N° d'ordre : 4271

THESE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITE DE BORDEAUX

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

PAR

Matthias VANDESQUILLE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR

SPECIALITE NEUROSCIENCES

IMPLICATION DU SYSTEME CHOLINERGIQUE DANS L'ALTERATION DE LA MEMOIRE DE TRAVAIL AU COURS DU VIEILLISSEMENT CHEZ LA SOURIS.

Approche comportementale, pharmacologique et neurofonctionnelle.

Soutenue le 20 juin 2011

Devant la commission d'examen formée par :

Dr M. Daniel BERACOCHEA (CNRS UMR 5287, Univ. Bordeaux)……....…Directeur de Thèse
Dr M. Pierre LESTAGE (Institut de Recherches Servier, Croissy-sur-Seine)....Co-directeur de Thèse
Pr M. Jacques MICHEAU (CNRS UMR 5287, Univ. Bordeaux)….....…...Président du Jury
Pr Mme Catherine BELZUNG (Inserm U-930, Univ. François-Rabelais, Tours)..……Rapporteur
Pr Mme Sylvie GRANON (CNRS UMR 8195, Univ. Paris-Sud).....Rapporteur
Dr Mme Caroline LOUIS (Institut de Recherches Servier, Croissy-sur-Seine)….....Examinateur
Dr Mme Béatrice ALESCIO-LAUTIER (CNRS UMR 6149, Univ. de Provence)……Examinateur

-- 2011 --

Résumé

Nos travaux visaient à réaliser un « modèle rongeur » (souris C57Bl/6) de l'altération de la mémoire de travail (MDT) lors du vieillissement, et comparer le potentiel promnésiant de divers composés pharmacologiques. Nous montrons que des souris âgées (18-19 mois) présentent une sensibilité accrue aux interférences proactives délai-dépendantes dans une épreuve d'alternance spontanée par rapport à des souris jeunes (4-5 mois). Une étude immunohistochimique centrée sur l'activité CREB révèle que les souris âgées présentent une suractivation du cortex préfrontal (CPF) inversement corrélée aux performances. La relation entre le déficit cognitif et la suractivation du CPF est confortée par la restauration des performances suite à l'injection dans le CPF d'un inhibiteur de la kinase activatrice de CREB.

L'administration de composés cholinergiques permet de restaurer les capacités mnésiques des souris âgées par des mécanismes bien dissociés. Le donepezil, inhibiteur de l'acétylcholinestérase, augmente l'activation de l'hippocampe, alors que le S 38232, un agoniste des récepteurs nicotiniques α4β2, agit en supprimant la suractivation préfrontale. Finalement, l'utilisation de souris invalidées génétiquement pour la sous-unité β2 révèle des mécanismes de régulation complexes au sein du système cholinergique.

Nos travaux démontrent la validité de notre modèle pour l'étude des troubles de la MDT induits par le vieillissement. De plus, ils confortent des études récentes chez l'Homme indiquant un lien important entre la suractivation du CPF et le déclin cognitif lié à l'âge. Au regard de l'effet du S 38232 qui, en diminuant la suractivation préfrontale, permet de restaurer les performances de MDT, le récepteur nicotinique α4β2 apparaît comme une cible potentielle pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Mots clés : Vieillissement – Mémoire de travail – Souris – Cortex préfrontal – Hippocampe – Système cholinergique – Agoniste nicotinique – Knock-out β2.

Abstract

AGE-INDUCED WORKING MEMORY IMPAIRMENT: FOCUS ON THE CHOLINERGIC SYSTEM.

Behavioural, pharmacological and neurofonctionnal approaches.

The aim of this study was to realise a "rodent model" (C57Bl/6 mice) of age-related working memory (WM) impairments, and to evaluate the procognitive impact of several pharmacological compounds. We show that compared to young adult mice (4-5 months), aged mice (18-19 months) exhibit an exaggerated vulnerability to delay-dependant interference in a sequential spontaneous alternation task. CREB activity assessed by immunohistochemistry demonstrates that aged mice show an over-activation of the prefrontal cortex (PFC) negatively correlated with behavioural performance. Infusion of an inhibitor of CREB activation into the PFC restores WM performance in aged mice. Both results highlight the link between the PFC over-activation and the age-related cognitive deficit.

Pharmacological study reveals that cholinergic compounds restore cognitive performance of aged mice and act differently on brain structures sustaining WM. On one hand, donepezil – an inhibitor of acetylcholinesterase – increases CREB activation of the hippocampus. On the other hand, S 38232 – an agonist of α4β2 nicotinic receptors – decreases the CREB age-induced over-activation of the PFC. Finally, using β2 knock-out mice, we show that the regulation of the cholinergic system is submitted to complex mechanisms.

Overall, our experimental set up demonstrates that spontaneous alternation is a valuable model for studying age-related WM impairments. In accordance with human's findings, our results highlight the link between prefrontal over-activation and the cognitive decline occurring during ageing. Considering that S 38232, by decreasing the CPF over-activation, alleviates the WM deficit observed in aged mice, the α4β2 nicotinic receptor appears to be an efficient target for new therapeutic strategies.

Key-words: Ageing – Working memory – Mice – Prefrontal cortex – Hippocampus – Cholinergic system – Nicotinic agonist – Knock-out β2

Laboratoires d'accueil

Convention Industrielle de Formation par la REcherche,

Thèse tripartite entre :

Association Nationale de la Recherche et de la Technologie

ANRT, Service CIFRE
41, bd des Capucines
75002 Paris.

Institut de Recherches Servier

IdRS, division « Pathologie Cérébrale »
128 chemin de ronde
78290 Croissy-sur-Seine
Directeur de division : Dr Pierre Lestage

Institut des Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine

INCIA, Equipe « **EM**otion & **M**emory **I**nteractions »
Bat. B2, avenue des facultés
33400 Talence
Directeur de thèse : Dr Daniel Beracochea

Remerciements

Je commencerai tout d'abord ce manuscrit en remerciant tous ceux qui, d'une manière professionnelle et/ou personnelle, m'ont permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions.

Je tiens à remercier l'ANRT, sans qui cette collaboration entre l'IDRS et le CNRS n'aurait été possible. Ces trois collaborateurs m'ont apporté le soutien matériel et financier nécessaire à la réalisation de ce projet dans les meilleures conditions.

Je remercie l'Institut de Recherches Servier pour m'avoir permis, il y a de cela cinq ans, de réaliser mon stage de master 2 au sein de l'équipe Pathologie Cérébrale. C'est durant ce stage que s'est profilée la perspective d'une thèse en CIFRE, et l'envie qui en découle de mener à bien ce projet de collaboration entre la recherche privée et universitaire. J'ai une pensée particulière pour Isabelle Carrié ainsi que toute l'équipe de l'Institut de Recherches Servier qui, lors de ce stage, m'ont encouragé à concrétiser ce projet.

A Monsieur le Docteur Pierre Lestage, Directeur de la division Pathologie Cérébrale de l'IDRS, co-directeur de cette thèse. Les multiples échanges que nous avons eus m'ont permis de cerner la nécessité et la complexité de composer entre recherche fondamentale et recherche appliquée. Son regard scientifique sur mes travaux m'a toujours permis d'avancer dans la compréhension de mon sujet, et de conserver un aspect finalisé dans la planification des expériences. Il m'a également permis d'exposer mes résultats au Professeur Jean-Pierre Changeux afin de confronter nos hypothèses à son point de vue. Pour tout cela, je le prie de bien vouloir recevoir ici mes remerciements les plus sincères.

Je remercie particulièrement le Docteur Caroline Louis pour m'avoir soutenu et encouragé durant ces trois années de thèse. Nos échanges nous ont amené à discuter en détail de nombreux aspects de ma thèse, scientifiques bien sûr, mais également matériels et pratiques. Elle a su être le médiateur nécessaire entre l'entreprise, le laboratoire et moi-même. Je la remercie d'avoir apporté son expertise pharmacologique à mes travaux et d'avoir accepté de participer au jury de thèse. Qu'elle soit assurée de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Georges Di Scala, directeur du Centre des Neurosciences Intégratives et Cognitives, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Je garde un très bon souvenir de nos trop rares échanges, et je le remercie pour les nombreux encouragements prodigués lors de nos rencontres.

A Monsieur Jacques Micheau, Professeur des Universités à l'université de Bordeaux1, qui me fait l'honneur d'être Président de jury. C'est un peu grâce à lui si je lui là aujourd'hui, puisqu'il a dirigé le master professionnel Psychopharmacologie des Processus Cognitifs lors duquel j'ai réalisé mon stage à l'Institut de Recherches Servier. Qu'il veuille bien trouver ici ma plus grande reconnaissance.

A Madame Catherine Belzung, Professeur des Universités à l'université François Rabelais de Tours, et spécialiste reconnue pour ses travaux sur l'impact des émotions sur la mémoire. Je la remercie d'avoir participé au comité d'évaluation de mi-thèse, et d'accepter à présent d'être rapporteur de cette thèse.

A Madame Sylvie Granon, Professeur des Universités à l'université d'Orsay - Paris Sud, pour avoir acceptée de faire partie du jury en tant que rapporteur. Son expertise hautement reconnue dans le domaine de la prise de décision, et ses connaissances sur les récepteurs nicotiniques, apporteront énormément à mes réflexions et aux suites à donner à ce travail.

A Madame Béatrice Alescio-Lautier, Directeur de Recherche à l'Université de Provence de Marseille. Vos connaissances sur l'impact du vieillissement sur la mémoire, autant chez l'Homme que l'animal, apporteront un éclairage indispensable à nos travaux et leurs perspectives. Je vous remercie grandement d'avoir accepté de faire partie du jury de thèse.

Merci au Docteur Daniel Béracochea, responsable de l'équipe « *EMotion & Memory Interactions* », pour m'avoir encadré pendant ces trois années. Nous avons beaucoup échangé autant sur le plan professionnel et scientifique que personnel, ce qui m'a permis de réaliser une thèse enrichissante en tout point de vue. Il est un maître incontestable de la « relativisation » et de la philosophie du « *wait and see* », capacités essentielles dans la recherche afin de savoir se détacher un peu des choses et des hypothèses, … malgré que ce soit parfois un peu stressant, il faut l'avouer. Sa bonne humeur a su me motiver à continuer à chaque instant, et m'a permis d'effectuer mes travaux au sein d'une équipe soudée et investie.

Un grand merci à toute l'équipe pour ces trois années passées avec vous. Le Surfeur d'Argent (Vincent David), Jean-Louis Guillou, Marc Corio, Nicole Mons, Rose-Marie Vouimba, Jacques Micheau et Mathieu Wolf, chacun de vous a su faire du 2nd étage, et plus particulièrement du bureau des endroits agréables à vivre, remplis de discussions variées sur les sciences et bien plus. Je remercie Ali Krazem de m'avoir initié à l'alternance spontanée, ainsi que d'avoir contribué à certaines de mes expériences. Merci également à l'étudiant (il se reconnaîtra), aux étudiantes (bien plus nombreuses!), et à Nadia (grande experte de la négociation) pour tous ces bons moments passés ensemble, l'aide et le soutien que vous m'avez apporté.

Petite dédicace donc à Mathieu Baudonnat, second galérien thésard de l'équipe, pour toutes nos discussions, désaccords,… et bières but ensemble en parlant science toujours… ou presque. Becco à Steph, Zao et Al-fonce bien sûr.

Une pensée particulière à tous mes collègues de labo/repas pour leur aide et leur amitié. Merci à ma-mie (Laurence), Angélique, Nadia (encore elle), Gilles et Brice pour ces discussions qui nous ont emmené loin… peut-être trop loin parfois !

Merci également à tous les autres membres du laboratoire. Je ne peux ici citer tout le monde, mais je pense évidemment à l'ensemble des chercheurs, les animalières, le personnel technique, et ceux qui comme moi ont souffert, et pour certains souffrent encore sur l'autel de la thèse.

Je finirai par tous ceux sans le soutien de qui je n'aurai pas réussi à mener ce projet à bien. Je pense évidemment en premier lieu à mes parents, qui ont toujours cru en moi, et sans qui je n'aurai pas connu les joies d'avoir une voiture en panne tout les mois. A l'ensemble de mes amis du Viet-Vo-Dao avec qui j'ai pu me grandir spirituellement… et me défouler comme un fou après les manips. Merci à Séverine pour tous ses bons plats et les soirées à discuter, à Pierre pour nos échanges sur la culture bière, à Jack pour être un propriétaire hors du commun, et à Dorine pour tout ce que l'on a vécu ensemble. Je ne peux citer ici tous mes amis du grand nord et d'ailleurs, mais sachez que je ne vous oublie pas… et que l'on fêtera mon retour parmi vous comme il se doit.

Avant-propos

Ce travail de thèse a été effectué dans le cadre d'une collaboration CIFRE (Convention Industrielle de Formation par la REcherche) tripartite entre l'ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie), l'IDRS (Institut de Recherches Servier) et le CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique).

Dans ce cadre les travaux de recherches se sont déroulés au sein du Centre de Neurosciences Intégratives et Cognitives (CNIC, UMR 5228), devenu l'Institut des Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine (INCIA, UMR 5287) de l'Université de Bordeaux. La direction scientifique a été effectuée par le Dr Daniel Beracochea (Responsable de l'équipe « *EMotion & Memory Interaction* », INCIA) et le Dr Pierre Lestage (Responsable de la division « *Pathologie Cérébrale* », IDRS).

L'ensemble des résultats a fait l'objet d'une publication parue, une soumise et deux en préparation, ainsi que de multiples communications affichées.

- ***Publications avec comité de lecture, en tant que 1er auteur:***

Vandesquille M., Krazem A., Louis C., Lestage P., Beracochea D. (2011) "S18986 reverses spatial working memory impairments in aged mice: comparison with memantine". Psychopharmacology (Berl) 215:709-720.

Vandesquille M., Carrié I., Louis C., Beracochea D., Lestage P. (2011) "Effects of positive modulator of α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)-type glutamate receptors in a benzodiazepine-induced deficit of spatial discrimination in mice". Journal of Psychopharmacology. *Sous-presse.*

Vandesquille M., Louis C., Lestage P., Baudonnat M., Beracochea D. (2011) "Age-induced prefrontal over-activation and working memory impairments in mice are suppressed by the selective α4β2 nAChRs agonist S 38232". Neuropsychopharmacology. *En révision.*

Vandesquille M., Louis C., Lestage P., Guillou J.L., Beracochea D. (2011) "Modifications of pharmacological sensitivity to nicotinic compounds, and impact on working memory, following invalidation of the nicotinic β2 subunit in mice". *En préparation*.

- ***Publications avec comité de lecture, en tant que collaborateur :***

Baudonnat M., Guillou JL, Vandesquille M., Corio M., Crespin ML, David V. "Stress and drug reward impair spatial memory and prevent learning-induced CREB phosphorylation: implication for addiction". Front Neurosci. *En révision.*

Baudonnat M., Guillou JL, Vandesquille M., Corio M., David V. "Disrupting effect of drug reward on spatial learning but not cue-guided learning: relationship with brain regional expression of pCREB". J Neurosci. *En revision.*

- ***Communications affichées :***

Vandesquille M., Carrié I., Danober L., Louis C., Beracochea D., Lestage P. "Effects of positive modulator of α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)-type glutamate receptors in a benzodiazepine-induced deficit of spatial discrimination in mice".
_*39th Annual meeting of the Society for Neuroscience,* Chicago, Illinois, USA, October 17-21, 2009.

Vandesquille M., Louis C., Lestage P., Beracochéa D. "Selective increase of pCREB activity in the prelimbic cortex is associated with spatial working memory deficits in aged mice".
_*Journée de l'école doctorale de Bordeaux,* Arcachon, France, 28 avril 2010.
_*GDR NeuroMem,* Oléron, France, 18 mai 2010
_*7th Forum of European Neuroscience,* Amsterdam, Pays-Bas, 3-7 Juillet 2010.

Vandesquille M., LouisC., Lestage P., Baudonnat M., Beracochea D. "Age-induced prefrontal over-activation and working memory impairments in mice are suppressed by the cholinergic agonist S 38232".
_*Journée de l'école doctorale de Bordeaux,* Arcachon, France, 7 avril 2011.
_*10e colloque de la Société des Neurosciences Françaises,* Marseille, France, 27 mai 2011.

Sommaire

Sommaire

ABRÉVIATIONS *12*

LISTE DES ILLUSTRATIONS *13*

BASES THÉORIQUES *17*

I. La mémoire : aspect neuropsychologique **19**

I.A. Généralités *19*

I.B. Le cas du patient H.M. : exemple d'une approche neurofonctionnelle de la mémoire *20*

I.C. Les différentes classifications de la mémoire *21*

1. Le modèle princeps : modèle modal de la mémoire 21
2. Les modèles de mémoire à long terme 23
3. Les modèles de mémoire de travail 26

I.D. Les interactions entre les systèmes de mémoire et leur importance dans la mémoire de travail. *29*

1. Le tampon épisodique 29
2. Système MPMS 30

II.A. L'hippocampe *32*

1. Situation et cytoarchitecture de l'hippocampe 32
2. Les connexions intrahippocampiques : le circuit trisynaptique 33
3. Les connexions extrinsèques de l'hippocampe 34

II.B. Le cortex préfrontal *35*

1. Neuroanatonmie du CPF 35
2. Les connexions du CPF 37
3. Le CPF : fonctions exécutives et MDT 38

II.C. L'interaction CPF-HPC : implication dans la mémoire de travail *39*

1. Interactions structurelles 39
2. Interactions neurofonctionnelles 40

II.D. Mécanismes moléculaires de la mémoire *41*

1. Rôle dans la MLT 41
2. Rôle dans la MDT 42

III. Mémoire et vieillissement **44**

III.A. Atteintes cognitives lors du vieillissement *44*

1. Vieillissement « normal » et pathologique 44
2. Altérations de la mémoire lors du vieillissement chez l'Homme 48

III.B. Hypothèses neurobiologiques et traitements pharmacologiques du déficit cognitif lié à l'âge *54*

1. Dysfonctionnement des mécanismes moléculaires de la mémoire de travail au cours du vieillissement 55
2. Hypothèse cholinergique 56
3. Hypothèse glutamatergique 61
4. Les hypothèses alternatives 65

IV. Modèle d'étude pharmacologique **67**

IV.A. Validité des modèles animaux dans l'étude de la mémoire et son approche pharmacologique *67*

IV.B. Modèle de mémoire de travail : l'alternance spontanée *68*

V. Objectifs de l'étude **73**

MATÉRIELS ET MÉTHODES *77*

I. Animaux et procédure comportementale **78**

I.A. Animaux *78*

La lignée 78
Conditions d'élevage 78

I.B. Modèle comportemental : l'Alternance Spontanée *79*

Le choix du test comportemental 79
L'appareil 79
Procédure comportementale 79
Paramètres de l'expérience 80
Analyses statistiques 80

I.C. Traitements pharmacologiques *81*

II. Implantation chirurgicale et injection intracérébrale **83**

II.A. Chirurgie stéréotaxique *83*

II.B. Injection intracérébrale *84*

II.C. Contrôle histologique *84*

III. Etude biomoléculaire **86**

III.A. Immunohistochimie *86*

Le choix de la protéine CREB 86
Fixation des cerveaux 87
Marquage immunohistochimique 87
Analyses statistiques 89
Choix des structures 89

III.B. Western-blots *90*

Les protéines cibles 90
Prélèvement des échantillons 90
Protocole de Western-blots 91

III.C. PCR quantitative *92*

Extraction des ARN totaux 92
Dosage et qualité des ARN extraits 92
Reverse Transcription (RT) des ARN messagers (ARNm) 92
Q-PCR 93
Analyse des données de Q-PCR 93

CHAPITRE 1 ..... *95*

I. Introduction **96**

II. Méthodologie **98**

Rappel de la procédure comportementale *98*

Traitements pharmacologiques *98*

Analyse des résultats *99*

III. Résultats **100**

Expérience 1 : impact du vieillissement sur les performances d'AS *100*

Expérience 2 : validation pharmacologique du modèle *103*

Etude des substances de référence 103
Etude des molécules issues de la recherche Servier 105

IV. Discussion **107**

Impact du vieillissement sur l'alternance spontanée *107*

Validité pharmacologique du modèle *107*

Potentiel promnésiant des molécules étudiées *108*

Hypothèse glutamatergique 109
Hypothèse cholinergique 111

V. Conclusion **114**

CHAPITRE 2 ..... *115*

I. Introduction **117**

II. Méthodologie **120**

Expérience 1 ..... *120*

Expérience 2 ..... *121*

Expérience 3 ..... *121*

III. Résultats **123**

Expérience 1 : étude immunohistochimique *123*

Résultats comportementaux 123
Résultats immunohistochimiques 124

Expérience 2 : action de composés promnésiant sur le profil d'activation des structures recrutées dans l'AS. *128*

Analyses des données obtenues après traitement avec le donepezil 129
Analyses des données obtenues après traitement avec le S 38232 129

Expérience 3 : injection au sein du PL de molécules modifiant son niveau d'activation neuronale *131*

Inhibition du cortex prélimbique chez des souris jeunes 131
Inhibition spécifique de la protéine kinase A dans le cortex prélimbique de souris âgées 131

IV. Discussion **133**

Expérience 1 : données immunohistochimiques *133*

Expérience 2 : action de composés promnésiants sur le profil d'activation des structures recrutées dans l'AS. *136*

Expérience 3 : injection au sein du PL de molécules modifiant le niveau d'activation neuronale *139*

Conclusion **141**

CHAPITRE 3 ..... ***143***

I. Introduction **145**

II. Méthodologie **147**

Expérience 1 : étude comportementale sur les souris KO β2 de 4-5 mois *147*

Actimétrie : test de l'activité spontanée 147
Labyrinthe en croix surélevé : test d'anxiété. 147
Exploration libre en planche à huit trous : test de l'activité exploratoire. 148
L'alternance spontanée dans le labyrinthe en T : test de la mémoire de travail. 148
Apprentissage spatial en piscine de Morris : test de la mémoire de référence 148

Expérience 2 : étude des souris KO β2 à l'âge de 18-19 mois *149*

Expérience 3 : analyse du profil d'expression des sous-unités nicotiniques *150*

III. Résultats **151**

Expérience 1 : étude comportementale sur les souris KO β2 de 4-5 mois *151*

Actimétrie 151
Labyrinthe en croix surélevé 152
Exploration libre en planche à huit trous 153
Alternance spontanée 154
Apprentissage spatial en piscine de Morris 155

Expérience 2 : étude des souris KO β2 à l'âge de 18-19 mois *157*

Expérience 3 : analyse du profil d'expression des sous-unités nicotiniques *161*

Western Blot 161
PCR quantitative 162

IV. Discussion 164

Expérience 1 : étude comportementale sur les souris KO β2 de 4-5 mois *164*

Expérience 2 : étude des souris KO β2 à l'âge de 18-19 mois *165*

Expérience 3 : analyse du profil d'expression des sous-unités nicotiniques *167*

Conclusion 169

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES 170

I. Altération de la mémoire de travail lors du vieillissement *171*

Contexte de l'étude 171
Le modèle d'étude de la mémoire de travail 172
Activation cérébrale lors de l'AS 174
Modification du profil d'activation lors du vieillissement 175
Mécanismes moléculaires liés au déficit de la MDT 176
Perspectives 176

II. Effets promnésiants des traitements pharmacologiques. *177*

Modification pharmacologiques de l'activation cérébrale 178
Mécanisme d'action potentiel du donepezil 178
Hypothèses du mécanisme d'action du S 38232 179
Modulation pharmacologique de l'activité préfrontale 179
Perspectives 180

III. Le récepteur α4β2, rôle dans la MDT et le vieillissement *180*

Profil comportemental des souris KO β2 181
Conséquences pharmacologiques de la délétion du nAChR-α4β2 182
Perspectives 183

IV. Conclusion *183*

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 186

ANNEXES 213

Abréviations

ACh : acétylcholine

AS : alternance spontanée

AMPA: acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl)propanoïque

BLA : noyau baso-latéral de l'amygdale

CPF / CPFm : cortex préfrontal / CPF médian

CREB / tCREB / pCREB: cAMP response element-binding / total-CREB / phosphor-CREB

Glu : glutamate

HPC: hippocampe

IEE : intervalle entre essais

LCR : liquide céphalo-rachidien artificiel

MA : maladie d'alzheimer

MCI : mild cognitive impairment

MCT : mémoire à court terme

MDT : mémoire de travail

MLT : mémoire à long terme

nAChR : récepteur cholinergique de type nicotinique

NMDA : N-méthyl-D-aspartique

PB / TB / TBS : tampons phosphate, tris et tris salin

PKA : protéine kinase AMPc-dépendante

PL: cortex prélimbique

PLT/DLT: potentialisation / depression à long terme

R : récepteur

Ser : sérine

St : striatum

Liste des illustrations

Bases théoriques

Figure 1 : Représentation de la localisation et de l'étendue des lésions observées dans les lobes temporaux médians du patient H.M.

Figure 2 : Illustration du modèle modal de la mémoire d'après Aktinson et Shiffrin.

Figure 3 : Classification dichotomique des systèmes de mémoire d'après Squire.

Figure 4 : Modèle théorique SPI (Serial Parallel Independant) de l'organisation des systèmes de mémoire selon Tulving.

Figure 5 : Modèles de la mémoire de travail selon Baddeley.

Figure 6 : Organisation fonctionnelle du lobe temporal médian, et positionnement de l'hippocampe dans le cerveau des rongeurs.

Figure 7 : Schéma représentant les connexions intrahippocampiques du circuit trisynaptique.

Figure 8 : Les principales structures du cortex préfrontal impliquées dans les processus mnésiques chez les rongeurs.

Figure 9 : Illustration des relations entre la balance kinase/phosphatase et les différentes formes de mémoire.

Figure 10 : Illustrations du déclin cognitif lors du vieillissement normal et pathologique.

Figure 11 : Evolution de l'atteinte cérébrale lors du vieillissement pathologique.

Figure 12 : Altérations fonctionnelles des profils d'activations cérébrales lors du vieillissement.

Figure 13 : Modèle PASA.

Figure 14 : Activation cérébrale au niveau de l'HPC et du CPFdl, chez des sujets jeunes ou âgés, lors d'une tâche d'association simple ou complexe.

Figure 15 : Etude de Gazzaley et al. (2005) montrant un lien entre l'augmentation de la sensibilité aux interférences et le déficit de MDT observé chez les sujets âgés « non performants ».

Figure 16 : Modèle CRUNCH.

Figure 17 : Représentation schématique des principales voies cholinergiques chez les rongeurs.

Figure 18 : Illustration des récepteurs nicotiniques α4β2 et α7.

Figure 19 : Illustration des deux sous familles de récepteurs muscariniques.

Figure 20 : Schéma des principales projections glutamatergiques dans le cerveau des rongeurs.

Matériels et Méthodes

Figure 1 : Dispositif du labyrinthe en T, et procédure expérimentale de l'alternance spontanée.

Figure 2 : Contrôle histologique.

Figure 3 : Immunohistochimie sur coupes flottantes.

Chapitre 1

Figure 1 : Comparaison intra-groupes de l'effet du délai et de l'âge dans le test d'alternance spontanée.

Figure 2 : L'altération des performances d'AS chez les souris âgées se caractérise par une sensibilité accrue aux interférences proactives.

Figure 3 : Validation pharmacologique du modèle.

Figure 4 : Effet des molécules issues de la recherche Servier.

Chapitre 2

Figure 1 : Comparaison des performances d'AS entre les différents délais de perfusions.

Figure 2 : Etude cinétique de l'immunoréactivité tCREB entre souris jeunes et âgées.

Figure 3 : Etude cinétique de l'immunoréactivité pCREB entre souris jeunes et âgées.

Figure 4 : Corrélation entre l'immunoréactivité pCREB à 30 min et les performances comportementales.

Figure 5 : Résultats comportementaux et immunohistochimiques dans le CA1 et le PL, après traitement pharmacologique.

Figure 6 : Résultats comportementaux d'AS (IEE=90 sec) suite à l'injection dans le cortex prélimbique de modulateurs de l'activité neuronale.

Chapitre 3

Figure 1 : Données de l'étude d'actimétrie.

Figure 2 : Données du labyrinthe en croix surélevé.

Figure 3 : Résultats de l'exploration libre en planche à huit trous.

Figure 4 : Alternance spontanée chez des souris KO β2 de 4-5 mois et leurs témoins WT

Figure 5 : Apprentissage spatial en piscine de Morris.

Figure 6 : Alternance spontanée chez les souris KO β2 de 18-19 mois et leurs témoins WT.

Figure 7 : Performances d'alternance spontanée chez des souris KO β2 de 18-19 mois traitées avec le S 38232.

Figure 8 : Effet de la MLA sur les performances d'alternance spontanée chez des souris WT et KO β2 de 18-19 mois.

Figure 9 : Immunomarquages réalisés sur extrait d'hippocampe par Western-blot.

Figure 10 : Résultats de PCR quantitative sur l'expression des sous-unités α7 et β2.

Discussion Générale et perspectives

Figure 1 : Résumé des résultats obtenus sur le modèle d'alternance spontanée.

Figure 2 : Résumé des principales données pharmacologiques.

Figure 3 : Résumé des résultats obtenus chez les souris KO β2.

Bases théoriques

Bases théoriques

I. LA MÉMOIRE : ASPECT NEUROPSYCHOLOGIQUE 19

I.A. Généralités 19

I.B. Le cas du patient H.M. : exemple d'une approche neurofonctionnelle de la mémoire 20

I.C. Les différentes classifications de la mémoire 21

1. Le modèle princeps : modèle modal de la mémoire 21

2. Les modèles de mémoire à long terme 23

3. Les modèles de mémoire de travail 26

I.D. Les interactions entre les systèmes de mémoire et leur importance dans la mémoire de travail 29

1. Le tampon épisodique 29

2. Système MPMS 30

II. La mémoire de travail : aspect neurofonctionnel 32

II.A. L'hippocampe 32

1. Situation et cytoarchitecture de l'hippocampe 32

2. Les connexions intrahippocampiques : le circuit trisynaptique 33

3. Les connexions extrinsèques de l'hippocampe 34

II.B. Le cortex préfrontal 35

1. Structure du CPF 35

2. Les connexions du CPF 37

3. Le CPF : fonctions exécutives et MDT 38

II.C. L'interaction CPF-HPC : implication dans la mémoire de travail 39

1. Interactions structurelles 39

2. Interactions neurofonctionnelles *40*

II.D. Mécanisme moléculaire de la mémoire 41

Rôle dans la MLT *41*

Rôle dans la MDT *42*

III. MÉMOIRE ET VIEILLISSEMENT 44

III.A. Atteintes cognitives lors du vieillissement 44

1. Vieillissement « normal » et pathologique *44*

2. Altérations de la mémoire lors du vieillissement chez l'Homme *48*

III.B. Hypothèses neurobiologiques et traitements pharmacologiques du déficit cognitif lié à l'âge 54

1. Dysfonctionnement des mécanismes moléculaires de la mémoire de travail au cours du vieillissement *55*

2. Hypothèse cholinergique *56*

3. Hypothèse glutamatergique *61*

4. Les hypothèses alternatives *65*

IV. MODÈLE D'ÉTUDE PHARMACOLOGIQUE 67

IV.A. Validité des modèles animaux dans l'étude de la mémoire et son approche pharmacologique 67

IV.B. Modèle de mémoire de travail : l'alternance spontanée 68

V. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE 73

I. La mémoire : aspect neuropsychologique

I.A. Généralités

Les neurosciences et la psychologie définissent la mémoire comme étant l'ensemble des processus neurologiques (en tant qu'activités neuronales) permettant d'acquérir, de stocker et de rappeler des expériences passées et des informations (Jaffard, 1994). La mémoire est classiquement organisée en phases, temporellement distinctes, qui désignent un ensemble de processus nécessaires à l'acquisition de nouveaux souvenirs:

- l'apprentissage (ou ***encodage***) permet l'acquisition des informations, et varie selon le niveau attentionnel ou émotionnel du sujet (Aston-Jones, 2005).
- la ***consolidation*** mnésique permet le stockage de ces informations au cours du temps. Cette phase entraine le passage d'une forme « labile » de la mémoire à une forme « stable ». Cette forme stable correspond à l'ensemble des modifications neuronales induites par l'apprentissage (Nakazawa et al., 2004). Il s'agit d'un processus automatique (non volontaire), sous tendu notamment par le sommeil (Walker et Stickgold, 2006).
- le ***rappel*** mnésique est la phase de « récupération » du souvenir où l'information passe de l'état inactif à l'état actif. La récupération de l'information induit un processus de reconsolidation de l'information évoquée qui s'accompagne d'un retour à l'état « labile », pouvant engendrer la modification voire l'oubli de l'information initiale (Nader et Hardt, 2009).

Cependant, même si ces trois phases sont communément admises dans leurs principes, les processus, les structures ainsi que les mécanismes permettant l'organisation de la mémoire sont grandement débattus au sein de la communauté scientifique. Il est néanmoins admis que la mémoire n'est pas une entité unitaire, mais un ensemble hétérogène de systèmes de mémoire permettant chacun le traitement d'un type particulier d'information. Ces systèmes de mémoire sont définis selon la durée pendant laquelle l'information est stockée, la nature des informations qu'ils permettent de traiter et les structures impliquées dans ce traitement. Le rôle des neurosciences cognitives a été, et reste aujourd'hui, de définir ces différents systèmes mais également leurs interactions mutuelles, ainsi que les mécanismes cérébraux (autant au niveau structurel que cellulaire) sous-tendant les fonctions cognitives.

I.B. Le cas du patient H.M. : exemple d'une approche neurofonctionnelle de la mémoire

Alors que la plupart des patients cérébro-lésés présentent de nombreux déficits cognitifs, quelques cas montrent un déficit spécifique pouvant être relié à une structure relativement bien localisée. Le cas décrit en 1957, par Scoville et Milner est sans conteste l'un des plus remarquables. Ce patient, nommé H.M. (Henry Gustav Molaison, 1926 – 2008), souffrait d'épilepsie résistante à tout traitement depuis l'enfance. Il fut dirigé vers le neurochirurchien américain William Beecher Scoville qui localisa le foyer epileptogène dans les lobes temporaux gauche et droit. En 1953, Scoville pratiqua la résection de cette zone incluant la presque totalité de l'hippocampe, le gyrus parahippocampique ainsi que l'amygdale (cf. *fig. 1*). Bien que réussie du point de vue du traitement de l'épilepsie, l'opération engendra chez le patient H.M. un syndrome amnésique caractérisé par l'incapacité à former de nouveau souvenir. Cette amnésie antérograde était accompagnée d'une amnésie rétrograde plus légère (gradient d'environ 11 années) empêchant le rappel précis des événements passés. Des études plus approfondies montrèrent que les capacités perceptives et intellectuelles, la mémoire de travail ainsi que la mémoire procédurale implicite étaient épargnées, ce qui permis au patient H.M. d'apprendre de nouveaux gestes sans même se souvenir de les avoir déjà effectués (Corkin, 2002).

Ce cas clinique permis de mettre en évidence deux faits majeurs. Tout d'abord, les lobes temporaux médians, et principalement l'hippocampe, apparaissent comme essentiels dans l'apprentissage et la formation de nouveaux souvenirs. Cependant, cette structure ne semble plus intervenir dans le rappel des souvenirs les plus anciens. Ensuite, la mémoire ne peut être réduite à une entité unique ; ce fait était mis en évidence par l'absence d'atteinte de la mémoire de travail et de la mémoire procédurale, ainsi que par la capacité préservée du patient H.M. à apprendre de nouvelles tâches de manière implicite.

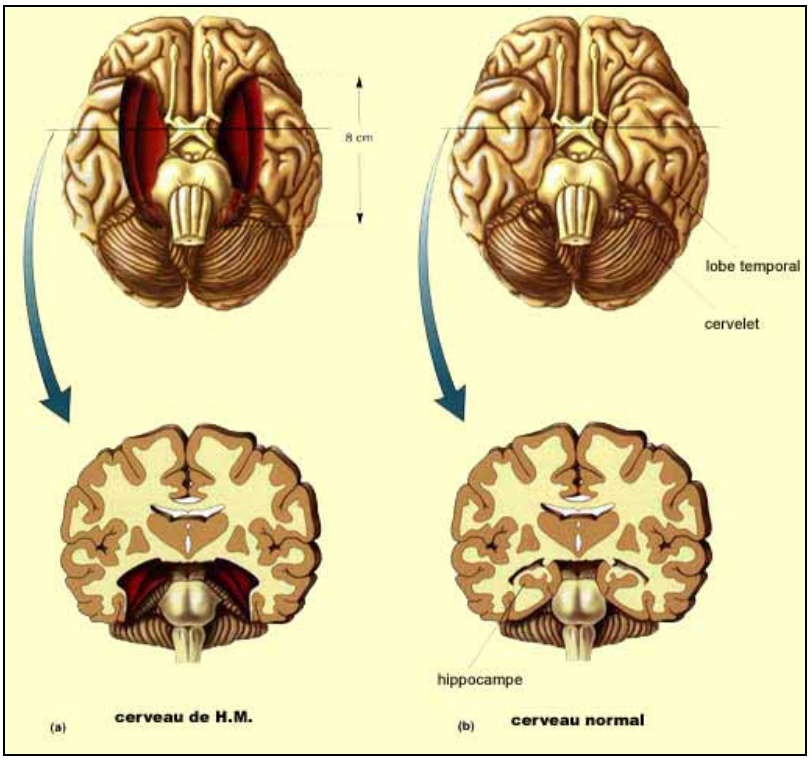


Figure 1 : Représentation de la localisation et de l'étendue des lésions observées dans les lobes temporaux médians du patient H.M. (Scoville et Milner, 1957).

Ces observations et de nombreuses autres en parallèle (ex : étude des patients Korsakoff par exemple ; Victor et al., 1971 ; Warrington et Weiskrantz, 1970 ; Brion et al., 1983 ; Lhermitte et Signoret, 1972) ont généré une classification des différents systèmes de mémoire et des structures cérébrales sous jacentes. Des études lésionnelles spécifiques chez l'animal, et plus récemment des études d'imagerie chez l'Homme, permirent la mise en place de classifications fondées sur des dichotomies variées de ces systèmes de mémoire (Shallice, 1979 ; Sherry et Schacter, 1987 ; Baddeley, 1988; Tulving, 1995; Squire, 2004).

I.C. Les différentes classifications de la mémoire

1. Le modèle princeps : modèle modal de la mémoire

Basé sur la conception dominante de la mémoire en psychologie cognitive de la fin des années 60, ce modèle divise la mémoire en trois sous-systèmes principaux fonctionnant en série (Atkinson et Shiffrin, 1968) (cf. *fig. 2*) :

- Le ***registre sensoriel*** : il permet la perception des informations émanant de l'environnement, et leur rétention pendant un délai très bref (quelques millisecondes).

- La ***mémoire à court terme*** (MCT) : elle contient un nombre limité d'éléments (empan mnésique), stockés pendant quelques secondes, afin de permettre soit une réponse, soit un stockage à plus long terme.
- La ***mémoire à long terme*** (MLT) : elle permet le stockage théorique d'une quantité illimitée d'information pour une durée infinie.

Atkinson et Shiffrin suggèrent ainsi un continuum entre MCT et MLT, les informations en MLT pouvant être rappelées en MCT si nécessaire.

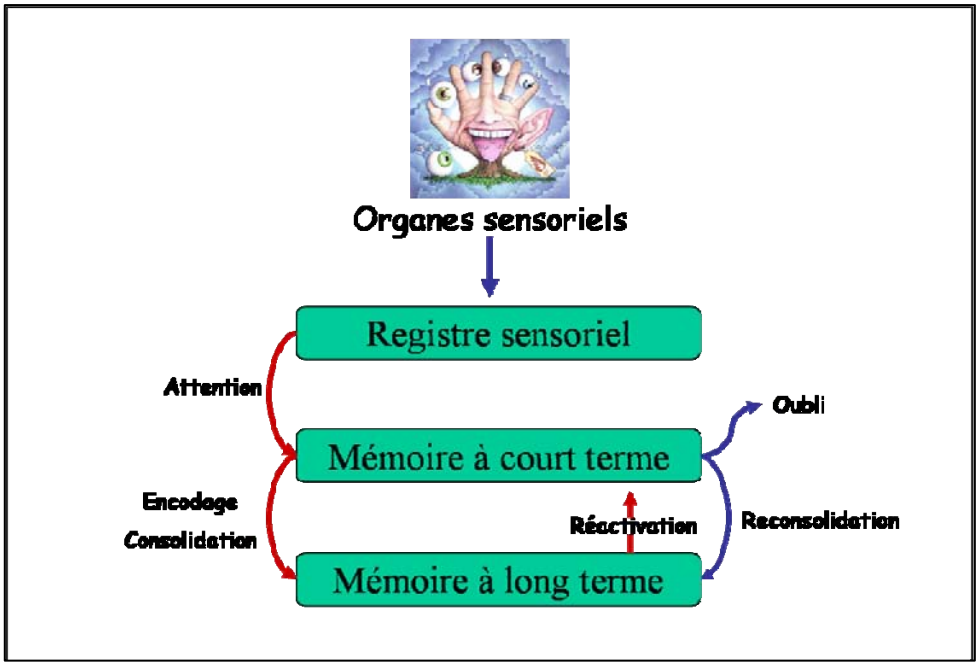


Figure 2: Illustration du modèle modal de la mémoire (d'après Atkinson et Shiffrin, 1968). Ce modèle se base sur l'existence d'un continuum allant de la perception à la mémoire à long terme, par l'intermédiaire de la mémoire à court-terme.

Bien que permettant d'appréhender aisément les phases nécessaires à la mise en mémoire de l'information, ce modèle ne permet pas d'expliquer pourquoi certains patients présentent un déficit de MCT tout en conservant une MLT avec des capacités d'apprentissage, de compréhension et de raisonnement préservées (Warrington et Shallice, 1969 ; Baddeley et Hitch, 1974). La mémoire à court terme n'apparaît donc pas comme une étape obligatoire de la MLT.

2. Les modèles de mémoire à long terme

Modèle de Squire

Ce modèle décrit la MLT en se basant sur de nombreuses observations effectuées sur des patients amnésiques, ainsi que des données obtenues chez le singe et le rongeur. Larry Squire développa en 1992 cette classification (actualisée en 2004) permettant la mise en relations des caractéristiques psychologiques des informations à stocker, et les structures dont l'intégrité est nécessaire lors de l'encodage ou du rappel de ces informations (cf. *fig. 3*). Le modèle met en opposition deux grands sous-systèmes de mémoire à long terme :

- ***La mémoire déclarative*** (ou explicite) qui repose sur un rappel explicite, conscient de représentations des événements contextualisés par leur situation dans le temps et l'espace (mémoire épisodique), ou de connaissances générales construites à partir des événements épisodiques décontextualisés (mémoire sémantique).

- ***la mémoire non déclarative*** (ou implicite) qui regroupe un grand nombre d'apprentissages ou de processus cognitifs « non conscients », dont le seul point commun est qu'ils ne dépendent pas de l'hippocampe. On y retrouve les habiletés motrices (mémoire procédurale), le phénomène d'amorçage par lequel un indice permet de faciliter le rappel d'une information (ex : 1ère lettre d'un mot oublié), le conditionnement classique (également appelé Pavlovien), et l'apprentissage non associatif tels que les phénomènes d'habituation ou de sensibilisation qui entraînent la modification d'une réponse suite à la présentation répétée d'un stimulus.

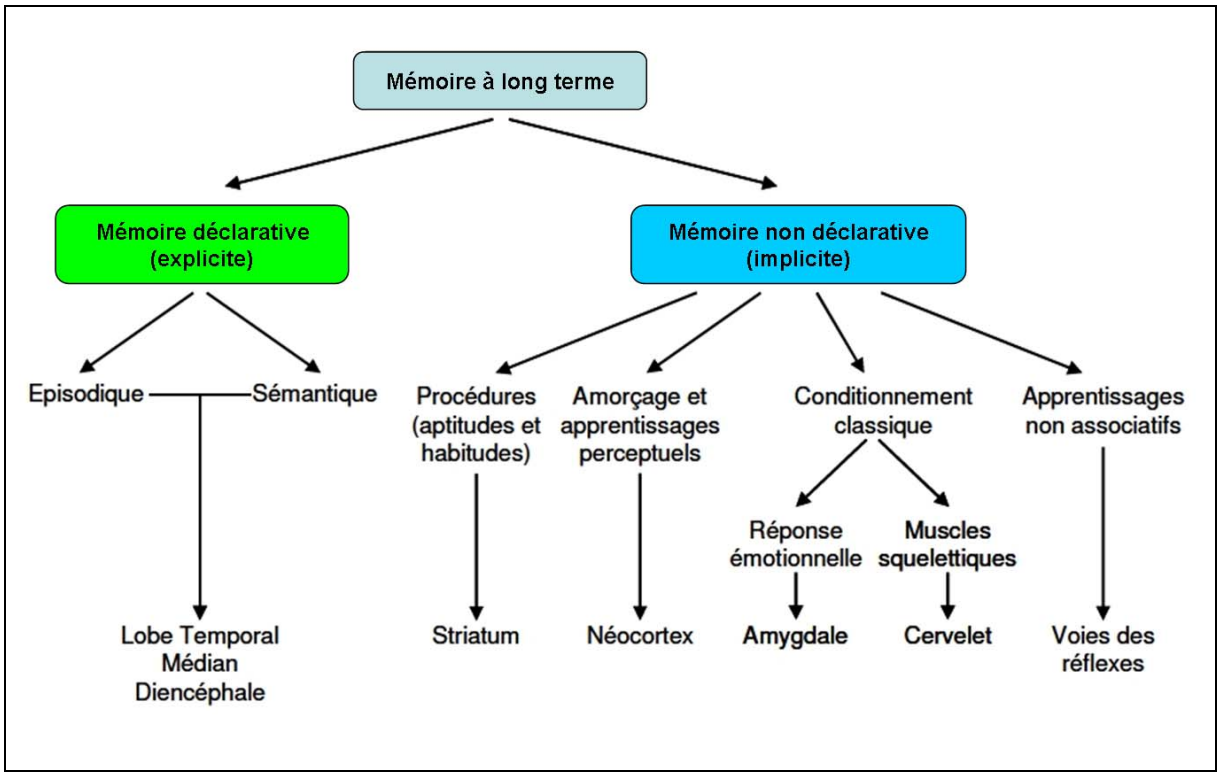


Figure 3 : Classification dichotomique des systèmes de mémoire d'après Squire (Squire, 1992, 2004). Cette classification, centrée sur l'hippocampe, associe à chaque type d'opération une structure cérébrale impliquée dans l'encodage de l'information.

Cette classification présente l'avantage de rapprocher les données biologiques et neuropsychologiques, et bénéficie d'une certaine souplesse. Le modèle de Squire reste aujourd'hui une référence dans le domaine des Neurosciences, même si deux critiques principales peuvent être émises:

- Cette dichotomie met l'accent sur les structures impliquées dans chacun des processus mnésiques, d'où découle le rôle primordial voire quasi exclusif des lobes temporaux médians dans la mémoire déclarative.
- Ce modèle ne fait apparaître que très peu d'interactions entre les systèmes de mémoire alors que de nombreuses études montrent l'existence des phénomènes de compétitions ou de coopérations entre ces systèmes (cf. *Bases théoriques I.C*).

Modèle de Tulving

Tulving a développé en 1995 un modèle structural de la mémoire dans lequel il intègre les mémoires épisodique et sémantique. Contrairement à Squire, Tulving estime que mémoire sémantique et mémoire épisodique ne peuvent être regroupées au sein d'un même système déclaratif unitaire. En effet, des données contredisent cette vision unitaire en montrant que des

informations sémantiques peuvent être acquises sans intervention de la mémoire épisodique (Vargha-Khadem et al., 1997). Tulving décrit également le cas d'un patient souffrant d'une lésion du lobe temporal médian, et présentant une amnésie rétrograde asymétrique, c'est-à-dire davantage marquée pour les souvenirs épisodiques que sémantiques (Tulving et al., 1988, 1991).

Il élabore alors un modèle capable d'expliquer ces observations, dans lequel il distingue cinq systèmes de mémoire organisés de façon hiérarchique, à la fois en termes d'origine phylogénétique et en termes de prépondérance au sein du système cognitif (cf. *fig. 4*) :

- La ***mémoire procédurale*** : elle constitue le plus ancien et le plus important système de mémoire.
- Le ***système de représentation perceptive*** : il contiendrait des ébauches perceptives des éléments constitutifs de la mémoire sémantique.

Ces deux premiers systèmes sont dits anoétiques puisqu'ils n'impliqueraient pas de prise de conscience de l'«objet ».

- La ***mémoire sémantique*** : elle serait selon Tulving sous-tendue par les régions parahippocampiques et non par l'hippocampe lui-même.
- La ***mémoire primaire*** : elle correspond à la ***mémoire de travail (MDT)***.

Ces deux systèmes sont dits noétiques puisqu'ils impliquent une prise de conscience des objets où informations qu'ils traitent.

- La ***mémoire épisodique*** : elle seule serait dépendante de l'hippocampe.

Ce système est dit auto-noétique parce qu'il implique une prise de conscience de l'objet et du sujet propre en tant qu'il perçoit l'objet.

En plus de cette dichotomie, Tulving intègre dans son modèle les interactions entre ces systèmes. Il définit ses interactions sous le nom de modèle « SPI » pour « sériel, parallèle et indépendant »:

- L'encodage se fait de façon ***sérielle***, dans un système après l'autre, item après item.
- Le stockage est ***parallèle***, un élément pouvant être stocké dans plusieurs systèmes en même temps.
- La récupération se fait de manière ***indépendante***, dans le système concerné.

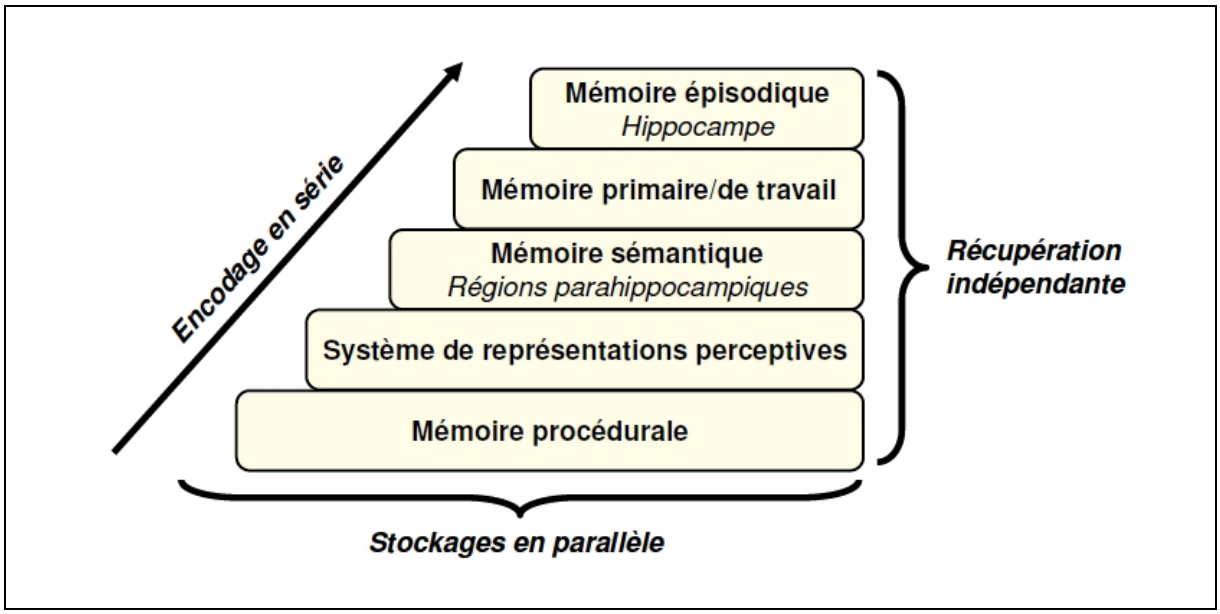


Figure 4 : Modèle théorique SPI (Serial Parallel Independant) de l'organisation des systèmes de mémoire selon Tulving (1995).

Ce modèle permet d'expliquer la présence d'une amnésie rétrograde asymétrique chez certains patients cérébro-lésés en postulant que la mémoire sémantique est encodée avant la mémoire épisodique, mais que chacune étant stockée en parallèle, le rappel de l'une peut se faire indépendamment de l'autre, y compris en cas de lésions structurelles touchant l'une des mémoires.

3. Les modèles de mémoire de travail

On estime que les déficits de la mémoire à court terme résultent d'une altération de la mémoire de travail. Divers modèles ont été proposés pour expliquer son organisation, son fonctionnement et les structures cérébrales qui la sous-tendent.

Modèle de Baddeley

La proposition théorique la plus influente vient sans conteste de Baddeley et Hitch (1974) qui proposèrent le concept de mémoire de travail (cf. *fig. 5.A*). Ce système apparaît comme une interface permettant la rétention temporaire d'un nombre limité d'informations et leurs manipulations en vue de l'exécution de tâches cognitives, ou de leur stockage en mémoire à long terme.

Dans sa description initiale, ce modèle s'articule autour de trois composantes en interaction :

- L'***administrateur central***, système attentionnel qui permet de contrôler les deux sous-systèmes « esclaves », ou asservis, que sont le calepin visuo-spatial et la boucle phonologique. C'est le système le moins bien connu, mais il semble fortement requérir l'activité des lobes frontaux (pour revue voir Baddeley, 2000).
- Le ***calepin visuo-spatial*** qui permet le maintien temporaire d'un nombre limité d'information visuo-spatiales pouvant être fractionné en une composante visuelle et une composante spatio-motrice (Logie, 1986). Son rôle est de générer et manipuler des images mentales. Il serait principalement sous-tendu par certaines aires de l'hémisphère droit (Aires 6, 19, 40 et 47 de Brodmann).
- La ***boucle phonologique*** est destinée au maintien temporaire de l'information verbale ou auditive dans un stock phonologique. Un processus de répétition verbale permettrait de rafraîchir l'information en la réintroduisant dans le stock. Il permettrait également le transfert d'informations visuelles vers le stock phonologique par un mécanisme de ré-encodage phonologique. Des études lésionnelles et d'imagerie suggèrent que les aires 40 et 44 de Brodmann sous-tendraient ce système.

Bien que permettant d'expliquer la majorité des tâches de mémoire de travail, ce modèle initial possède plusieurs limites :

- Il ne peut expliquer pourquoi des mots pouvant être reliés entre eux (homologie de signification ou de classe) sont plus facilement rappelés, alors qu'à l'inverse des mots ayant la même consonance sont plus difficilement évoqués.
- Il ne fournit pas d'explication des relations entre MDT et MLT, notamment la capacité de manipuler des connaissances anciennes dans la réalisation d'une tâche de MDT (ex : la compréhension d'un texte).

Sur ce constat, Baddeley a récemment fait évoluer son modèle en rajoutant une quatrième composante à la conception tripartite initiale : le ***tampon épisodique*** (Baddeley, 2000) (cf. *fig. 5.B*). Il constitue un sous-système de capacité limitée, dédié au stockage temporaire d'informations multimodales et à l'intégration (« *binding* ») au sein d'une représentation épisodique unitaire des informations provenant des systèmes « esclaves » et de la MLT. Sous le contrôle de l'administrateur central, qui par l'attention permet la manipulation du contenu intégré, le tampon épisodique constitue une interface entre la mémoire de travail et la mémoire à long terme, permettant ainsi un passage des informations contenues en MLT vers la MDT (Quinette et al., 2006 ; Eustache et Desgranges, 2008).

Etant grandement dépendant de l'état de conscience et d'attention du sujet, le fonctionnement de la MDT dépendrait, comme l'administrateur central, du cortex préfrontal (Baddeley, 2000 ; Repovs et Baddeley, 2006). Cependant, comme nous allons le voir plus tard (cf. *Bases théoriques I.C*), des études récentes suggèrent que l'hippocampe pourrait également intervenir dans la MDT notamment dans les fonctions de *binding* et de maintien du tampon épisodique.

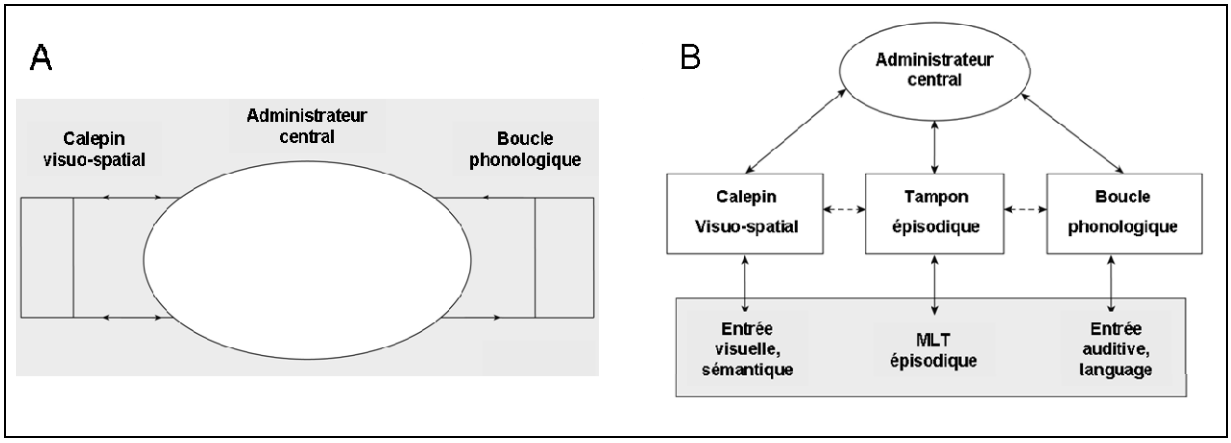


Figure 5 : A : modèle initial de la mémoire de travail selon Baddeley (1974). L'administrateur central contrôle les deux sous-systèmes. B : Développement du modèle initial incluant le tampon épisodique permettant les relations avec la MLT (Baddeley, 2000).

Modèle de Cowan

Bien que le modèle de Baddeley soit considéré par le plus grand nombre comme le modèle de référence de la mémoire de travail, certains envisagent néanmoins la possibilité de concepts alternatifs. C'est le cas de Nelson Cowan qui propose un modèle de processus intégré dans lequel il décrit la mémoire de travail comme « un processus cognitif permettant la rétention d'une information habituellement dans un état inaccessible » (Cowan, 1988). Ce modèle est centré sur l'attention qui permettrait le maintien d'une partie activée de la MLT, afin de récupérer les informations pertinentes. Ainsi, la mémoire de travail ne serait pas une entité structurelle prédéfinie, mais un état particulier d'activation de la MLT dépendant de l'attention et des processus perceptifs. Allant dans ce sens, des études d'imagerie sur la mémoire de travail chez l'Homme montrent non seulement une activation du cortex préfrontal (CPF), mais également une ré-activation des zones cérébrales recrutées lors de la présentation de l'information. Ainsi, différentes informations activeraient différents circuits neuronaux (D'Esposito, 2007). Ceci conforte la position de Cowan pour qui le concept de stocks spécialisés n'est pas en adéquation avec l'organisation cérébrale elle-même.

Avec ce modèle, Cowan propose une conception flexible et efficace de la mémoire de travail, puisque ne nécessitant pas de transferts d'informations entre les différents stocks d'informations (perception, tampon épisodique et MLT). Cependant, Cowan est en accord avec plusieurs points du modèle de Baddeley, et ce dernier reconnaît lui-même que la MDT dépend d'une partie activée de la MLT (Baddeley, 2010 ; Cowan, 2010). Ainsi, Baddeley voit plutôt dans ce concept une tentative d'explication de l'interface entre l'administrateur central et le tampon épisodique présent dans son modèle.

I.D. Les interactions entre les systèmes de mémoire et leur importance dans la mémoire de travail.

La difficulté de la définition de la mémoire de travail est de comprendre son rapport à la mémoire à long terme. Il en ressort également que la mémoire n'est pas une entité figée, mais un processus dynamique dans lequel les différents systèmes sont en interaction. Ces interactions sont essentielles pour comprendre la MDT, car cette dernière recrute à la fois les structures impliquées dans le stockage des informations, notamment l'hippocampe, et les structures impliquées dans l'attention et la sélection des informations ainsi que leur organisation, telles que le cortex préfrontal. De nombreuses théories visant à comprendre les interactions entre systèmes de mémoire ont montré comment l'hippocampe et le cortex préfrontal interagissent dans les tâches mnésiques.

1. Le tampon épisodique

Le concept de tampon épisodique que nous avons vu précédemment (cf. *Bases théoriques II.B.3*) remet en question la séparation entre MCT et MLT. L'un des débats majeurs concerne le substrat neuro-anatomique sous-tendant le tampon épisodique et permettant sa fonction de *binding* en MDT (Baddeley, 2010). En effet, Baddeley postule au départ que le tampon épisodique se situe dans le CPF, tout comme l'administrateur central (Baddeley, 2000 ; Repovs et Baddeley, 2006). Une étude d'imagerie cérébrale conforte cette hypothèse, en démontrant une augmentation de l'activité du cortex préfrontal lorsque les sujets sont testés dans une tâche de mémoire de travail sollicitant de fait la fonction de tampon épisodique (Prabhakaran et al., 2000).

Cependant, plusieurs études effectuées récemment suggèrent que l'hippocampe serait également impliqué dans le fonctionnement du tampon épisodique. En effet, les sujets présentant une atteinte du lobe temporal médian (patient Alzheimer ou schizophrènes) peuvent présenter, outre un dysfonctionnement 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 tâches de 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., 2010). Toutefois, une récente étude publiée par Baddeley vient contredire l'hypothèse de l'implication de l'hippocampe dans la MDT. Cette étude présente le cas d'un patient amnésique souffrant depuis la naissance d'une lésion hippocampique associée à un syndrome amnésique, et ne présentant aucun déficit du tampon épisodique (Baddeley, 2010).

A ce jour, le débat se poursuit entre les partisans de la non implication de l'hippocampe dans la mémoire de travail (Squire et Knowlton, 1996 ; Baddeley et al., 2010 ; Jeneson et al., 2010) et ceux qui au contraire défendent l'idée que des représentations de même nature, 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).

2. Système MPMS

La notion d'interaction entre les systèmes de mémoire suppose que les différents systèmes puissent fonctionner de façon indépendante, en ***coopération*** ou en ***compétition,*** l'implication respective de chaque système étant dépendante de la tâche cognitive, de la nature de l'information, du temps de consolidation, ainsi que des facteurs environnementaux (comme le stress ou l'âge).

Pour décrire les interactions entre système de mémoire, White et McDonald (2002) ont proposé un modèle appelé ***MPMS*** (Multiple Parallel Memory System) reposant sur trois systèmes (sans exclure la présence d'autres systèmes):

- le ***système hippocampique*** gérant les associations stimulus-stimulus.
- le ***système striatal*** encodant sur un mode stimulus-réponse.
- le ***système amygdalien*** basé sur l'association stimulus-renforcement.

Cette théorie repose sur des données expérimentales principalement fondées sur des lésions/inactivations de structures chez l'animal. Dans un labyrinthe en croix, un apprentissage court (8 jours) induit une réponse spatiale de type allocentrique sous tendue par l'hippocampe chez les animaux contrôles, alors que les animaux dont l'HPC a été inactivé utilisent une stratégie égocentrée dépendante du striatum. Lors d'un apprentissage intensif (16 jours), les animaux contrôles privilégient alors la stratégie égocentrique, mais l'inactivation du striatum provoque un retour vers une stratégie spatiale allocentrée (Packard et McGaugh, 1996). Au fur et à mesure des répétitions de l'apprentissage, on observe un changement de stratégie et donc du système de mémoire impliqué dans le comportement de l'animal. Cette expérience a permis de mettre en évidence le mécanisme de ***coopération*** décrit par White et McDonald. Au départ, il est essentiel d'utiliser une stratégie cognitive afin d'adapter le comportement à la situation nouvelle, la stratégie procédurale restant sous-jacente (Jaffard et Meunier, 1993). Avec les répétitions, le processus mnésique devenant une habitude, il s'oriente vers la stratégie procédurale nécessitant moins d'effort cognitif, laissant ainsi plus de ressources cognitives disponibles pour d'autres tâches (James, 1890).

Les systèmes de mémoire peuvent également entrer en ***compétition*** (interaction négative). En effet, les lésions hippocampiques facilitent l'acquisition d'apprentissage ou de conditionnements dépendant du fonctionnement du striatum (McDonald et White, 1993 ; Packard et al., 1989), ou de l'amygdale (McDonald et White, 1993).

Ainsi, les différents systèmes seraient activés conjointement lors de l'encodage, la sélection du système prépondérant ne s'effectuant qu'à posteriori par évaluation de la pertinence du type d'association (White et McDonald, 2002). Il a été montré que l'évaluation et la sélection du système le plus adapté dépendait du cortex préfrontal. Dans la tâche du labyrinthe en croix décrite précédemment, la lésion du cortex préfrontal médian provoque l'incapacité des rats de passer d'une stratégie spatiale à une stratégie indicée (Ragozzino et al., 1999). L'implication du cortex préfrontal a également été mise en évidence chez l'Homme. Ainsi, différentes études montre en outre que le processus de changement de stratégie recrute fortement les mécanismes de la mémoire de travail (Robbins, 2007 ; Liefooghe et al., 2008).

II. La mémoire de travail : aspect neurofonctionnel

Ces différentes classifications mettent en évidence le rôle essentiel du lobe temporal médian et plus précisément de l'hippocampe (HPC) dans la MLT, ainsi que celui du cortex préfrontal (CPF) dans la MDT. Cependant, les nombreuses relations et interactions entre ces deux systèmes et ces deux structures ne permettent pas de restreindre la mémoire à la seule dichotomie HPC-MLT / CPF-MDT. Néanmoins, compte tenu du rôle primordial du CPF dans la MDT ainsi que l'implication possible de l'HPC dans ces mêmes processus, nous nous proposons ici de décrire l'anatomie de ces deux structures dans la perspective de comprendre leur fonctionnement propre, ainsi que leurs interactions mutuelles.

II.A. L'hippocampe

1. Situation et cytoarchitecture de l'hippocampe

Le lobe temporal médian se compose d'une structure centrale, la formation hippocampique, et des cortex périrhinal et parahippocampique qui constituent les principales voies d'entrée des informations provenant des aires associatives néocorticales (cf. *fig. 6.A*). La formation hippocampique se décline en quatre régions distinctes cytoarchitectoniquement : le gyrus denté, l'hippocampe proprement dit (subdivisé en trois régions appelées Champs Amoniques), le subiculum et le cortex entorhinal (cf. *fig. 7*). La position tridimensionnelle de la formation hippocampique dans le cerveau est complexe. Selon Amaral et Witter (1995), elle « *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* » (cf. *fig.6.B*). 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 est constitué de trois couches :

- La ***couche moléculaire*** principalement constituée de prolongements dendritiques et axonaux ainsi que d'interneurones GABAergiques.
- La ***couche granulaire***, qui correspond à la couche principale, est constituée pour l'essentiel de cellules granulaires et de neurones GABAergiques, permettant le contrôle des efférences du gyrus denté.

- La ***couche polymorphe*** (ou hilus) qui comprend une grande variété de types cellulaires.

La corne d'Ammon se subdivise en trois champs ammoniques qui se succèdent (CA3, CA2, CA1) et s'organisent en couche. On distingue une couche 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.

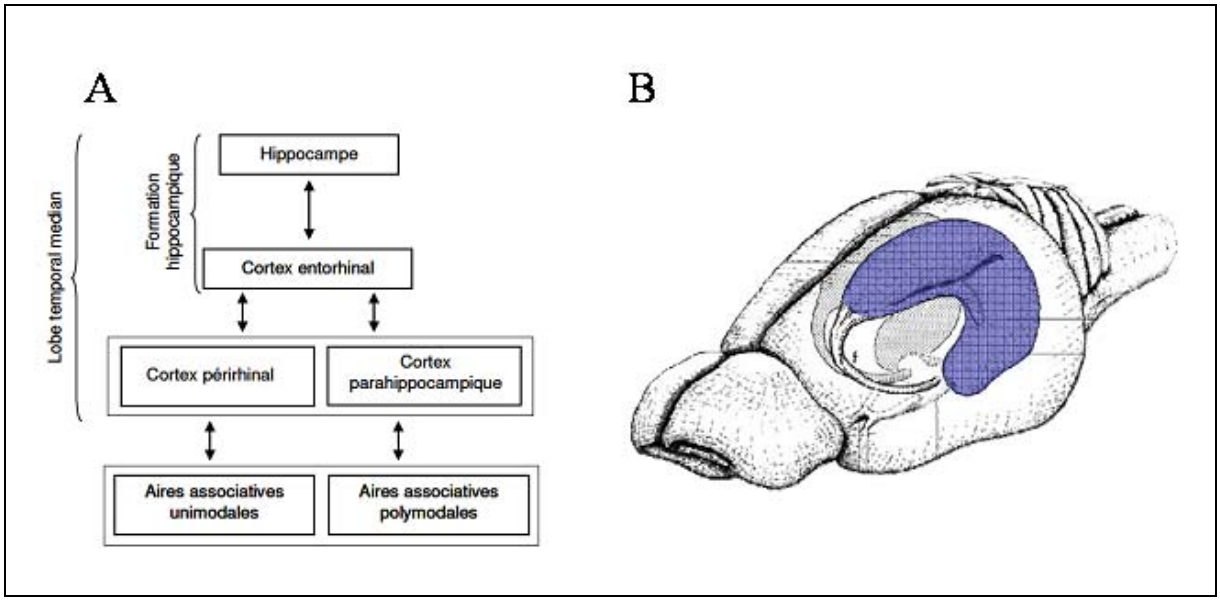


Figure 6 : A: Organisation fonctionnelle du lobe temporal médian (Lavenex et Amaral, 2000) ; B: Positionnement de l'hippocampe dans le cerveau des rongeurs (Amaral et Witter, 1995).

2. Les connexions intrahippocampiques : le circuit trisynaptique

Décrit pour la première fois par le neuroanatomiste Ramón Y Cajal en 1911, ce circuit possède la particularité de ne présenter que des connexions unilatérales (cf. *fig. 7*). Les cellules pyramidales du cortex entorhinal envoient leurs axones, formant la voie perforante, vers le gyrus denté pour contacter les cellules granulaires. Les axones des cellules granulaires, les fibres moussues, contactent les cellules pyramidales du CA3 qui, à leur tour, envoient des axones, appelés les « collatérales de Schaffer », vers l'aire du CA1. Ces derniers neurones envoient leurs projections hors de l'hippocampe, vers le subiculum qui contacte en retour le

cortex entorhinal, formant ainsi une boucle anatomique trisynaptique. 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.

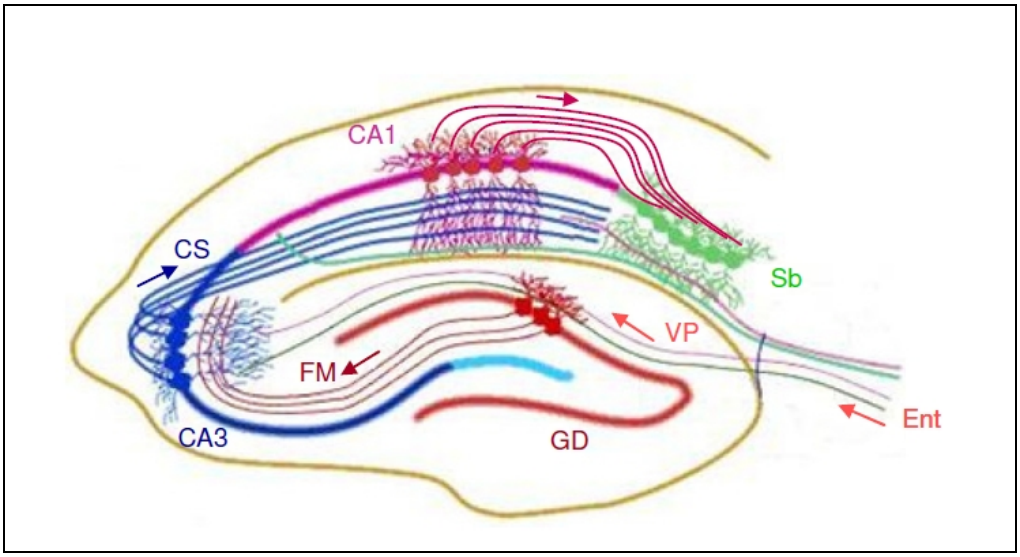


Figure 7 : Schéma représentant les connexions intrahippocampiques du circuit trisynaptique. Ent : cortex entorhinal ; VP : voie perforante ; GD : gyrus denté ; FM : fibres moussues ; CS : collatérales de Schaffer ; Sb : subiculum.

3. Les connexions extrinsèques de l'hippocampe

La grande majorité des ***afférences*** hippocampiques passe par le cortex entorhinal qui reçoit lui-même des projections des cortex périrhinal, piriforme, insulaire, rétrosplénial, préfrontal, ainsi que du bulbe olfactif. 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. Les champs CA3 et CA1 reçoivent également des afférences cholinergiques et GABAergiques en provenance du septum médian et notamment du noyau réuniens qui permettrait un retour indirect des informations du cortex préfrontal vers l'hippocampe (Vertes, 2006). De manière plus spécifique, le CA1 reçoit des afférences thalamiques et amygdaliennes (pour revue voir Amaral et Witter, 1995).

La principale ***voie de sortie*** de l'hippocampe passe par le subiculum qui projette sur un grand nombre d'aires corticales comme le cortex préfrontal (médian, orbitofrontal, infralimbique, prélimbique), le cortex rétrosplénial et le cortex entorhinal. La région septale et les corps mammillaires de l'hypothalamus 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 (pour revue voir Amaral et Witter, 1995).

Ainsi, ces connexions directes ou indirectes avec de nombreuses aires impliquées dans les processus mnésiques et émotionnels (telles que le CPF, le thalamus ou l'amygdale) renforcent l'hypothèse d'un rôle intégrateur de l'hippocampe, permettant le lien entre les différents systèmes de mémoire.

II.B. Le cortex préfrontal

De nombreuses études chez le rat, le singe et l'Homme démontrent le rôle essentiel du CPF dans les *fonctions exécutives*. Cet ensemble de processus cognitif permet la réalisation de séquences comportementales complexes incluant le focus attentionnel, la résistance aux interférences, l'inhibition comportementale, le changement de tâche, la planification et la prise de décision (pour revue chez l'animal voir Dalley et al., 2004 ; chez l'Homme voir Kane et Engle, 2002). Plus généralement, le CPF est essentiel au maintien actif (« *on-line* ») des représentations mnésiques, permettant leur manipulation en vue de la réalisation d'actions dirigées vers un but. Compte tenu de son hétérogénéité fonctionnelle, la difficulté est de définir les fonctions cognitives spécifiques liées aux diverses sous régions du CPF. Dans le cadre de nos travaux de thèse, nous décrirons brièvement l'organisation structurale ainsi que les diverses connexions du CPF, avant de voir ses implications dans la MDT.

1. Neuroanatonmie du CPF

L'organisation histologique du cortex cérébral (dont le CPF) repose principalement sur les découvertes de Ramon y Cajal et Golgi qui décrivirent une structure subdivisée en six couches (numérotées depuis la surface cérébrale) :

- ***la couche moléculaire***. Elle contient des axones et des dendrites en provenance des neurones des couches internes.
- ***la couche granulaire externe*** contient des neurones granulaires et reçoit les afférences d'autres aires du cortex (connexions cortico-corticales afférentes).
- ***la couche pyramidale externe***. Constituée de cellules pyramidales, elle émet des connexions vers d'autres zones du cortex cérébral. Il s'agit ici de connexions cortico-corticales efférentes.

- ***la couche granulaire interne***. Elle contient des neurones étoilés et pyramidaux. C'est par cette couche que les informations arrivent au cortex (par exemple du subiculum). Elle reçoit aussi les afférences en provenance de l'autre hémisphère cérébral.
- ***la couche pyramidale interne***. De cette couche partent des connexions efférentes hors du cortex. C'est, par exemple, de cette couche que partent les neurones qui innervent les motoneurones.
- ***la couche polymorphe***, la couche la plus interne à l'état adulte. Elle envoie des prolongements axonaux en direction du thalamus permettant une rétroaction sur les entrées du cortex cérébral, ainsi que la liaison indirecte avec l'hippocampe par l'intermédiaire du noyau reuniens (Vertes, 2006).

La difficulté majeure dans la description structurelle du CPF provient du fait que cette région présente de fortes différences inter-espèces. En se basant sur le cerveau des rongeurs, et l'implication des structures dans les fonctions cognitives majeures, nous pouvons retenir globalement l'organisation structurelle suivante (Uylings et al., 2003 ; Holmes et Wellman, 2009) (cf. *fig. 8*) :

- Le cortex préfrontal médian (***CPFm***), composé des cortex cingulaire antérieur (AC), prélimbique (PL) et infralimbique (IL). La région dorsale (AC) a été reliée à des comportements moteurs variés, alors que la partie ventrale (PL et IL) serait impliquée dans les processus émotionnels, cognitifs et mnésiques (Heidbreder et Groenewegen, 2003).
- Le cortex orbito frontal (***COF***) composé des cortex orbitofrontaux médian (MO), ventral (VO), latéral (LO) et dorsolateral (DLO). Son rôle est encore mal connu, mais il interviendrait dans l'intégration sensorielle, la prise de décision et l'anticipation notamment lors d'actions renforcées (Kringelbach, 2005).

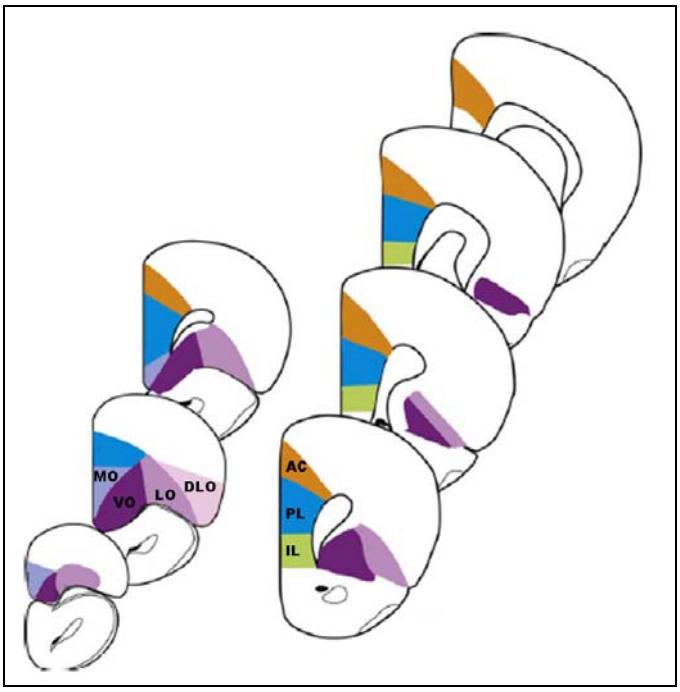


Figure 8 : Les principales structures du cortex préfrontal impliquées dans les processus mnésiques chez les rongeurs (adaptation de Paxinos et Franklin, 2001). MO: cortex orbitofrontal médian ; VO: cortex orbitofrontal ventral ; LO: cortex orbitofrontal latéral ; DLO : cortex orbitofrontal dorsolatéral ; AC: cortex cingulaire antérieur ; PL: cortex prelimbique ; IL: cortex infralimbique.

2. Les connexions du CPF

La majorité des connexions du CPF est réalisée entre ses différentes couches et sous-régions, révélant un haut degré d'activité intrinsèque et d'autorégulation (pour revue voir Dalley et al., 2004).

Toutefois, le CPF reçoit des afférences des ganglions de la base via des projections pallidothalamiques et nigrothalamiques provenant elles-mêmes de projections striatopallidales et striatonigrales. Outre les afférences thalamiques, le CPF possèdent des connexions cortico-corticales majeures issues du cortex pariétal postérieur et des aires corticales sensitives ainsi que de connexions en provenance de structures sous corticales telles que la substance noire, l'aire tegmentale ventrale, l'amygdale, l'hypothalamus latéral et l'hippocampe.

En retour, le CPF entretien des connexions réciproques directes vers ces structures, excepté l'hippocampe, ainsi que des projections directes sur le thalamus latéral, le mésencéphale et les régions du tronc cérébral. De la même manière, des connexions réciproques existent entre le CPF et les principaux noyaux à la source des différents systèmes de neurotransmission (noradrénaline, dopamine, sérotonine, acétylcholine). De plus, le cortex

préfrontal possède des projections indirectes sur l'hippocampe, par l'intermédiaire du noyau reuniens du thalamus.

L'ensemble des connexions anatomiques du CPF avec le reste du cerveau le positionne idéalement pour la régulation des fonctions exécutives (pour revue voir Vertes, 2004).

3. Le CPF : fonctions exécutives et MDT

Des enregistrements unitaires de neurones dans le CPF latéral chez le singe ont mis en évidence une activation prolongée et soutenue lors de la rétention d'informations pendant un bref délai (Fuster et Alexander, 1971 ; Kubota et Niki, 1971 ; Funahashi et al., 1989). Cette activité serait le marqueur de la rétention de l'information permettant le lien entre le stimulus présenté et la réponse contingente. Aujourd'hui, la neuroimagerie permet de reproduire ces résultats chez l'Homme, confirmant ainsi le rôle du CPF dans le maintien de l'information, et plus précisément du cortex préfrontal dorso-latéral (CPFdl) lors de tâches de mémoire de travail spatiale (Courtney et al., 1998). Des études lésionnelles chez le rat ont montré que le PL serait principalement impliqué lors de tâches de réponses différées, ce qui rapproche cette région du CPFdl chez les primates (Delatour et Gisquet-Verrier, 1999 ; Kesner, 2000). Néanmoins, bien qu'impliqué dans le rappel de la tâche, le PL (et plus largement le cortex frontal médian, CPFm) ne semble pas impliqué dans son encodage (Seamans et al., 1995). Le PL interviendrait donc dans les phénomènes de perception de la contingence entre l'action et la conséquence nécessaire à l'adaptation comportementale (Balleine et Dickinson, 1998). Ces données confirment que le CPFm serait principalement impliqué dans les processus de haut niveau cognitif tels que l'organisation, la planification et la flexibilité comportementale, à partir d'informations précédemment acquises (Dalley et al., 2004).

Dans ce cadre, il a été proposé que le CPFm serait une structure d'inhibition comportementale dans un but adaptatif (Iversen et Mishkin, 1970 ; Roberts et al., 1998). Ainsi, il a été montré que des lésions du cortex prélimbique/infralimbique (PL/IL) entraînaient l'absence d'extinction du comportement de peur conditionnée à un son, résultat pouvant s'expliquer par une incapacité à réaliser l'apprentissage de l'association son/absence de choc (Morgan et LeDoux, 1995 ; Garcia et al., 1999). Le rôle inhibiteur du cortex préfrontal est particulièrement important dans le cas des interférences. Ainsi, dans une tâche de MDT en labyrinthe radiaire, des lésions du PL chez le rat provoquent des erreurs de répétitions révélatrices d'une incapacité à supprimer les informations interférentes (Taylor et

al., 2003). Chez l'Homme, il a été montré que la capacité à supprimer les interférences dépend principalement du CPFdl (Kane et Engle, 2002 ; Konishi et al., 2010).

Le CPFm serait également impliqué dans les processus de changement de stratégie ou de règle. Des rats ayant une lésion située dans le PL/IL sont incapables de passer d'une stratégie spatiale à une stratégie indicée dans de nombreux tests (de Bruin et al., 1997 ; Ragozzino et al., 1999; Ragozzino et al., 2003 ; Rich et Shapiro, 2007 ; Young et Shapiro, 2009), ou de changer de règle d'apprentissage dans des épreuves de reconnaissances sensorielles ou de localisation (Birrell et Brown, 2000 ; Joel et al., 1997). Cette même implication du cortex préfrontal a également été mise en évidence chez l'Homme, montrant de plus que le mécanisme de changement de stratégie recrute fortement la mémoire de travail (Robbins, 2007 ; Liefooghe et al., 2008).

Ces données sont en accord avec le rôle du CPFm dans le focus attentionnel permettant la perception des indices pertinents lors d'un apprentissage.

Ainsi, parmi les structures du cortex préfrontal, le cortex préfrontal médian et plus particulièrement le cortex prélimbique semble soutenir les fonctions exécutives de sélection de l'information pertinente et d'inhibition des informations non pertinentes. Ces opérations sont critiques pour la mémoire de travail (Kolb, 1990 ; Kane et Engle, 2002 ; Burgess et Braver, 2010), ce qui explique l'intérêt tout particulier que nous avons porté au cortex PL lors de nos études sur l'altération de la mémoire de travail lors du vieillissement.

II.C. L'interaction CPF-HPC : implication dans la mémoire de travail

1. Interactions structurelles

Comme décrit précédemment, il existe de nombreuses interactions HPC-CPF aussi bien fonctionnelles (cf. *Bases théoriques I.C*) que structurelles (cf. *Bases théoriques II.A.2* et *II.B.2*) (pour revue voir Laroche et al., 2000). Plus précisément, des injections de marqueurs rétrogrades et antérogrades ont montré que seules les régions hippocampiques du CA1 et du subiculum projetaient sur le CPFm et le cortex orbito-frontal (Rosene et Van Hoesen, 1977 ; Cavada et al., 1983 ; Goldman-Rakic et al., 1984 ; Jay et Witter, 1991 ; Barbas et Blatt, 1995 ; Carmichael et Price, 1995). A l'inverse, l'HPC ne reçoit pas de projection en retour du CPF (Witter et al., 1989 ; Goldman-Rakic et al., 1984 ; Carmichael et Price, 1995). Néanmoins,

des projections indirectes existent par l'intermédiaire du thalamus, et plus précisément du noyau reuniens (Vertes, 2006).

Plusieurs expériences lésionnelles chez le rat ont montré que l'HPC, et plus particulièrement l'HPC dorsal était nécessaire à la tâche de MDT d'alternance différée (Maruki et al., 2001 ; Wang et Cai, 2006). Plus récemment, la combinaison de lésions ipsi ou controlatérales dans l'HPC dorsal et le CPFm a mis en évidence le rôle primordial de l'intégrité de la voie hippocampo-préfrontale dans la MDT (Izaki et al., 2008).

2. Interactions neurofonctionnelles

Les mécanismes cellulaires et moléculaires sous tendant les connexions hippocampo-prefrontales ont été étudiés grâce à l'électrophysiologie. L'une des premières expériences a révélé que chez le rat anesthésié, l'application de trains de stimulations à haute fréquence sur l'HPC provoquait une potentialisation à long-terme (PLT) rapide et stable dans le PL (Laroche et al., 1990). D'autres expériences ont depuis renforcé cette observation, en montrant notamment que ce mode d'induction de la PLT dans le PL induisait une activation extrêmement rapide (quelques minutes) de la PKA (protéine kinase A) et des cascades de transduction qui en résultent (Jay et al., 1998). Nous décrirons plus précisément l'importance de ces mécanismes moléculaires, et leurs implications dans la mémoire de travail dans la section suivante (cf. *Bases théoriques II.D*).

Une autre forme de plasticité synaptique est la dépression à long terme (DLT). L'une des premières expériences sur les relations entre la DLT et la MDT a consisté à observer cette forme de plasticité lors d'une tâche de mémoire de travail chez le rat en labyrinthe radiaire à huit bras. Dans cette expérience, une première phase consistait à laisser les rats visiter quatre bras pour obtenir une récompense alimentaire, puis après un délai de 30 min, les rats devaient choisir les quatre bras non visités. Les résultats révèlent une diminution de la réponse synaptique hippocampo-préfrontale pendant le délai, qui se prolongeait pendant la seconde phase de test de manière proportionnelle à l'augmentation des performances (Burette et al., 2000). L'une des hypothèses serait que la DLT, en augmentant le ratio signal-bruit de fond, permettrait d'inhiber les informations interférentes afin de ne conserver que les informations pertinentes nécessaires à la réalisation de la tâche de MDT. Cette hypothèse a été confortée récemment par l'utilisation de souris déficientes dans des formes spécifiques de DLT qui présentaient des déficits de MDT liés à une incapacité à supprimer des informations précédemment acquises (Nicholls et al., 2008). La même équipe a ensuite utilisé des souris possédant une PKA inactive dans le CA1 et certaines couches corticales. Ces souris

présentent une facilitation de la DLT concomitante à une augmentation de leurs performances en MDT, probablement liée à la capacité accrue à supprimer plus rapidement les informations non nécessaires à la réalisation de la tâche (avec en contre-partie une diminution des performances dans des tâches de MLT) (Malleret et al., 2010). Ces résultats suggèrent un rôle inverse des mécanismes de plasticité entre les différentes formes de mémoire. Alors que la PLT sous tendrait la MLT en consolidant les informations acquises au fur et à mesure de l'apprentissage, la DLT permettrait de supprimer les informations interférentes provenant des essais précédents lors d'une tâche de MDT (Malleret et al., 2010).

L'ensemble de ces données montre que la voie hippocampo-préfontale est essentielle à la MDT. Comme nous allons le voir, nos travaux confortent ce rôle majeur, et élargissent l'étude aux mécanismes moléculaires et aux systèmes de neurotransmission impliqués dans les déficits observés lors du vieillissement.

II.D. Mécanismes moléculaires de la mémoire

Après avoir tenté de définir les structures impliquées dans la MDT, la recherche actuelle vise à comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans ce type de mémoire. Comme nous l'avons vu, les études électrophysiologiques ont montré une dualité de la plasticité cérébrale entre MDT et MLT. Ces mécanismes de plasticité étant dépendant des processus moléculaires ayant lieu au sein même des neurones, l'étude de ces derniers est donc essentielle à la compréhension de ces phénomènes de plasticité.

1. Rôle dans la MLT

De nombreuses données expérimentales ont montré l'implication des récepteurs des neurotransmetteurs dans la production de seconds messagers, initiateurs des cascades moléculaires intracellulaires AMPc et calcium dépendantes. Ces cascades moléculaires permettent de réguler l'activation des enzymes de phosphorylation (kinase) et de déphosphorylation (phosphatase), dont la balance est essentielle à l'ensemble des fonctions cellulaires, et plus particulièrement à celles requises dans les processus mnésiques (Wang et Kelly, 1996 ; Mansuy et Shenolikar, 2006). Comme nous l'avons vu précédemment (cf. *Bases théoriques II.C.2*) l'induction d'une PLT provoque l'activation rapide de la PKA (Jay et al., 1998), et de manière réciproque l'inhibition de la PKA bloque l'initiation de la PLT (Huang et Kandel, 1998). De nombreux arguments démontrent le rôle central des kinases dans

l'apprentissage et la consolidation en MLT, notamment la PKA (pour revue voir Abel et Nguyen, 2008), la PKC (Bonini et al., 2007), les CaMK II et IV (Wang et al., 2003 ; Peters et al., 2003), et des MAPK (Blum et al., 1999). A titre d'exemple, il a été démontré que l'activation de la PKA dans l'HPC améliorait les performances en mémoire spatiale, alors que son inhibition était délétère (Bernabeu et al., 1997 ; Barad et al., 1998). A l'inverse, les phosphatases PP2A et calcineurine (PP2B) joueraient un rôle négatif sur la consolidation mnésique, démontré par l'amélioration des performances d'apprentissage et de mémoire, consécutivement à leur inactivation moléculaire ou génétique (Havekes et al., 2008 ; Sharma et al., 2003). La protéine CREB (« *cAMP Response Element Binding* »), dont l'activité est directement régulée par la balance kinase/phosphatase, permet l'étude des mécanismes moléculaires impliqués lors des processus mnésiques (pour revue voir Carlezon et al., 2005). Une étude récente a ainsi montré que le maintien de la phosphorylation de CREB (pCREB actif) dans le CA1 reflétait le niveau d'apprentissage de souris lors d'un apprentissage spatial en piscine de Morris (Porte et al., 2008b).

2. Rôle dans la MDT

Lors d'une tâche de MDT, une augmentation d'activation de la CaMKII et de la PKC a été mise en évidence dans le CPFm, suggérant l'implication de la balance kinase/phosphatase également dans la MDT. Cependant, contrairement aux résultats obtenus sur la MLT, l'inhibition des kinases, et notamment de la PKA, provoque une amélioration des performances, alors que leur activation est délétère (Taylor et al., 1999 ; Runyan et Dash, 2005). De même, les effets délétères du stress sur la MDT résulteraient de la suractivation de la PKC dans le CPF, alors que son inhibition permet de restaurer les performances d'animaux stressés (Birnbaum et al., 2004). Ces résultats suggèrent que l'augmentation des mécanismes de phosphorylation serait délétère pour la MDT. Cette hypothèse est confortée par le rôle opposé des phosphatases, notamment de la calcineurine, dont l'inhibition dans le CPFm provoque une altération des performances en MDT de manière dose-dépendante (Zeng et al., 2001 ; Runyan et al., 2005).

La balance kinase/phosphatase apparaît donc comme un régulateur essentiel de la mémoire, agissant de manière opposée entre MDT et MLT (cf. *fig. 9*). Une expérience dont nous avons parlé précédemment (cf. *Bases théoriques II.C.2*) semble confirmer ce rôle en montrant que l'invalidation génétique de la PKA chez des souris améliore leurs performances en MDT mais diminue celles de MLT (Malleret et al., 2010). D'un point de vue mécanistique,

cet effet différentiel entre ces deux formes de mémoire pourrait s'expliquer par leurs rôles respectifs. La MLT, en tant que mémoire stable et durable, se voit améliorée par les kinases qui vont permettre le déclanchement de PLT et la consolidation des informations. A l'inverse, la MDT est une mémoire labile dont les informations sont manipulées et constamment « mises à jour » (« *on line* »). Les phosphatases permettraient alors de réduire le « bruit » créé par les informations interférentes, tout en augmentant le « signal » que constituent les informations pertinentes (Gonzalez-Burgos et al., 2005 ; Dash et al., 2007).

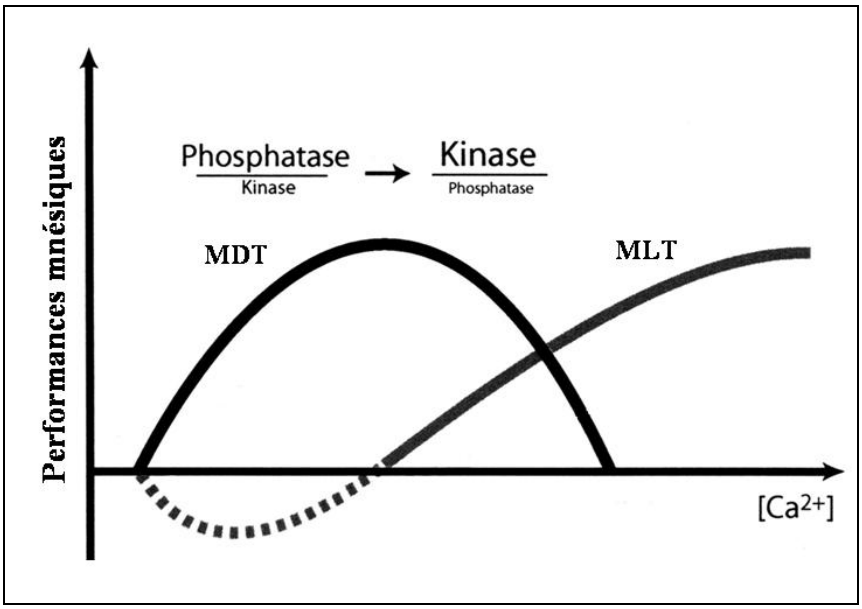


Figure 9 : Illustration des relations entre la balance kinase/phosphatase et les différentes formes de mémoire (adaptation d'après Dash et al., 2007).

III. Mémoire et vieillissement

III.A. Atteintes cognitives lors du vieillissement

Le vieillissement, ou sénescence est un processus normal et inéluctable touchant tous les êtres vivants une fois atteinte la maturité. Ce processus complexe se caractérise par l'altération du renouvellement cellulaire de tous les tissus y compris le cerveau, provoquant par la suite l'affaiblissement progressif des capacités physiques et psychiques de l'individu. 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. Avec l'augmentation de l'espérance de vie, la population âgée représente une part de plus en plus importante dans nos sociétés actuelles. Il apparaît donc essentiel de mettre au point de nouvelles thérapeutiques capables d'atténuer les effets délétères de ce processus, afin de permettre aux individus de préserver au mieux leurs capacités physiques, émotionnelles et cognitives. Cependant, l'une des difficultés actuelles réside dans la définition même du terme de vieillissement pathologique, puisqu'il n'existe pas de séparation clairement définie avec le processus biologique « normal ». Dans cette première partie, nous tenterons donc d'exposer les différences entre vieillissement « normal » et pathologique ainsi que les altérations de la mémoire, notamment de la MDT, afin de pouvoir aborder dans la seconde partie les hypothèses du vieillissement cognitif et les traitements envisagés.

1. Vieillissement « normal » et pathologique

1.A. Diagnostic clinique:

Le vieillissement cognitif est un processus hétérogène entre les individus et entre les fonctions cognitives, pouvant conduire dans les cas extrêmes à des démences. Le terme de démence est défini par l'OMS comme « une altération acquise progressive de la mémoire et d'au moins une autre fonction supérieure ». Parmi ces pathologies, la maladie d'Alzheimer (MA) apparaît aujourd'hui comme la démence majeure puisqu'elle représente plus de 60% des cas de démences. Son incidence et de 10% après 65 ans et atteint 50% passé 85 ans (Ferri et al., 2005 ; Helmer et al., 2006). Cependant, l'un des points soulevés par ces études est la difficulté de différentiation entre vieillissement « normal » et pathologique, puisque seul ce dernier est répertorié au DSM-IV (4e version du manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux) dans la catégorie des démences. Cette différentiation apparaît aujourd'hui

comme une nécessité puisque le diagnostic, ne se faisant principalement que sur des critères psychologiques ou psycho-sociologiques, ne permet d'identifier les signes de la maladie que dans les stades avancés (Lindesay, 2008). D'où la proposition de révision du DSM afin de modifier la classification de « démence » en « Trouble Neurocognitif Majeur » incluant les patients dont certaines fonctions cognitives sont en déclin (ex : attention, MDT), ce qui pourrait refléter un stade prodromal de la MA (patient MCI, pour *« Mild Cognitive Impairment »)* (Sellal et al., 2005).

Au cours du vieillissement, on observe une altération précoce de la MDT, rapidement suivie par une altération des fonctions exécutives et de la mémoire épisodique (cf. *fig. 10.A*), alors qu'à l'inverse, les connaissances (mémoire sémantique) semblent préservées, voire améliorées (cf. *fig. 10.B*). En considérant cela, le vieillissement pathologique se caractérise par une accélération de la perte cognitive, modérée au début du processus (ce que l'on nomme MCI), puis extrêmement marquée lors des stades plus avancés (maladie d'Alzheimer). Cette représentation « clinique » du vieillissement montre l'importance du stade intermédiaire MCI, puisque c'est dans cette population de patients que le diagnostic différentiel sera posé. Aujourd'hui de nombreuses études sont poursuivies afin de trouver les marqueurs biologiques (notamment par imagerie ou analyse moléculaire, voir Dubois et al., 2010) qui permettront d'identifier les patients MCI qui évolueront vers une MA, et nécessitant donc un traitement en amont. La compréhension des mécanismes impliqués dans le vieillissement « normal » révèle alors toute son importance dans ce diagnostic et la compréhension des relations existantes entre vieillissement cérébral et MA.

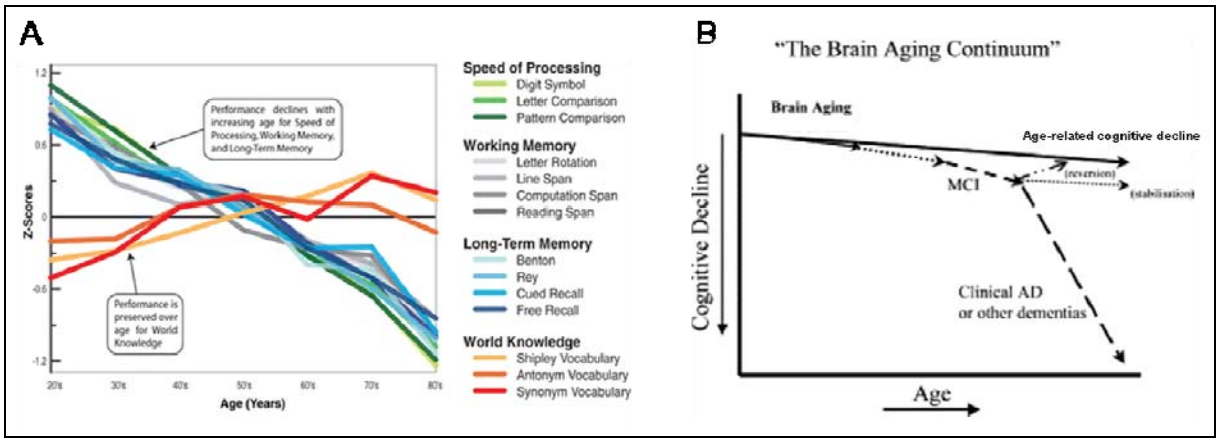


Figure 10 : Illustrations du déclin cognitif lors du vieillissement normal et pathologique. A : on observe que la vitesse de traitement de l'information (« speed processing »), la mémoire de travail (« working memory ») et la mémoire à long-terme (« long-term memory ») déclinent avec l'âge, alors qu'à l'inverse, la mémoire des connaissances de type sémantique (« word knowledge ») est préservée (Park et Reuter-Lorenz, 2009). B : illustration de l'évolution parallèle du déclin des fonctions cognitives lors du vieillissement normal (Age-related cognitive decline), chez les patients MCI, et lors du développement des signes pathologiques (« clinical AD or other dementias») (d'après Lockhart et Lestage, 2003).

1.B. Atteinte neurofonctionnelle chez l'Homme

Le déclin cognitif décrit précédemment résulte des altérations structurelles observées dans le cerveau (cf. *fig. 11*). Ainsi, lors du vieillissement, on observe une altération modérée de la substance blanche avec cependant une atteinte plus importante dans les régions frontales (Head et al., 2004 ; Salat et al., 2004). La substance grise est plus fortement touchée, particulièrement au niveau du cortex préfrontal et en moindre proportion dans l'hippocampe. Lors du développement de la MA, l'atteinte structurelle est plus précoce, et débute au niveau de l'hippocampe et du lobe temporal médian, avant de se propager dans les cortex frontaux, pour finalement toucher l'ensemble du cortex dans les stades avancés. Une perte neuronale a également été mise en évidence dans plusieurs régions, telles que le néocortex et l'hippocampe, dans le cerveau de personnes âgées ou atteintes de la MA (pour revue sur la maladie d'Alzheimer voir Bi, 2010).

On note également, au début du processus, une croissance dendritique (pouvant résulter d'un mécanisme compensatoire consécutif à la dégénérescence des neurones voisins), suivie d'une régression à mesure de l'âge. Ces processus neurobiologiques sont encore une fois plus marqués chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer que chez les sujets âgés

sains (Coleman et Flood, 1987). Ces différences physiopathologiques expliquent en partie les différences des atteintes cognitives observées entre le vieillissement normal et la MA.

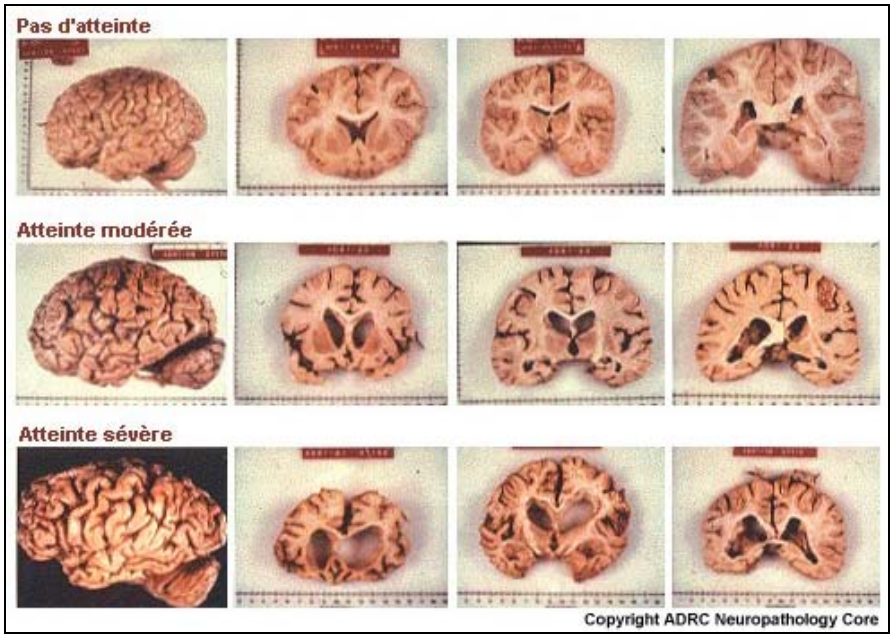


Figure 11 : Evolution de l'atteinte cérébrale lors du vieillissement pathologique. On observe une altération importante du cortex cérébral marquée notamment par une diminution des circonvolutions, ainsi qu'une hypertrophie des ventricules cérébraux suite à l'atteinte de la substance blanche et de la substance grise.

1.C. Atteintes neurofonctionnelles chez l'animal.

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, le nombre de synapses diminue avec l'âge. Une étude de microscopie électronique montre que chez le rat âgé on observe une diminution de 27% du nombre de synapses axodendritiques 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 préfrontal chez le macaque (Duan et al., 2003), et la sous-région CA1 de l'hippocampe chez la souris. De plus, alors que l'apprentissage spatial en piscine de Morris entraîne une augmentation de la densité d'épines dendritiques chez le rat jeune (Moser et al.,

1994), on observe une diminution des épines dendritiques basales corrélée avec le déficit d'apprentissage spatial de souris âgées (von Bohlen und Halbach et al., 2006).

Altération de la plasticité

De nombreuses études ont montré des altérations de la PLT 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 plasticité amoindrie chez le rat âgé (Landfield et Lynch, 1977 ; Massicotte et Baudry, 1991 ; Muller et al., 1991).

2. Altérations de la mémoire lors du vieillissement chez l'Homme

Compte tenu des objectifs de la thèse, nous développerons principalement les atteintes de la MDT apparaissant au cours du vieillissement.

Le développement de nouvelles techniques d'imagerie fonctionnelle chez l'Homme a apporté récemment une méthode sans précédent de visualisation de l'activité cérébrale et de ses modifications liées à l'âge (pour revue voir Bishop et al., 2010). Les données recueillies ont montré que des régions collaborant lors de la réalisation de processus cognitifs présentent une perte de la coordination d'activation lors du vieillissement, ce qui suggère une diminution globale des fonctions intégratives (Andrews-Hanna et al., 2007).

En plus de cette perte de coordination, le vieillissement provoque une diminution de la précision dans la localisation de l'activation neuronale dans plusieurs zones du cerveau (cf. *fig.12.A*). Ces observations sont particulièrement prononcées lors de tests de MDT dans le CPF, où l'activation se fait de manière unilatérale chez des sujets jeunes, alors qu'elle se généralise aux deux lobes préfrontaux chez les sujets âgés. Ce phénomène, qui n'est pas exclusif à la MDT et au CPF, est connu sous le nom de ***HAROLD*** pour « ***H****emispheric* ***A****symetry* ***R****eduction in* ***Old****er adults* » (Cabeza, 2002 ; Park et Reuter-Lorenz, 2009) (cf. *fig.12.B*). Ce mécanisme traduirait des processus de compensation permettant aux individus

âgés de réaliser la tâche, puisqu'il a été montré que cette activation bilatérale était corrélée aux performances chez ces sujets. A l'inverse, chez les sujets âgés déficitaires, l'activation du CPF reste unilatérale mais plus importante, ce qui serait le reflet d'une suractivation délétère (Cabeza et al., 2002).

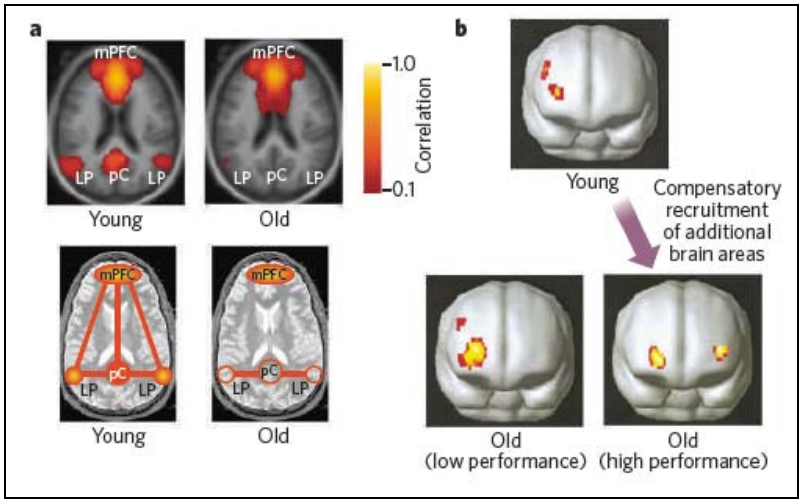


Figure 12 : Altérations fonctionnelles des profils d'activations cérébrales lors du vieillissement. A : Perte de coordination entre systèmes lors du vieillissement (Andrews-Hanna et al., 2007) ; B : Visualisation par IRM des mécanismes compensatoires mis en place lors du vieillissement : modèle HAROLD (Cabeza et al., 2002).

Conjointement à la perte de latéralisation dans le CPF, plusieurs études ont montré une modification globale des profils d'activité cérébrale (Grady et al., 1994; Grady et al., 1995 ; Park et al., 2003). Ces auteurs ont observé une activité des régions occipito-temporals, notamment hippocampique, plus faibles chez les sujets âgés, conjointement à une hyperactivation des régions antérieures, incluant le cortex préfrontal. Ce phénomène, nommé ***PASA*** (pour « ***P****osterior* ***A****nterior* ***S****hift in* ***A****ging* ») est considéré comme étant une compensation fonctionnelle du défaut d'activation des régions occipitalo-temporales (Davis et al., 2008) (cf. *fig.13*).

Des études récentes émettent l'hypothèse que l'hypoactivation hippocampique serait consécutive à une hyperactivation présente dans les stades prodromaux de la MA, et résulterait de l'altération structurelle de cette région lors de l'avancement de la maladie (Sperling, 2007 ; Miller et al., 2008 ; O'Brien et al., 2010).

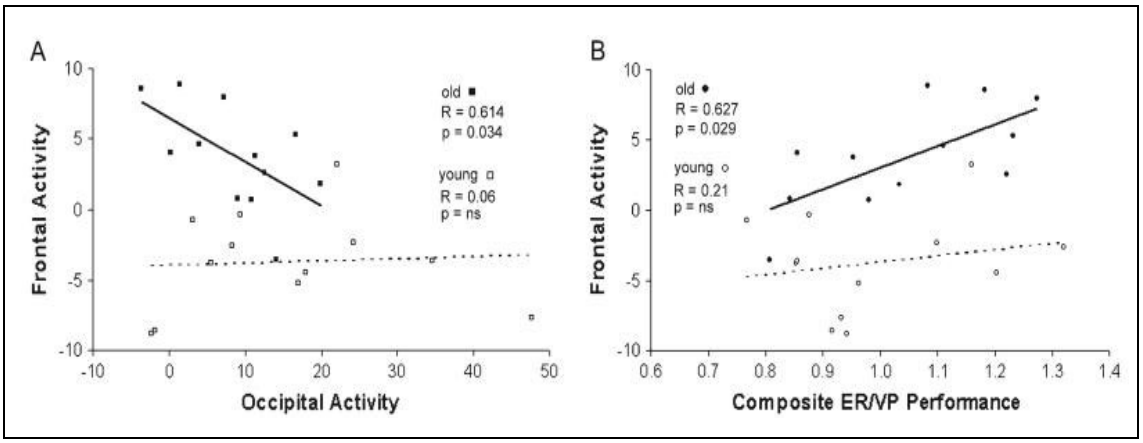


Figure 13 : Modèle PASA : ce modèle décrit le shift d'activité dans les régions frontales chez les sujets âgés comme un mécanisme compensatoire (Davis et al., 2008). A : corrélation effectuée entre l'activité dans les régions frontales et occipitale. B : corrélation entre l'activité dans les régions frontales et les performances de rappel épisodique (ER) ou perception visuel (VP).

Les relations entre HPC et CPF lors du vieillissement ont été récemment étudiées dans une tâche de mémoire relationnelle (Leshikar et al., 2010). Le test consiste à formuler une phrase à partir de deux items présentés simultanément quelques secondes auparavant. Le CPF et l'hippocampe sont les deux principales aires recrutées puisqu'il est nécessaire de maintenir en mémoire les deux items le temps d'établir la relation et de formuler la phrase. Les résultats de Leshikar et ses collaborateurs montrent que les mêmes structures sont recrutées chez les sujets jeunes et âgés lors d'association simple. Lors de tâches plus complexes (items sans relation directe), les deux groupes présentent une suractivation hippocampique et préfrontale. Cependant, alors que l'activation de l'HPC ne diffère pas, l'activation préfrontale est plus marquée chez les sujets âgés. Ces données confirment que la suractivation spécifique du cortex préfrontal lors de tâches recrutant plus de ressources cognitives serait une signature du vieillissement, reflétant un mécanisme de compensation nécessaire à la réalisation de la tâche (cf. *fig.14*).

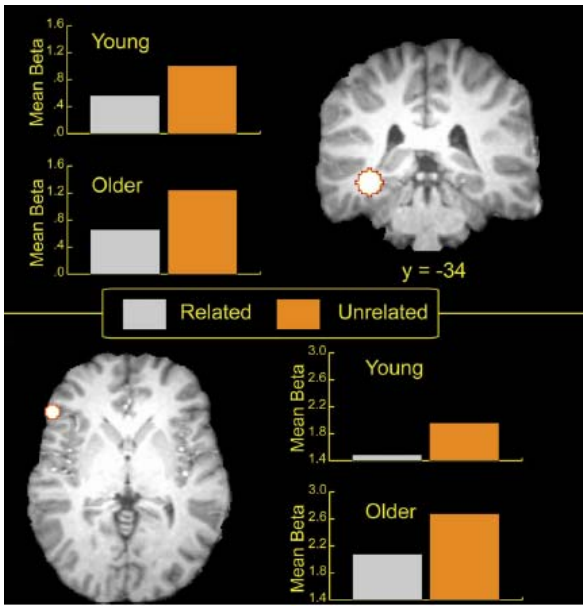


Figure 14 : Activation cérébrale au niveau de l'HPC (en haut) et du CPFdl (en bas), chez des sujets jeunes (« young ») ou âgés (« older »), lors d'une tâche d'association simple (« related ») ou complexe (« unrelated ») (Leshikar et al., 2010).

L'une des caractéristiques majeures du vieillissement mnésique est son caractère hétérogène entre les individus. Pour tenter d'expliquer ces différences interindividuelles, Gazzalet et ses collaborateurs (2005) ont soumis des sujets jeunes ou âgés à une tâche de reconnaissance de visage ou de paysage. Les résultats obtenus confirment l'altération de la mémoire de travail chez les sujets âgés (cf. *fig. 15.A*), ainsi qu'un lien entre ce déficit et une incapacité à supprimer les informations interférentes. De plus, les résultats d'imagerie montrent un déficit de suppression de l'activité dans le CPF chez les sujets âgés, lorsqu'il faut ignorer une information spécifique (« *suppression index* ») (cf. *fig. 15.C*). De manière intéressante, en séparant les individus âgés en deux groupes « performant » et « non performant » (cf. *fig. 15.B*), l'analyse des résultats d'imagerie a révélé que seuls les individus du groupe « non performant » présentaient ce déficit de suppression (cf. *fig.15.D*).

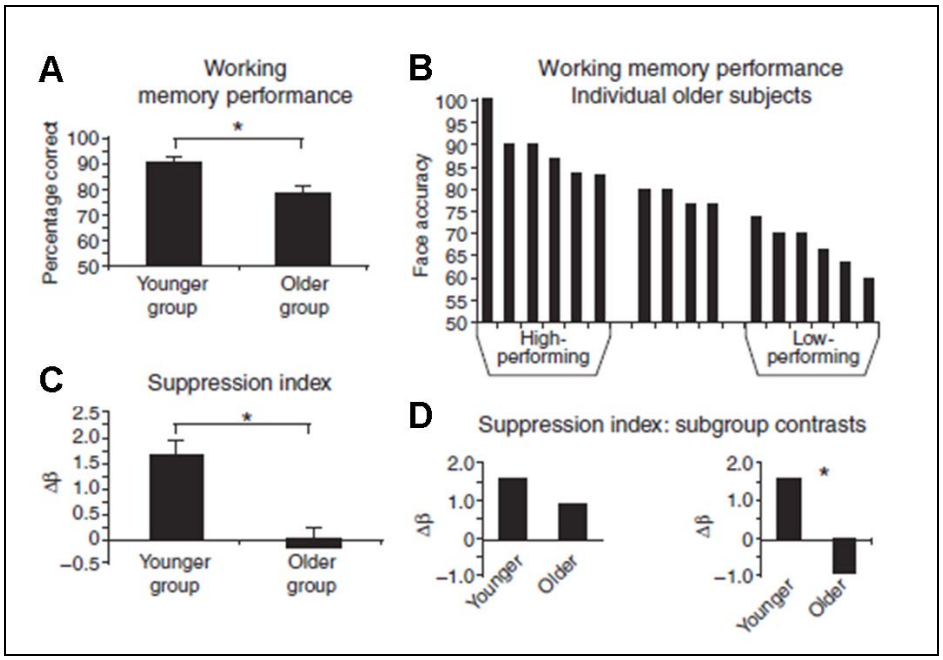


Figure 15 : Etude de Gazzaley et al. (2005) montrant un lien entre l'augmentation de la sensibilité aux interférences et le déficit de MDT observé chez les sujets âgés « non performants ». A : performances dans l'épreuve de mémoire de travail. B : représentation des performances des sujets âgés permettant la dissociation en deux sous groupe « performant » et « non performant ». C : variation de l'activation du CPF lorsque la suppression d'interférence est nécessaire. D : index de suppression dans les sous-groupes individus âgés « performants » et « non performants ».

Afin d'expliquer la capacité préservée d'une partie de la population âgée à maintenir un niveau élevé d'aptitudes mnésiques, Park et Reuter-Lorenz (2009) ont proposé le modèle ***STAC*** (« ***S****caffolding* ***T****heory of* ***C****ognitive* ***A****ging* »). Le terme « *scaffolding* » dont la traduction littérale signifie « échafaudage », est difficilement transposable au domaine des neurosciences. Nous utiliserons plutôt ici le terme « circuits additionnels ». Ce modèle propose que le maintien des aptitudes mnésiques avec l'âge, malgré les modifications neuronales et les altérations fonctionnelles, est rendu possible par le recrutement de circuits additionnels permettant un phénomène de compensation. Il s'agit en fait d'une extension des phénomènes neuronaux observés lors d'apprentissages au cours de la vie, dès les premiers stades du développement. Lors d'un apprentissage, de nombreux circuits sont recrutés, et avec la répétition de la tâche, le circuit le plus adapté est sélectionné (ex : cf. *Bases théoriques I.C.2*). Les circuits additionnels, devenus silencieux au profit des régions plus spécifiques, pourraient à nouveau être recrutés si nécessaire (Petersen et al., 1998), notamment lors de l'altération fonctionnelle du circuit principal comme c'est le cas lors du vieillissement. Dans ce cadre, le cortex préfrontal apparaît comme l'une des régions majeures de compensation. Le

modèle ***STAC*** reprend notamment les théories ***HAROLD*** et ***PASA*** décrivant lors du vieillissement une bilatéralisation de l'activité du CPF, ainsi qu'un shift d'activation des régions postérieures vers les régions frontales, deux phénomènes proposés à l'origine des compensations mnésiques. Le recrutement de circuits additionnels lors du vieillissement serait donc un mécanisme physiologique tendant à contrer les effets délétères du vieillissement.

Cependant, la suractivation du CPF pourrait résulter du mode d'étude transversale des patients. En effet, l'étude de mêmes sujets à 6 années d'écart (étude longitudinale) montre une diminution globale d'activation dans le cerveau, y compris dans le CPF (Nyberg et al., 2010). Néanmoins, Reuter-lorenz a émis une hypothèse permettant d'accorder les théories apparemment incompatibles d'une augmentation ou d'une diminution d'activation du CPF liées à l'âge. Ce modèle, dénommé ***CRUNCH*** (pour « ***C****ompensation-****R****elated* ***U****tilization of* ***N****eural* ***C****ircuits* ***H****ypothesis* »), stipule que les sujets âgés recrutent plus de ressources cognitives afin d'accomplir des tâches en nécessitant moins chez les sujets jeunes (Reuter-Lorenz et Cappell, 2008 ; Schneider-Garces et al., 2010). Dans une étude récente, cette équipe a ainsi montré que, pour une faible charge mnésique, les sujets âgés présentaient une activation plus importante du CPFdl tout en réussissant la tâche. Lors d'une charge mnésique importante, les performances comme l'activation du CPFdl chez les sujets âgés étaient nettement inférieures à celles des sujets jeunes (Cappell et al., 2010). L'activation du CPFdl refléterait donc le recrutement plus important du CPFdl avec la charge mnésique, la limite cognitive chez les sujets âgés étant atteinte plus rapidement que chez les sujets jeunes.

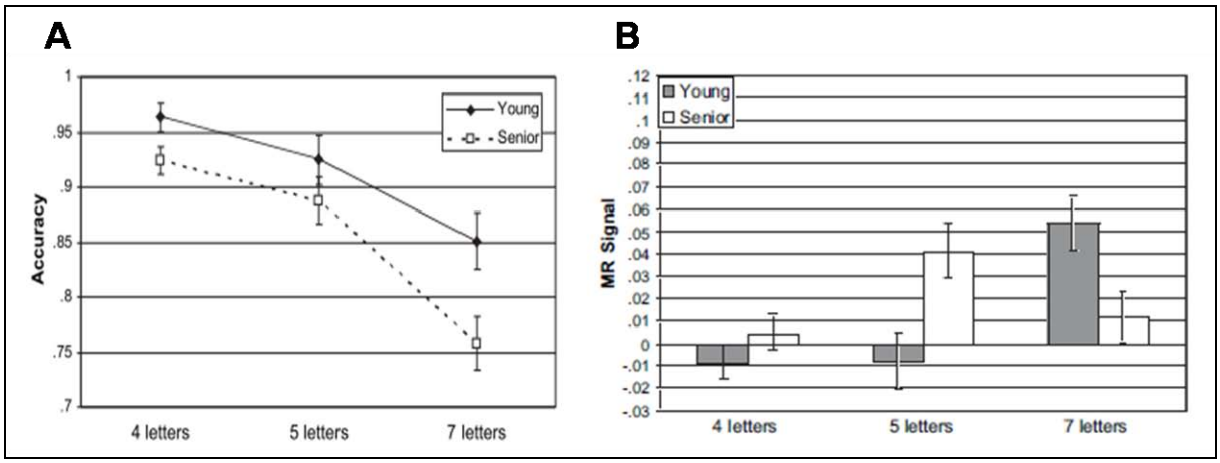


Figure 16 : Modèle CRUNCH : l'activation du CPFdl est supérieure chez les sujets âgés (« senior ») pour la réussite de tâches mnésiques nécessitant moins de ressources chez les sujets jeunes (« young ») (Cappell et al., 2010). A : performances dans un test d'empan mnésique. B : activation dans le CPFdl lors de la réalisation de la tâche.

III.B. Hypothèses neurobiologiques et traitements pharmacologiques du déficit cognitif lié à l'âge

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 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* », selon le type de tâche effectuée. Au delà de ces considérations comportementales qui permettent globalement de généraliser aux animaux les déficits cognitifs observés chez l'Homme, les modèles animaux permettent l'étude précise des processus neuronaux impliqués dans le vieillissement cognitif.

Le fait de pouvoir étudier la mémoire chez l'animal a permis de montrer les similitudes mécanistiques avec les processus observés chez l'Homme, y compris ceux impliqués dans le vieillissement cognitif. Le but de telles études est non seulement de comprendre ces mécanismes de manière fondamentale, mais également de développer des moyens permettant d'agir sur ces processus à des fins médicales.

Ainsi, en regard de l'altération globale des processus cognitifs lors du vieillissement et plus particulièrement de la mémoire de travail, il apparaît essentiel de développer des molécules psychopharmacologiques actives contre cette dégradation cognitive qui affecte la qualité de vie. Sans les oublier, nous n'aborderons pas ici les questions du diagnostic et de la prise en charge non pharmacologique, essentielles pour le devenir du patient. Nous nous attacherons plutôt à exposer les principales hypothèses psychopharmacologiques du déficit cognitif lié à l'âge, ainsi que les différentes stratégies thérapeutiques envisagées dans les traitements.

1. Dysfonctionnement des mécanismes moléculaires de la mémoire de travail au cours du vieillissement

Comme nous l'avons vu précédemment (cf. *Bases théoriques II.D*), les différentes formes de mémoire (MDT/MLT) sont sous-tendues par des processus moléculaires intraneuronaux, dont la dérégulation pourrait expliquer les altérations observées lors du vieillissement.

Les cascades de signalisations intracellulaires sont majoritairement activées par le calcium. Or, il est connu que l'homéostasie calcique est perturbée lors du vieillissement, avec notamment une augmentation de certains canaux calciques provoquant l'élévation du niveau basal du calcium, et l'augmentation de l'amplitude des vagues calciques suite à une stimulation neuronale (Toescu et al., 2004). Cette augmentation calcique pourrait conduire à un accroissement de l'activité basale de protéines kinases et provoquer l'altération de la MDT observée chez les sujets âgés (Dash et al., 2007). Une étude de Ramos et collaborateurs (2003) appuie cette hypothèse en montrant une augmentation de phosphorylation de la protéine CREB (CREB actif : pCREB) par la PKA spécifiquement dans le cortex préfrontal de rats âgés, sans modification dans l'hippocampe. Dans cette même étude, l'injection d'un activateur de la PKA (Sp-AMPc) exacerbe le déficit de MDT observé chez les rats âgés dans une tâche d'alternance dans un labyrinthe en T. A l'inverse, l'injection d'un inhibiteur de la PKA (Rp-cAMPS) améliore les performances des rats âgés. Ces travaux suggèrent que le déficit de MDT des sujets âgés résulterait de la désinhibition de la voie AMPc/PKA dans le CPF observée avec l'âge. Afin de conforter leur hypothèse, les auteurs ont montré que l'injection d'un activateur de la PKA entraînait des déficits de MDT chez le singe, et cela de manière proportionnelle à l'âge. Ces résultats s'opposent aux effets procognitifs de l'injection de cet activateur chez la souris âgée dans une tâche de MLT (Barad et al., 1998), mais

conforte la thèse d'une régulation différentielle de la MDT et de la MLT par l'activité kinasique (cf. *Bases théoriques II.D*).

D'autres études ont permis d'élargir au vieillissement l'hypothèse d'un rôle différentiel des kinases dans la MLT. L'expression de l'adénylate cyclase 1 (AC1), permettant la production d'AMPc et l'activation sous-jacente de la PKA, diminue avec l'âge dans le CA1 hippocampique. De plus, cette diminution d'expression est directement corrélée aux déficits de performances en mémoire de référence spatiale de souris âgées testées en piscine de Morris (Mons et al., 2004). En accord avec ces données, une étude a montré que le vieillissement s'accompagne d'une diminution de la forme phosphorylée de CREB dans le CA1 lorsque les animaux sont testés dans le même test de MLT. Cette dérégulation chez les souris âgées touche également les facteurs de transcription situés en aval de CREB (tel que c-Fos), lesquels permettent les phénomènes de plasticité et de consolidation de la mémoire (Porte et al., 2008a). Ce constat a également été effectué dans un test de mémoire relationnelle/déclarative en labyrinthe radiaire (Touzani et al., 2003).

L'origine du déséquilibre de la balance kinase/phosphatase lié à l'âge pourrait résulter d'une modification des systèmes de neurotransmission, dont les récepteurs sont essentiels dans les cascades moléculaires intracellulaires (Ramos et al., 2003 ; Dash et al., 2007). Notre étude nous a conduits à nous intéresser à cette question afin de comprendre les mécanismes intracellulaires à l'origine des altérations de MDT lors du vieillissement et aux effets de certains composés psychopharmacologiques.

2. Hypothèse cholinergique

Le système cholinergique : généralités

L'acétylcholine (***ACh***) est un neurotransmetteur largement présent dans le système nerveux central. Il intervient dans de nombreuses fonctions cérébrales telles que le développement et l'activité corticale, le contrôle du flux sanguin cérébral, les cycles de veille-sommeil, ainsi que les processus cognitifs et mnésiques (Schliebs et Arendt, 2006). 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., 1983 ; Nagai et al., 1983). L'ACh provient de trois principaux groupes de noyaux situés au niveau basal du télencéphale (également appelé « complexe du cerveau basal antérieur »), de la région pontomésencéphalique, ainsi que quelques interneurones striataux. La majorité des

projections cholinergiques corticales et hippocampiques provient du complexe du cerveau basal antérieur, ensemble composé du septum médian, des noyaux verticaux et horizontaux de la bande diagonale de Broca, ainsi que du noyau basal magnocellulaire (cf. *fig.17*).

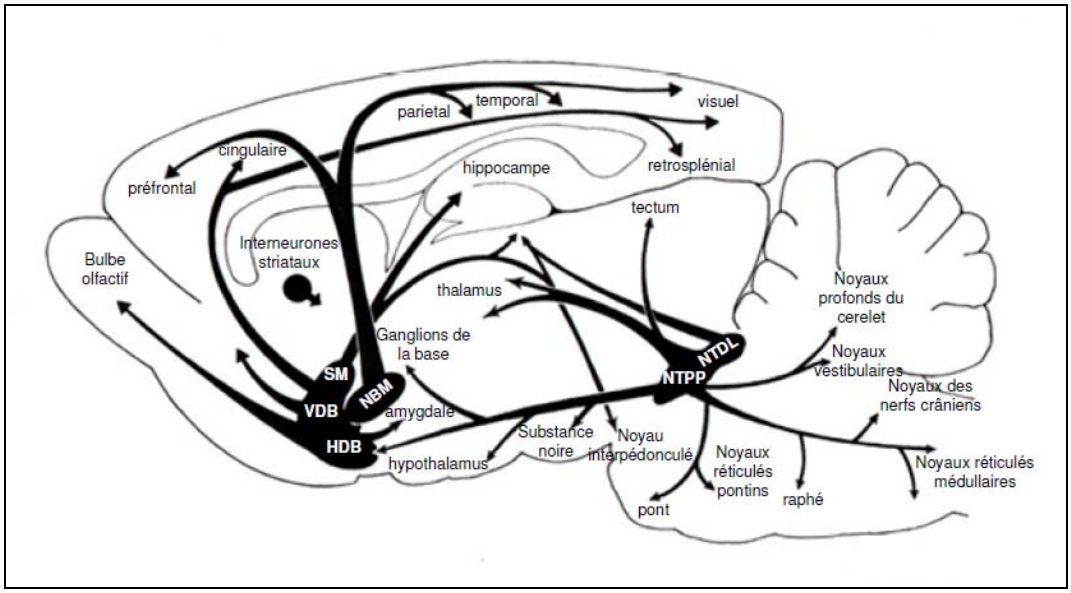


Figure 17 : Représentation schématique des principales voies cholinergiques chez les rongeurs (d'après Mesulam et al., 1983). SM : septum médian ; VDB : noyau vertical de la bande diagonale de Broca ; HDB : noyau horizontal de la bande diagonale de Broca ; NBM : noyau basal magnocellulaire ; NTPP : noyau tegmental pédonculo-pontin ; NTDL : noyau tegmental dorsolatéral.

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

Les récepteurs nicotiniques (nAChR) font partie de la famille des récepteurs ionotropiques constitués de cinq sous-unités identiques (homopentamères) ou différentes (hétéropentamères). Ces sous-unités sont de deux types : les sous-unités α (au nombre de neuf : α2 à α10), et les sous-unités β (au nombre de trois : β2 à β4). Il en résulte de multiples récepteurs possédant des propriétés pharmacologiques et des localisations différentes dans le cerveau, les plus fréquemment rencontrés dans l'hippocampe et le cortex préfrontal 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 Ca^{2+} (pour revue voir Gotti et al., 2006) (cf. *fig. 18*).

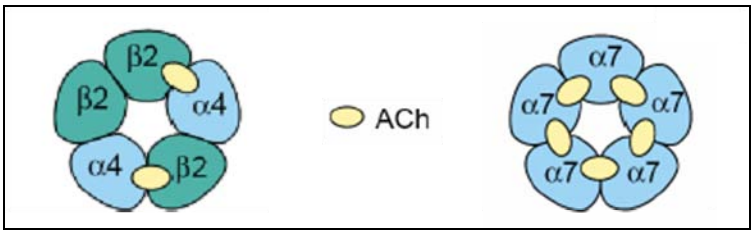


Figure 18 : Illustration des récepteurs nicotiniques α4β2 et α7, majoritairement situés dans l'hippocampe et le cortex (Gotti et al., 2006).

- ***Les récepteurs muscariniques*** 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 G_q/G_{11}, activatrices de la phospholipase C qui induit une mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire. La deuxième famille est constituée des récepteurs ***M2*** et ***M4*** qui ont une activité inhibitrice. Ils sont couplés aux protéines G_i/G_o, qui inhibent l'adenylate cyclase, entrainant une diminution de la concentration cytoplasmique d'AMPc (pour revue voir Eglen et al., 2001) (cf. *fig. 19*).

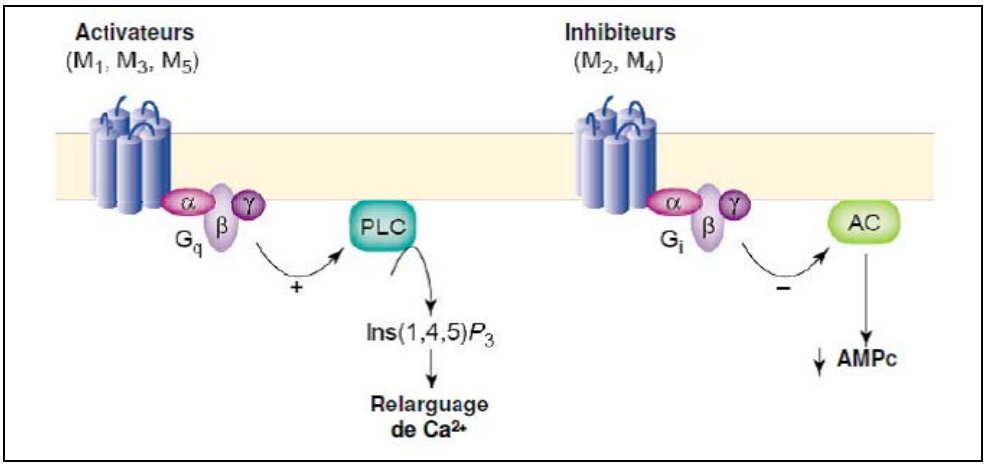


Figure 19 : Illustration des deux sous familles de récepteurs muscariniques, respectivement excitatrices et inhibitrices (Gotti et al., 2006).

Origine de l'hypothèse cholinergique

Les neurones cholinergiques provenant du complexe du cerveau basal antérieur subissent une neurodégénérescence lors du vieillissement « normal » et lors de la MA, avec pour conséquence l'atteinte progressive des capacités mnésiques (Bartus et al., 1982 ; Francis, 2005 ; Schliebs et Arendt, 2006). Cette dégénérescence s'accompagne d'une profonde altération de nombreux marqueurs cholinergiques tels que l'enzyme de synthèse de l'ACh, ou

sa recapture présynaptique permettant son recyclage. Ces altérations provoquent une diminution drastique de la quantité d'ACh disponible au niveau synaptique lors du vieillissement, et sont directement corrélées avec le déclin mnésique observé chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Francis et al., 1985 ; Francis, 2005). De telles observations ont également été rapportées chez les animaux et particulièrement chez le rat âgé (Sherman et al., 1981 ; Wu et al., 1988). La mort neuronale cholinergique serait liée à la diminution des facteurs neurotrophiques dans les noyaux cholinergiques (Sofroniew et al., 2001), ou à l'augmentation de l'activité métabolique de ces neurones accélérant la dégénérescence observée (Baskerville et al., 2008). Cependant, alors que la dégénérescence cholinergique est bien établie lors de la MA, son importance lors du vieillissement « normal » reste discutée, même si l'altération de la fonction cholinergique est confirmée (Schliebs et Arendt, 2010).

L'étude des récepteurs cholinergiques de type nicotinique (nAChR) durant le développement de la MA révèle une fixation nicotinique réduite de 60% par rapport à des sujets jeunes, alors que la fixation muscarinique semble moins touchée (environ 20% de réduction) (Francis, 2005). Cependant, le récepteur muscarinique M1 serait en partie découplé de ses protéines G lors de la MA, diminuant ainsi grandement l'activation des cascades moléculaires sous jacentes (Flynn et al., 1991). Il a récemment été montrée que ces altérations étaient corrélées à l'atteinte cognitive lors de la MA (Tsang et al., 2006).

A l'inverse, de nombreuses études montrent une diminution conséquente de la quantité de nAChR dans les zones atteintes par la pathologie Alzheimer, et plus particulièrement pour les récepteurs α4β2 et α7 (Picciotto et Zoli, 2002 ; Gotti et al., 2006). De plus, il a été démontré une sensibilité plus importante des nAChR α7 au peptide amyloïde, l'un des facteurs pathogènes de la MA (Buckingham et al., 2009). Lors du vieillissement « normal », la diminution des nAChR semble moins prononcée et bien plus variable selon les régions étudiées. Ainsi, des études indiquent une diminution d'expression de la sous-unité α7 au niveau du cortex préfrontal (Utsugisawa et al., 1999b) et de la sous-unité β2 au niveau du cortex et de l'hippocampe (Tohgi et al., 1998 ; Utsugisawa et al., 1999a ; voir aussi Picciotto et Zoli, 2002). L'ensemble de ces résultats a globalement été confirmé chez les rongeurs (Birtsch et al., 1997 ; Rogers et al., 1998 ; Ferrari et al., 1999).

Ces données ont conduit à l'hypothèse cholinergique du vieillissement mnésique et de la MA (Bartus et al., 1982 ; voir Bartus, 2000 pour actualisation). Depuis 30 ans, c'est cette

hypothèse qui a principalement orienté la recherche dans le but de trouver des traitements permettant de compenser ces déficits cholinergiques afin de restaurer les performances mnésiques des sujets vieillissant.

Approche pharmacologique

Confortant l'hypothèse cholinergique, l'injection d'un antagoniste des récepteurs muscariniques (la scopolamine) chez des sujets jeunes induit des déficits cognitifs mimant 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). De même, la perturbation du système cholinergique par injection d'un antagoniste nicotinique (la mécamylamine) provoque une altération dose-dépendante des performances dans de nombreux tests cognitifs (Newhouse et al., 1992, 1994 ; pour revue, voir Rusted et al., 2000). Cette altération était très prononcée chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, plus modérée chez les sujets âgés, et faible chez de jeunes adultes. A l'inverse, l'injection de nicotine chez des sujets âgés ou atteints de la MA améliore leurs performances dans de nombreux tests cognitifs (Levin et Rezvani, 2002; Levin et al., 2006). Outre la validation des effets promnésiants et pro-cognitifs, les études chez l'animal ont montré que les agonistes nicotiniques possédaient un effet neuroprotecteur et permettaient de restaurer partiellement les fonctions cholinergiques (voir Picciotto et Zoli, 2002).

Les premiers traitements de la MA ont donc eu pour objectif de restaurer l'activité du système cholinergique, en inhibant spécifiquement l'acétylcholinestérase qui est l'enzyme de dégradation de l'ACh. Malgré les espoirs fondés sur ces molécules, leur potentiel promnésiant, bien que présent, s'est avéré relativement modéré, variable selon les individus, et dégressif avec l'évolution de la maladie (Francis et al., 2010). Cependant, malgré cet effet limité et de nombreux effets secondaires, les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase sont restés pendant longtemps le seul traitement de la MA et continuent d'être utilisés actuellement.

L'une des conséquences de ces constatations fut également de remettre en cause le rôle central de l'ACh dans la mémoire. Ainsi, des études lésionnelles chez l'animal ont montré que la lésion quasi-totale des noyaux cholinergiques du complexe basal antérieur (Wenk et Engisch, 1986), ou la lésion spécifique des neurones cholinergiques (Baxter et al., 1996; Baxter et Gallagher, 1996) ne modifiait pas les performances mnésiques chez le rat. L'ensemble de ces résultats conduit à considérer l'ACh davantage comme un modulateur des processus cognitifs notamment par la régulation de l'éveil cognitif et de l'attention (Francis et

al., 1999). Il a été suggéré 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 ; von Linstow Roloff et al., 2007). En outre, certaines études montrent que les substances cholinergiques agissent également sur d'autres systèmes de neurotransmission. Ainsi, le donepezil (inhibiteur de l'acétylcholinestérase) augmenterait également la libération de glutamate au niveau synaptique (Francis, 2003), mécanisme compatible avec l'hypothèse d'un rôle régulateur de l'ACh.

Ce rôle régulateur de l'ACh a permis de relancer un intérêt pour la pharmacologie cholinergique. Ainsi, plusieurs composés muscariniques ont démontré des effets promnésiants chez l'animal, certains ayant même atteint le stade d'étude clinique (pour revue voir Lockhart et Lestage, 2003 ; Francis et al., 2010). Cependant, ces composés ont montré une efficacité clinique variable, et provoquent des effets secondaires du fait de la présence des récepteurs muscariniques au niveau du système nerveux périphérique. Parallèlement, compte tenu des données montrant une diminution des récepteurs nicotiniques α4β2 et α7 lors du vieillissement et de la MA, de nouvelles molécules ont été développées visant spécifiquement ces deux récepteurs nicotiniques afin de potentialiser le rôle régulateur du système cholinergique (Taly et al., 2009 ; Bencherif et Lippiello, 2010).

3. Hypothèse glutamatergique

Le système glutamatergique : généralités

Le glutamate (***Glu***) est le neurotransmetteur excitateur majoritaire dans le système nerveux central. Il est présent dans l'ensemble du cerveau, avec de fortes concentrations dans le cerveau antérieur, où la majorité des projections corticales sont glutamatergiques (Fagg et Foster, 1983 ; Cotman et Monaghan, 1986) (cf. *fig. 20*).

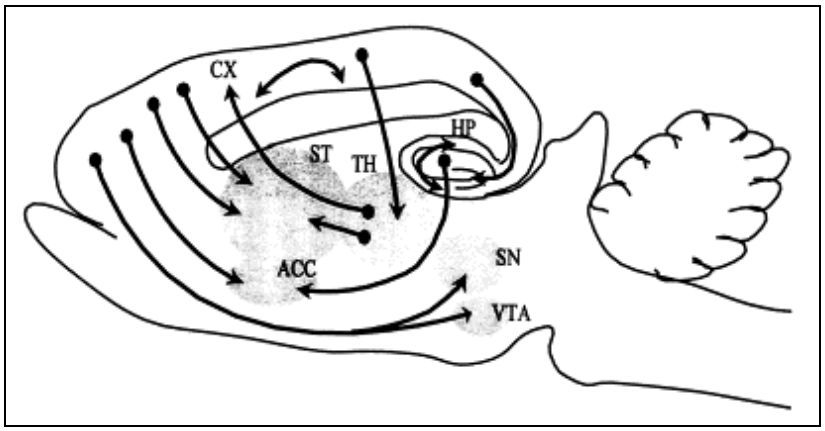


Figure 20 : Schéma des principales projections glutamatergiques dans le cerveau des rongeurs (d'après Cotman et Monaghan, 1986). ACC: nucleus accumbens; CX: cerebral cortex; HP: hippocampus; SN: substantia nigra; ST: striatum; TH: thalamus; VTA: aire tegmentale ventrale.

Après son relargage par le neurone, le Glu est capté par les cellules gliales où il est converti en glutamine. La glutamine diffuse à travers l'espace extracellulaire jusqu'au neurone où elle sera utilisée pour la synthèse du Glu (Fonnum, 1993). Au niveau de la fente synaptique, les astrocytes semblent jouer un rôle essentiel afin d'éviter la diffusion du neurotransmetteur (Araque et al., 1999). Ce mécanisme permet de maintenir un niveau synaptique basal très bas, et la diminution rapide de sa concentration lors du relargage, ceci afin d'éviter les phénomènes d'excitotoxité propre au Glu. En effet, en se fixant à ses récepteurs postsynaptiques, ce neurotransmetteur va provoquer un flux calcique qui, s'il est prolongé, entraînera de nombreux processus de dégénérescences cellulaires parmi lesquels la nécrose et l'apoptose (Obrenovitch et Urenjak, 1997).

Les récepteurs glutamatergiques sont divisés en deux grandes familles réparties de façon ubiquitaire dans le cerveau, avec cependant des concentrations plus importantes dans le cerveau antérieur et l'hippocampe (pour revue voir Ozawa et al., 1998).

- ***Les récepteurs ionotropiques*** répartis en deux sous-groupes : d'un côté le récepteur NMDA (R-NMDA pour récepteur N-méthyl-D-aspartate) qui possède une haute conductance calcique ; de l'autre les récepteurs AMPA (R-AMPA pour récepteur α-amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate) et kainate qui sont des canaux sodiques. Les R-NMDA sont des canaux voltage-dépendants impliqués dans la dépolarisation de la membrane. Les récepteurs AMPA/kainates sont impliqués dans la transmission de l'excitation rapide nécessaire à l'activation des R-NMDA.

- ***Les récepteurs métabotropiques*** sont des récepteurs couplés aux protéines G. Huit sous-types ont été décrits, qui permettent des modulations excitatrice ou inhibitrice par le Glu.

En tant que neurotransmetteur excitateur majeur, le Glu possède un rôle central dans le cerveau. Il est au cœur de l'excitabilité neuronale par la genèse du potentiel d'action permettant la transmission de l'information entre les neurones. De plus le Glu a clairement été défini comme le neurotransmetteur permettant les phénomènes de plasticité synaptique, parmi lesquels la potentialisation à long terme (PLT) et la dépolarisation à long terme (DLT). Le rôle central du R-NMDA dans ces mécanismes de plasticité fait de ce récepteur un détecteur de coïncidence à la base des processus mnésiques.

Origine de l'hypothèse glutamatergique

L'hypothèse glutamatergique découle de son rôle central dans la mémoire. En effet, le Glu étant impliqué dans la majorité des processus mnésiques, il a été proposé qu'une altération de la neurotransmission glutamatergique serait responsable des déficits observés lors du vieillissement ou de la MA, notamment par les phénomènes d'excitotoxicité qui pourraient provoquer la dégénérescence neuronale (Obrenovitch et Urenjak, 1997).
Cependant, les altérations du système glutamatergique lors du vieillissement « normal » restent modérées. Les différentes études chez les rongeurs rapportent cependant une diminution de la quantité de Glu particulièrement dans le CPFm et l'HPC, pouvant refléter la dégénérescence neuronale de ces régions, et qui serait responsable de la diminution de l'excitabilité neuronale. Une diminution modérée de la recapture du glutamate a également été observée, et pourrait résulter du développement de la glie (dont les astrocytes) lors de la neurodégénérescence. Au niveau des récepteurs, on note une diminution importante des R-NMDA (jusqu'à 50%) et plus modérée pour les R-AMPA. Une étude a établi une corrélation entre la diminution des récepteurs NMDA et le déficit observé chez la souris âgée dans un test de mémoire spatiale. Finalement, l'âge provoquerait une plus forte vulnérabilité aux effets neurotoxiques du Glu. (Pour revue complète voir Segovia et al., 2001).

Lors de la MA, on retrouve globalement ces atteintes mais de manière bien plus marquée. La majeure partie des neurones en dégénérescence au niveau de l'HPC et du CPF est constituée de neurones pyramidaux impliquant l'activité glutamatergique (Najlerahim et al., 1990), ce qui pourrait être à l'origine de la forte diminution des R-NMDA (Greenamyre et

al., 1985 ; Procter et al., 1989) et R-AMPA (Amstrong, 1994 ; Wakabayashi et al., 1999) dans ces mêmes régions. Les mécanismes de recapture du Glu semblent également altérés provoquant l'augmentation de sa concentration au niveau synaptique, et la création d'une activation résiduelle au niveau des récepteurs postsynaptiques (Francis, 2003).

Approche pharmacologique

Contrairement à l'ACh, le traitement par augmentation de la quantité de Glu disponible ne peut être envisagé en raison des effets neurotoxiques intrinsèques à ce neurotransmetteur. Les différentes approches pharmacologiques sont donc axées sur le développement de molécules agissant au niveau des récepteurs.

Le terme AMPAKines désigne les molécules ayant une action en tant que modulateur positif de l'activité des R-AMPA. Par leur interaction avec un site allostérique du R-AMPA, ces molécules agissent en stabilisant ce récepteur dans un état ouvert suite à la fixation du glutamate (Black, 2005). Ceci prolonge le courant induit à travers le récepteur canal augmentant ainsi la transmission synaptique (Granger et al., 1993), tout en évitant les effets excitotoxiques d'une activation directe et prolongée du récepteur NMDA impliqué dans la neurodégénérescence observée lors du vieillissement (Francis et al., 1993 ; Yamada, 2000). Certaines de ces AMPAKines ont atteint la phase 2 d'étude clinique, mais compte tenu des résultats modestes, voire contradictoires, les études ont du être arrêtées (Swanson, 2009).

La plus surprenante approche développée avec succès est l'utilisation d'un antagoniste des R-NMDA, la mémantine. De manière paradoxale, c'est en bloquant le R-NMDA que cette molécule améliore la mémoire. Son mécanisme d'action atypique se base sur un antagonisme voltage-dépendant du canal du récepteur. En niveau basal d'activation cellulaire, la mémantine bloque le récepteur et évite le flux résiduel. Lors de la dépolarisation de la membrane, la mémantine lève son inhibition pour permettre l'activation du récepteur et les phénomènes de PLT consécutifs. La mémantine permet donc d'éviter l'activation anormale du récepteur NMDA, et restaure sa fonction de détecteur de coïncidence altérée lors du vieillissement et de la MA (Parsons et al., 2007). La mémantine est aujourd'hui prescrite dans les formes modérées à sévères de la MA, le plus souvent en complément d'inhibiteur de l'acétylcholinestérase (pour revue complète voir Francis et al., 2010).

4. Les hypothèses alternatives

Les développements de molécules psychopharmacologiquement actives sur les déficits mnésiques liés à l'âge ont débouché sur la commercialisation des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, et de la mémantine, antagoniste des R-NMDA. Les deux hypothèses décrites précédemment ont mobilisé la majorité des études en raison de l'implication de l'ACh et du Glu dans la mémoire. Cependant elles ne sont pas les seules à avoir été émises, et la limite thérapeutique des traitements actuels a conduit à renouveler l'intérêt des hypothèses alternatives.

L'altération du système sérotoninergique au cours du vieillissement a été mise en évidence dès les années 80, avec une diminution des neurones sérotoninergiques ainsi que de la quantité cérébrale de sérotonine (Bowen et al., 1983 ; Curcio et Kemper, 1984 ; Palmer et al., 1987). Plus récemment, des études ont montré une corrélation entre le déclin mnésique chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer et la perte de récepteurs spécifiques de la sérotonine (Lai et al., 2005 ; Kepe et al., 2006). Cependant, les effets bénéfiques des molécules ciblant le système sérotoninergique se font principalement sur les aspects neuropsychiatriques de la MA (Nyth et Gottfries, 1990 ; Taragano et al., 1997). Néanmoins, certaines molécules sont à l'étude chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer en tant que traitement procognitif (Upton et al., 2008 ; Raje et al., 2008). Le potentiel de ces substances réside sûrement dans leur amélioration des transmissions cholinergique et glutamatergique (Dijk et al., 1995a, b ; Schechter et al., 2002).

Compte tenu du rôle des catécholamines, et notamment de la dopamine, dans la mémoire et l'attention, ces neurotransmetteurs ont été étudiés lors de la MA. Cependant, très peu de modifications de ces systèmes ont été rapportées dans la littérature, et le rôle des substances ciblant ces systèmes semble plutôt tourné vers les altérations neuropsychiatriques associées à la MA (Francis et al., 2010).

Le GABA est le neurotransmetteur inhibiteur le plus important du système nerveux central. Le système GABAergique est très peu affecté lors du vieillissement et de la MA. En considérant l'atteinte majeure des systèmes excitateurs, l'hypothèse d'un déséquilibre des mécanismes d'excitation/inhibition avec l'âge a été avancée (Rissman et al., 2007). Compte tenu du rôle de ces mécanismes dans la mémoire (PLT, DLT notamment) et de l'effet

amnésiant largement décrit des benzodiazépines (agoniste du récepteur $GABA_A$) (Singh et al., 1998 ; Beracochea, 2006), l'implication du GABA dans les altérations liées à l'âge semble réaliste. En effet, Bishop et al (2010) ont montré une atteinte GABAergique dans le CPF, qui pourrait rendre compte de la suractivation de cette structure chez les sujets âgés ; de même, l'atteinte GABAergique de la voie septo-hippocampique, source du rythme théta hippocampique impliqué dans la MDT (Vertes, 2005), pourrait expliquer en partie les déficits observés au cours du vieillissement. Néanmoins, traiter les déficits mnésiques par inhibition de ce système semble difficile compte tenu de l'implication du GABA dans l'ensemble des processus cérébraux.

IV. Modèle d'étude pharmacologique

IV.A. Validité des modèles animaux dans l'étude de la mémoire et son approche pharmacologique

L'étude chez l'être humain ne suffit pas pour comprendre l'ensemble des mécanismes cérébraux impliqués dans la mémoire. Le recours à l'utilisation de modèles animaux est indispensable pour compléter les données psychologiques ou d'imageries obtenues chez l'Homme. Ainsi, comme nous l'avons vu, les nombreuses études chez l'animal ont confirmé que l'on pouvait, dans une certaine mesure, transposer les modèles de mémoire développés chez l'Homme à l'animal. De même, le développement de techniques d'imagerie de plus en plus perfectionnées chez l'Homme a permis de confirmer des données observées dans un premier temps chez l'animal. Cependant, chaque modèle animal possède ses caractéristiques et ses limites. Pour être capable de représenter au mieux une pathologie humaine, un modèle animal devra répondre à trois critères de validité (Guelfi et Rouillon, 2007):

- ***Validité phénoménologique*** (« *face validity* »). Elle se réfère à une similarité entre le comportement de l'animal et une caractéristique spécifique de la maladie chez l'Homme. Ce critère est souvent très subjectif puisqu'il s'appuie lui-même sur la théorie développée chez l'Homme. La MDT en est un exemple puisque l'on tente de la modéliser chez l'animal alors que le débat existe toujours sur sa définition exacte chez l'Homme (cf. *Bases théoriques I.C.3*). Il en est de même pour la modélisation du vieillissement cognitif, puisqu'il ne correspond pas à une pathologie à part entière (cf. *Bases théoriques II.A.1*).
- ***Validité théorique*** (« *construct validity* »). Elle correspond à la fidélité avec laquelle un test mesure ce qu'il est censé mesurer. Bien qu'elle soit essentielle au modèle, elle est très rarement établie puisqu'en constante évolution, en parallèle aux critères d'évaluation chez l'Homme. Dans le cadre de la MDT cependant, certaines mesures sont relativement établies chez l'Homme (empans mnésiques, sensibilité aux interférences, recrutement d'aires cérébrales spécifiques), ce qui permet une transposition à l'animal (cf. *Bases théoriques II*). L'atteinte mnésique observée lors du vieillissement est plus difficilement conceptualisable même si de plus en plus d'études chez l'Homme permettent de vérifier la validité des modèles animaux (cf. *Bases théoriques II.A.2*).

- ***Validité prédictive*** (« *predictive validity* »). Elle correspond à la capacité d'un test à prédire un critère d'intérêt, un phénomène humain, ceci à partir des performances du modèle. Un modèle d'étude de la MDT devra être capable de reproduire les effets du vieillissement, ou de composés promnésiants par exemple. D'ailleurs, dans un sens trop restreint, la validité prédictive a trait à la prédiction thérapeutique. En se basant sur les données cliniques, le modèle devra discerner les faux positifs et les faux négatifs, et être capable de révéler une correspondance entre l'effet observé et celui obtenu en clinique (cf. *Bases théoriques III.B*).

Comme nous pouvons le voir à travers ces définitions, il n'existe pas de modèle animal parfait, puisque ce modèle ne serait possible que si l'on connaissait l'intégralité des mécanismes sous-tendant la pathologie modélisée. Le modèle n'aurait donc plus d'intérêt d'être. Ainsi, il faut garder à l'esprit que comme les différents modèles de mémoire présentés au début de ce manuscrit, les modèles animaux sont heuristiques et restent un outil à adapter afin de répondre à une question précise.

Lors de nos travaux, notre modèle animal aura pour but de répondre à la question : « Quels sont les mécanismes impliqués dans les déficits de MDT observés lors du vieillissement et comment les atténuer, voire les supprimer, par voie pharmacologique ». Pour répondre à cette question, notre modèle devra intégrer au maximum les différentes validités décrites précédemment, ce qui fut l'objet du chapitre 1 de nos travaux.

IV.B. Modèle de mémoire de travail : l'alternance spontanée

La plupart des études chez l'animal impliquent des variables difficilement contrôlables, telles que la perte de poids consécutive à une privation alimentaire et la motivation alimentaire suite à cette privation, qui peuvent interférer avec la variable mesurée, à savoir la mémoire. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser le modèle de l'alternance spontanée (AS) qui permet d'étudier la mémoire de travail sans faire appel à un renforcement alimentaire, et de ce fait, permet de se rapprocher le plus possible des conditions d'étude chez l'Homme, majoritairement réalisée en absence de renforcement lors de la tâche.

Dans un labyrinthe en « T », composé d'une allée centrale et de deux compartiments (bras) d'arrivée opposés, le comportement d'AS se traduit par l'alternance du choix du bras

d'arrivée au cours d'une séquence d'essais successifs (Montgomery, 1952 ; Dember et Fowler, 1958). L'alternance spontanée repose sur un système motivationnel intrinsèque d'investigation ou de curiosité (Berlyne, 1966 ; Fowler et Wischner, 1965) et ne serait qu'un aspect particulier du phénomène d'habituation. La motivation intrinsèque d'investigation est cependant un moteur très fort pour le maintien du comportement d'alternance au cours d'une série d'essais puisqu'on observe peu d'écart entre les taux d'alternance spontanée et les taux d'alternance renforcée par une pastille alimentaire par exemple, lorsque la série implique des délais entre essais assez courts. En outre, ce comportement est beaucoup plus présent chez la souris que chez le rat, qui cesse d'alterner très rapidement en l'absence d'agent renforçant, ce qui n'est pas le cas chez la souris (Lalonde, 2002). Selon Douglas (1975), l'AS mettrait en jeu l'inhibition comportementale qui serait plus l'inhibition d'un choix (aller dans tel bras) que de la réponse précédente (tourner à droite ou à gauche) ; en effet, Montgomery (1952) et Glanzer (1953) utilisant un labyrinthe en croix (permettant de disposer de deux compartiments de départ diamétralement opposés) ont montré qu'un rat préfère conserver la même réponse motrice (par exemple tourner à droite) pour aller dans le bras opposé à celui déjà visité, que l'inverse. Cette expérience montre que le rat préfère choisir le bras d'arrivée sur la base des indices allocentriques spatiaux, que sur la base de la réponse motrice. Outre l'inhibition du choix précédemment effectué, l'attrait pour la nouveauté apparaît comme un facteur déterminant puisqu'en ajoutant des stimuli à la branche non visitée, la tendance à alterner augmente (Egger, 1973).

Toute théorie de l'alternance postule l'existence lors du deuxième essai d'une trace mnésique correspondant aux informations reçues lors du premier essai (Douglas, 1975). Cette hypothèse suppose que l'animal utilise peu ou pas les stimuli olfactifs laissés par son passage lors de l'essai précédent. Cette possibilité existe, mais les travaux réalisés dans ce domaine montrent que l'utilisation du « marquage » olfactif ne contribue que pour une part très faible à l'alternance et uniquement pour des délais très courts (Douglas, 1966). De plus, diverses observations vont à l'encontre d'une telle possibilité :

1) Le maintien du comportement d'alternance lors d'essais répétés pour lesquels on peut supposer que ce marquage, ou tout au moins son caractère différentiel, s'atténue progressivement ; cet argument a été utilisé par Squire (1969) dans une étude visant à déterminer l'effet des drogues cholinergiques sur la mémoire. « Si les souris se réfèrent aux traces olfactives pour alterner, alors le déclin du pourcentage d'alternance en fonction du temps ne serait pas la conséquence de l'oubli, mais résulterait de l'effacement progressif des

indices olfactifs présents dans le labyrinthe ». Dans son expérience, Squire démontra que l'absence d'indices olfactifs n'altérait pas le taux d'alternance et que, dans la mesure où les drogues cholinergiques avaient un effet, « ces résultats indiquaient que les drogues cholinergiques pourvues d'un effet central amélioraient ou perturbaient la mémorisation ».

2) L'existence du comportement d'AS pour des intervalles entre essais de plusieurs heures durant lesquelles des dizaines d'animaux sont successivement placés dans l'appareil qui, de plus, est nettoyé entre chaque passage (Beracochea, 1984).

3) La discrimination olfactive a été directement contrôlée dans la mesure où le fait de changer de labyrinthe entre l'essai d'acquisition et celui de rétention n'affecte pas les performances, y compris pour des intervalles entre essais très courts (Beracochea, 1984).

La mémoire de travail est évaluée par un protocole d'alternances séquentielles, qui consiste à soumettre la souris à plusieurs essais successifs. Pour alterner à l'essai N, l'animal doit se rappeler du bras visité à l'essai immédiatement précédent (N-1) et de ce fait, occulter les essais antérieurs (N-2, N-3, etc…). La capacité à alterner implique un jugement de récence, et au fur et à mesure du déroulement de la séquence, l'existence d'un mécanisme d'effacement des informations non pertinentes (« *resetting mechanisms* ») au profit de l'information cible, ce qui est un processus central de la mémoire de travail (Thomas et Spafford, 1984 ; Brito et Thomas, 1981). Cette information cible varie d'un essai à l'autre. Dans l'alternance séquentielle, la performance est affectée par la place de l'essai dans la série ainsi que par la durée de l'intervalle entre les essais, deux facteurs qui contribuent à accroître les interférences entre les informations. Les performances d'alternance reflètent donc la mémoire de travail des animaux (Beracochea et Jaffard, 1985, 1987 ; Lalonde, 2002 ; Chauveau et al., 2005).

L'alternance spontanée est un test de mémoire de travail ayant une composante spatiale. Plusieurs expériences ont montré que les indices spatiaux sont essentiels à l'obtention de performances d'alternance élevées comme le montre l'effet d'une ablation de la rétine chez des souris (Dember et Fowler, 1958), ou la modification de l'emplacement des indices visuels chez le rat (Sanchez-Santed et al., 1997).

Les bases neurobiologiques du comportement d'alternance ont été étudiées chez l'animal, notamment par de nombreuses études lésionnelles. Nous nous attacherons ici à

mentionner certaines études ayant montré l'implication de l'HPC et du CPF dans ce test, compte tenu de l'implication de ces deux structures dans la MDT.

L'***hippocampe*** est une structure connue pour son implication dans la mémoire de travail spatiale (Aggleton et al., 1986). Dans l'alternance spontanée, des lésions de l'hippocampe dorsal provoquent une altération des performances (Dalland, 1976 ; Stevens et Cowey, 1973), de même que des lésions du septum médian, principale source cholinergique de l'HPC (Clody et Carlton, 1969). Ces données sont en accord avec le rôle de l'hippocampe et de la voie cholinergique septo-hippocampique dans la mémoire de travail spatiale, notamment par son importance dans le repérage spatial et la mise en relation d'informations impliquant les interactions hippocampo-préfrontales.

Le ***cortex préfrontal***, essentiel à l'ensemble des tâches de MDT, est également impliqué dans l'alternance séquentielle comme le montre le déficit observé lors de lésions du CPFm, et notamment du cortex prélimbique, chez le rat (Delatour et Gisquet-Verrier, 1996 ; Divac, 1975 ; Sanchez-Santed et al., 1997). La lésion du noyau basal magnocellulaire, principale voie de projection cholinergique sur le CPF, provoque également une altération des performances d'AS, réversible par l'injection d'un inhibiteur de l'acétylcholinestérase (Murray et Fibiger, 1986). De plus, une augmentation de l'acétylcholine dans le CPF de rat a été mise en évidence lors de l'alternance spontanée (Giovannini et al., 1998), et de façon plus générale dans la mémoire de travail (Hironaka et al., 2001). L'importance du CPF dans la mémoire de travail spatiale chez l'animal est largement décrite (Aggleton et al., 1986 ; Granon et Poucet, 1995 ; Granon et al., 1995, 1996), et les déficits observés lors de sa lésion pourraient être provoqués par une désinhibition produisant une augmentation des erreurs de persévérance, phénomène rapporté dans de nombreux tests chez le rat (Kolb, 1984 ; Granon et al., 1994).

De plus, de fortes intéractions ont été décrites entre le CPF et l'HPC. Lors de tâches de MDT spatiale, le CPF apparaît comme essentiel lorsque deux essais sont séparés par des délais courts (de l'ordre de la seconde à la minute), alors que l'hippocampe deviendrait progressivement recruté avec l'augmentation de l'intervalle entre essais (délai supérieur à la minute) (pour revue voir Kesner, 2005).

Comme nous l'avons vu précédemment (cf. *Bases théoriques III.A*), le cortex préfrontal et l'hippocampe sont fortement impliqués dans les processus liés au déclin mnésique observé lors du vieillissement. Ces structures étant également nécessaires à la

réalisation de la tâche d'alternance spontanée, nous nous sommes attachés à étudier l'impact du vieillissement dans cette tâche (cf. *Chapitre 1*), ainsi que les modifications des profils d'activation de ces structures avec l'âge (cf. *Chapitre 2*).

V. Objectifs de l'étude

La revue théorique que nous venons d'effectuer met l'accent sur l'importance, lors de la réalisation de tâches requérant la mémoire de travail, du cortex préfrontal et de l'hippocampe, ainsi que des mécanismes neurobiologiques (systèmes de neurotransmission et cascades intracellulaires notamment) ayant lieu au sein de ces structures. De plus, les études effectuées chez l'Homme comme chez l'animal, démontrent une altération précoce de la mémoire de travail observée lors du vieillissement, qui se caractérise par des atteintes structurelles ainsi que des dysfonctionnements mécanistiques au niveau de ces deux structures clés.

Dans le cadre de la thèse CIFRE en collaboration entre l'Institut des Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine (***INCIA***) et l'Institut de Recherches Servier (***IdRS***), nous avons cherché à comprendre les mécanismes fondamentaux impliqués dans l'altération de mémoire de travail liée au vieillissement, ainsi que le mode d'action de composés pharmacologiques capables de pallier ce déficit.

Afin de pouvoir réaliser cette étude, nous nous sommes tout d'abord attachés à ***développer et valider un modèle comportemental capable de révéler un déficit de mémoire de travail chez la souris âgée***.

Comme nous l'avons vu précédemment, le test de l'alternance spontanée, largement décrit au sein de l'équipe (Beracochea et Jaffard, 1983, 1985, 1991 ; Jaffard et al., 1991 ; Beracochea et al., 2001 ; Pierard et al., 2006, 2007), permet l'étude de la mémoire de travail spatiale (cf. *Bases théoriques IV.B*). Le *chapitre 1* de ce manuscrit présente les résultats de l'extension du modèle d'alternance spontanée à l'étude du vieillissement, ainsi que ceux de l'***étude pharmacologique visant à établir la validité prédictive du modèle et à étudier certaines molécules issues de la recherche Servier***. Les données obtenues ont permis la validation de notre modèle en confirmant l'altération de la mémoire de travail lors du vieillissement, et démontre la capacité de substances pharmacologiques à pallier ce déficit.

Une partie de ces travaux a également fait l'objet d'une première publication :

- **Vandesquille M.**, Krazem A., Louis C., Lestage P., Beracochea D. (2011) “S18986 reverses spatial working memory impairments in aged mice: comparison with memantine”. Psychopharmacology. *Sous presse*.

Dans un second temps notre objectif a été l’***étude des mécanismes structurels et neurobiologiques impliqués dans le déficit de mémoire de travail observé chez les souris âgées.***

Tout d’abord, afin de ***définir les structures cérébrales impliquées dans ce déficit***, nous avons réalisé une ***étude immunohistochimique de la protéine CREB.*** Cette protéine, décrite comme marqueur de l’activité cérébrale (Mayr et Montminy, 2001 ; Porte et al., 2008b ; cf. *chapitre 2*), est également activée par de nombreuses cascades moléculaires impliquées dans les processus mnésiques, notamment lors du vieillissement (cf. *Bases théoriques II.D et III.B.1*).

L’étude pharmacologique réalisée lors du *chapitre 1* a permis de mettre en évidence le potentiel promnésiant puissant des composés ciblant le système cholinergique, parmi lesquels le donepezil (inhibiteur de l’acétylcholinestérase, Seltzer, 2007) et le S 38232 (agoniste des récepteurs cholinergiques de type α4β2, Lagostena et al., 2010). Toujours par une approche immunohistochimique, nous nous sommes donc intéressés aux ***mécanismes neurobiologiques sous tendant le potentiel promnésiant*** de ces composés cholinergiques lors du vieillissement.

Afin de conforter nos observations immunohistochimiques, nous avons finalement procédé à l’***injection au sein du cortex préfrontal*** de molécules permettant de ***modifier le niveau d’activation*** de cette structure.

L’ensemble de ces travaux sont présentés dans le *chapitre 2*, et font l’objet d’une publication en préparation :

- **Vandesquille M.**, Louis C., Lestage P., Baudonnat M., Beracochea D. (2011) “Age-induced prefrontal over-activation and working memory impairments in mice are suppressed by the selective α4β2 nAChRs agonist S 38232”. Neuropsychopharmacology. *En préparation*.

Les résultats du second chapitre ont montré que, chez les souris âgées, le S 38232 particulièrement permettait de pallier le déficit de mémoire de travail par un mécanisme ciblant le cortex préfrontal. Dans le but de mieux comprendre l’***implication des récepteurs nicotiniques α4β2 dans les processus de mémoire de travail et/ou du vieillissement***, nous avons utilisé des ***souris invalidées pour la sous-unité nicotinique β2***.

Nous avons tout d'abord réalisé une ***évaluation comportementale*** complète de ces souris génétiquement modifiées afin de comprendre les conséquences comportementales de la suppression totale de la sous-unité β2, et de les comparer avec les altérations observées lors du vieillissement.

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action du S 38232 chez les souris âgées, nous avons réalisé, chez les souris KO β2, une ***étude pharmacologique*** à l'aide d'agonistes/antagonistes nicotiniques spécifiques, afin d'étudier l'impact de l'invalidation du gène de la sous-unité β2 lors de traitements cholinergiques.

Finalement, nous avons souhaité étudier lors du vieillissement ou de modifications génétiques le ***profil d'expression des principales sous-unités nicotiniques*** impliquées dans les processus cognitifs (cf. *Bases théoriques II.B.2*). Pour cela, nous avons utilisé des ***méthodes biomoléculaires*** (Western-Blot et de PCR quantitative) afin d'évaluer, au sein de l'hippocampe et du cortex préfrontal, le niveau d'expression des sous-unités α7 ou β2 en fonction de l'âge ou de la sous-unité invalidée.

L'ensemble des résultats constitue le *chapitre 3* de ce manuscrit, et la rédaction d'un article est en prévision :

- **Vandesquille M.,** Louis C., Lestage P., Guillou J.L., Beracochea D. "Modifications of pharmacological sensitivity to nicotinic compounds, and impact on working memory, following invalidation of the nicotinic β2 subunit in mice". *En preparation*.

Matériels et méthodes

Matériels et Méthodes

I. Animaux et procédure comportementale 78

I.A. Animaux 78

La lignée 78
Conditions d'élevage 78

I.B. Modèle comportemental : l'Alternance Spontanée 79

Le choix du test comportemental 79
L'appareil 79
Procédure comportementale 79
Paramètres de l'expérience 80
Analyses statistiques 80

I.C. Traitements pharmacologiques 81

II. Implantation chirurgicale et injection intracérébrale 83

II.A. Chirurgie stéréotaxique 83

II.B. Injection intracérébrale 84

II.C. Contrôle histologique 84

III. Etude biomoléculaire 86

III.A. Immunohistochimie 86

Le choix de la protéine CREB 86
Fixation des cerveaux 87
Marquage immunohistochimique 87
Analyses statistiques 89
Choix des structures 89

III.B. Western-blots 90

Les protéines cibles 90
Prélèvement des échantillons 90
Protocole de Western-blots 91

III.C. PCR quantitative 92

Extraction des ARN totaux 92
Dosage et qualité des ARN extraits 92
Reverse Transcription (RT) des ARN messagers (ARNm) 92
Q-PCR 93
Analyse des données de Q-PCR 93

I. Animaux et procédure comportementale

I.A. Animaux

Les soins ainsi que les expérimentations réalisées sur les animaux sont en conformité avec la directive du conseil de la communauté européenne se rapportant à l'utilisation des animaux de laboratoire à des fins expérimentales (directive n° 86/609ECC).

La lignée

Les expériences ont été réalisées avec la lignée consanguine de souris C57Bl/6 (centre d'élevage Charles River, France). Cette lignée est fréquemment utilisée dans les études portant sur l'impact du vieillissement sur les différentes formes de mémoire. De plus ces souris sont couramment utilisées comme fond génétique de lignée génétiquement modifiée. C'est le cas pour les lignées invalidées pour les sous-unités nicotiniques β2 et α7 que nous avons utilisées lors du *chapitre 3*, qui nous ont permis d'étudier plus en détails l'implication du système nicotinique dans les résultats comportementaux et pharmacologiques obtenus avec les souris âgées.

Conditions d'élevage

Les souris sont réceptionnées par lots homogènes de 20 sujets âgés de 6 à 8 semaines ou 12 à 14 mois. A leurs arrivées au laboratoire, les animaux sont placés en stabulation en cage collective de types 4 (surface de 720 cm^2) avec eau et nourriture. La pièce d'animalerie, à température et hygrométrie contrôlées (21 +/- 1°C et 55 +/- 10, respectivement), est sous un cycle nycthéméral 12h-12h (7h-19h).

Les souris sont stabulées en cages collectives jusqu'à leur âge de test, à savoir 4-5 mois, 18-19 mois ou 23-24 mois. Deux semaines avant le début de l'expérimentation, les souris sont transférées dans des cages individuelles de type 1 (surface de 180 cm^2) avec eau et nourriture. Une fois isolés, les animaux sont manipulés quotidiennement cinq jours avant les épreuves comportementales, et habitués à la préhension nécessaire aux traitements pharmacologiques, de façon à réduire les réactions de peur et d'anxiété causées par l'expérimentateur.

I.B. Modèle comportemental : l'Alternance Spontanée

Le choix du test comportemental

Comme nous l'avons vu précédemment, le test d'AS dans le labyrinthe en T permet l'étude de la mémoire de travail spatiale chez les rongeurs (cf. *Bases théoriques IV.B*). Ce modèle, en se basant sur un comportement spontané des rongeurs, permet d'éviter l'effet de la privation alimentaire et du renforcement. De plus, du fait de sa sensibilité à l'effet du délai et des interférences, l'alternance spontanée réalisée avec une procédure séquentielle (plusieurs essais successifs séparés par un délai court) se révèle être un test particulièrement adapté à l'étude de la mémoire de travail.

L'appareil

Le labyrinthe en T est situé dans une pièce à luminosité constante (30 lux), dont les murs portent divers indices visuels (papiers contrastés et hachurés) positionnés un mètre au-dessus du labyrinthe. Conçu en plexiglas opaque, le labyrinthe en T est constitué d'un compartiment de départ, d'une allée centrale et de deux compartiments d'arrivée opposés (cf. *fig.1.A*). Le compartiment de départ (14x10x20) ainsi que ceux d'arrivée (29x10x20) sont séparés de l'allée centrale (46x10x20) par des portes coulissantes qui peuvent être actionnées à distance par un système de vérins. Les déplacements de l'animal sont visualisés grâce à une caméra située au-dessus du labyrinthe.

Procédure comportementale

Habituation : les souris sont tout d'abord soumises à deux sessions d'habituation de 10 minutes chacune (1 session par jour), qui permet à la souris d'explorer librement l'appareil et de se familiariser avec les indices visuels.

Session prétest : les souris sont ensuite soumises à une première session d'alternance séquentielle spontanée ayant pour but d'habituer l'animal à la procédure expérimentale (confinement, ouverture/fermeture des portes, manipulations par l'expérimentateur) afin de s'assurer de la mise en place du comportement d'alternance spontanée et réduire le stress et la néophobie.

Session test : le jour suivant, les animaux réalisent le test comportemental d'AS. L'animal est confiné dans le bras de départ pendant un délai prédéfini (intervalle entre essais

ou IEE). Cet IEE peut varier d'une série à l'autre afin d'étudier la mémoire de travail à différents délais (de 5 à 180 secondes dans notre étude). A la fin de ce délai, la porte du compartiment de départ est abaissée et l'animal peut entrer librement dans un des deux bras de l'appareil. Une fois l'animal complètement entré dans l'un des deux bras d'arrivée, une porte se referme, confinant ainsi l'animal dans le bras choisi pendant trente secondes, délai permettant le repérage spatial de l'animal. Le délai de confinement dans le bras d'arrivée est toujours de 30 secondes et ne varie pas. La souris est ensuite replacée dans le compartiment de départ pour un nouvel essai. A chacun des essais, l'animal a le choix d'entrer librement dans un des deux bras.

Paramètres de l'expérience

Une série test est constituée de sept essais successifs durant lesquels la latence de choix et le choix du bras sont enregistrés, ce qui permet de définir la latence de choix moyenne, ainsi que le nombre d'alternance totale d'où découle le pourcentage d'alternance (nombre d'alternances / nombre d'essais x 100). Le pourcentage d'alternance est utilisé comme index de la mémoire de travail.

De plus, l'AS étant particulièrement sensible à l'effet des interférences proactives, nous avons réalisé un calcul du pourcentage d'alternance par bloc d'essais (bloc 1 = essais 2+3 ; bloc 2 = essais 4+5 ; bloc 3 = essais 6+7) (cf. *fig.1.B*). Cette analyse a pour but de visualiser l'effet des interférences qui se manifeste par une diminution progressive des performances au fur et à mesure des essais. L'essai 1 étant un choix libre non influencé par un essai précédent, il n'est pas inclus dans cette analyse.

Analyses statistiques

Les résultats comportementaux ont été analysés à l'aide du logiciel statistique Statview®. Les comparaisons entre groupes ont été effectuées par une analyse de variances (ANOVA) à un facteur ou plusieurs facteurs, suivie d'un test statistique d'analyse post-hoc adapté afin de comparer les différents groupes entre eux. Les comparaisons des performances moyennes par rapport au hasard (i.e. 50%) ont été réalisées avec un test t non apparié de Student.

La significativité statistique est établie à $p<0.05$, avec pour représentation graphique * : $p<0.05$; ** : $p<0.01$; *** : $p<0.001$.

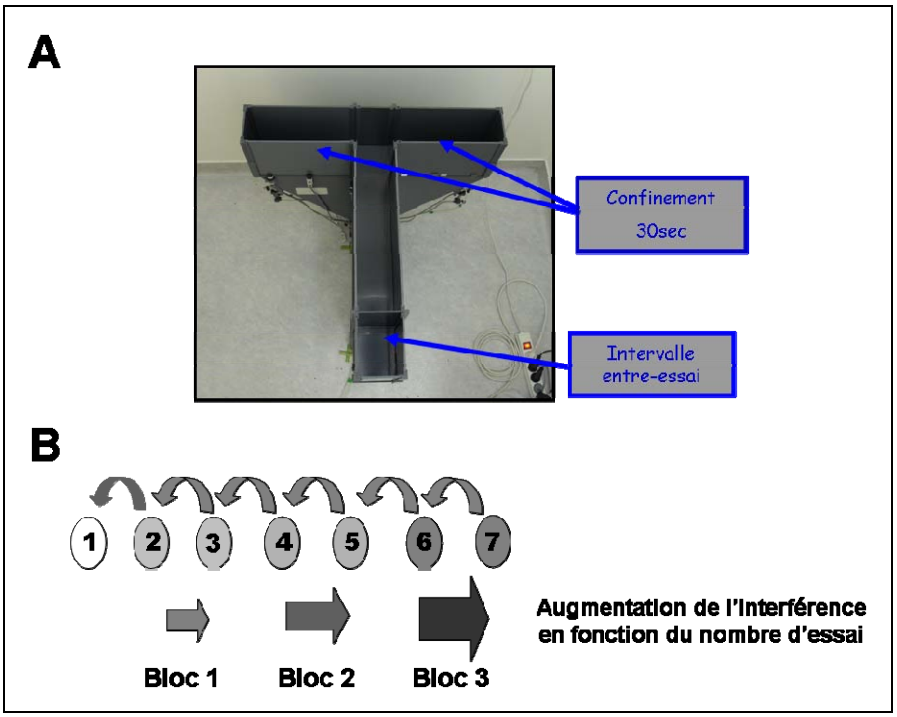


Figure 1 : L'alternance spontanée dans le labyrinthe en T. A : dispositif expérimental. B : Procédure expérimentale.

I.C. Traitements pharmacologiques

Toutes les solutions sont préparées avant chaque expérience (pH=7) à partir d'une solution de sérum physiologique (NaCl 0.9% Baxter®). Les animaux sont injectés par voie intrapéritonéale (ip) 30 minutes avant le test avec un volume de 10 ml/kg. Les injections sont réalisées dans une pièce différente de celle de comportement.

Les substances pharmacologiques utilisées proviennent de classes pharmacologiques ciblant différents systèmes de neurotransmission :

- **Système glutamatergique** :
  - Memantine (Tocris BioScience®), antagoniste des récepteurs NMDA.
  - S 18986 (Servier®), modulateur positif des récepteurs AMPA.

- **Système cholinergique** :
  - Donepezil (Syntheval®), inhibiteur de l'acétylcholinestérase.
  - S 24795 (Servier®), agoniste des récepteurs α7.
  - S 38232 (Sevier®), agoniste des récepteurs α4β2.
  - Methyllycaconitine (MLA, Sigma®) : antagoniste des récepteurs α7.

- **<u>Les références négatives</u>** :
  - Venlafaxine (Tocris BioScience®), inhibiteur de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline.
  - Flumazenil (Tocris BioScience®), antagoniste des récepteurs aux benzodiazépines.

II. Implantation chirurgicale et injection intracérébrale

II.A. Chirurgie stéréotaxique

A la suite d'une période d'isolement de 10 jours, chaque animal est anesthésié par l'injection intrapéritonéale (10 ml/kg) d'un mélange kétamine (100 mg/kg ; Panpharma®) + xylazine (10 mg/kg ; Sigma®). L'animal est ensuite fixé sur un appareil stéréotaxique (La Précision Cinématographique, LPC) par deux barres d'oreille et une barre de mâchoire. Les yeux de l'animal sont protégés de la lumière et de la déshydratation par un gel protecteur oculaire (Ocry-gel®) ainsi que par un morceau de papier placé entre le museau et la barre de maintien vertical de la tête. La peau du crâne est désinfectée par badigeonnage avec une solution antiseptique (Bétadine® Dermique 10%), puis imprégnée d'une solution de xylocaïne 5% (AstraZeneca®) avant incision. Le crâne de l'animal est ensuite trépané afin de placer les guides canule (acier chirurgical ; longueur = 8mm ; Ø ext. = 0,46 mm, Ø int. = 0.255 mm ; Le Guellec tubular components) de manière bilatérale dans le cortex prélimbique selon les coordonnées stéréotaxiques suivantes (en mm par rapport au bregma selon l'atlas de Paxinos et Franklin 2001) (cf. *fig. 2.A*) : AP= +1,90 ; LAT= +/-0,3 ; V= -1,2 (la verticalité tient compte du fait que la canule mesure 9 mm, soit 1 mm de plus que le guide). Trois microvis en acier chirurgical (pas de vis : Ø = 0,5 mm ; longueur = 1 mm ; FOM 2000) sont insérées à proximité des guides, puis l'ensemble microvis / guides est fixé au crâne de l'animal avec un ciment dentaire (PalavitG®, Promodentaire). Une fois le ciment sec, la peau est suturée puis désinfectée à la Bétadine® dermique 10%, et un mandrin est déposé dans le guide afin d'éviter qu'il ne se bouche, ou prévenir d'éventuelles remontées de liquide céphalorachidien. L'animal est ensuite laissé en observation dans sa cage au-dessus d'une source de chaleur jusqu'à son réveil. Les épreuves comportementales ne débuteront que 2 semaines après l'opération, afin de permettre à l'animal de récupérer complètement.

II.B. Injection intracérébrale

La semaine précédent le test, les animaux sont manipulés trois fois par l'expérimentateur, et sont habitués à la contention ainsi qu'à l'insertion des canules (Ø ext. = 0,23 mm ; longueur = 9 mm) dans les guides. Les canules sont laissées en place 2 min à chaque manipulation pour réduire les phénomènes d'inflammation tissulaire résultant du passage de la canule, ainsi que les effets du stress induits par la mise en place et le retrait des canules.

Le jour du test d'AS, une canule reliée par cathéter de polyéthylène à une seringue Hamilton (1µl) est insérée dans chaque guide canule, dont elle dépasse de 1 mm en profondeur afin que la pointe de la canule soit située dans le cortex prélimbique (V = -2,5 mm). Les injections (0,25µl) ont été réalisées à l'aide d'un pousse seringue (débit 0,125µl/min), puis les canules sont laissées à demeure 2 min après injection afin de favoriser la diffusion tissulaire et limiter la remonter du produit lors du retrait de la canule. Les mandrins sont replacés dans les guides, et les animaux sont soumis à l'épreuve comportementale 2 min après le retrait des canules d'injection.

Les produits injectés ont été choisis pour leur mécanisme d'action :

- Liquide céphalorachidien artificiel (***LCR***, *Microperfusion fluid*, Phymep®) : solvant des différentes substances testées, il est également injecté chez les souris témoins.
- ***Lidocaïne*** (0.05 mg/ml ; Sigma®) : inhibiteur des canaux sodium, ce produit bloque la conductance sodique et empêche la formation de potentiel d'action dans les neurones et bloque ainsi de nombreux mécanismes cellulaires.
- ***Rp-cAMPS*** (0,6 mg/ml ; Enzo Life Sciences®) : puissant inhibiteur spécifique de la protéine kinase AMPc-dépendante (PKA), ce produit permet de bloquer la phosphorylation de la protéine CREB et les mécanismes cellulaires sous jacents.

II.C. Contrôle histologique

Afin de vérifier la localisation des sites d'injections, le cerveau de chaque souris est prélevé à la fin des tests expérimentaux en vue du contrôle histologique.

L'implantation des canules dans les cerveaux des souris ayant servi à l'immunohistochimie est directement contrôlée lors du comptage (cf. *fig.2.B*).

Pour le contrôle des animaux non utilisés en immunohistochimie, les souris sont perfusées comme précédemment décrit (cf. *Matériels & Méthodes II.A*) en remplaçant le PFA 4% par du formol 10%. Les cerveaux sont ensuite prélevés et fixés à 4°C dans une solution formol 10% pendant 48h, avant de passer dans une solution formol 10% - saccharose 30% pendant 24h minimum. Les cerveaux sont ensuite coupés frontalement (50µm) au microtome à congélation, montés sur lames gélatinées, puis colorés à la thionine (colorant nucléaire). Après montage d'une lamelle, les coupes sont observées sous microscope afin de vérifier la localisation des sites d'injections (cf. *fig.2.B*).

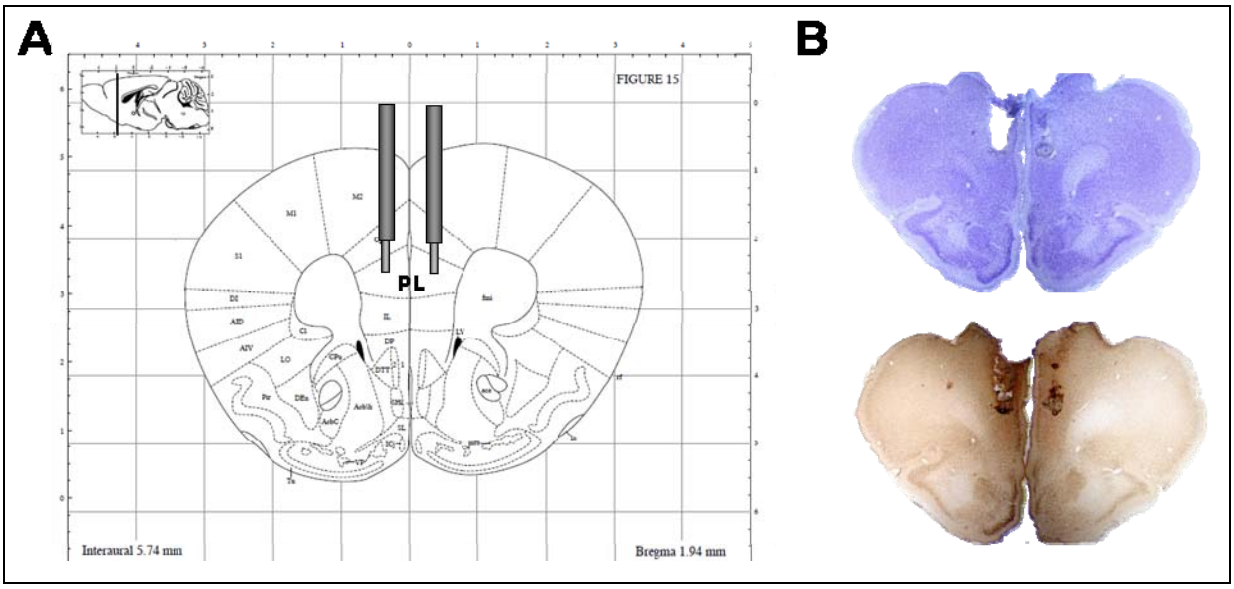


Figure 2 : Contrôle histologique. A : schéma d'une coupe au niveau du cortex préfrontal chez la souris (Paxinos et Franklin 2001). B : microphotographie illustrant des contrôles histologiques dans le prélimbique par marquage à la thionine (en haut), ou suite à l'immunohistochimie pCREB (en bas).

III. Etude biomoléculaire

III.A. Immunohistochimie

Le choix de la protéine CREB

La protéine ***CREB*** (***c****AMP* ***R****esponse* ***E****lement* ***B****inding*) est un facteur de transcription exprimé de façon ubiquitaire dans le cerveau des mammifères. Son activité est régulée par la phosphorylation du résidu Ser^{133}. La phosphorylation de ce résidu par les kinases induit le recrutement de son co-activateur CBP (**C**REB **B**inding **P**rotein), et la formation de ce complexe permet de stimuler la transcription de gènes dits précoces tels que c-fos et zif268 (Mayr et Montminy 2001). Les phosphatases, en déphosphorylant la Ser^{133} vont induire son inactivation par dissociation du complexe CREB/CBP. CREB est donc hautement régulé par la balance kinase/phosphatase, ce qui en fait un marqueur pertinent de l'activité neuronale (Mayr et Montminy, 2001 ; Carlezon et al., 2005).

Plusieurs études ont montré une cinétique d'activation différentielle de la protéine CREB selon la tâche comportementale (Bernabeu et al. 1997 ; Bourtchudaladze et al. 1994 ; Colombo et al. 2003 ; Schultz et al. 1999 ; Stanciu et al. 2001 ; Taubenfeld et al. 2001 ; Trifilieff et al. 2006 ; Porte et al. 2008). Nous avons donc réalisé une étude cinétique de l'immunoréactivité de la protéine CREB phosphorylée sur la Ser^{133} (***pCREB***) afin d'évaluer le délai le plus représentatif de l'activation neuronale dans notre modèle (cf. *Chapitre 2*). Les délais de perfusion ont été fixés selon un délai « après le début du test » afin que tous les animaux soient perfusés dans les mêmes conditions. Ceci n'aurait pas été le cas si on avait choisi un délai « post test », dans la mesure où les animaux ne mettent pas tous le même temps pour réaliser la séquence et/ou que l'intervalle entre essais prédéfini n'est pas identique. Dans cette étude, nous avons donc analysé les données obtenues dans 5 groupes d'animaux :

- Un groupe ***naif*** : ce groupe est constitué de souris ayant été isolées, mais n'ayant effectué aucune procédure comportementale.
- Un groupe ***cage*** : il s'agit de souris ayant été soumises à la procédure comportementale complète (isolement, habituations, session prétest), mais n'ayant pas effectué le test le jour de la perfusion. Ce groupe a pour but de vérifier si la procédure

d'habituation produit un effet sur la quantité totale et/ou la phosphorylation de la protéine CREB.

- Trois groupes comportementaux ayant été perfusés respectivement à ***30 minutes***, ***1 heure*** et ***1 heure 30*** après le début du test.

Pour réaliser les immunomarquages, nous avons utilisé des anticorps dirigés contre la protéine CREB phosphorylée (***pCREB***) et non phosphorylée (***tCREB***). En effet, il était essentiel de vérifier l'absence de modification de la quantité totale de protéine CREB selon le délai de perfusion et l'âge, afin que nos observations de l'immunomarquage pCREB ne soient pas influencées par la quantité totale de la protéine.

Fixation des cerveaux

Trente minutes après le début du test, les animaux sont anesthésiés par une injection intrapéritonéale d'avertine (10 ml/kg), puis perfusés en intracardiaque avec 100 ml d'une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4% dans du tampon phosphate (PB 0.1M, pH=7.4, 4°C). Les cerveaux sont alors prélevés et post-fixés une nuit à 4°C dans du PFA 4%. Le lendemain, les cerveaux sont transférés pendant 24h dans une solution de sucrose à 30% préparée dans du PB 0.1M. Cette solution permet d'extraire l'eau des cerveaux par phénomène d'osmolarité, afin que la congélation n'endommage pas les tissus. Cette congélation est réalisée en passant progressivement les cerveaux dans une solution d'isopentane à -20°C pendant 1h avant d'être stockés à -80°C en vue de l'immunomarquage.

Avant l'immunomarquage, les cerveaux sont coupés au microtome à congélation à -20°C (Leica®), en coupes frontales sériées de 50µm en trois jeux de coupes. Deux jeux sont prélevés dans un liquide de cryoprotection (30 % de glycerol / 30% d'ethylène glycol dans du PB 0,1M final) puis conservés à -20°C. Le dernier jeu est prélevé dans du tampon Tris (TB 0.1M, pH=7.4) contenant du fluorure de sodium (NaF 0.25mM) agissant comme inhibiteur de phosphatases.

Marquage immunohistochimique

Les étapes décrites ci-après sont effectuées sous agitation douce. Toutes les solutions utilisées ici contiennent un inhibiteur de phosphatases NaF (0.25 mM), et les rinçages sont effectués dans des puits de boites de culture à raison de 5 ml par puits et de 12 min par rinçage.

Les coupes flottantes sont d'abord rincées 4 fois avec du TB 0.1M puis incubées 30 min à 4°C dans une solution de TB contenant 0.5% d'H_2O_2 (inhibition des peroxydases endogènes). Après 4 rinçages au TBS (tampon Tris + 0.9% NaCl), les coupes sont incubées dans une solution de saturation pendant 2h à 4°C (TB 0,1M ; albumine sérique bovine 1% ; sérum de chèvre 3% ; Triton X-100 0,2%), puis 24h à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans le tampon de saturation : anticorps polyclonaux obtenus chez le lapin, anti-tCREB (1:3000, Cell Signaling Technology®, 48H2), ou anti-pCREB (1:6000, Upstate Biotechnology®). Après 4 nouveaux rinçages au TBS, les coupes sont mises en présence de l'anticorps secondaire (IgG de chèvre anti-lapin, 1:2000, Jackson Immunoresearch®) dilué dans la solution de saturation, pendant 2h à température ambiante. Suite à 4 rinçages, les coupes sont incubées avec le complexe avidine-biotine-peroxydase (Vectastain Elite kit, Vector Laboratories®) pendant 2h à l'obscurité et température ambiante, puis rincées à nouveau 4 fois avant révélation du complexe antigène-anticorps à l'aide de 2-3 diaminobenzidine (0.05%) péroxydée en présence d'H_2O_2 (0.02%). Cette réaction, qui produit un précipité brun révélant la protéine d'intérêt, est stoppée après 10-12 min par 4 rinçages au TB à 4°C (cf. *fig. 3.A*). Finalement, les coupes sont étalées sur lame de verre, déshydratées dans deux bains successifs de toluène, puis montées entre lame et lamelle avec une résine (Eukitt®).

La quantification du marquage s'effectue en aveugle à l'aide d'un système d'imagerie semi-automatisé (OLYMPUS BX 50®, Biocom Visiolab 2000®, V4.50) (cf. *fig.3.B*). Pour chaque individu et chaque structure, le comptage est effectué sur 3-4 coupes de façon bilatérale, puis moyenné en nombre de noyaux immunopositifs par mm^2.

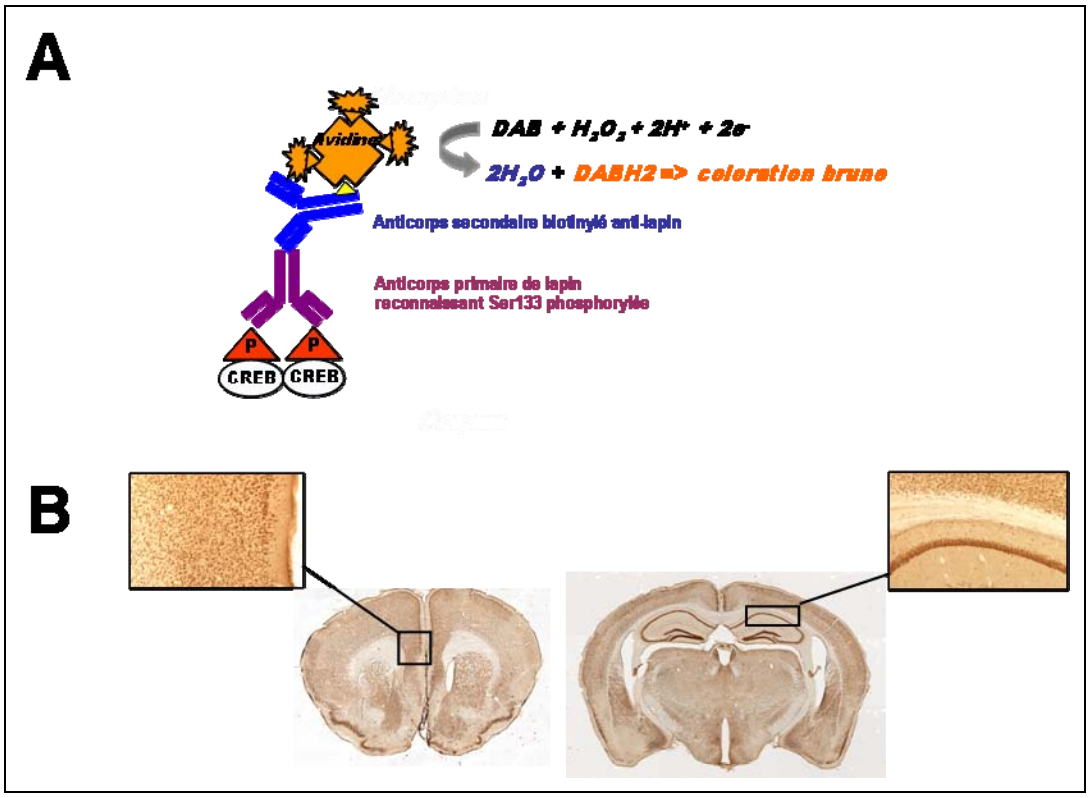


Figure 3 : Immunohistochimie sur coupes flottantes. A : illustration du mécanisme de marquage immunohistochimique (exemple de l'Ac pCREB). B : exemple d'immunomarquage pCREB au niveau du prélimbique et du CA1 hippocampique.

Analyses statistiques

Les résultats d'immunohistochimie ont été analysés à l'aide du logiciel statistique Statview®. Les données ont été traitées par analyse de variances (ANOVA) avec pour facteurs de variance les variables « Age » et « Délai de perfusion ». Lorsqu'un effet global ou l'interaction entre plusieurs effets apparaissent statistiquement significatifs ($p<0.05$), les analyses se poursuivent par le test post-hoc adapté afin de comparer les différents groupes entre eux.

Choix des structures

Nos expériences nous ont amené à rechercher les structures pouvant être impliquées dans l'alternance spontanée et/ou pouvant être affectées par le vieillissement. Comme nous l'avons vu dans les bases théoriques, quatre structures cérébrales principales apparaissent comme pouvant intervenir dans le comportement d'AS :

- L'hippocampe (***CA1***) : impliqué dans la mémoire à long terme, le repérage spatial, la mise en relation d'informations et la MDT (cf. *Bases théoriques I.C.2*).

- Le cortex préfrontal, et plus précisément le cortex prélimbique (***PL***): structure essentielle à la MDT, le CPF est impliqué dans l'attention, le maintien et la manipulation d'informations pertinentes et la suppression des informations interférentes (cf. *Bases théoriques II.B.3*).
- Le striatum (***St***): nous avons voulu vérifier si cette structure intervenait dans l'AS en raison de son implication dans les processus procéduraux (cf. *Bases théoriques I.C.2*).
- Le noyau baso-latéral de l'amygdale (***BLA***) : par son implication dans les relations « émotions-mémoire », l'amygdale pourrait moduler les processus cognitifs, notamment lors du vieillissement connu pour modifier la réactivité émotionnelle des animaux (Tronche et al., 2010 ; Phelps et LeDoux, 2005).

III.B. Western-blot

Les protéines cibles

Dans le cadre de notre étude sur le mode d'action du composé S 38232 (agoniste des récepteurs cholinergiques α4β2), nous avons réalisé une analyse biochimique par Western-blot afin de quantifier la sous-unité nicotinique β2. Le choix de cette cible a été effectué en fonction de son implication dans les processus mnésiques (cf. *Bases théoriques III.B.2*), et des résultats pharmacologiques et immunohistochimiques que nous avons obtenus (cf. *Chapitre 2 et 3*)

Prélèvement des échantillons

Les souris sont décapitées et les cerveaux sont très rapidement prélevés, déposés dans des tubes eppendorfs stériles et congelés à l'aide d'azote liquide. Des sections de 300µm sont effectuées à l'aide d'un cryostat et l'hippocampe dorsal est prélevé à l'aide d'un emporte-pièce. Les tissus sont lysés et homogénéisés dans une solution d'extraction protéique (10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1% Triton X-100, 30 mM sodium pyrophosphate, 50 mM NaF, 5 µM ZnCl2, 100 µM Na3PO4, 1 mM DTT, 5 nM okadaic acid, 2.5 µg aprotinin, 2.5 µg pepstatine, 0.5 µg PMSF, 0.5 mM benzamidine, 2.5 µg leupeptin). Les échantillons sont dénaturés au bain-marie sec (95°C pendant 5min), et la quantification des protéines totales est effectuée par méthode colorimétrique (micro BCA protein assay kit, Pierce®).

Protocole de Western-blots

Les protéines (20µg par puits) sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (10% SDS PAGE) puis transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF, 0.45 µm Hybond P, Amersham Biosciences®). Une vérification de la charge de chaque puits et de la qualité du transfert est effectuée à l'aide d'une coloration au rouge ponceau (0,2% dans une solution d'acide acétique 5%). Après décoloration dans une solution d'acide acétique à 5% puis rinçage, les membranes sont saturées à l'aide d'une solution à 5% de lait écrémé (Regilait®) dans du TB 0,1M pH=7,5 contenant 0,1M de NaCl pendant 1h sous agitation à température ambiante. Les membranes sont ensuite incubées une nuit à 4°C avec l'un des anticorps dirigé contre la sous-unité nicotinique β2 (anticorps polyclonal anti nAChR-β2: ab41174 au 1/500, Abcam® ; GTX113654 au 1/500, GeneTex® ; poids moléculaire rapporté : 57kDa), dilué dans du tampon de saturation contenant 0,1% de Tween 20 (TBS-Tween). Après rinçage (6 x 10min) au TBS-Tween, les membranes sont incubées 2h à température ambiante avec l'anticorps secondaire d'âne anti-lapin (1:5000, HRP-conjugated donkey anti-rabbit IgG, Amersham Biosciences®), dilué dans le tampon de saturation. La présence des protéines est alors révélée en chambre noire sur film photographique par une réaction photo-luminescente en présence du substrat ECL (kit Amersham Biosciences®). Après révélation, les membranes subissent un protocole de « décrochage » (ou stripping) des anticorps (2 x 30min dans du tampon Glycine 0,1M pH 2,8 au bain-marie à 55°C puis 10min dans du SDS dilué à 2% dans du TBS 1X) puis sont abondamment rincées. Elles sont alors prêtes pour une nouvelle saturation et traitées pour la détection de la protéine β-tubuline utilisée comme marqueur de charge (1:2000, anticorps polyclonal de lapin anti- β-tubuline, Sigma® ; poids moléculaire rapporté : 50kDa).

La quantification est directement effectuée par mesure de la densité optique (DO) sur les films photographiques, à l'aide du logiciel ImageJ. Les données sont présentées, pour chaque animal, sous forme du rapport « DO obtenues pour les sous-unités α7 et β2 » / « DO obtenues pour la β-tubuline », et analysées par ANOVA (seuil de significativité : $p<0,05$) à l'aide du logiciel Statview.

III.C. PCR quantitative

Cette étude a été réalisée par la plateforme technique CNRS de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) de Gif sur Yvette.

Pour toutes les étapes qui suivent, l'H_2O utilisée est dépourvue de RNase et DNase afin d'éviter ou de limiter toute dégradation de nos échantillons.

Extraction des ARN totaux

Chaque échantillon est broyé avec des Billes CK-Mix (Bertin®) dans 500µL de tampon de lyse RA1. Les broyages sont réalisés en utilisant un Precellys 24 (Bertin®) refroidi par un Cryolys (Bertin®) selon le protocole suivant : 23 secondes à 6500rpm. Les ARN sont ensuite isolés à l'aide du kit NucleoSpin RNA XS (Macherey-Nagel®) selon les instructions du fabricant. Les ARN extraits sont conservés à -80°C.

Dosage et qualité des ARN extraits

La concentration en acides nucléiques est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop (ND-1000, Thermo Fisher Scientific®).

La qualité (niveau de dégradation) des ARN extraits est mesurée sur un Bioanalyser 2100 (Agilent®, Massy, France) à l'aide du kit «Agilent RNA 6000 nano» selon les instructions de fabricant. Pour cela, 2µL d'ARN sont dénaturés pendant 2 minutes à 70°C, puis 1µL est chargé dans 1 puits de la puce d'analyse. Un colorant fluorescent se lie à l'ARN et sert de rapporteur. La qualité des ARN est déterminée par le calcul d'un RIN (RNA Integrity Number) qui correspond au rapport entre les pics de fluorescence des ARN ribosomaux 18S et 28S. Ces ARN forment 2 pics majoritaires dans les micro-électrophorèses. Le RIN a une valeur comprise entre 0 et 10 où la valeur 0 correspond à un ARN entièrement dégradé et 10 à un ARN non dégradé.

Reverse Transcription (RT) des ARN messagers (ARNm)

Les ARNm sont rétro-transcrits en ADN complémentaires (ADNc) à l'aide du kit « High Capacity cDNA Reverse Transcription kit » (Applied Biosystems®). 500 ng d'ARN sont dilués dans 10µL d'H_20 puis 10µL du mix de RT 2x, avec inhibiteur de RNase, sont ajoutés. Après homogénéisation, les échantillons sont placés à 25°C pendant 10 minutes puis 2 heures à 37°C. La transcriptase inverse est inactivée en chauffant les échantillons à 85°C pendant 5 minutes. Les ADNc sont conservés à -20°C à la concentration de 25ng/µL.

Q-PCR

Pour toutes les réactions de Q-PCR, les ADNc sont dilués à la concentration de 1ng/µL. Chaque Q-PCR est réalisée avec 7µL de mélange réactionnel de PCR comprenant 5µL de Mix 2X FAST TaqMan (Applied Biosystems®), 0,5µL de sonde TaqMan 20X et 1,5µL d'H_2O. Trois microlitres d'ADNc dilué (ou H_2O pour le contrôle sans ADNc) sont ajoutés soit 3ng/réaction dans un volume final de 10µL. Toutes les Q-PCR ont été réalisées en duplicat technique. Les réactions de Q-PCR sont réalisées à l'aide de l'ABI 7900HT selon le protocole thermique suivant : la DNA polymérase est activée par une étape à 95°C pendant 20 secondes, suivie de 40 cycles de 1 seconde à 95°C (Dénaturation) et 25 secondes à 60°C (Hybridation-Elongation). La fluorescence émise par chaque puits réactionnel est recueillie à chaque cycle.

Détermination des meilleurs gènes de référence

Des gènes de référence sont définis pour chaque étude. Ceux-ci sont sélectionnés suite aux analyses des algorithmes Normfinder et Genorm du logiciel Genex pro (v4.4.2.308, MultiD®, Suède). Le but est de sélectionner les gènes dont les expressions sont les plus stables entre les différents échantillons. Pour ces analyses, les gènes GAPDH, PGK1, GUSB, UBC, 18S, TBP et HPRT1 ont été testés par QPCR. Parmi ces 7 gènes et suite aux analyses par les algorithmes Normfinder et Genorm du logiciel Genex, les 3 gènes GAPDH, PGK1 et GUSB sont classés comme les plus stables dans les paramètres de ce projet, c'est-à-dire, entre souris WT et KO, de même entre organe HPC ou CPF, et entre souris jeunes et âgées. Ces gènes sont donc sélectionnés pour les expériences et analyses de quantification relatives suivantes.

Les assays TaqMan des gènes ACHRNA7 (sous-unité nicotinique α7) et ACHRNB2 (sous-unité nicotinique β2), ont été choisis pour leur sélectivité et leur absence d'amplification lors de KO des 2 gènes d'intérêts. Le protocole de Q-PCR est celui décrit plus haut en incluant les gènes de référence sélectionnés (GAPDH, PGK1 et GUSB).

Analyse des données de Q-PCR

Les fluorescences collectées sont analysées dans le logiciel RQ Manager (v1.2.1, Applied Biosystems®). Les seuils de base («*thresholds*») sont redéfinis manuellement dans la partie la plus linéaire des courbes de fluorescence. La valeur de Ct («Cycle threshold») de chacune des PCR est alors déterminée. Les limites de reproductibilité technique

préalablement définies dans le laboratoire permettent d'appliquer une « limite de Ct » arbitrairement fixée à 40 Ct. En cas de dépassement de cette limite, le gène testé est considéré comme non exprimé dans l'échantillon.

La dernière étape consiste à calculer la variation d'expression de chaque gène par rapport au niveau d'expression de ce gène dans l'échantillon de référence. Les Ct sont d'abord normalisés (Delta-Ct) par rapport à la moyenne géométrique des 3 gènes de référence utilisés dans notre étude. Puis, la quantité relative, notée RQ, est calculée en utilisant la méthode du « Delta Delta Ct » (DDCt) décrite par Pfaffl, 2001, puis les écarts types biologiques sont calculés en utilisant la méthode décrite par l'équipe de Willems et al., 2008.

Analyses statistiques

La distribution non paramétrique des échantillons pour les gènes ACHRNA7 et ACHRNB2 a été déterminée par le test de Kolmogorov-Smirnov du logiciel Genex pro. Le test statistique utilisé est donc un test non-paramétrique (Wilcoxon). La significativité des RQ a été calculée à l'aide du logiciel StatMiner (v4.1, Integromics®, Espagne). La significativité est symbolisée sur les graphiques en utilisant la nomenclature suivante : * : $p<0,05$; ** : $p<0,01$; *** : $p<0,001$.

Chapitre 1

Chapitre 1

L'alternance spontanée: modèle d'étude de la mémoire de travail. Approche longitudinale et pharmacologique.

I. INTRODUCTION *96*

II. MÉTHODOLOGIE *98*

Rappel de la procédure comportementale **98**
Traitements pharmacologiques **98**
Analyse des résultats **99**

III. RÉSULTATS *100*

Expérience 1 : impact du vieillissement sur les performances d'AS **100**
Expérience 2 : validation pharmacologique du modèle **103**
Etude des substances de référence *103*
Etude des molécules issues de la recherche Servier *105*

IV. DISCUSSION *107*

Impact du vieillissement sur l'alternance spontanée **107**
Validité pharmacologique du modèle **107**
Potentiel promnésiant des molécules étudiées **108**
Hypothèse glutamatergique *109*
Hypothèse cholinergique *111*

V. CONCLUSION *114*

I. Introduction

Parmi les déficits observés lors du vieillissement « normal » ou pathologique, ceux liés à la mémoire de travail apparaissent de manière précoce, et altèrent grandement la qualité de vie des personnes concernées (Baddeley et al., 1991). C'est pourquoi l'étude des mécanismes cérébraux impliqués dans le déclin cognitif lié à l'âge, et les moyens pharmacologiques permettant de palier ces déficits, sont aujourd'hui l'une des cibles privilégiées de la recherche fondamentale ainsi que de la recherche pharmacologique appliquée (Lockhart et Lestage, 2003). En s'inscrivant dans le cadre d'une thèse Cifre en collaboration entre le CNRS et les laboratoires pharmaceutiques Servier, mes travaux se sont orientés de ce fait vers la mise en place d'un modèle de mémoire de travail, l'étude des effets du vieillissement sur ce modèle, ainsi que sa validation pharmacologique.

Comme nous l'avons évoqué, l'âge se caractérise par des troubles mnésiques sévères, particulièrement marqués pour la mémoire de travail. Nous avons donc cherché à « modéliser » ces déficits chez l'animal. A cet effet, nous avons choisi d'utiliser le comportement d'alternance spontanée afin d'évaluer la mémoire de travail spatiale chez la souris.

L***'alternance spontanée*** (AS) permet l'étude de la ***mémoire de travail spatiale***, et notamment l'effet du délai et des interférences proactives (cf. *Bases théoriques IV.B*). Basée sur le comportement spontané des rongeurs à se diriger vers la nouveauté, l'alternance séquentielle spontanée se caractérise par le comportement des souris à alterner à chaque essai le choix du bras d'arrivée dans un labyrinthe en T. Ainsi dans une série de plusieurs essais, pour alterner à un essai donné (N), l'animal devra se rappeler du bras visité à l'essai précédent (N-1) et « oublier » ou ne pas tenir compte des choix antérieurs interférents (N-2 ; N-3 ; …). Ceci implique un mécanisme d'effacement des informations d'un essai à l'autre (« *resetting mechanisms* ») ainsi que la flexibilité cognitive nécessaire à la sélection de l'information pertinente (Olton, 1979) ce qui est le cas dans la mémoire de travail chez l'Homme (Bjork, 1978). De ce fait, la capacité à alterner au cours d'une série est affectée par la place de l'essai dans la série et par le délai ménagé entre les essais (IEE). Ainsi, l'effet délétère des interférences proactives et l'IEE font de la mémoire de travail une composante primordiale de

l'alternance spontanée séquentielle. De plus, plusieurs études ont montré l'implication dans l'AS du cortex préfrontal et de l'hippocampe (cf. *Bases théroriques IV.B*) (Wan et al., 1994 ; Lalonde, 2002 ; Savage et al., 2003; Pych et al., 2005 ; Izaki et al., 2008), deux structures connues pour leur rôle central dans la mémoire de travail aussi bien chez l'animal que chez l'Homme (Yoon et al., 2008; van Vugt et al., 2010). Ces deux structures cérébrales sont également impliquées dans les perturbations cognitives liées à l'âge (Bishop et al., 2010) (cf. *Bases théoriques II, et III.A.2*).

L'ensemble de ces données conforte le choix de l'AS comme modèle d'étude de la mémoire de travail lors du vieillissement. De plus, le fait d'utiliser une épreuve basée sur un comportement spontané ne nécessitant ni privation alimentaire ni agent renforçant explicite, et de plus rapide à mettre en place et reproductible, fait du test d'AS un modèle animal adapté aussi bien à la recherche fondamentale qu'aux études pharmacologiques (Lalonde, 2002 ; Hughes, 2004 ; Deacon et Rawlins, 2006).

Dans cette première étude, nous nous sommes tout d'abord attachés à étudier l'***impact du vieillissement sur la mémoire de travail*** spatiale.
Nous avons ensuite vérifié la ***validité pharmacologique*** du modèle en étudiant l'effet de molécules de références positives (donepezil, mémantine) ou négatives (venlafaxine, flumazenil) sur des souris jeunes adultes ou âgées. Finalement, nous avons évalué l'effet promnésiant, chez les souris jeunes et âgées, de molécules issues de la recherche Servier appartenant à trois classes pharmacologiques différentes.

Ce premier chapitre a fait l'objet d'un article parut dans le journal *Psychopharmacology* (Vandesquille et al., 2011a ; cf. *Annexe 1*). Dans un souci de clarté et de cohérence, les résultats présentés dans cet article s'attachent plus particulièrement à la présentation du modèle comportemental, ainsi qu'aux résultats pharmacologiques portant sur la mémantine et sur l'un des produits issus de la recherche Servier (S 18986), afin d'aborder le rôle du système glutamatergique dans l'alternance spontanée et la mémoire de travail spatiale.

II. Méthodologie

Rappel de la procédure comportementale

Le test d'AS a été réalisé dans un labyrinthe en T constitué d'un compartiment de départ débouchant sur l'allée centrale au bout de laquelle se situent les deux bras d'arrivés, perpendiculaires à l'axe central. Chaque série « Test » comprend 7 essais consécutifs séparés par un IEE constant au sein de chaque série « Test », mais variable d'une session à l'autre. Le choix et la latence de chaque essai sont mesurés afin de déterminer le pourcentage d'alternance ainsi que la latence moyenne de chaque groupe. De plus, une analyse des pourcentages d'alternance par bloc d'essais (essais 2+3 ; essais 4+5 ; essais 6+7) est réalisée afin d'étudier l'effet des interférences proactives. (cf. *Matériels et Méthodes I.B*).

Dans une première expérience, nous avons voulu étudier l'***impact du vieillissement sur les performances d'AS***. Pour cela, nous avons utilisé des souris C57Bl/6 de trois âges différents (4-5 mois, 18-19 mois, 23-24 mois) que nous avons soumises à plusieurs sessions d'AS avec des IEE différents (5 sec, 30 sec, 90 sec, 180 sec). Afin de vérifier les performances des souris en mémoire de travail, nous avons comparé leurs pourcentages d'alternance avec le seuil du hasard (50%). Pour les séries dont les performances chutent au niveau du hasard (90 sec pour les souris de 18-19 mois, 180 sec pour les souris de 4-5mois), un 8e essai avec un IEE plus court (IEE = 30 sec) est rajouté. Ce 8e essai permet de vérifier si la baisse des performances à ces délais est due à une diminution de la motivation et/ou une incapacité à alterner en fin de série. A l'inverse, si la diminution des performances est induite par le délai utilisé dans la série, alors diminuer l'IEE au 8e essai devrait augmenter l'alternance au 8ème essai, par rapport au 7e essai.

Traitements pharmacologiques

Lors d'une seconde expérience, nous avons réalisé une étude pharmacologique sur ce modèle. Elle avait pour but de vérifier la ***validité pharmacologique du modèle*** comportemental à l'aide de substances de référence, ainsi que de tester le ***potentiel promnésiant de molécules issues de la recherche Servier***.

Pour la réalisation de cette étude pharmacologique, nous avons choisi d'étudier les différentes molécules dans des conditions d'oubli établies lors de la première expérience chez les souris de ***4-5 mois (IEE= 90 sec)*** et celles de ***18-19 mois (IEE = 180 sec)***. Les différents composés ont été injectés par voie intra-péritonéale 30 minutes avant le test au volume de 10 ml/kg. Les souris témoins reçoivent le solvant de dilution des composés (NaCl). (cf. *Matériels et Méthodes I.C*).

Les références positives :

- Mémantine : antagoniste des récepteurs NMDA.
- Donepezil : inhibiteur de l'acétylcholinestérase.

Les références négatives :

- Venlafaxine : inhibiteur de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline.
- Flumazenil : antagoniste des récepteurs aux benzodiazépines.

Les molécules Servier :

- S 18986 : modulateur positive des récepteurs glutamatergiques de type AMPA.
- S 24795 : agoniste des récepteurs nicotiniques α7.
- S 38232 : agoniste des récepteurs nicotiniques α4β2.

Analyse des résultats

Les comparaisons des performances moyennes par rapport au hasard (i.e 50%) ont été réalisées avec un test t non apparié de Student. Les résultats comportementaux entre groupes d'âge ou de traitement ont été analysés par ANOVAs à un ou deux facteurs, suivis du test post-hoc adapté afin de comparer les différents groupes entre eux. Les analyses par bloc d'essais ne sont détaillées uniquement que lorsqu'un effet significatif est observé.

III. Résultats

Expérience 1 : impact du vieillissement sur les performances d'AS

Nos résultats montrent une diminution des performances parallèlement à l'augmentation de l'IEE quelque soit l'âge des souris [4-5 mois (*n*=10) : $F_{(2,27)}$=8.3, p<0,001 ; 18-19 mois (*n*=9) : $F_{(1,16)}$=9,9, p=0.006 ; 23-24 mois (*n*=10) : $F_{(1,18)}$=4,8, p=0,04] (cf. *fig 1.A*). Plus précisément, les analyses chez les souris jeunes (4-5 mois) montrent que les animaux alternent de manière significativement supérieure au hasard au délai de 30 sec (71,6±6,1% ; t=23,0 ; p<0,001) et de 90 sec (68,3±3,8% ; t=4,8 ; p<0,001), mais non pour celui de 180 sec (40,0±7,5% ; t= -0,32 ; p=0,75). De plus, la comparaison entre délais révèle une différence significative des performances entre le délai de 180 sec et ceux de 30 sec (p<0,001) et 90 sec (p=0,02). Aucune différence n'est observée sur les latences de choix (respectivement pour 30 sec, 90 sec and 180 sec: 13,7±0,6 ; 14,8±1 ; 19,8±2,3 sec ; $F_{(4,57)}$=1,01 ; NS). Lors du 8ème essai (IEE=30 sec), les performances des souris jeunes observées lors du 7ème essai de la série à 90 sec sont identiques (90±10% dans les deux cas), alors qu'elles diffèrent significativement lors du 7 ème essai de la série à 180 sec (90,0±10,0% et 50,0±16,7% au 8ème et 7ème essai respectivement ; p=0,03).

Chez les souris de 18-19 mois, les résultats indiquent des performances supérieures au hasard pour le délai de 30 sec (70,3±4,6% ; t=4,4 ; p=0,02), ce qui n'est pas le cas au délai de 90 sec (46,3±6,0% ; NS). De plus, les performances observées au délai de 90 sec sont significativement inférieures à celles observées lors du délai de 30 sec (p<0,01). L'analyse des latences de choix fait apparaître un effet du délai, avec une augmentation de la latence de choix au délai de 30 sec (36,4±4,6 sec) par rapport au délai de 90 sec (16,8±1,9 sec ; $F_{(1,16)}$=9,8 ; p=0,006). De manière intéressante, les souris mettent plus de temps à effectuer leurs choix lors de l'IEE où l'on observe des performances supérieures au hasard (cf. *fig. 1.B*). Les souris âgées de 23-24 mois répondent au hasard pour le délai de 30 sec (51,5±4,6% ; NS), alors qu'elles présentent des performances supérieures au hasard pour le délai de 5 sec (66,6±4,9% ; t=3.3 ; p<0,008). Aucune différence n'a été observée sur les latences de choix (39,3±5,1 sec et 40,3±6,7 sec, respectivement pour les délais de 5 et 30 sec ; NS).

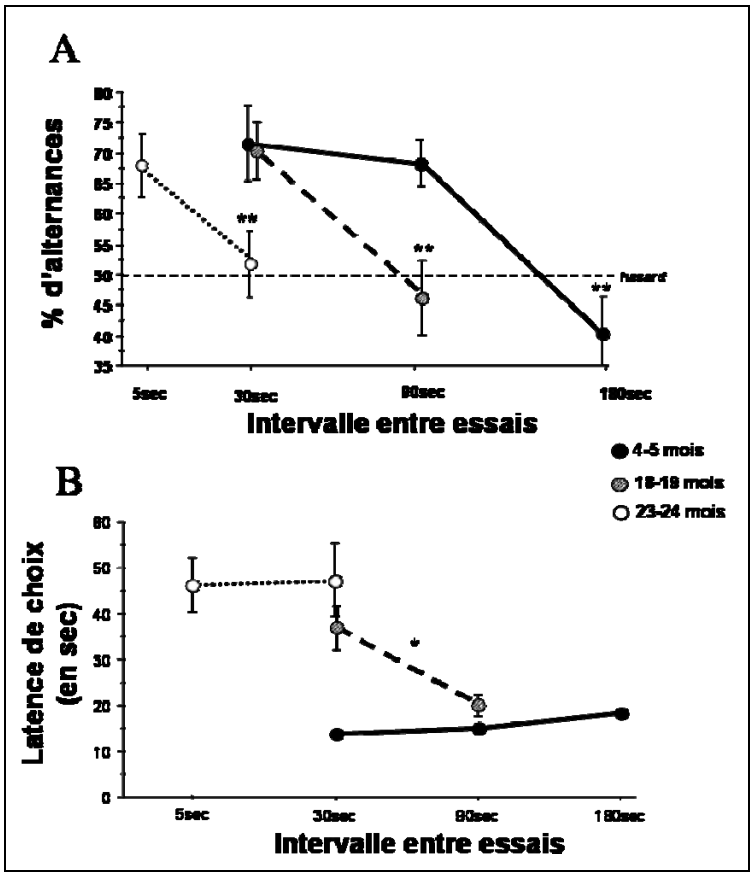


*Figure 1 : Comparaison intra-groupes de l'effet du délai et de l'âge dans le test d'alternance spontanée. A : performances d'AS en fonction du délai et de l'âge. B : latence de choix lors du test d'AS en fonction du délai et de l'âge. * :p<0.05 ; ** :p<0.01.*

Ces données montrent que le vieillissement entraîne une vulnérabilité accrue à l'impact délétère du délai, puisque le délai nécessaire pour induire une réponse au hasard diminue avec l'augmentation de l'âge. Pour les souris de 18-19 mois, on note un déficit dès l'IEE de 90 sec, ce qui traduit une vulnérabilité accrue aux interférences par rapport aux souris jeunes. Les performances ne sont pas affectées aux délais de 30 sec et 5 sec. Par contre, les souris de 23 mois présentent un déficit dès le délai de 30 sec, alors que le comportement d'alternance est conservé lors de séries avec un IEE de 5 sec.

L'analyse par bloc d'essais permet d'étudier l'impact des interférences proactives lors de la réalisation de la tâche d'AS. Les résultats font apparaître un effet « bloc » lors de la comparaison des souris de 4-5 mois et 18-19 mois au délai de 90 sec ($F_{(2,24)}$=4,6 ; p=0,02). Alors qu'il n'y a pas de différence entre les performances des souris de 4-5 mois et celles de 18-19 mois sur le 1er bloc d'essais (respectivement 65±10,6% et 61,1±13,8% ; NS), on observe une diminution du pourcentage d'alternance pour les souris âgées lors du 2 ème bloc et 3 ème blocs d'essais (33,7±11,7% et 44,4±13% contre 70±8,1% et 70±11%, respectivement

pour les souris âgées et jeunes, lors du 2ème et 3ème blocs d'essais ; $p<0,05$ dans toutes les comparaisons). (cf. article en *Annexe 1* pour les graphiques). (cf. *fig. 2.B*)

L'étude des latences de choix montre que le délai n'induit pas de différence significative au sein des groupes 4-5 mois et 23-24 mois (cf. *fig. 1.B*). Seul le groupe 18-19 mois présente une latence de choix significativement plus courte pour le délai de 90 sec par rapport à celui de 30 sec. Cependant, il est à noter que l'augmentation des latences sur le délai plus court s'effectue parallèlement à une augmentation significative des performances par rapport au hasard.

Finalement (cf. article en *Annexe 1* pour davantage d'informations), cette expérience montre que le vieillissement entraîne une vulnérabilité accrue aux interférences délai-dépendantes dans l'épreuve d'alternances spontanées séquentielles.

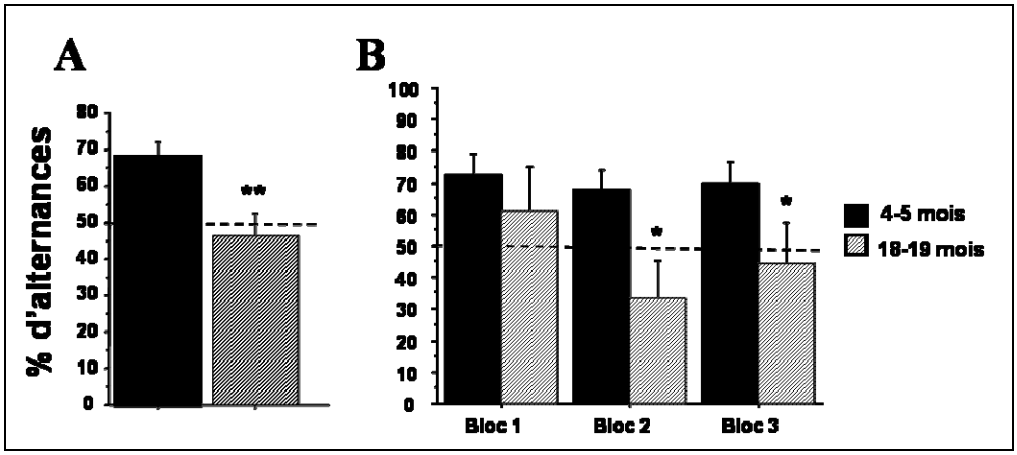


Figure 2 : L'altération des performances d'AS chez les souris âgées se caractérise par une sensibilité accrue aux interférences proactives. A : performances moyennes lors de la réalisation de la tâche d'AS sur 7 essais. B : analyse des performances d'AS par bloc d'essais (bloc 1 : essais 2+3 ; bloc 2 : essais 4+5 ; bloc 3 : essais 6+7).

Expérience 2 : validation pharmacologique du modèle

Etude des substances de référence

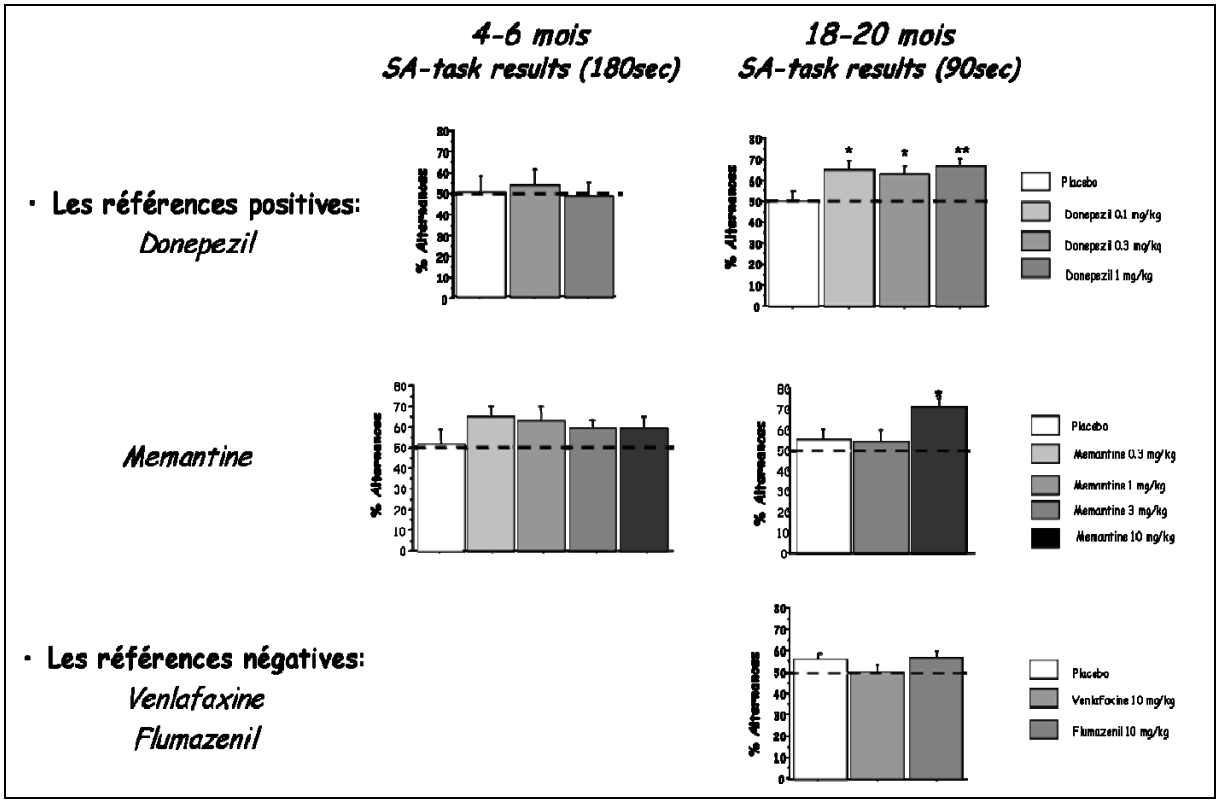


Figure 3 : Validation pharmacologique du modèle, par l'étude de molécules de référence positives (donepezil et mémantine), ou négatives (venlafaxine et flumazenil) chez des animaux jeunes (4-5 mois) et âgées (18-19 mois). Les résultats indiquent que les références positives possèdent un effet promnésiant dans le test d'AS uniquement chez les souris âgées, alors que les références négatives ne présentent pas d'effet chez ces mêmes souris.

Nous avons voulu vérifier si des substances utilisées dans le traitement de la maladie d'Alzheimer (le donepezil et la mémantine) et connues pour leurs effets promnésiants dans de nombreux modèles animaux (Seltzer, 2007 ; Parsons et al., 2007) étaient également capables d'atténuer le déficit d'alternances séquentielles observé chez les souris âgées dans notre modèle. Afin d'évaluer l'impact promnésiant de ces composés, nous avons utilisé la situation comportementale induisant des déficits, tant chez les souris jeunes que chez les souris âgées. Les études pharmacologiques ont donc été réalisées avec des souris jeunes (4-5 mois) soumises à une épreuve d'alternances séquentielles au délai de 180 sec, et avec des souris âgées (18-19 mois) soumises à une épreuve d'alternances séquentielles au délai de 90 sec.

Dans l'étude impliquant les souris de 4-5 mois, le donépezil comme la mémantine n'induisent pas de modifications significatives des performances d'AS par rapport au groupe

placebo ($F_{(2,24)}$=0,182 et $F_{(4,44)}$=0,623 ; NS dans les deux comparaisons, respectivement pour le donepezil et la mémantine) (cf. *fig.3*).

Chez les souris de 18-19 mois, le donepezil induit une augmentation significative des performances aux trois doses étudiées [$F_{(3,31)}$=3,21 ; p=0,036 ; placebo (*n=8*) : 50±4,5% ; 0,1 mg/kg (*n=9*) : 64,82±4,3% ; 0,3 mg/kg (*n=9*) : 62,98±3,7% ; 1 mg/kg (*n=9*) : 66,68±3,9%], l'effet le plus significatif étant observé à la dose la plus importante (0,1 mg/kg : p=0,017 ; 0.3 mg/kg : p=0,035 ; 1 mg/kg : p=0,008 ; comparaison effectuée par rapport au groupe placebo). La mémantine induit également une augmentation significative des performances chez les souris âgées [$F_{(2,29)}$=3,89 ; p=0,032 ; placebo (*n=11*) : 54,54±5,5% ; 3 mg/kg (*n=9*) : 53,7±6% ; 10 mg/kg (*n=12*) : 70,84±3,6%], mais uniquement à la dose de 10 mg/kg (p=0,024 comparé au groupe placebo).

Ces deux substances de référence sont donc capables de supprimer les déficits observés chez les animaux âgés, mais non chez les animaux jeunes. Ces résultats sont en accord avec de nombreuses études qui ont montré une efficacité plus importante de ces molécules chez les sujets âgés (Grön et al., 2005 ; Kosasa et al., 1999 ; Lockrow et al., 2010 ; Martinez-Coria et al., 2010 ; Nyakas et al., 2010 ; Reus et al., 2008 ; Vandesquille et al., 2011b).

Afin de compléter l'étude pharmacologique, nous avons évalué deux molécules décrites comme n'induisant pas de modifications mnésiques directes : la venlafaxine, un inhibiteur de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline, et le flumazenil, un antagoniste des récepteurs aux benzodiazépines.

Ces deux molécules, testées chez les souris âgées de 18-19 mois, n'ont fait apparaître aucun effet significatif sur les performances ($F_{(2,24)}$=1,47 ; NS) (cf. *fig.3*), conformément à diverses études réalisées précédemment avec différents tests de mémoire (Krazem et al., 2001 ; de Oliveira et al., 2004 ; Dhir et Kulkarni, 2008 ; Belzung et al., 2000 ; Savic et al., 2005).

Etude des molécules issues de la recherche Servier

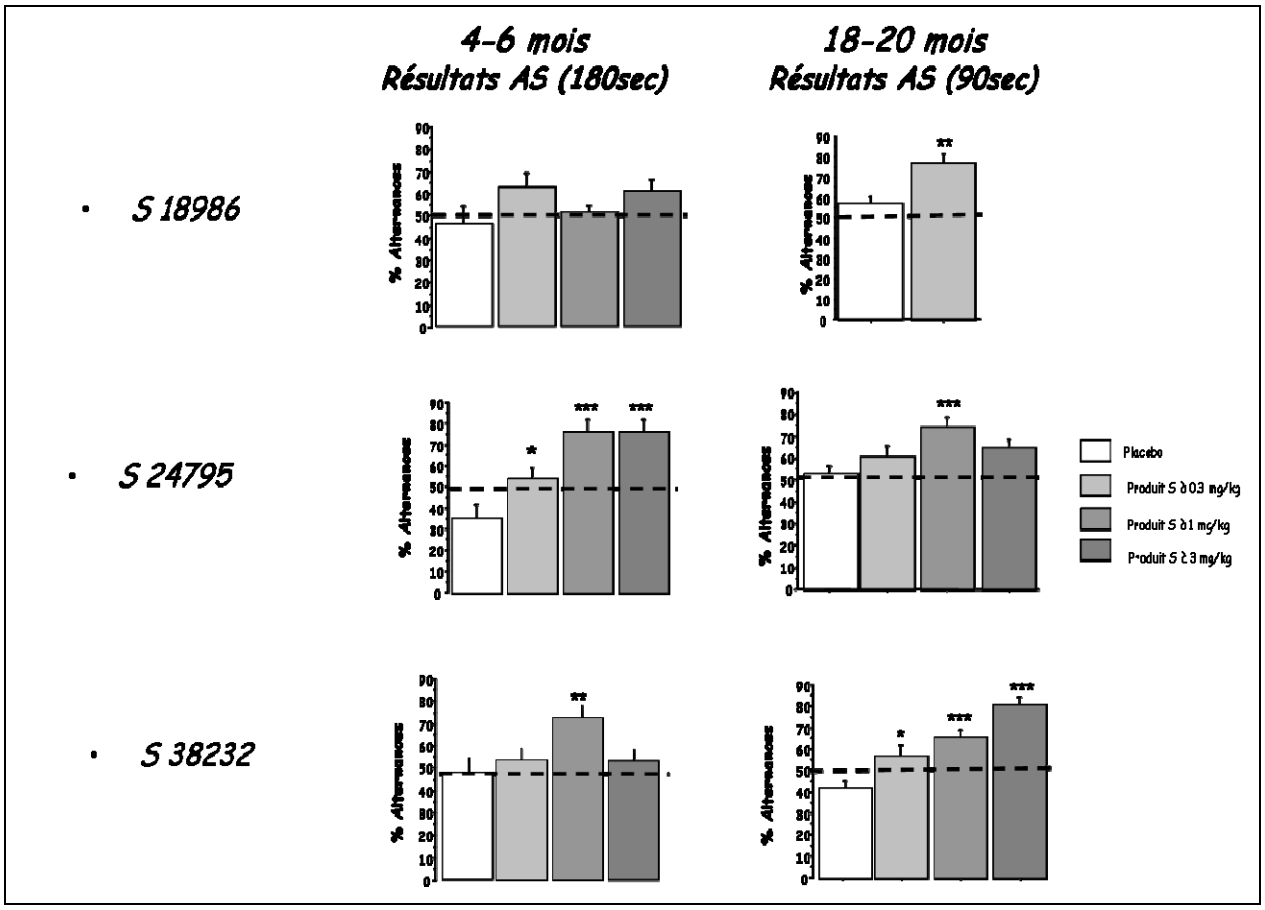


Figure 4 : Effet des molécules issues de la recherche Servier sur le modèle d'alternance spontanée chez des souris jeunes (4-5 mois) et âgées (18-19 mois). Ces substances ciblant les systèmes de neurotransmission glutamatergique (S 18986) ou cholinergique (S 24795 et S 38232), montrent des effets très différents selon la dose et l'âge étudiés.

Les trois molécules issues de la recherche Servier ont des profils d'activité très différents (cf. *fig. 4*) :

S 18986 :

Ce produit ne montre pas d'effet significatif chez les souris jeunes ($F_{(3,32)}$=1,6 ; NS), mais induit une amélioration des performances chez les animaux âgés à la dose de 0,1 mg/kg [$F_{(1,13)}$=12,434 ; p=0,004 ; Placebo (n=7): 57,16±3,37 ; 0,1 mg/kg (n=8): 77,09±4,38]. Deux doses inférieures (0,03 et 0,1 mg/kg) ont été également évaluées et sont présentées dans l'article (cf. *Annexe 1*). Outre un effet similaire sur les performances globales, on observe un effet promnésiant de ces deux doses sur le 3e bloc d'essais, c'est-à-dire celui ayant la plus forte charge mnésique.

S 24795 :

Chez les souris jeunes, on observe un effet promnésiant significatif aux trois doses étudiées [$F_{(3,32)}$=10,33 ; p<0,001 ; placebo (n=9) : 35,2±6,5% ; 0,3 mg/kg (n=9) : 53,7±5,4% ; 1 mg/kg (n=9) : 75,92±6,28% ; 3 mg/kg (n=9) : 75,92±6,28%], l'effet le plus significatif étant observé aux deux doses les plus importantes (p=0,4 ; p<0,001 ; p<0,001 ; respectivement pour 0,3 – 1 – 3 mg/kg). Chez les souris âgées, le traitement avec le S 24795 améliore les performances ($F_{(3,32)}$=4,67 ; p=0,008) alors que les souris placebos répondent au hasard [placebo (n=11): 53,03±3,04]. Plus précisément, les analyses montrent que seule la dose intermédiaire de 1mg/kg est efficace, même si une forte tendance apparaît dès la dose de 3 mg/kg [0,3 mg/kg (n=8): 60,41±5,39 ; 1 mg/kg (n=9): 74,08±4,89 ; 3 mg/kg (n=8): 64,6±3,77 ; comparaisons respectives au groupe placebo: p=0.22 ; p<0.001 ; p=0.06].

S 38232 :

Chez les souris jeunes, ce produit induit une augmentation significative des performances à la dose intermédiaire de 1 mg/kg uniquement [$F_{(3,44)}$=4,54 ; p=0,007 ; placebo (n=12) : 48,61±6,3% ; 0,3 mg/kg (n=12) : 54,17±5,48% ; 1 mg/kg (n=12) : 73,61±3,81% ; 3 mg/kg (n=12) : 54,17±4,64%] (comparaisons respectives avec les souris placebos : p=0,44 ; p=0,001 ; p=0,44).

Chez les sujets âgés, le S 38232 possède un effet significatif à toutes les doses étudiées ($F_{(3,44)}$=16,43 ; p<0,001). Alors que les souris placebos répondent au hasard (n=12 ; 41,6±3,2%), on observe un effet dose du S 38232, caractérisé par un effet promnésiant modéré à la dose la plus faible qui augmente progressivement aux doses plus importantes [0,3 mg/kg (n=12) : 56,9±4,7% ; p<0,05 ; 1 mg/kg (n=12) : 67,2±3,8% ; p<0,001 ; 3 mg/kg (n=12) : 80,5±4,0% ; p<0,001]. L'analyse par bloc d'essais fait apparaître une amélioration des performances par le S 38232 sur les deux derniers blocs d'essais (Blocs 2 et 3; p<0,008 and p<0,001 respectivement), alors que l'on n'observe pas de différence sur le 1er bloc (p>0,2). Le détail des analyses montrent que les deux doses les plus élevées de S 38232 améliorent les performances des souris lors du bloc 2 (70,8±11,4% et 75,0±7,5% pour 1 et 3 mg/kg respectivement) en comparaison des souris placebos (37,5±8,9% ; p<0,05 dans les deux comparaisons). Un effet plus important est observé lors du 3e bloc (70,8±9,6% et 91,6±5,6% pour 1 et 3 mg/kg respectivement) en comparaison des souris placebos (33,3±9,4% ; p<0,05 et p<0,01 respectivement). La dose la plus faible de S 38232 (0,3 mg/kg) n'a pas d'effet spécifique sur les performances d'AS lors de l'analyse par bloc (p>0,1 dans toutes les analyses).

IV. Discussion

Impact du vieillissement sur l'alternance spontanée

Cette première expérience a permis de montrer l'intérêt de l'alternance spontanée dans le labyrinthe en T pour l'étude de la mémoire de travail spatiale. En effet, les résultats font apparaître une diminution des performances en fonction de l'augmentation de l'IEE, ce qui constitue un trait majeur de la mémoire de travail (Livesay et Livesay, 1981 ; Beracochea et Jaffard, 1995 ; Ragozzino et al., 1999). De plus, la diminution des performances sur les derniers essais (cf. article en *Annexe 1*) indique une sensibilité aux interférences proactives, autre caractéristique de la mémoire de travail (Granon et al., 1994 ; Kane et Engle, 2002 ; Konishi et al., 2010). Ainsi nos résultats montrent que l'AS dépend de la capacité des animaux à se souvenir d'une information dans le temps, mais également de la capacité à sélectionner l'information appropriée pour l'essai en cours, et de ce fait à supprimer les informations interférentes non pertinentes.

Le vieillissement induit une vulnérabilité accrue à l'effet délétère de l'augmentation du délai. Ceci se caractérise par la diminution des performances dès 90 sec pour les souris de 18-19 mois et dès 30 sec pour celles de 23-24 mois. L'analyse par bloc d'essais montre une augmentation de la sensibilité aux interférences chez les souris âgées. Nos résultats indiquent donc que l'âge provoque une dégradation de la mémoire de travail, caractérisée dans notre modèle par une vulnérabilité accrue à l'effet délétère du délai et des interférences. Nos données sont en accord avec diverses études de la mémoire de travail chez l'Homme (i.e. *n-back task*, test de reconnaissance faciale, ou *delayed matching to sample task*) montrant que les sujets âgés présentent une diminution du rappel de l'information pertinente, au profit d'une augmentation du rappel automatique de l'information interférente (Gazzaley et al., 2005 ; Hogge et al., 2008).

Validité pharmacologique du modèle

Ce modèle d'étude de la mémoire de travail, et le fait qu'une altération de ce processus est observée avec l'âge, permet la réalisation d'études pharmacologiques afin de développer de nouvelles molécules à potentiel promnésiant.

Afin de pouvoir étudier les mécanismes d'action de diverses molécules, nous avons dans un premier temps évalué les substances procognitives de référence également utilisées dans le traitement de la maladie d'Alzheimer : le donepezil, inhibiteur de l'acétylcholinestérase, et la mémantine, antagoniste des récepteurs glutamatergiques de type NMDA. Nos résultats sont en accord avec la majorité des données de la littérature montrant que ces deux substances sont principalement actives lors de déficits cognitifs liés à l'âge ou induits pharmacologiquement (Grön et al., 2005 ; Kosasa et al., 1999 ; Lockrow et al., 2010 ; Martinez-Coria et al., 2010 ; Nyakas et al., 2010 ; Reus et al., 2008 ; Vandesquille et al., 2011b).

Afin de vérifier la spécificité du test d'AS à révéler uniquement les effets promnésiants des substances, nous avons évalué deux molécules connues comme n'induisant pas d'effet promnésiant : la venlafaxine, antidépresseur utilisé en clinique agissant en inhibant la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline, et le flumazenil, antagonistes des sites de liaison des benzodiazépines. En accord avec les données de la littérature, ces deux molécules n'induisent pas d'augmentation significative des performances dans différents tests de mémoire chez les rongeurs (Krazem et al., 2001 ; de Oliveira et al., 2004 ; Dhir et Kulkarni, 2008 ; Belzung et al., 2000 ; Savic et al., 2005).

Potentiel promnésiant des molécules étudiées

Au regard des différents résultats pharmacologiques, il apparaît que chacune des substances que nous avons étudiée possède un effet promnésiant dans notre test, effet qui se manifeste de manière différente selon l'âge et la dose étudiée. Ceci traduit probablement une implication de nombreux systèmes de neurotransmission dans les tâches de mémoire de travail. Ainsi, les molécules que nous avons utilisées appartiennent à deux grandes classes pharmacologiques :

- les molécules ciblant le système glutamatergique (mémantine, S 18986)
- celles ciblant le système cholinergique (donepezil, S 24795, S 38232)

Ces deux systèmes sont altérés lors du vieillissement et dès les premiers stades de la maladie d'Alzheimer (Bartus et al., 1982 ; Francis et al., 1993).

Hypothèse glutamatergique

En considérant le rôle central du glutamate dans les processus de plasticité liés à la mémoire, il a été proposé qu'une altération de la neurotransmission glutamatergique serait responsable des déficits observés lors du vieillissement ou de la MA, notamment par les phénomènes d'excitotoxicité qui pourraient provoquer la dégénérescence neuronale (Obrenovitch et Urenjak, 1997 ; Segovia et al., 2001). Une corrélation entre le degré de démence et le taux de neurodégénérescence des neurones glutamatergiques a également été rapportée (Chalmers et al., 1990). De plus, des études chez l'animal âgé révèlent une diminution de la potentialisation à long terme (PLT) résultant de l'atteinte du système glutamatergique (Barnes, 1979 ; Barnes et McNaughton, 1985 ; Geinisman et al., 1995 ; Norris et al., 1996 ; Foster, 1999) (cf. *Bases théoriques III.B.3*).

Au regard de l'atteinte glutamatergique, des molécules ayant pour objectif de restaurer la transmission glutamatergique ont été développées afin de contrer les effets délétères du vieillissement. La mémantine est la première et seule molécule fonctionnant sur ce principe à être commercialisée dans le traitement des formes modérées à sévères de la maladie d'Alzheimer (Parsons et al., 2007). Son mode d'action peut paraître contradictoire puisque la molécule agit par blocage des récepteurs NMDA. Cependant ses caractéristiques d'antagoniste non compétitif voltage-dépendant lui permettent d'empêcher l'activation résiduelle de ces récepteurs et de faciliter leurs activations physiologiques (Danysz et al., 2000; Danysz et Parsons, 2003). Chez l'animal, la mémantine présente un potentiel promnésiant dans de nombreux tests de mémoire de travail ou de mémoire déclarative (Parsons et al., 2007).

Nos résultats concordent avec les données de la littérature décrivant la mémantine comme principalement active chez les sujets âgés (Lockrow et al., 2010 ; Martinez-Coria et al., 2010 ; Nyakas et al., 2010 ; Reus et al., 2008). La dose efficace de 10 mg/kg peut sembler importante compte tenu des effets secondaires connus de ce produit à forte dose (Reus et al., 2008 ; Kos et Popik, 2005 ; Zoladz et al., 2006), mais les différences entre les espèces (rat/souris) et l'absence de privation dans notre procédure peuvent expliquer que nous n'observions pas d'altération comportementale. De plus, plusieurs études récentes utilisant des doses élevées de memantine de façon chronique ont montré une absence d'effets secondaires prononcés (Lockrow et al., 2010 ; Martinez-Coria et al., 2010 ; Nyakas et al., 2010). Outre son effet pro-cognitif, la mémantine possèderait un effet neuroprotecteur (Parsons et al., 2007). Chez l'Homme une étude récente démontre que la mémantine permet

d'améliorer les activités quotidiennes, et de diminuer les comportements agités et agressifs des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (pour revue Francis et al., 2010).

Les modulateurs positifs des récepteurs AMPA tel que le S 18986, par leur interaction sur un site allostérique du récepteur AMPA, agissent en stabilisant ce récepteur dans un état ouvert suite à la fixation du glutamate (Black, 2005). Ceci prolonge le courant induit à travers le récepteur canal augmentant ainsi la transmission synaptique (Granger et al., 1993), tout en évitant les effets excitotoxiques d'une activation directe et prolongée du récepteur NMDA (Yamada, 2000) impliqué dans la neurodégénérescence observée lors du vieillissement (Francis et al., 1993). Compte tenu de ce mécanisme d'action, il a été montré que le S 18986 induisait une augmentation de la PLT hippocampique (Pirotte et al., 1998) permettant de restaurer la plasticité synaptique nécessaire aux fonctions cognitives et mnésiques (Robbins et Murphy, 2006). Ainsi, le S 18986 est pourvu d'un potentiel procognitif chez des souris de 14-15 mois (Beracochea et al., 2007) et dans plusieurs tests chez le rat âgé (Rosi et al., 2004; Bloss et al., 2008).

Dans notre étude, le S 18986 ne présente pas d'effet chez les souris jeunes, ce qui confirme la majorité des observations décrivant les modulateurs des récepteurs AMPA comme majoritairement actifs chez l'animal âgé ou lors de traitements pharmacologiques délétères (Bernard et al., 2010). Chez les souris âgées, le S 18986 possède un effet promnésiant caractérisé par une amélioration des performances sur le dernier bloc d'essais. Ceci montre que le S 18986 permet de pallier le déficit de mémoire de travail lié à l'âge en diminuant l'effet délétère des interférences proactives, par un processus de suppression des informations non pertinentes. Cet effet a été principalement observé sur les doses les plus faibles du produit (cf. *Annexe 1*), et confirme d'autres études montrant l'action à faible dose de ce modulateur AMPA (Marighetto et al., 2008b ; Kelly et al., 2009).

D'un point de vue neurofonctionnel, les effets promnésiants du S 18986 et de la mémantine dans l'alternance séquentielle pourraient s'expliquer par une amélioration des fonctions hippocampiques, étant donné l'implication de l'hippocampe dans de nombreux tests de mémoire de travail (Wan et al., 1994 ; Braun et al., 2010 ; van Vugt et al., 2010 ; Hyman et al., 2010). De plus, ces deux molécules ont été décrites comme augmentant l'activité cholinergique hippocampique (Lockhart et al., 2000 ; Rosi et al., 2004 ; Drever et al., 2007), activité impliquée dans le comportement d'alternance spontanée (Degroot et Parent, 2000 ; Lalonde, 2002), et sous tendant de nombreux processus cognitifs.

Hypothèse cholinergique

Cette hypothèse constitue l'une des pistes les plus étudiées dans le développement pharmacologique de substances pro-cognitives pour les sujets atteints de la maladie d'Alzheimer (voir revue Pepeu et Giovannini, 2010). En effet, il a été montré que de nombreux symptômes observés dans la maladie d'Alzheimer peuvent être reliés à la diminution de la synthèse et de la recapture de l'acétylcholine (Coyle et al., 1983 ; Bartus et al., 1982), ainsi qu'à la neurodégénérescence des neurones cholinergiques du noyau basal de Meynert (Francis et al., 1993). De plus, on note une altération spécifique des marqueurs cholinergiques (tel que la choline acetyltransférase) dans le cerveau de sujets souffrant de perte de mémoire liée au vieillissement (Bowen et al., 1976 ; Whitehouse et al., 1982 ; Gill et al., 2007). Dans ce contexte, les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase ont été les premières molécules développées. En inhibant l'enzyme de dégradation de l'acétylcholine, ils permettent l'augmentation de sa concentration dans la fente synaptique, prolongeant ainsi l'activation des récepteurs cholinergiques, connus pour leur rôle fondamental dans de nombreux processus mnésiques et attentionnels (Seltzer, 2007). L'un des chefs de file de ces molécules est le donepezil, pourvu d'un potentiel promnésiant aussi bien chez l'Homme que l'animal (Pepeu et Giovannini, 2009, 2010). Dans notre étude, le donepezil est capable de supprimer le déficit observé chez les souris âgées. L'effet facilitateur sur la mémoire pourrait résulter d'une augmentation de la transmission cholinergique au niveau de l'hippocampe ou du cortex préfrontal, deux structures essentielles dans l'AS (Lalonde, 2002).

Les deux molécules issues de la recherche Servier ciblent quant à elles spécifiquement les récepteurs cholinergiques de type nicotinique. Parmi ces récepteurs, les récepteurs α4β2 et α7 constituent respectivement environ 85 et 10% du total des récepteurs nicotiniques dans le cerveau (Francis, 2003), et sont impliqués dans divers processus mnésiques (pour revue Gotti et al., 2006). De plus, des études ont montré une diminution de l'expression des récepteurs nicotiniques dans l'hippocampe et le cortex préfrontal des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Sabri et al., 2008 ; London et al., 1989 ; Schroder et al., 1991). Plus récemment Kendziorra et son équipe ont montré que la diminution du nombre de récepteurs α4β2 dans le cerveau de patients MCI (« mild cognitive impairment ») pouvait prédire le développement vers la maladie d'Alzheimer (Kendziorra et al., 2011). Chez l'animal, il a été montré que l'injection intra-hippocampique de mécamylamine, antagoniste nicotinique non spécifique, provoquait un déficit lors d'épreuves de mémoire de travail (Levin et al., 2002; Levin et

Rezvani, 2002 ; Ohno et al., 1993). Plus spécifiquement, l'injection intra-hippocampique d'antagonistes des récepteurs α4β2 (DHβE : dihydro-β-erythrodine) ou α7 (MLA : methyllycaconitine) provoquent également des déficits dans différentes tâches mnésiques (Bancroft et Levin, 2000 ; Bettany et Levin, 2001 ; Levin et al., 2002 ; Nott et Levin, 2006). L'injection de ces antagonistes dans le cortex frontal médian provoque des déficits de mémoire de travail (Chan et al., 2007 ; Granon et al., 1995). En regard de ces études, ces deux types de récepteurs nicotiniques présentent un intérêt pharmacologique certain.

Dans notre étude, le S 24795 est pourvu d'un effet promnésiant particulièrement important chez les souris jeunes, alors qu'il n'est actif qu'à la dose intermédiaire chez les souris âgées. Le S 24795 cible spécifiquement le récepteur homomérique α7. Les agonistes α7 améliorent les performances cognitives dans plusieurs tests de mémoire chez le rongeur jeune et âgé (Arendash et al., 1995 ; Meyer et al., 1998 ; Kem, 2000 ; Van Kampen et al., 2004 ; Boess et al., 2007 ; Beracochea et al., 2008 ; Marighetto et al., 2008a), le singe (Buccafusco et al., 2007), et également chez l'Homme (Olincy et al., 2006) (patients atteints de schizophrénie, maladie provoquant des déficits de mémoire de travail). Compte tenu de son expression importante dans l'hippocampe et sa haute perméabilité calcique (Seguela et al., 1993), ce récepteur α7 permet, au niveau présynaptique, d'augmenter l'activité glutamatergique (Alkondon et al., 2003 ; Aramakis et Metherate, 1998 ; Gray et al., 1996 ; Radcliffe et Dani, 1998 ; Yamamoto et al., 2005), noradrénergique (Barik et Wonnacott, 2006 ; Li et al., 1998) ainsi que GABAergique (Alkondon et Albuquerque, 2001; Alkondon et al., 1999 ; Kanno et al., 2005). De plus, Sarter et son équipe ont bien établi que ce récepteur influençait directement la durée des courants transitoires glutamatergiques et cholinergiques sans affecter leurs amplitudes (Sarter et al., 2009 ; Parikh et al., 2010), ce qui provoque par effet calcium-dépendant le relargage de neurotransmetteurs, ainsi que les cascades de transduction (Fayuk et Yakel, 2007 ; Gilbert et al., 2009). Néanmoins, l'augmentation de la durée des courants transitoires va à l'encontre de la nécessité de courants précis pour la détection d'indices. Le mécanisme expliquant l'effet des agonistes α7 dans l'augmentation des performances attentionnelles reste encore mal compris (Grottick et Higgins, 2000 ; Hahn et al., 2003 ; Hoyle et al., 2006 ;Young et al., 2007).

Chez l'animal ainsi que chez l'Homme, l'administration d'agonistes α4β2 améliore les performances dans des tests cognitifs dépendant de l'attention (Buccafusco et al., 1995; McGaughy et al., 1999 ; Potter et al., 1999 ; Wilens et al., 1999, 2006; Hahn et al., 2003 ;

Dunbar et al., 2007 ; Wilens et Decker, 2007). Dans ce cadre, le S 38232 améliore les performances de rats testés dans une tâche d'attention soutenue (Howe et al., 2010). Cette amélioration semble attribuable à une modulation positive de l'amplitude de courants cholinergiques transitoires dans le cortex préfrontal, sans modification de leurs durées. Ces courants transitoires plus précis permettraient l'amélioration de la détection d'indices reliés aux processus attentionnels sous-tendant la mémoire de travail (Howe et al., 2010 ; Parikh et al., 2010 ; Sarter et al., 2009). Etant donné l'implication du cortex préfrontal dans l'AS, nous pouvons supposer que l'action promnésiante du S 38232 repose en partie sur ce mécanisme d'amélioration du caractère transitoire des courants cholinergiques. Les diminutions des afférences cholinergiques et de la quantité de récepteurs nicotiniques dans le cortex préfrontal et l'hippocampe lors du vieillissement pourraient entraîner une perturbation de ces courants transitoires. Ainsi l'effet plus important du S 38232 chez les souris âgées pourrait s'expliquer par l'amélioration de la définition de ces courants transitoires dégradés par l'âge.

V. Conclusion

Le modèle d'alternance séquentielle spontanée apparaît comme un test adapté à l'étude de l'altération de la mémoire de travail lors du vieillissement. A partir de cette constatation, nous avons voulu comprendre les mécanismes cérébraux impliqués dans les effets du vieillissement sur la mémoire de travail, par une approche neurofonctionnelle.

Compte tenu de nos résultats pharmacologiques, le donepezil, inhibiteur de l'acétylcholinestérase, et le S 38232, par son action agoniste des récepteurs cholinergiques α4β2, apparaissent comme les molécules ayant le plus fort potentiel promnésiant chez les souris âgées. Nous avons de ce fait décidé d'entreprendre une étude neurofonctionnelle permettant de déterminer certains mécanismes neurobiologiques sous-tendant l'effet promnésiant de ces deux composés, ciblant le système cholinergique.

Chapitre 2

Chapitre 2

Etude neurofonctionnelle de l'altération de la mémoire de travail lors du vieillissement : implication du système cholinergique.

I. INTRODUCTION 117

II. MÉTHODOLOGIE 120

Expérience 1 120

Expérience 2 121

Expérience 3 121

III. RÉSULTATS 123

Expérience 1 : étude immunohistochimique 123

Résultats comportementaux 123

Résultats immunohistochimiques 124

Expérience 2 : action de composés promnésiants sur le profil d'activation des structures recrutées dans l'AS 128

Analyses des données obtenues après traitement avec le donepezil 129

Analyses des données obtenues après traitement avec le S 38232 129

Expérience 3 : injection au sein du PL de molécules modifiant son niveau d'activation neuronale 131

Inhibition du cortex prélimbique chez des souris jeunes 131

Inhibition spécifique de la protéine kinase A dans le cortex prélimbique de souris âgées 131

IV. DISCUSSION *133*

Expérience 1 : données immunohistochimiques **133**

Expérience 2 : action de composés promnésiants sur le profil d'activation des structures recrutées dans l'AS **136**

Expérience 3 : injection au sein du PL de molécules modifiant le niveau d'activation neuronale **139**

CONCLUSION *141*

I. Introduction

Le chapitre 1 a mis en évidence une diminution des performances d'alternance spontanée délai dépendante, ainsi qu'une sensibilité aux interférences proactives exacerbée chez les souris âgées. Ces données sont en accord avec l'augmentation de la sensibilité aux interférences observée lors du vieillissement chez l'Homme (Gazzaley et al., 2005 ; Emery et al., 2008 ; Hogge et al., 2008 ; May et al., 1999). Concrètement, dans le test d'AS, l'augmentation de l'intervalle entre essais (IEE) provoque une diminution des performances plus rapide chez les souris âgées qui répondent au niveau du hasard dès un IEE de 90 sec, alors qu'un IEE de 180 sec est nécessaire afin d'entraîner un déficit d'alternance comparable chez les souris jeunes.

Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans le déficit de MDT lié au vieillissement, dans une première expérience, nous avons étudié les profils d'activation neuronale lors du test d'AS effectué avec un délai induisant un déficit spécifiquement chez les souris âgées (IEE = 90 sec). Les différentes structures étudiées ont été choisies en fonction de leur implication potentielle dans la réalisation de la tâche d'alternance spontanée:

- L'hippocampe dorsal (***CA1***) : ses nombreuses fonctions dans la mémoire à long terme, le repérage spatial, la mise en relation d'information et la MDT, en font une des structures potentiellement mise en jeu dans l'AS (cf. *Bases théoriques I.C.2*).
- Le cortex préfrontal, et plus précisément le cortex prélimbique (***PL***): structure essentielle à la MDT, le CPF est impliqué dans l'attention, le maintien et la manipulation d'informations pertinentes, ainsi que la suppression des informations interférentes (cf. *Bases théoriques II.B.3*).
- Le striatum (***St***): nous avons voulu vérifier si cette structure intervenait dans l'AS en raison de son implication dans les processus procéduraux (cf. *Bases théoriques I.C.2*).
- Le noyau basolatéral de l'amygdale (***BLA***): connue pour son rôle dans les relations « émotions-mémoire », l'amygdale pourrait moduler les processus cognitifs, notamment lors du vieillissement qui affecte la réactivité émotionnelle des animaux (Tronche et al., 2010 ; Phelps et LeDoux, 2005).

Nous avons vu précédemment que les cascades moléculaires intracellulaires sont des processus essentiels à la mémoire (cf. *Bases théoriques II.D*), et que leur altération pouvait être à l'origine des déficits de mémoire de travail lors du vieillissement (cf. *Bases thérориques III.B.1*). Parmi les éléments composant ces cascades moléculaires, la protéine ***CREB*** (**c**AMP **R**esponse **E**lement **B**inding) apparaît comme une cible précoce des kinases et des phosphatases. CREB est un facteur de transcription exprimé de façon ubiquitaire dans le cerveau. La phosphorylation de son résidu Ser^{133} par les kinases induit le recrutement de son co-activateur CBP (**C**REB **B**inding **P**rotein). La formation de ce complexe permet de stimuler la transcription de gènes précoces tels que c-fos et zif268 (Mayr et Montminy, 2001). Ce résidu Ser^{133} est également la cible des phosphatases qui inhibent l'activité de CREB par déphosphorylation (pour revue voir Carlezon et al., 2005). Ce facteur de transcription apparaît donc comme le point de convergence de multiples voies de signalisation Ca^{2+} et AMPc dépendantes (Izquierdo et Medina, 1997 ; Roberson et al., 1999 ; Josselyn et Nguyen, 2005) dont les niveaux d'activité (balance kinases/phosphatases) régissent de manière extrêmement fine la réponse cellulaire de synthèse protéique. La convergence des signaux vers l'activation nucléaire de CREB fait alors de ce facteur un parfait représentant de l'activité neuronale.

De nombreuses études ont montré l'importance de la phosphorylation de CREB dans la mémoire. Ainsi, son augmentation dans l'hippocampe est liée à une amélioration des performances en mémoire à long terme (Kida et al., 2002 ; Martel et al., 2006 ; Porte et al., 2008b), alors que sa diminution provoque des déficits dans ces mêmes tests (Guzowski et McGaugh, 1997 ; Bernabeu et al., 1997 ; Barad et al., 1998). A l'inverse, dans des tâches de mémoire de travail recrutant le cortex préfrontal, l'augmentation de la phosphorylation de CREB au sein de cette structure serait délétère, alors que son inhibition améliore les performances, notamment chez des animaux âgés (Taylor et al., 1999 ; Ramos et al., 2003 ; Runyan et Dash, 2005).

Ces considérations nous ont conduit à réaliser une ***étude immunohistochimique*** en utilisant la protéine CREB, et plus particulièrement son état de phosphorylation sur la Ser^{133} (***pCREB***), comme marqueur de l'activité neuronale au sein des structures décrites précédemment. Nous avons réalisé une ***étude cinétique de l'activation de la protéine CREB*** dans les principales structures étudiées afin de définir le délai révélant le plus précisément l'activation neuronale au sein de ces structures.

Dans une seconde expérience, nous avons étudié l'***action de composés promnésiants sur le profil d'activation des structures recrutées dans l'alternance séquentielle***. En raison de l'implication essentielle du système cholinergique dans la MDT (cf. *Bases théoriques III.B.2*), et compte tenu des données pharmacologiques observées (cf. *Chapitre 1*) notre choix s'est porté sur le ***donepezil*** (inhibiteur de l'acetylcholinesterase et substance de référence dans le traitement de la maladie d'Alzheimer), ainsi que le ***S 38232*** (agoniste des récepteurs nicotiniques α4β2).

Ces deux premières expériences ont mis en évidence le rôle essentiel du cortex préfrontal, et plus précisément du cortex prélimbique (PL) dans le test d'alternance spontanée, et les déficits induits par le vieillissement.

Dans une troisième expérience, nous avons alors vérifié de manière mécanistique directe l'implication de cette structure dans l'épreuve d'AS, par l'***injection au sein du cortex PL de molécules modifiant son niveau d'activation neuronale,*** tant chez les souris jeunes adultes que chez les souris âgées.

II. Méthodologie

Nous ne ferons ici qu'un rappel succinct de la méthodologie utilisée afin de la replacer dans le contexte de nos expériences. L'ensemble des procédures est décrit en détail dans la partie Matériels et Méthodes de ce manuscrit (cf. *Matériels et Méthodes I.B à II.C*).

Expérience 1

Les animaux ont été évalués dans la tâche d'***AS en labyrinthe en T*** avec un intervalle entre essais de 90 sec (***IEE = 90 sec***). Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les souris âgées (18-19 mois) présentent à ce délai un déficit d'alternance spontanée. Le choix de ce délai nous permet donc de comparer le profil d'activation cérébrale des souris âgées placées en condition d'altération de la MDT par rapport à celui de souris jeunes (4-5 mois) réussissant la tâche.

Afin d'étudier les profils d'activation cérébrale, nous avons procédé au ***marquage immunohistochimique*** de la protéine CREB. Nous avons utilisé des anticorps dirigés contre la forme totale (***tCREB***) ou phosphorylée (***pCREB***) de cette protéine, afin d'évaluer les variations de la quantité totale de CREB, ainsi que de sa forme activée. L'immunoréactivité des anticorps (tCREB-ir ou pCREB-ir) est représentée en fonction du nombre moyen de noyaux marqués par mm^2 dans chaque structure.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une étude cinétique de la protéine CREB totale ou phosphorylée. Pour cela, les animaux ont été sacrifiés 30 minutes, 1 heure et 1 heure 30 après le début de l'épreuve comportementale. En plus de ces trois groupes, un groupe « naïf » (animaux uniquement isolés) et un groupe « cage » (soumis aux deux habituations ainsi qu'à la session prétest) ont été rajoutés afin de définir un seuil basal d'immunoréactivité. Suite aux sacrifices, les cerveaux ont été prélevés puis congelés, avant d'être coupés au microtome à congélation. Les coupes ont ensuite été soumises à la procédure d'immunomarquage avec un anticorps dirigés contre la protéine pCREB ou tCREB. La quantification du marquage est effectuée dans les différentes structures d'intérêt à l'aide d'un système d'imagerie semi-automatisé.

L'analyse statistique des données comportementales a été effectuée par une ANOVA à un facteur suivie d'un test post-hoc adapté afin de comparer les performances à 90 sec entre souris jeunes et âgées. Les résultats immunohistochimiques ont été analysés par une ANOVA à un ou plusieurs facteurs (âge, délai de perfusion, …), suivie du test post-hoc adéquat.

Expérience 2

Les substances pharmacologiques ont été injectées 30 minutes avant l'épreuve d'AS. Celle-ci a été réalisée avec des souris âgées (18-19 mois) testées avec un IEE de 90 sec. Les doses étudiées pour la réalisation de l'***immunohistochimie lors de l'experience 2 (pharmacologie)*** ont été choisies en fonction des résultats obtenus dans le chapitre 1. Ainsi, la dose de 1 mg/kg à été retenue pour le ***donepezil*** comme pour le ***S 38232*** afin de pouvoir comparer ces deux composés avec une dose produisant un effet promnésiant comparable chez les souris âgées (environ 70% d'AS pour les deux groupes d'âge ; cf. *Chapitre 1*). Les animaux contrôles ont reçu le solvant des produits pharmacologiques (NaCl 0.9%, groupe Placebo).

Compte tenu des résultats obtenus dans l'expérience 1, le délai de 30 minutes a été conservé pour le sacrifice des animaux en vue de l'immunohistochimie. De même, l'absence de différence entre les animaux des groupes « naïf » et « cage » nous a amené à les regrouper au sein d'un même groupe contrôle. La quantification a été réalisée dans le PL et le CA1 uniquement, puisqu'il s'agit des deux structures dont l'immunomarquage est modifié dans l'expérience 1.

L'analyse des résultats a été effectué par une ANOVA à un ou plusieurs facteurs (âge, structure, …), suivi du test post-hoc adéquat permettant la comparaison entre les différents groupes.

Expérience 3

Afin de modifier directement le niveau d'activation du cortex PL lors de l'épreuve comportementale, les animaux ont été soumis à l'implantation chirurgicale de guides canule dans cette structure en vue de l'***injection intra-PL de molécules modifiant son niveau***

d'activité. La chirurgie stéréotaxique a été réalisée deux semaines avant le début de la procédure comportementale. Lors de la session prétest, les animaux ont été soumis aux protocoles d'injection (implantation des canules) sans que l'injection soit réalisée afin de les habituer aux procédures d'injection et à la manipulation afférente. Le jour du test, les animaux reçoivent l'injection intra-PL avant la réalisation de la tâche comportementale d'AS avec un IEE de 90 sec. Les ***souris jeunes*** sont injectées avec de la ***lidocaine*** (inhibiteur spécifique des canaux sodiques voltage-dépendants ; à 0.05 mg/kg) afin de vérifier les effets de l'inactivation du PL. Les ***souris âgées*** reçoivent une injection de ***Rp-cAMPS*** (inhibiteur spécifique de la protéine kinase A ; à 0.6 mg/kg), afin d'observer les effets de l'inactivation de la voie PKA dans le PL, et la diminution d'activation de CREB consécutive. Les souris contrôles ont été injectées avec du liquide céphalo-rachidien (LCR) utilisé comme solvant des deux composés.

Les résultats comportementaux ont été analysés par un test t de Student afin de comparer les performances des animaux contrôles avec ceux ayant reçu les molécules d'intérêt.

III. Résultats

Expérience 1 : étude immunohistochimique

Résultats comportementaux

Les données comportementales obtenues lors de la réalisation de l'AS avec un IEE de 90 sec montrent que les performances sont comparables pour les groupes affectés aux trois délais étudiés dans notre étude de cinétique (30 min, 1h et 1h30), et que l'âge induit un déficit d'alternance spontanée (cf. *fig. 1*). En effet, les ANOVAs ne révèlent aucun effet du délai de perfusions ($F_{(2,46)}$=2,095 ; p=0,13), alors qu'une différence très significative est observée avec l'âge ($F_{(1,46)}$=23,479 ; p<0,001). L'interaction entre le délai de perfusion et l'âge ne révèle aucune différence statistique ($F_{(2,46)}$=0,99 ; p=0,9). Les analyses post-hoc effectuées sur l'effet de l'âge montrent que pour chaque délai de perfusion, les souris âgées présentent un taux d'alternance inférieur aux souris jeunes [comparaison jeune/âgé : 75,9% (*n=9*) vs 55,5% (*n=9*), p=0,03 ; 81,2% (*n=8*) vs 62,9% (*n=9*), p=0,009 ; 72,9% (*n=8*) vs 50% (*n=9*), p=0,003 ; respectivement pour les groupes 30 min, 1h et 1h30].

Le vieillissement augmente significativement la latence de choix [$F_{(1,46)}$=13,64 ; p<0,001 ; 14,69±1,1 sec, (*n=25*) vs 20,99±1,35 sec, (*n=27*)]. On observe aucun effet du délai de perfusion ($F_{(2,46)}$=1,265 ; p=0,29) et l'interaction « âge » x « délais » n'est pas significative ($F_{(2,46)}$=2,412 ; p>0,1). Cette analyse confirme les données obtenues précédemment, les souris âgées présentant une latence de choix plus élevée.

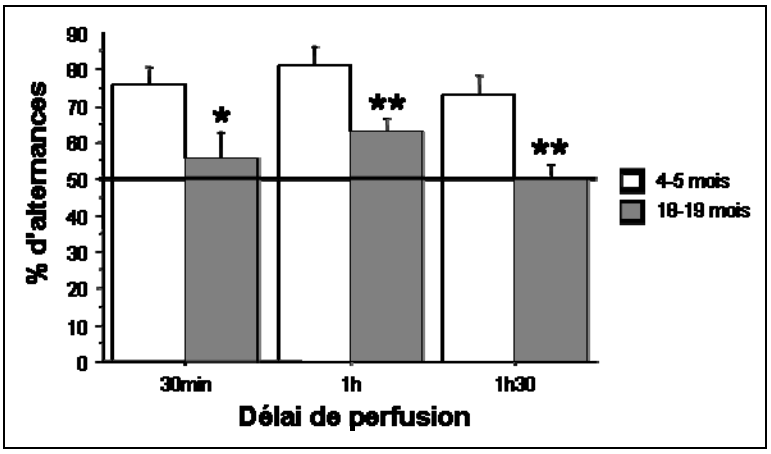


*Figure 1 : Comparaison des performances d'AS entre les différents délais de perfusions (IEE=90sec). Les trois groupes ne présentent pas de différences significatives. Dans chaque groupe, les souris âgées (n= 9 par groupe) ont des performances significativement inférieures à celles des souris jeunes (n= 9, 8 et 8 respectivement pour les groupes 30 min, 1h et 1h30). * : p<0.05 ; ** : p<0.01.*

Résultats immunohistochimiques

Les données comportementales étant comparables entre chaque groupe nous avons souhaité renforcer la validité du choix de la protéine CREB phosphorylée (pCREB) en tant que marqueur d'activité cérébrale. Pour cela, nous avons quantifié dans un premier temps l'immunoréactivité de la protéine CREB totale (tCREB) afin de vérifier si sa quantité était modifiée par le délai de perfusion ou l'âge. Nos résultats montrent que, quelque soient la structure étudiée, l'âge ou le délai de perfusion ne modifie pas la quantité totale de protéine CREB (NS dans toutes les analyses ; cf. *Annexe 2*) (cf. *fig. 2*).

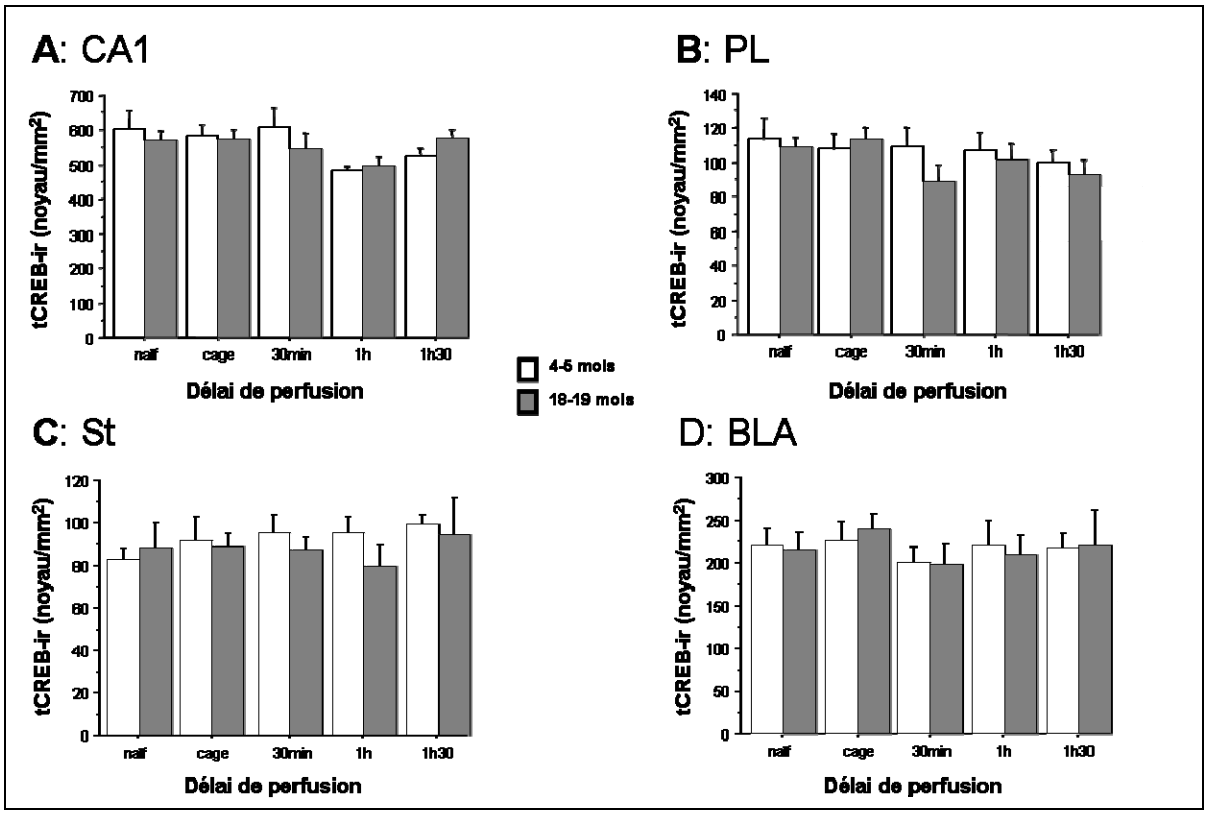


Figure 2 : Etude cinétique de l'immunoréactivité tCREB entre souris jeunes et âgées. Les résultats montrent que la quantité totale de la protéine CREB n'est modifiée ni par le délai de perfusion, ni par l'âge. A : données dans le CA1 hippocampique. B : données dans le cortex prélimbique (PL). C : données dans le striatum. D : données dans le noyau baso latéral de l'amygdale.

La quantité de protéine CREB (tCREB) n'étant pas modifiée par l'âge ou le délai de perfusion dans les différentes structures d'intérêts, nous avons analysé sa cinétique d'activation par immunomarquage de sa phosphorylation (pCREB). Dans cette expérience, les comparaisons entre les délais de perfusion sont réalisées par rapport au groupe « naïf ».

Dans un premier temps, nous avons comparé nos animaux « naïfs » et « cages » entre eux afin de définir si la procédure comportementale précédant le jour test (habituations et prétest) induisait une modification de la phosphorylation de CREB. Les comparaisons des deux groupes ne montrent aucune différence significative quelque soit l'âge ou la structure étudiée (cf. *Annexe 3*). On peut donc considérer que la procédure comportementale précédant le jour test n'induit pas de modification de pCREB, ce qui nous a permis de grouper les animaux « naif » et « cage » au sein d'un même groupe contrôle afin d'établir la cinétique d'activation de pCREB.

Les données obtenues dans le CA1 montrent que dans cette structure, seul le délai de perfusion modifie significativement l'immunoréactivité pCREB (cf. *fig. 3.A*). Les ANOVAs révèlent en effet une différence significative entre les délais de perfusion ($F_{(3,66)}$=15,09 ; p<0,001), alors que l'on n'observe pas de différence significative avec le facteur âge ($F_{(1,65)}$=0,2 ; p=0,65). L'interaction « *délai de perfusion* » / « *âge* » n'est pas significative également ($F_{(3,66)}$=0,2 ; p=0,89). L'immunoréactivité pCREB dans le CA1 au délai de 30 min (327,1±28,17 ; *n=18* ; p<0,001) et 1h30 (203,4±38,94 ; *n=17* ; p=0,025) est plus élevée que chez les animaux contrôles (121,8±13,15 *; n=22*), alors que l'on n'observe pas de modifications pour les animaux du groupe 1h (113,6±15,77 ; *n=17* ; p=0,82).

Dans le cortex PL, on note une modification de l'immunoréactivité due au délai de perfusion ainsi qu'à l'âge (cf. *fig. 3.B*). Les analyses montrent un effet significatif du délai de perfusion ($F_{(3,66)}$=8,23 ; p<0,001), un effet significatif de l'âge ($F_{(3,66)}$=36,41 ; p<0,001), mais une absence d'interaction entre ces deux facteurs ($f_{(3,66)}$=1,18 ; p=0,32). L'analyse post-hoc réalisée avec le facteur « *délai de perfusion* » indique que l'immunoréactivité pCREB dans le PL au délai de 30 min (68,55±7,68 ; *n=18* ; p<0,001) et 1h30 (55,86±8,18 ; *n=17* ; p=0,023) est plus élevée que chez les animaux contrôles (37,95±5,03 ; *n=22*), alors que l'on n'observe pas de modifications pour les animaux du groupe 1h (35,11±6,76 ; *n=17* ; p=0,73). L'analyse avec le facteur « *âge* » révèle une augmentation de pCREB chez les sujets âgés par rapport aux sujets jeunes du groupe contrôle [âgé (*n=12*) : 47,46±6,29 ; jeune (*n=10*) : 26,19±6,65 ; p=0,03], du groupe 30 min [âgé (*n=9*) : 92,09±8,8 ; jeune (*n=9*) : 46,12±7,65 ; p=0,001], du groupe 1h [âgé (*n=9*) : 47,43±11,17 ; jeune (*n=8*) : 21,27±3,16 ; p=0,05], et du groupe 1h30 [âgé (*n=9*) : 76,27±9,58 ; jeune (*n=8*) : 32,91±8,08 ; p=0,004].

Les ANOVAs réalisées sur les valeurs obtenues dans le striatum et le BLA ne révèlent aucune différence significative par rapport aux délais de perfusion ou à l'âge (NS dans toutes les analyses). L'immunoréactivité dans ces structures n'est donc modifiée ni par l'épreuve comportementale, ni par l'âge (cf. *fig. 3.C* et *D*). Les données sont précisées dans l'*Annexe 2*.

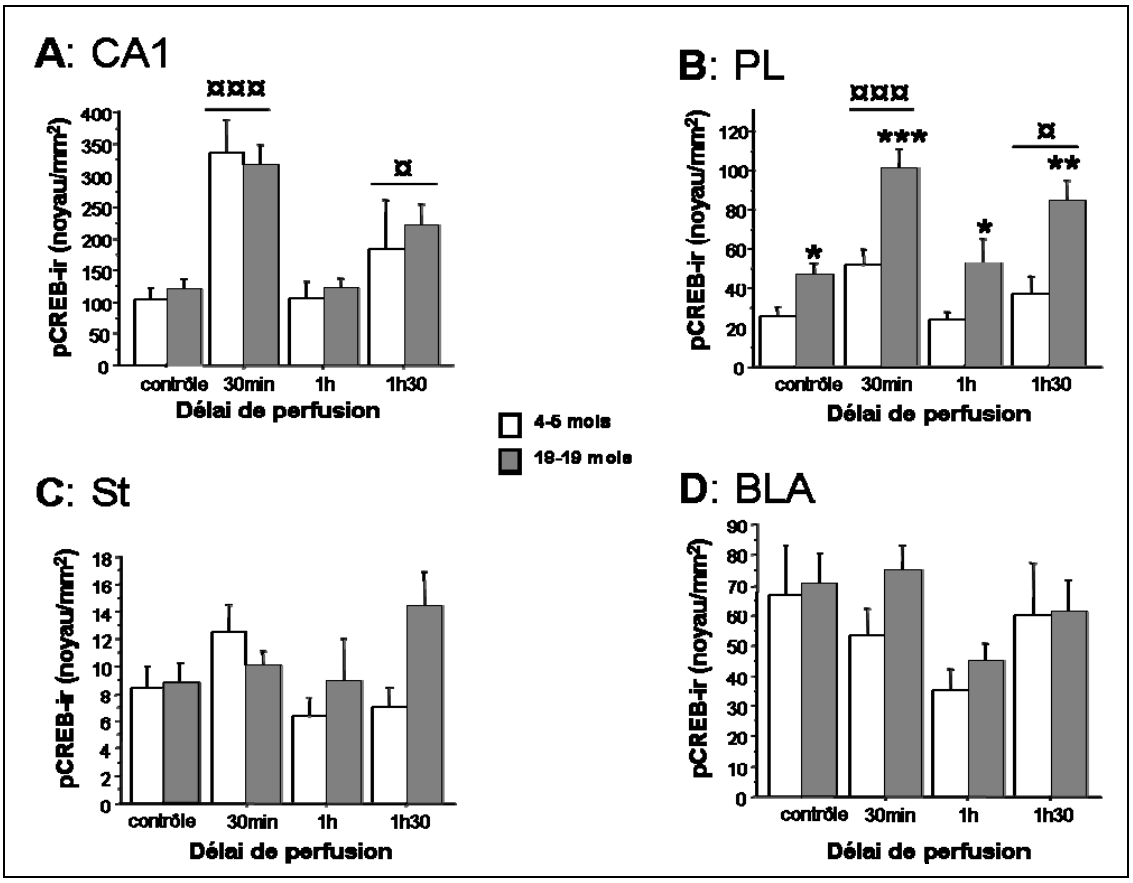


Figure 3 : Etude cinétique de l'immunoréactivité pCREB entre souris jeunes et âgées. Ces résultats montrent que le CA1 et le PL sont recrutés lors de l'épreuve d'AS, et qu'une suractivation du PL est présente chez les sujets âgés. A : données dans le CA1 hippocampique. B : données dans le cortex prélimbique. C : données dans le striatum. D : données dans le noyau baso latéral de l'amygdale.
Comparaison selon le délai de perfusion, ¤ : p<0.5 ; ¤¤¤: p<0.001.
*Comparaison selon l'âge, * : p<0.05 ; ** : p<0.01 ; *** : p<0.001.*

La corrélation des performances comportementales avec l'immunomarquage pCREB ne fait apparaître aucune corrélation significative dans le CA1 (C=0,138 ; p=0,59 ; *n=18*), mais ***révèlent une forte corrélation inverse entre ces deux facteurs dans le PL*** (C= -0,6 ; p=0,007 ; *n=18*) (cf. *fig. 4*).

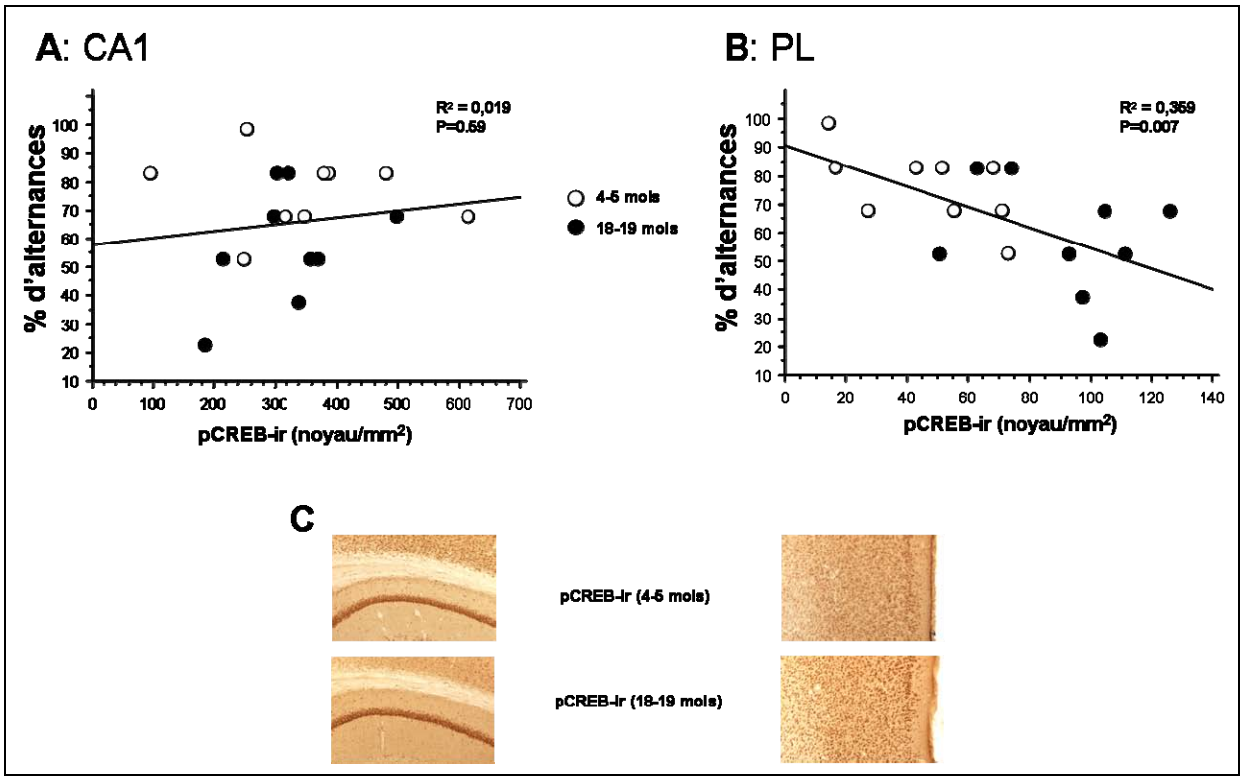


Figure 4 : Corrélation entre l'immunoréactivité pCREB à 30 min et les performances comportementales. On observe une forte corrélation inverse entre le pourcentage d'alternance et l'immunoréactivité pCREB uniquement dans le PL. A : résultat dans le CA1. B : résultats dans le PL. C : illustration de l'immunomarquage pCREB dans le CA1 (gauche) et le PL (droite) chez des souris jeunes (haut) et âgées (bas).

En résumé, les données d'immunohistochimie montrent que le CA1 et le PL sont recrutés lors de la tâche d'AS, implication particulièrement révélée au délai de perfusion de 30 minutes après le début du test. De plus, l'âge induit spécifiquement une augmentation d'activation dans le PL qui est inversement corrélée aux performances.

Expérience 2 : action de composés promnésiants sur le profil d'activation des structures recrutées dans l'AS.

L'expérience 1 a montré que le délai de perfusion de 30 minutes après le début du test permettait d'étudier l'implication différente de l'hippocampe et du cortex prélimbique dans l'épreuve comportementale. Dans la 2e expérience, nous avons voulu étudier les profils d'activation cérébrale chez les souris âgées lors de traitement par des composés promnésiants. Pour cela, nous avons réalisé une étude immunohistochimique (pCREB) sur les doses actives de 1 mg/kg de deux composés cholinergiques évalués précédemment, le donepezil et le S 38232.

Analyses des données obtenues après traitement avec le donepezil

Les résultats comportementaux obtenus avec le donepezil montrent que ce composé supprime le déficit d'AS observé chez les souris âgées, et induit une augmentation de l'activation du CA1 hippocampique (cf. *fig. 5.A*).

La comparaison par un test t de Student fait apparaitre une différence significative entre les performances des souris âgées placebos et les performances des souris traitées avec le donepezil ($t_{(15)}$= -2,82 ; p=0,013 ; 50±4,46%, *n=8* et 66,7±3,9%, *n=9* ; respectivement pour le groupe placebo et le groupe donepezil).

L'analyse par ANOVAs des résultats immunohistochimiques révèle un effet significatif du facteur traitement dans le CA1 ($F_{(2,20)}$=10,05 ; p<0,001) et le cortex PL ($F_{(2,20)}$=6,56 ; p=0,006). Plus précisément, les données dans le CA1 indiquent une différence significative entre les souris contrôles (94,73±9,81 ; *n=6*), et les souris placebos (189,51±28,36 ; *n=8* ; p=0,032), ainsi qu'avec les souris traitées au donepezil à 1 mg/kg (274,94±31,03 ; *n=9* ; p<0,001). On note également une augmentation significative du marquage pCREB chez les souris traitées au donepezil par rapport au souris placebo (p=0,033). Dans le cortex PL, les données montrent une différence significative entre les souris contrôles (56,2±5,42 ; *n=6*), et les souris placebos (97,52±10,21 ; *n=8* ; p=0,003), ainsi qu'avec les souris traitées au donepezil à 1 mg/kg (89,41±6,43 ; *n=9* ; p=0,009). Aucune différence significative n'est observée entre les souris placebos et celles du groupe donepezil (p=0,4).

Analyses des données obtenues après traitement avec le S 38232

Les résultats obtenus avec le S 38232 montre que ce composé supprime le déficit d'AS observé chez les souris âgées, et atténue la suractivation du cortex PL (cf. *fig. 5.B*).

La comparaison par un test t de Student révèle une différence significative entre les performances des souris âgées placebos et les performances des souris traitées avec le S 38232 à la dose de 1 mg/kg ($t_{(16)}$= -3,15 ; p=0,006 ; 50%±4,45, *n=8* et 71,7%±5, *n=10* ; respectivement pour le groupe placebo et le groupe S 38232).

L'analyse par ANOVAs des résultats immunohistochimiques indique un effet significatif du facteur traitement dans le CA1 ($F_{(2,21)}$=5,311 ; p=0,014) ainsi que dans le PL ($F_{(2,20)}$=15,85 ; p<0,001). Plus précisément, comparées au groupe contrôle (94,12±11,17 ; *n=6*), les données dans le CA1 montrent une différence significative avec le groupe placebo (159,91 +/- 22,47 ; *n=8* ; p=0,04), ainsi qu'avec le groupe S 38232 (187,85±19,34 ; *n=9* ;

p=0,004). Aucune différence significative n'est observée entre les souris placebos et celles du groupe S 38232 (p=0.3). Dans le PL, les données font apparaître une différence significative entre le groupe contrôle (41,89±5,97 ; *n=6*), et placebo (77,34±4,06 ; *n=8* ; p<0,001), ainsi qu'entre les souris contrôles et celles traitées avec le S 38232 à 1 mg/kg (60,24±3,12 ; *n=9* ; p=0,006). De manière intéressante, on note également une diminution fortement significative du marquage pCREB chez les souris traitées avec le S 38232 par rapport aux souris placebos (p=0,006).

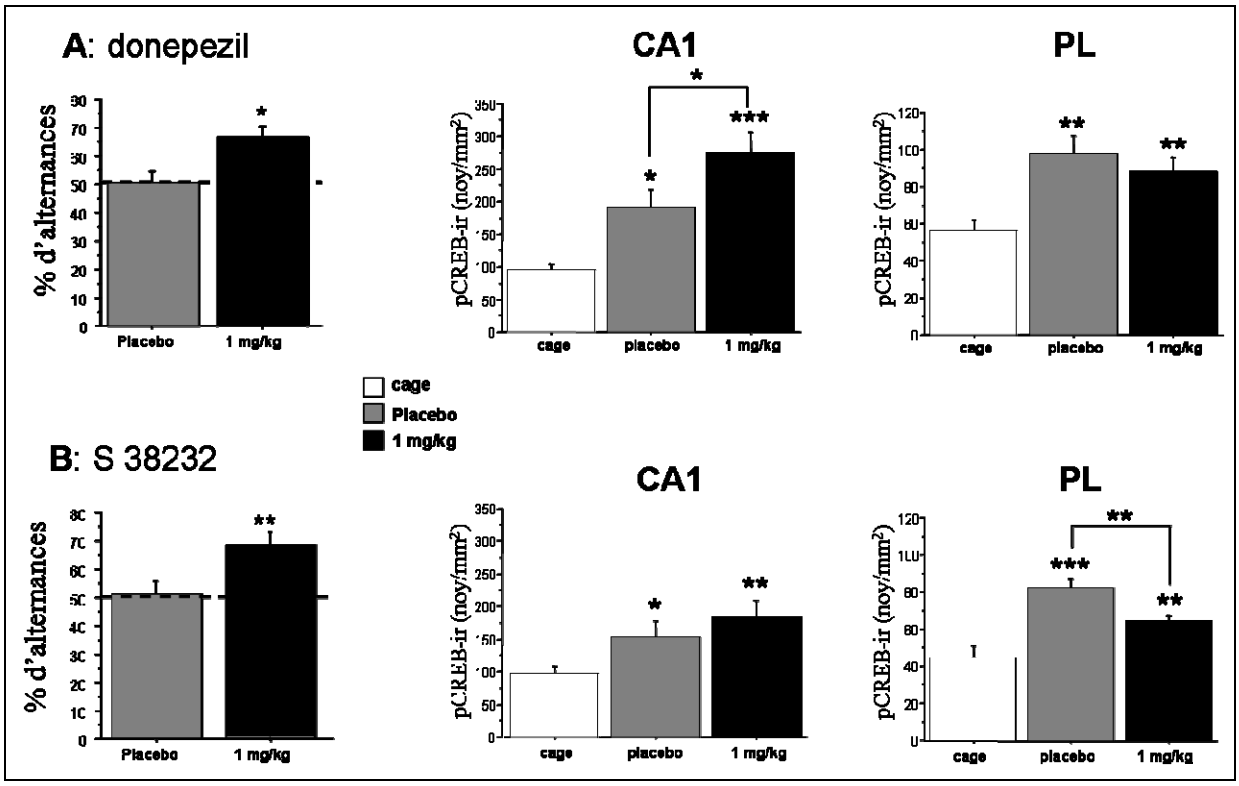


Figure 5 : Résultats comportementaux et immunohistochimiques dans le CA1 et le PL, après traitement pharmacologique. A : traitement pharmacologique avec le donepezil à la dose de 1 mg/kg. B : traitement pharmacologique avec le S 38232 à la dose de 1 mg/kg.

L'ensemble des résultats de l'expérience 2 montre que les deux composés cholinergiques (donepezil et S 38232) suppriment le déficit comportemental lié à l'âge, mais semblent agir par des mécanismes neuronaux différents. ***Ainsi, alors que le donepezil augmente les performances des souris âgées en induisant l'activation hippocampique, le S 38232 semble agir directement sur les performances en MDT en diminuant la suractivation induite par l'âge dans le cortex prélimbique***.

Expérience 3 : injection au sein du PL de molécules modifiant son niveau d'activation neuronale

Les résultats pharmacologiques et immunohistochimiques précédents montrent que le cortex PL joue un rôle central dans l'épreuve d'AS et que la suractivation de cette structure pourrait être impliquée dans les effets délétères du vieillissement sur la MDT des souris âgées. Nous avons alors choisi de moduler directement l'activation du cortex prélimbique chez les souris jeunes adultes ou âgées. Les comparaisons sont effectuées avec des souris ayant reçu l'injection de solvant (liquide céphalo-rachidien, LCR).

Inhibition du cortex prélimbique chez des souris jeunes

Tout d'abord, nous avons injecté un inhibiteur spécifique des canaux sodiques voltage-dépendants (la lidocaïne) afin de bloquer l'activation neuronale du PL chez des souris jeunes évaluées en AS avec un IEE de 90 sec (cf. *fig. 6.A*). Les données comportementales montrent que la lidocaine (0,05 mg/ml) provoque une diminution significative des performances des souris jeunes [$t_{(16)}$=2,86 ; p=0,011 ; LCR (*n=9*) : 68,52±5,15% ; lidocaine (*n=9*) : 50±3.93%]. Le PL apparaît donc nécessaire à la réalisation de la tâche d'AS.

Inhibition spécifique de la protéine kinase A dans le cortex prélimbique de souris âgées

Les données immunohistochimiques de l'expérience 2 suggèrent que la diminution de la suractivation de pCREB dans le PL chez les souris âgées pourrait permettre de restaurer les performances d'AS. Nous avons alors décidé d'injecter un inhibiteur spécifique de la PKA (Rp-cAMPS à 0,6 mg/ml) dans le cortex PL des souris âgées, afin de bloquer l'activité de la kinase majoritairement responsable de la phosphorylation de CREB (cf. *fig. 6.B*). Les résultats d'AS réalisée avec un IEE de 90 sec chez les souris âgées mettent en évidence une différence significative ($t_{(12)}$=-4,45 ; p=0,05) entre les souris injectées avec du LCR (*n=6*, 44,44±7,03), et celles ayant reçu le Rp-cAMPS (*n=8*, 62,29±5,22). L'inhibition spécifique de la PKA dans le cortex prélimbique permet donc d'améliorer les performances des souris âgées.

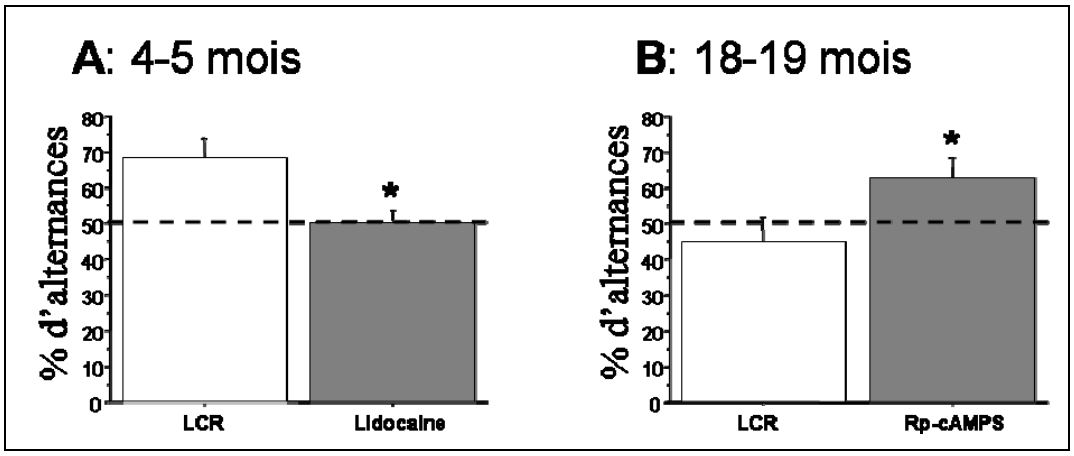


Figure 6 : Résultats comportementaux d'AS (IEE=90 sec) suite à l'injection dans le cortex prélimbique de modulateurs de l'activité neuronale. Les données montrent que la lidocaine, en bloquant l'activation du PL, provoque un déficit d'AS chez les souris jeunes, alors que l'injection du Rp-cAMPS dans le PL restaure les performances des souris âgées. A : injection de la lidocaine chez les souris jeunes. B : injection du Rp-cAMPS chez les souris âgées.

Les résultats de l'expérience 3 indiquent que l'inactivation complète du PL entraîne un déficit de MDT chez les souris jeunes, alors que la diminution de la suractivation du PL observée chez les souris âgées permet de restaurer leurs performances comportementales.

IV. Discussion

Lors du chapitre 1, nous avons observé une sensibilité accrue à l'effet délétère du délai et des interférences proactives chez les animaux âgés, en accord avec ce que l'on observe lors du vieillissement chez l'Homme (Gazzaley et al., 2005 ; Emery et al., 2008 ; Hogge et al., 2008 ; May et al., 1999). Dans ce chapitre, nous nous sommes donc attachés à comprendre les mécanismes neuronaux sous tendant ce déficit, avant d'étendre cette étude aux mécanismes d'action de deux substances cholinergiques procognitives.

Expérience 1 : données immunohistochimiques

Dans un premier temps, nous avons utilisé une technique d'immunohistochimie afin d'étudier la phosphorylation de la protéine CREB comme marqueur de l'activité neuronale. CREB est un facteur de transcription activé lorsqu'il est phosphorylé sur la Ser^{133} (Mayr et Montminy, 2001). Cette phosphorylation étant directement dépendante de la balance kinase/phosphatase essentielle au processus mnésique (cf. *Bases théoriques II.D*), pCREB se présente donc comme un marqueur idéal de l'activité neuronale dépendante de ces processus.

Nos résultats nous ont tout d'abord permis de montrer l'absence de modification de la quantité totale de la protéine CREB dans les différentes aires d'intérêts lors de la procédure d'AS ou du vieillissement. Ces données sont en accord avec les études précédentes montrant l'absence de modification de tCREB avec l'âge (Ramos et al., 2003 ; Porte et al., 2008a ; Williams et al., 2008 ; Xu et al., 2010). Ce constat permet de s'assurer que les modifications de l'immunomarquage de la protéine CREB phosphorylée (pCREB) dépendent uniquement de la procédure comportementale, et non d'une différence dans la quantité de protéine CREB entre souris jeunes et âgées.

De nombreuses données montrant une régulation différentielle de pCREB selon la tâche mnésique effectuée, nous avons réalisé une étude cinétique afin d'évaluer le profil d'activation temporelle de CREB dans les différentes structures d'intérêts. Plusieurs études démontrent également un profil d'activation biphasique de la phosphorylation de CREB dans

l'hippocampe lors d'apprentissages d'épreuves de mémoire à long terme, avec un pic de phosphorylation entre 0 et 60 minutes suivit d'un second pic 3 à 5 heures après (Bernabeu et al., 1997 ; Colombo et al., 2003 ; Stanciu et al., 2001 ; Taubenfeld et al., 2001 ; Trifilieff et al., 2006). De plus, au sein du laboratoire, une équipe a montré que le premier pic de phosphorylation de CREB dans le CA1 se faisait avec un décalage de 30 minutes chez les sujets âgés, ce qui pourrait être relié le déficit observé chez ces souris (Porte et al., 2008a). Contrairement à ces études, nos travaux se sont intéressés à la mémoire de travail ; il était donc essentiel d'analyser pour ce type de mémoire la cinétique d'activation de CREB. Notre étude cinétique a ainsi démontré une phosphorylation précoce et majeure de CREB au délai de 30 minutes après le début du test. Un second pic de plus faible amplitude semble également apparaître après un délai d'1h30. Etant donné les nombreuses voies de régulation de la protéine CREB, ce second pic pourrait être provoqué par un mécanisme de régulation secondaire plus tardif. Il est également concevable que ce second pic puisse être induit par des facteurs inhérents à la procédure et sans rapport avec le test, puisque durant le délai entre l'épreuve et la perfusion, l'animal est replacé dans sa cage à l'animalerie. Néanmoins nos résultats montrent clairement une phosphorylation majoritaire de CREB au délai le plus court, reflétant l'activation des structures cérébrales suites à la réalisation du test de mémoire de travail spatiale, ce qui nous a conduit à conserver ce délai pour les études ultérieures.

Afin de vérifier l'effet de notre protocole comportemental, nous avons comparé l'activation de CREB entre des animaux naïfs et des animaux ayant effectué l'ensemble de la procédure précédant l'épreuve comportementale (habituations et session prétest). Nous avons ainsi pu vérifier que la procédure comportementale n'entraînait pas de modification du seuil de base de pCREB.

L'analyse des données immunohistochimiques obtenues après l'épreuve comportementale a montré l'absence de modification de pCREB dans le striatum et le noyau basolatéral de l'amygdale lors de l'AS. Ceci suggère que la mémoire procédurale (liée au striatum) et les processus émotionnels (sous tendus par l'amygdale) ne sont pas significativement impliqués dans les résultats obtenus. A l'inverse, le CA1 hippocampique et le cortex prélimbique sont fortement activés lors de notre test. De nombreux travaux démontrent une intéraction entre ces deux structures lors de tâches de MDT reposant sur une composante spatiale. De plus, cette intéraction serait dépendante du délai, le CPF étant impliqué dès la mise en jeu d'intervalles de l'ordre de la seconde à la minute, alors que l'HPC

interviendrait progressivement au fur et à mesure de la mise en jeu de délai plus important (pour revue voir Kesner, 2005). En accord avec ces données, le délai de 90 secondes choisit dans notre étude recrute à la fois le cortex préfrontal et l'hippocampe. Dans l'alternance spontanée, ces deux structures agiraient en coopération afin de maintenir l'information précédemment acquise (codage retrospéctif), prévoir la réponse ultérieure (codage prospectif), ainsi que de supprimer les informations interférantes provenant des essais précédant le dernier essai effectué.

L'un des rôles majeurs de l'hippocampe dans le comportement d'alternance est probablement de soutenir la mémoire spatiale ainsi que la mise en relation des informations au fur et à mesure des essais, notamment par la fonction de tampon épisodique (cf. *Bases théoriques I.D.1*). Son activation conforte de nombreuses observations démontrant, notamment par des approches lésionnelles, l'implication de l'HPC dans l'alternance spontanée (Dalland, 1976 ; Stevens et Cowey, 1973 ; Lalonde, 2002). Le cortex préfrontal, et plus précisément le cortex prélimbique, est nécessaire aux tâches nécessitant la mémoire de travail (cf. *Bases théoriques IV.B*). Nos résultats confirment ces données et élargissent l'étude aux effets du vieillissement. Les souris âgées présentent un seuil de base de pCREB supérieur aux individus jeunes conformément à des résultats précédemment obtenus chez le rat (Ramos et al., 2003), et suite à l'épreuve comportementale, les souris âgées présentent une suractivation spécifique du PL. De plus, l'analyse de l'ensemble des données de l'étude obtenues avec les souris jeunes et âgées démontre une corrélation négative entre les performances d'AS et l'immunomarquage pCREB dans le PL, renforçant l'implication directe de la suractivation hippocampique dans l'altération de la mémoire de travail. Ces données sont à mettre en perspective avec celles obtenues par Porte et collaborateurs (2008a), montrant une corrélation positive entre les performances de mémoire à long terme et la phosphorylation de CREB dans le CA1. Compte tenu des mécanismes de régulation opposés entre les différents types de mémoire (cf. *Bases théoriques II.D*), ces deux études confortent et étendent au vieillissement l'hypothèse selon laquelle la MLT est soutenue par des mécanismes de phosphorylation dans l'HPC alors que ces mêmes mécanismes dans le CPF seraient délétères pour la MDT (cf. *Bases théoriques III.B.1*).

L'ensemble des résultats obtenus lors de la première expérience suggère que la suractivation spécifique du cortex prélimbique chez les souris âgées serait le reflet du déficit cognitif observé dans notre test de mémoire de travail spatiale.

Expérience 2 : action de composés promnésiants sur le profil d'activation des structures recrutées dans l'AS.

En raison de l'implication essentielle du système cholinergique dans la MDT (cf. *Bases théoriques III.B.2*), et compte tenu des données pharmacologiques observées (cf. *Chapitre 1*), nous avons étudié l'action de deux composés promnésiants chez la souris âgée (le donepezil et le S 38232) sur les profils d'activation de CREB dans le CA1 et le PL.

L'épreuve comportementale a été effectuée avec une dose de 1 mg/kg pour les deux substances, ce qui nous a permis de comparer ces deux substances à une dose produisant un effet promnésiant sensiblement identique chez les souris âgées (environ 70% d'alternance).

Les données immunohistochimiques reproduisent et confirment l'augmentation de la phosphorylation de CREB dans le CA1 et le PL chez les souris âgées lors de l'AS. Les substances pharmacologiques, bien qu'ayant un effet promnésiant comparable, agissent de manière différente sur les profils d'activations de ces structures. Ainsi, le donepezil produit une augmentation de la phosphorylation de CREB dans le CA1, sans induire de modification dans le PL. A l'inverse, le S 38232 agit sans modification de pCREB dans le CA1, mais diminue la suractivation présente dans le PL. Ces résultats confortent l'hypothèse d'une balance kinase/phosphatase ayant un rôle régulateur opposé entre le cortex préfrontal et l'hippocampe (cf. *Bases théoriques II.D*).

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer les mécanismes d'action de ces composés cholinergiques. Le donepezil, en inhibant l'acetylcholinesterase, permet d'augmenter la concentration d'acetylcholine (ACh) disponible au niveau des structures recevant des projections des noyaux cholinergiques du cerveau basal antérieur (Pepeu et Giovannini, 2010) (cf. *Bases théoriques III.B.2).* Lors du vieillissement et de la maladie d'Alzheimer, la neurodégénérescence majeure des neurones cholinergiques projetant notamment sur l'hippocampe serait à l'origine des déficits cognitifs observés (Bartus et al., 1982 ; Francis, 2005; McKinney et Jacksonville, 2005 ; Schliebs et Arendt, 2006). Le donepezil pourrait alors pallier l'altération de la transmission cholinergique hippocampique, et ainsi restaurer les performances mnésiques.

Chez l'animal, les travaux de Scali et collaborateurs (1997) ont révélé une diminution de l'ACh chez des rats âgés comparés à des rats jeunes. De plus, suite à l'injection d'un inhibiteur de l'acétylcholinestérase, les auteurs ont noté une augmentation majeure d'ACh

dans l'HPC des rats âgés. Lors de tâches de mémoire de travail, notamment l'AS chez le rat, une libération importante d'ACh a été démontrée au niveau de l'HPC (Ragozzino et al., 1999 ; Scali et al., 1997) et du CPF (Giovannini et al., 1998 ; Hironaka et al., 2001). De plus, Giovannini et ses collaborateurs ont montré que l'augmentation d'ACh au niveau du CPF était nettement diminuée chez les rats âgés. Chez des rats jeunes, une étude a confirmé la libération préfrontale d'ACh lors d'une tâche de mémoire de travail, mais a révélé que cette libération était induite dans l'HPC lors de l'ajout d'un indice visuel améliorant les performances (Hironaka et al., 2001). Dans notre expérience, l'augmentation d'activation du CPF refléterait la difficulté accrue des souris âgées à réaliser la tâche d'AS, et l'augmentation d'activation dans l'HPC lors du traitement par le donepezil pourrait permettre de compenser ce déficit.

En outre, des études d'imagerie cérébrale chez l'Homme démontrent que l'injection d'un inhibiteur de l'acétylcholinestérase améliore non seulement les performances en MDT, mais provoque également une diminution d'activation du CPF chez les sujets jeunes. (Furey et al., 2000, 2008). Chez les sujets âgés, cette diminution d'activation du CPF est toujours présente, mais on note en plus une augmentation d'activation d'aires cérébrales nécessaire à la réalisation de la tâche. Ce recrutement de régions supplémentaires lors du test rappel la théorie STAC (Park et Reuter-Lorenz, 2009 ; cf. *Bases théoriques III.A.2*) qui prédit un recrutement de circuits additionnels comme mécanisme compensatoire aux effets délétères du vieillissement. Le test d'AS nécessitant entre autre l'implication de l'HPC en raison de son importance dans l'orientation spatiale (O'Keefe, 1979 ; White et McDonald, 2002 ; Morris, 1984), l'augmentation d'activation de cette structure chez la souris âgée traitée avec le donepezil serait alors un mécanisme de compensation visant à restaurer les performances dans ce test de MDT spatiale. Le fait que l'on ne note pas de diminution d'activation préfrontale dans nos résultats pourrait être dû à la différence d'espèce ou de tâche.

Contrairement à l'action non spécifique du donepezil qui provoque une augmentation globale de l'ACh disponible, le S 38232 agit spécifiquement sur les récepteurs α4β2 (Lagostena et al., 2010). En ciblant ces récepteurs majoritairement situés dans l'HPC et le cortex préfrontal, ce composé permet de moduler directement l'activité cholinergique au sein des structures impliquées dans la MDT. Au niveau du CPF, il a été montré que des courants très transitoires d'ACh permettaient la détection d'indices dans des tâches attentionnelles (Parikh et al., 2008), et que ce phénomène était potentialisé par la nicotine et d'une plus forte manière par des agonistes α4β2 (Parikh et al., 2008, 2010). Sur la base de ces résultats, les

auteurs ont proposé que la stimulation des récepteurs α4β2 permettrait un courant transitoire plus précis que celui obtenu avec l'ACh ou la nicotine, ces derniers stimulant non spécifiquement l'ensemble des nAChR. Ce courant transitoire précis améliorerait ainsi la composante attentionnelle lors de tests cognitifs (Sarter et al., 2009). Cette même équipe a confirmé cette hypothèse en utilisant le S 38232 afin de démontrer la spécificité des récepteurs α4β2 dans ce mécanisme (Howe et al., 2010). En considérant l'atteinte des nAChR α4β2 lors du vieillissement (cf. *Bases théoriques III.B.2*), le S 38232 restaurerait les courants transitoires précis, ce qui induirait l'amélioration de la MDT observée chez les souris âgées.

Dans leurs études, l'équipe de Sarter a également montré une relation étroite entre les systèmes cholinergique et glutamatergique (Parikh et al., 2008 ; Howe et al., 2010). Les projections cortico-thalamiques glutamatergiques permettraient l'activation initiale du CPF lors de la détéction d'une information. L'activation secondaire du système cholinergique, et plus particulièrement les courants transitoires consécutifs à l'activation des nAChR-α4β2, entretiendraient cette activation glutamatergique afin de renforcer cette détéction. Ceci corobore l'hypothèse soutenant que le système cholinergique aurait un rôle régulateur, qui permettraient la coordination des différentes systèmes cérébraux (Gold, 2003 ; Parent et Baxter, 2004). L'activation des nAChR-α4β2 par le S 38232 permettraient ainsi une communication neuronale plus effective, notamment entre le CPF et l'HPC, et l'amélioration consécutive des performances cognitives.

Le ryhtme thêta, directement dépendant de la voie septo-hippocampique, a également été proposé comme un marqueur de la coordination des systèmes et de la MDT (Vertes, 2005). Il a également été montré que le donepezil, en augmentant la transmission cholinergique, permet d'améliorer le rythme thêta en parralèle de la MDT (Masuoka et Kamei, 2009). De plus, la coordination des oscillations entre les structures, notamment entre l'HPC et le PFC, apparait comme un médiateur des processus cognitifs tels que l'attention, la mémoire de travail et la consolidation mnésique (Benchenane et al., 2011). Au regard de ces données, il serait intéressant d'étudier les effets des composés cholinergiques sur la synchronisation des rythmes oscillatoires dans l'HPC et le PFC lors de l'AS et du vieillissement.

Expérience 3 : injection au sein du PL de molécules modifiant le niveau d'activation neuronale

Les résultats des expériences précédentes nous ont permis de mettre en évidence une suractivation du cortex prélimbique chez les souris âgées, dont la diminution de manière pharmacologique restaure les performances de mémoire de travail. Nous avons donc ensuite vérifié par des injections pharmacologiques directement dans le PL, l'implication de cette structure chez les souris jeunes et âgées.

Le PL étant impliqué lors de tâche de mémoire de travail, nous avons tout d'abord souhaité vérifier si son activation était nécessaire lors de l'alternance spontanée. Nous avons pour cela utilisé la lidocaine, qui est un bloqueur spécifique des canaux sodiques voltage-dépendant ayant une action immédiate et une durée effective d'environ 20 minutes (Pereira de Vasconcelos et al., 2006). Dans notre étude, le modèle comportemental ayant une durée d'environ 15 minutes, nous pouvons donc considérer que le PL est inhibé durant l'ensemble de la phase de test. Nos résultats montrent donc que cette inactivation chez des souris jeunes provoque une diminution drastique des performances d'AS, et conforte les études ayant montrées, par des approches lésionnelles chez le rat, la nécessité de l'intégrité de cette structure pour la réalisation de la tâche d'AS (Delatour et Gisquet-Verrier, 1996 ; Divac, 1975 ; Sanchez-Santed et al., 1997). Ainsi, la suractivation comme l'inhibition totale du cortex préfrontal apparaissent comme délétère pour la MDT. Il convient donc de cibler spécifiquement les mécanismes moléculaires à l'origine de cette suractivation.

Une étude a montré une augmentation d'activité de CREB suite au traitement par un agoniste nicotinique (Bitner et al., 2007). Les auteurs ont ensuite montré que l'inhibition de la protéine ERK, kinase dépendante des 2nd messagers et activatrice de la la protéine CREB, n'induisait qu'une diminution partielle de l'activité de CREB. Cette dernière étude suggère que d'autres voies, telles que celles initiées par la protéine kinase A, seraient à l'origine de la phosphorylation de CREB. Dans nos résultats, la phosphorylation de CREB dans le PL, qui apparait comme intrinsèquement liée à l'altération de la MDT lors du vieillissement, serait donc probablement régulée par l'activité de la PKA. Nous avons donc réalisée l'inhibition spécifique de cette protéine, principale kinase activatrice de CREB, par le Rp-cAMPS, antagoniste compétitif complet des sites de fixation de l'AMPc (Van Haastert et al., 1984) (cf. *Bases théoriques II.D*). Dans notre modèle, l'injection dans le PL du Rp-cAMPS provoque

une amélioration des performances chez les sujets. Ces résultats sont en accord avec des études précédentes montrant qu'une activation préfrontale de la PKA est délétère, alors que son inhibition permet de restaurer les performances lors de tâches de MDT (Taylor et al., 1999 ; Birnbaum et al., 2004 ; Runyan et Dash, 2005 ; Runyan et al., 2005 ; Zeng et al., 2001). Compte tenu des résultats obtenus dans nos expériences précédentes, l'amélioration de la MDT pourrait résulter de la diminution de suractivation du PL observée chez les souris âgées. Cette interprétation renforce le mécanisme d'action du S 38232, dont l'injection intra-péritonéale améliore les performances d'AS, et diminue la suractivation du PL. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse d'un lien direct entre la diminution de la suractivation prélimbique observée avec le S 38232 chez les souris âgées, et l'effet promnésiant de ce composé.

L'ensemble de ces expériences a permis, en modulant le niveau d'activation du cortex prélimbique, de montrer que même si l'inhibition totale du PL était délétère, l'inhibition spécifique de la voie PKA permettait de restaurer les capacités comportementales de souris âgées dans notre test de mémoire de travail.

Conclusion

Les données du chapitre 2 ont révélé une suractivation du cortex prélimbique spécifiquement chez les souris âgées lors de la réalisation d'une tâche de mémoire de travail spatiale. En accord avec de nombreuses études réalisées chez l'Homme et l'animal, cette suractivation serait profondément liée au déficit cognitif observé lors du vieillissement (pour revue voir Bishop et al., 2010) (cf. *Bases théoriques III.A.2)*.

Dans le cadre du développement de composés promnésiants dans le traitement du vieillissement normal et pathologique, nous avons étudié l'action du donepezil et du S 38232, deux composés cholinergiques, sur le profil d'activation cérébrale des souris âgées.

En agissant spécifiquement sur les récepteurs α4β2, le S 38232 semble avoir un mécanisme d'action plus spécifique. En accord avec les résultats de Howe et collaborateurs (2010), ce composé permettrait d'améliorer la sélection des informations pertinentes par une augmentation du ratio signal/bruit dans le CPF. L'optimisation fonctionnelle du CPF induit par le S 38232 pourrait être responsable de la diminution d'activation du PL observée chez les souris âgées. En accord avec cette hypothèse, l'injection dans le PL d'un inhibiteur de la voie PKA permet de restaurer les performances d'AS chez les souris âgées, ce qui confirme le rôle délétère de l'activité kinase préfrontale lors de tâches de MDT (Runyan et Dash, 2005).

Le donepezil, en tant qu'inhibiteur de l'acétylcholinestérase, agirait sur l'hippocampe qui est une cible majeure des afférences cholinergiques. L'augmentation de l'ACh au niveau de l'hippocampe permettrait d'augmenter son activation et son recrutement lors de la tâche d'AS, et ainsi de compenser de manière indirecte le déficit préfrontal observé lors du vieillissement. Cette hypothèse est en accord avec des observations d'imagerie fonctionnelle chez l'Homme mettant en évidence le recrutement d'aires additionnelles pour la réalisation de tâches de MDT suite au traitement par des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (Furey et al., 2000, 2008).

Dans leur ensemble, nos résultats montrent qu'il est possible de limiter le déficit cognitif lors du vieillissement par l'utilisation de composés promnésiants tel que le S 38232, qui optimisent le fonctionnement du CPF, diminuant ainsi sa suractivation délétère.

Chapitre 3

Chapitre 3

Rôle des récepteurs alpha4beta2 dans la mémoire de travail.

Etude des souris jeunes et âgées invalidées pour la sous-unité béta2.

I. INTRODUCTION 145

II. MÉTHODOLOGIE 147

Expérience 1 : étude comportementale sur les souris KO β2 de 4-5 mois 147

Actimétrie : test de l'activité spontanée. 147

Labyrinthe en croix surélevé : test d'anxiété 147

Exploration libre en planche à huit trous : test de l'activité exploratoire. 148

L'alternance spontanée dans le labyrinthe en T : test de la mémoire de travail. 148

Apprentissage spatial en piscine de Morris : test de la mémoire de référence. 148

Expérience 2 : étude des souris KO β2 à l'âge de 18-19 mois 149

Expérience 3 : analyse du profil d'expression des sous-unités nicotiniques 150

III. RÉSULTATS 151

Expérience 1 : étude comportementale sur les souris KO β2 de 4-5 mois 151

Actimétrie 151

Labyrinthe en croix surélevé 152

Exploration libre en planche à huit trous 153

Alternance spontanée 154

Apprentissage spatial en piscine de Morris 155

Expérience 2 : étude des souris KO β2 à l'âge de 18-19 mois 157

Expérience 3 : analyse du profil d'expression des sous-unités nicotiniques 160

Western Blot 160

PCR quantitative 161

IV. DISCUSSION 163

Expérience 1 : étude comportementale sur les souris KO β2 de 4-5 mois 163

Expérience 2 : étude des souris KO β2 à l'âge de 18-19 mois 164

Expérience 3 : analyse du profil d'expression des sous-unités nicotiniques 166

CONCLUSION 168

I. Introduction

L'étude immunohistochimique décrite dans le *chapitre 2* a révélé une ***suractivation du cortex préfrontal chez les souris âgées*** déficitaires dans le test d'alternance spontanée, ce qui confirme des études préalables chez l'Homme (pour revue voir Bishop et al., 2010) et l'animal (Ramos et al., 2003). De plus, les résultats obtenus suite au traitement de ces souris par un agoniste des récepteurs α4β2 ont révélé que ce composé ***(S 38232) est capable d'améliorer les performances de mémoire de travail en diminuant la suractivation du cortex prélimbique observée chez les souris âgées***. Ces données confirment chez l'animal les études montrant que chez l'Homme, le traitement par des composés procholinergiques permettait d'améliorer les performances de mémoire de travail chez les sujets âgés tout en diminuant la suractivation préfrontale (Furey et al., 2000, 2008).

Le mécanisme par lequel le S 38232 permet de diminuer la suractivation préfrontale et de restaurer les performances de mémoire de travail reste encore mal compris. Les différentes hypothèses développées dans la discussion du *chapitre 2* ne permettent que d'amorcer une explication fonctionnelle. Lors du vieillissement, la diminution d'expression du récepteur nicotinique α4β2 (chez l'Homme : Tohgi et al., 1998 ; voir aussi Picciotto et Zoli, 2002 ; et chez l'animal : Birtsch et al., 1997 ; Rogers et al., 1998 ; Ferrari et al., 1999) pourrait rendre compte de l'altération des fonctions préfrontales et de la sensibilité accrue des sujets âgés à l'effet délétère des interférences (cf. C*hapitre 1*). Le S 38232 en tant qu'agoniste spécifique des récepteurs α4β2 (Lagostena et al., 2010), permettrait d'améliorer la fonction de détecteur d'indices du cortex préfrontal (Howe et al., 2010) et ainsi d'augmenter les performances en mémoire de travail chez les souris âgées lors du test d'alternance spontanée (cf. C*hapitre 2*).

Afin de mieux comprendre le mode d'action du S 38232, nous avons choisi d'utiliser des ***souris invalidées pour la sous-unité nicotinique béta2*** (« *knock-out béta2* », ou KO β2). L'invalidation de ce gène chez des souris de souche C57Bl/6 provoque la perte totale d'expression du récepteur α4β2, mais n'entraîne pas de conséquences physiologiques délétères majeures (Picciotto et al., 1995). D'un point de vue neurofonctionnel, ces souris présentent une perte totale de sensibilité à la nicotine (Picciotto et al., 1995) ainsi qu'un défaut d'organisation comportementale probablement dû à une altération des fonctions

attentionnelles (Avale et al., 2008 ; Besson et al., 2008 ; Granon et al., 2003 ; Maubourguet et al., 2008) mais sans atteintes mnésiques prononcées (Zoli et al., 1999).

Dans le cadre de nos travaux, l'utilisation de ces souris permet d'aborder le ***rôle fonctionnel du récepteur α4β2*** dans la mémoire de travail et son altération par le vieillissement, notre hypothèse étant que la délétion de ce récepteur provoquerait un déficit comparable à celui des souris âgées. Notre première préoccupation fut donc d'étudier les ***souris KO β2 jeunes*** dans une série de tests comportementaux afin de mieux ***caractériser les modifications cognitives résultant de l'invalidation de la sous-unité β2***.

En regard des résultats obtenus, nous avons décidé de compléter l'étude comportementale par la réalisation du test d'alternance spontanée chez les souris KO β2 âgées. Nous avons ensuite réalisé une ***étude pharmacologique chez les souris KO β2 âgées*** dans le test de l'alternance séquentielle spontanée, afin de vérifier la spécificité du S 38232 pour le récepteur α4β2. Compte tenu de l'effet inattendu du S 38232 obtenu chez les souris KO β2, nous nous sommes également intéressés à l'implication potentielle du récepteur α7 dans ces résultats pharmacologiques. En effet, le S 38232 possédant une faible activité α7 (Lagostena et al., 2010), il est envisageable que l'absence de la sous-unité β2 chez les souris puisse potentialiser l'action du S 38232 sur la sous-unité α7 (cf. *expérience 2 et discussion*).

Des modifications d'expression des sous-unités nicotiniques ont été rapportées chez l'Homme (Francis, 2005; Picciotto et Zoli, 2002 ; Gotti et al., 2006) et l'animal (Birtsch et al., 1997 ; Rogers et al., 1998 ; Ferrari et al., 1999). Nous avons donc émis l'hypothèse que des modifications des sous-unités nicotiniques pourraient être à l'origine des résultats observés chez les souris âgées (cf. *Chapitre 1 et 2*), et dans la présente étude réalisée avec des souris KO β2. Nous avons donc évalué, par une ***approche biomoléculaire,*** la quantité (par western-blot) ainsi que l'expression (par PCR quantitative) des récepteurs α4β2 et α7 dans le cortex préfrontal et l'hippocampe, structures clés de l'AS (cf. *Chapitre 2*). Nous avons réalisé ces analyses chez des souris jeunes et âgées, ainsi que chez des souris invalidées pour la sous-unité β2 ou α7 afin de voir les ***modifications d'expression lors du vieillissement ou de la délétion spécifique de l'une des deux sous-unités***.

II. Méthodologie

Expérience 1 : étude comportementale sur les souris KO β2 de 4-5 mois

Cette expérience est constituée d'un ensemble de tests comportementaux visant à ***caractériser d'un point de vue cognitif les modifications induites par la délétion de la sous-unité nicotinique β2 chez des souris de 4-5 mois***. Dans chaque test, les souris KO β2 jeunes sont comparées à leurs témoins *Wild-Type* (WT : génotype « *sauvage* » basé sur un fond C57Bl/6 ; voir Picciotto et al., 1995).

Les comparaisons par rapport aux WT sont effectuées par un test t de Student. Une ANOVA à un ou deux facteurs a été utilisée dans l'alternance spontanée et l'apprentissage spatial en piscine de Morris, selon les cas. Le test post-hoc consécutif a permis de comparer les performances des animaux KO β2 par rapport à leurs WT ou selon les paramètres du test.

Actimétrie : test de l'activité spontanée.

Ce test a pour but d'effectuer différentes mesures de l'activité spontanée d'un animal placé dans une cage spécifique (18x12x22cm) pourvue d'un système laser (Imetronic®). Les différentes valeurs relevées représentent l'activité globale de l'animal, le temps passé autour de la mangeoire (avant de la cage) ou au fond de la cage, les mouvements de « va et vient », ainsi que les redressements. Les mesures automatisées sont gérées par un ordinateur et sont effectuées pendant 24h. L'appareil est muni d'un système de régulation de la lumière et de l'hygrométrie afin que les animaux soient placés dans les mêmes conditions que celles de l'animalerie.

Labyrinthe en croix surélevé : test d'anxiété.

Le labyrinthe en croix surélevé est un test classiquement utilisé pour la mesure de l'anxiété chez les rongeurs (pour revue, voir File et al., 2004 ; Clement et al., 2009). L'appareil est constitué de deux bras munis de parois opaques (bras fermés ; 30x7x17cm) et deux bras de mêmes dimensions, qui en sont dépourvus (bras ouverts). Le plancher de l'appareil est situé à 1 mètre au-dessus du sol. Ce test exploite le conflit, chez les rongeurs,

entre la peur des espaces ouverts et le désir d'explorer un nouvel environnement. Les bras fermés représentent la sécurité, alors que les bras ouverts offrent une valeur exploratoire. Au début de l'expérience, l'animal est placé au centre de l'appareil, puis le nombre d'entrées et le temps passé dans chaque bras sont relevés par des capteurs laser pendant une durée de 5 minutes. Le nombre total d'entrées, le temps total de visites ainsi que la latence passée au centre de l'appareil sont des mesures indicatives du comportement exploratoire de l'animal. Les données sont gérées par informatique. La mesure de la réactivité émotionnelle de peur (ou « anxiété ») s'effectue par le ratio d'entrées dans les bras fermés / activité totale (ratio entrée dans les bras fermés).

Exploration libre en planche à huit trous : test de l'activité exploratoire.

Ce test permet d'évaluer le comportement exploratoire des souris dans une situation non anxiogène, contrairement à l'épreuve précédente. Il est effectué dans une enceinte carrée (50x50x20cm) comportant 8 trous équidistants (Ø 2 cm) sur le plancher de l'appareil. L'animal est libre d'explorer l'appareil pendant une durée de 7 minutes pendant laquelle le nombre et le temps de visite de chaque trou sont mesurés par un système laser. Le rapport du nombre de visite totale / durée totale de visite permet de définir la durée moyenne par visite. Les mesures sont automatisées et gérées par un ordinateur.

L'alternance spontanée dans le labyrinthe en T : test de la mémoire de travail.

Ce test qui permet d'évaluer la mémoire de travail est identique au protocole décrit précédemment dans ce manuscrit (cf. *Matériels et Méthodes I.B,* ainsi que le *chapitre 1*). Dans cette expérience, les souris KO β2 jeunes ainsi que leurs WT sont soumises à la procédure standard d'AS, réalisée avec différents intervalles entre essais allant de 5 à 180 secondes.

Apprentissage spatial en piscine de Morris : test de la mémoire de référence.

Le test de la piscine de Morris permet d'étudier la capacité des animaux à localiser une plateforme immergée dans une piscine (Ø 140cm, hauteur 40cm), à l'aide d'indices visuels situés dans la pièce (pour une description détaillée cf. Martel et al., 2006). Cette tâche repose sur la motivation de l'animal à s'échapper de l'eau en montant aussi vite que possible sur la plateforme de sécurité. Afin de localiser cette plateforme non visible, l'animal doit établir une

carte spatiale grâce aux indices allocentriques distaux. A ce titre, la piscine de Morris est reconnue comme un excellent test de mémoire spatiale (Morris et al., 1982).

L'apprentissage est effectué pendant 5 jours consécutifs, à raison de 6 essais par jour durant lesquels l'animal dispose d'un délai maximum de 90 secondes pour rejoindre la plateforme. Lors de la première journée, la plateforme dont la localisation est modifiée entre chaque essai, est marquée par un indice visuel ce qui permet de vérifier les capacités motrices, motivationnelles et sensorielles des animaux. Les quatre jours suivants, la plateforme est située à un emplacement fixe, mais le point de départ des animaux est aléatoire entre chaque essai. La distance de nage nécessaire à la localisation de la plateforme reflète le niveau d'apprentissage. La distance de nage diminue en effet au fur et à mesure des sessions, ce qui indique que l'animal améliore sa capacité à repérer la plateforme dans l'espace. Après le dernier essai de la dernière session, les animaux sont soumis à un test de rappel de 90 sec (« *probe trial* »), durant lequel la plateforme est retirée de la piscine. L'absence de la plateforme permet alors d'évaluer la force de l'apprentissage initial, par la persévérance à rechercher la plateforme dans la zone cible.

Expérience 2 : étude des souris KO β2 à l'âge de 18-19 mois

Dans une seconde expérience, et compte tenu des résultats dégagés, l'étude de la mémoire de travail (alternance spontanée) a été complétée avec les souris KO β2 âgées (18-19 mois). Par cette expérience, nous avons voulu vérifier si la délétion de la sous-unité β2 pouvait accentuer le déficit de mémoire observé chez des souris C57BL/6 âgées lors du *chapitre 1*. Les souris KO β2 âgées ont donc été testées dans la procédure décrite précédemment, avec des IEE de 5, 30 et 90 secondes.

Au regard des résultats obtenus précédemment avec le S 38232 montrant un potentiel promnésiant plus important chez les souris âgées (cf. *Chapitre 1*), ainsi que du profil comportemental des souris KO β2 âgées, nous avons décidé de tester la spécificité du S 38232 pour le récepteur α4β2 chez ces dernières. Pour cela, ce composé a été administré par voie intrapéritonnéale chez des souris KO β2 de 18-19 mois et des WT du même âge, 30 minutes avant la réalisation du test d'AS (IEE=90 sec).

Les résultats inattendus obtenus avec le S 38232 nous ont conduits à vérifier l'implication du récepteur α7 dans ces observations. Nous avons utilisé un antagoniste des récepteurs α7 (MLA : méthyllycaconitine) afin de bloquer l'activation de ces récepteurs lors

de la réalisation de la tâche d'AS. Les souris ont été injectées par voie intrapéritonéale 30 min avant la réalisation du test avec un IEE de 90 sec.

Expérience 3 : analyse du profil d'expression des sous-unités nicotiniques

L'ensemble des résultats obtenus sur les souris KO β2 indique l'importance de ce récepteur dans les processus cognitifs, et démontre une modification de la sensibilité pharmacologique aux composés ciblant le système cholinergique. Afin de comprendre ces modifications, une analyse quantitative des sous-unités β2 et α7 a été réalisée dans les aires cérébrales impliquées dans la mémoire de travail (cf. *Chapitre 2*).

Par une approche biomoléculaire (Western-blot et PCR quantitative) (pour les protocoles détaillés, cf. *Matériels et Méthodes III.B, et III.C)*, nous avons quantifié les deux sous-unités dans le cortex préfrontal et l'hippocampe de souris C57Bl/6 de 4-5 mois, de 18-19 mois, ainsi que de souris KO β2 et α7 de 4-5 mois. Le but de ces expériences était d'identifier les modifications potentielles de l'expression et/ou de traduction de ces sous-unités, consécutives au vieillissement ou à la délétion de l'une des sous-unités.

III. Résultats

Expérience 1 : étude comportementale sur les souris KO β2 de 4-5 mois

Ces expériences ont été réalisées avec des souris de KO β2 de 4-5 mois et les témoins WT du même âge.

Actimétrie

L'analyse par ANOVA sur mesures répétées de l'ensemble des données obtenues heure par heure pendant 24h sur l'actimétrie n'indique pas d'effet « génotype » ($F_{(1,14)}$=0,59 ; p=0,45 ; cf. *fig. 1.A*), mais démontre un effet « heure » ($F_{(23,294)}$=20,75 ; p<0,001), ainsi qu'une interaction « heure x génotype » ($F_{(23,294)}$=3,18 ; p<0,001). L'effet « heure » s'explique notamment par le fait que sur 24h les souris présentent une phase nocturne d'activité intense, et une phase diurne d'activité moindre. Nous avons donc divisé les 24h d'observation en une phase diurne et une phase nocturne correspondant au cycle 7-19h de l'animalerie. Les résultats ne font pas apparaître de différence significative sur la phase nocturne [$F_{(1,14)}$=0,14 ; p=0,71 ; WT (n=8), 4421±388 ; KO (n=8), 4651±477], contrairement à la phase diurne pour laquelle les souris KO β2 présentent une diminution d'activité comparée à leurs témoins ([$F_{(1,14)}$=4,43 ; p=0,05 ; WT (n=8), 2592±302 ; KO (n=8), 1679±310] (cf. *fig. 1.B*). La phase diurne correspondant au début du test, nous avons regardé heure par heure l'activité globale des souris lors de cette phase. Les analyses révèlent un effet significatif du génotype sur les quatre premières heures d'actimétrie ($F_{(1,62)}$=7,43 ; p=0,0083), particulièrement marqué lors des deux premières heures de test [T1 : WT (n=8), 882±86 ; KO (n=8), 580±70 ; p=0,017] [T2 : WT (n=8), 584±62 ; KO (n=8), 225±64 ; p=0,001] (cf. *fig. 1.C*).

Ces données font apparaître une diminution de l'activité des souris KO β2 lors des premières heures des mesures, ce qui suggère une diminution de la réactivité au changement d'environnement.

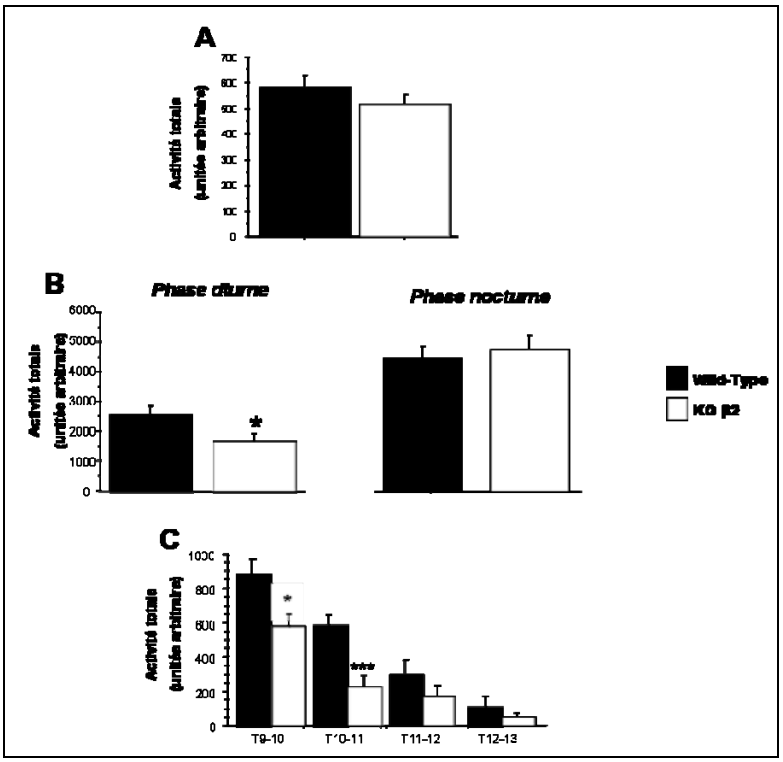


Figure 1 : Données de l'étude d'actimétrie. A : l'activité totale sur 24h montre une diminution d'activité globale chez les souris KO β2 comparée aux souris WT. B : L'analyse entre la phase diurne et nocturne indique une diminution significative de l'activité lors de la phase diurne. C :une analyse plus précise par heure démontre que cette diminution d'activité lors de la phase diurne est principalement marquée lors des premières heures du changement de phase.

Labyrinthe en croix surélevé

Cette épreuve ne révèle aucune différence dans le ratio du nombre d'entrée dans les bras fermés / activité totale entre les souris KO β2 et les souris WT ($F_{(1,18)}$=0,139 ; p=0,7 ; respectivement 0,32±0,6 et 0,35±0,5 ; *n=10* pour chaque groupe). Cependant, on note une diminution significative du comportement exploratoire chez les souris KO β2 par rapport aux WT comme l'indique les diminutions de la latence passée au centre (respectivement 69,9±6,5 sec et 104,5±5,3 sec ; p<0.001) et du nombre de visite des bras (respectivement 22,3±1,4 et 30,1±1,9 ; p=0,004), ainsi que l'augmentation du temps passé dans les bras (respectivement 227,6±6,5 sec et 192,9±5,3 sec ; p<0,001) (cf. *fig. 2*).

Les résultats du labyrinthe en croix surélevé n'indiquent pas de comportement de type anxieux chez les souris KO β2, mais confirment une diminution du comportement exploratoire chez ces souris.

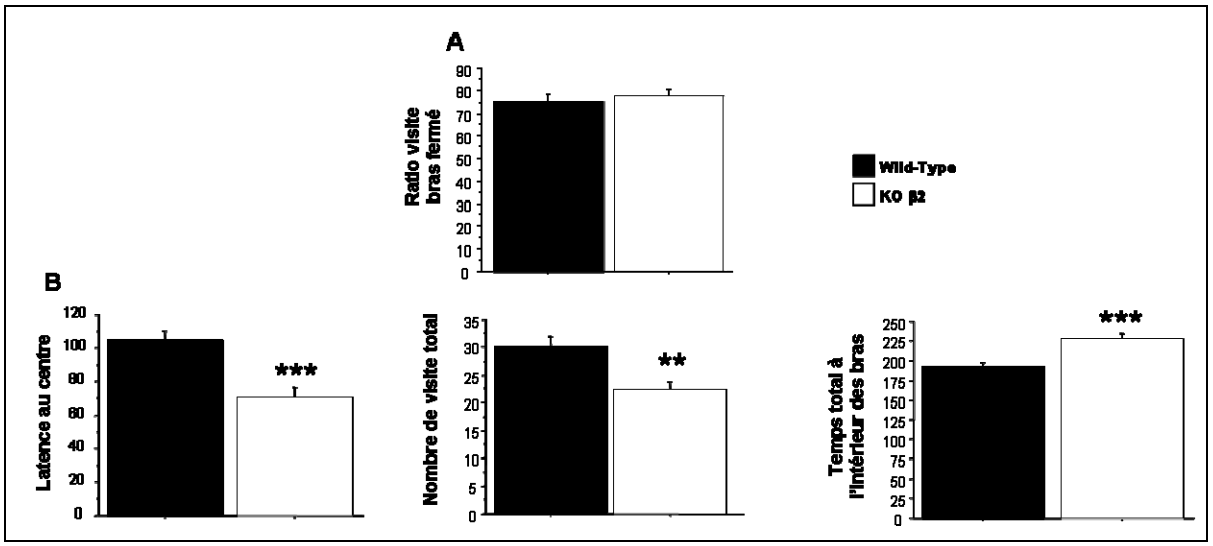


Figure 2 : Données du labyrinthe en croix surélevé. Aucune différence du ratio bras fermé / activité totale n'est observée (A), mais une diminution du comportement exploratoire chez les souris KO β2 apparaît cependant (B).

Exploration libre en planche à huit trous

L'exploration libre en planche à huit trous se déroule pendant une durée de 7 minutes, durant laquelle l'animal peut librement explorer l'appareil. Les mesures effectuées révèlent un effet significatif du génotype ($F_{(1,42)}$=3,98 ; p=0,05). L'analyse détaillée des mesures ne met en évidence qu'une tendance à une diminution de latence de visite chez les souris KO β2 (*n=8* ; 5,2±1) par rapport aux souris WT (*n=8* ; 8,34±1,3 ; p=0,084), alors que les analyses effectuées sur le nombre total de visite [WT : (*n=8*), 22,5±3,2 ; KO (*n=8*), 15,12±3,8 ; p=0,16] et la durée moyenne par visite [WT : (*n=8*), 0,4±0,05 ; KO (*n=8*), 0,37±0,04 ; p=0,64] n'indiquent aucun effet du génotype. (cf. *fig. 3*).

Même si une différence significative est observée entre les souris KO β2 et leurs témoins, le manque de puissance des analyses ne permet pas de conclure à une diminution du comportement exploratoire de ces souris. Cependant, la tendance à la diminution de durée de visite semble conforter nos observations précédentes, et soutient l'hypothèse d'une diminution du comportement exploratoire chez ces souris.

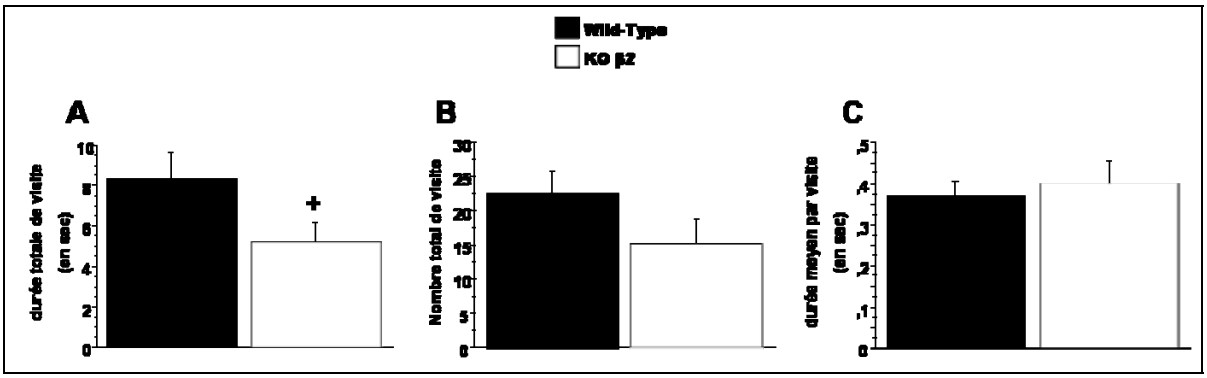


Figure 3 : Résultats de l'exploration libre en planche à huit trous. On observe une tendance à la diminution de la durée totale de visite chez les souris KO β2 (A), sans modification significative du nombre totale de visite (B) et de la durée moyenne par visite (C).

Alternance spontanée

Comme nous l'avons vu précédemment, la mémoire de travail dans ce test dépend du délai et des interférences entre essais (cf. *Bases théoriques IV.B* et *chapitre 1*). De plus, nous avons vu que le S 38232, par son action d'agoniste des nAChR α4β2, permet de restaurer les performances des souris jeunes et âgées (cf. *Chapitre 1 et 2*). Nous nous sommes donc intéressés dans un premier temps à l'effet de la délétion de la sous-unité nicotinique β2 chez des souris jeunes dans le test d'AS.

Les résultats révèlent un effet du délai ($F_{(4,90)}$=4,73 ; p=0,002), un effet du génotype ($F_{(1,90)}$=8,92 ; p=0,004), ainsi qu'une interaction « délai x génotype » significative ($F_{(4,90)}$=2,43 ; p=0,05). Les analyses post-hoc démontrent une diminution des performances des souris KO β2 pour les délais de 5 sec (WT (*n=10*), 76,67±3,7% ; KO β2 (*n=10*), 58,34±5,1% ; p=0,009), et de 30 sec (WT (*n=10*), 76,66±4,4% ; KO β2 (*n=10*), 53,33±4,8% ; p=0,002) (cf. *fig. 4.A*).

L'analyse des performances des souris par bloc d'essais indique un effet génotype sur le 2nd bloc (essai 4+5 : $F_{(4,90)}$=8,89 ; p=0,004) ainsi qu'une interaction délai x génotype ($F_{(4,90)}$=2,92 ; p=0,02). Plus précisément, les résultats sur le 2nd bloc montrent une altération des performances des souris KO β2 lors du délai de 5 sec (WT (*n=10*), 80±11% ; KO β2 (*n=10*), 45±8,9 % ; p=0,02), et 30 sec (WT (*n=10*), 85±7,6% ; KO β2 (*n=10*), 40±6,7% ; p<0,001) (cf. *fig. 4.B*).

Aucune différence n'est observée sur les latences de choix quelque soit le génotype, le délai ou les blocs d'essais (NS dans toutes les analyses).

Globalement, les données de l'alternance spontanée ne permettent pas de conclure à un déficit de la mémoire de travail chez les souris KO β2 jeunes, puisque ni l'augmentation du délai, ni les interférences lors du dernier bloc ne permettent de mettre en évidence un déficit. De manière intéressante, on note cependant un déficit lors des délais courts, résultant d'une altération des performances lors du 2nd bloc d'essais à ces délais. Ce déficit semble davantage résulter d'un problème d'organisation comportementale de type attentionnel, et conforte les données obtenues dans les tests précédents.

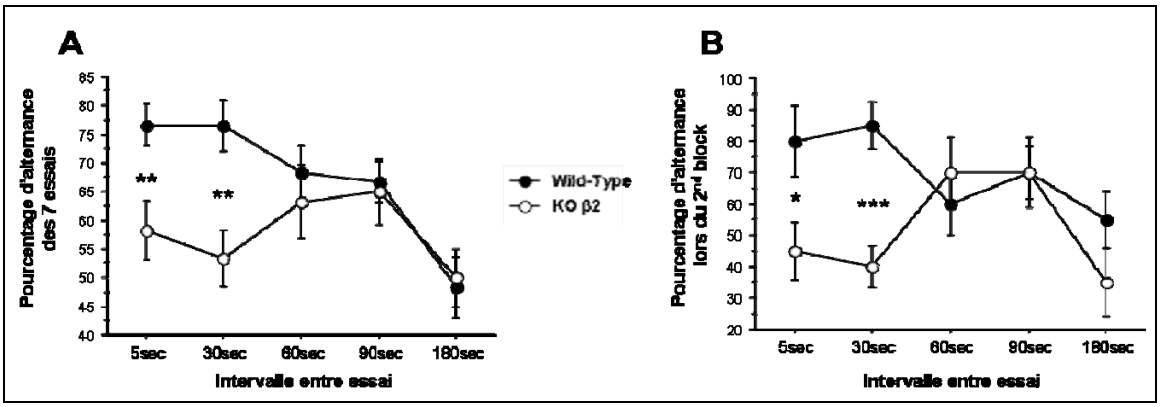


Figure 4 : Alternance spontanée chez des souris KO β2 de 4-5 mois et leurs témoins WT. A : un déficit marqué lors des délais courts (5 et 30 sec) est observé chez les souris KO β2 comparé aux WT. B : plus précisément, ce déficit est particulièrement marqué lors du 2nd bloc d'essais.

Apprentissage spatial en piscine de Morris

Lors de la phase indicée du test de la piscine de Morris, les analyses par ANOVAs avec mesures répétées n'indiquent aucune différence significative entre les souris KO β2 et les WT tant pour ce qui concerne la vitesse de nage ($F_{(1,148)}$=2,3 ; p=0,13), que la distance de nage jusque la plateforme lors des 6 essais ($F_{(1,115)}$=1,9 ; p=0,17). Lors de l'apprentissage indicé, un effet « essai » a été mis en évidence, traduisant une amélioration des performances au fur et à mesure des essais (($F_{(5,115)}$=8,65 ; p<0,001), sans interaction avec le génotype ($F_{(5,115)}$=1,19 ; p=0,32). Ce premier jour de test a permis de montrer que les souris KO β2 ne présentaient pas de déficits moteurs, sensoriels ou motivationnels dans la réalisation de la tâche (cf. *fig. 5.A*).

La phase d'apprentissage réalisée sur les quatre jours suivants confirme l'absence de différence dans la vitesse de nage ($F_{(1,345)}$=0,2 ; p=0,66). L'analyse de la distance de nage jusqu'à la plateforme révèle un effet « essai » ($F_{(5,345)}$=3,89 ; p=0,003), un effet « jour » ($F_{(3,345)}$=17,04 ; p<0,001), ainsi qu'un effet « génotype » ($F_{(1,345)}$=9,43 ; p=0,005). Les résultats sur le facteur « jour » et « essai » indiquent une amélioration de l'apprentissage au

cours des essais et des jours, sans interaction avec le génotype (NS dans toutes les analyses). L'analyse post-hoc réalisée avec le facteur « génotype » indique une distance de nage jusqu'à la plateforme supérieure chez les souris KO β2 comparées aux WT pour chacun des jours tests [jour 1 : KO (*n=13*), 892±62 cm ; WT (*n=12*) 676±66 cm ; p=0,018] ; [jour 2 : KO (*n=13*), 796±61cm ; WT (*n=12*) 464±52 cm ; p<0,001] ; [jour 3 : KO (*n=13*), 585±58 cm ; WT (*n=12*) 370±42 cm ; p=0,004] ; [jour 4 : KO (*n=13*), 525±54 cm ; WT (*n=12*) 348±45 cm ; p=0,014]. Néanmoins, aucune différence significative n'est observée lors du 1er essai du 1er jour [E_1 : KO (*n=13*), 820±146 cm ; WT (*n=12*) 807±163 cm ; p=0,95], ni lors du dernier essai du dernier jour [E_6 : KO (*n=13*), 454±135 cm ; WT (*n=12*) 219±61 cm ; p=0,14]. Les résultats sur E_1 confirment les résultats de l'apprentissage indicé, alors que ceux observés sur E_6 semblent indiquer que les souris KO β2 présentent des performances équivalentes aux souris WT (cf. *fig. 5.B*).

Cette dernière hypothèse est confirmée par l'essai test (« *probe trial* »), lors duquel les souris KO β2 et WT présentent des performances comparables que ce soit pour le temps passé dans le cadran cible où était localisée précédemment la plateforme [KO (*n=13*), 41,4±3 cm ; WT (*n=12*) 41,9±1,9 cm ; p=0,68], et pour le nombre de croisements de la plateforme virtuelle [KO (*n=13*), 3,1±0,6 ; WT (*n=12*) 3,7±0,6 ; p=0,26].

Les résultats obtenus lors de l'apprentissage spatial en piscine de Morris démontrent que, même si les souris KO β2 présentent un retard d'apprentissage, elles réussissent néanmoins à apprendre la localisation de la plateforme avec un niveau de performance comparable aux souris témoins.

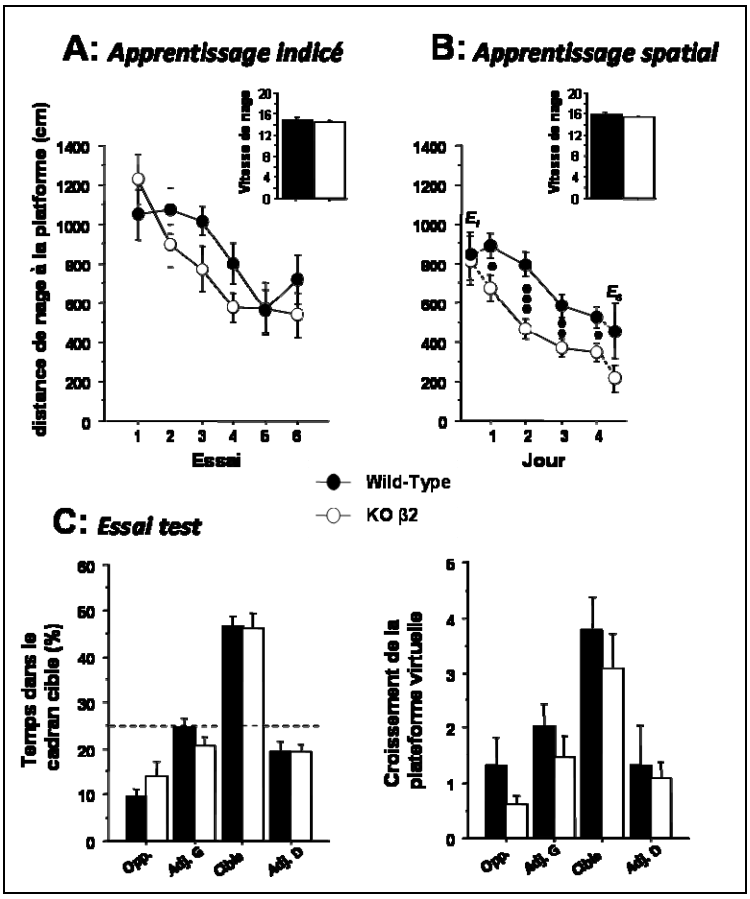


Figure 5 : Apprentissage spatial en piscine de Morris. A : le 1er jour du test réalisé avec une plateforme indicée, permet de vérifier que les souris KO β2 n'ont pas de déficits moteurs, sensoriels ou motivationnels. B : lors de la phase d'apprentissage, les souris KO β2 présentent un retard d'apprentissage sur l'ensemble des quatre jours, même si ces souris ont des performances comparables aux témoins lors du 1er essai du 1er jour (E_1) et du dernier essai du dernier jour (E_6). C : Les résultats de l'essai test (« probe test ») montrent que les souris KO β2 ont appris à localiser l'emplacement de la plateforme de manière comparable aux WT.

Expérience 2 : étude des souris KO β2 à l'âge de 18-19 mois

Les résultats obtenus chez les souris KO β2 jeunes montrent que ces dernières ne présentent pas un déficit de la mémoire de travail comparable à celui observé chez les souris âgées. Nous avons cependant souhaité vérifier si, chez des souris KO β2 âgées de 18-19 mois, le vieillissement pouvait accélérer la détérioration des performances de mémoire de travail.

Les souris KO β2 âgées ne présentent pas de différence significative avec leurs témoins quelque soit le délai étudié ($F_{(1,54)}$=0,017 ; p=0,89), et aucune interaction « génotype x délai » n'est mise en évidence par l'analyse statistique ($F_{(2,54)}$=0,02 ; p=0,98) (cf. *Annexe 4* pour les données détaillées). Cependant, on note un effet du délai ($F_{(2,54)}$=3,32 ; p=0,043) avec des performances plus élevées aux délais de 5 (*n=20*, 68,33±4,2% ; p=0,044) et 30 sec (*n=20*,

70±3,7% ; p=0,021) en comparaison des performances obtenues au délai de 90 sec (*n=20*, 57,5±2,8%) (cf. *fig. 6.A*).

Aucune différence n'est observée sur la latence de choix des animaux en fonction du génotype ($F_{(1,54)}$=0,64 ; p=0,43), contrairement à l'analyse en fonction du délai ($F_{(2,54)}$=2,45 ; p<0,001). Plus précisément, la latence de choix au délai de 5 sec (*n=20*, 45,64±4,1 sec) est supérieure à celles observées avec les délais de 30 (*n=20*, 25,29±2,4 sec ; p<0,001) et 90 sec (*n=20*, 19,28±1,5 sec ; p<0,001) (cf. *fig. 6.B*).

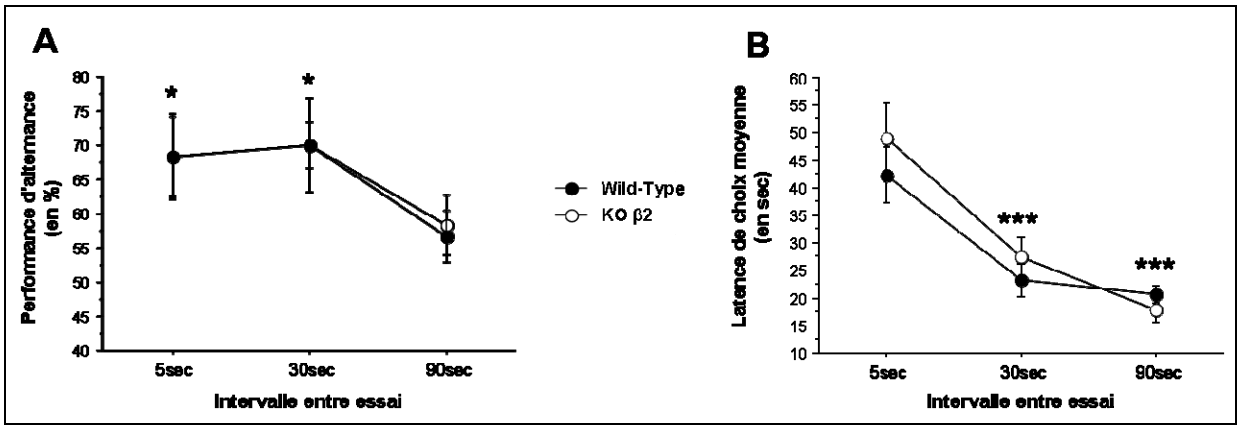


Figure 6 : Alternance spontanée chez les souris KO β2 de 18-19 mois et leurs témoins WT. Aucune différence n'est observée entre les deux génotypes. On note cependant une diminution des performances d'AS au délai de 90 sec (A), ainsi qu'une latence de choix plus élevée au délai de 5 sec (B).

Contrairement aux souris KO β2 jeunes qui présentent un déficit sur les délais courts en comparaison des souris WT jeunes, les souris KO β2 âgées ont un profil d'alternance comparable aux souris WT âgées, caractérisé par un déficit de mémoire de travail délai-dépendant. En raison du potentiel promnésiant plus important du S 38232 chez les souris C57Bl/6 âgées par rapport aux souris jeunes lors de l'AS (cf. *Chapitre 1*), nous avons évalué ce composé chez les souris KO β2 âgées. Notre hypothèse fut qu'en raison de la délétion de la sous-unité β2 (Picciotto et al., 1995), et la spécificité du produit pour le récepteur α4β2 (Lagostena et al., 2010), le S 38232 ne posséderait aucun effet chez ces souris.

L'analyse des résultats pharmacologiques par ANOVA indique un effet du traitement ($F_{(3,28)}$=3,25 ; p=0,036). Comparé aux souris traitées avec le NaCl (n=8, 50±7), celles recevant le S 38232 présentent une augmentation significative de l'alternance, modérée à la dose de 0,3 mg/kg (n=8, 72,92±4,4 ; p=0,018), plus importante à la dose de 1 mg/kg (n=8, 75±7 ; p=0,01), alors que la dose de 3 mg/kg ne possède pas d'effet significatif (n=8, 60,4±7 ; p=0,26). L'analyse par bloc d'essais révèle un effet du S 38232 comparable sur le 2nd bloc (essais 4+5 ; $F_{(3,28)}$=3,16 ; p=0,04), avec un effet modéré à 0,3 mg/kg (n=8, 75±13,4 ; p=0,04),

plus marqué à la dose de 1 mg/kg (n=8, 87,5±8,2 ; 0,006), alors que la dose de 3 mg/kg ne présente pas de différence significative avec le contrôle (respectivement : n=8, 62,5±8,2 et n=8, 43,75±11,3 ; p=0,22). Lors du 3e bloc d'essais (essais 6+7), on note une tendance du S 38232 à améliorer les performances des souris sur l'ensemble des doses en comparaison des souris contrôles ($F_{(3,28)}$=2,54 ; p=0,077 ; cf. *Annexe 5*).

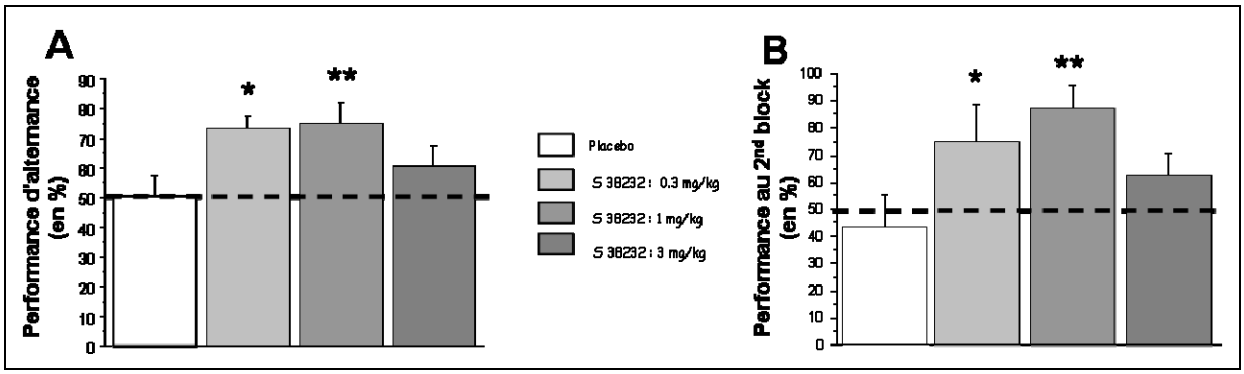


Figure 7 : Performances d'alternance spontanée chez des souris KO β2 de 18-19 mois traitées avec le S 38232. A : les résultats sur l'ensemble des 7essais démontrent un effet du produit aux doses de 0,3 et 1 mg/kg. B : cet effet est particulièrement marqué lors du second bloc d'essais de l'AS.

Contrairement à l'hypothèse de départ, on observe un effet du S 38232 chez les souris KO β2 âgées, malgré sa haute spécificité pour le récepteur α4β2. Nous avons donc souhaité vérifier dans un second temps si cet effet inattendu pouvait s'expliquer par une action du produit sur un récepteur nicotinique autre que le récepteur α4β2. Compte tenu de la faible affinité du S 38232 pour le récepteur α7 (Lagostena et al., 2010), nous avons étudié l'implication de ce récepteur dans l'effet du S 38232 chez les souris KO β2. Pour cela, nous avons utilisé un antagoniste des récepteurs α7 (la méthyllycaconitine, MLA), afin de bloquer l'activation de ces récepteurs lors du traitement avec le S 38232. Dans un premier temps, nous avons vérifié l'effet intrinsèque de la MLA sur les souris Wild-Type et KO β2 âgées.

Suite au traitement des souris par la MLA aux doses de 0,6 – 1,5 – 5 mg/kg, on observe une différence intergroupes non significative, caractérisée par une diminution des performances des souris expérimentales ($F_{(3,59)}$=2,43 ; p=0,074). Cependant, un effet du génotype est observé ($F_{(1,59)}$=8,22 ; p=0,006), ainsi qu'une interaction entre le traitement et le génotype ($F_{(3,59)}$=2,87 ; p=0,044) (cf. *fig. 8*). Ces résultats s'expliquent par une absence d'effet de la MLA chez les souris WT ($F_{(3,28)}$=0,52 ; p=0,67), alors qu'on observe un effet significatif de la MLA chez les souris KO β2 ($F_{(3,31)}$=5,25 ; p=0,004 ; p<0,01 pour chaque dose en comparaison des souris KO β2 traitées avec le NaCl ; cf. *Annexe 6*).

Ces données démontrent que contrairement aux souris Wild-Type, le blocage des récepteurs α7 par la MLA provoque un effet délétère sur les performances d'AS chez les souris KO β2. Cette observation ne permet pas de réaliser un co-traitement MLA + S 38232 afin de vérifier l'hypothèse d'une activité α7 du S 38232 chez les souris KO β2.

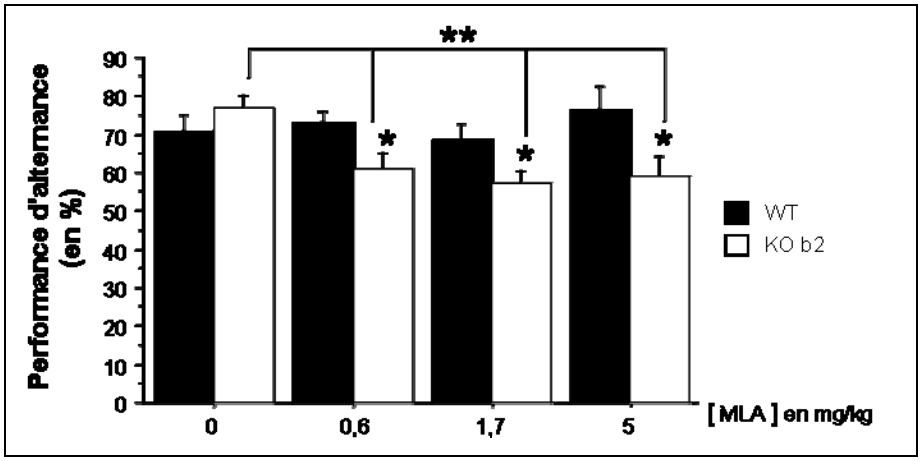


Figure 8 : Effet de la MLA sur les performances d'alternance spontanée chez des souris WT et KO β2 de 18-19 mois. On observe un effet de la MLA spécifiquement chez les souris KO β2.

Expérience 3 : analyse du profil d'expression des sous-unités nicotiniques

Les résultats de l'expérience 2 suggèrent qu'il existe un rôle plus important du récepteur α7 chez les souris KO β2, ce qui pourrait expliquer l'effet du S 38232 observé chez ces souris.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons quantifié les sous-unités α7 et β2 chez des souris génétiquement invalidées pour ces sous-unités. Pour cela, nous avons utilisé une approche biomoléculaire par les techniques de western-blot et de PCR quantitative.

De plus, une altération d'expression de ces sous-unités a été rapportée chez l'Homme lors du vieillissement normal et pathologique (cf. *Bases théoriques III.B.2*). Afin d'étendre l'étude biomoléculaire des sous-unités α7 et β2 au vieillissement, nous avons intégré dans nos analyses des souris C57Bl/6 jeunes (4-5 mois) et âgées (18-19 mois)

Western Blot

Sur des extraits d'hippocampe, la réalisation de western blot avec des anticorps dirigés contre les sous-unités β2 (Ab41174, GTX113654) a révélé une aspécificité de ces anticorps mise en évidence par la présence d'immunomarquage chez les souris KO β2 (avec l'anticorps GTX113654), voire l'absence de marquage (avec l'anticorps Ab41174) (cf. *fig. 9*). Ces

résultats confirment une étude réalisée avec de nombreux anticorps dirigés contre plusieurs sous-unités nicotiniques, et démontrant la difficulté d'obtenir des anticorps spécifiques dirigés contre ces sous-unités (Moser et al., 2007). Ces considérations nous ont amené à utiliser la technique de PCR quantitative.

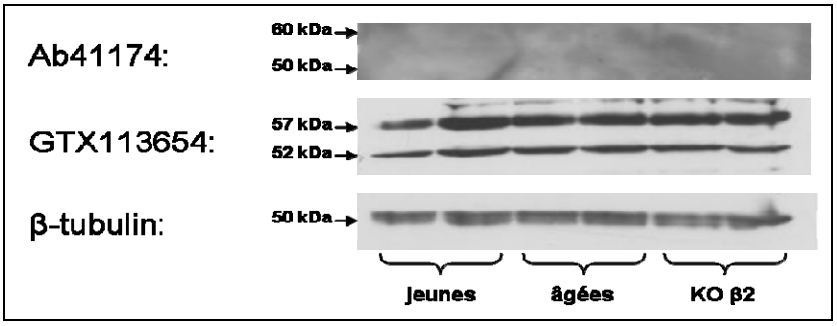


Figure 9 : Immunomarquages réalisés sur extrait d'hippocampe par Western-blot avec deux anticorps dirigés contre la sous-unité nicotinique β2, ainsi qu'un anticorps contre la protéine β-tubulin utilisée comme marqueur de charge. Les résultats démontrent une absence de réactivité de l'anticorps ab41174, ainsi qu'une aspécificité de l'anticorps GTX113654 comme le démontre la présence de marquage chez les souris KO β2.

PCR quantitative

Cette étude a été réalisée par la plateforme technique CNRS de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) de Gif sur Yvette.

La réalisation d'une PCR quantitative avait pour but d'étudier les modifications d'expressions des sous-unités α7 et β2 (nAChR α7 et nAChR β2), dans le cortex préfrontal et l'hippocampe (CPF et HPC), lors du vieillissement (jeunes de 4-5 mois et âgées de 18-19 mois), ainsi que lors de l'invalidation génétique de la sous-unité α7 ou β2 (KO α7 et KO β2 de 4-5 mois).

Globalement, les comparaisons entre les souris C57Bl/6 jeunes et âgées n'indiquent aucune différence, que ce soit au niveau de la sous-unité α7 ou β2 (cf. *fig. 10.A et B* ; cf. *Annexe 7*). Les analyses selon le génotype révèlent une absence d'expression de la sous-unité α7 chez les KO α7, et une expression résiduelle de la sous-unité β2 chez les souris KO β2. Toutefois, cette expression résiduelle semble provenir du type de construction génétique et n'aurait pas de signification biologique fonctionnelle. En effet, afin d'invalider le gène de la sous-unité nicotinique β2, le laboratoire Pasteur a réalisé une construction par remplacement de la séquence ATG par une séquence LacZ (Picciotto et al., 1995). Cette séquence bloque l'initiation de la transcription du gène, et empêche ainsi la synthèse de la sous-unité β2. L'absence du récepteur α4β2 chez les souris KO β2 a été confirmée par des études de liaison radioactive et d'électrophysiologie (Maskos et al., 2005). L'expression résiduelle observée

suite à la qPCR représente en toute probabilité un fragment d'ARN non-fonctionnel situé en amont du promoteur.

Les comparaisons entre structures révèlent un taux d'expression de la sous-unité α7 près de deux fois plus importante dans l'HPC que dans le CPF (cf. *fig. 10.A et B)* (cf. *Annexe 7*). Les analyses sur le taux d'expression de la sous-unité β2 révèlent une quantité plus importante dans l'HPC que dans le CPF, mais cette significativité tient principalement à la très faible variabilité intra-groupe. Ces résultats ne semblent pas rendre compte d'une différence biologique compte tenu de la faible différence d'expression existant entre les groupes (cf. *Annexe 7*).

Contrairement à notre hypothèse de départ, la délétion de la sous-unité nicotinique α7 ou β2 ne produit pas de modification d'expression de l'autre sous-unité en conséquence. De plus, nos résultats démontrent une absence de modification du profil d'expression de ces deux sous-unités lors du vieillissement. La différence majeure observée ici tient à une expression environ deux fois plus importante de la sous-unité α7 dans l'hippocampe par rapport au cortex préfrontal.

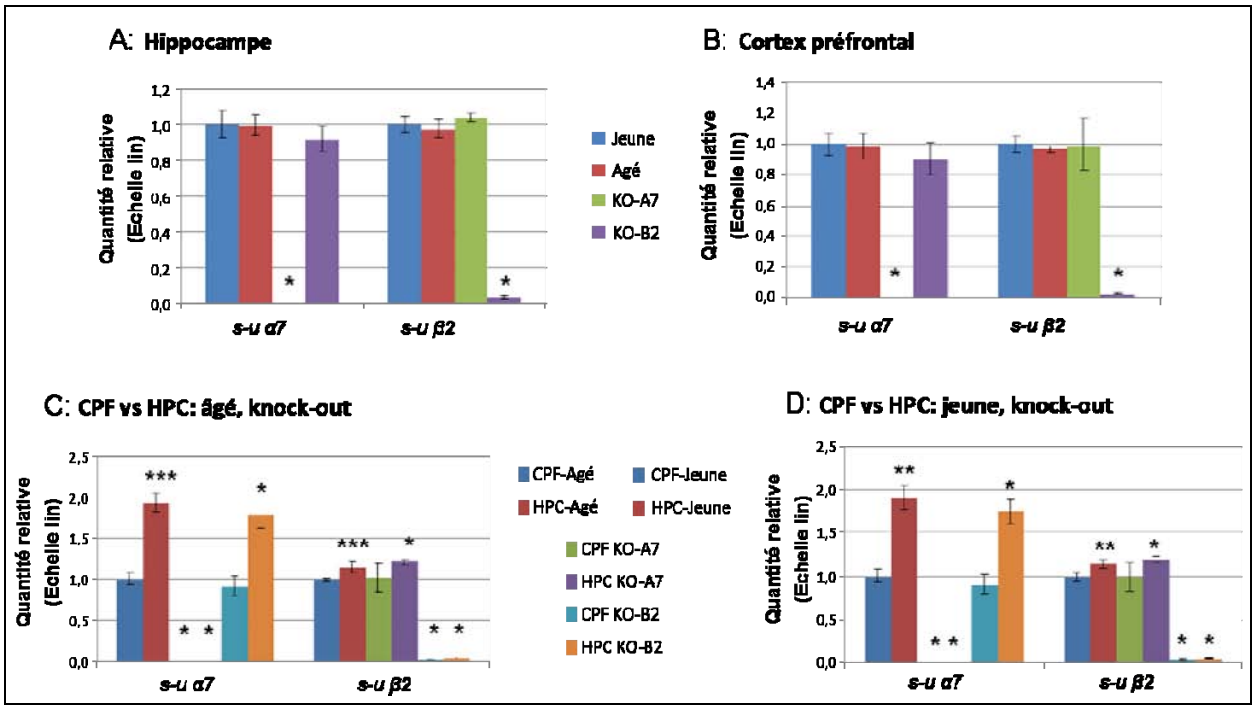


Figure 10 : Résultats de PCR quantitative sur l'expression des sous-unités α7 et β2 dans le cortex préfrontal (CPF) et d'hippocampe (HPC) de souris C57Bl/6 jeunes (4-5 mois, n=8) et âgées (18-19 mois, n=8), ainsi que de souris KO α7 (4-5mois, n=4) et KO β2 (4-5 mois, n=4). Les résultats dans l'HPC (A) et le CPF (B) ne démontrent pas de différence d'expression des sous-unités selon l'âge, et confirme l'invalidation chez les souris knock-out. La comparaison de l'expression entre les structures (C et D) indique une expression de la sous-unité α7 deux fois plus importante dans l'HPC que dans le CPF quelque soit l'âge.

IV. Discussion

Les résultats du *chapitre 2* ont permis de démontrer qu'un agoniste des récepteurs α4β2, le S 38232, permet de diminuer la suractivation préfrontale observée chez les souris âgées, et ainsi d'augmenter leurs performances lors de la réalisation d'une tâche de mémoire de travail spatiale. Le *chapitre 3* visait à déterminer l'implication de la sous-unité nicotinique β2 dans les processus cognitifs, ainsi que son rôle dans l'effet procognitif du S 38232.

De nombreuses études ont démontré le rôle des récepteurs nicotiniques, et plus particulièrement du récepteur α4β2, dans les processus cognitifs. L'injection intra-hippocampique de la mécamylamine, un antagoniste nicotinique aspécifique, provoque un déficit de mémoire de travail (Levin et al., 2002 ; Ohno et al., 1993). De la même manière, le blocage spécifique des récepteurs β2 ou α7 dans l'hippocampe entraîne une altération des performances mnésiques (Bancroft et Levin 2000 ; Bettany et Levin 2001 ; Levin et al., 2002 ; Nott et Levin 2006). Dans le cortex préfrontal, l'injection de ces produits est également responsable d'un déficit de mémoire de travail (Chan et al., 2007 ; Granon et al., 1995).

Dans ce chapitre, nous avons étudié le rôle du récepteur α4β2 grâce à l'utilisation de souris génétiquement modifiées n'exprimant plus la sous-unité β2 (knock-out β2), et par voie de conséquence ne possédant plus le récepteur nicotinique α4β2.

Expérience 1 : étude comportementale sur les souris KO β2 de 4-5 mois

Dans un premier temps, nous avons caractérisé le profil cognitif des souris KO β2. Les résultats obtenus semblent indiquer chez ces souris un déficit d'organisation comportementale, traduit notamment par une diminution de la réactivité à un environnement nouveau, une diminution du comportement exploratoire, un déficit d'alternance lors de délais courts, ainsi qu'un retard d'apprentissage spatial. L'ensemble de ces données suggère un déficit de type préfrontal provoqué par la délétion de la sous-unité β2.

Nos observations sont en accord avec des études précédentes ayant montrées chez ces souris une diminution de la flexibilité comportementale (Granon et al., 2003 ; Changeux 2006 ; Maubourguet et al., 2008). Ces travaux ont ainsi montré que ces animaux présentent une diminution du temps passé à explorer un nouvel environnement, en accord avec nos résultats d'actimétrie, de labyrinthe en croix surélevé et d'exploration libre en planche à huit

trous. De plus, l'analyse fine du comportement exploratoire de ces souris en open-field met en évidence une diminution des instants « stops » chez ces souris, ce qui serait le reflet d'une impulsivité plus grande (Maubourguet et al., 2008). Cette observation pourrait rendre compte de nos résultats dans l'alternance spontanée, qui révèlent un déficit des souris KO β2 par rapport à leurs témoins wild-type uniquement lors de délais courts. L'augmentation de l'intervalle entre essais permet alors de restaurer des performances élevées d'alternance, probablement par la diminution du comportement impulsif de ces souris. Nos résultats lors d'un apprentissage spatial en piscine sont en contradiction avec l'étude de Zoli et collaborateurs ayant montré une absence de déficit chez les souris KO β2, excepté à un âge avancé de 22-24 mois (Zoli et al., 1999). Cependant, nos données sont en accord avec l'absence de déficit d'apprentissage, puisque dans notre épreuve, les souris KO β2 finissent par localiser l'emplacement de la plateforme à un niveau équivalent aux souris wild-type. Le retard d'apprentissage observé peut s'expliquer par la taille plus importante de la piscine dans notre étude, ce qui potentialiserait la difficulté à réaliser la tâche au début de l'apprentissage. Encore une fois, cette altération est probablement le reflet d'une perturbation d'organisation comportementale des souris KO β2.

Contrairement à l'hypothèse envisagée, la délétion de la sous-unité β2 ne provoque pas de déficit cognitif comparable à celui observé lors du vieillissement. Les souris jeunes invalidées pour la sous-unité β2 présentent une organisation comportementale différente des souris Wild-type, caractérisée notamment par une impulsivité qui pourrait expliquer les différentes altérations observées dans les différents tests que nous avons effectués. La délétion de la sous-unité β2 provoque donc un déficit cognitif de type préfrontal. Une des explications proposées impliquerait une altération de la transmission dopaminergique consécutive à la modification génétique (Avale et al., 2008).

Expérience 2 : étude des souris KO β2 à l'âge de 18-19 mois

L'absence de déficit cognitif comparable aux effets du vieillissement chez les souris KO β2 jeunes nous a conduits à étendre aux souris de 18-19 mois notre étude afin de vérifier si la délétion de la sous-unité β2 pouvait accentuer l'effet délétère de l'âge sur la mémoire de travail.

Les souris KO β2 de 18-19 mois ne présentent aucune différence par rapport aux souris Wild-type du même âge. Contrairement aux souris KO β2 jeunes, les souris âgées ne présentent pas de déficit d'alternance pour les délais courts. En considérant le ralentissement

psychomoteur observé lors du vieillissement, il est concevable de penser qu'une diminution de l'impulsivité motrice chez les souris âgées pourrait conduire à une diminution du déficit attentionnel observé chez les souris KO β2 jeunes, même si aucune différence significative n'a pu être mise en évidence dans nos expériences.

Compte tenu des résultats du *chapitre 1* démontrant un effet procognitif plus important du S 38232 chez les souris C57Bl/6 âgées, nous avons voulu vérifier la spécificité de cet agoniste α4β2 chez les souris KO β2 âgées. Or, contrairement à l'hypothèse émise, le traitement des souris invalidées pour le récepteur α4β2 produit une amélioration des performances chez ces souris. Les données de la littérature décrivent le S 38232 comme un agoniste spécifique des récepteurs α4β2 (Lagostena et al., 2010), alors que sa faible activité sur le récepteur α7 caractérisée *in vitro* ne semble pas être effective lors d'études *in vivo* (Howe et al., 2010). Cependant, il est concevable que chez les souris KO β2, l'absence constitutive du récepteur α4β2 puisse provoquer une augmentation d'expression ou de fonctionnalité du récepteur α7. En effet, ce dernier est connu pour être également impliqué dans de nombreux processus cognitifs, notamment la mémoire de travail (Chan et al., 2007 ; Granon et al., 1995). De plus, la stimulation chronique du récepteur α7 chez les souris KO β2 permet de restaurer la sensibilité à la nicotine, normalement intégralement dépendante du récepteur α4β2 (Picciotto et al., 1995 ; Besson et al., 2007 ; Maskos et al., 2005).

Nous avons donc réalisé un blocage pharmacologique des récepteurs α7 chez les souris KO β2 âgées ainsi que les témoins WT. Cette expérience préliminaire visait à étudier les effets intrinsèques de la MLA sur la mémoire de travail, afin de procéder par la suite à la co-administration S 38232 / MLA. Cette derbière expérience nous aurait ainsi permis d'étudier l'action du S 38232 suite au blocage spécifique du récepteur α7. Or, l'analyse des résultats a révélé une absence d'effet de la MLA chez les souris WT, mais un effet délétère marqué chez les souris KO β2. Ces données, bien qu'empêchant la réalisation de l'étude d'un traitement conjoint S 38232 / MLA, semblent confirmer un rôle plus important du récepteur α7 en l'absence de la sous-unité β2. En accord avec des études précédentes, le récepteur α7 serait stimulé de façon chronique en l'absence de la sous-unité β2, ce qui potentialiserait son implication dans les processus cognitifs (Besson et al., 2007 ; Besson et al., 2008 ; Maskos et al., 2005).

Expérience 3 : analyse du profil d'expression des sous-unités nicotiniques

Afin d'approfondir cette hypothèse, nous avons évalué par des techniques biomoléculaires la quantité des sous-unités nicotiniques β2 et α7 par Western-blot, ainsi que leurs niveaux d'expression par PCR quantitative. En plus de souris invalidées pour la sous-unité β2, nous avons intégré à cette analyse des souris invalidées pour la sous-unité α7 (KO α7) afin de voir les conséquences de l'absence d'une sous-unité sur la seconde. De plus, des études chez l'Homme ont décrit une diminution d'expression de ces sous-unités lors du vieillissement normal et pathologique (cf. *Bases théoriques III.B.2)*. Nous avons donc inclus dans cette analyse des souris C57Bl/6 de 4-5 mois et 18-19 mois, afin d'étudier l'impact du vieillissement sur les sous-unités nicotiniques.

Lors de la réalisation des expériences de Western-blot, nous nous sommes heurtés à la difficulté d'obtenir des anticorps spécifiques. Une publication précédente a décrit la non spécificité en Western-blot et immunohistochimie de nombreux anticorps dirigés contre de multiples sous-unités nicotiniques (Moser et al., 2007). Cependant, nous avons évalué deux autres anticorps anti-β2 non testés chez les souris KO β2, et dirigés contre des séquences différentes des anticorps précédemment décrits. Encore une fois, les anticorps se sont révélés inactifs ou aspécifiques puisque présentant une immunoréactivité égale chez les souris témoins et KO β2.

L'existence de sondes spécifiques pour les ARNm des sous-unités β2 et α7 a permis l'analyse du niveau d'expression de ces sous-unités dans le cortex préfrontal et l'hippocampe. Contre toute attente, les résultats n'ont révélé aucune modification que ce soit suite à l'invalidation des sous-unités β2 ou α7, ou lors du vieillissement. Nos résultats semblent contredire des donnés obtenues chez l'Homme (Picciotto et Zoli 2002 ; Gotti et al., 2006) et l'animal (Utsugisawa et al., 1999 ; Tohgi et al., 1998 ; voir aussi Picciotto et Zoli 2002). Cependant, le fait que les études chez l'Homme soient majoritairement réalisées chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer peut expliquer les différences observées. Dans celles réalisées chez l'animal âgé, la diminution de quantité des sous-unités nicotiniques reste très modérée, et la différence d'âge ou d'espèce pourrait rendre compte de nos données. Les résultats obtenus chez les souris KO β2 ou α7 sont plus surprenants, et ne permettent pas d'expliquer l'augmentation de fonctionnalité suggérée par nos expériences pharmacologiques. Cependant, le taux d'expression ne rend pas compte de la sensibilité pharmacologique des

récepteurs, et on peut émettre l'hypothèse que ces récepteurs puissent être modifiés au niveau de leur affinité et/ou efficacité suite à la suppression de l'un d'entre eux.

Conclusion

L'étude des souris invalidées pour la sous-unité β2 a révélé une grande complexité dans le rôle et la régulation des récepteurs nicotiniques. Bien que présentant un déficit de type attentionnel, caractérisé par une désorganisation comportementale, les souris KO β2 jeunes ne présentent pas d'altération des fonctions mnésiques. De plus, le vieillissement chez ces souris n'accentue pas les déficits de mémoire de travail observés chez les souris Wild-type. La délétion de la sous-unité β2 ne conduit donc pas à un profil comportemental comparable au vieillissement normal ou pathologique. Il a été suggéré que ces souris seraient plutôt un modèle adapté à l'étude des déficits observés dans les TDAH (**T**rouble **D**éficit de l'**A**ttention / **H**yperactivité) (Granon et Changeux 2006 ; Besson et al., 2008), voire dans l'autisme (Changeux 2006 ; Maubourguet 2008).

Cependant, bien que ne permettant pas une étude directe du vieillissement, ces souris n'en restent pas moins un modèle d'étude des propriétés des récepteurs nicotiniques. Ainsi, l'utilisation d'un agoniste spécifique des récepteurs α4β2 a révélé un effet promnésiant même en l'absence du récepteur. La possibilité d'un rôle potentialisé des récepteurs α7 chez les souris KO β2 semble confirmée par l'altération de leurs performances de mémoire de travail suite à l'injection d'un antagoniste α7, alors que le même composé ne possède pas d'effet mnésique chez les souris Wild-type.

Les analyses biomoléculaires par PCR quantitative n'ont cependant pas révélé de modification d'expression des sous-unités α7 et β2 chez des souris KO β2 ou α7. De plus, le vieillissement chez des souris C57Bl/6 n'induit pas non plus de changement dans le profil d'expression de ces sous-unités. L'analyse plus détaillée du profil pharmacologique (affinité, sensibilité, spécificité, efficacité, etc…) de ces récepteurs chez les animaux génétiquement modifiés, et lors du vieillissement, pourrait permettre de mettre en évidence des modifications moléculaires subtiles. Des études par des méthodes de liaison (« *binding* ») moléculaire et d'électrophysiologie sont actuellement envisagées afin de répondre à ces hypothèses.

Discussion générale et perspectives

Discussion générale et perspectives

I. Altération de la mémoire de travail lors du vieillissement 170

Contexte de l'étude 170

Le modèle d'étude de la mémoire de travail 171

Activation cérébrale lors de l'AS 173

Modification du profil d'activation lors du vieillissement 174

Mécanismes moléculaires liés au déficit de la MDT 175

Perspectives 175

II. Effets promnésiants des traitements pharmacologiques. 176

Modification pharmacologiques de l'activation cérébrale 177

Mécanisme d'action potentiel du donepezil 177

Hypothèses du mécanisme d'action du S 38232 178

Modulation pharmacologique de l'activité préfrontale 178

Perspectives 179

III. Le récepteur α4β2, rôle dans la MDT et le vieillissement 179

Profil comportemental des souris KO β2 180

Conséquences pharmacologiques de la délétion du nAChR-α4β2 181

Perspectives 182

IV. Conclusion 182

La mémoire de travail est un processus permettant la rétention temporaire, la manipulation et la restitution d'informations dans un but dirigé, ou leur stockage à long terme (cf. *Bases théoriques I.C.3*). Cette mémoire, principalement décrite comme dépendante du cortex préfrontal, fait également intervenir d'autres structures telles que l'hippocampe (cf. *Bases théoriques I.D, II.C*). Lors du vieillissement, on note une atteinte de ces structures cérébrales et de leurs systèmes de neurotransmission (cf. *Bases théoriques III*). Ce processus s'accompagne d'une altération des performances mnésiques, particulièrement marquée lors de la réalisation de tâches de mémoire de travail. Afin de pallier ces déficits, les principales molécules développées ont eu pour but de compenser les atteintes des différents systèmes de neurotransmission, et particulièrement du système cholinergique. Cependant, l'efficacité limitée des traitements utilisés depuis plusieurs décennies, a conduit à revoir la stratégie visant à compenser les déficits de neurotransmission, par l'utilisation de molécules plus spécifiques. En se basant sur ces considérations, nos travaux ont eu pour objectif de comprendre le mécanisme d'action de molécules promnésiantes.

Pour cela, nous avons tout d'abord développé un modèle d'étude de la mémoire de travail lors du vieillissement chez la souris. La validation comportementale et pharmacologique du modèle nous a ensuite permis de définir les molécules ayant le potentiel promnésiant le plus important.

L'étude des profils d'activation cérébrale lors de l'alternance spontanée a confirmé l'importance de l'hippocampe et plus particulièrement du cortex préfrontal dans la mémoire de travail et l'altération de son fonctionnement lors du vieillissement. De plus, la réalisation de traitements pharmacologiques a permis de démontrer la possibilité de pallier les effets mnésiques liés à l'âge, en modulant l'activité de ces structures.

Finalement, afin de comprendre le mécanisme d'action du S 38232 et de son récepteur cible nAChR-α4β2, nous avons réalisé une étude à l'aide de souris génétiquement invalidées pour la sous-unité β2.

I. Altération de la mémoire de travail lors du vieillissement

Contexte de l'étude

Il ressort des nombreuses études réalisées chez l'Homme une profonde altération de la mémoire de travail lors du vieillissement (cf. *Bases théoriques III.A.2*). D'un point de vue cognitif, cette altération se caractérise par une augmentation de la sensibilité aux

interférences, principalement due à une incapacité à supprimer les informations non pertinentes (Gazzaley et al., 2005 ; Hogge et al., 2008). D'un point de vue fonctionnel, on note de nombreuses modifications pouvant résulter d'une réorganisation fonctionnelle consécutive à l'altération structurelle. Globalement, on note une augmentation d'activité au niveau des régions préfrontales (Davis et al., 2008 ; Leshikar et al., 2010), ainsi que le recrutement d'aires cérébrales additionnelles (Park et Reuter-Lorenz, 2009 ; Cappell et al., 2010) probablement dans le but de compenser les différentes modifications cérébrales causées par le vieillissement. La mise au point d'un modèle d'étude de la mémoire de travail lors du vieillissement se doit par conséquent de reproduire ces caractéristiques, afin de présenter les différentes validités nécessaires à l'étude des altérations liées à l'âge et au développement de molécules thérapeutiques visant à pallier ces déficits (cf. *Bases théoriques IV.A*).

Le modèle d'étude de la mémoire de travail

L'utilisation du test d'alternance spontanée nous a permis de montrer que d'un point de vue comportemental, les résultats observés chez la souris âgée présentent des caractéristiques communes avec l'atteinte de la mémoire de travail observée chez l'Homme. En effet, on note une ***diminution du délai nécessaire pour induire un oubli chez les souris âgées, ainsi qu'une augmentation de la sensibilité aux interférences proactives***. Ces données sont comparables à celles obtenues chez des souris jeunes mais avec des délais plus importants. Il en ressort que les souris âgées présentent une altération de la mémoire de travail, caractérisée par une atteinte plus rapide des limites cognitives (capacité à gérer des informations séquentielles) et mnésiques (sensibilité accrue aux effets délétères du délai entre essais). Ces résultats chez l'animal sont comparables à ceux obtenus chez l'Homme dans de nombreux tests (Gazzaley et al., 2005 ; Cappell et al., 2010), notamment ceux ayant permis l'élaboration du modèle CRUNCH, théorie stipulant que les sujets âgés recrutent davantage de ressources cognitives afin d'accomplir des tâches qui en nécessitent moins chez les sujets jeunes (Reuter-Lorenz et Cappell, 2008 ; Schneider-Garces et al., 2010 ; cf. *Bases théoriques III.A.2*).

Le caractère spontané du modèle comportemental utilisé dans cette étude ne pourrait-il pas induire un déficit de motivation qui pourrait rendre compte des déficits ? Il semblerait que non. En effet, l'alternance spontanée, en se basant sur un comportement implicite, utilise une motivation innée intrinsèque chez les rongeurs (et notamment la souris) à se diriger vers la nouveauté (Douglas, 1966 ; Egger, 1973 ; Beracochea, 1984). De plus, le fait que des

animaux âgés de 18-19 mois et 23-24 mois alternent de manière comparable à des souris de 4-5 mois lors d'intervalles entre essais courts indiquent une motivation intacte chez ces animaux.

On peut également se questionner sur le processus cognitif mesuré par l'AS. Plusieurs études ont ainsi montré que la mémoire de travail comme l'attention étaient impliquées dans la réalisation de la tâche (pour revue voir Lalonde, 2002). Selon notre protocole et les données obtenues, nous pouvons supposer que lors de délais courts, l'attention joue un rôle primordial dans les performances, comme le montre le déficit d'alternance pour les délais de 5 et 30 secondes chez les souris knock-out β2, présentant un déficit de type attentionnel (Granon et Changeux, 2006; Besson et al., 2008 ; cf. *Chapitre 3, Expérience 1*). Cependant, et ce indépendamment du délai, on note une diminution des performances plus prononcée sur les derniers blocs d'essais. Ceci démontre que même si l'attention joue un rôle, la mémoire de travail reste un processus primordial à la réalisation de la tâche.

De plus, même si les modèles de Baddeley et de Cowan ne coïncident pas en tout point, chacun décrit l'attention comme un processus cognitif inhérent à la mémoire de travail (cf. *Bases théoriques I.C.3*). Ainsi, selon Baddeley l'attention permettrait le maintien de l'information dans le tampon épisodique afin de permettre son utilisation de manière adéquate. Cowan quant à lui décrit l'attention comme le processus permettant d'aller rechercher l'information au sein même de la mémoire. Même si ces deux modèles diffèrent sur le rôle de l'attention dans la MDT, ils s'accordent néanmoins sur le fait que l'attention et la MDT sont intrinsèquement liées, et qu'ils dépendent tout deux du cortex préfrontal et de ses relations avec l'hippocampe. En s'appuyant sur ce constat, on peut définir l'AS comme un modèle d'étude de la mémoire de travail, ce qui est renforcé par le fait que nos résultats démontrent également l'implication primordiale du CPF et le rôle de l'HPC dans la réalisation du test d'alternances séquentielles (cf. C*hapitre 2, Expérience 1*).

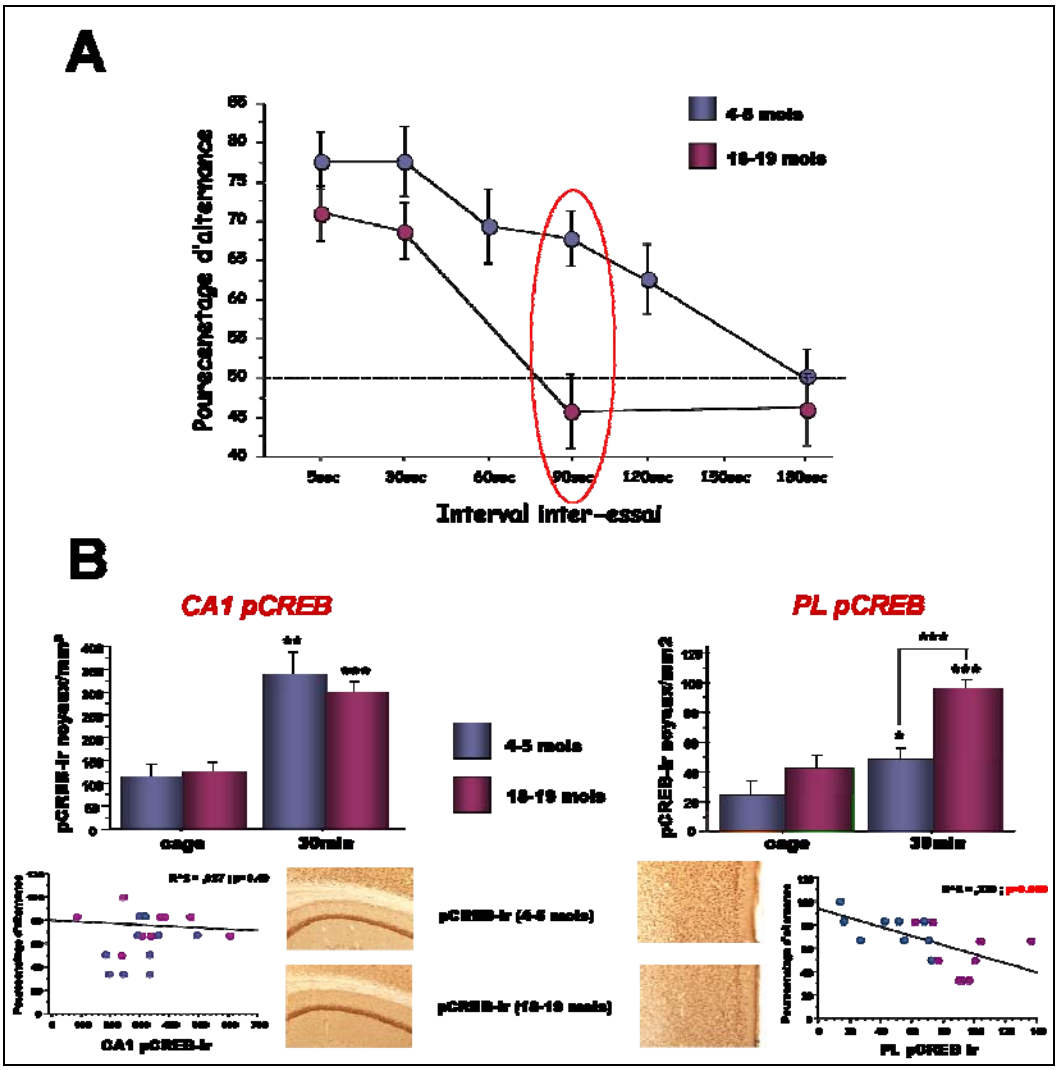


Figure 1 : Résumé des résultats obtenus sur le modèle d'alternance spontanée. A : on observe une accélération de l'effet délétère du délai chez les souris âgées. B : Suite à l'AS réalisée avec un IEE = 90 sec, les résultats immunohistochimiques indiquent une activation de l'HPC indépendamment de l'âge des animaux, ainsi qu'une suractivation spécifique du PL chez les souris âgées. De plus, on observe une corrélation inverse entre les performances d'alternance et la phosphorylation de CREB dans le PL.

Activation cérébrale lors de l'AS

L'utilisation, par immunohistochimie, de la protéine pCREB comme marqueur d'activité neuronale a révélé l'***implication du cortex préfrontal et de l'hippocampe dans l'alternance spontanée***. Cette observation neurofonctionnelle confirme les résultats obtenus par des approches lésionnelles quant à l'implication de ces structures dans l'AS et plus largement dans des tâches de mémoire de travail spatiale (Dalland, 1976 ; Stevens et Cowey, 1973 ; Delatour et Gisquet-Verrier, 1996 ; Divac, 1975 ; Sanchez-Santed et al., 1997 ; Granon et al., 1995, 1996). Nos propres résultats chez la souris jeune démontrent que l'inactivation du cortex prélimbique abolit la capacité à alterner des animaux (cf. *Chapitre 2, Expérience 3*).

En accord avec des études précédentes, l'absence d'activation du striatum renforce l'hypothèse de l'utilisation d'une stratégie spatiale hippocampe-dépendante, plutôt qu'une stratégie procédurale striatum-dépendante lors de cette tâche de mémoire de travail spatiale (Egger, 1973 ; Douglas, 1975 ; Sanchez-Santed et al., 1997 ; Dalland, 1976). De plus, dans cette épreuve, l'état émotionnel des animaux n'apparaît pas modifié par le test ou l'âge des souris comme l'indique l'absence d'augmentation de la phosphorylation de CREB dans l'amygdale. La procédure d'habituation permet probablement d'éviter une augmentation du niveau d'anxiété des animaux lors de la phase test, qui pourrait modifier le niveau d'éveil émotionnel connu pour influencer les fonctions cognitives (Browning et al., 2010 ; Dolan, 2002 ; Gyurak et al., 2011) notamment lors du vieillissement (Mather et Carstensen, 2005 ; Pardon, 2007 ; Pardon et Rattray, 2008 ; Tronche et al., 2010).

Modification du profil d'activation lors du vieillissement

On observe cependant un effet spécifique du vieillissement sur le cortex préfrontal (CPF). Parallèlement à la diminution des performances d'alternance, l'immunohistochimie révèle une augmentation spécifique de l'activation du cortex prélimbique chez les souris de 18-19 mois. De plus, l'analyse combinée des performances d'AS avec l'immunoréactivité pCREB révèle une forte corrélation négative, ***qui met en évidence un lien profond entre la suractivation du CPF et l'altération des performances d'alternance***. Ces résultats sont en accord avec ceux de Ramos et collaborateurs (2003) démontrant une augmentation de la phosphorylation de CREB chez le rat âgé, ainsi qu'une altération des performances de la MDT chez le rat et le singe suite à la phosphorylation de CREB induite de manière pharmacologique dans le CPF. Notre étude, en plus d'élargir ces résultats à la souris âgée, démontre ***en situation comportementale le lien entre la suractivation du cortex prélimbique et l'altération des performances de MDT parallèlement au vieillissement***.

Ces données sont à rapprocher de celles obtenues chez l'Homme réalisées par imagerie fonctionnelle. Une modification des profils d'activation cérébrale a été décrite chez l'Homme lors du vieillissement, et plus précisément lors de tâches de mémoire de travail. Ces études montrent une augmentation de l'activité préfrontale chez les sujets âgés, interprétée comme la mise en place d'un mécanisme compensatoire (pour revue voir Bishop et al., 2010). Toutefois, chez l'Homme, cette suractivation apparaît à la limite des capacités cognitives et non une fois les performances altérées (Mattay et al., 2006 ; Cappell et al., 2010) ; par contre, chez les souris âgées, la suractivation préfrontale est observée en situation de déficit de la MDT. Cette différence est probablement due à la méthode d'observation de l'activité

cérébrale qui est en temps réel chez l'Homme, alors que dans notre étude, l'observation se fait par un marqueur des cascades intraneuronales recrutées consécutivement à l'activation cérébrale. Globalement, nos données s'accordent néanmoins à celles obtenues chez l'Homme sur le lien essentiel entre la suractivation préfrontale et l'altération des performances de la MDT observée lors du vieillissement.

Mécanismes moléculaires liés au déficit de la MDT

Les cascades intracellulaires sont particulièrement importantes dans les processus mnésiques, et la balance kinase/phosphatase apparaît comme un mécanisme régulateur différentiel entre les mémoires de travail et à long terme (cf. *Bases théoriques II.D*). Lors de tâches de MDT, un processus de mise à jour des informations est nécessaire au fur et à mesure de la tâche. Par leur fonction de maintien actif de l'information, les kinases présentent dans le CPF seraient ainsi responsables d'un effet d'interférence proactive. Les phosphatases, à l'inverse, permettraient le processus d'actualisation des informations essentiel à la MDT (Dash et al., 2007 ; Runyan et al., 2005). En accord avec ces propositions, notre étude démontre que 30 minutes après le début du test, il existe une ***augmentation de la phosphorylation de la protéine CREB dans le cortex prélimbique parallèlement à la diminution des performances chez les souris âgées***.

Contrairement à d'autres études, nous n'observons pas de second pic de phosphorylation à un délai plus tardif (Bernabeu et al., 1997 ; Porte et al., 2008b). Cependant, ces études réalisées sur la MLT ont montré que ce second pic permettait un mécanisme de consolidation de l'information. Notre étude portant sur la MDT, la consolidation et donc le second pic d'activation, n'apparaissent pas nécessaires et pourraient même être délétères.

Perspectives

Nous avons démontré que pour le délai de 180 secondes, les souris jeunes répondent également au niveau du hasard. Il serait intéressant d'étudier le profil d'activation cérébrale dans ces conditions. En accord avec les données chez l'Homme, il est envisageable que nous observions une suractivation préfrontale comparable à celle présentée par les souris âgées au délai de 90 secondes. Cependant, en raison du délai plus important, il est possible que d'autres structures, telles que l'hippocampe, soient recrutées de manière plus active afin de permettre un maintien de l'information (pour revue voir Kesner, 2005).

Des études récentes au sein de l'équipe indiquent une variabilité plus importante des performances d'AS chez des souris de 14 mois. L'étude immunohistochimique chez des

souris de cet âge pourrait permettre de mettre en évidence une suractivation du PL chez les souris déficitaires par rapport à celles réussissant la tâche. Notre modèle pourrait alors permettre de discriminer des souris dont la MDT est précocement altérée avec l'âge, afin de pouvoir étudier plus en détail les mécanismes à l'origine de cette atteinte cognitive prématurée.

II. Effets promnésiants des traitements pharmacologiques.

Suite à l'étude pharmacologique effectuée lors du *chapitre 1*, deux composés ciblant le système cholinergique ressortent comme particulièrement actifs chez les souris âgées: le ***donepezil, inhibiteur de l'acétylcholinestérase*** utilisé pour le traitement des formes légères à modérément sévères de la maladie d'Alzheimer, ainsi que le ***S 38232, agoniste des nAChR-α4β2***.

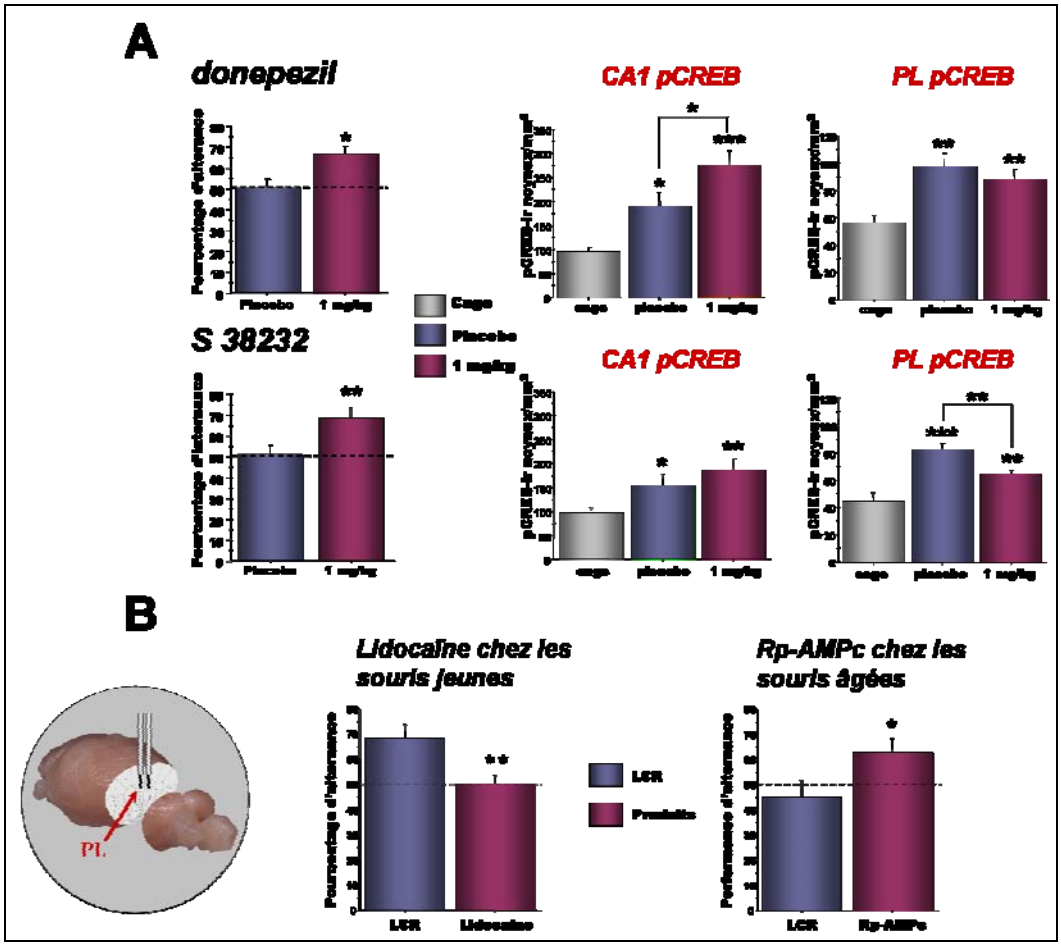


Figure 2 : Résumé des principales données pharmacologiques. A : le donepezil et le S 38232 restaurent les performances des souris âgées par des mécanismes neurofonctionnels différents. B : Bien que l'activation du cortex prélimbique soit nécessaire à la réalisation de la tâche d'AS, l'inhibition spécifique de la phosphorylation de CREB permet de restaurer les performances des souris âgées.

Modifications pharmacologiques de l'activation cérébrale

En se basant sur les données immunohistochimiques ayant montré un lien entre la suractivation du cortex prélimbique et l'altération des performances des souris âgées, nous avons étudié le profil d'activation cérébrale de souris âgées traitées avec ces deux composés cholinergiques. Le donepezil et le S 38232 restaurent les performances d'alternance chez les souris âgées, en agissant de manière différente sur le cortex préfrontal et l'hippocampe. Ainsi, ***le donepezil entraine une augmentation de la phosphorylation de CREB dans le CA1*** hippocampique, alors que ***le S 38232 permet de diminuer la suractivation de CREB au niveau prélimbique***. Ces résultats confortent l'hypothèse d'une balance kinase/phosphatase ayant un rôle régulateur opposé entre le cortex préfrontal et l'hippocampe.

Les mécanismes par lesquels ces composés modulent l'activité de ces deux structures clés de la MDT ne sont pas élucidés, mais plusieurs hypothèses peuvent être avancées. L'acétylcholine possède un rôle central dans la mémoire de travail (Granon et al., 1995 ; Ragozzino et al., 1998 ; McIntyre et al., 2002 ; Giovannini et al., 1998 ; Hironaka et al., 2001), et il a été proposé que les déficits cognitifs apparaissant lors du vieillissement seraient consécutifs à l'atteinte du système cholinergique (Bartus et al., 1982 ; Francis, 2005). Les composés cholinergiques, en augmentant la quantité d'ACh disponible au niveau synaptique, ou en stimulant directement les récepteurs nicotiniques, restaureraient les performances de MDT chez les animaux âgés (Francis et al., 2010).

Mécanisme d'action potentiel du donepezil

Ainsi, il a été montré que les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase permettent d'augmenter la quantité d'ACh disponible au niveau de l'HPC de rats âgés (Scali et al., 1997). Chez l'Homme, ces molécules restaurent la mémoire de travail des sujets âgés, en diminuant la suractivation du CPF et en augmentant l'activation d'aires cérébrales additionnelles nécessaire à la réalisation de la tâche (Furey et al., 2000 ; 2008 ; Ricciardi et al., 2009). Dans l'AS, l'HPC apparaît plus comme une aire nécessaire à la réalisation de la tâche en raison de sa composante spatiale. Compte tenu de l'importance de cette structure dans l'orientation spatiale (O'Keefe, 1979 ; White et McDonald, 2002 ; Morris, 1984), on peut supposer que ***l'augmentation d'activité neuronale dans l'HPC permettrait une amélioration de la mémoire spatiale***. Il s'agirait donc d'un ***mécanisme compensatoire rappelant la théorie STAC*** développée chez l'Homme, et prédisant le recrutement d'aires cérébrales additionnelles

lors du vieillissement dans le but de compenser l'altération des processus cognitifs (Park et Reuter-Lorenz, 2009 ; cf. *Bases théoriques III.A.2*).

Hypothèses du mécanisme d'action du S 38232

Des études ont montré que la stimulation des récepteurs nicotiniques au niveau du CPF permettait d'augmenter la détection d'indices lors de tâches attentionnelles (Parikh et al., 2008, 2010). Ceci provoquerait une augmentation de la composante attentionnelle lors de tests cognitifs (Sarter et al., 2009), qui permettrait une efficacité plus grande du CPF, caractérisée par une diminution de sa suractivation et l'amélioration consécutive des performances d'alternance. Cette hypothèse est cohérente avec la localisation des nAChR-α4β2 et α7, en grande quantité dans le CPF et l'HPC (pour revue voir Gotti et al., 2006). Ces récepteurs nicotiniques sont les deux types de nAChR principalement exprimés dans le cerveau et impliqués dans les processus de MDT et d'attention (pour revue voir Graef et al., 2011). Cependant, les résultats de Parikh et collaborateurs (2010) ont démontré que le récepteur α4β2 serait le médiateur principal du mécanisme attentionnel. Sa stimulation induit un courant cholinergique très transitoire permettant une augmentation du ratio signal/bruit dans la sélection de l'information. En utilisant le S 38232, décrit comme un agoniste spécifique des nAChR-α4β2 (Lagostena et al., 2010), la même équipe a démontré que la stimulation spécifique des récepteurs α4β2 induisait une augmentation des courants transitoires d'ACh plus importante qu'avec des agonistes aspécifiques des récepteurs nicotiniques (Howe et al., 2010). Ainsi, ***chez les souris âgées, le S 38232 induirait une augmentation du processus attentionnel, permettant un fonctionnement optimal du CPF et l'amélioration consécutive des performances de MDT lors de l'AS***.

Modulation pharmacologique de l'activité préfrontale

L'importance du cortex prélimbique dans la réalisation de la tâche d'alternance spontanée a été confirmée par l'altération des performances de souris jeunes suite à l'injection dans cette structure de lidocaïne, un inhibiteur de l'activité neuronale. Cependant, nous avons également démontré que le fait de diminuer la phosphorylation excessive de la protéine CREB dans le PL permettait de restaurer les performances chez les souris âgées (cf. *Chapitre 2, Expérience 3*). En effet, le Rp-cAMPS, en inhibant l'une des principales kinases activatrices de CREB (la PKA), diminue sa phosphorylation, bloquant ainsi l'activation des cascades moléculaires sous-jacentes (Dostmann, 1995). Cette observation conforte la théorie d'un ***rôle délétère des kinases lors de tâches de MDT*** (cf. *Bases théoriques II.D*), ainsi que

celle d'une ***altération de la balance kinases/phosphatases lors du vieillissement*** (cf. *Bases théoriques III.B.1*). Cela renforce également l'hypothèse d'un lien profond entre la suractivation prélimbique et l'altération de la MDT lors du vieillissement, et démontre la possibilité d'une relation de cause à effet entre l'amélioration des performances suite au traitement par le S 38232 et la diminution de pCREB dans le PL.

Perspectives

Bien que nos résultats établissent un lien direct entre la diminution d'activation dans le CPF et l'effet promnésiant du S 38232, le mécanisme d'action de cet agoniste des récepteurs α4β2 reste mal défini. Il est donc envisagé de réaliser des injections intra-prélimbiques du S 38232 afin de définir si ce composé agit de manière directe sur cette structure, ou si son mode d'action recrute un système bien plus complexe pouvant faire intervenir des structures additionnelles.

L'activation de l'HPC semble également capable d'améliorer les performances des souris âgées. L'injection intra-hippocampique d'un activateur de la PKA (Sp-AMPc), afin d'augmenter la phosphorylation de CREB, nous permettrait également de vérifier notre hypothèse sur le mécanisme d'action du donepezil.

D'un point de vue fondamental, l'étude des rythmes oscillatoires éléctrophysiologiques, tel que le rythme thêta, entre l'HPC et PFC pourrait nous permettre de mieux comprendre les relations entre ces deux structures. Il est envisageable qu'une altération de la synchronisation entre ces deux structures puissent être reliée à l'altération des performances de MDT (Benchenane et al., 2011 ; Hyman et al., 2011 ; Vertes, 2005).

III. Le récepteur α4β2, rôle dans la MDT et le vieillissement

Afin d'étudier le rôle fonctionnel du récepteur nAChR-α4β2, nous avons opté dans cette thèse pour l'utilisation de souris invalidées génétiquement pour la sous-unité β2 (knock-out β2).

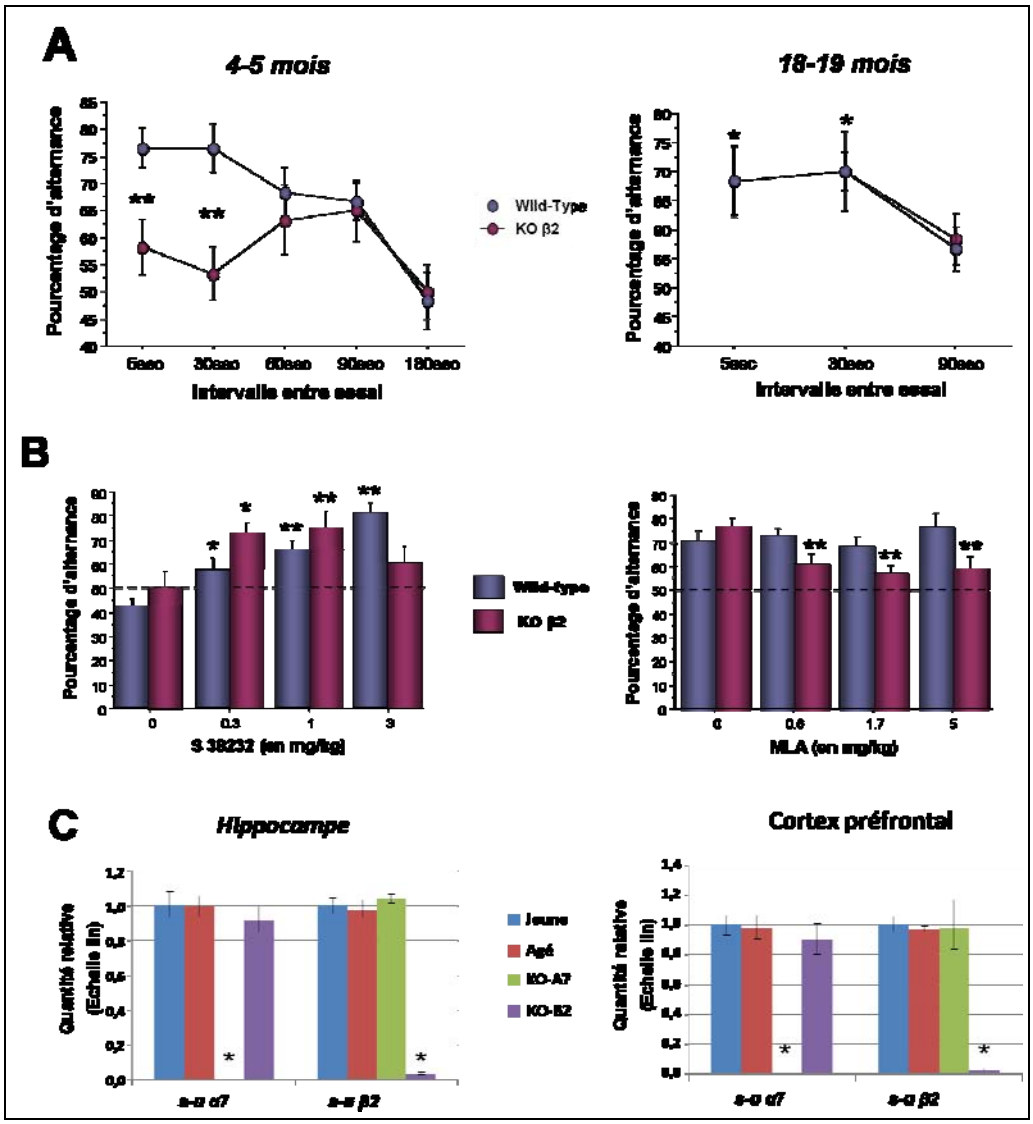


Figure 3 : Résumé des résultats obtenus chez les souris KO β2. A : les souris KO β2 jeunes présentent un déficit de type attentionnel, alors que les souris âgées sont comparables aux wild-types. B : Les résultats pharmacologiques montrent de manière surprenante un effet bénéfique du S 38232, ainsi qu'un effet délétère de la MLA chez les souris KO β2. C : Les analyses par Q-PCR ne révèlent aucune modification de l'expression des sous-unités β2 ou α7 lors du vieillissement ou chez les souris génétiquement modifiées.

Profil comportemental des souris KO β2

En effet, en accord avec les données de la littérature (Avale et al., 2008 ; Granon et al., 2003 ; Changeux, 2006 ; Maubourguet et al., 2008 ; Picciotto et al., 1995 ; Zoli et al., 1999), l'étude du profil comportemental des ***souris KO β2 ne révèle pas d'altération des fonctions mnésiques, mais révèle par contre un défaut d'organisation comportementale de type préfrontal***. Ce modèle de souris a ainsi été proposé pour l'étude des pathologies de type TDAH (**T**rouble **D**éficit de l'**A**ttention / **H**yperactivité) ou autisme (Granon et Changeux, 2006 ; Besson et al., 2008 ; Changeux, 2006 ; Maubourguet et al., 2008).

Nous avons souhaité compléter ces résultats par l'étude de la MDT chez les souris KO β2 âgées afin d'étudier les conséquences du vieillissement lors de l'invalidation du nAChR-α4β2. Contrairement aux souris KO β2 jeunes, nous n'observons plus chez les souris âgées de déficit dans le test d'AS en comparaison des souris témoins du même âge. Le vieillissement pourrait induire une diminution du déficit attentionnel caractérisé chez les souris KO β2 jeunes. Une impulsivité psychomotrice moindre chez ces souris âgées est envisageable, même si aucune différence significative de latence de choix n'a pu être mise en évidence dans notre test. De plus, en raison du rôle démontré du récepteur α4β2 dans l'attention (Graef et al., 2011), il est envisageable que le vieillissement ait des conséquences différentes chez les souris KO β2 et les souris wild-type.

Conséquences pharmacologiques de la délétion du nAChR-α4β2

De manière surprenante, nous avons observé que malgré la délétion du récepteur α4β2, le S 38232 possède un effet promnésiant chez les souris KO β2 âgées. L'hypothèse la plus probable est qu'en raison de la faible activité α7 du S 38232 *in vitro* (Lagostena et al., 2010), ***l'absence du récepteur α4β2 provoque une augmentation du rôle du récepteur α7 dans la MDT***. Ceci semble confirmé par le fait qu'un antagoniste des récepteurs α7 (la MLA) provoque une altération de la mémoire de travail spécifiquement chez les souris KO β2. La délétion constitutive du nAChR-α4β2 provoque probablement une stimulation plus importante du nAChR-α7. Or, il a été démontré que la stimulation chronique du nAChR-α7 induit un changement de son profil pharmacologique et électrophysiologique, provoquant notamment une sensibilité de ce récepteur à la nicotine (Besson et al., 2007 ; Levin et al., 2009). ***Les modifications fonctionnelles du nAChR-α7 seraient reflétées chez les souris KO β2 par la sensibilité au S 38232 ainsi qu'à la MLA***.

Le vieillissement induisant une modification de l'expression et la traduction des sous-unités nicotiniques chez l'Homme (Picciotto et Zoli, 2002 ; Gotti et al., 2006 ; Tohgi et al., 1998 ; Utsugisawa et al., 1999a, 1999b), nous avons vérifié le niveau d'expression des sous-unités β2 et α7 chez les souris lors du vieillissement, ainsi que lors de la délétion de chacune de ces sous-unités. Malgré notre impossibilité de vérifier la quantité de protéine par western-blot en raison du manque d'anticorps spécifiques, nous avons pu montrer qu'aucune différence d'expression n'a été mise en évidence par PCR quantitative. Il en résulte que ***la modification fonctionnelle du récepteur α7 chez les souris KO β2 n'est pas due à une modification d'expression***. Cependant, cela ne signifie pas nécessairement qu'il n'y a pas modification de la quantité de sous-unités nicotiniques, telles que le démontrent plusieurs

études par une diminution des nAChRs sans modification d'expression des ARNm (Hellstrom-Lindahl et al., 1999 ; Wevers et al., 1999 ; pour revue voir Buckingham et al., 2009).

Perspectives

L'utilisation de techniques plus sensibles telles que des marqueurs radioactifs couplés aux anticorps, pourrait permettre de quantifier les nAChR lors du vieillissement et chez les souris génétiquement modifiées (Moser et al., 2007).

Cependant, le changement du profil pharmacologique du récepteur α7 lors de sa stimulation chronique (Besson et al., 2007 ; Levin et al., 2009) nous orienterait plutôt à évaluer ses caractéristiques fonctionnelles chez les souris KO β2 par des études d'électrophysiologie ou de liaison moléculaire (« *binding* »). Ces études nous permettraient d'étudier les cinétiques d'activation du récepteur, ainsi que son profil pharmacologique (affinité, sensibilité, spécificité, …) afin d'évaluer les modifications possibles et leur lien avec le profil comportemental et pharmacologique des animaux invalidés pour la sous-unité β2.

IV. Conclusion

L'ensemble de ce travail a permis de démontrer qu'il existe lors du vieillissement chez la souris une suractivation du cortex préfrontal parallèlement à la diminution des performances de mémoire de travail. Ces résultats sont en accord avec de nombreuses observations effectuées chez l'Homme, et ayant conduit aux théories les plus récentes du vieillissement cognitif.

Cependant, il semble possible de compenser le déficit cognitif lié à l'âge par des mécanismes diminuant la suractivation préfrontale, afin de rétablir un fonctionnement optimal de cette structure. Le récepteur nicotinique α4β2 apparaît comme l'une des cibles permettant ce mécanisme. Le composé S 38232, en agissant directement sur ces récepteurs, permet ainsi de diminuer la suractivation préfrontale et de restaurer les performances mnésiques chez les souris âgées. Cependant, en regard des données obtenues avec des souris invalidées génétiquement pour ce récepteur, il semble que le nAChR-α7 puisse également jouer un rôle important dans la réponse pharmacologique aux ligands de récepteurs nicotiniques.

De plus amples études chez les souris knock-out pour des récepteurs nicotiniques permettraient de mieux comprendre ces différents mécanismes de régulation, notamment par une approche électrophysiologique. Lors de la maladie d'Alzheimer, de nombreuses

modifications d'affinité des récepteurs nicotiniques ont pu être mises en évidence. Il est donc envisageable qu'il existe lors du vieillissement normal ou pathologique des modifications des propriétés pharmacologiques de ce type de récepteur, modifications devant être prises en compte lors du développement de nouveaux traitements.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

A

Abel T, Nguyen PV (2008) Regulation of hippocampus-dependent memory by cyclic AMP-dependent protein kinase. Prog Brain Res 169:97-115.

Aggleton JP, Hunt PR, Rawlins JN (1986) The effects of hippocampal lesions upon spatial and non-spatial tests of working memory. Behav Brain Res 19:133-146.

Alkondon M, Albuquerque EX (2001) Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 and alpha4beta2 subtypes differentially control GABAergic input to CA1 neurons in rat hippocampus. J Neurophysiol 86:3043-3055.

Alkondon M, Pereira EF, Albuquerque EX (2003) NMDA and AMPA receptors contribute to the nicotinic cholinergic excitation of CA1 interneurons in the rat hippocampus. J Neurophysiol 90:1613-1625.

Alkondon M, Pereira EF, Eisenberg HM, Albuquerque EX (1999) Choline and selective antagonists identify two subtypes of nicotinic acetylcholine receptors that modulate GABA release from CA1 interneurons in rat hippocampal slices. J Neurosci 19:2693-2705.

Amaral D, Witter M (1995) The rat nervous system. 2nd ed G. Paxinos:443-842.

Amstrong RA (1994) The spatial patterns of beta/A4 deposit subtypes in Down's syndrome. Acta Neuropathol 88:353-358.

Andrews-Hanna JR, Snyder AZ, Vincent JL, Lustig C, Head D, Raichle ME, Buckner RL (2007) Disruption of large-scale brain systems in advanced aging. Neuron 56:924-935.

Aramakis VB, Metherate R (1998) Nicotine selectively enhances NMDA receptor-mediated synaptic transmission during postnatal development in sensory neocortex. J Neurosci 18:8485-8495.

Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. Trends Neurosci 22:208-215.

Arendash GW, Sengstock GJ, Sanberg PR, Kem WR (1995) Improved learning and memory in aged rats with chronic administration of the nicotinic receptor agonist GTS-21. Brain Res 674:252-259.

Aston-Jones G (2005) Brain structures and receptors involved in alertness. Sleep Med 6 Suppl 1:S3-7.

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

Avale ME, Faure P, Pons S, Robledo P, Deltheil T, David DJ, Gardier AM, Maldonado R, Granon S, Changeux JP, Maskos U (2008) Interplay of beta2* nicotinic receptors and dopamine pathways in the control of spontaneous locomotion. Proc Natl Acad Sci U S A 105:15991-15996.

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

B

Baddeley A (1988) Cognitive psychology and human memory. Trends Neurosci 11:176-181.
Baddeley A (2000) The episodic buffer: a new component of working memory? Trends Cogn Sci 4:417-423.
Baddeley A (2010) Working memory. Curr Biol 20:R136-140.
Baddeley A, Hitch G (1974) Working memory. Bower, GA Edition The Psychology of Learning and Motivation:47-89.
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 AD, Bressi S, Della Sala S, Logie R, Spinnler H (1991) The decline of working memory in Alzheimer's disease. A longitudinal study. Brain 114 (Pt 6):2521-2542.
Balleine BW, Dickinson A (1998) Goal-directed instrumental action: contingency and incentive learning and their cortical substrates. Neuropharmacology 37:407-419.
Bancroft A, Levin ED (2000) Ventral hippocampal alpha4beta2 nicotinic receptors and chronic nicotine effects on memory. Neuropharmacology 39:2770-2778.
Barad M, Bourtchouladze R, Winder DG, Golan H, Kandel E (1998) Rolipram, a type IV-specific phosphodiesterase inhibitor, facilitates the establishment of long-lasting long-term potentiation and improves memory. Proc Natl Acad Sci U S A 95:15020-15025.
Barbas H, Blatt GJ (1995) Topographically specific hippocampal projections target functionally distinct prefrontal areas in the rhesus monkey. Hippocampus 5:511-533.
Barik J, Wonnacott S (2006) Indirect modulation by alpha7 nicotinic acetylcholine receptors of noradrenaline release in rat hippocampal slices: interaction with glutamate and GABA systems and effect of nicotine withdrawal. Mol Pharmacol 69:618-628.
Barnes CA (1979) Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. J Comp Physiol Psychol 93:74-104.
Barnes CA, McNaughton BL (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.
Bartus RT (2000) On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. Exp Neurol 163:495-529.
Bartus RT, Dean RL, 3rd, Beer B, Lippa AS (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. Science 217:408-414.
Baskerville KA, Kent C, Personett D, Lai WR, Park PJ, Coleman P, McKinney M (2008) Aging elevates metabolic gene expression in brain cholinergic neurons. Neurobiol Aging 29:1874-1893.
Baxter MG, 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 MG, Bucci DJ, Sobel TJ, Williams MJ, Gorman LK, Gallagher M (1996) Intact spatial learning following lesions of basal forebrain cholinergic neurons. Neuroreport 7:1417-1420.
Belzung C, Le Guisquet AM, Crestani F (2000) Flumazenil induces benzodiazepine partial agonist-like effects in BALB/c but not C57BL/6 mice. Psychopharmacology (Berl) 148:24-32.

Benchenane K, Tiesinga PH, Battaglia FP (2011) Oscillations in the prefrontal cortex: a gateway to memory and attention. Curr Opin Neurobiol.
Bencherif M, Lippiello PM (2010) Alpha7 neuronal nicotinic receptors: the missing link to understanding Alzheimer's etiopathology? Med Hypotheses 74:281-285.
Beracochea D (1984) Analyse et bases fonctionnelles des déficits mnésiques induits par la consommation chronique d'éthanol chez la souris BALB/c. Univ Bordeaux 1, thèse de 3e cycle.
Beracochea D (2006) Anterograde and retrograde effects of benzodiazepines on memory. ScientificWorldJournal 6:1460-1465.
Beracochea D, Jaffard R (1983) [Accelerated forgetting and increased proactive interference after long-term alcohol consumption in the mouse]. C R Seances Acad Sci III 296:535-540.
Beracochea D, Jaffard R (1985) Memory deficits subsequent to chronic consumption of alcohol in mice: an analysis based on spontaneous alternation behavior. Behav Brain Res 15:15-25.
Beracochea D, Jaffard R (1991) Effects of chronic ethanol consumption associated or not with experimental anterior thalamic lesions on spontaneous sequential alternation in mice. Neurosci Lett 134:45-48.
Beracochea D, Boucard A, Trocme-Thibierge C, Morain P (2008) Improvement of contextual memory by S 24795 in aged mice: comparison with memantine. Psychopharmacology (Berl) 196:555-564.
Beracochea D, Philippin JN, Meunier S, Morain P, Bernard K (2007) Improvement of episodic contextual memory by S 18986 in middle-aged mice: comparison with donepezil. Psychopharmacology (Berl) 193:63-73.
Beracochea D, Cagnard B, Celerier A, le Merrer J, Peres M, Pierard C (2001) First evidence of a delay-dependent working memory-enhancing effect of modafinil in mice. Neuroreport 12:375-378.
Beracochea DJ, Jaffard R (1987) Impairment of spontaneous alternation behavior in sequential test procedures following mammillary body lesions in mice: evidence for time-dependent interference-related memory deficits. Behav Neurosci 101:187-197.
Beracochea DJ, Jaffard R (1995) The effects of mammillary body lesions on delayed matching and delayed non-matching to place tasks in the mice. Behav Brain Res 68:45-52.
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.
Berlyne DE (1966) Curiosity and exploration. Science 153:25-33.
Bernabeu R, Bevilaqua L, Ardenghi P, Bromberg E, Schmitz P, Bianchin M, Izquierdo I, Medina JH (1997) Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. Proc Natl Acad Sci U S A 94:7041-7046.
Bernard K, Danober L, Thomas JY, Lebrun C, Munoz C, Cordi A, Desos P, Lestage P, Morain P (2010) DRUG FOCUS: S 18986: A positive allosteric modulator of AMPA-type glutamate receptors pharmacological profile of a novel cognitive enhancer. CNS Neurosci Ther 16:e193-212.
Besson M, Suarez S, Cormier A, Changeux JP, Granon S (2008) Chronic nicotine exposure has dissociable behavioural effects on control and beta2-/- mice. Behav Genet 38:503-514.
Besson M, Granon S, Mameli-Engvall M, Cloez-Tayarani I, Maubourguet N, Cormier A, Cazala P, David V, Changeux JP, Faure P (2007) Long-term effects of chronic

nicotine exposure on brain nicotinic receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 104:8155-8160.
Bettany JH, Levin ED (2001) Ventral hippocampal alpha 7 nicotinic receptor blockade and chronic nicotine effects on memory performance in the radial-arm maze. Pharmacol Biochem Behav 70:467-474.
Bi X (2010) Alzheimer disease: update on basic mechanisms. J Am Osteopath Assoc 110:S3-9.
Birnbaum SG, Yuan PX, Wang M, Vijayraghavan S, Bloom AK, Davis DJ, Gobeske KT, Sweatt JD, Manji HK, Arnsten AF (2004) Protein kinase C overactivity impairs prefrontal cortical regulation of working memory. Science 306:882-884.
Birrell JM, Brown VJ (2000) Medial frontal cortex mediates perceptual attentional set shifting in the rat. J Neurosci 20:4320-4324.
Birtsch C, Wevers A, Traber J, Maelicke A, Bloch W, Schroder H (1997) Expression of alpha 4-1 and alpha 5 nicotinic cholinoceptor mRNA in the aging rat cerebral cortex. Neurobiol Aging 18:335-342.
Bishop NA, Lu T, Yankner BA (2010) Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. Nature 464:529-535.
Bitner RS et al. (2007) Broad-spectrum efficacy across cognitive domains by alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonism correlates with activation of ERK1/2 and CREB phosphorylation pathways. J Neurosci 27:10578-10587.
Bjork RA (1978) The updating of human memory. In G Bower (ed), The Psychology of learning and motivation New-York Academic Press 12.
Black MD (2005) Therapeutic potential of positive AMPA modulators and their relationship to AMPA receptor subunits. A review of preclinical data. Psychopharmacology (Berl) 179:154-163.
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.
Bloss EB, Hunter RG, Waters EM, Munoz C, Bernard K, McEwen BS (2008) Behavioral and biological effects of chronic S18986, a positive AMPA receptor modulator, during aging. Exp Neurol 210:109-117.
Blum S, Moore AN, Adams F, Dash PK (1999) A mitogen-activated protein kinase cascade in the CA1/CA2 subfield of the dorsal hippocampus is essential for long-term spatial memory. J Neurosci 19:3535-3544.
Boess FG, De Vry J, Erb C, Flessner T, Hendrix M, Luithle J, Methfessel C, Riedl B, Schnizler K, van der Staay FJ, van Kampen M, Wiese WB, Koenig G (2007) The novel alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist N-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]-7-[2-(methoxy)phenyl]-1-benzofuran-2- carboxamide improves working and recognition memory in rodents. J Pharmacol Exp Ther 321:716-725.
Bondareff W, Geinisman Y (1976) Loss of synapses in the dentate gyrus of the senescent rat. Am J Anat 145:129-136.
Bonini JS, Da Silva WC, Bevilaqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M (2007) On the participation of hippocampal PKC in acquisition, consolidation and reconsolidation of spatial memory. Neuroscience 147:37-45.
Bowen DM, Smith CB, White P, Davison AN (1976) Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. Brain 99:459-496.
Bowen DM, Allen SJ, Benton JS, Goodhardt MJ, Haan EA, Palmer AM, Sims NR, Smith CC, Spillane JA, Esiri MM, Neary D, Snowdon JS, Wilcock GK, Davison AN (1983)

Biochemical assessment of serotonergic and cholinergic dysfunction and cerebral atrophy in Alzheimer's disease. J Neurochem 41:266-272.
Braun M, Weinrich C, Finke C, Ostendorf F, Lehmann TN, Ploner CJ (2010) Lesions affecting the right hippocampal formation differentially impair short-term memory of spatial and nonspatial associations. Hippocampus.
Brion S, Mikol J, Plas J (1983) [Memory and hemispheric functional specialization. Anatomo-clinical report]. Rev Neurol (Paris) 139:39-43.
Brito GN, Thomas GJ (1981) T-maze alternation, response patterning, and septo-hippocampal circuitry in rats. Behav Brain Res 3:319-340.
Browning M, Holmes EA, Harmer CJ (2010) The modification of attentional bias to emotional information: A review of the techniques, mechanisms, and relevance to emotional disorders. Cogn Affect Behav Neurosci 10:8-20.
Buccafusco JJ, Terry AV, Jr., Decker MW, Gopalakrishnan M (2007) Profile of nicotinic acetylcholine receptor agonists ABT-594 and A-582941, with differential subtype selectivity, on delayed matching accuracy by young monkeys. Biochem Pharmacol 74:1202-1211.
Buccafusco JJ, Jackson WJ, Terry AV, Jr., Marsh KC, Decker MW, Arneric SP (1995) Improvement in performance of a delayed matching-to-sample task by monkeys following ABT-418: a novel cholinergic channel activator for memory enhancement. Psychopharmacology (Berl) 120:256-266.
Buckingham SD, Jones AK, Brown LA, Sattelle DB (2009) Nicotinic acetylcholine receptor signalling: roles in Alzheimer's disease and amyloid neuroprotection. Pharmacol Rev 61:39-61.
Burette F, Jay TM, Laroche S (2000) Synaptic depression of the hippocampal to prefrontal cortex pathway during a spatial working memory task. Curr Psychol Lett 1:9-23.
Burgess GC, Braver TS (2010) Neural mechanisms of interference control in working memory: effects of interference expectancy and fluid intelligence. PLoS One 5:e12861.

C

Cabeza R (2002) Hemispheric asymmetry reduction in older adults: the HAROLD model. Psychol Aging 17:85-100.
Cabeza R, Anderson ND, Locantore JK, McIntosh AR (2002) Aging gracefully: compensatory brain activity in high-performing older adults. Neuroimage 17:1394-1402.
Cappell KA, Gmeindl L, Reuter-Lorenz PA (2010) Age differences in prefontal recruitment during verbal working memory maintenance depend on memory load. Cortex 46:462-473.
Carlezon WA, Jr., Duman RS, Nestler EJ (2005) The many faces of CREB. Trends Neurosci 28:436-445.
Carmichael ST, Price JL (1995) Limbic connections of the orbital and medial prefrontal cortex in macaque monkeys. J Comp Neurol 363:615-641.
Cavada C, Llamas A, Reinoso-Suarez F (1983) Allocortical afferent connections of the prefrontal cortex in the cat. Brain Res 260:117-120.
Chalmers DT, Dewar D, Graham DI, Brooks DN, McCulloch J (1990) Differential alterations of cortical glutamatergic binding sites in senile dementia of the Alzheimer type. Proc Natl Acad Sci U S A 87:1352-1356.

Chan WK, Wong PT, Sheu FS (2007) Frontal cortical alpha7 and alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors in working and reference memory. Neuropharmacology 52:1641-1649.
Changeux JP (2006) The Ferrier Lecture 1998. The molecular biology of consciousness investigated with genetically modified mice. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 361:2239-2259.
Chauveau F, Celerier A, Ognard R, Pierard C, Beracochea D (2005) Effects of ibotenic acid lesions of the mediodorsal thalamus on memory: relationship with emotional processes in mice. Behav Brain Res 156:215-223.
Clement Y, Le Guisquet AM, Venault P, Chapouthier G, Belzung C (2009) Pharmacological alterations of anxious behaviour in mice depending on both strain and the behavioural situation. PLoS One 4:e7745.
Clody DE, Carlton PL (1969) Behavioral effects of lesions of the medial septum of rats. J Comp Physiol Psychol 67:344-351.
Coleman PD, Flood DG (1987) Neuron numbers and dendritic extent in normal aging and Alzheimer's disease. Neurobiol Aging 8:521-545.
Colombo PJ, Brightwell JJ, Countryman RA (2003) Cognitive strategy-specific increases in phosphorylated cAMP response element-binding protein and c-Fos in the hippocampus and dorsal striatum. J Neurosci 23:3547-3554.
Corkin S (2002) What's new with the amnesic patient H.M.? Nat Rev Neurosci 3:153-160.
Cotman CW, Monaghan DT (1986) Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their properties. Adv Exp Med Biol 203:237-252.
Courtney SM, Petit L, Maisog JM, Ungerleider LG, Haxby JV (1998) An area specialized for spatial working memory in human frontal cortex. Science 279:1347-1351.
Cowan N (1988) Evolving conceptions of memory storage, selective attention, and their mutual constraints within the human information-processing system. Psychol Bull 104:163-191.
Cowan N (2010) Multiple concurrent thoughts: The meaning and developmental neuropsychology of working memory. Dev Neuropsychol 35:447-474.
Coyle JT, Price DL, DeLong MR (1983) Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. Science 219:1184-1190.
Cruz L, Roe DL, Urbanc B, Cabral H, Stanley HE, Rosene DL (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.
Curcio CA, Kemper T (1984) Nucleus raphe dorsalis in dementia of the Alzheimer type: neurofibrillary changes and neuronal packing density. J Neuropathol Exp Neurol 43:359-368.

D

D'Esposito M (2007) From cognitive to neural models of working memory. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 362:761-772.
Dalland T (1976) Response perseveration of rats with dorsal hippocampal lesions. Behav Biol 17:473-484.
Dalley JW, Cardinal RN, Robbins TW (2004) Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. Neurosci Biobehav Rev 28:771-784.
Danysz W, Parsons CG (2003) The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: preclinical evidence. Int J Geriatr Psychiatry 18:S23-32.

Danysz W, Parsons CG, Mobius HJ, Stoffler A, Quack G (2000) Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease--a unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action. Neurotox Res 2:85-97.
Dash PK, Moore AN, Kobori N, Runyan JD (2007) Molecular activity underlying working memory. Learn Mem 14:554-563.
Davis SW, Dennis NA, Daselaar SM, Fleck MS, Cabeza R (2008) Que PASA? The posterior-anterior shift in aging. Cereb Cortex 18:1201-1209.
de Bruin JP, Swinkels WA, de Brabander JM (1997) Response learning of rats in a Morris water maze: involvement of the medical prefrontal cortex. Behav Brain Res 85:47-55.
de Oliveira RA, Cunha GM, Borges KD, de Bruin GS, dos Santos-Filho EA, Viana GS, de Bruin VM (2004) The effect of venlafaxine on behaviour, body weight and striatal monoamine levels on sleep-deprived female rats. Pharmacol Biochem Behav 79:499-506.
Deacon RM, Rawlins JN (2006) T-maze alternation in the rodent. Nat Protoc 1:7-12.
Degroot A, Parent MB (2000) Increasing acetylcholine levels in the hippocampus or entorhinal cortex reverses the impairing effects of septal GABA receptor activation on spontaneous alternation. Learn Mem 7:293-302.
Delatour B, Gisquet-Verrier P (1996) Prelimbic cortex specific lesions disrupt delayed-variable response tasks in the rat. Behav Neurosci 110:1282-1298.
Delatour B, 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 113:941-955.
Dember WN, Fowler H (1958) Spontaneous alternation behavior. Psychol Bull 55:412-428.
Dhir A, Kulkarni SK (2008) Venlafaxine reverses chronic fatigue-induced behavioral, biochemical and neurochemical alterations in mice. Pharmacol Biochem Behav 89:563-571.
Dijk SN, Francis PT, Stratmann GC, Bowen DM (1995a) Cholinomimetics increase glutamate outflow via an action on the corticostriatal pathway: implications for Alzheimer's disease. J Neurochem 65:2165-2169.
Dijk SN, Francis PT, Stratmann GC, Bowen DM (1995b) NMDA-induced glutamate and aspartate release from rat cortical pyramidal neurones: evidence for modulation by a 5-HT1A antagonist. Br J Pharmacol 115:1169-1174.
Divac I (1975) Magnocellular nuclei of the basal forebrain project to neocortex, brain stem, and olfactory bulb. Review of some functional correlates. Brain Res 93:385-398.
Dolan RJ (2002) Emotion, cognition, and behavior. Science 298:1191-1194.
Dostmann WR (1995) (RP)-cAMPS inhibits the cAMP-dependent protein kinase by blocking the cAMP-induced conformational transition. FEBS Lett 375:231-234.
Douglas RJ (1966) Cues for spontaneous alternation. J Comp Physiol Psychol 62:171-183.
Douglas RJ (1975) The development of hippocampal function: implications for theory and for therapy. The Hippocampus R.L. Isaacson and K.H. Pribram, Ed. Plenum Press, N.Y.:327-361.
Drachman DA, Leavitt J (1974) Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging? Arch Neurol 30:113-121.
Drachman DA, Noffsinger D, Sahakian BJ, Kurdziel S, Fleming P (1980) Aging, memory, and the cholinergic system: a study of dichotic listening. Neurobiol Aging 1:39-43.
Drever BD, Anderson WG, Johnson H, O'Callaghan M, Seo S, Choi DY, Riedel G, Platt B (2007) Memantine acts as a cholinergic stimulant in the mouse hippocampus. J Alzheimers Dis 12:319-333.

Duan H, Wearne SL, Rocher AB, Macedo A, Morrison JH, Hof PR (2003) Age-related dendritic and spine changes in corticocortically projecting neurons in macaque monkeys. Cereb Cortex 13:950-961.

Dubois B et al. (2010) Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. Lancet Neurol 9:1118-1127.

Dunbar G, Boeijinga PH, Demazieres A, Cisterni C, Kuchibhatla R, Wesnes K, Luthringer R (2007) Effects of TC-1734 (AZD3480), a selective neuronal nicotinic receptor agonist, on cognitive performance and the EEG of young healthy male volunteers. Psychopharmacology (Berl) 191:919-929.

E

Egger GJ (1973) The relevance of memory, arousal, and cue factors to developmental changes in spontaneous alternation by rats. Dev Psychobiol 6:459-468.

Eglen RM, Choppin A, Watson N (2001) Therapeutic opportunities from muscarinic receptor research. Trends Pharmacol Sci 22:409-414.

Emery L, Hale S, Myerson J (2008) Age differences in proactive interference, working memory, and abstract reasoning. Psychol Aging 23:634-645.

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

F

Fagg GE, Foster AC (1983) Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system. Neuroscience 9:701-719.

Fayuk D, Yakel JL (2007) Dendritic Ca2+ signalling due to activation of alpha 7-containing nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. J Physiol 582:597-611.

Ferrari R, Pedrazzi P, Algeri S, Agnati LF, Zoli M (1999) Subunit and region-specific decreases in nicotinic acetylcholine receptor mRNA in the aged rat brain. Neurobiol Aging 20:37-46.

Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Scazufca M (2005) Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. Lancet 366:2112-2117.

File SE, Lippa AS, Beer B, Lippa MT (2004) Animal tests of anxiety. Curr Protoc Neurosci Chapter 8:Unit 8 3.

Flynn DD, Weinstein DA, Mash DC (1991) Loss of high-affinity agonist binding to M1 muscarinic receptors in Alzheimer's disease: implications for the failure of cholinergic replacement therapies. Ann Neurol 29:256-262.

Fonnum F (1993) Regulation of the synthesis of the transmitter glutamate pool. Prog Biophys Mol Biol 60:47-57.

Foster TC (1999) Involvement of hippocampal synaptic plasticity in age-related memory decline. Brain Res Rev 30:236-249.

Fowler H, Wischner GJ (1965) Discrimination Performance as Affected by Problem Difficulty and Shock for Either the Correct or Incorrect Response. J Exp Psychol 69:413-418.

Francis PT (2003) Glutamatergic systems in Alzheimer's disease. Int J Geriatr Psychiatry 18:S15-21.

Francis PT (2005) The interplay of neurotransmitters in Alzheimer's disease. CNS Spectr 10:6-9.
Francis PT, Ramirez MJ, Lai MK (2010) Neurochemical basis for symptomatic treatment of Alzheimer's disease. Neuropharmacology 59:221-229.
Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK (1999) The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. J Neurol Neurosurg Psychiatry 66:137-147.
Francis PT, Palmer AM, Sims NR, Bowen DM, Davison AN, Esiri MM, Neary D, Snowden JS, Wilcock GK (1985) Neurochemical studies of early-onset Alzheimer's disease. Possible influence on treatment. N Engl J Med 313:7-11.
Francis PT, Webster MT, Chessell IP, Holmes C, Stratmann GC, Procter AW, Cross AJ, Green AR, Bowen DM (1993) Neurotransmitters and second messengers in aging and Alzheimer's disease. Ann N Y Acad Sci 695:19-26.
Funahashi S, Bruce CJ, Goldman-Rakic PS (1989) Mnemonic coding of visual space in the monkey's dorsolateral prefrontal cortex. J Neurophysiol 61:331-349.
Furey ML, Pietrini P, Alexander GE, Schapiro MB, Horwitz B (2000) Cholinergic enhancement improves performance on working memory by modulating the functional activity in distinct brain regions: a positron emission tomography regional cerebral blood flow study in healthy humans. Brain Res Bull 51:213-218.
Furey ML, Ricciardi E, Schapiro MB, Rapoport SI, Pietrini P (2008) Cholinergic enhancement eliminates modulation of neural activity by task difficulty in the prefrontal cortex during working memory. J Cogn Neurosci 20:1342-1353.
Fuster JM, Alexander GE (1971) Neuron activity related to short-term memory. Science 173:652-654.

G

Gallagher M, Rapp PR (1997) The use of animal models to study the effects of aging on cognition. Annu Rev Psychol 48:339-370.
Garcia R, Vouimba RM, Baudry M, Thompson RF (1999) The amygdala modulates prefrontal cortex activity relative to conditioned fear. Nature 402:294-296.
Gazzaley A, Cooney JW, Rissman J, D'Esposito M (2005) Top-down suppression deficit underlies working memory impairment in normal aging. Nat Neurosci 8:1298-1300.
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 RE (1995) Hippocampal markers of age-related memory dysfunction: behavioral, electrophysiological and morphological perspectives. Prog Neurobiol 45:223-252.
Gilbert D, Lecchi M, Arnaudeau S, Bertrand D, Demaurex N (2009) Local and global calcium signals associated with the opening of neuronal alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. Cell Calcium 45:198-207.
Gill SK, Ishak M, Dobransky T, Haroutunian V, Davis KL, Rylett RJ (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.
Giovannini MG, Bartolini L, Kopf SR, Pepeu G (1998) Acetylcholine release from the frontal cortex during exploratory activity. Brain Res 784:218-227.
Glanzer M (1953) The role of stimulus satiation in spontaneous alternation. J Exp Psychol 45:387-393.

Gold PE (2003) Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. Neurobiol Learn Mem 80:194-210.
Gold PE (2004) Coordination of multiple memory systems. Neurobiol Learn Mem 82:230-242.
Goldman-Rakic PS, Selemon LD, Schwartz ML (1984) Dual pathways connecting the dorsolateral prefrontal cortex with the hippocampal formation and parahippocampal cortex in the rhesus monkey. Neuroscience 12:719-743.
Gonzalez-Burgos G, Kroener S, Seamans JK, Lewis DA, Barrionuevo G (2005) Dopaminergic modulation of short-term synaptic plasticity in fast-spiking interneurons of primate dorsolateral prefrontal cortex. J Neurophysiol 94:4168-4177.
Gotti C, Riganti L, Vailati S, Clementi F (2006) Brain neuronal nicotinic receptors as new targets for drug discovery. Curr Pharm Des 12:407-428.
Grady CL, Maisog JM, Horwitz B, Ungerleider LG, Mentis MJ, Salerno JA, Pietrini P, Wagner E, Haxby JV (1994) Age-related changes in cortical blood flow activation during visual processing of faces and location. J Neurosci 14:1450-1462.
Grady CL, McIntosh AR, Horwitz B, Maisog JM, Ungerleider LG, Mentis MJ, Pietrini P, Schapiro MB, Haxby JV (1995) Age-related reductions in human recognition memory due to impaired encoding. Science 269:218-221.
Graef S, Schonknecht P, Sabri O, Hegerl U (2011) Cholinergic receptor subtypes and their role in cognition, emotion, and vigilance control: An overview of preclinical and clinical findings. Psychopharmacology (Berl).
Granger R, Staubli U, Davis M, Perez Y, Nilsson L, Rogers GA, Lynch G (1993) A drug that facilitates glutamatergic transmission reduces exploratory activity and improves performance in a learning-dependent task. Synapse 15:326-329.
Granon S, Poucet B (1995) Medial prefrontal lesions in the rat and spatial navigation: evidence for impaired planning. Behav Neurosci 109:474-484.
Granon S, Changeux JP (2006) Attention-deficit/hyperactivity disorder: a plausible mouse model? Acta Paediatr 95:645-649.
Granon S, Faure P, Changeux JP (2003) Executive and social behaviors under nicotinic receptor regulation. Proc Natl Acad Sci U S A 100:9596-9601.
Granon S, Save E, Buhot MC, Poucet B (1996) Effortful information processing in a spontaneous spatial situation by rats with medial prefrontal lesions. Behav Brain Res 78:147-154.
Granon S, Vidal C, Thinus-Blanc C, Changeux JP, Poucet B (1994) Working memory, response selection, and effortful processing in rats with medial prefrontal lesions. Behav Neurosci 108:883-891.
Granon S, Poucet B, Thinus-Blanc C, Changeux JP, Vidal C (1995) Nicotinic and muscarinic receptors in the rat prefrontal cortex: differential roles in working memory, response selection and effortful processing. Psychopharmacology (Berl) 119:139-144.
Gray R, Rajan AS, Radcliffe KA, Yakehiro M, Dani JA (1996) Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. Nature 383:713-716.
Greenamyre JT, Penney JB, Young AB, D'Amato CJ, Hicks SP, Shoulson I (1985) Alterations in L-glutamate binding in Alzheimer's and Huntington's diseases. Science 227:1496-1499.
Grottick AJ, Higgins GA (2000) Effect of subtype selective nicotinic compounds on attention as assessed by the five-choice serial reaction time task. Behav Brain Res 117:197-208.
Guelfi JD, Rouillon F (2007) Manuel de psychatrie. Elsevier Masson Chapitre 4.3:37-42.
Guzowski JF, McGaugh JL (1997) Antisense oligodeoxynucleotide-mediated disruption of hippocampal cAMP response element binding protein levels impairs consolidation of memory for water maze training. Proc Natl Acad Sci U S A 94:2693-2698.

Gyurak A, Goodkind MS, Kramer JH, Miller BL, Levenson RW (2011) Executive functions and the down-regulation and up-regulation of emotion. Cogn Emot:1-16.

H

Hahn B, Shoaib M, Stolerman IP (2003) Involvement of the prefrontal cortex but not the dorsal hippocampus in the attention-enhancing effects of nicotine in rats. Psychopharmacology (Berl) 168:271-279.

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

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

Havekes R, Nijholt IM, Visser AK, Eisel UL, Van der Zee EA (2008) Transgenic inhibition of neuronal calcineurin activity in the forebrain facilitates fear conditioning, but inhibits the extinction of contextual fear memories. Neurobiol Learn Mem 89:595-598.

Head D, Buckner RL, Shimony JS, Williams LE, Akbudak E, Conturo TE, McAvoy M, Morris JC, Snyder AZ (2004) Differential vulnerability of anterior white matter in nondemented aging with minimal acceleration in dementia of the Alzheimer type: evidence from diffusion tensor imaging. Cereb Cortex 14:410-423.

Heidbreder CA, Groenewegen HJ (2003) The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. Neurosci Biobehav Rev 27:555-579.

Hellstrom-Lindahl E, Mousavi M, Zhang X, Ravid R, Nordberg A (1999) Regional distribution of nicotinic receptor subunit mRNAs in human brain: comparison between Alzheimer and normal brain. Brain Res Mol Brain Res 66:94-103.

Helmer C, Pasquier F, Dartigues JF (2006) [Epidemiology of Alzheimer disease and related disorders]. Med Sci (Paris) 22:288-296.

Hironaka N, Tanaka K, Izaki Y, Hori K, Nomura M (2001) Memory-related acetylcholine efflux from rat prefrontal cortex and hippocampus: a microdialysis study. Brain Res 901:143-150.

Hogge M, Adam S, Collette F (2008) Directed forgetting and aging: the role of retrieval processes, processing speed, and proactive interference. Neuropsychol Dev Cogn B Aging Neuropsychol Cogn 15:471-491.

Holmes A, Wellman CL (2009) Stress-induced prefrontal reorganization and executive dysfunction in rodents. Neurosci Biobehav Rev 33:773-783.

Howe WM, Ji J, Parikh V, Williams S, Mocaer E, Trocme-Thibierge C, Sarter M (2010) Enhancement of attentional performance by selective stimulation of alpha4beta2(*) nAChRs: underlying cholinergic mechanisms. Neuropsychopharmacology 35:1391-1401.

Hoyle E, Genn RF, Fernandes C, Stolerman IP (2006) Impaired performance of alpha7 nicotinic receptor knockout mice in the five-choice serial reaction time task. Psychopharmacology (Berl) 189:211-223.

Huang YY, Kandel ER (1998) Postsynaptic induction and PKA-dependent expression of LTP in the lateral amygdala. Neuron 21:169-178.

Hughes RN (2004) The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. Neurosci Biobehav Rev 28:497-505.

Hyman JM, Hasselmo ME, Seamans JK (2011) What is the Functional Relevance of Prefrontal Cortex Entrainment to Hippocampal Theta Rhythms? Front Neurosci 5:24.
Hyman JM, Zilli EA, Paley AM, Hasselmo ME (2010) Working Memory Performance Correlates with Prefrontal-Hippocampal Theta Interactions but not with Prefrontal Neuron Firing Rates. Front Integr Neurosci 4:2.

I

Iversen SD, Mishkin M (1970) Perseverative interference in monkeys following selective lesions of the inferior prefrontal convexity. Exp Brain Res 11:376-386.
Izaki Y, Takita M, Akema T (2008) Specific role of the posterior dorsal hippocampus-prefrontal cortex in short-term working memory. Eur J Neurosci 27:3029-3034.
Izquierdo I, Medina JH (1997) Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. Neurobiol Learn Mem 68:285-316.

J

Jaffard R (1994) Les systèmes de mémoire. Les mémoires Journées internationales sur les sciences cognitives.
Jaffard R, Meunier M (1993) Role of the hippocampal formation in learning and memory. Hippocampus 3 Spec No:203-217.
Jaffard R, Mocaer E, Poignant JC, Micheau J, Marighetto A, Meunier M, Beracochea D (1991) Effects of tianeptine on spontaneous alternation, simple and concurrent spatial discrimination learning and on alcohol-induced alternation deficits in mice. Behav Pharmacol 2:37-46.
James W (1890) The Principles of Psychology. Holt: New York.
Jay TM, Witter MP (1991) Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. J Comp Neurol 313:574-586.
Jay TM, Gurden H, Yamaguchi T (1998) Rapid increase in PKA activity during long-term potentiation in the hippocampal afferent fibre system to the prefrontal cortex in vivo. Eur J Neurosci 10:3302-3306.
Jeneson A, Mauldin KN, Squire LR (2010) Intact working memory for relational information after medial temporal lobe damage. J Neurosci 30:13624-13629.
Joel D, Weiner I, Feldon J (1997) Electrolytic lesions of the medial prefrontal cortex in rats disrupt performance on an analog of the Wisconsin Card Sorting Test, but do not disrupt latent inhibition: implications for animal models of schizophrenia. Behav Brain Res 85:187-201.
Josselyn SA, Nguyen PV (2005) CREB, synapses and memory disorders: past progress and future challenges. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord 4:481-497.

K

Kane MJ, Engle RW (2002) The role of prefrontal cortex in working-memory capacity, executive attention, and general fluid intelligence: an individual-differences perspective. Psychon Bull Rev 9:637-671.

Kanno T, Yaguchi T, Yamamoto S, Nagata T, Yamamoto H, Fujikawa H, Nishizaki T (2005) Bidirectional regulations for glutamate and GABA release in the hippocampus by alpha7 and non-alpha7 ACh receptors. Biochem Biophys Res Commun 338:742-747.

Kelly SJ, Bernard K, Munoz C, Lawrence RC, Thacker J, Grillo CA, Piroli GG, Reagan LP (2009) Effects of the AMPA receptor modulator S 18986 on measures of cognition and oxidative stress in aged rats. Psychopharmacology (Berl) 202:225-235.

Kem WR (2000) The brain alpha7 nicotinic receptor may be an important therapeutic target for the treatment of Alzheimer's disease: studies with DMXBA (GTS-21). Behav Brain Res 113:169-181.

Kendziorra K, Wolf H, Meyer PM, Barthel H, Hesse S, Becker GA, Luthardt J, Schildan A, Patt M, Sorger D, Seese A, Gertz HJ, Sabri O (2011) Decreased cerebral alpha4beta2* nicotinic acetylcholine receptor availability in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease assessed with positron emission tomography. Eur J Nucl Med Mol Imaging 38:515-525.

Kepe V, Barrio JR, Huang SC, Ercoli L, Siddarth P, Shoghi-Jadid K, Cole GM, Satyamurthy N, Cummings JL, Small GW, Phelps ME (2006) Serotonin 1A receptors in the living brain of Alzheimer's disease patients. Proc Natl Acad Sci U S A 103:702-707.

Kesner RP (2000) Behavioral analysis of the contribution of the hippocampus and parietal cortex to the processing of information: interactions and dissociations. Hippocampus 10:483-490.

Kesner RP (2005) Temporal processing of information: the role of the medial prefrontal cortex and hippocampus: theoretical comment on Gilmartin and McEchron (2005). Behav Neurosci 119:1705-1709.

Kida S, Josselyn SA, Pena de Ortiz S, Kogan JH, Chevere I, Masushige S, Silva AJ (2002) CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. Nat Neurosci 5:348-355.

Kolb B (1984) Functions of the frontal cortex of the rat: a comparative review. Brain Res 320:65-98.

Kolb B (1990) Animal models for human PFC-related disorders. Prog Brain Res 85:501-519.

Konishi S, Hirose S, Jimura K, Chikazoe J, Watanabe T, Kimura HM, Miyashita Y (2010) Medial prefrontal activity during shifting under novel situations. Neurosci Lett 484:182-186.

Kos T, Popik P (2005) A comparison of the predictive therapeutic and undesired side-effects of the NMDA receptor antagonist, memantine, in mice. Behav Pharmacol 16:155-161.

Kosasa T, Kuriya Y, Matsui K, Yamanishi Y (1999) Inhibitory effects of donepezil hydrochloride (E2020) on cholinesterase activity in brain and peripheral tissues of young and aged rats. Eur J Pharmacol 386:7-13.

Krazem A, Borde N, Beracochea D (2001) Effects of diazepam and beta-CCM on working memory in mice: relationships with emotional reactivity. Pharmacol Biochem Behav 68:235-244.

Kringelbach ML (2005) The human orbitofrontal cortex: linking reward to hedonic experience. Nat Rev Neurosci 6:691-702.

Kubota K, Niki H (1971) Prefrontal cortical unit activity and delayed alternation performance in monkeys. J Neurophysiol 34:337-347.

L

Lagostena L, Danober L, Challal S, Lestage P, Mocaer E, Trocme-Thibierge C, Cherubini E (2010) Modulatory effects of S 38232, a non alpha-7 containing nicotine acetylcholine

receptor agonist on network activity in the mouse hippocampus. Neuropharmacology 58:806-815.
Lai MK, Tsang SW, Alder JT, Keene J, Hope T, Esiri MM, Francis PT, Chen CP (2005) Loss of serotonin 5-HT2A receptors in the postmortem temporal cortex correlates with rate of cognitive decline in Alzheimer's disease. Psychopharmacology (Berl) 179:673-677.
Lalonde R (2002) The neurobiological basis of spontaneous alternation. Neurosci Biobehav Rev 26:91-104.
Landfield PW, Lynch G (1977) Impaired monosynaptic potentiation in in vitro hippocampal slices from aged, memory-deficient rats. J Gerontol 32:523-533.
Laroche S, Jay TM, Thierry AM (1990) Long-term potentiation in the prefrontal cortex following stimulation of the hippocampal CA1/subicular region. Neurosci Lett 114:184-190.
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.
Lavenex P, Amaral DG (2000) Hippocampal-neocortical interaction: a hierarchy of associativity. Hippocampus 10:420-430.
Leshikar ED, Gutchess AH, Hebrank AC, Sutton BP, Park DC (2010) The impact of increased relational encoding demands on frontal and hippocampal function in older adults. Cortex 46:507-521.
Levin ED, Rezvani AH (2002) Nicotinic treatment for cognitive dysfunction. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord 1:423-431.
Levin ED, McClernon FJ, Rezvani AH (2006) Nicotinic effects on cognitive function: behavioral characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. Psychopharmacology (Berl) 184:523-539.
Levin ED, Bradley A, Addy N, Sigurani N (2002) Hippocampal alpha 7 and alpha 4 beta 2 nicotinic receptors and working memory. Neuroscience 109:757-765.
Levin ED, Petro A, Rezvani AH, Pollard N, Christopher NC, Strauss M, Avery J, Nicholson J, Rose JE (2009) Nicotinic alpha7- or beta2-containing receptor knockout: effects on radial-arm maze learning and long-term nicotine consumption in mice. Behav Brain Res 196:207-213.
Lhermitte F, Signoret JL (1972) [Neuropsychologic analysis and differentiation of amnesia syndromes]. Rev Neurol (Paris) 126:161-178.
Li X, Rainnie DG, McCarley RW, Greene RW (1998) Presynaptic nicotinic receptors facilitate monoaminergic transmission. J Neurosci 18:1904-1912.
Liefooghe B, Barrouillet P, Vandierendonck A, Camos V (2008) Working memory costs of task switching. J Exp Psychol Learn Mem Cogn 34:478-494.
Lindesay J (2008) Prospects for the classification of mental disorders of the elderly. Eur Psychiatry 23:477-480.
Lindner MD, Hogan JB, Hodges DB, Jr., Orie AF, Chen P, Corsa JA, Leet JE, Gillman KW, Rose GM, Jones KM, Gribkoff VK (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.
Livesay PJ, Livesay DJ (1981) Spontaneous alternation in the white rat : a learning memory phenomenon. Behav Neural Biol 32:158-169.
Lockhart B, Iop F, Closier M, Lestage P (2000) (S)-2,3-dihydro-[3,4]cyclopentano-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide: (S18986-1) a positive modulator of AMPA receptors enhances (S)-AMPA-mediated [3H]noradrenaline release from rat hippocampal and frontal cortex slices. Eur J Pharmacol 401:145-153.

Lockhart BP, Lestage PJ (2003) Cognition enhancing or neuroprotective compounds for the treatment of cognitive disorders: why? when? which? Exp Gerontol 38:119-128.

Lockrow J, Boger H, Bimonte-Nelson H, Granholm AC (2010) Effects of long-term memantine on memory and neuropathology in Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. Behav Brain Res.

Logie RH (1986) Visuo-spatial processing in working memory. Q J Exp Psychol A 38:229-247.

London ED, Ball MJ, Waller SB (1989) Nicotinic binding sites in cerebral cortex and hippocampus in Alzheimer's dementia. Neurochem Res 14:745-750.

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

M

Malleret G, Alarcon JM, Martel G, Takizawa S, Vronskaya S, Yin D, Chen IZ, Kandel ER, Shumyatsky GP (2010) Bidirectional regulation of hippocampal long-term synaptic plasticity and its influence on opposing forms of memory. J Neurosci 30:3813-3825.

Mansuy IM, Shenolikar S (2006) Protein serine/threonine phosphatases in neuronal plasticity and disorders of learning and memory. Trends Neurosci 29:679-686.

Marighetto A, Valerio S, Desmedt A, Philippin JN, 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, 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.

Martel G, Millard A, Jaffard R, Guillou JL (2006) Stimulation of hippocampal adenylyl cyclase activity dissociates memory consolidation processes for response and place learning. Learn Mem 13:342-348.

Martinez-Coria H, Green KN, Billings LM, Kitazawa M, Albrecht M, Rammes G, Parsons CG, Gupta S, Banerjee P, LaFerla FM (2010) Memantine improves cognition and reduces Alzheimer's-like neuropathology in transgenic mice. Am J Pathol 176:870-880.

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 895:273-276.

Maskos U, Molles BE, Pons S, Besson M, Guiard BP, Guilloux JP, Evrard A, Cazala P, Cormier A, Mameli-Engvall M, Dufour N, Cloez-Tayarani I, Bemelmans AP, Mallet J, Gardier AM, David V, Faure P, Granon S, Changeux JP (2005) Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. Nature 436:103-107.

Massicotte G, Baudry M (1991) Triggers and substrates of hippocampal synaptic plasticity. Neurosci Biobehav Rev 15:415-423.

Masuoka T, Kamei C (2009) The role of nicotinic receptors in the amelioration of cholinesterase inhibitors in scopolamine-induced memory deficits. Psychopharmacology (Berl) 206:259-265.
Mather M, Carstensen LL (2005) Aging and motivated cognition: the positivity effect in attention and memory. Trends Cogn Sci 9:496-502.
Mattay VS, Fera F, Tessitore A, Hariri AR, Berman KF, Das S, Meyer-Lindenberg A, Goldberg TE, Callicott JH, Weinberger DR (2006) Neurophysiological correlates of age-related changes in working memory capacity. Neurosci Lett 392:32-37.
Maubourguet N, Lesne A, Changeux JP, Maskos U, Faure P (2008) Behavioral sequence analysis reveals a novel role for beta2* nicotinic receptors in exploration. PLoS Comput Biol 4:e1000229.
May CP, Hasher L, Kane MJ (1999) The role of interference in memory span. Mem Cognit 27:759-767.
Mayr B, Montminy M (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. Nat Rev Mol Cell Biol 2:599-609.
McDonald RJ, White NM (1993) A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. Behav Neurosci 107:3-22.
McGaughy J, Decker MW, Sarter M (1999) Enhancement of sustained attention performance by the nicotinic acetylcholine receptor agonist ABT-418 in intact but not basal forebrain-lesioned rats. Psychopharmacology (Berl) 144:175-182.
McIntyre CK, Pal SN, Marriott LK, Gold PE (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.
McKinney M, Jacksonville MC (2005) Brain cholinergic vulnerability: relevance to behavior and disease. Biochem Pharmacol 70:1115-1124.
Mesulam MM, Mufson EJ, Wainer BH, Levey AI (1983) Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). Neuroscience 10:1185-1201.
Meyer EM, Tay ET, Zoltewicz JA, Meyers C, King MA, Papke RL, De Fiebre CM (1998) Neuroprotective and memory-related actions of novel alpha-7 nicotinic agents with different mixed agonist/antagonist properties. J Pharmacol Exp Ther 284:1026-1032.
Miller SL, Fenstermacher E, Bates J, Blacker D, Sperling RA, Dickerson BC (2008) Hippocampal activation in adults with mild cognitive impairment predicts subsequent cognitive decline. J Neurol Neurosurg Psychiatry 79:630-635.
Mons N, Segu L, Nogues X, Buhot MC (2004) Effects of age and spatial learning on adenylyl cyclase mRNA expression in the mouse hippocampus. Neurobiol Aging 25:1095-1106.
Montgomery KC (1952) Exploratory behavior and its relation to spontaneous alternation in a series of maze exposures. J Comp Physiol Psychol 45:50-57.
Morgan MA, LeDoux JE (1995) Differential contribution of dorsal and ventral medial prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats. Behav Neurosci 109:681-688.
Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J Neurosci Methods 11:47-60.
Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. Nature 297:681-683.
Moser MB, 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.

Moser N, Mechawar N, Jones I, Gochberg-Sarver A, Orr-Urtreger A, Plomann M, Salas R, Molles B, Marubio L, Roth U, Maskos U, Winzer-Serhan U, Bourgeois JP, Le Sourd AM, De Biasi M, Schroder H, Lindstrom J, Maelicke A, Changeux JP, Wevers A (2007) Evaluating the suitability of nicotinic acetylcholine receptor antibodies for standard immunodetection procedures. J Neurochem 102:479-492.

Muller RU, Kubie JL, Saypoff R (1991) The hippocampus as a cognitive graph (abridged version). Hippocampus 1:243-246.

Murray CL, Fibiger HC (1986) Pilocarpine and physostigmine attenuate spatial memory impairments produced by lesions of the nucleus basalis magnocellularis. Behav Neurosci 100:23-32.

N

Nader K, Hardt O (2009) A single standard for memory: the case for reconsolidation. Nat Rev Neurosci 10:224-234.

Nagai T, McGeer PL, Peng JH, McGeer EG, Dolman CE (1983) Choline acetyltransferase immunohistochemistry in brains of Alzheimer's disease patients and controls. Neurosci Lett 36:195-199.

Najlerahim A, Francis PT, Bowen DM (1990) Age-related alteration in excitatory amino acid neurotransmission in rat brain. Neurobiol Aging 11:155-158.

Nakazawa K, McHugh TJ, Wilson MA, Tonegawa S (2004) NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. Nat Rev Neurosci 5:361-372.

Newhouse PA, Potter A, Corwin J, Lenox R (1992) Acute nicotinic blockade produces cognitive impairment in normal humans. Psychopharmacology (Berl) 108:480-484.

Newhouse PA, Potter A, Corwin J, Lenox R (1994) Age-related effects of the nicotinic antagonist mecamylamine on cognition and behavior. Neuropsychopharmacology 10:93-107.

Nicholls RE, Alarcon JM, Malleret G, Carroll RC, Grody M, Vronskaya S, Kandel ER (2008) Transgenic mice lacking NMDAR-dependent LTD exhibit deficits in behavioral flexibility. Neuron 58:104-117.

Norris CM, Korol DL, Foster TC (1996) Increased susceptibility to induction of long-term depression and long-term potentiation reversal during aging. J Neurosci 16:5382-5392.

Nott A, Levin ED (2006) Dorsal hippocampal alpha7 and alpha4beta2 nicotinic receptors and memory. Brain Res 1081:72-78.

Nyakas C, Granic I, Halmy LG, Banerjee P, Luiten PG (2010) The basal forebrain cholinergic system in aging and dementia. Rescuing cholinergic neurons from neurotoxic amyloid-beta42 with memantine. Behav Brain Res.

Nyberg L, Salami A, Andersson M, Eriksson J, Kalpouzos G, Kauppi K, Lind J, Pudas S, Persson J, Nilsson LG (2010) Longitudinal evidence for diminished frontal cortex function in aging. Proc Natl Acad Sci U S A 107:22682-22686.

Nyth AL, Gottfries CG (1990) The clinical efficacy of citalopram in treatment of emotional disturbances in dementia disorders. A Nordic multicentre study. Br J Psychiatry 157:894-901.

O

O'Brien JL, O'Keefe KM, LaViolette PS, DeLuca AN, Blacker D, Dickerson BC, Sperling RA (2010) Longitudinal fMRI in elderly reveals loss of hippocampal activation with clinical decline. Neurology 74:1969-1976.

O'Keefe J (1979) A review of the hippocampal place cells. Prog Neurobiol 13:419-439.

Obrenovitch TP, Urenjak J (1997) Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. Prog Neurobiol 51:39-87.

Ohno M, Yamamoto T, Watanabe S (1993) Blockade of hippocampal nicotinic receptors impairs working memory but not reference memory in rats. Pharmacol Biochem Behav 45:89-93.

Olincy A, Harris JG, Johnson LL, Pender V, Kongs S, Allensworth D, Ellis J, Zerbe GO, Leonard S, Stevens KE, Stevens JO, Martin L, Adler LE, Soti F, Kem WR, Freedman R (2006) Proof-of-concept trial of an alpha7 nicotinic agonist in schizophrenia. Arch Gen Psychiatry 63:630-638.

Olton DS (1979) Mazes, maps, and memory. Am Psychol 34:583-596.

Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. Prog Neurobiol 54:581-618.

P

Packard MG, McGaugh JL (1996) Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. Neurobiol Learn Mem 65:65-72.

Packard MG, Hirsh R, White NM (1989) Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze tasks: evidence for multiple memory systems. J Neurosci 9:1465-1472.

Palmer AM, Francis PT, Benton JS, Sims NR, Mann DM, Neary D, Snowden JS, Bowen DM (1987) Presynaptic serotonergic dysfunction in patients with Alzheimer's disease. J Neurochem 48:8-15.

Pardon MC (2007) Stress and ageing interactions: a paradox in the context of shared etiological and physiopathological processes. Brain Res Rev 54:251-273.

Pardon MC, Rattray I (2008) What do we know about the long-term consequences of stress on ageing and the progression of age-related neurodegenerative disorders? Neurosci Biobehav Rev 32:1103-1120.

Parent MB, Baxter MG (2004) Septohippocampal acetylcholine: involved in but not necessary for learning and memory? Learn Mem 11:9-20.

Parikh V, Man K, Decker MW, Sarter M (2008) Glutamatergic contributions to nicotinic acetylcholine receptor agonist-evoked cholinergic transients in the prefrontal cortex. J Neurosci 28:3769-3780.

Parikh V, Ji J, Decker MW, Sarter M (2010) Prefrontal beta2 subunit-containing and alpha7 nicotinic acetylcholine receptors differentially control glutamatergic and cholinergic signaling. J Neurosci 30:3518-3530.

Park DC, Reuter-Lorenz P (2009) The adaptive brain: aging and neurocognitive scaffolding. Annu Rev Psychol 60:173-196.

Park DC, Welsh RC, Marshuetz C, Gutchess AH, Mikels J, Polk TA, Noll DC, Taylor SF (2003) Working memory for complex scenes: age differences in frontal and hippocampal activations. J Cogn Neurosci 15:1122-1134.

Parsons CG, Stoffler A, Danysz W (2007) Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system--too little activation is bad, too much is even worse. Neuropharmacology 53:699-723.

Paxinos G, Franklin KBJ (2001) The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. A Press.

Pepeu G, Giovannini MG (2009) Cholinesterase inhibitors and beyond. Curr Alzheimer Res 6:86-96.

Pepeu G, Giovannini MG (2010) Cholinesterase inhibitors and memory. Chem Biol Interact 187:403-408.

Pereira de Vasconcelos A, Klur S, Muller C, Cosquer B, Lopez J, Certa U, Cassel JC (2006) Reversible inactivation of the dorsal hippocampus by tetrodotoxin or lidocaine: a comparative study on cerebral functional activity and motor coordination in the rat. Neuroscience 141:1649-1663.

Peters M, Mizuno K, Ris L, Angelo M, Godaux E, Giese KP (2003) Loss of Ca2+/calmodulin kinase kinase beta affects the formation of some, but not all, types of hippocampus-dependent long-term memory. J Neurosci 23:9752-9760.

Petersen SE, van Mier H, Fiez JA, Raichle ME (1998) The effects of practice on the functional anatomy of task performance. Proc Natl Acad Sci U S A 95:853-860.

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 29:e45.

Phelps EA, LeDoux JE (2005) Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. Neuron 48:175-187.

Picciotto MR, Zoli M (2002) Nicotinic receptors in aging and dementia. J Neurobiol 53:641-655.

Picciotto MR, Zoli M, Lena C, Bessis A, Lallemand Y, Le Novere N, Vincent P, Pich EM, Brulet P, Changeux JP (1995) Abnormal avoidance learning in mice lacking functional high-affinity nicotine receptor in the brain. Nature 374:65-67.

Pierard C, Liscia P, Valleau M, Drouet I, Chauveau F, Huart B, Bonneau D, Jouanin JC, Beaumont M, Beracochea D (2006) Modafinil-induced modulation of working memory and plasma corticosterone in chronically-stressed mice. Pharmacol Biochem Behav 83:1-8.

Pierard C, Liscia P, Philippin JN, Mons N, Lafon T, Chauveau F, Van Beers P, Drouet I, Serra A, Jouanin JC, Beracochea D (2007) Modafinil restores memory performance and neural activity impaired by sleep deprivation in mice. Pharmacol Biochem Behav 88:55-63.

Pirotte B, Podona T, Diouf O, de Tullio P, Lebrun P, Dupont L, Somers F, Delarge J, Morain P, Lestage P, Lepagnol J, Spedding M (1998) 4H-1,2,4-Pyridothiadiazine 1,1-dioxides and 2,3-dihydro-4H-1,2, 4-pyridothiadiazine 1,1-dioxides chemically related to diazoxide and cyclothiazide as powerful positive allosteric modulators of (R/S)-2-amino-3-(3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-yl)propionic acid receptors: design, synthesis, pharmacology, and structure-activity relationships. J Med Chem 41:2946-2959.

Porte Y, Buhot MC, Mons N (2008a) Alteration of CREB phosphorylation and spatial memory deficits in aged 129T2/Sv mice. Neurobiol Aging 29:1533-1546.

Porte Y, Buhot MC, Mons NE (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.

Potter A, Corwin J, Lang J, Piasecki M, Lenox R, Newhouse PA (1999) Acute effects of the selective cholinergic channel activator (nicotinic agonist) ABT-418 in Alzheimer's disease. Psychopharmacology (Berl) 142:334-342.

Prabhakaran V, Narayanan K, Zhao Z, Gabrieli JD (2000) Integration of diverse information in working memory within the frontal lobe. Nat Neurosci 3:85-90.

Procter AW, Stirling JM, Stratmann GC, Cross AJ, Bowen DM (1989) Loss of glycine-dependent radioligand binding to the N-methyl-D-aspartate-phencyclidine receptor complex in patients with Alzheimer's disease. Neurosci Lett 101:62-66.

Pych JC, Chang Q, Colon-Rivera C, Gold PE (2005) Acetylcholine release in hippocampus and striatum during testing on a rewarded spontaneous alternation task. Neurobiol Learn Mem 84:93-101.

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

Radcliffe KA, Dani JA (1998) Nicotinic stimulation produces multiple forms of increased glutamatergic synaptic transmission. J Neurosci 18:7075-7083.

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 19:4585-4594.

Ragozzino ME, Pal SN, Unick K, Stefani MR, Gold PE (1998) Modulation of hippocampal acetylcholine release and spontaneous alternation scores by intrahippocampal glucose injections. J Neurosci 18:1595-1601.

Ragozzino ME, Kim J, Hassert D, Minniti N, Kiang C (2003) The contribution of the rat prelimbic-infralimbic areas to different forms of task switching. Behav Neurosci 117:1054-1065.

Raje S, Patat AA, Parks V, Schechter L, Plotka A, Paul J, Langstrom B (2008) A positron emission tomography study to assess binding of lecozotan, a novel 5-hydroxytryptamine-1A silent antagonist, to brain 5-HT1A receptors in healthy young and elderly subjects, and in patients with Alzheimer's disease. Clin Pharmacol Ther 83:86-96.

Ramon y Cajal S (1911) Histologie du système nerveux de l'Homme et des vertébrés. Maloine: Paris.

Ramos BP, Birnbaum SG, Lindenmayer I, Newton SS, Duman RS, Arnsten AF (2003) Dysregulation of protein kinase a signaling in the aged prefrontal cortex: new strategy for treating age-related cognitive decline. Neuron 40:835-845.

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.

Reus GZ, Valvassori SS, Machado RA, Martins MR, Gavioli EC, Quevedo J (2008) Acute treatment with low doses of memantine does not impair aversive, non-associative and recognition memory in rats. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 376:295-300.
Reuter-Lorenz P, Cappell KA (2008) Neurocognitive aging and the compensation hypothesis. Current Directions in Psychological Science 17:117-182.
Ricciardi E, Pietrini P, Schapiro MB, Rapoport SI, Furey ML (2009) Cholinergic modulation of visual working memory during aging: a parametric PET study. Brain Res Bull 79:322-332.
Rich EL, Shapiro ML (2007) Prelimbic/infralimbic inactivation impairs memory for multiple task switches, but not flexible selection of familiar tasks. J Neurosci 27:4747-4755.
Rissman RA, De Blas AL, Armstrong DM (2007) GABA(A) receptors in aging and Alzheimer's disease. J Neurochem 103:1285-1292.
Robbins TW (2007) Shifting and stopping: fronto-striatal substrates, neurochemical modulation and clinical implications. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 362:917-932.
Robbins TW, Murphy ER (2006) Behavioural pharmacology: 40+ years of progress, with a focus on glutamate receptors and cognition. Trends Pharmacol Sci 27:141-148.
Roberson ED, English JD, Adams JP, Selcher JC, Kondratick C, Sweatt JD (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 AC, Robbins TW, Weiskrantz L (1998) Discussion and conclusions. Roberts, AC, Robbins, T W, Weiskrantz, L editors The prefrontal cortex: executive and cognitive functions.:221-242.
Rogers SW, Gahring LC, Collins AC, Marks M (1998) Age-related changes in neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha4 expression are modified by long-term nicotine administration. J Neurosci 18:4825-4832.
Rosene DL, Van Hoesen GW (1977) Hippocampal efferents reach widespread areas of cerebral cortex and amygdala in the rhesus monkey. Science 198:315-317.
Rosi S, Giovannini MG, Lestage PJ, Munoz C, Corte LD, Pepeu G (2004) S 18986, a positive modulator of AMPA receptors with cognition-enhancing properties, increases ACh release in the hippocampus of young and aged rat. Neurosci Lett 361:120-123.
Runyan JD, Dash PK (2005) Distinct prefrontal molecular mechanisms for information storage lasting seconds versus minutes. Learn Mem 12:232-238.
Runyan JD, Moore AN, Dash PK (2005) A role for prefrontal calcium-sensitive protein phosphatase and kinase activities in working memory. Learn Mem 12:103-110.
Rusted JM, Newhouse PA, Levin ED (2000) Nicotinic treatment for degenerative neuropsychiatric disorders such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Behav Brain Res 113:121-129.

S

Sabri O, Kendziorra K, Wolf H, Gertz HJ, Brust P (2008) Acetylcholine receptors in dementia and mild cognitive impairment. Eur J Nucl Med Mol Imaging 35 Suppl 1:S30-45.
Salat DH, Buckner RL, Snyder AZ, Greve DN, Desikan RS, Busa E, Morris JC, Dale AM, Fischl B (2004) Thinning of the cerebral cortex in aging. Cereb Cortex 14:721-730.
Sanchez-Santed F, de Bruin JP, Heinsbroek RP, Verwer RW (1997) Spatial delayed alternation of rats in a T-maze: effects of neurotoxic lesions of the medial prefrontal cortex and of T-maze rotations. Behav Brain Res 84:73-79.

Sarter M, Parikh V, Howe WM (2009) nAChR agonist-induced cognition enhancement: integration of cognitive and neuronal mechanisms. Biochem Pharmacol 78:658-667.
Savage LM, Chang Q, Gold PE (2003) Diencephalic damage decreases hippocampal acetylcholine release during spontaneous alternation testing. Learn Mem 10:242-246.
Savic MM, Obradovic DI, Ugresic ND, Cook JM, Yin W, Bokonjic DR (2005) Bidirectional effects of benzodiazepine binding site ligands in the passive avoidance task: differential antagonism by flumazenil and beta-CCt. Behav Brain Res 158:293-300.
Scali C, Giovannini MG, Prosperi C, Bartolini L, Pepeu G (1997) Tacrine administration enhances extracellular acetylcholine in vivo and restores the cognitive impairment in aged rats. Pharmacol Res 36:463-469.
Schechter LE, Dawson LA, Harder JA (2002) The potential utility of 5-HT1A receptor antagonists in the treatment of cognitive dysfunction associated with Alzheimer s disease. Curr Pharm Des 8:139-145.
Schliebs R, Arendt T (2006) The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. J Neural Transm 113:1625-1644.
Schliebs R, Arendt T (2010) The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. Behav Brain Res.
Schneider-Garces NJ, Gordon BA, Brumback-Peltz CR, Shin E, Lee Y, Sutton BP, Maclin EL, Gratton G, Fabiani M (2010) Span, CRUNCH, and beyond: working memory capacity and the aging brain. J Cogn Neurosci 22:655-669.
Schoenbaum G, Setlow B, Saddoris MP, Gallagher M (2006) Encoding changes in orbitofrontal cortex in reversal-impaired aged rats. J Neurophysiol 95:1509-1517.
Schroder H, Giacobini E, Struble RG, Zilles K, Maelicke A, Luiten PG, Strosberg AD (1991) Cellular distribution and expression of cortical acetylcholine receptors in aging and Alzheimer's disease. Ann N Y Acad Sci 640:189-192.
Scoville WB, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. J Neurol Neurosurg Psychiatry 20:11-21.
Seamans JK, Floresco SB, Phillips AG (1995) Functional differences between the prelimbic and anterior cingulate regions of the rat prefrontal cortex. Behav Neurosci 109:1063-1073.
Segovia G, Porras A, Del Arco A, Mora F (2001) Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. Mech Ageing Dev 122:1-29.
Seguela P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, Patrick JW (1993) Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. J Neurosci 13:596-604.
Sellal F, Nieoullon A, Michel G, Michel BF, Lacomblez L, Geerts H, Delini Stula A, Bordet R, Bentue-Ferrer D, Allain H (2005) Pharmacology of Alzheimer's disease: appraisal and prospects. Dement Geriatr Cogn Disord 19:229-245.
Seltzer B (2007) Donepezil: an update. Expert Opin Pharmacother 8:1011-1023.
Shallice T (1979) A theory of consciousness. Science 204:827.
Sharma SK, Bagnall MW, Sutton MA, Carew TJ (2003) Inhibition of calcineurin facilitates the induction of memory for sensitization in Aplysia: requirement of mitogen-activated protein kinase. Proc Natl Acad Sci U S A 100:4861-4866.
Sherman KA, Kuster JE, Dean RL, Bartus RT, Friedman E (1981) Presynaptic cholinergic mechanisms in brain of aged rats with memory impairments. Neurobiol Aging 2:99-104.
Sherry DF, Schacter DL (1987) The evolution of multiple memory systems. Psychol Rev 94:439-454.
Singh N, Sharma A, Singh M (1998) Possible mechanism of alprazolam-induced amnesia in mice. Pharmacology 56:46-50.

Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC (2001) Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. Annu Rev Neurosci 24:1217-1281.
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 HD, 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 LR (1969) Effects of pretrial and posttrial administration of cholinergic and anticholinergic drugs on spontaneous alternation. J Comp Physiol Psychol 69:69-75.
Squire LR (1992) Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. Psychol Rev 99:195-231.
Squire LR (2004) Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. Neurobiol Learn Mem 82:171-177.
Squire LR, Knowlton B (1996) Memory, Hippocampus and Brain Systems. press M, ed The cognitive neurosciences, G. MS. Cambridge.
Stanciu M, Radulovic J, Spiess J (2001) Phosphorylated cAMP response element binding protein in the mouse brain after fear conditioning: relationship to Fos production. Brain Res Mol Brain Res 94:15-24.
Stevens R, Cowey A (1973) Effects of dorsal and ventral hippocampal lesions on spontaneous alternation, learned alternation and probability learning in rats. Brain Res 52:203-224.
Swanson GT (2009) Targeting AMPA and kainate receptors in neurological disease: therapies on the horizon? Neuropsychopharmacology 34:249-250.

T

Taly A, Corringer PJ, Guedin D, Lestage P, Changeux JP (2009) Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. Nat Rev Drug Discov 8:733-750.
Taragano FE, Lyketsos CG, Mangone CA, Allegri RF, Comesana-Diaz E (1997) A double-blind, randomized, fixed-dose trial of fluoxetine vs. amitriptyline in the treatment of major depression complicating Alzheimer's disease. Psychosomatics 38:246-252.
Taubenfeld SM, Milekic MH, Monti B, Alberini CM (2001) The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. Nat Neurosci 4:813-818.
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 147:107-114.
Taylor JR, Birnbaum S, Ubriani R, Arnsten AF (1999) Activation of cAMP-dependent protein kinase A in prefrontal cortex impairs working memory performance. J Neurosci 19:RC23.
Thomas GJ, Spafford PS (1984) Deficits for representational memory induced by septal and cortical lesions (singly and combined) in rats. Behav Neurosci 98:394-404.
Toescu EC, Verkhratsky A, Landfield PW (2004) Ca2+ regulation and gene expression in normal brain aging. Trends Neurosci 27:614-620.
Tohgi H, Utsugisawa K, Yoshimura M, Nagane Y, Mihara M (1998) Age-related changes in nicotinic acetylcholine receptor subunits alpha4 and beta2 messenger RNA expression in postmortem human frontal cortex and hippocampus. Neurosci Lett 245:139-142.

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.

Trifilieff P, Herry C, Vanhoutte P, Caboche J, Desmedt A, Riedel G, Mons N, Micheau J (2006) Foreground contextual fear memory consolidation requires two independent phases of hippocampal ERK/CREB activation. Learn Mem 13:349-358.

Tronche C, Pierard C, Coutan M, Chauveau F, Liscia P, Beracochea D (2010) Increased stress-induced intra-hippocampus corticosterone rise associated with memory impairments in middle-aged mice. Neurobiol Learn Mem 93:343-351.

Tsang SW, Lai MK, Kirvell S, Francis PT, Esiri MM, Hope T, Chen CP, Wong PT (2006) Impaired coupling of muscarinic M1 receptors to G-proteins in the neocortex is associated with severity of dementia in Alzheimer's disease. Neurobiol Aging 27:1216-1223.

Tulving E (1995) Organisation of memory: quo vadis? (Gazzaniga MS, ed) The cognitive neurosciences.:839-847.

Tulving E, Hayman CA, Macdonald CA (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 DL, McLachlan DR, Moscovitch M (1988) Priming of semantic autobiographical knowledge: a case study of retrograde amnesia. Brain Cogn 8:3-20.

U

Upton N, Chuang TT, Hunter AJ, Virley DJ (2008) 5-HT6 receptor antagonists as novel cognitive enhancing agents for Alzheimer's disease. Neurotherapeutics 5:458-469.

Utsugisawa K, Tohgi H, Yoshimura M, Nagane Y, Ukitsu M (1999a) Quantitation of nicotinic acetylcholine receptor subunits alpha 4 and beta 2 messenger RNA in postmortem human brain using a non-radioactive RT-PCR and CCD imaging system. Brain Res Brain Res Protoc 4:92-96.

Utsugisawa K, Nagane Y, Tohgi H, Yoshimura M, Ohba H, Genda Y (1999b) Changes with aging and ischemia in nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha7 mRNA expression in postmortem human frontal cortex and putamen. Neurosci Lett 270:145-148.

Uylings HB, Groenewegen HJ, Kolb B (2003) Do rats have a prefrontal cortex? Behav Brain Res 146:3-17.

V

Van Haastert PJ, Van Driel R, Jastorff B, Baraniak J, Stec WJ, De Wit RJ (1984) Competitive cAMP antagonists for cAMP-receptor proteins. J Biol Chem 259:10020-10024.

Van Kampen M, Selbach K, Schneider R, Schiegel E, Boess F, Schreiber R (2004) AR-R 17779 improves social recognition in rats by activation of nicotinic alpha7 receptors. Psychopharmacology (Berl) 172:375-383.

van Vugt MK, Schulze-Bonhage A, Litt B, Brandt A, Kahana MJ (2010) Hippocampal gamma oscillations increase with memory load. J Neurosci 30:2694-2699.

Vandesquille M, Krazem A, Louis C, Lestage P, Beracochea D (2011a) S 18986 reverses spatial working memory impairments in aged mice: comparison with memantine. Psychopharmacology (Berl) 215:709-720.

Vandesquille M, Carrié I, Louis C, Beracochea D, Lestage P (2011b) Effects of positive modulator of α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)-type glutamate receptors in a benzodiazepine-induced deficit of spatial discrimination in mice. Journal of Psychopharmacology:submit.

Vargha-Khadem F, Gadian DG, Watkins KE, Connelly A, Van Paesschen W, Mishkin M (1997) Differential effects of early hippocampal pathology on episodic and semantic memory. Science 277:376-380.

Vertes RP (2004) Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. Synapse 51:32-58.

Vertes RP (2005) Hippocampal theta rhythm: a tag for short-term memory. Hippocampus 15:923-935.

Vertes RP (2006) Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. Neuroscience 142:1-20.

Victor M, Adams RD, Collins GH (1971) The Wernicke-Korsakoff syndrome. A clinical and pathological study of 245 patients, 82 with post-mortem examinations. Contemp Neurol Ser 7:1-206.

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 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

Wakabayashi K, Narisawa-Saito M, Iwakura Y, Arai T, Ikeda K, Takahashi H, Nawa H (1999) Phenotypic down-regulation of glutamate receptor subunit GluR1 in Alzheimer's disease. Neurobiol Aging 20:287-295.

Walker MP, Stickgold R (2006) Sleep, memory, and plasticity. Annu Rev Psychol 57:139-166.

Wan RQ, Pang K, Olton DS (1994) Hippocampal and amygdaloid involvement in nonspatial and spatial working memory in rats: effects of delay and interference. Behav Neurosci 108:866-882.

Wang GW, Cai JX (2006) Disconnection of the hippocampal-prefrontal cortical circuits impairs spatial working memory performance in rats. Behav Brain Res 175:329-336.

Wang JH, Kelly PT (1996) The balance between postsynaptic Ca(2+)-dependent protein kinase and phosphatase activities controlling synaptic strength. Learn Mem 3:170-181.

Wang Y, Mishra R, Simonson MS (2003) Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II stimulates c-fos transcription and DNA synthesis by a Src-based mechanism in glomerular mesangial cells. J Am Soc Nephrol 14:28-36.

Warrington EK, Shallice T (1969) The selective impairment of auditory verbal short-term memory. Brain 92:885-896.

Warrington EK, Weiskrantz L (1970) Amnesic syndrome: consolidation or retrieval? Nature 228:628-630.

Wenk GL, Engisch KL (1986) [3H]ketanserin (serotonin type 2) binding increases in rat cortex following basal forebrain lesions with ibotenic acid. J Neurochem 47:845-850.

Wevers A, Monteggia L, Nowacki S, Bloch W, Schutz U, Lindstrom J, Pereira EF, Eisenberg H, Giacobini E, de Vos RA, Steur EN, Maelicke A, Albuquerque EX, Schroder H (1999) Expression of nicotinic acetylcholine receptor subunits in the cerebral cortex in

Alzheimer's disease: histotopographical correlation with amyloid plaques and hyperphosphorylated-tau protein. Eur J Neurosci 11:2551-2565.
White NM, McDonald RJ (2002) Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. Neurobiol Learn Mem 77:125-184.
Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR (1982) Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. Science 215:1237-1239.
Wilens TE, Decker MW (2007) Neuronal nicotinic receptor agonists for the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder: focus on cognition. Biochem Pharmacol 74:1212-1223.
Wilens TE, Verlinden MH, Adler LA, Wozniak PJ, West SA (2006) ABT-089, a neuronal nicotinic receptor partial agonist, for the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in adults: results of a pilot study. Biol Psychiatry 59:1065-1070.
Wilens TE, Biederman J, Spencer TJ, Bostic J, Prince J, Monuteaux MC, Soriano J, Fine C, Abrams A, Rater M, Polisner D (1999) A pilot controlled clinical trial of ABT-418, a cholinergic agonist, in the treatment of adults with attention deficit hyperactivity disorder. Am J Psychiatry 156:1931-1937.
Willems E, Leyns L, Vandesompele J (2008) Standardization of real-time PCR gene expression data from independent biological replicates. Anal Biochem 379:127-129.
Williams CM, El Mohsen MA, Vauzour D, Rendeiro C, Butler LT, Ellis JA, Whiteman M, Spencer JP (2008) Blueberry-induced changes in spatial working memory correlate with changes in hippocampal CREB phosphorylation and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels. Free Radic Biol Med 45:295-305.
Witter MP, Groenewegen HJ, Lopes da Silva FH, Lohman AH (1989) Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. Prog Neurobiol 33:161-253.
Wu CF, 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.

X

Xu J, Rong S, Xie B, Sun Z, Deng Q, Wu H, Bao W, Wang D, Yao P, Huang F, Liu L (2010) Memory impairment in cognitively impaired aged rats associated with decreased hippocampal CREB phosphorylation: reversal by procyanidins extracted from the lotus seedpod. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 65:933-940.

Y

Yamada KA (2000) Therapeutic potential of positive AMPA receptor modulators in the treatment of neurological disease. Expert Opin Investig Drugs 9:765-778.
Yamamoto S, Kanno T, Nagata T, Yaguchi T, Tanaka A, Nishizaki T (2005) The linoleic acid derivative FR236924 facilitates hippocampal synaptic transmission by enhancing activity of presynaptic alpha7 acetylcholine receptors on the glutamatergic terminals. Neuroscience 130:207-213.
Yoon T, Okada J, Jung MW, Kim JJ (2008) Prefrontal cortex and hippocampus subserve different components of working memory in rats. Learn Mem 15:97-105.

Young JJ, Shapiro ML (2009) Double dissociation and hierarchical organization of strategy switches and reversals in the rat PFC. Behav Neurosci 123:1028-1035.

Young JW, Crawford N, Kelly JS, Kerr LE, Marston HM, Spratt C, Finlayson K, Sharkey J (2007) Impaired attention is central to the cognitive deficits observed in alpha 7 deficient mice. Eur Neuropsychopharmacol 17:145-155.

Z

Zeng H, Chattarji S, Barbarosie M, Rondi-Reig L, Philpot BD, Miyakawa T, Bear MF, Tonegawa S (2001) Forebrain-specific calcineurin knockout selectively impairs bidirectional synaptic plasticity and working/episodic-like memory. Cell 107:617-629.

Zoladz PR, Campbell AM, Park CR, Schaefer D, Danysz W, Diamond DM (2006) Enhancement of long-term spatial memory in adult rats by the noncompetitive NMDA receptor antagonists, memantine and neramexane. Pharmacol Biochem Behav 85:298-306.

Zoli M, Picciotto MR, Ferrari R, Cocchi D, Changeux JP (1999) Increased neurodegeneration during ageing in mice lacking high-affinity nicotine receptors. EMBO J 18:1235-1244.

Annexes

Annexe 1:

Psychopharmacology
DOI 10.1007/s00213-011-2168-9

ORIGINAL INVESTIGATION

S 18986 reverses spatial working memory impairments in aged mice: comparison with memantine

Matthias Vandesquille · Ali Krazem · Caroline Louis · Pierre Lestage · Daniel Béracochéa

Received: 3 September 2010 / Accepted: 4 January 2011
© Springer-Verlag 2011

Psychopharmacology (2011) 215:709–720
DOI 10.1007/s00213-011-2168-9

ORIGINAL INVESTIGATION

S 18986 reverses spatial working memory impairments in aged mice: comparison with memantine

Matthias Vandesquille · Ali Krazem · Caroline Louis · Pierre Lestage · Daniel Béracochéa

Received: 3 September 2010 / Accepted: 4 January 2011 / Published online: 28 January 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract
Rationale Normal or pathological ageing is characterized by working-memory dysfunction paired with a marked reduction in several neurotransmitters activity. The development of therapeutic strategy centered on the glutamatergic system known to bear a critical role in cognitive functions, is therefore of major importance in the treatment of mild forms of AD or age-related memory dysfunctions.
Objectives In Experiment 1, we investigated the effects of ageing on spatial working memory measured by sequential alternation (SA). Thus, the decay of alternation rates over a series of trials separated by varying intertrial temporal intervals (ITI, from 5 sec to 180 sec) was studied in mice of different age groups. In Experiment 2, we investigated the memory-enhancing potential of S 18986—a modulator of AMPA receptors—on age-related SA impairments, in comparison with memantine—an antagonist of NMDA receptors—.
Results In Experiment 1, aged mice responded at chance with shorter ITI's and exhibited greater levels of interference in the SA task as compared to young adult mice. In Experiment 2, (1) S 18986 at 0.03 and 0.1 mg/kg reversed the memory deficit in aged mice but did not modify performance in young adult mice; (2) memantine at 10 mg/kg also increased SA rates in aged mice but did not improve performance in young adult mice.
Conclusion The SA task is a useful tool to reveal age-induced time-dependent working memory impairments. As compared to memantine, S 18986—a compound targeting AMPA receptors—contributes a valuable therapy in the treatment of age-related cognitive dysfunctions or mild forms of AD.

Keywords Ageing · Alternation · Mice · Working memory · S 18986 · Memantine · AMPA receptor

M. Vandesquille · A. Krazem · D. Béracochéa (✉)
Institut de Neurosciences Intégratives et Cognitives d'Aquitaine (INCIA), Universités de Bordeaux,
IMR CNRS 5287,
Avenue des Facultés,
33405 Talence, France
e-mail: d.beracochea@cnic.u-bordeaux1.fr

M. Vandesquille · C. Louis · P. Lestage
Institut de Recherches SERVIER (IDRS),
125 chemin de ronde,
78290 Croissy-sur-Seine, France

Introduction

The increasing proportion of elderly in the population is accompanied by an increase in chronic age-related cerebral neurodegenerative diseases (Alzheimer's disease (AD), in particular) characterized by memory impairments and cognition dysfunctions. Age-related cognitive disorders are mainly due to the impairment of the neurons' ability to synthesize and release certain neurotransmitters. Memory deficiency in humans appears not only in old age but also emerges progressively earlier in life (Davis et al. 2003). Likewise, age-related memory deficits have also been described in middle-aged rodents (Ward et al. 1999; Francia et al. 2006) and seem to be initiated by changes in synaptic plasticity (Rex et al. 2005).

In an attempt to supply a new therapeutic approach to those memory disorders, we selected a positive allosteric modulator of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) glutamate receptor subtype. These compounds stabilize the AMPA receptor in its channel-open state following glutamate binding, and thus, prolong current flow through the channel enhancing

thereby synaptic response (Granger et al. 1993). This effect increases glutamate action and avoids the excitotoxic effects due to a direct and sustained activation of the NMDA receptor (Yamada 2000). Moreover, several positive modulators of AMPA-R have shown a distinctive capacity to increase LTP in hippocampus in vivo in rodents, and possess pro-cognitive properties in several behavioral tasks in rodents and primates (Lepagnol et al. 1997; Zivkovic et al. 1995; Thompson et al. 1995; Buccafusco et al. 2004; Beracochea et al. 2007). One of these compounds—S 18986—has been shown to enhance hippocampal and cortical release of noradrenaline and hippocampal release of acetylcholine (Lockhart et al. 2000; Rosi et al. 2004). It also displays cognition-enhancing properties in young (Lebrun et al. 2000) and aged rodents (Rosi et al. 2004; Marighetto et al. 2008). From these results, S 18986 emerged as a worthy candidate for the treatment of memory deficits associated with cerebral ageing, and particularly mild cognitive impairments. The present study further characterizes the memory-enhancing profile of S 18986 by investigating its effect in a mouse model of age-related working memory deficits.

To that aim, it was decided to investigate its effect in a sequential spontaneous alternation (SA) task used as a tool to test spatial working memory. SA is the innate tendency of rodents whereby over a series of runs in a T-maze, they alternate at each successive trial the choice of the goal arm. Repetitive testing constitutes a potent source of proactive interference as from trial to trial, accurate performance at a given trial (N) requires for subjects to remember the target N-1 trial from the previous interfering ones (trials trial N-2, N-3, etc.). Thus, in the sequential procedure, the target trial required for successful performance varies from trial to trial, so that the subject is not only required to keep temporarily in short-term memory the N-1 target information, but also to reset it over successive runs to avoid interference effects. The resetting mechanisms and cognitive flexibility required for successful performance over successive trials are major components of working memory processes in animals during SA (Olton 1979) as in humans (Bjork 1978). Since repetitive testing constitutes a potent source of proactive interference and that SA rates depends on the length of the intertrial delay interval and/or of the place of the trial in the series, working memory is an inherent component of the SA behavior (Grant, 1981; Beracochea and Jaffard 1985; 1995; Wenk, 2001; Chauveau et al. 2005; Segovia et al. 2008; Dillon and Qu 2008; Niimi et al. 2008). Moreover, several studies have shown the importance of frontal cortices and hippocampus in SA (Wan et al. 1994; Lalonde, 2002; Savage et al. 2003; Pych et al. 2005; Izaki et al. 2008), these brain structures being already known to sustain working memory in animals and humans (Yoon et al. 2008; Van Vugt et al. 2010).

Thus, using the SA task, the goals of the present study were threefold: (1) firstly, to study the effects of ageing on spatial working memory assessed by SA rates; (2) secondly, to evaluate the enhancing-memory effects of S 18986 on SA performance in young adult and aged animals, and (3) thirdly, to investigate in parallel the effects of memantine (an NMDA receptor antagonist) in young adult and aged animals on the same task, in order to compare the enhancing-memory impact of S 18986 with one of the main pharmacological compounds used in mild to severe forms of AD.

Materials and methods

Animals

The subjects were naive male mice of the C57Bl/6 inbred strain obtained from C. RIVERS (France).They were either 4–5, 18–19, or 23–24 months old at the time of experiment and weighed between 28 and 32 g. They were housed individually with continuous access to food and water, on a 12-h light–dark cycle in a temperature-controlled and ventilated room. All test procedures were conducted during the light phase of the cycle. Experiments were performed in accordance with the European Communities Council Guidelines of 24 November 1986 (8616091 EEC).

Apparatus

Apparatus all testing was conducted in a T-maze constructed of grey Plexiglas. Stem and arms were 35 cm long, 15 cm wide, and 10 cm high. The starting box (10 cm× 12 cm) was separated from the stem by a vertical sliding door. Horizontal sliding doors were placed at the entrance of each arm. Light inside the apparatus (30 lx) was provided by a lamp positioned 2 m above the stem. Both goal arms and the central alley of the maze were equipped with photoelectric cells allowing to detect the location of the subject and to record both its choice (left or right) and the choice latency (in seconds) that elapsed between the opening of the start-box and the closing of the goal-box. The opening and closing of the doors were automatically monitored by a computer, which also allowed the opening of the start-arm as a function of the intertrial temporal interval (ITI) imposed by the experimenter. The T-maze was located at the center of a room with various allocentric cues (white, black or striped cardboards) located on the wall 1 m above the apparatus. A 30 dB white noise was also provided in the behavioral testing room.

General procedure in this study, animals were not food deprived and no food reinforcement was used. Animals were first submitted to an habituation phase in which they were given two free exploration sessions of 10 min each on two successive days (one session per day) in the apparatus, in order to familiarize them with the apparatus and the allocentric spatial cues; in the habituation phase, all doors of the T-maze were open and the subjects were free to explore the apparatus. At the end of the habituation phase, all subjects were submitted to a training phase, during which they were submitted to a session constituted by seven successive trials separated by a 30-s ITI. The training phase was aimed at familiarizing the subjects with the opening and closing of the doors, and with the confinement into the start and goal-arms.

For the training phase as for the test session, at the beginning of a trial, the subject was placed in the start box, and after a confinement period (predefined ITI) the door to the stem was opened. When the mouse entered one of the arms, the door was closed, and the chosen arm and the latency were recorded. After a 30-s confinement period in the chosen arm, the mouse was removed and placed in the start-box for a second trial, identical to the first one. To avoid olfactory cues in the apparatus, visible traces of urine and feces were removed from the stem and arms between trials.

In the test session, animals were submitted to the same general procedure as in the training session, except that mice were submitted either to different fixed ITIs separating trials (Experiment 1) or were given the pre-test pharmacological treatments (Experiment 2), as described below.

Behavioral schedules

First experiment: effects of ageing on spontaneous alternation rates as a function of ITIs

The goal of the first experiment was to determine whether ageing induced a progressive delay-dependent decay of SA rates. Independent groups of mice being either 5, 18, or 23 months old were submitted to the general behavioral SA procedure described above (see habituation and training phase). Sessions consisted in a series of seven successive trials with a fixed ITI for each test-session. ITI increased between each test-session from the shorter to the longer one (i.e., 30, 90, and 180 s). For each group, the experiment ended when SA rates did not differ from chance level (50%). An additional 5-s ITI was studied only in 23-month-old mice, which already responded at chance at the 30-s ITI.

In the series involving an ITI higher than 30 s (i.e., 90 and 180 s), an eighth trial was added at the end of the series. This trial was separated from the seventh trial by a short (30-s) ITI. Shortening the ITI between the seventh and eighth trials allowed to determine if impairments rely on a failure of motivation and/or an inability to alternate at the end of the series. Indeed, if the increase in the delay interval is the only causal factor for the emergence of the deficit, then reducing the ITI at the eighth trial should improve performance as compared to the seventh one.

Second experiment: effects of S 18986 and memantine on alternation rates in 5- and 18-month-old mice

The aim of the second experiment was to evaluate the memory-enhancing effect of S 18986 and memantine on SA rates in 5- and 18-month-old mice. Eighteen-month-old mice were chosen for the pharmacological experiments in aged animals to minimize the increase in choice latency observed in aged animals in the SA task and more particularly in 23-month-old mice as compared 5-month old ones. Pharmacological treatments were administered as after-specified.

The test session was constituted by a series of seven trials which were separated by a fixed ITI being 180 s in 5-month-old mice and 90 s in 18-month-old mice, ITIs at which both groups performed at chance respectively, as evidenced in Experiment 1.

Pharmacological treatments and drug administration

Independent groups of 5- and 18-month-old mice have been ascribed to three main pharmacological conditions: Vehicle, S 18986 (three doses—0.03, 0.1, and 0.3 mg/kg; given the results, an additional 1.0 mg/kg dose was studied in 5-month-old animals), and memantine (according to the results, two doses were studied in 18-month-old mice—3 and 10 mg/kg whereas four doses were studied in 5-month-old mice—0.1, 0.3, 3.0, and 10.0 mg/kg).

S 18986 (Servier, France) and memantine (Syntheval, France) were dissolved in a saline solution and administered i.p. 30 min before behavioral testing in a room different from the behavioral room. Vehicle-treated mice received only the saline solution.

Statistical analyses

Results are expressed in percentage. The data were analyzed using one- or two-way factorial ANOVAs or ANOVA with repeated measures, followed when adequate by post hoc comparisons (Dunnett's test). A Student's *t* test was used for statistical comparisons between the seventh

and eighth trials in Experiment 1, and for comparisons with the chance level (50%).

After ANOVA, analyses per block of two consecutive trials (Block 1, trials 2+3; Block 2, trials 4+5; Block 3, trials 6+7) are made in order to study proactive interference effects within a given session.

Results

Experiment 1: effects of ageing on alternation rates as a function of ITIs

(A) Within-group analyses

Results are presented in Fig. 1.

Five-month-old mice submitted to 30-, 90-, and 180-s ITIs The increase of the delay separating trials induced a significant performance decrease in 5-month-old mice (n=10) (F(2,27) = 8.3; p<0.001). Interestingly, mice alternated significantly above chance level at the 30 s ITI (71.6±6.1%; t=23.0; p<0.001), 90 s ITI (68.3±3.8%; t=4.8; p<0.001) but not at the 180 s ITI (40.0±7.5%; t=−0.32; p=0.75). Moreover, the alternation rate at the longest ITI (180 s) was significantly different from the alternation rate observed at the 30 s ITI (p<0.001) and 90 s ITI (p=0.02). No significant difference was observed on choice latencies (respectively, for 30, 90, and 180 s: 13.7±0.6; 14.8±1; 19.8±2.3; F(4,57) = 1.01; NS).

Finally, 5-month-old mice exhibited the same performance at the eighth trial (30 s) of the 90 s series as compared to performance observed at the seventh trial (90±10% in both cases); in contrast, they exhibited a significant higher performance at the eighth trial of the 180 s ITI series as compared to performance observed at the seventh trial (90.0±10.0% versus 50.0±16.7% at the eighth and seventh trials, respectively; p=0.03). No significant difference was observed on choice latencies of the seventh and eighth trials of the 180-s ITI series (20.2±4.4 s versus 19.1±3.4 s, respectively, at the eighth and seventh trials; NS).

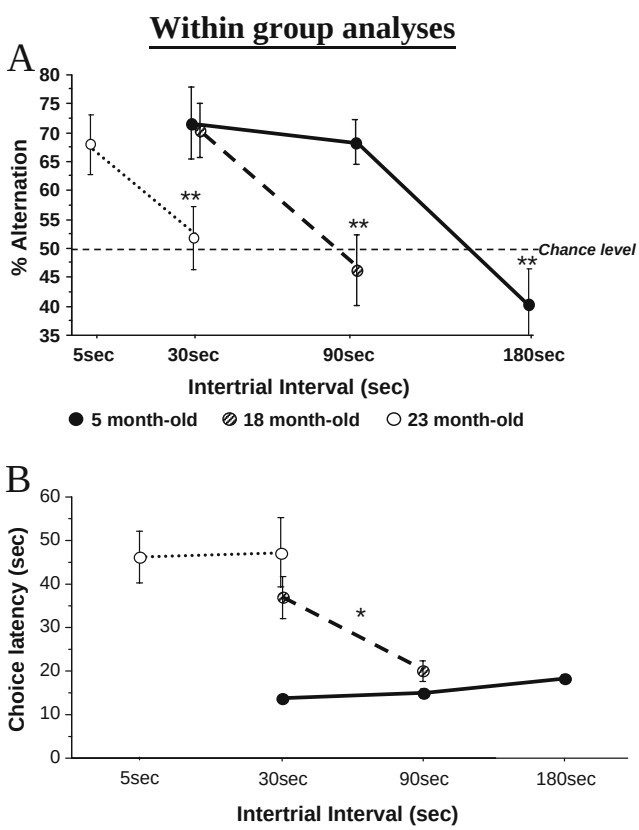


Fig. 1 **a** Within-group analyses: spontaneous alternation rates as a function of the length of the intertrial interval (ITI) in 5- (n=10), 18- (n=9) and 23-month-old mice (n=10). Performance of each group decrease with the increase of ITI, and **b** within-group latency: analyses show only difference for 18-month-old mice with a decrease in choice latency between 30- and 90-s ITIs; *p<0.05, **p<0.01

Eighteen-month-old mice submitted to 30- and 90-s ITIs the increase of the delay separating trials induced a significant performance decrease in 18-month-old mice (n=9) (F(1,16) = 9.9; p=0.006). Whereas mice alternated significantly above chance level at the 30-s ITI (70.3±4.6%; t=4.4; p=0.02), performance at the 90-s ITI failed to significantly differ from chance (46.3±6.0%; NS). Moreover, the alternation rate at the longest delay interval (90 s) was significantly different from the one observed at the 30 s ITI (p<0.01). Analyses on choice latencies showed differences among the ITIs. In fact, 18-month-old mice are slower entering an arm at 30 s (36.4±4.6 s) than at 90 s (16.8±1.9 s; F(1,16) = 9.8; p=0.006). Interestingly, mice are longer at the ITI at which they performed above chance (30 s).

Finally, 18-month-old mice exhibited significantly optimized performance at the eighth trial of the 90 s series as compared to those observed at the seventh trial (90±10.0% versus 30.0±15.0%, respectively; p=0.005). No significant difference was observed on choice latencies (20.2±4.4 s versus 19.1±3.4 s, respectively, at the eighth and seventh trials; NS).

Twenty-three-month-old mice submitted to 5- and 30-s ITIs the increase of the delay separating trials induced a significant performance decrease in 23-month-old mice (n=10) (F(1,18) = 4.8; p=0.04). Whereas mice alternated significantly above chance level at the 5-s ITI (66.6±4.9%; t=3.3; p<0.008), performance at the 30 s ITI failed to significantly differ from chance (51.5±4.6%; NS). No significant difference was observed on choice latencies of

the 5- and 30-s ITI's sessions (39.3±5.1 s versus 40.3±6.7 s, respectively; NS).

(B) Between-group analyses

Results are presented in Fig. 2.

Thirty-second ITI (cf Fig. 2a and b) The ANOVA performed on alternation rates at the 30-s ITI evidenced a significant between-group difference ($F(2,26)=4.7$; $p=0.018$). Interestingly, the alternation rate of 23-month-old mice ($n=10$; 51.6±4.6%) was significantly impaired as compared to both 5- ($n=10$; 71.6±6.1%; $p<0.01$) and 18-month-old ones ($n=9$; 70.3±4.6%; $p=0.018$; cf Fig. 2a). However, the deficit is observed on pooled number of trials, since the analyses per block of trials (Block 1, trials 2+3; Block 2, trials 4+5; Block 3, trials 6+7) did not evidence any significant between group differences (NS), even though 23-month-old subjects exhibited non-significant lower performance than 5- and 18-month-old mice on the first block of trials (respectively, 55±11.6%, 80±8.1%, 83.3±8.3% ; $F(2,26)=2.617$; $p=0.09$; cf Fig. 2b).

Choice latency was also significantly different among the three groups ($F(2,26)=10.2$; $p=0.005$). More specifically, choice latency dramatically increased in 23-month-old mice (40.3±6.7 s) as compared to both 5- (13.6±0.7 s; $p<0.001$) and 18-month-old ones (36.4±4.6 s; NS, however). Interestingly, significant difference was also observed between 5- and 18-month-old mice ($p=0.006$) even though SA rates were similar.

Ninety-second ITI (cf Fig. 2c) Analyses performed on the 90-s ITI evidenced a significant between-group difference ($F(2,24)=4.6$; $p=0.02$). Five-month-old animals exhibited a higher SA rate (68.3±3.8%) than 18-month-old animals (46.3±6.0%; $p=0.006$). Thus, as compared to 5-month-old mice, 18-month-old animals exhibited an accelerated time-dependent decay of SA rates.

An analysis per block of two consecutive trials showed that 18-month-old animals exhibited a greater deficit at the 90-s ITI on the last two blocks of trials as compared to 5-month-old animals (33.3±11.7% and 44.4±13.0% versus 70.0±8.1% and 70.0±11.0% respectively, in aged versus young mice for the second and third blocks; $p<0.05$ in all comparisons; see Fig. 2d); no difference was observed on the first block (65.0±10.6% versus 61.1±13.8% for, respectively, the young and aged groups; NS).

Interestingly, no significant difference was observed on choice latencies between young (14.7±1 s) and aged mice (16.8±1.9 s; $F(1,17)=3.9$; NS).

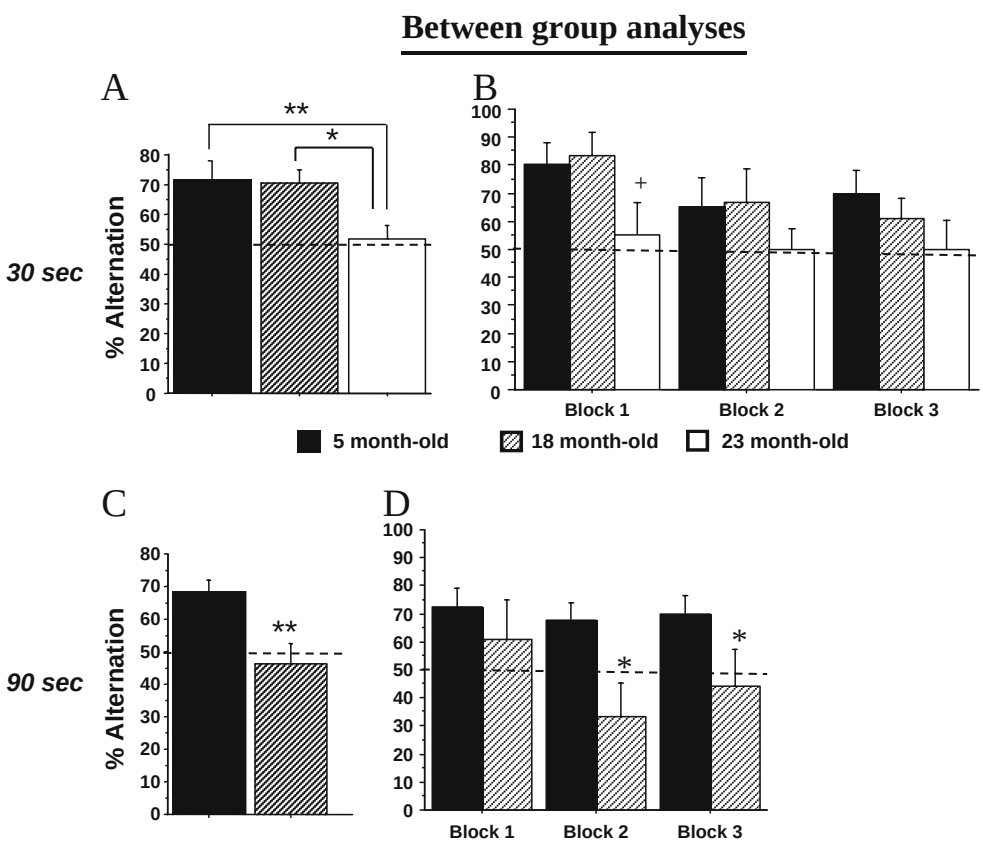


Fig. 2 Between-group analyses between 5- ($n=10$), 18- ($n=9$), and 23-month-old mice ($n=10$) for 30 s ITI (**a** and **b**) and for 90 s ITI (**c** and **d**). **a** Comparison on the 30-s ITI showed that 23-month-old mice performed significantly lower than 5- and 18-month-old mice. **b** Analyses per blocks on the 30-s ITI between 5-, 18-, and 23-month-old mice. No significant between-groups difference was observed even if a decrease tendency was observed on the first block for the 23-month-old mice. **c** Comparison at the 90-s ITI showed that 5-month-old mice exhibited a higher SA rate than 18-month-old mice. **d** Analyses per blocks at the 90-s ITI between 5- and 18-month-old mice. Eighteen-month-old mice showed a decrease of alternation rates for the two last blocks as compared to 4–5-month-old mice; $^{+}p<0.1$, $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$

Experiment 2: effects of S 18986 and memantine on SA rates in 5- and 18-month-old mice

(A) Effects of S 18986 on SA rates in 5-month-old mice

Results are presented in Fig. 3a and b.

An ANOVA showed that S 18986 does not significantly improve SA rates as compared to vehicles ($F(4,46)=1.89$; NS; cf Fig. 3a). More specifically, whereas vehicle-treated mice responded at chance ($n=14$; 52.3±6.5%; NS); S 18986 failed to significantly improve performance (0.03 mg/kg: $n=9$; 68.5±5.8%; 0.1 mg/kg: $n=10$; 68.3±5.8%; 0.3 mg/kg: $n=9$; 62.9±6.6%; 1.0 mg/kg: $n=9$; 51.8±3.3%; NS in all comparisons with vehicles). Further, no significant between group difference was observed on the different blocks of trials (NS in all comparisons) and the interaction between blocks of trials and groups was also not significant (cf Fig. 3b).

The mean choice latency was not significantly different among the groups ($F(4,46)=1.7$; NS). Thus, S 18986 at 0.03 (11.3±1.3 s), 0.1 (19.4±4.0 s) 0.3 (17.2±2.0 s), and 1.0 mg/kg (14.0±1.2 s) did not significantly differ from vehicle-treated mice (13.1±1.8 s; NS in all comparisons).

(B) Effects of memantine on SA rates in 5-month-old mice

Results are presented in Fig. 3c and d.

An ANOVA analysis showed a non significant between-group difference ($F(4,44)<1.0$; cf Fig. 3c). More specifically, whereas vehicle-treated mice responded at chance ($n=9$; 51.8±7.0%), memantine failed to significantly improve performance (0.3 mg/kg: $n=9$; 64.8±5.1%; 1.0 mg/kg: $n=9$; 62.9±7.2%; 3.0 mg/kg: $n=9$; 59.2±4.0%; 10 mg/kg: $n=13$; 58.9±5.8% as compared to vehicles; NS in all comparisons). Moreover, no between-group difference was observed on the different blocks of trials (NS in all comparisons; cf Fig. 3d).

A non-significant between-group difference was also observed on choice latency ($F(4,44)<1.0$). Thus, memantine at 0.3 (16.2±3.6 s), 1.0 (20.3±5.3 s), 3.0 (15.5±2.1 s), and at 10 mg/kg (16.1±1.3 s) did not significantly differ from vehicle-treated mice (13.0±0.9 s; NS in all comparisons).

(C) Effects of S 18986 on SA rates in 18-month-old mice

Results are presented in Fig. 4a and b.

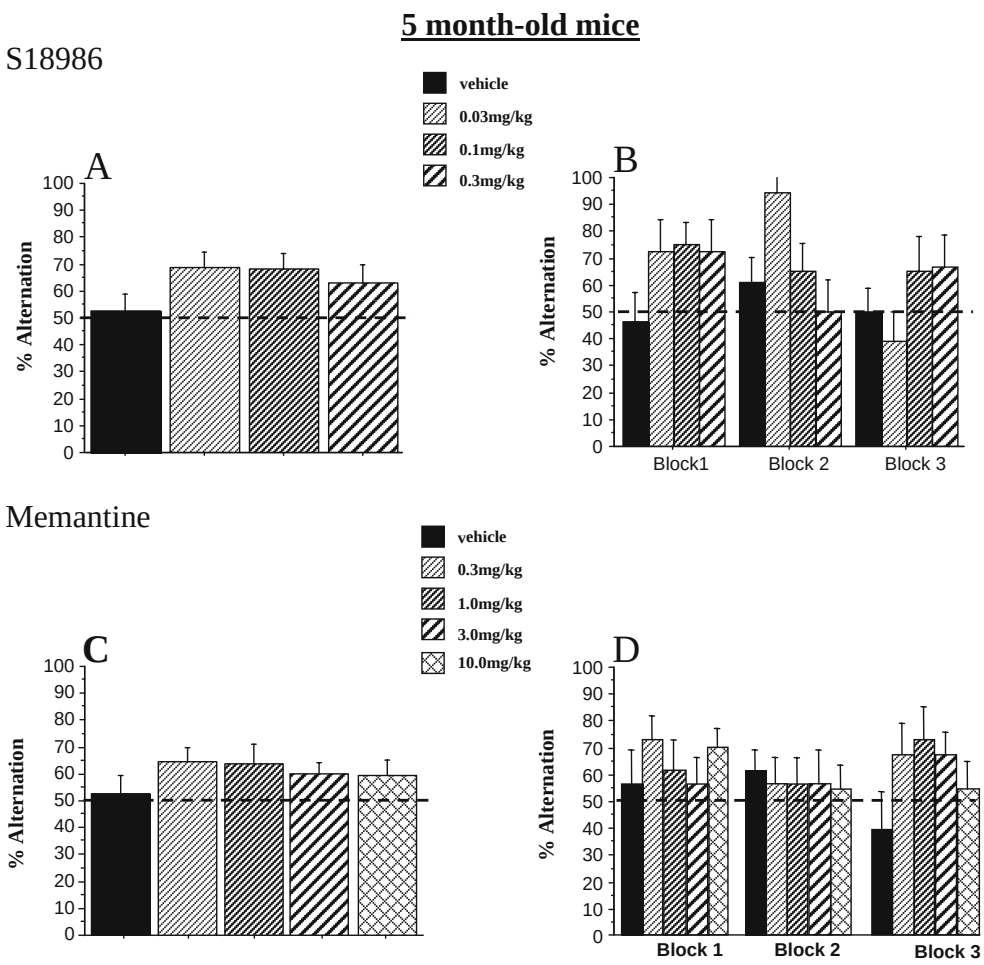


Fig. 3 **a** Effects of S 18986 on SA rates (ITI=180s) in 5-month-old mice as a function of the dose used (vehicle: $n=14$; 0.03 mg/kg: $n=9$; 0.1 mg/kg: $n=10$; 0.3 mg/kg: $n=9$). As can be seen, S 18986 did not improve SA rates, as compared to vehicle-treated mice at the three studied doses. **b** Effects of S 18986 on SA rates on the 3 blocks of trials. As can be seen, no significant improvement of performance was observed as compared to vehicle-treated mice. **c** Effects of memantine on SA rates (ITI=180 s) in 5-month-old mice as a function of the administered dose (vehicle: $n=9$; 0.3 mg/kg: $n=9$; 1 mg/kg: $n=9$; 3 mg/kg: $n=9$; 10 mg/kg: $n=13$). As can be seen, memantine did not improve SA rates, as compared to vehicle-treated mice. **d** Effects of memantine on SA rates on the three blocks of trials. As can be seen, no significant improvement of performance was observed as compared to vehicle-treated mice

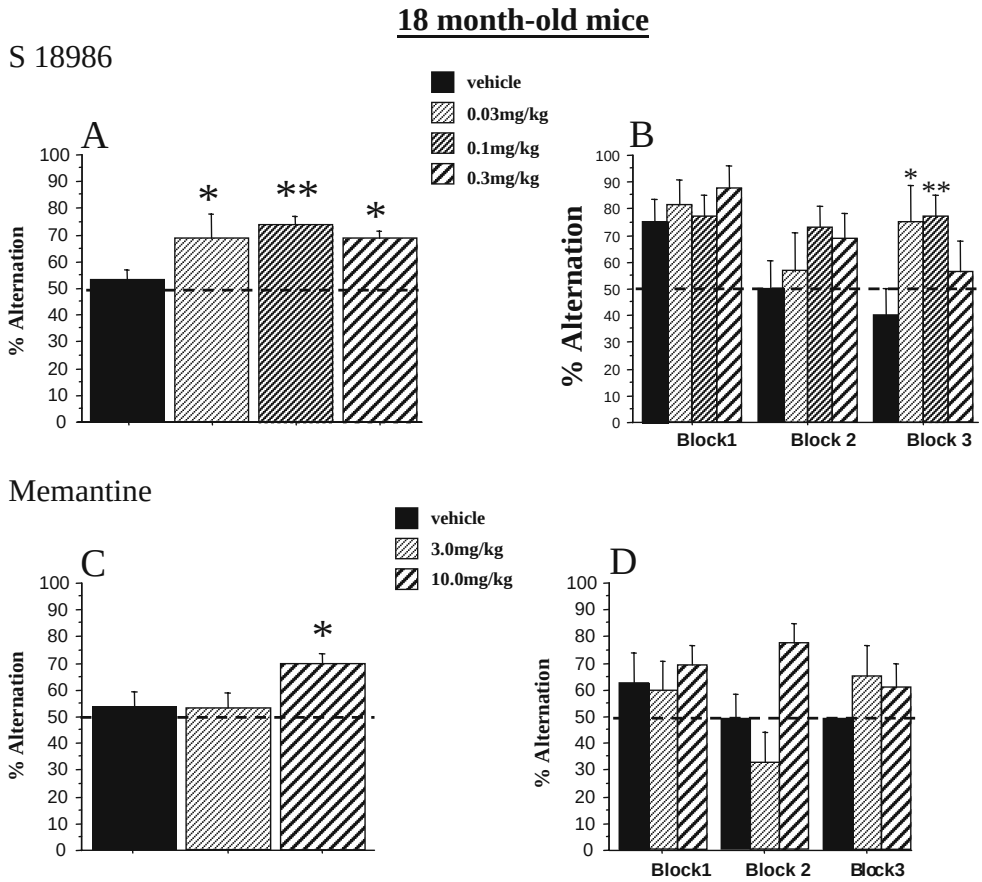


Fig. 4 **a** Effects of S 18986 on SA rates (ITI=90 s) in 18-month-old mice as a function of the administered dose (vehicle: n=10; 0.03 mg/kg: n=8; 0.1 mg/kg: n=11; 0.3 mg/kg: n=8). As can be seen, S 18986 improved significantly SA rates, as compared to vehicle-treated mice at the thre studied doses. **b** Effects of S 18986 on SA rates on the three blocks of trials. As can be seen, significant improvement of performance was observed as compared to vehicle-treated mice mainly at the two lower doses on the third block of trials. **c** Effects of memantine on SA rates (ITI=90 s) in 18-month-old mice as a function of the dose used (vehicle: n=11; 3 mg/kg: n=9; 10 mg/kg: n=12). As can be seen, memantine improved SA rates at the 10 mg/kg dose but not the 3 mg/kg one, as compared to vehicle-treated mice. **d** Effects of memantine on SA rates on the 3 blocks of trials. As can be seen, no significant improvement of performance was observed as compared to vehicle-treated mice; *p<0.05, **p<0.01

An ANOVA showed that S 18986 significantly improved SA rates as compared to vehicles (F(3,33)=3.5; p=0.02; cf Fig. 4a). More specifically, whereas vehicle-treated mice responded at chance (n=10; 55.0±3.5%), S 18986 significantly improved performance (0.03 mg/kg: n=8; 70.8±9.3%; 0.1 mg/kg: n=11; 75.8±3.4%; 0.3 mg/kg: n=8; 70.8±2.7%; p=0.03, p=0.003, and p=0.03 as compared to vehicles, respectively).

An analysis per block of two consecutive trials showed that the main between groups difference was observed on the two last trials of the series, that is to say when interference is greater (cf Fig. 4b). More specifically, whereas vehicles alternated at chance (40.0±10%), S 18986 dramatically improved performance at the two lower doses (0.03 mg/kg: 75.0±13.3%; 0.1 mg/kg: 77.2±7.8%; p=0.02 and p<0.01 as compared to vehicles, respectively) whereas the higher dose had no effect (0.3 mg/kg: 56.2±11.3%; NS as compared to vehicles).

The mean choice latency was not significantly different among the groups (F(3,33)<1.0). Thus, S 18986 at 0.03 mg/kg (25.2±4.9 s), S 18986 at 0.1 mg/kg (29.1±6.2 s), and S 18986 at 0.3 mg/kg (38.7±5.3 s) did not significantly differ from vehicle-treated mice (29.7±8.1 s; NS in all comparisons).

(D) Effects of memantine on SA rates in 18-month-old mice

Results are presented in Fig. 4c and d.

An ANOVA analysis showed a significant between-group difference (F(2,29)=3.8; p=0.03; cf Fig. 4c). More specifically, whereas vehicle-treated mice responded at chance (n=11; 54.5±5.0%), memantine failed to significantly improve performance as compared to vehicles at the lower dose (3 mg/kg: n=9; 53.7±6.0%; NS) but significantly improved SA rates at the higher dose (10 mg/kg: n=12; 70.8±3.6%; p=0.02 as compared to vehicles). No between-group difference was observed on the different blocks of trials (NS in all comparisons; cf Fig. 4d).

A non-significant between-group difference was observed on choice latency (F(2,29)=1.2; NS). Thus, memantine at 3 (16.0±2.4 s) and at 10 mg/kg (16.7±1.4 s) did not significantly differ from vehicle-treated mice (19.9±1.7 s; NS in all comparisons).

Discussion

The main results of the study are as follows: (1) aging induced an exaggerated vulnerability to time-dependent

interference in the SA task; (2) S 18986 totally reversed the SA deficit in 18 month-old mice at the 0.03, 0.1, and 0.3 mg/kg doses, the main memory-enhancing effect being however observed on the last two trials of the series only at both lower S 18986 doses; in contrast, S 18986 did not improve performance in 5-month-old mice; (3) memantine also increased SA rates in 18-month-old mice, but only at the higher dose (10 mg/kg versus 3.0 mg/kg); in contrast, memantine had no memory-enhancing effect in 5-month-old animals.

Sequential alternation task and ageing

It has been already shown that aging induced an increase in the vulnerability to interference in rodents (Winocur 1986; Matzel et al. 2008), monkeys (Moss et al. 1988), and humans (Emery et al. 2008; Hogge et al. 2008). Our study extends these findings to mice and spatial working memory. Indeed, as shown in Experiment 1, deficits in alternation rates depended both on the delay interval and of the age of the subjects. Thus, a 30-s ITI induces an alternation deficit in 23-month-old mice, whereas a 90-s ITI is required to induce the same impairment in 18-month-old animals; in contrast, 4–5-month-old mice exhibited an alternation deficit only at a 180-s ITI.

One can suggest that non-mnemonic factors could contribute to the findings: (1) animals would rather use non-spatial cues to alternate (i.e., olfactory ones) or would use non-spatial strategy (egocentric strategy). In our experiments, in young and aged mice however, the maze was cleaned between each trial; moreover, it has been demonstrated that olfactory cues are not preferentially used to alternate (Montgomery 1952; Jaffard et al. 1981) and that retention delays as short as 10 s can eliminate the use of egocentric forms of memory in rats (Futter and Aggleton, 2006). In addition, there is substantial evidence indicating that alternation scores are lowered by the removal of directional cues (Richman et al. 1987); (2) the decrease of SA rates at the 90-s ITI in aged mice could be due to a fall of the motivation to alternate rather than to delay, since in the behavioral testing procedure used, each mouse was submitted to repetitive testing (Experiment 1); however, the same deficit is also observed in 18-month-old animals used in Experiment 2, and which were not submitted to the behavioral schedule of Experiment 1; moreover, shortening the delay interval between the seventh (90 s) and eighth trials (30 s) resulted in a significant increase of SA rates, which clearly shows that delay, and not motivation to alternate, accounts for the fall of alternation rates. This conclusion is congruent with numerous studies showing that increasing the temporal interval among location choices lowered performance (Livesay et al. 1981; Beracochea and Jaffard, 1995; Ragozzino et al. 1998); 3) the increase in choice latencies in aged subjects would be responsible for the memory deficit. This is not the case since within-group analyses showed that 18-month-old mice exhibit higher choice latencies at the 30-s session as compared to the 90 s one; in addition, we found that delay is not predictive of performance since on the one hand, there is a significant difference in choice latencies between 5- and 18-month-old mice without differences between groups in SA performance at the 30-s ITI; on the other hand, there is no difference between both age groups in choice latencies but significant difference on memory performance at the 90 s ITI.

Thus, the overall analyses strengthened the fact that the alternation deficit in 18-month-old animals is due to an increased vulnerability to delay-dependent interference, as the deficit was mainly observed on the last two blocks of trials but not on the first one of the 90-s ITI session. The to-be-forgotten trials (N-2, N-3, etc.) interfere with the recollection of the target (to be remembered N-1) trial, leading to decreased alternation rates. According to the data, aged animals exhibit an heightened vulnerability to proactive interference as compared to young ones; such a finding is congruent with data drawn in studies of human working memory (i.e., n-back task, face recognition, or delayed matching to sample task) showing that older adults exhibit decreased recollection of to-be-remembered items, associated with increased automatic retrieval of the to-be-forgotten ones (Gazzaley et al. 2005; Hogge et al. 2008). As working memory is mainly sustained by the prefrontal cortex and the hippocampus activity, the impairment observed during ageing could be due to a dysfunction of either these brain structures or of their related connectivity (West 1996; Yoon et al. 2008; Leshikar et al. 2010).

Overall, the sequential alternation procedure appears to be a useful tool to assess time-dependent spatial working memory impairments in aged mice.

Effects of S 18986 and memantine on SA rates

Both memantine and S 18986 did not enhance nor disrupt performance in 5-month-old mice. Interestingly, there is substantial evidence that S 18986 (10 mg/kg, i.p.) increased by 70% the release of acetylcholine in the hippocampus of young 3-month-old rats (Rosi et al. 2004), and that memantine reduced the release of glutamate from rat cerebral cortex nerve terminals in adult rats (Lu et al. 2010). To our knowledge however, there is little evidence to date regarding cognitive improvement induced by the two compounds in normal adult animals which do not have a treatment-induced deficit. Thus, as regards S 18986, a study showed a memory-enhancing effect in young adult rats in an object recognition task (Lebrun et al. 2000) but another study showed that chronic administration of S 18986 failed to induce a significant learning improvement

in an operant-delayed alternation task in young adult rats (Kelly et al. 2009). Conflicting findings have also been reported regarding memantine. A long-term memory improvement was observed in adult rats treated with memantine at doses of 5 and 7.5 mg/kg, but not at doses of 2.5 and 3.75 mg/kg (Zoladz et al. 2006). In contrast, other studies showed that memantine at a dose of 5 mg/kg failed to improve memory in normal adult rats whereas higher doses (10 and 20 mg/kg) induced behavioral alterations (Reus et al. 2008). Dose-dependent behavioral alterations induced by memantine have also been mentioned in other studies in adult rats mainly at high doses (10–30 mg/kg; Kos and Popik, 2005; Zoladz et al. 2006). In the present study, we did not observe behavioral alterations at the dose of 10 mg/kg, as shown by similar choice latency between treated and vehicle mice. We have no particular explanation for the discrepancy between studies, except that of specie differences (rats versus mice) and of the behavioral tasks used (see Mondadori et al. 1989).

As opposed to 5-month-old mice, S 18986 produced a powerful memory-enhancing effect in aged mice, which was of greater magnitude as compared to memantine, one of the main therapeutic treatment used in mild to moderate Alzheimer's disease. Indeed, the memory enhancing effects of S 18986 are observed at very low doses (mainly at 0.03 and 0.1 mg/kg) whereas a higher dose is required to observe a significant effect with memantine (10 mg/kg).

The memory-enhancing effects of S 18986 were due to a reduction of interference, indicating that this compound improved the animal's ability to reset non-relevant information over the series of trials. The positive effect of S 18986 was obtained at the 3 doses tested, but mainly at the two lower ones (0.03 and 0.1 mg/kg) as drawn from the analysis of performance on the last block of trials of the SA series. Our findings are congruent with other studies demonstrating a memory-enhancing effect of S 18986 on age-related memory impairments at low doses. Thus, a memory enhancing effect was also observed at a low dose (0.1 mg/kg) in aged mice on working memory performance in radial maze paradigms (Marighetto et al. 2008). Interestingly, we previously observed an improvement of contextual memory in middle-aged (14 month old) mice submitted to a chronic per esophagi S 18986 administration at a 1.0 mg/kg dose (Beracochea et al. 2007).

Memantine also improves memory in aged mice but at higher dose than S 18986. Thus, memantine at 3.0 mg/kg failed to improve spatial working memory in 18-month-old mice in the present study. Interestingly, we previously observed a memory enhancing effect at the 3.0 mg/kg dose on contextual memory in middle-aged mice being submitted to a chronic (9 days) per esophagi administration (Beracochea et al. 2007). Accordingly, Zajaczowski et al (1997) and Van Dam et al (2005) also reported positive effects of memantine in different memory paradigms in rodents in the range of 3–5 mg/kg. In the present study, only a 10-mg/kg dose of memantine was found to enhance memory in 18 month-old animals without significant modifications of choice latency. Even though this finding agrees with studies indicating that memantine was found to be active in high range doses (Barnes et al. 1996; Minkeviciene et al. 2004), it has been also shown that the 10 mg/kg dose can also induce severe disturbances. Thus, behavioral disturbances (hyperactivity notably) in rats as well as learning impairments have been reported using a 10 mg/kg dose of memantine (Zajaczowski et al. 1997; Creeley et al. 2006; Zoladz et al. 2006). Again, difference in species, tasks used and in the mode of administration can account for the discrepancies between studies.

The memory-enhancing effects of S 18986 and memantine observed in our study could be due to an improvement of hippocampal functioning since the hippocampus is involved in working memory processes in a wide variety of tasks (Wan et al. 1994; Braun et al. 2010; Van Vugt et al. 2010; Hyman et al. 2010). Recent findings showed that hippocampal dysfunction is responsible for the working memory deficit observed in a verbal task of subjects with amnestic mild cognitive impairment (Bokde et al. 2010). Moreover, we already showed hippocampal alterations in middle-aged mice which were associated with memory impairments (Tronche et al. 2010). Interestingly, S 18986, as a positive allosteric modulator of AMPA-type glutamate receptors, increases extracellular excitatory field potentials in the CA1 region of rat hippocampal slices and enhances LTP in the dentate gyrus of anesthetized rat after stimulation of the perforant path (Lepagnol et al. 1997). S 18986 also enhances the hippocampal and cortical noradrenergic transmission (Lockhart et al. 2000), and both S 18986 and memantine improved the hippocampal cholinergic activity, even through different mechanisms (Lockhart et al. 2000; Rosi et al. 2004; Drever et al. 2007). The effects of S 18986 on hippocampal plasticity and synaptic transmission could support its memory enhancing properties in the alternation task which has been found to be sustained at least in part by hippocampal cholinergic activity (Degroot and Parent 2000; Bernard et al. 2010).

Over the past decade, positive modulators of AMPA receptors have displayed valuable preclinical and clinical data related to ageing. In vitro, it has been shown that positive AMPA modulators (Aniracetam, IDRA-21 and S 18986) lower the induction threshold, enhance the amplitude and increase the duration of LTP (Arai et al. 1994; 2004; Lepagnol et al. 1997) and that this activation of AMPA receptors allows an up-regulation of NMDA receptors implicated in the plasticity mechanisms necessary to cognitive and memory functions (Robbins and Murphy 2006). Furthermore, this indirect regulation of NMDA receptors avoid their over-activation and reduced so far

the excitotoxic effects, a phenomenon implied in the neuronal degeneration observed during ageing and age-related disorders (Francis et al. 1993). In vivo, IDRA-21 produced a sizeable improvement of DMTS performance in young and aged rhesus monkeys (Buccafusco et al. 2004). Recent findings have evidenced that chronic administration of S 18986 in aged rats increases spatial memory and the neurotrophic factor BDNF (Bloss et al. 2008). In humans, preliminary clinical research evidenced contradictory results. One of the earliest tested compound, CX-516 (Cortex Pharmaceuticals), was shown to modestly improve cognitive performance in young and elderly subjects (Lynch et al. 1997), but its very short half-life in humans did not allow for a medical usage. Nonetheless, research on such positive modulators of AMPA receptors further probe which mechanism could account for this preclinical/clinical paradox.

In our study, the positive modulator of AMPA receptor S 18986 induces a memory-enhancing effect of greater magnitude than memantine in 18-month-old mice, as regards the different dose range used to induce a memory-enhancing effect in aged animals. Overall, the positive modulation of AMPA receptor activity remains a promising strategy for the treatment of memory deficits associated with cerebral aging or mild form of AD.

Acknowledgments We wish to thank all the technical personal of our laboratory for their help and advice as well as IDRS for statistical analyses. This work was funded by grants from the "Association Nationale de la Recherche et de la Technologie, ANRT". The authors would like to thank Dr. Frances Ash for language translation (contact: ashberac@free.fr).

References

Arai A, Kessler M, Xiao P, Ambros-Ingerson J, Rogers G, Lynch G (1994) A centrally active drug that modulates AMPA receptor gated currents. Brain Res 638(1–2):343–346

Arai AC, Xia YF, Suzuki E (2004) Modulation of AMPA receptor kinetics differentially influences synaptic plasticity in the hippocampus. Neuroscience 123(4):1011–1024

Barnes CA, Danysz W, Parsons CG (1996) Effects of the uncompetitive NMDA receptor antagonist memantine on hippocampal long-term potentiation, short-term exploratory modulation and spatial memory in awake, freely moving rats. Eur J Neurosci 8:565–571

Beracochea D, Jaffard R (1985) Memory deficits subsequent to chronic alcohol consumption in mice: an analysis based on spontaneous alternation behavior. Behav Brain Res 15:15–25

Beracochea D, Jaffard R (1995) The effects of mammillary body lesions on delayed matching and delayed non matching to place tasks in the mice. Behav Brain Res 68:45–52

Beracochea D, Philippin JN, Meunier S, Morain P, Bernard K (2007) Improvement of episodic contextual memory by S 18986 in middle-aged mice: comparison with donepezil. Psychopharmacology 93 (1):63–73

Bernard K, Danober L, Thomas JY, Lebrun C, Muñoz C, Cordi A, Desos P, Lestage P, Morain P (2010) DRUG FOCUS: S 18986: A positive allosteric modulator of AMPA-type glutamate receptors pharmacological profile of a novel cognitive enhancer. CNS Neurosci Ther 16(5):193–212

Bjork RA (1978) The updating of human memory. Psychol Learn Motiv 12:235–259

Bloss EB, Hunter RG, Waters EM, Munoz C, Bernard K, McEwen BS (2008) Behavioral and biological effects of chronic S 18986, a positive AMPA receptor modulator, during aging. Exp Neurol 210:109–117

Bokde AL, Karmann M, Born C, Teipel SJ, Omerovic M, Ewers M, Frodl T, Meisenzahl E, Reiser M, Möller HJ, Hampel H (2010) Altered brain activation during a verbal working memory task in subjects with amnestic mild cognitive impairment. J Alzheimers Dis 21(1):103–118

Braun M, Weinrich C, Finke C, Ostendorf F, Lehmann TN, Ploner CJ (2010) Lesions affecting the right hippocampal formation differentially impair short-term memory of spatial and non spatial associations. Hippocampus. doi:10.1002/hipo.20752

Buccafusco JJ, Weiser T, Winter K, Klinder K, Terry AV (2004) The effects of IDRA 21, a positive modulator of the AMPA receptor, on delayed matching performance by young and aged rhesus monkeys. Neuropharmacology 46(1):10–22

Chauveau F, Celerier A, Ognard R, Pierard C, Beracochea D (2005) Effects of ibotenic acid lesions of the mediodorsal thalamus on memory: relationship with emotional processes in mice. Behav Brain Res 156:215–223

Creeley C, Wozniak DF, Labruyere J, Taylor GT, Olney JW (2006) Low doses of memantine disrupt memory in adult rats. J Neurosci 12;26(15):3923–3932

Davis HP, Small SA, Stern Y, Mayeux R, Feldstein SN, Keller FR (2003) Acquisition, recall, and forgetting of verbal information in long-term memory by young, middle-aged, and elderly individuals. Cortex 39:1063–1091

Degroot A, Parent MB (2000) Increasing acetylcholine levels in the hippocampus or entorhinal cortex reverses the impairing effects of septal GABA receptor activation on spontaneous alternation. Learn Mem 7:293–302

Dillon GM, Qu X, Marcu Jn, Dodart JC (2008) Excitotoxic lesions restricted to the dorsal CA1 field of the hippocampus impair spatial memory and extinction learning in C57BL/6 mice. Neurobiol Learn Mem 90(2):426–33

Drever BD, Anderson WG, Johnson H, O'Callaghan M, Choi DY, Riedel G, Platt B (2007) Memantine acts as a cholinergic stimulant in the mouse. J Alzheimers Dis 12:319–333

Emery L, Hale S, Myerson J (2008) Age difference in proactive interference, working memory, and abstract reasoning. Psychol Aging 23:634–645

Francia N, Cirulli F, Chiarotti F, Antonelli A, Aloe L, Alleva E (2006) Spatial memory deficits in middle-aged mice correlate with lower exploratory activity and a subordinate status: role of hippocampal neurotrophins. Eur J Neurosci 23(3):711–728

Futter JE, Aggleton JP (2006) How rats perform spatial working memory tasks: limitations in the use of egocentric and idiothetic working memory. Q J Exp Psychol Colchester 59(1):77–99

Gazzaley A, Cooney JW, Rissman J, D'Esposito M (2005) Top-down suppression deficit underlies working memory impairment in normal aging. Nat Neurosci 8:1298–300

Granger R, Staubli U, Davis M, Perez Y, Nilsson L, Rogers GA, Lynch GA (1993) Drug that facilites glutamatergic transmission reduces exploratory activity and improves performance in a learning-dependant task. Synapse 15:326–9

Grant DS (1981) Intertrial interference in rat short-term memory. J Exp Psychol 7:217–227

Hogge M, Adams S, Collette F (2008) Directed forgetting and aging: the role of retrieval processes, processing speed, and proactive interference. Neuropsychol Dev Cogn B Aging Neuropsychol Cogn 15:471–91

Hyman JM, Zilli EA, Paley AM, Hasselmo ME (2010) Working memory performance correlates with prefrontal-hippocampal

theta interactions but not with prefrontal neuron firing rates. Front Integr Neurosci 4:2

Izaki Y, Takita M, Akema T (2008) Specific role of the posterior dorsal hippocampus-prefrontal cortex in short-term working memory. Eur J Neurosci 27:3029–3034

Jaffard R, Dubois M, Galey D (1981) Memory of a choice direction in a T-maze as measured by spontaneous alternation in mice: effects of intertrial interval and reward. Behav Processes 6:11–21

Kelly SJ, Bernard K, Munoz C, Lawrence RC, Thacker J, Grillo CA, Piroli GG, Reagan LP (2009) Effects of the AMPA receptor modulator S 18986 on measures of cognition and oxidative stress in aged rats. Psychopharmacolgy 202:225–235

Kos T, Popik P (2005) A comparison of the predictictive therapeutic and undesired side-effects of the NMDA receptor antagonist, memantine, in mice. Behav Pharmacol 16:155–161

Lalonde R (2002) The neurobiological basis of spontaneous alternation. Neurosci Biobehav Rev 26(1):91–104

Lebrun C, Pilliere E, Lestage P (2000) Effects of S 18986-1, a novel cognitive enhancer, on memory performances in an object recognition task in rats. Eur J Pharmacol 401:205–212

Lepagnol J, Lebrun C, Pilliere E, Thomas JY, Desos P, Cordi A, Lestage P (1997) Neuroexcitatory and cognition enhancing effect of S 18986, a positive allosteric modulator of glutamate AMPA receptor. 27th Annual Meeting of the Neuroscience Society, New Orleans, October 1997. Am Soc Neurosci 23(2):1841

Leshikar ED, Gutchess AH, Hebrank AC, Sutton BP, Park DC (2010) The impact of increased relational encoding demands on frontal and hippocampal function in older adults. Cortex 46:507–21

Livesay PJ, Livesay DJ, Syme GJ (1981) Spontaneous alternation in the white rat: a learning and memory phenomenon. Behav Neural Biol 32:158–169

Lockhart B, Iop F, Closier M, Lestage P (2000) (S)-2, 3-dihydro-(3, 4) cyclopentano-1, 2, 4-benzothiadiazine-1, 1-dioxide: (S 18986–1) a positive modulator of AMPA receptors enhances (S)-AMPA-mediated (3 H) noradrenaline release from rat hippocampal and frontal cortex slices. Eur J Pharmacol 401:145–153

Lu CW, Lin TY, Wang SJ (2010) Memantine depresses glutamate release through inhibition of volytage-dependent Ca(2+) entry and protein kinase C in rat cerebral cortex nerve terminals: an NMDA receptor-independent mechanism. Neurochem Int 57 (2):168–176

Marighetto A, Valerio S, Jaffard R, Mormede C, Munoz C, Bernard K, Morain P (2008) The AMPA modulator S 18986 improves declarative and working memory performances in aged mice. Behav Pharmacol 19:235–244

Matzel LD, Grossman H, Light K, Townsend D (2008) Kolata S Age-related declines in general cognitive abilities of Balb/c mice are associated with disparities in working memory, body weight and general activity. Learn Mem 15:733–746

Minkeviciene R, Banerjee P, Tanila H (2004) Memantine improves spatial learning in a transgenic mouse model of alzheimer's disease. J Pharmacol Exp Ther 311:677–682

Mondadori C, Weiskrantz L, Buerki H, Petschke F, Fagg GE (1989) NMDA receptor antagonists can enhance or impair learning memory performance in animals. Exp Brain Res 75:449–456

Montgomery KC (1952) A test of two explanations of spontaneous alternation. J Comp Physiol Psychol 45:287–293

Moss MB, Rosene DL, Peters A (1988) Effects of aging on visual recognition memory in the rhesus monkey. Neurobiol Aging 9:495–502

Niimi K, Takahashi E, Itakura C (2008) Improved short-term memory and increased expression of NR2B observed in senescence-accelerated mouse (SAM) P6. Exp Gerontol 43:847–852

Olton D (1979) Mazes, Maps and memory. Am Psychol 34:583–596

Pych JC, Colon-Rivera C, Gold PE (2005) Acetylcholine release in hippocampus and striatum during testing on a rewarded spontaneous alternation task. Neurobiol Learn Mem 84:93–101

Ragozzino ME, Pal SN, Unick KE, Stefani MR, Gold PE (1998) Modulation of hippocampal acetylcholine release and spontaneous alternation scores by intra-hippocampal glucose injections. J Neurosci 18:1595–1601

Reus GZ, Valvassori SS, Machado RA (2008) martins MR, Giavoli EC, Quevedo J. Acute treatment with low doses of memantine does not impair aversive, non-associative and recognition memory in rats. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 376:295–300

Rex CS, Kramar EA, Colgin LL, Lin B, Gall CM, Lynch G (2005) Long-term potentiation is impaired in middle-aged rats: regional specificity and reversal by adenosine receptor antagonists. J Neurosci 25(25):5956–5966

Richman CL, Dember WN, Kim P (1987) Spontaneous alternation behavior: a review. Curr Psychol Res Rev 5:358–391

Rosi S, Giovannini MG, Lestage PJ, Munoz C, Corte LD, Pepeu GS (2004) 18986, a positive modulator of AMPA receptors with cognition-enhancing properties, increases Ach release in the hippocampus of young and aged rat. Neurosci Lett 361:120–123

Savage LM, Chang Q, Gold PE (2003) Diencephalic damage decreases hippocampal acetylcholine release during spontaneous alternation testing. Learn mem 10:242–246

Segovia G, Del Arco A, de Blas M, Garrido P, Mora F (2008) Effects of enriched environment on the release of dopamine in the prefrontal cortex produced by stress and on working memory during aging in the awake rat. Behav Brain Res 187:304–311

Thompson DM, Guidotti A, DiBella M, Costa E (1995) 7-Chloro-3-methyl-3, 4-dihydro-2H–1, 2, 4-benzothiadiazine S, S-dioxide (IDRA 21), a congener of aniracetam, potently abates pharmacologically induced cognitive impairments in patas monkeys. PNAS 92(17):7667–7671

Tronche C, Pierard C, Coutan M, Chauveau F, Liscia P, Beracochea D (2010) Increased stress-induced intra-hippocampus corticosterone rise associated with memory impairments in middle-aged mice. Neurobiol Learn Mem 93:343–351

Van Dam D, Abramowski D, Staufenbiel M, De Deyn PP (2005) Symptomatic effects of donepezil, rivastigmine, galantamine and memantine on cognitive deficits in the APP23 model. Psychopharmacol 180:177–190

Van Vugt MK, Schulze-Bonhage A, Litt B, Brandt A, Kahana MJ (2010) Hippocampal gamma oscillations increase with memory load. J Neurosci 30:2694–2699

Wan RQ, Pang K, Olton DS (1994) Hippocampal and amygdaloid involvement in non spatial and spatial working memory in rats: effects of delay and interference. Behav Neurosci 108:866–882

Ward MT, Stoelzel CR, Markus EJ (1999) Hippocampal dysfunction during aging II: deficits the radial-arm maze. Neurobiol Aging 20 (4):373–380

Wenk GL (2001) Assessment of spatial memory using the T-maze. Curr Protoc Neurosci, chapter 8: unit 8.5B

West RL (1996) An application of prefrontal cortex function theory to cognitive aging. Psychol Bull 120:272–292

Winocur G (1986) Memory decline in aged rats: a neuropsychological interpretation. J Gerontol 41:758–763

Yamada KA (2000) Therapeutic potential of positive AMPA receptor modulators in the treatment of neurological disease. Expert Opin Investig Drugs 9(4):765–778

Yoon T, Okada J, Jung MW, Kim JJ (2008) Prefrontal cortex and hippocampus subserve different components of working memory in rats. Learn Mem 15:97–105

Zajaczowski W, Frankiewicz T, Parsons CG, Danysz W (1997) Uncompetitive NMDA receptor antagonists attenuate NMDA-

induced impairment of passive avoidance learning and LTP. Neuropharmacol 36:961–976

Zivkovic I, Thompson DM, Bertolino M, Uzunov D, DiBella M, Costa E, Guidotti A (1995) 7-Chloro-3-methyl-3–4-dihydro-2H–1, 2, 4 benzothiadiazine S, S-dioxide (IDRA 21): a benzothiadiazine derivative that enhances cognition by attenuating dl-alpha-amino-2, 3-dihydro-5-methyl-3-oxo-4-isoxazolepropanoic acid (AMPA) receptor desensitization. J Pharmacol Exp Ther 272(1):300–309

Zoladz PR, Campbell AM, Collin RP, Schaefer D, Danysz W, Diamond DM (2006) Enhancement of long-term spatial memory in adult rats by the noncompetitive NMDA receptor antagonists, memantine and neramexane. Pharmacol Biochem Behav 85:298–306

Annexe 2:

Analyse sur l'ensemble des données d'immunohistochimie tCREB

CA1 hippocampique

ANOVA Table for CA1 CREBt
Row exclusion: étude cinétique jeune-âgé CREBt.svd

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
délai de perf	4	73455,137	18363,784	2,216	,0794	8,862	,607
âge	1	1767,384	1767,384	,213	,6461	,213	,073
délai de perf * âge	4	21546,890	5386,723	,650	,6294	2,600	,195
Residual	54	447588,452	8288,675				

Means Table for CA1 CREBt
Effect: délai de perf * âge
Row exclusion: étude cinétique jeune-âgé CREBt.svd

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
30min, 5-6mois	6	609,705	133,589	54,537
30min, 18-20mois	7	544,941	119,456	45,150
1h, 5-6mois	6	484,548	31,598	12,900
1h, 18-20mois	5	494,238	60,224	26,933
1h30, 5-6mois	6	526,423	51,260	20,927
1h30, 18-20mois	4	576,044	52,099	26,050
cage, 5-6mois	7	582,985	85,966	32,492
cage, 18-20mois	8	571,999	80,947	28,619
naive, 5-6mois	6	604,888	124,916	50,997
naive, 18-20mois	9	567,515	89,255	29,752

Cortex prélimbique

ANOVA Table for PL CREBt
Row exclusion: étude cinétique jeune-âgé CREBt.svd

DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
4	2189,378	547,344	1,079	,3760	4,316	,310
1	670,705	670,705	1,322	,2552	1,322	,193
4	1187,539	296,885	,585	,6746	2,341	,179
54	27390,346	507,229				

Means Table for PL CREBt
Effect: délai de perf * âge
Row exclusion: étude cinétique jeune-âgé CREBt.svd

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
30min, 5-6mois	6	109,497	26,327	10,748
30min, 18-20mois	7	88,941	25,529	9,649
1h, 5-6mois	6	107,073	25,486	10,405
1h, 18-20mois	5	101,257	20,844	9,322
1h30, 5-6mois	6	100,112	17,421	7,112
1h30, 18-20mois	4	92,556	17,694	8,847
cage, 5-6mois	7	107,737	24,210	9,150
cage, 18-20mois	8	113,211	19,937	7,049
naive, 5-6mois	6	113,706	28,071	11,460
naive, 18-20mois	9	109,010	17,077	5,692

Striatum

ANOVA Table for St tCREB IR
Row exclusion: cinétique jeune-âgé CREBt.svd

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
âge	1	156,292	156,292	,297	,5888	,297	,082
délai de perf	4	1266,352	316,588	,601	,6639	2,404	,180
âge * délai de perf	4	569,311	142,328	,270	,8955	1,081	,103
Residual	43	22649,643	526,736				

Means Table for St tCREB IR
Effect: âge * délai de perf
Row exclusion: cinétique jeune-âgé CREBt.svd

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
5-6mois, 30min	4	82,807	20,476	10,238
5-6mois, 1h	4	89,692	21,828	10,914
5-6mois, 1h30	4	86,511	17,246	8,623
5-6mois, cage	4	84,545	19,813	9,907
5-6mois, naive	4	93,592	22,352	11,176
18-20mois, 30min	7	88,292	32,152	12,152
18-20mois, 1h	5	81,405	22,562	10,090
18-20mois, 1h30	4	72,232	15,960	7,980
18-20mois, cage	8	81,586	20,571	7,273
18-20mois, naive	9	95,607	23,529	7,843

Noyau baso-latéral de l'amygdale

ANOVA Table for BLA tCREB IR
Row exclusion: cinétique jeune-âgé CREBt.svd

DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
1	4051,864	4051,864	1,357	,2505	1,357	,196
4	11148,864	2787,216	,933	,4537	3,733	,265
4	4383,887	1095,972	,367	,8308	1,468	,124
43	128414,228	2986,377				

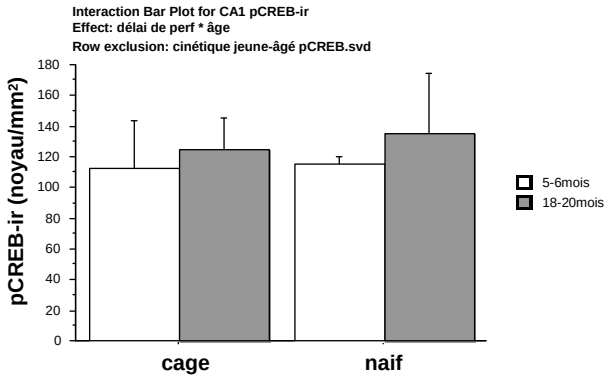
Means Table for BLA tCREB IR
Effect: âge * délai de perf
Row exclusion: cinétique jeune-âgé CREBt.svd

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
5-6mois, 30min	4	178,866	29,293	14,647
5-6mois, 1h	4	197,092	47,096	23,548
5-6mois, 1h30	4	196,371	28,930	14,465
5-6mois, cage	4	194,145	64,400	32,200
5-6mois, naive	4	197,447	26,223	13,111
18-20mois, 30min	7	169,382	39,862	15,066
18-20mois, 1h	5	208,812	52,554	23,503
18-20mois, 1h30	4	220,358	85,813	42,906
18-20mois, cage	8	241,549	62,933	22,250
18-20mois, naive	9	215,601	63,021	21,007

Annexe 3:

Comparaison de l'immunoréactivité pCREB entre les groupes « naif » et « cage » par un test t de Student.

CA1 hippocampique



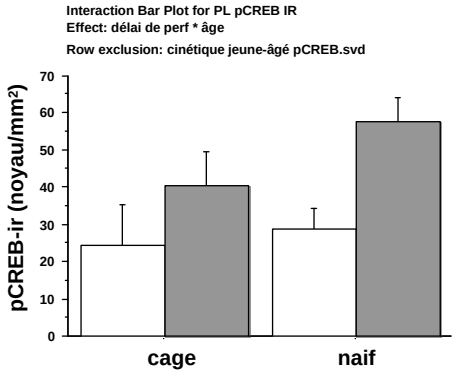
Unpaired t-test for CA1 pCREB-ir
Grouping Variable: délai de perf
Split By: âge
Hypothesized Difference = 0
Row exclusion: cinétique jeune-âgé pCREB.svd

	Mean Diff.	DF	t-Value	P-Value
cage, naive: Total	-7,357	20	-,269	,7907
cage, naive: 5-6mois	-3,308	8	-,084	,9350
cage, naive: 18-20mois	-10,210	10	-,250	,8075

Group Info for CA1 pCREB-ir
Grouping Variable: délai de perf
Split By: âge
Row exclusion: cinétique jeune-âgé pCREB.svd

	Count	Mean	Variance	Std. Dev.	Std. Err
cage: Total	13	118,830	3969,646	63,005	17,474
cage: 5-6mois	6	112,076	5881,604	76,692	31,309
cage: 18-20mois	7	124,619	2953,240	54,344	20,540
naive: Total	9	126,187	3993,946	63,198	21,066
naive: 5-6mois	4	115,384	89,166	9,443	4,721
naive: 18-20mois	5	134,829	7710,950	87,812	39,271

Cortex prélimbique



Unpaired t-test for PL pCREB IR
Grouping Variable: délai de perf
Split By: âge
Hypothesized Difference = 0
Row exclusion: cinétique jeune-âgé pCREB.svd

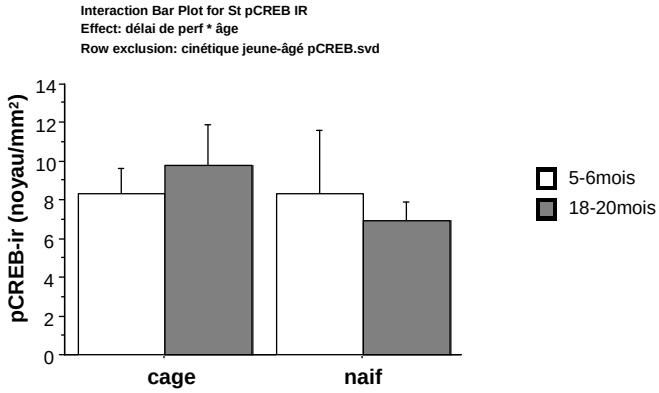
	Mean Diff.	DF	t-Value	P-Value
cage, naive: Total	-11,832	20	-1,167	,2568
cage, naive: 5-6mois	-4,621	8	-,323	,7551
cage, naive: 18-20mois	-17,109	10	-1,398	,1922

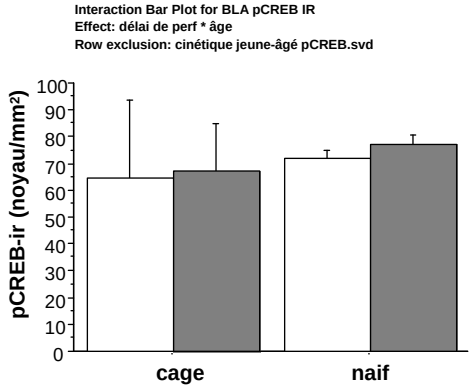
Group Info for PL pCREB IR
Grouping Variable: délai de perf
Split By: âge
Row exclusion: cinétique jeune-âgé pCREB.svd

	Count	Mean	Variance	Std. Dev.	Std. Err
cage: Total	13	32,954	659,105	25,673	7,120
cage: 5-6mois	6	24,345	722,222	26,874	10,971
cage: 18-20mois	7	40,334	578,705	24,056	9,092
naive: Total	9	44,787	377,519	19,430	6,477
naive: 5-6mois	4	28,966	108,065	10,395	5,198
naive: 18-20mois	5	57,443	223,468	14,949	6,685

Striatum

Noyau baso-latéral de l'amygdale





Unpaired t-test for St pCREB IR
Grouping Variable: délai de perf
Split By: âge
Hypothesized Difference = 0
Row exclusion: cinétique jeune-âgé pCREB.svd

	Mean Diff.	DF	t-Value	P-Value
cage, naive: Total	1,538	20	,778	,4454
cage, naive: 5-6mois	,027	8	,009	,9932
cage, naive: 18-20mois	2,790	10	1,022	,3308

Unpaired t-test for BLA pCREB IR
Grouping Variable: délai de perf
Split By: âge
Hypothesized Difference = 0
Row exclusion: cinétique jeune-âgé pCREB.svd

	Mean Diff.	DF	t-Value	P-Value
cage, naive: Total	-8,725	20	-,455	,6539
cage, naive: 5-6mois	-7,311	8	-,201	,8458
cage, naive: 18-20mois	-9,776	10	-,453	,6603

Group Info for St pCREB IR
Grouping Variable: délai de perf
Split By: âge
Row exclusion: cinétique jeune-âgé pCREB.svd

	Count	Mean	Variance	Std. Dev.	Std. Err
cage: Total	13	9,078	21,691	4,657	1,292
cage: 5-6mois	6	8,305	10,780	3,283	1,340
cage: 18-20mois	7	9,741	33,288	5,770	2,181
naive: Total	9	7,540	19,345	4,398	1,466
naive: 5-6mois	4	8,277	44,415	6,664	3,332
naive: 18-20mois	5	6,950	4,401	2,098	,938

Group Info for BLA pCREB IR
Grouping Variable: délai de perf
Split By: âge
Row exclusion: cinétique jeune-âgé pCREB.svd

	Count	Mean	Variance	Std. Dev.	Std. Err
cage: Total	13	66,158	3219,406	56,740	15,737
cage: 5-6mois	6	64,770	5061,134	71,142	29,043
cage: 18-20mois	7	67,349	2217,617	47,092	17,799
naive: Total	9	74,883	56,781	7,535	2,512
naive: 5-6mois	4	72,081	38,285	6,187	3,094
naive: 18-20mois	5	77,125	70,714	8,409	3,761

Annexe 4:

Analyse des données d'alternance spontanée chez les souris KO β2 et leurs souris Wild-type.

Comparaison entre souris KO β2 et WT

ANOVA Table for moyenne SA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
ITI	2	1842,593	921,296	3,323	,0436	6,646	,599
génotype	1	4,630	4,630	,017	,8977	,017	,052
ITI * génotype	2	9,259	4,630	,017	,9834	,033	,052
Residual	54	14972,222	277,263				

Means Table for moyenne SA
Effect: génotype * ITI

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
WT, 5sec	10	68,333	19,954	6,310
WT, 30sec	10	70,000	21,943	6,939
WT, 90sec	10	58,333	14,164	4,479
KO b2, 5sec	10	68,333	18,342	5,800
KO b2, 30sec	10	70,000	10,541	3,333
KO b2, 90sec	10	56,667	11,653	3,685

Fisher's PLSD for moyenne SA
Effect: ITI
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
5sec, 30sec	-1,667	10,557	,7528	
5sec, 90sec	10,833	10,557	,0445	S
30sec, 90sec	12,500	10,557	,0212	S

Annexe 5:

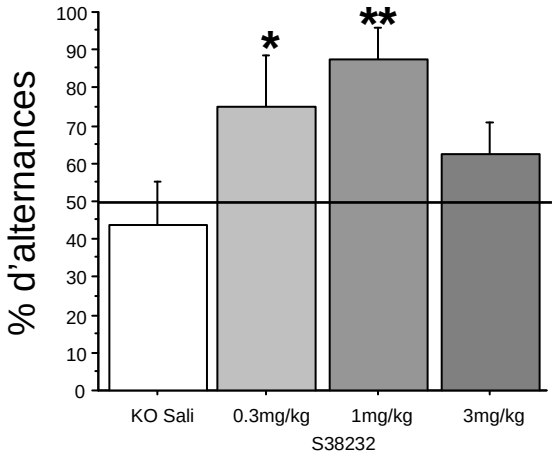
Analyse des données pharmacologiques obtenues chez les souris β2: traitement avec le S 38232.

Analyse au 2e bloc d'essais

ANOVA Table for Bloc2
Row exclusion: Ko beta2 S38232.svd

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
S..	3	8359,375	2786,458	3,160	,0401	9,481	,667
Residual	28	24687,500	881,696				

Interaction Bar Plot for Bloc2
Effect: S38232



Means Table for Bloc2
Effect: S..
Row exclusion: Ko beta2 S38232.svd

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
0.3mg/kg	8	75,000	37,796	13,363
1mg/kg	8	87,500	23,146	8,183
3mg/kg	8	62,500	23,146	8,183
KO Sali	8	43,750	32,043	11,329

Fisher's PLSD for Bloc2
Effect: S..
Significance Level: 5 %
Row exclusion: Ko beta2 S38232.svd

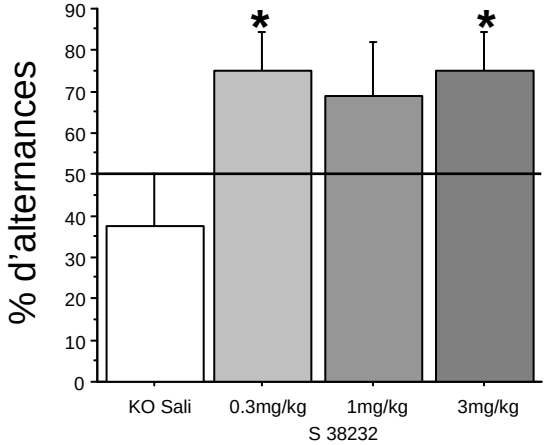
	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
0.3mg/kg, 1mg/kg	-12,500	30,412	,4070	
0.3mg/kg, 3mg/kg	12,500	30,412	,4070	
0.3mg/kg, KO Sali	31,250	30,412	,0444	S
1mg/kg, 3mg/kg	25,000	30,412	,1033	
1mg/kg, KO Sali	43,750	30,412	,0064	S
3mg/kg, KO Sali	18,750	30,412	,2170	

Analyse au 3e bloc d'essais

ANOVA Table for Bloc3
Row exclusion: Ko beta2 S38232.svd

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
S..	3	7734,375	2578,125	2,538	,0768	7,615	,558
Residual	28	28437,500	1015,625				

Interaction Bar Plot for Bloc3
Effect: S38232



Means Table for Bloc3
Effect: S..
Row exclusion: Ko beta2 S38232.svd

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
0.3mg/kg	8	75,000	26,726	9,449
1mg/kg	8	68,750	37,201	13,153
3mg/kg	8	75,000	26,726	9,449
KO Sali	8	37,500	35,355	12,500

Fisher's PLSD for Bloc3
Effect: S..
Significance Level: 5 %
Row exclusion: Ko beta2 S38232.svd

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
0.3mg/kg, 1mg/kg	6,250	32,640	,6979	
0.3mg/kg, 3mg/kg	0,000	32,640	•	
0.3mg/kg, KO Sali	37,500	32,640	,0259	S
1mg/kg, 3mg/kg	-6,250	32,640	,6979	
1mg/kg, KO Sali	31,250	32,640	,0599	
3mg/kg, KO Sali	37,500	32,640	,0259	S

Annexe 6:

Analyse des données pharmacologiques obtenues chez les souris β2: traitement avec la MLA.

Comparaison entre souris KO β2 et WT

ANOVA Table for % alternance
Row exclusion: MV030 - ko b2 âgé + MLA.svd

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Traitement	3	1038,366	346,122	2,426	,0744	7,279	,570
Génotype	1	1173,040	1173,040	8,224	,0057	8,224	,819
Traitement * Génotype	3	1227,107	409,036	2,868	,0440	8,603	,654
Residual	59	8416,005	142,644				

Means Table for % alternance
Effect: Traitement * Génotype
Row exclusion: MV030 - ko b2 âgé + MLA.svd

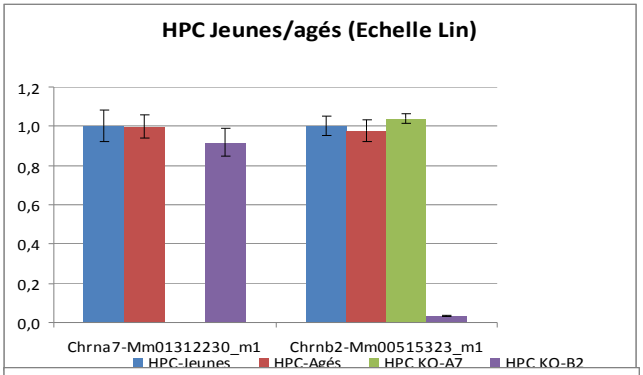
	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
NaCl, KO b2	8	77,083	8,626	3,050
NaCl, WT	8	70,833	11,785	4,167
MLA 0.55mk, KO b2	9	61,111	11,785	3,928
MLA 0.55mk, WT	8	72,917	8,626	3,050
MLA 1.67mk, KO b2	9	57,407	8,784	2,928
MLA 1.67mk, WT	9	68,519	13,029	4,343
MLA 5mk, KO b2	9	59,259	14,699	4,900
MLA 5mk, WT	7	76,190	16,265	6,148

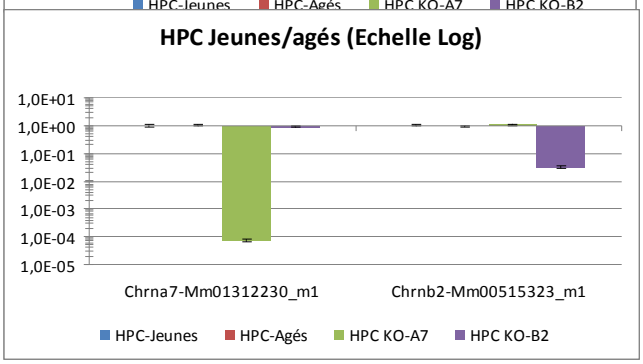
Row exclusion: MV030 - ko b2 âgé + MLA.svd

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
NaCl, MLA 0.55mk	15,972	11,226	,0068	S
NaCl, MLA 1.67mk	19,676	11,226	,0012	S
NaCl, MLA 5mk	17,824	11,226	,0029	S

Annexe 7:

Analyse des données de PCR quantitative.





groupes HPC Vs HPC Jeunes

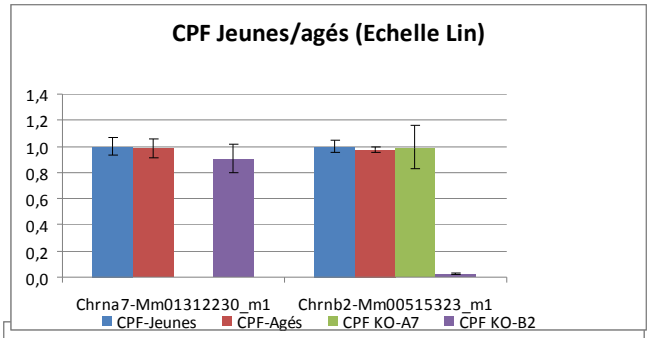
RQ

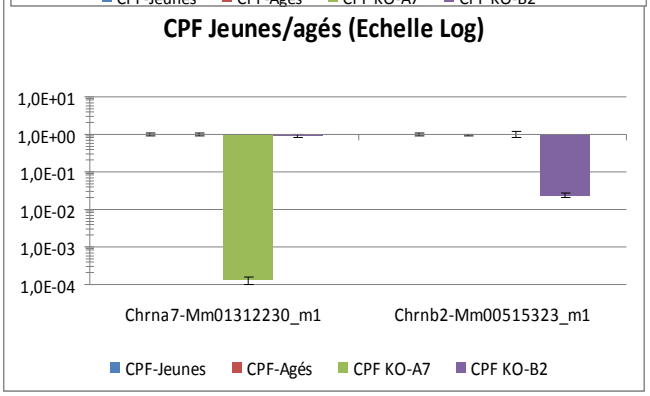
	Chrna7-Mm01312230_m1	Chrnb2-Mm00515323_m1
HPC-Jeunes	1,0	1,0
HPC-Agés	1,0	1,0
HPC KO-A7	0,00007	1,0
HPC KO-B2	0,9	0,03

HPC Jeunes Vs Agés

Pvalues

	Chrna7-Mm01312230_m1	Chrnb2-Mm00515323_m1
HPC-Jeunes		
HPC-Agés	1,000	0,721
HPC KO-A7	0,038	0,717
HPC KO-B2	0,298	0,017





groupes CPF Vs CPF Jeunes

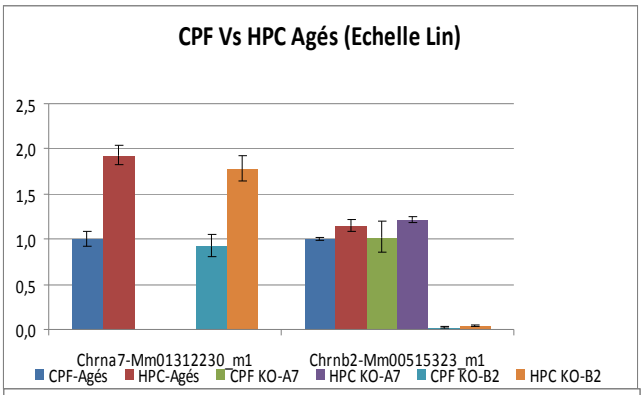
RQ

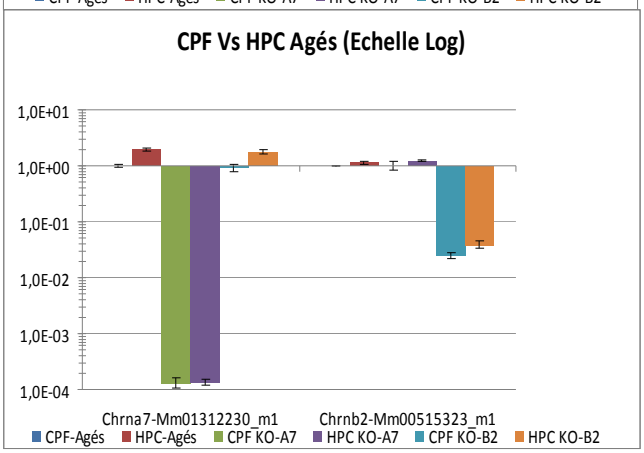
	Chrna7-Mm01312230_m1	Chrnb2-Mm00515323_m1
CPF-Jeunes	1,0	1,0
CPF-Agés	1,0	1,0
CPF KO-A7	0,00013	1,0
CPF KO-B2	0,9	0,02

CPF Jeunes Vs Agés

Pvalues

	Chrna7-Mm01312230_m1	Chrnb2-Mm00515323_m1
CPF-Jeunes		
CPF-Agés	1,000	0,862
CPF KO-A7	0,038	1,000
CPF KO-B2	0,102	0,017



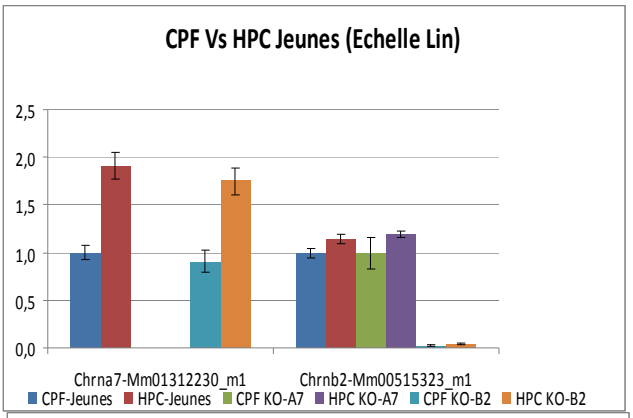


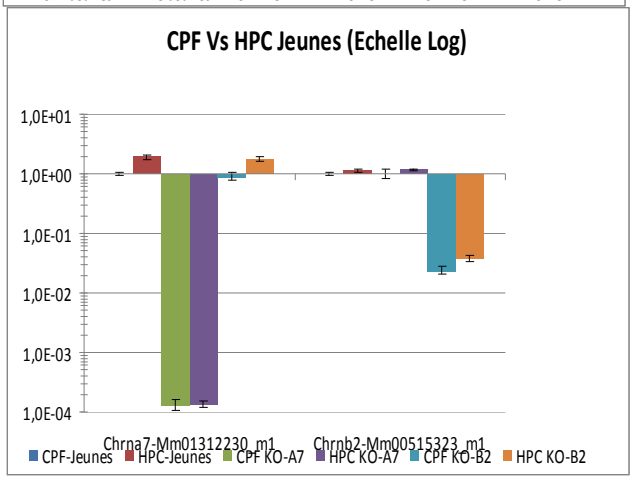
HPC ou KO Vs CPF Agés
RQ

	Chrna7-Mm01312230_m1	Chrnb2-Mm00515323_m1
CPF-Agés	1,0	1,0
HPC-Agés	1,9	1,1
CPF KO-A7	0,00013	1,0
HPC KO-A7	0,00014	1,22
CPF KO-B2	0,9	0,02
HPC KO-B2	1,8	0,04

CPF Vs HPC Agés
Pvalues

	Chrna7-Mm01312230_m1	Chrnb2-Mm00515323_m1
CPF-Agés		
HPC-Agés	0,001	0,001
CPF KO-A7	0,038	0,950
HPC KO-A7	0,038	0,038
CPF KO-B2	0,405	0,017
HPC KO-B2	0,017	0,017





HPC ou KO Vs CPF Agés
RQ

	Chrna7-Mm01312230_m1	Chrnb2-Mm00515323_m1
CPF-Agés	1,0	1,0
HPC-Agés	1,9	1,1
CPF KO-A7	0,00013	1,0
HPC KO-A7	0,00014	1,22
CPF KO-B2	0,9	0,02
HPC KO-B2	1,8	0,04

CPF Vs HPC Agés
Pvalues

	Chrna7-Mm01312230_m1	Chrnb2-Mm00515323_m1
CPF-Agés		
HPC-Agés	0,001	0,001
CPF KO-A7	0,038	0,950
HPC KO-A7	0,038	0,038
CPF KO-B2	0,405	0,017
HPC KO-B2	0,017	0,017