tolerance to locomotor activity in animals ($n=5$–6) treated with vehicle (Veh) or $\Delta^9$-tetrahydrocannabinol (THC) (1 mg/kg). Data are presented as mean + SEM. Significant effects are indicated by $^*P<0.05$ and $^{**}P<0.01$.

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

Importantly, Veh-treated animals spent more time (above chance level) in the new target quadrant than in the old one [$F(1,22) = 6.09$, $P < 0.05$], showing that they have started to learn the new location of the platform. THC-treated animals were, however, at chance level in both the new and the old quadrants. Taken together, these results show that THC impaired reversal learning in the water maze.

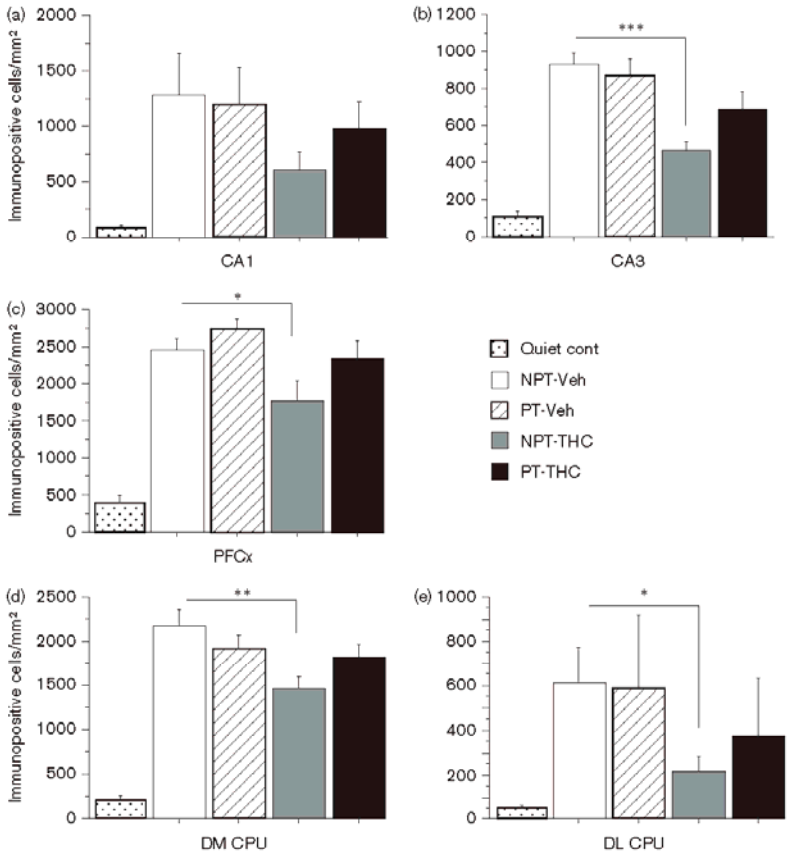
### Locomotor activity

We also measured locomotor activity, using another set of animals (Fig. 6). No difference was observed between the animals on day 0 before the beginning of the drug administration. Using one-way repeated measure ANOVA, we showed that the THC treatment decreased locomotor activity over days [$F(1,54) = 5.48$, $P < 0.05$]. The analysis of each day separately showed that THC reduced locomotor activity on days 2 [$F(1,9) = 14.84$, $P < 0.01$], 3 [$F(1,9) = 5.94$, $P < 0.05$] and 4 [$F(1,9) = 6.84$, $P < 0.05$]. From the 5th day of treatment, no significant difference was seen between Veh-treated and THC-treated mice, showing that animals became tolerant to the locomotor suppressant effect of THC.

### Immunohistochemistry

The number of zif268 immunoreactive cells for different regions are shown in Fig. 7. Analysis with Student's *t*-test showed that in animals that were not pretreated (NPT-Veh compared with NPT-THC), THC decreased zif268 expression in the CA3 of the hippocampus ($P < 0.001$),

**Fig. 7**




Number of zif268 immunopositive cells in (a) CA1 and (b) CA3 of the hippocampus, (c) the prefrontal cortex (PFCx) and (d) the dorsomedial (DM) and (e) the dorsolateral (DL) caudate putamen (CPU) in animals ($n = 6$ per group) were pretreated (PT) or non-pretreated (NPT) with either vehicle (Veh) or $\Delta^9$-tetrahydrocannabinol (THC) (1 mg/kg). Animals from 'quiet cont' group did not receive any injection and were not trained ($n = 6$). Data are presented as mean+SEM. Significant effects are indicated by $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.001$.

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

in the dorsomedial ($P < 0.01$) and dorsolateral ($P < 0.05$) part of the caudate putamen and in the prefrontal cortex ($P < 0.05$). No significant effects of THC were observed in animals that received pretreatment with THC (PT-Veh compared with PT-THC).

## Discussion

The main results from this study are that animals treated with a relatively low dose of THC, whether they have been pretreated or not, had a deficit in learning of the spatial reference memory task. However, they eventually acquired the task like control animals. During the reversal phase, although both NPT and PT animals were tolerant to the locomotor suppressant effects of THC, the drug impaired cognitive flexibility of the animals as they did not learn the new location of the platform as rapidly as controls. This highlights a long-lasting cognitive deficit in these animals, as even after 24 days of exposure to the drug, PT mice still had not developed tolerance to this effect. Immunohistochemical analysis revealed that THC decreased zif268 expression in the CA3 of the hippocampus, in the prefrontal cortex and in the dorsomedial and dorsolateral caudate putamen only in animals that did not receive a pretreatment, with no effect seen in PT animals.

At the beginning of acquisition, animals were trained in two cued trials where the location of the platform was indicated by a visual cue. No significant difference between Veh-treated and THC-treated animals was observed, showing that all animals were able to find the platform. This result, together with the absence of difference in swim speed in animals treated with THC compared with Veh, suggests that THC did not induce any visual or locomotor impairment in mice exploring the water maze. These results are consistent with studies showing that, although cannabinoids impair learning in the place version of the water maze, no deficit was observed in the cued version of the water maze task using the visible platform (Ferrari *et al.*, 1999; Niyuhire *et al.*, 2007).

After the two cued trials, acquisition of the reference memory task began. Animals received four trials per session over 9 consecutive days, where the hidden platform remained in a fixed position. We observed a slower acquisition of spatial memory performance in animals treated with THC, irrespective of whether these animals were pretreated with THC for 13 days or not. Cannabinoids such as HU 210 (Ferrari *et al.*, 1999) and THC (Da and Takahashi, 2002) have previously been shown to impair learning in the place version of the water maze task. By the 9th day, no difference was observed between Veh-treated and THC-treated groups, showing that all animals had learnt the task. These results show that THC impaired the acquisition of the spatial reference memory, which can be overcome with repeated learning sessions.

For the reversal testing, the location of the platform was changed but the procedural component of the task (to swim to the platform to escape) remained unmodified. Thus, animals had to extinguish the original spatial response and learn a new one, by making new associations between the novel platform location and the surrounding spatial cues (Rossato *et al.*, 2006). On the first trial of the 1st day of reversal (day 11), an increased time to reach the platform was observed for all animals, as they had to find the new location of the platform. Interestingly, on the second trial of this day, THC-treated animals were delayed in finding the platform compared with Veh-treated animals, and this effect was accentuated on the 2nd day of reversal (Fig. 4). Using acute doses of THC higher than in this study, working memory deficits have been reported both in rats and mice (Lichtman and Martin, 1996; Varvel *et al.*, 2001). In a similar paradigm to ours, THC decreased spatial working memory on the second trial of the delayed matching-to-place paradigm in the water maze when administered at 2 and 5 mg/kg (Fadda *et al.*, 2004). In line with these data, our own study, by using a relatively low dose of THC more comparable to doses used for human beings, showed working memory impairment, as evidenced by reversal deficit. Indeed, as illustrated by our data, instead of promoting perseveration responses (see below) THC seemed to alter the reactualization of the information, this capacity of flexibility being one of the properties of working memory.

The first probe trial carried out 1 h after the last acquisition trial showed that all mice explored the target quadrant above chance level, confirming that they successfully learnt the spatial reference memory task. However, although the difference between Veh-treated and THC-treated animals is quite moderate, the significantly higher latency to the first platform crossing implies a less accurate spatial response in THC-treated mice. On the second probe trial at the end of the reversal on day 11, Veh-treated animals spent more time in the new target quadrant than THC-treated animals, and above chance level. This illustrates that Veh-treated animals were again learning the new location of the platform faster than THC-treated mice. This further strengthens our interpretation that THC impaired behavioural flexibility in this model. As THC-treated animals did not learn the new platform location, this deficit in reversal might be because of an increased perseverance of the animals in returning to the previously learnt platform location. Our results, however, showed that THC-treated animals that spent less time in the new target quadrant did not spend more time in the former target quadrant. Therefore, THC-induced deficits in reversal learning are most likely explained by a specific deficit in learning the new platform location.

Interestingly, during both the reference memory and the reversal tasks, no difference was observed between

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

THC-treated PT and NPT animals, showing no differential effect of the pretreatment on learning. With repeated administration, tolerance to cannabinoid effects such as locomotor suppression or hypothermia develops rapidly (Oliva *et al.*, 2003); however, effects on memory impairment seem to be more resistant to the development of tolerance (for review, see Gonzalez *et al.*, 2005). We analysed the effect of repeated THC exposure on locomotor activity and observed that animals developed tolerance to the locomotor suppressant effects of 1 mg/kg THC after 5 days of treatment. Thus, THC-induced deficits on reference memory cannot be related to the sedative effects of cannabinoids, as NPT and PT animals exhibited the same level of performance on day 1 of acquisition. In conjunction with the absence of effects of the drug on swim speed, this strengthens the interpretation that this relatively low dose of THC promoted a specific memory deficit.

Although the acute effects of cannabinoids on memory have been widely reported, the effects of long-term cannabinoid exposure have received less attention. Interestingly, the memory deficits observed during the reversal phase were independent of whether the animals received 13 days of pretreatment before the beginning of the acquisition or not. This suggests that even after 24 days of treatment for the PT group and 11 days of treatment for the NPT group, THC was still effective in impairing memory. To our knowledge, this study is the first to report the absence of development of tolerance to cannabinoid-induced working memory impairments in mice. These results are consistent with studies using rats reporting that THC administered at 5 mg/kg impaired working memory in the radial arm maze even after 90 days of administration, 6 days per week (Nakamura *et al.*, 1991). A 2-week pretreatment with the same dose of THC injected twice daily did not modify the effect of a challenging dose of 2.5 mg/kg THC on impairment of correct alternation task in the T maze, showing that animals did not develop tolerance to working memory deficits (Nava *et al.*, 2001). The spatial working memory impairments observed with 2 and 5 mg/kg THC-rich extracts were also observed over months of dosing with brief periods of washout (Fadda *et al.*, 2004). When tolerance was observed, it only appeared after 30 days of exposure to relatively high doses of both THC (10 mg/kg) and the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 in delayed match-to-sample and delayed non-match-to-sample tasks, respectively (Deadwyler *et al.*, 1995; Hampson *et al.*, 2003). Thus consistent with earlier studies, the results from this study show that memory impairments promoted by THC, even at such a relatively low dose, are resistant to the development of tolerance. It would be interesting to examine if tolerance could be observed to the memory impairing effects with such a low dose of THC and how many days of administration beyond the 24 days examined here, would be required.

In NPT mice, THC decreased zif268 expression in hippocampal CA3 and to a lesser extent in the CA1, which is consistent with the view that the hippocampus mediates the memory impairing effects of cannabinoids (Lichtman *et al.*, 1995; Misner and Sullivan, 1999; Hampson and Deadwyler, 2000; Egashira *et al.*, 2002). Interestingly, THC exposure also reduced the expression of zif268 in the prefrontal cortex. This region is another site thought to participate in cannabinoid-induced spatial memory impairment. For example, direct administration of THC into the medial prefrontal cortex has been shown to disrupt spatial working memory (Silva de Melo *et al.*, 2005). Further, repeated THC administration in rats caused a persistent reduction in medial prefrontal cortical dopamine turnover, which was assumed to subserve, in part, the cognitive dysfunction observed in these animals (Verrico *et al.*, 2003). As memory processes are dependent on synaptic plasticity in the hippocampus and prefrontal cortex (Laroche *et al.*, 2000; Riedel and Davies, 2005), these results suggest that the THC-induced impairment of working memory observed here could be mediated by a decreased neuronal plasticity in both the hippocampus and prefrontal cortex as measured by zif268.

The decreased zif268 expression in the hippocampus and prefrontal cortex in NPT animals vanished in PT animals, although the latter did exhibit cognitive impairments, which were sometimes even more marked as assessed by the probe tests (Fig. 5). These results suggest that between 11 and 24 days of treatment, some cellular and molecular determinants of tolerance began developing which are dissociable from the memory impairing effect of THC. Interestingly, 2-week chronic THC treatment did not produce tolerance to CB1-mediated inhibition of extracellular hippocampal acetylcholine and working memory, but there was a time-course difference between these two phenomena suggesting that they might be dissociated (Nava *et al.*, 2001).

Similar to the effects of THC on the hippocampus and prefrontal cortex, THC also decreased zif268 expression in the dorsomedial and dorsolateral caudate putamen only in NPT animals. The dorsal striatum is not reported to be implicated in spatial memory (Egashira *et al.*, 2002), but recent reports have emphasized a role of the medial striatum in behavioural flexibility (McDonald *et al.*, 2008). The behavioural effects of THC on striatal function seem to fit better with this interpretation as the PT animals were tolerant to the locomotor suppressant effect of THC at the time of testing and no deficits were observed in the cued trials of the water maze task, a task supposed to be mediated by the caudate putamen (Packard and Teather, 1998).

This study examined for the first time the effects of repeated cannabinoid exposure on zif268 expression in

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

the mouse forebrain. In earlier in-situ hybridization studies, acute cannabinoid receptor agonist exposure increased the expression of zif268 mRNA in the CA1 and CA3 regions of the hippocampus (Derkinderen *et al.*, 2003), cingulate cortex, fronto-parietal cortex and the caudate-putamen (Mailleux *et al.*, 1994). Consistent with this, Glass and Dragunow (1995) showed in an immunohistochemical study that acute administration of a high dose of CP 55 940 (2.5 mg/kg) significantly increased zif268 in the striatum (CP 55 940 is approximately 30 times as potent as THC: see Arnold *et al.*, 2001a, b). Given that acutely, cannabinoids induce zif268 expression, the decrease in zif268-labelled cells, we observed here, indicates that zif268 expression is inversely regulated by repeated cannabinoid exposure. Indeed, such a phenomenon has also been reported for the psychostimulant drug, cocaine. Acutely, cocaine increased zif268 expression in the rat forebrain, however, with repeated administration it decreased basal zif268 expression (Bhat *et al.*, 1992).

In conclusion, this study showed that repeated cannabinoid exposure induced persistent memory deficits that are resistant to tolerance and may be, at least initially, regulated by diminished expression of the transcription factor zif268.

## Acknowledgements

This work was supported by grants from the French Centre National de la Recherche Scientifique [C.N.R.S] and the Conseil Régional d'Aquitaine.

## References

Arnold JC, Hunt GE, McGregor IS (2001a). Effects of the cannabinoid receptor agonist CP 55 940 and the cannabinoid receptor antagonist SR 141716 on intracranial self-stimulation in Lewis rats. *Life Sci* **70**:97–108.

Arnold JC, Topple AN, Mallet PE, Hunt GE, McGregor IS (2001b). The distribution of cannabinoid-induced Fos expression in rat brain: differences between the Lewis and Wistar strain. *Brain Res* **921**:240–255.

Bhat RV, Cole AJ, Baraban JM (1992). Chronic cocaine treatment suppresses basal expression of zif268 in rat forebrain: in situ hybridization studies. *J Pharmacol Exp Ther* **263**:343–349.

Bozon B, Davis S, Laroche S (2002). Regulated transcription of the immediate-early gene zif268: mechanisms and gene dosage-dependent function in synaptic plasticity and memory formation. *Hippocampus* **12**:570–577.

Da S, Takahashi RN (2002). SR 141716A prevents $\Delta^9$-THC-induced spatial learning deficit in a Morris-type water maze in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **26**:321–325.

Deadwyler SA, Heyser CJ, Hampson RE (1995). Complete adaptation to the memory disruptive effects of $\Delta^9$-THC following 35 days of exposure. *Neurosci Res Commun* **17**:9–18.

Derkinderen P, Valjent E, Toutant M, Corvol JC, Enslen H, Ledent C, *et al.* (2003). Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *J Neurosci* **23**:2371–2382.

Egashira N, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M (2002). Intracerebral microinjections of $\Delta^9$-THC: search for the impairment of spatial memory in the eight-arm radial maze in rats. *Brain Res* **952**:239–245.

Egerton A, Brett RR, Pratt JA (2005). Acute $\Delta^9$-THC-induced deficits in reversal learning: neural correlates of affective inflexibility. *Neuropsychopharmacology* **30**:1895–1905.

Fadda P, Robinson L, Fratta W, Pertwee RG, Riedel G (2004). Differential effects of THC- or CBD-rich cannabis extracts on working memory in rats. *Neuropharmacology* **47**:1170–1179.

Ferrari F, Ottani A, Vivoli R, Giuliani D (1999). Learning impairment produced in rats by the cannabinoid agonist HU 210 in a water-maze task. *Pharmacol Biochem Behav* **64**:555–561.

Fletcher JM, Page JB, Francis DJ, Copeland K, Naus MJ, Davis CM, *et al.* (1996). Cognitive correlates of long-term cannabis use in Costa Rican men. *Arch Gen Psychiatry* **53**:1051–1057.

Glass M, Dragunow M, (1995). Induction of the krox 24 transcription factor in striosomes by a cannabinoid agonist. *Neuroreport* **6**:241–244.

Gonzalez S, Cebeira M, Fernandez-Ruiz J (2005). Cannabinoid tolerance and dependence: a review of studies in laboratory animals. *Pharmacol Biochem Behav* **81**:300–318.

Hampson RE, Deadwyler SA (2000). Cannabinoids reveal the necessity of hippocampal neural encoding for short-term memory in rats. *J Neurosci* **20**:8932–8942.

Hampson RE, Simeral JD, Kelly EJ, Deadwyler SA (2003). Tolerance to the memory disruptive effects of cannabinoids involves adaptation by hippocampal neurons. *Hippocampus* **13**:543–556.

Hill MN, Froese LM, Morrish AC, Sun JC, Floresco SB (2006). Alterations in behavioral flexibility by cannabinoid CB1 receptor agonists and antagonists. *Psychopharmacology (Berl)* **187**:245–259.

Jentsch JD, Verrico CD, Le D, Roth RH (1998). Repeated exposure to $\Delta^9$-THC reduces prefrontal cortical dopamine metabolism in the rat. *Neurosci Lett* **246**:169–172.

Kanayama G, Rogowska J, Pope HG, Gruber SA, Yurgelun-Todd DA (2004). Spatial working memory in heavy cannabis users: a functional magnetic resonance imaging study. *Psychopharmacology (Berl)* **176**:239–247.

Laroche S, Davis S, Jay TM (2000). Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses: dual roles in working memory and consolidation. *Hippocampus* **10**:438–446.

Lichtman AH, Martin BR (1996). $\Delta^9$-THC impairs spatial memory through a cannabinoid receptor mechanism. *Psychopharmacology (Berl)* **126**:125–131.

Lichtman AH, Dimen KR, Martin BR (1995). Systemic or intrahippocampal cannabinoid administration impairs spatial memory in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **119**:282–290.

Mailleux P, Verslype M, Preud'homme X, Vanderhaeghen JJ (1994). Activation of multiple transcription factor genes by THC in rat forebrain. *Neuroreport* **5**:1265–1268.

McDonald RJ, King AL, Foong N, Rizos Z, Hong NS (2008). Neurotoxic lesions of the medial prefrontal cortex or medial striatum impair multiple-location place learning in the water task: evidence for neural structures with complementary roles in behavioural flexibility. *Exp Brain Res* **187**:419–427.

Messinis L, Kyprianidou A, Malefaki S, Papathanasopoulos P (2006). Neuropsychological deficits in long-term frequent cannabis users. *Neurology* **66**:737–739.

Misner DL, Sullivan JM (1999). Mechanism of cannabinoid effects on long-term potentiation and depression in hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci* **19**:6795–6805.

Nakamura EM, Da Silva EA, Concilio GV, Wilkinson DA, Masur J (1991). Reversible effects of acute and long-term administration of $\Delta^9$-THC on memory in the rat. *Drug Alcohol Depend* **28**:167–175.

Nava F, Carta G, Colombo G, Gessa GL (2001). Effects of chronic $\Delta^9$-THC treatment on hippocampal extracellular acetylcholine concentration and alternation performance in the T-maze. *Neuropharmacology* **41**:392–399.

Niyuhire F, Varvel SA, Martin BR, Lichtman AH (2007). Exposure to marijuana smoke impairs memory retrieval in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **322**:1067–1075.

Oliva JM, Ortiz S, Palomo T, Manzanares J (2003). Behavioural and gene transcription alterations induced by spontaneous cannabinoid withdrawal in mice. *J Neurochem* **85**:94–104.

Packard MG, Teather LA (1998). Amygdala modulation of multiple memory systems: hippocampus and caudate-putamen. *Neurobiol Learn Mem* **69**:163–203.

Riedel G, Davies SN (2005). Cannabinoid function in learning, memory and plasticity. *Handb Exp Pharmacol* **168**:445–477.

Rog DJ, Nurmikko TJ, Friede T, Young CA (2005). Randomized, controlled trial of cannabis-based medicine in central pain in multiple sclerosis. *Neurology* **65**:812–819.

Rossato JI, Zinn CG, Furini C, Bevilaqua LR, Medina JH, Cammarota M, Izquierdo I (2006). A link between the hippocampal and the striatal memory systems of the brain. *An Acad Bras Cienc* **78**:515–523.

Silva de Melo LC, Cruz AP, Rios Valentim SJ Jr, Marinho AR, Mendonca JB, Nakamura-Palacios EM (2005). $\Delta^9$-THC administered into the medial prefrontal cortex disrupts the spatial working memory. *Psychopharmacology (Berl)* **183**:54–64.

Smith PF (2005). The safety of cannabinoids for the treatment of multiple sclerosis. *Expert Opin Drug Saf* **4**:443–456.

Solowij N, Michie PT, Fox AM (1995). Differential impairments of selective attention due to frequency and duration of cannabis use. *Biol Psychiatry* **37**:731–739.

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

Solowij N, Stephens RS, Roffman RA, Babor T, Kadden R, Miller M, *et al.* (2002). Cognitive functioning of long-term heavy cannabis users seeking treatment. *JAMA* **287**:1123–1131.

Varvel SA, Hamm RJ, Martin BR, Lichtman AH (2001). Differential effects of $\Delta^9$-THC on spatial reference and working memory in mice. *Psychopharmacology (Berl)* **157**:142–150.

Varvel SA, Anum E, Niyuhire F, Wise LE, Lichtman AH (2005). $\Delta^9$-THC-induced cognitive deficits in mice are reversed by the GABA(A) antagonist bicuculline. *Psychopharmacology (Berl)* **178**:317–327.

Verrico CD, Jentsch JD, Roth RH (2003). Persistent and anatomically selective reduction in prefrontal cortical dopamine metabolism after repeated, intermittent cannabinoid administration to rats. *Synapse* **49**:61–66.

Whitlow CT, Freedland CS, Porrino LJ (2003). Functional consequences of the repeated administration of $\Delta^9$-THC in the rat. *Drug Alcohol Depend* **71**:169–177.

Yucel M, Solowij N, Respondek C, Whittle S, Fornito A, Pantelis C, Lubman DI (2008). Regional brain abnormalities associated with long-term heavy cannabis use. *Arch Gen Psychiatry* **65**:694–701.

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.