



UNIVERSITE DE STRASBOURG

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Strasbourg
Spécialité Neurosciences

par

Pierre-Henri MOREAU

**Modélisation des déficits cognitifs de la maladie
d'Alzheimer par une approche lésionnelle chez des souris
transgéniques hAPP/hApoE et non transgéniques C57BL/6J.**

Soutenue publiquement le 2 novembre 2011 devant
la Commission d'Examen :

Pr. Ayikoe Guy MENSAH NYAGAN

Examineur interne – Président du Jury

Pr. Catherine BELZUNG

Rapporteur externe

Dr. Etienne SAVE

Rapporteur externe

Dr. Chantal MATHIS

Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

À défaut de garder le meilleur pour la fin, je souhaiterais remercier en premier lieu ma directrice de thèse, le docteur Chantal Mathis. Au cours de ces quatre années de thèse, par son écoute, sa réflexion scientifique, son empathie et sa pédagogie, elle m'a permis de m'épanouir dans tout ce travail entrepris ainsi que d'observer et d'apprendre toutes les qualités nécessaires pour devenir un bon chercheur. En cela, un énorme merci.

Je remercie le Doyen et directeur du Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitive, Christian Kelche, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je tiens à remercier tout particulièrement l'Association Alsace Alzheimer 68, sans qui tout le travail présenté dans cette thèse n'aurait pu voir le jour.

Je remercie tout particulièrement le Professeur Catherine Belzung, le Professeur Ayikoe Guy Mensah Nyagan et le Docteur Etienne Save pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger et d'évaluer ce travail de thèse. Je vous adresse mes remerciements les plus sincères et vous prie de vouloir accepter le témoignage de mon plus grand respect.

Merci également au Professeur Jean-Christophe Cassel, pour son dynamisme, son entrain et toute sa passion pour les Neurosciences, qu'il sait particulièrement bien transmettre au laboratoire ou sur le terrain de P... !

Je suis extrêmement reconnaissant à Brigitte Cosquer, Karine Geiger, et Anaïs Gillet pour toute l'aide technique apporté pendant ma thèse, et toujours avec le mot pour rire.

Un grand merci à Alexandra Barbelivien et Monique Majchrzak pour m'avoir permis de découvrir pour la première fois ce laboratoire lors de ma licence de psychologie, sans savoir que j'y passerais autant de temps les années futures. Un grand merci aussi pour m'avoir initié à l'enseignement, pour vos conseils aussi bien dans la préparation de cours que dans l'évaluation des copies.

Je tenais tout particulièrement à remercier Lucas Lecourtier (alias « Maître »), pour tout ce que j'ai pu apprendre sur l'habenula au cours de ma thèse et tous ces bons moments passés à s'étriper au Barbu.

Un grand merci à tous les doctorants du labo : Mohamad Ali, Jean-Bastien Bott, Olivier Bousige, Elodie Dechatrette, Jean-Baptiste Faure, Michaël Lourreiro, Marc-Antoine Muller, Romain Neidel, Sarah Pol Bodetto et Nour Yacine, pour toutes nos discussions « scientifiques » pendant nos pauses cigarettes, enfin pas toujours scientifiques d'ailleurs mais pour tous ces bons moments passés avec vous, qui me font dire on est bien au labo.

Merci à tous les membres temporaires, permanents et nouveaux statutaires de l'équipe, parmi lesquels Olivier Bildstein, Anne-Laurence Boutiller, Raphaëlle Cassel, Thibault Cholvin, Patrick Gire, Romain Goutagny, Catherine Krieger, Christine Lazarus, Edouardo Marques, Carole Meirman, Marie-Laure Michel, Marie Munch, Mathieu Fontenau, Phillipe Oberling,

Lorène Penazzi, Anne Pereira de Vasconcelos, Pascal Romieu, Anett Schumacher, Elise Vogel, pour ces moments de partage et votre bonne humeur.

Un grand merci aux étudiants qui, m'ont permis de faire avancer un peu plus vite mon travail : Mélanie Arrivet, Cyril Daniel.

Malgré la distance qui parfois nous sépare, je n'oublie pas non plus tous mes compères de début de thèse, aujourd'hui docteurs. Je tiens ainsi à remercier Samy Ben Hamida, Hayat Harrati, Anne-Sophie Laurensen, Joelle Lopez et Christophe Muller, pour votre amitié sincère.

J'en viens à présent à tous mes amis hors labo, Ophé, Oliv, Nico, Cath, Eric, Caro et Tom, pour votre soutien pendant les moments difficiles, pour votre amitié tout au long de ces années et, bien sûr, pour les cinés-clubs et les p'tits cochons.

Un grand merci, enfin, à toute ma famille, pour avoir toujours été là et m'avoir soutenu durant toutes ces années.

Pour terminer, je dois tous mes remerciements les plus sincères à Léa Ackermann, qui malgré toutes ces années faciles et moins évidentes pour certaines, a toujours été à mes côtés, a toujours su trouver les mots pour me faire avancer et sans qui je ne serais jamais arrivé jusque là. Léa merci.

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1 : LA MALADIE D'ALZHEIMER.....	1
I. Généralités	1
1. Historique.....	1
2. Prévalence de la MA	2
3. Symptomatologie des déficits cognitifs de la MA	2
3.1. Troubles de la mémoire	2
3.2. Troubles des fonctions instrumentales	4
3.3. Troubles du comportement	5
II. Neuropathologie de la maladie d'Alzheimer.....	6
1. Les plaques séniles	6
2. Les dégénérescences neurofibrillaires.....	8
III. Etiologie de la maladie d'Alzheimer et ses facteurs de risque	10
1. Les mutations du gène de l'APP.....	10
1.1. La voie non amyloïdogène	11
1.2. La voie amyloïdogène	12
2. Les mutations des gènes des présénilines.....	13
3. Le gène de l'apolipoprotéine E4	14
3.1. Caractéristiques de l'ApoE.....	15
3.2. Le rôle de l'ApoE dans le système nerveux central.....	16
4. Les facteurs de risque environnementaux.....	22
4.1. Age	22
4.2. Niveau d'éducation et stimulation cognitive	23
4.3. Le genre	24
4.4. Traumatismes crâniens	24
4.5. Risques cardiovasculaires	24

CHAPITRE 2 : MALADIE D'ALZHEIMER ET MEMOIRE	26
I. La mémoire spatiale	27
1. Définition.....	28
2. La théorie de la carte cognitive et des cellules de lieu.....	28
3. Outils d'évaluation de la mémoire spatiale chez l'Homme dans l'étude des déficits mnésiques de la MA	30
4. Outils d'évaluation de la mémoire spatiale chez le Rongeur	32
4.1. La piscine de Morris.....	33
4.2. Le labyrinthe de Barnes	34
II. La mémoire de reconnaissance	37
1. Définition.....	37
2. Notions de familiarité	39
 CHAPITRE 3 : CONSIDERATIONS NEUROANATOMIQUES ET FONCTIONNELLES	 40
I. Le cortex entorhinal	40
1. Neuroanatomie et neurotransmission du CE	40
1.1. Localisation	40
1.2. Cytoarchitecture	42
1.3. Connectivité du CE	43
2. Le CE et la MA	50
3. Le CE et la mémoire chez le Rongeur.....	51
3.1. Outils de lésion du CE	51
3.2. Le CE et la mémoire spatiale	52
3.3. Le CE et la mémoire de reconnaissance	57
II. Le système cholinergique	59
1. Le système cholinergique central et la neurotransmission	59
1.1. L'acétylcholine	59
1.2. Les neurones cholinergiques et leurs connexions.....	60
1.3. Les récepteurs cholinergiques	61
2. Le système cholinergique et la MA.....	63

3.	Etude du système cholinergique dans la mémoire	64
3.1.	Outils de lésion des neurones ou des projections cholinergiques	65
3.2.	Le système cholinergique et la mémoire spatiale	68
3.3.	Le système cholinergique et la mémoire de reconnaissance	73
CHAPITRE 4 : OBJECTIFS DE THESE.....		75
MATERIELS ET METHODES		79
I.	Animaux	79
1.	Souris consanguines C57BL/6J.....	79
2.	Souris transgéniques hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4.....	80
2.1.	Construction génétique des souris hAPP-YAC	80
2.2.	Construction génétique des souris hapoE3-TR et hapoE4-TR.....	83
2.3.	Génération des souris double transgéniques hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4	83
3.	Conditions d'élevage.....	84
II.	Opérations chirurgicales.....	85
1.	Lésion du CE	85
1.1.	Préparation de la solution de NMDA	85
1.2.	Préparation de l'animal et anesthésie	85
1.3.	Injection bilatérale de NMDA	86
2.	Lésion des NCB.....	87
2.1.	Préparation de la solution de mu p75-saporine et choix de la dose utilisée ...	87
2.2.	Préparation de l'animal et anesthésie	88
2.3.	Injection bilatérale de mu p75-saporine.....	88
III.	Tests comportementaux.....	90
1.	Actographie.....	90
1.1.	Dispositif expérimental	90
1.2.	Protocole.....	91
2.	Test de la barre	91
2.1.	Dispositif expérimental	91
2.2.	Protocole.....	92

3.	Piscine de Morris	92
3.1.	Dispositif expérimental	92
3.2.	Protocole.....	93
4.	Labyrinthe de Barnes.....	95
4.1.	Dispositif expérimental	95
4.2.	Protocole.....	97
5.	Tâche de reconnaissance spatiale et de reconnaissance d'objets..	98
5.1.	Dispositif expérimental	98
5.2.	Protocoles	99
6.	Tâche des cages claire-obscur	101
6.1.	Dispositif expérimental	101
6.2.	Protocole de test	102
IV.	Techniques histologiques et immunohistochimiques	103
1.	Euthanasie des souris et fixation des tissus par perfusion	103
2.	Coloration au violet de crésyl	103
3.	Révélation histochimique de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE).....	104
3.1.	Protocole de coloration	104
3.2.	Quantification de l'activité de l'AChE	104
4.	Marquages immunohistochimiques.....	105
4.1.	Protocole de coloration	105
4.2.	Comptage des neurones dans le SM/BDB et NBM	106
	CONTRIBUTION EXPERIMENTALE	107
	CHAPITRE 1 : MODELISATION DE L'ATTEINTE DU CORTEX ENTORHINAL ET DES NEURONES CHOLINERGIQUES DE LA BASE ANTERIEURE CHEZ DES SOURIS NON TRANSGENIQUES C57BL/6J.	107
	EXPERIENCE 1 : Mise au point de la lésion des neurones cholinergiques de la base du cerveau antérieur et caractérisation des effets comportementaux.....	108
	PUBLICATION 1	110

EXPERIENCE 2 : Evaluation comportementale des effets des lésions combinées du cortex entorhinal et des neurones cholinergiques de la base du cerveau antérieur	124
PUBLICATION 2	126
DISCUSSION GENERALE DU CHAPITRE 1	157
I. Synthèse des principaux résultats	157
1. La mu p75-saporine comme outil d'étude des déficits liés à la perte spécifique des NCB chez la souris	157
2. La lésion combinée du CE et des NCB : effets comportementaux	158
II. La lésion des NCB : la mu p75-saporine et étendue de lésion (aspects techniques).....	161
III. Effet comportemental de la lésion du CE et des NCB.....	163
1. La lésion des NCB et activité locomotrice.....	163
2. Le CE et mémoire spatiale : la lésion du CE n'induit que des déficits modérés.....	164
3. Le CE impliqué dans les processus de rétention à très long terme ?	165
4. Déficiets de mémoire spatiale suite à la lésion combiné du CE et des NCB : un déficit de mémoire de travail ?	166
5. Le modèle de lésions combinées du CE et des NCB : un modèle de déficits cognitifs similaires à ce qui est observé dans la MA ?	167
 CHAPITRE 2 : MODELISATION DE L'ATTEINTE DU CORTEX ENTORHINAL ET DES NEURONES CHOLINERGIQUES DE LA BSE ANTERIEURE CHEZ DES SOURIS TRANSGENIQUES HAPP/HAPOE3 ET HAPP/HAPOE4.	169
EXPERIENCES PRELIMINAIRES	172
I. Perfectionnement de la lésion du CE	172
1. Objectif de l'étude	172
2. Analyses statistiques.....	173

3.	Résultats	173
3.1.	Etendue des lésions	173
3.2.	Effet de deux doses neurotoxiques du NMDA sur les performances de mémoire spatiale dans la piscine de Morris	174
II.	Adaptation de la lésion des NCB aux souris transgéniques hAPP/hApoE et évaluation comportementale.....	178
1.	Objectifs de l'étude.....	178
2.	Résultats (Rapport Merck) : conséquences de la lésion des NCB sur les performances comportementales des souris hAPP/hApoE....	179
2.1.	Activité locomotrice	179
2.2.	Test de la piscine de Morris : protocole de mémoire de référence	180
2.3.	Test du labyrinthe de Barnes : protocole de mémoire de référence	183
3.	Conclusions (Rapport Merck)	184
4.	Conclusions après immunohistochimie de la ChAT	186
EXPERIENCE 3 : Evaluation comportementale des effets des lésions combinées du CE et des NCB chez des souris doubles transgéniques hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4.....		
187		
I.	Objectif de l'étude	187
II.	Analyses statistiques.....	188
III.	Résultats.....	189
1.	Effectifs des groupes obtenus après exclusion	189
2.	Histologie.....	190
2.1.	Evaluation de la lésion du CE	190
2.2.	Evaluation de la lésion des NCB	192
3.	Evaluation comportementale	195
3.1.	Effet des lésions sur l'activité locomotrice	195
3.2.	Effet des lésions sur l'anxiété	198
3.3.	Effet des lésions sur les performances de navigation dans la tâche du labyrinthe de Barnes	202

DISCUSSION GENERALE DU CHAPITRE 2	208
I. Evaluation comportementale des souris non lésées	208
1. Une activité locomotrice diminuée chez les souris hAPP/hAPoE4	208
2. Mesure d'une forme d'anxiété des souris hAPP/hApoE3 et hAPP/hAPoE4 dans la tâche des boîtes claire-obscur	209
3. Des souris femelles hAPP/hAPoE4 non lésées âgées de 15 mois aux performances en mémoire spatiale excellentes	210
3.1. Les souris hAPP/hAPoE4 femelles âgées performantes : un résultat contradictoire aux données de la littérature	210
3.2 Les souris hAPP/hAPoE4 femelles âgées performantes : un effet bénéfique de l'hAPP ?	211
II. Effet des lésions du CE, des NCB seules ou combinées sur les performances comportementales des souris hAPP/hApoE	214
1. Effet étrange de la lésion des NCB chez les souris hAPP/hApoE3	214
2. Effet des lésions du CE et des NCB sur l'anxiété : des souris hAPP/hAPoE3 plus sensibles à la lésion combinée?	217
3. Effet des lésions du CE et des NCB sur l'activité locomotrice : une hyperactivité post-lésion persistante jusqu'à 18 mois pour les souris hAPP/hApoE4	218
4. Effet des lésions du CE et des NCB sur la mémoire spatiale	220
4.1. Pas d'effet de la lésion du CE chez les souris hAPP/hApoE4	220
4.2. Un effet massif de la lésion des NCB sur les performances d'apprentissage et de rétention des souris hAPP/hApoE4	221
4.3. Des performances d'apprentissage altérées chez les souris hAPP/hAPoE3 : un effet synergique de la lésion du CE et des NCB ?	223
5. L'ApoE4 comme facteur de risque chez l'Homme comme chez la Souris transgénique ?	224
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	226
BIBLIOGRAPHIE	230
ANNEXES	259

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION GENERALE

Figure 1 : Représentation d'une plaque neuritique et de sa localisation au niveau tissulaire	7
Figure 2 : Distribution des plaques neuritiques dans le parenchyme.....	8
Figure 3 : Illustration de dégénérescences neurofibrillaires.....	8
Figure 4 : Représentation de la distribution des DNF dans le parenchyme cérébral	9
Figure 5 : Représentation schématique de la voie non amyloïdogène.....	12
Figure 6 : Représentation schématique de la voie amyloïdogène	13
Figure 7 : Représentation schématique de la structure générale de toutes les présénilines.....	14
Figure 8 : Estimation du nombre de personnes touchées en France par la maladie d'Alzheimer	23
Figure 9 : Exemple de ville virtuelle utilisée en expérimentation chez l'Homme.....	31
Figure 10 : Exemple d'environnement réel.....	32
Figure 11 : Exemple d'environnement virtuel.....	32
Figure 12 : Schéma du dispositif de la piscine de Morris	33
Figure 13 : Schéma du dispositif du labyrinthe de Barnes utilisé au laboratoire pour les souris.	35
Figure 14 : Représentation schématique des connexions anatomiques entre les régions du néocortex, les régions parahippocampales et l'hippocampe dans la mémoire de reconnaissance	38
Figure 15 : Représentation de la surface latérale de cerveau de rat et de la surface ventrale d'un cerveau de singe et d'un cerveau humain	41
Figure 16 : Représentation schématique d'un cerveau de rongeur	41
Figure 17 : Représentation schématique des principales afférences du CE.	45
Figure 18 : Schéma concernant l'organisation des projections entorhino-hippocampiques.	49
Figure 19 : Schéma indicatif de la localisation des différents noyaux cholinergiques dans le cerveau d'un Rongeur	61
Figure 20 : Représentation schématique du mécanisme d'action de la mu p75-saporine.	67

MATERIELS ET METHODES

Figure 21 : Représentation schématique de la construction d'un chromosome artificiel de levure....	82
Figure 22 : Représentation graphique du dispositif d'actographie	90
Figure 23 : Photographie illustrant le test de la barre	91
Figure 24 : Photographie illustrant le dispositif expérimental de la piscine de Morris	93
Figure 25 : Protocole de mémoire de référence en piscine de Morris	94
Figure 26 : Protocole de plate-forme visible en piscine de Morris	95

Figure 27 : Photographie illustrant le dispositif expérimental du labyrinthe de Barnes	96
Figure 28 : Illustration du dispositif de reconnaissance spatiale et d'objets.....	99
Figure 29 : Schéma illustrant le protocole utilisé pour le test de mémoire de reconnaissance.....	101
Figure 30 : Photographies représentant le dispositif expérimental des cages claire-obscur.....	102

CONTRIBUTION EXPERIMENTALE

Figure 31 : Illustration de la répartition du pourcentage de neurones cholinergiques restant après injection de mu p75-saporine obtenue dans l'expérience 2.....	162
Figure 32 : Effet de deux doses neurotoxiques de NMDA sur les performances des souris lors des phases d'acquisition, de rétention et de renforcement dans la piscine de Morris	174
Figure 33 : Effet de deux doses neurotoxiques de NMDA sur les performances de rétention dans la piscine de Morris évaluées 24 h après le dernier jour d'acquisition	175
Figure 34 : Effet de deux doses neurotoxiques de NMDA sur les performances de rétention dans la piscine de Morris 24 h après le dernier jour d'acquisition.....	176
Figure 35 : Représentation graphique de l'activité locomotrice des souris hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4 avant opération	179
Figure 36 : Représentation graphique de l'effet des lésions des NCB sur l'activité locomotrice des souris hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4.....	180
Figure 37 : Représentation graphique de l'effet de la lésion des NCB sur les performances dans la piscine de Morris lors de la phase d'acquisition de 5 jours.	181
Figure 38 : Représentation graphique de l'effet de la lésion des NCB sur les performances de rétention évaluées 24 h après le dernier jour d'acquisition dans la piscine de Morris. ...	182
Figure 39 : Représentation graphique de l'effet de la lésion des NCB sur les performances dans la piscine de Morris lors du protocole de plate-forme visible	182
Figure 40 : Représentation graphique de l'effet de la lésion des NCB sur les performances des souris hAPP/hApoE3 et E4 lors des 6 jours d'acquisition dans le labyrinthe de Barnes	183
Figure 41 : Représentation graphique de l'effet de la lésion des NCB sur les performances des souris hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4 lors du test de rétention dans le labyrinthe de Barnes..	184
Figure 42 : Représentations schématiques de coupes coronales de cerveau de souris situées entre -4,04 mm et -5,02 mm depuis <i>bregma</i>	191
Figure 43 : Représentation graphique de l'effet de la lésion induite par la mu p75-saporine sur le nombre de neurones ChAT-positifs présents dans le SM	192
Figure 44 : Représentation graphique de l'effet de la lésion induite par la mu p75-saporine sur le nombre de neurones ChAT-positifs présents dans le NBM	193

Figure 45 : Représentation graphique de l'effet des lésions du CE et des NCB sur l'activité locomotrice des souris hAPP/hApoE3 et HAPP/hApoE4	196
Figure 46 : Représentation graphique de l'effet des lésions du CE et des NCB sur le temps passé dans la cage claire pour les souris hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4	199
Figure 47 : Représentation graphique de l'effet des lésions du CE et des NCB sur la latence d'entrée dans la cage claire pour les souris hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4.....	200
Figure 48 : Représentation graphique de l'effet des lésions du CE et des NCB sur le nombre de transitions des souris hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4	201
Figure 49 : Représentation graphique de l'effet de la lésion des NCB et du CE sur les performances dans le labyrinthe de Barnes des souris hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4.....	203
Figure 50 : Représentation graphique de l'effet de la lésion des NCB et du CE sur les performances dans le labyrinthe de Barnes des souris hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4.....	205
Figure 51 : Représentation graphique de l'effet des lésions du CE et des NCB sur les performances dans le labyrinthe de Barnes des souris hAPP/hApoE3 et E4 lors du test de rétention ...	206
Figure 52 : Figure illustrant les postures de l'épileuse	216
Figure 53 : Figure représentant des exemples de souris épileées	217

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION GENERALE

- Tableau 1** : Résumé des principaux résultats des études évaluant l'effet de la lésion du CE sur la mémoire spatiale de référence, la mémoire spatiale de travail et la mémoire de reconnaissance..... 55
- Tableau 2** : Résumé des principaux résultats des études évaluant l'effet de la lésion des NCB sur la mémoire spatiale de référence, la mémoire spatiale de travail, en fonction du type de lésion, de la structure ciblée, du test utilisé et de l'espèce utilisée..... 71

MATERIELS ET METHODES

- Tableau 3** : Tableau récapitulatif de l'ensemble des coordonnées utilisées pour chaque expérience visant la lésion du CE 86
- Tableau 4** : Tableau récapitulatif de l'ensemble des coordonnées utilisées pour chaque expérience visant la lésion des NCB..... 89
- Tableau 5** : Tableau illustrant le nombre de jours d'acquisition et le délai entre la phase d'acquisition et le test de rétention pour chaque expérience 98
- Tableau 6** : Anticorps primaires 105
- Tableau 7** : Anticorps secondaires 105

CONTRIBUTION EXPERIMENTALE

- Tableau 8** : Synthèse des résultats de l'expérience 1 : Mise au point de la lésion des NCB et caractérisation des effets comportementaux..... 158
- Tableau 9** : Synthèse des résultats de l'expérience 2 : Caractérisation des effets cognitifs et comportementaux de la lésion combinée du CE et des NCB chez les souris non transgéniques C57BL/6J..... 160
- Tableau 10** : Résumé des principaux facteurs utilisés pour les analyses statistiques des résultats obtenus dans l'expérience 3..... 189
- Tableau 11** : Tableau représentant les effectifs par groupes avant et après les éliminations sur critères histologiques 190
- Tableau 12** : Tableaux représentant les valeurs de densité optique du produit de dégradation de l'AChE obtenues dans les différentes régions cérébrales pour les souris hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4 194
- Tableau 13** : Synthèse des résultats de l'expérience 2 : Caractérisation des effets cognitifs et comportementaux de la lésion combinée du CE et des NCB chez les souris double transgéniques hAPP/hApoE. 207

LISTE DES ABREVIATIONS

Aβ	Protéine β -amyloïde
acétylCoA	Acétyl coenzyme A
AChE	Acétylcholinestérase
ACID	<i>APP intracellular domain</i>
ADAM	<i>α disintegrin and metalloprotease</i>
ApoA-1	Apolipoprotéine A-1
ApoE	Apolipoprotéine E
ApoE-KI	<i>ApoE knock-in</i>
ApoE-KO	<i>ApoE knock-out</i>
APoER2	Récepteurs 2 de l'ApoE
ApoE-TR	<i>ApoE target replacement</i>
ApoJ	Apolipoprotéine J
APP	<i>Amyloid precursor protein</i>
BACE	<i>β-site APP Cleaving Enzyme</i>
BDB	Bande diagonale de Broca
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BuChE	Butyrylcholinestérase
CA	Corne d'Ammon - champs ammoniques
Ch	Choline
ChAT	Choline acetyltransférase
CE	Cortex entorhinal
CEL	Cortex entorhinal latéral
CEM	Cortex entorhinal médian
CEN	Centromère
CSPG	Chondroïtine sulfates protéoglycane
DIE	Région dorso-intermédiaire (du CEL)
DLE	Région dorso-latérale (du CEL)
DMTP	<i>Delayed matching-to-position</i>
DNF	Dégénérescences neurofibrillaires
DNMTP	<i>Delayed non matching-to-position</i>
DO	Densité optique
EC	Région entorhinale caudale (du CEM)
HACU	<i>High affinity choline uptake</i> : transport axonal à haute affinité
hApoE4	Gène humain de l'ApoE ϵ 4
hAPP	APP humaine
hBDB	Bras horizontal de la bande diagonale de Broca
HDL	<i>High density lipoproteins</i> : lipoprotéines de forte densité
HSPG	Héparane-Sulfate Protéoglycane
i.c.v.	(Injections) intracérébroventriculaires
IDL	<i>Intermediate density lipoproteins</i> : lipoprotéines de densité intermédiaire
INSEE	Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques
i.p.	Injections intrapéritonéales

KI	<i>Knock-in</i>
KO	<i>Knock-out</i>
KPI	<i>Kunitz-like protease inhibitor</i>
LDL	<i>Low density lipoproteins</i> : lipoprotéines de faible densité
LDL-R	<i>Related protein</i> : récepteur des LDL
MA	Maladie d'Alzheimer
mAChR	Récepteurs muscariniques
MCI	<i>Mild cognitive impairment</i> : déficits cognitifs légers
ME	Région entorhinale médiane (du CEM)
MTA	<i>Material transfer agreement</i> : accord de transfert de matériel
nAChR	Récepteurs nicotiniques
NBM	Noyau <i>basalis magnocellularis</i>
NCB	Neurones cholinergiques de la base du cerveau antérieur
NGF	<i>Nerve growth factor</i> : facteur de croissance des nerfs
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartate
ORI	Séquence d'origine de la réplication du vecteur
PAQUID	« Personnes âgées quid »
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> : tampon phosphate salin
PHF	<i>Paired helical filament</i> : paire de filaments protéiques appariés en hélice
Por	Cortex postrhinal
Prh	Cortex perirhinal
PS1	Préséniline 1
PS2	Préséniline 2
RO	Reconnaissance d'objets
RS	Reconnaissance spatiale
SAP	Mu p75-saporine
SM	Septum médian
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
TDL	Noyau tegmental dorsolatéral
TEL	Téломère
TPP	Noyau tegmental pedonculopontin
TR	<i>Target replacement</i> ou <i>targeted gene replacement</i>
T&U	<i>Touch and up</i>
VACHT	<i>Vesicular acetylcholine transporteur</i> : transporteur de la choline
vBDB	Bras vertical de la bande diagonale de Broca
VIE	Région ventro-intermédiaire (du CEL)
VLDL	<i>Very low density lipoproteins</i> : lipoprotéines de très faible densité
VLDL-R	Récepteurs aux VLDL
YAC	<i>Yeast artificial chromosome</i> : transfert de chromosome artificiel de levure

INTRODUCTION GENERALE

CHAPITRE 1

LA MALADIE D'ALZHEIMER

CHAPITRE 1

LA MALADIE D'ALZHEIMER

I. Généralités

1. Historique

En 1907, Aloïs Alzheimer (1864 – 1915) publie un article intitulé "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde"¹ ("une maladie caractéristique grave du cortex cérébral"), dans lequel il présente le cas d'une patiente âgée de 51 ans, Auguste Deter, atteinte de démence présénile avec des lésions corticales à l'autopsie. Il y décrit "une femme de 51 ans" qui présentait "parmi les premiers symptômes de sa maladie, un fort sentiment de jalousie envers son mari. Elle montra très vite des signes de dégradation importante de la mémoire ; elle était désorientée, elle déplaçait les objets n'importe où dans son appartement et les cachait. Parfois elle avait l'impression que quelqu'un cherchait à la tuer, ce qui la faisait hurler. Elle mourut après quatre ans et demi de maladie". Alzheimer poursuit : "Au centre d'une cellule apparemment normale se dressent une ou plusieurs fibrilles caractérisées par leur épaisseur et leur imprégnabilité particulière" à un colorant argenté. "De nombreux et petits foyers similaires se trouvent dans les couches supérieures. Ils sont caractérisés par l'accumulation d'une substance particulière dans le cortex"². Aloïs Alzheimer est ainsi le premier à décrire une pathologie caractérisée par une atteinte progressive des fonctions cognitives observée chez une patiente présentant des lésions corticales marquées après autopsie réalisée *post-mortem*. Ce n'est qu'en 1910 que cette forme de pathologie sera nommée "maladie d'Alzheimer" (MA) par Ernest Kraepelin.

¹ Une version traduite en Anglais est disponible : Alzheimer et coll., 1995.

² Traduction proposée sur le site : www.medarus.org et disponible à l'adresse suivante : www.medarus.org/Medecins/MedecinsTextes/alzheimer.html

2. Prévalence de la MA

La MA est aujourd'hui une des pathologies neurodégénératives les plus fréquentes, affectant environ 25 millions de personnes dans le monde. Dans une étude "Delphi", il est estimé qu'en 2020 le nombre de personnes touchées par la pathologie atteindra 42,3 millions de personnes et, en 2040, approximativement 81,1 millions. En France, à l'heure actuelle, on estime à 860 000 les personnes atteintes par la MA. Environ 225 000 nouveaux cas sont décelés chaque année, ce qui prédit, 1 200 000 cas en 2020 et 2 100 000 en 2040. Cette maladie est d'autant plus tragique et la prévalence importante qu'elle évolue lentement et ne peut être diagnostiquée à coup sûr que lors d'un examen *post-mortem*.

3. Symptomatologie des déficits cognitifs de la MA

La MA est une maladie rendue responsable, dans bon nombre de cas, du développement d'un état démentiel chez les personnes âgées. Elle se caractérise par une apparition progressive de troubles des fonctions supérieures, dont l'évolution conduit inexorablement à un état démentiel en 8 à 10 ans. La première caractéristique observable chez les patients Alzheimer est un déclin progressif et irréversible des fonctions mnésiques. Ce déclin s'accompagne souvent d'autres atteintes cognitives, dont l'apparition de troubles du langage, une atteinte des capacités visuo-spatiales, des troubles du jugement et une atteinte générale des capacités intellectuelles.

3.1. Troubles de la mémoire

Les perturbations mnésiques sont parmi les premiers signes inquiétants pouvant être observés dans la pathologie et conduisant le patient à consulter.

Au stade précoce de la MA, les premiers troubles concernent la mémoire épisodique (Storey et coll., 2002 ; Perry et Hodges, 2000). Cette forme de mémoire est définie comme la capacité à apprendre, stocker et rappeler des informations spécifiques d'un événement replacé dans son contexte temporel et spatial. L'atteinte de cette composante mnésique fait le plus souvent l'objet de plaintes des malades ou de leur entourage, avant l'apparition des

premiers signes de démence. En effet, l'altération de cette mémoire est souvent associée à une forte désorientation spatiale chez les patients (Dubois et coll., 1997). Bien que l'ensemble des chercheurs s'accorde à dire que des déficits marqués de mémoire épisodique sont présents au stade débutant de la MA, la nature exacte des processus déficitaires n'est pas encore bien clarifiée. En effet, si les recherches initiales penchaient en faveur d'un déficit des capacités de rappel de l'information (Lipinska et Bäckman, 1997), d'autres études suggèrent plutôt des difficultés dans la capacité à encoder une nouvelle information (Greene et coll., 1996 ; Grober et Kawas, 1997). Il semblerait donc que les troubles de la mémoire épisodique observés chez les patients Alzheimer résultent plutôt d'une atteinte des capacités d'encodage que de stockage de l'information. Les mécanismes impliqués dans les déficits d'encodage restent cependant inconnus. Une cause possible serait l'altération d'un processus de mémorisation à court terme pouvant être associé à la mémoire épisodique : la mémoire de travail. Classiquement, on considère que cette forme de mémoire permet la rétention temporaire d'une information dans le but de l'utiliser dans une tâche cognitive³. Selon Baddeley (2000), la mémorisation de ces informations à court terme pourrait être suivie par un stockage à plus long terme, sous forme de représentations mnésiques de nature épisodique, pouvant aller de la minute à plusieurs années. Dans la MA, la mémoire de travail semble légèrement déficitaire dès les premiers stades de la maladie, alors qu'elle se détériore sévèrement au cours de la pathologie. Certains auteurs ont donc proposé que les déficits d'encodage de la mémoire épisodique pourraient s'expliquer, à partir du modèle de Baddeley (2000), par une atteinte précoce d'une composante spécifique de la mémoire de travail nécessaire pour le traitement de nouvelles informations (Baddeley et coll., 2001).

Au début de la maladie, les premiers troubles observés englobent également une perturbation des capacités d'orientation dans l'espace (Henderson et coll., 1989 ; Pai et coll., 2004). Chez des personnes non démentes, les difficultés d'orientation spatiale sont souvent associées à une diminution du volume de l'hippocampe postérieur droit et des aires pariétales (Delpolyi et coll., 2007). Or, dans les tous premiers stades de la MA, les régions cérébrales touchées sont justement celles qui jouent un rôle critique dans les processus de

³ Un exemple de mémoire de travail serait la capacité à retenir un numéro de téléphone momentanément avant de le composer sur l'appareil. Cette action nécessite de retenir une information temporairement (le numéro de téléphone) pour réaliser une tâche (appeler une personne).

navigation. Cette altération structurelle pourrait expliquer pourquoi les patients Alzheimer présentent ce type de déficit à un stade relativement précoce de développement de la maladie.

En ce qui concerne les autres systèmes de mémoire, à savoir la mémoire sémantique (capacité à retenir des mots, des connaissances ou des concepts indépendamment du contexte spatio-temporel) ou la mémoire procédurale (capacité à acquérir implicitement des habiletés), ils ne sont pas altérés dans les débuts de la pathologie dans la mesure où l'étendue des déficits cognitifs reste encore limitée. En fait, l'évolution du déclin cognitif est progressive tout au long de la maladie, jusqu'à ce que l'ensemble des capacités mnésiques soit affecté.

3.2. Troubles des fonctions instrumentales

Il est à noter que la mémoire n'est pas le seul trouble cognitif observé au cours de la MA. Une autre caractéristique de la maladie est le syndrome aphaso-apraxo-agnosique.

Les troubles aphasiques sont des perturbations associées au langage. Ces déficits apparaissent au début de la maladie par un "manque du mot" et certaines difficultés à élaborer des discours riches en mots et complets. Ils s'aggravent au cours de l'évolution de la pathologie par des difficultés à reconnaître les mots et peuvent aller jusqu'à un mutisme total à un stade très avancé.

Les troubles apraxiques sont des déficits dans la réalisation de tâches motrices complexes et routinières, comme faire la cuisine, s'habiller ou dessiner, malgré des capacités sensorimotrices relativement préservées. Ils apparaissent tardivement dans l'évolution de la maladie.

Le dernier trouble des fonctions instrumentales rencontré chez les patients Alzheimer concerne les troubles agnosiques, qui consistent en une difficulté à reconnaître des objets ou des visages familiers (prosopagnosie), allant jusqu'à l'incapacité à admettre ses propres déficits (anosognosie).

3.3. Troubles du comportement

En complément des déficits cognitifs observés dans la MA, les patients développent divers troubles comportementaux. Ces troubles sont observés tout au long de l'évolution de la maladie et entraînent souvent une modification de la personnalité des patients et de leurs habitudes de vie. Peuvent être observés une apathie (perte de la motivation, désintérêt, repli sur soi) et des troubles dépressifs ou anxieux, qui apparaissent relativement tôt dans la pathologie. Une étude (PHRC-REAL) réalisée sur plus de 500 sujets atteints de MA a permis de déceler l'ensemble de ces symptômes chez 84% des sujets atteints à un stade léger ou modéré, et chez 92,5% des patients à un stade sévère. Au cours de l'évolution de la maladie, peuvent également se développer des comportements agressifs ou des troubles du sommeil pouvant être combinés avec une certaine agitation provoquant, bien souvent, des errances nocturnes chez les patients. Puis, lorsque la maladie est à un stade très évolué, la sévérité de la démence est telle que des hallucinations et des délires peuvent apparaître.

II. Neuropathologie de la maladie d'Alzheimer

La MA est une pathologie pouvant être diagnostiquée à partir des déficits cognitifs observés chez les patients. Cependant, le diagnostic clinique n'est établi qu'à titre probabiliste, car on ne peut affirmer qu'une personne est atteinte de la MA qu'à partir du moment où sont décelés, *post-mortem*, deux marqueurs de la pathologie, à savoir les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires.

1. Les plaques séniles

Les plaques séniles sont constituées d'agrégats extracellulaires qui regroupent principalement des dépôts de fibrilles amyloïdes. Ces fibrilles sont formées d'un peptide composé de 38 à 42 acides aminés, la protéine β -amyloïde ($A\beta$), que l'on retrouve principalement sous deux formes, $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$. Ces deux formes se distinguent par leur capacité d'agrégation. En effet, l' $A\beta$ sous forme 1-42 s'agrège plus facilement en fibrille que la forme 1-40, ce qui la rend plus à même de s'accumuler et de former des plaques séniles (Kim et coll., 2007 ; McGowan et coll., 2005).

Il existe globalement deux variétés de dépôts amyloïdes, les plaques neuritiques et les dépôts diffus, que l'on peut différencier par la nature des fibrilles amyloïdes et par des techniques de coloration histologiques spécifiques (rouge congo, thioflavine-S).

Les plaques neuritiques (*cf* figure 1) sont composées d'une partie centrale, compacte, formée par des fibrilles amyloïdes particulièrement insolubles. En plus de ces fibrilles, ce corps protéique dense peut présenter d'autres constituants comme de α -synucléine, des protéoglycanes (HSPG, CSPG), de l'apolipoprotéine E (ApoE), des protéines du complément ou encore de l' α -chymotripsine (Dickson, 1997). Il est entouré par une couronne radiaire composée de terminaisons nerveuses anarchiques, de neurites dystrophiques, de cellules microgliales et astrogliales réactives (Cummings et coll., 1997 ; Selkoe, 2004). Ces plaques neuritiques pourraient résulter de la maturation d'une autre variété de dépôts, les dépôts diffus. Ces derniers sont constitués majoritairement de peptides $A\beta_{1-42}$ sous forme non agrégés, donc non fibrillaires.

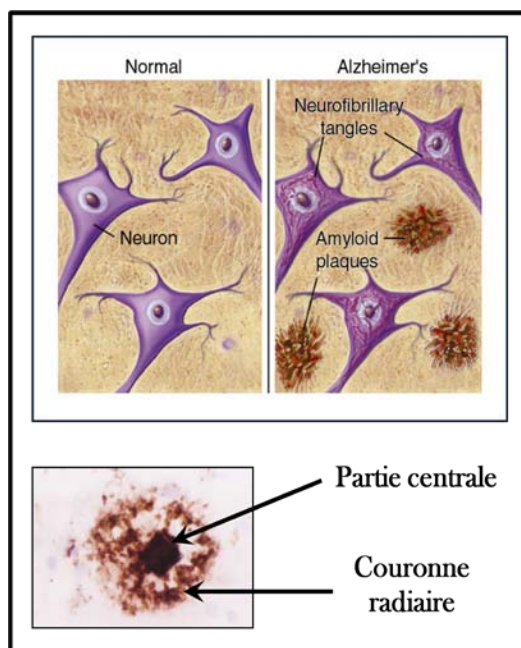


Figure 1 : Représentation d'une plaque neuritique et de sa localisation au niveau tissulaire (Image issue du site www.trikapalnet.fr).

Ces deux marqueurs amyloïdes ne seraient pas impliqués de la même manière dans la pathologie. Les plaques neuritiques, formées d'A β sous forme fibrillaire, ont longtemps été associées aux perturbations neuronales et, par voie de conséquence, aux déficits de mémoire observés dans la maladie. Mais depuis quelques années, plusieurs études démontrent que la toxicité cérébrale liée à la protéine A β serait plutôt provoquée par sa forme oligomérique et/ou sa forme en dépôts diffus (Kayed et coll., 2003 ; Ferreira et coll., 2007 ; Montalto et coll., 2007 ; Walsh et Selkoe, 2007). En effet, l'A β sous forme dimérique altérerait l'activité synaptique, ce qui provoquerait l'apparition de déficits mnésiques (Shankar et coll., 2008). Il est à noter que les plaques séniles sont également une caractéristique du vieillissement normal. En effet, elles se développent chez des personnes saines non démentes, mais en quantité moindre par rapport à ce qui est observé dans le cas de la MA. Dans la pathologie, ces plaques sont localisées en grande quantité dans le lobe temporal, dont l'hippocampe et le cortex entorhinal (CE), dans les aires associatives et primaires (notamment dans le cortex occipital) et dans quelques structures sous-corticales (noyaux de la base du cerveau antérieur et l'amygdale). Elles sont en faible quantité dans les aires frontales (*cf* figure 2).

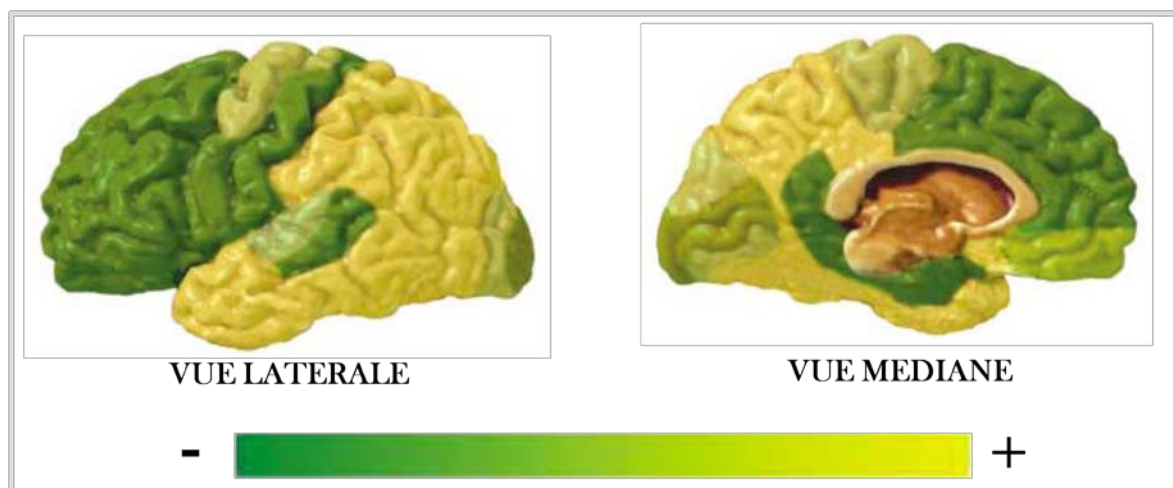


Figure 2 : Distribution des plaques neuritiques dans le parenchyme (Schéma issu de Cumming et coll., 2002).

2. Les dégénérescences neurofibrillaires

Les dégénérescences neurofibrillaires (DNF ; cf figure 3) sont des lésions intracellulaires composées d'agrégats de matériel fibrillaire anormal. L'observation en microscopie électronique de ces DNF laisse apparaître des paires de filaments protéiques appariés en hélice (*Paired Helical Filament* ; Kidd, 1963). Ces filaments sont constitués d'une protéine du cytosquelette, la protéine Tau (Brion et coll., 1985).

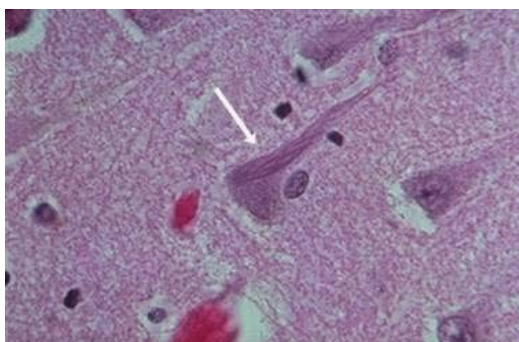


Figure 3 : Illustration de dégénérescences neurofibrillaires (Image issue du site www.lyc-davidneel.ac-aix-marseille.fr).

Cette protéine joue un rôle dans le maintien du cytosquelette en promouvant l'assemblage des microtubules et en régulant leur stabilité. En temps normal, l'état de phosphorylation de la protéine Tau définit un équilibre dynamique qui module la stabilité du cytosquelette. Dans la MA, cette protéine Tau se trouve anormalement hyperphosphorylée. Cette

hyperphosphorylation diminue son affinité pour une autre protéine du cytosquelette, la tubuline, ce qui déstabilise les microtubules, puis le cytosquelette, provoquant l'accumulation de protéine Tau sous la forme de filaments protéiques appariés en hélice dans le cytoplasme (cf figure 4 ; Mandelkow et Mandelkow, 1998 ; Maccioni et coll., 2001 ; Meraz-Rios et coll., 2010). Les DNF sont principalement localisées dans les neurones pyramidaux de la formation hippocampique, dans les couches II et IV du CE (Kordower et coll., 2001), dans les couches III et V des aires associatives (Cummings et Cole, 2002) et dans des noyaux tels que les noyaux du raphé, le *locus coeruleus* et le noyau basal de Meynert (Hauw et coll., 1990).

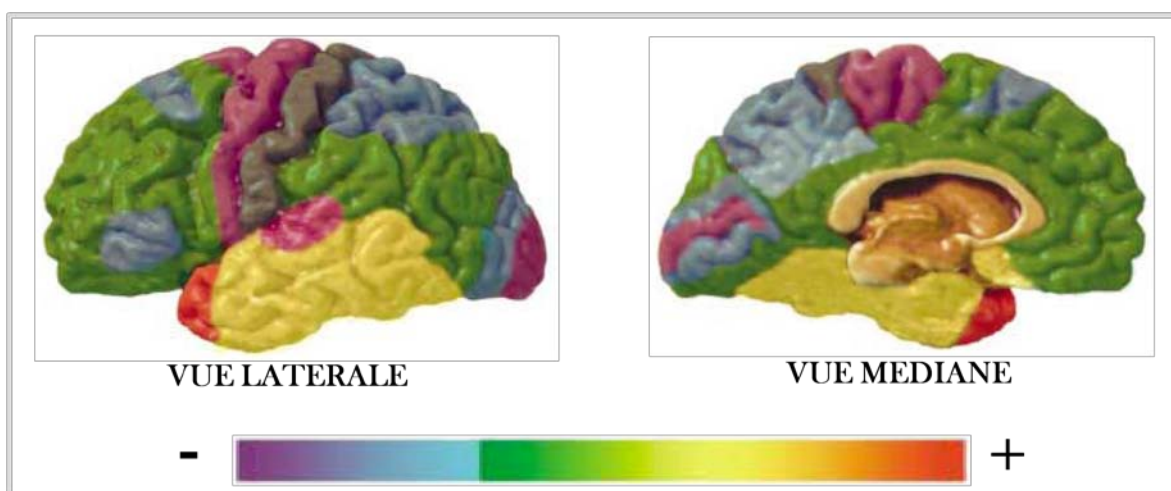


Figure 4 : Représentation de la distribution des DNF dans le parenchyme cérébral (schéma issu de l'article de Cummings et Cole, 2002).

III. Etiologie de la maladie d'Alzheimer et ses facteurs de risque

La MA est une pathologie dont l'origine serait multifactorielle et donc, l'étiologie n'est pas clairement établie. A l'heure actuelle, il est bien établi que l'interaction entre plusieurs facteurs génétiques et environnementaux créerait un terrain favorable au développement de la maladie, ces deux types de facteurs pouvant agir indépendamment l'un de l'autre ou de manière synergique. Il a ainsi été caractérisé une MA de type sporadique par opposition à une MA de type familiale.

Les MA d'origine sporadique représentent environ 90% des cas de MA. Pour celles-ci, la cause reste difficile à déterminer. Elles seraient liées à une interaction entre des facteurs de risques environnementaux, comme l'âge ou le vieillissement, le niveau d'éducation faible, la survenue de traumatismes crâniens au cours de la vie ou d'autres altérations cérébrales comme des problèmes vasculaires, et des facteurs de risque génétiques. A ce jour, on connaît plusieurs facteurs de risque génétiques de la MA sporadique, mais le plus important est celui lié au gène de l'ApoE.

Les formes familiales, quant à elles, ne concernent que très peu de malades de par le monde, et représentent moins de 10% des cas de MA. Ces formes familiales se déclarent précocement, souvent avant l'âge de 65 ans, et ont une origine génétique. En effet, l'identification de mutations génétiques associées à ces formes familiales a permis de déceler le caractère héréditaire de la maladie. Ces mutations ont été découvertes sur trois gènes. Les mutations du gène de l'APP (*Amyloid Precursor Protein*), qui sont retrouvées dans 15% des cas, et les mutations des gènes des présénilines, qui représentent plus de 60% des formes familiales de la MA.

1. Les mutations du gène de l'APP

L'APP est une glycoprotéine transmembranaire et ubiquitaire dont le gène est situé sur le chromosome 21. A l'heure actuelle, environ trente mutations ponctuelles de ce gène ont été associées aux formes familiales de la MA. Il code pour trois isoformes différentes de

la protéine APP obtenues par épissage alternatif de l'ARN messenger. Ces isoformes se distinguent les unes des autres par leur nombre d'acides aminés et par la présence ou non du domaine KPI⁴. Les trois isoformes sont les formes APP695, APP751 et APP770, comportant chacune respectivement 695, 751 et 770 acides aminés. Les formes APP751 et APP770 possèdent le domaine KPI et sont exprimées essentiellement dans les cellules gliales au niveau cérébral (Selkoe, 1998), alors que la forme APP695 est dépourvue de domaine KPI et est exprimée principalement au niveau neuronal. Ces trois formes d'APP sont relativement proches les unes des autres et contiennent la séquence peptidique de 39-43 acides aminés responsable de la production du peptide A β retrouvée dans les plaques séniles et les dépôts diffus. Ainsi, cette protéine APP transmembranaire est soumise à une protéolyse selon deux voies : une voie "non amyloïdogène", dite "non toxique", car n'aboutissant pas à la formation d'A β , et une voie "amyloïdogène" qui conduit à la production d'A β .

1.1. La voie non amyloïdogène

Cette voie est issue du clivage de l'APP par l' α -sécrétase. Il s'agit d'une métalloprotéase dont le site catalytique est situé sur la face externe de la membrane plasmique. A l'heure actuelle, plusieurs formes d' α -sécrétase ont été identifiées comme appartenant à la famille des désintégrines (ADAM : *α disintegrin and metalloprotease*) : ADAM9, ADAM10 et TACE/ADAM17. Ces protéines sont capables d'induire le clivage de l'APP notamment au niveau du site de coupe de l' α -sécrétase situé entre les acides aminés 16 et 17 de la séquence correspondant à la protéine A β (cf figure 5). Ce clivage de l'APP est réalisé au niveau du réseau trans-golgien ou au niveau de la membrane plasmique. Cette coupure étant faite au sein de la région comportant la protéine A β , elle en abolit ainsi la production. Elle conduit à la libération de sAPP α dans l'espace extracellulaire et laisse enchâssé dans la membrane le fragment C-terminal appelé "p10" et constitué de 10 acides aminés. Ce fragment est également clivé par une autre sécrétase, la γ -sécrétase, qui génère ainsi deux fragments, P7 et P3, composés respectivement de 7 et 3 acides aminés (le

⁴ KPI pour *Kunitz-like Protease Inhibitor* : il s'agit d'une séquence de 56 acides aminés analogue aux inhibiteurs de protéase.

fragment p7 est également appelé ACID pour *APP Intracellular Domain*). La conséquence de cette voie non amyloïdogène est la production de sAPP α et l'exclusion de la production d'A β . Cette voie est donc considérée comme plutôt bénéfique, d'autant plus que les sAPP α ont des effets neurotrophiques, neuroprotecteurs et promnésiants (Meziane et coll., 1998 ; Dodart et coll., 2000 ; Bour et coll., 2004 ; Ring et coll., 2007).

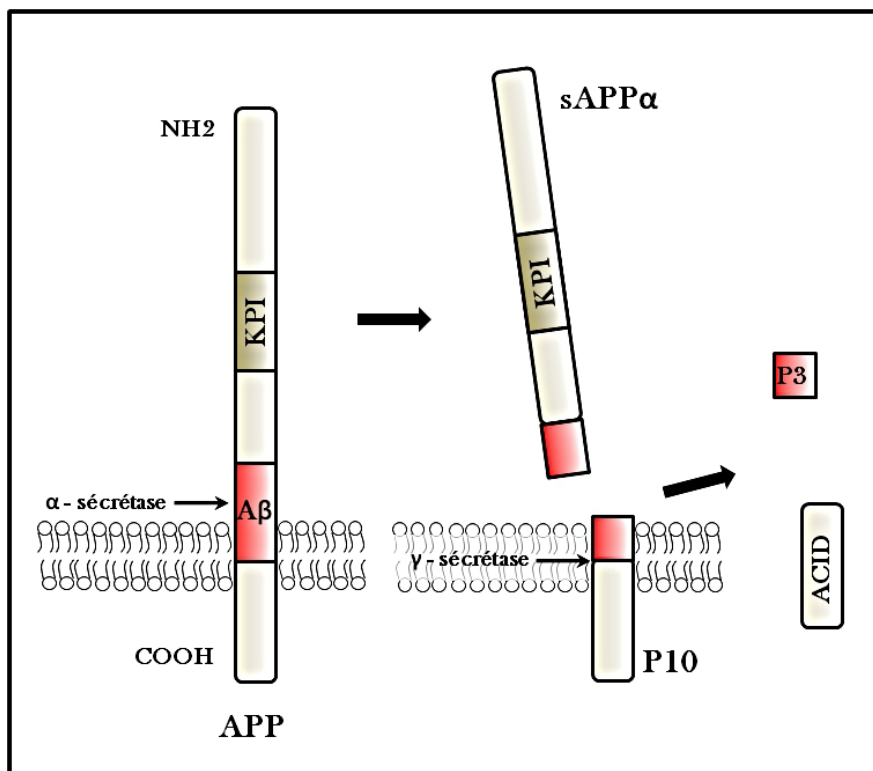


Figure 5 : Représentation schématique de la voie non amyloïdogène.

1.2. La voie amyloïdogène

La deuxième voie de clivage de l'APP est la voie amyloïdogène (*cf* figure 6). Au cours de ce processus, l'APP subit deux clivages successifs issus de l'action de deux sécrétases, la β -sécrétase et la γ -sécrétase, au niveau du réseau trans-golgien de la membrane plasmique et au niveau du réticulum endoplasmique. Il existe deux types de β -sécrétase appelés BACE1 et BACE2 (β -site APP Cleaving Enzyme). Cependant, BACE1 est la seule β -sécrétase porteuse de l'activité enzymatique capable de couper l'APP au niveau du site β , en position 1 et 11 (Vassar et coll., 1999). Il n'a pas été remarqué de mutation impliquée dans la MA au niveau de BACE1 (Liu et coll., 2003). Cependant, une augmentation de l'activité de la β -sécrétase a

pu être décelée au niveau cérébral dans des cas de MA sporadiques (Tyler et coll., 2002 ; Holsinger et coll., 2002). Ainsi l'activité β -sécrétase clive l'APP au niveau de l'extrémité N-terminale, induisant la libération d'une autre forme sécrétée de l'APP : le sAPP β . La protéine A β est issue du clivage du fragment C-terminal, laissé enchâssé dans la membrane plasmique, par la γ -sécrétase. Ainsi, cette voie conduit à la production de la protéine A β , du sAPP β et du fragment C-terminal ACID.

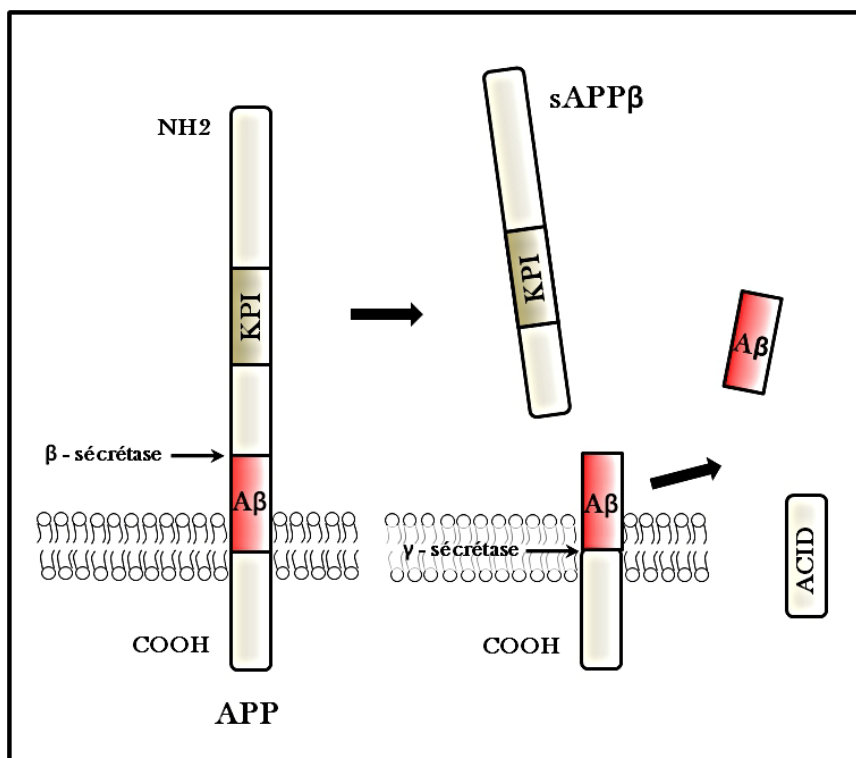


Figure 6 : Représentation schématique de la voie amyloïdogène.

2. Les mutations des gènes des présénilines

Les mutations du gène APP ne sont pas les seules à induire une MA de type familiale. L'étude de ces mutations a entraîné la découverte de deux protéines transmembranaires situées au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi : la préséniline 1 (PS1) et la préséniline 2 (PS2).

La PS1 est codée par un gène situé sur le bras long du chromosome 14 (Price et coll., 1998). Cette protéine est associée au complexe de la γ -sécrétase, qui intervient dans le clivage de l'APP et notamment dans la production de protéines A β . La PS2 est codée par un gène situé

sur le chromosome 1 mais n'interviendrait que marginalement dans la production de l'A β (Sherrington et coll., 1995). De multiples mutations de ces gènes, à l'origine de plus de 60% des formes familiales de la MA, ont ainsi été découvertes (cf figure 7). Des études réalisées *in vitro* et *in vivo* montrent que la combinaison des mutations de PS1 et du gène de l'APP induirait une surproduction d'A β et favoriserait ainsi l'accumulation de dépôts d'A β dans le cerveau (Borchelt et coll., 1996 ; Citron et coll., 1997). De plus, les observations faites à partir de croisements de souris transgéniques PS1 exprimant une mutation du gène de la PS1 combinées à des souris transgéniques Tg2576 exprimant une APP humaine mutée, font état d'une augmentation de la production d'A β 1-42 et d'une accélération des dépôts amyloïdes dès l'âge de 3 mois contre 9-12 mois pour des souris Tg2576 (McGowan et coll., 1999 ; Wengenack et coll., 2000).

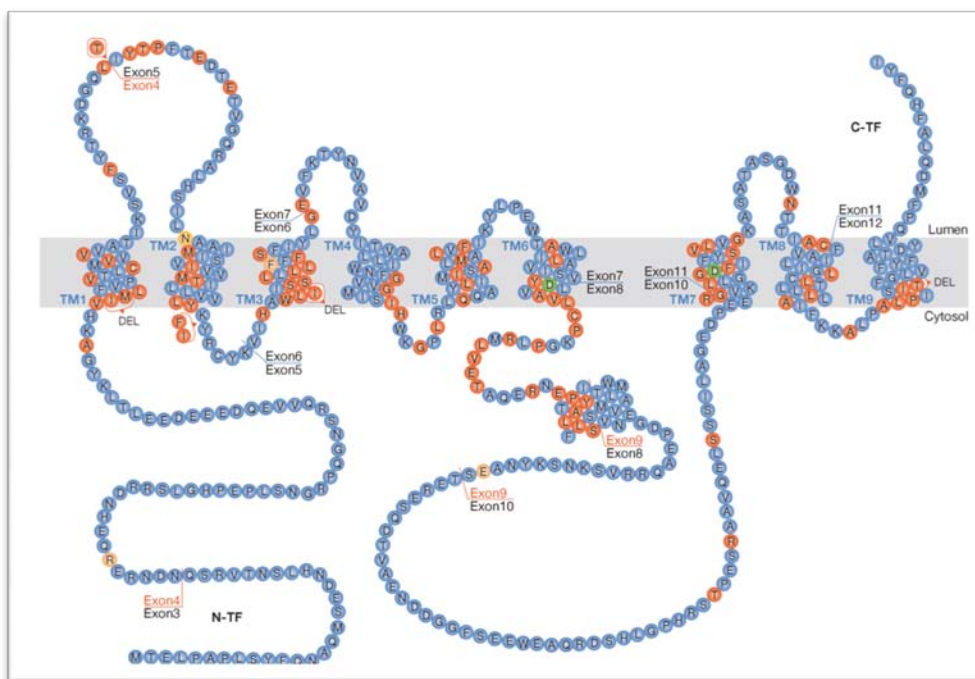


Figure 7 : Représentation schématique de la structure générale de toutes les présénilines présentant la composition en acides aminés et les sites de mutations (en rouge) dans le cas de certaines MA familiales (Hardy et coll., 2007).

3. Le gène de l'apolipoprotéine E4

A l'heure actuelle, il est clairement établi que l'allèle ϵ 4 du gène de l'ApoE représente un facteur de risque important dans le développement de la forme sporadique de la MA

(Corder et coll., 1993 ; Strittmatter et coll., 1993a). L'association entre l'allèle $\epsilon 4$ et la MA a été confirmée par de nombreuses recherches sur différentes populations humaines (Kuusisto et coll., 1994 ; Mayeux et coll., 1993 ; Poirier et coll., 1993 ; Ueki et coll., 1993). Comparée à des individus ne possédant pas l'allèle $\epsilon 4$, l'augmentation du risque de développer la MA est 2 à 3 fois supérieure chez des personnes qui possèdent uniquement un allèle $\epsilon 4$ et 12 fois supérieure chez des personnes homozygotes pour l'allèle $\epsilon 4$ (d'après *the AlzGene database* ; Bertram et coll., 2007 ; Roses et coll., 1997). L'homozygotie pour $\epsilon 4$ résulterait en un fort risque de développer de la MA passé l'âge de 80 ans (Corder et coll., 1993). Cependant, toutes les personnes porteuses de l'allèle $\epsilon 4$ ne développent pas forcément la maladie, c'est pourquoi l'allèle $\epsilon 4$ est considéré comme un facteur de risque et non comme la cause de la MA.

3.1. Caractéristiques de l'ApoE

L'ApoE appartient à la famille des apolipoprotéines. L'ApoE humaine est une glycoprotéine composée de 299 acides aminés et "pesant" environ 34 kD. Elle est fortement présente dans le foie et le cerveau. Au niveau cérébral, l'ApoE est produite principalement par les astrocytes et une partie de la microglie (Naidu et coll., 2002 ; Grehan et coll., 2001). Les neurones peuvent également produire de l'ApoE, mais en quantité inférieure par rapport aux astrocytes (Xu et coll., 1999 ; Xu et coll., 2006). L'ApoE joue un rôle important dans le transport des lipides au niveau sanguin et dans l'homéostasie du cholestérol. Elle se lie aux lipides au niveau d'une région spécifique située entre les résidus 244 et 272 de la partie C-terminale. Cette association entre l'ApoE et les lipides permet la formation de particules lipoprotéiques (*ApoE-Lipoprotein particles*). Ces lipoprotéines sont de taille et de densité différentes dans le plasma sanguin : il existe des lipoprotéines de très faible, faible, intermédiaire et forte densité (respectivement VLDL, LDL, IDL et HDL pour *very low, low, intermediate et high density lipoproteins*). Elles sont de forme sphérique et contiennent un cœur lipidique composé de cholestérol estérifié (Pitas et coll., 1987 ; LaDu et coll., 1998). Dans le cerveau, l'ApoE et deux autres apolipoprotéines, ApoJ et ApoA-1, sont majoritairement présentes sur des HDL (Fagan et coll., 1999). Cependant, l'apolipoprotéine prédominante des HDL dans le système nerveux central (SNC) reste l'ApoE.

Chez l'Homme, le gène de l'ApoE est situé sur le chromosome 19. Le gène de l'ApoE existe sous trois principaux allèles ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$), ce qui engendre six génotypes différents ($\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$ et $\epsilon 4/\epsilon 4$). Les trois allèles codent pour trois isoformes protéiques, ApoE2, ApoE3 et ApoE4, qui diffèrent les unes des autres par leurs acides aminés en position 112 et 158 (Mahley et coll., 2006). L'ApoE3 contient une Cystéine en position 112 et une Arginine en position 158, alors que l'ApoE4 contient une arginine sur les deux positions, et que l'ApoE2 contient une Cystéine aux deux positions. Un seul acide aminé différent est suffisant pour modifier la structure de la protéine et influencer son association avec les lipides et leurs récepteurs (Hatters et coll., 2006). Pour exemple, l'ApoE3 et l'ApoE4 se lient au récepteur aux LDL (LDL-R) avec une affinité 50 fois plus grande que l'ApoE2. Il en résulte que l'ApoE2 transporterait les lipides moins efficacement et que sa présence serait parfois associée à une hyperlipoprotéïnémie de type III. Au contraire l'ApoE4, de par la présence d'une arginine en position 112, aurait une conformation privilégiée pour les particules lipoprotéiques larges et de très faible densité (VLDL) et ne serait donc pas associée à un risque cardiovasculaire (Weisgraber et Mahley, 1996).

Chez la Souris, l'ApoE n'a pas de variante génétique. L'ApoE murine diffère de l'ApoE4 humaine par la présence d'une thréonine à la place d'une arginine en position 61. De par cette variante en position 61, les effets physiologiques de l'ApoE murine pourraient se rapprocher de ceux de l'ApoE3 humaine (Weisgraber et Mahley, 1996), malgré la présence de deux arginines en position 112 et 158, comme sur l'ApoE4 humaine (Rajavashisth et coll., 1985). Contrairement à l'ApoE humaine, l'ApoE murine ne s'exprime que dans les cellules gliales, principalement astrocytaires.

3.2. Le rôle de l'ApoE dans le système nerveux central

3.2.1. Les récepteurs de l'ApoE

Dans le SNC, l'ApoE se lie à des récepteurs appartenant à la superfamille des LDL-R. Cette famille de récepteurs est impliquée dans l'homéostasie du cholestérol. Elle comprend les récepteurs aux LDL, les récepteurs aux VLDL (VLDL-R), les récepteurs 2 de l'ApoE (APOER2), les récepteurs aux protéines des LDL-R (renommés à l'heure actuelle LRP pour

LDL-R related protein), et les récepteurs à la mégaline. L'ensemble de ces LDL-R est présent dans le cerveau, mais en concentration différente. On retrouve en forte concentration les récepteurs LRP et APOER2, présents principalement dans les neurones, et en faible concentration les LDL-R, présents sur les astrocytes. Globalement, l'ensemble des LDL-R est impliqué lors du développement cérébral, dans la différenciation des neurones, mais également dans les phénomènes de plasticité et dans la redistribution des lipides lors de processus de régénération après atteinte neuronale.

3.2.2. L'ApoE et l'A β dans la MA

Des études expliquent l'implication de l'ApoE dans la MA de par son interaction avec la protéine A β (Naslund et coll., 1995). L'ApoE, plus particulièrement l'ApoE4, favoriserait la pathologie amyloïde dans la MA. En effet, il est constaté chez l'Homme que l'ApoE se trouve en forte quantité au niveau des plaques séniles. De plus, des travaux de Tiraboschi et collaborateurs (2004) montrent que les niveaux d'ApoE4 semblent être associés avec une augmentation du nombre de plaques neuritiques chez les patients atteints de MA (Tiraboschi et coll., 2004). Une autre étude plus récente montre, chez des patients exempts de troubles cognitifs, que l'ApoE4 augmenterait la charge cérébrale de la forme fibrillaire de manière dose-dépendante (Reiman et coll., 2009). Il semblerait donc que l'ApoE4 accélère l'apparition de dépôts amyloïdes tout en favorisant son agrégation fibrillaire.

3.2.2.1. L'ApoE4 dans l'accumulation d'A β

Dans le but de clarifier l'implication de l'ApoE dans la maladie et d'en étudier son rôle avec l'A β , des études réalisées *in vitro* ont cherché à caractériser les relations entre les différentes isoformes de l'ApoE et l'A β , notamment en étudiant leurs capacités respectives pour lier l'A β et, par conséquent, influencer les processus d'agrégation de l'A β *in vitro*.

Initialement, il a été montré que l'ApoE forme un complexe stable avec l'A β et que l'ApoE4 serait capable de lier plus rapidement l'A β que ne le fait l'ApoE3 (Sanan et coll., 1994 ; Strittmatter et coll., 1993b). Cependant, un bon nombre d'études rapporte que ce lien entre l'ApoE et l'A β est beaucoup plus stable lorsqu'il s'agit de l'ApoE2 et de l'ApoE3, en

comparaison avec l'ApoE4 (Aleshkov et coll., 1997 ; LaDu et coll., 1994 ; Yang et coll., 1997). De manière très étonnante, il est rapporté que l'efficacité du complexe formé entre l'ApoE et l'A β suit cet ordre : ApoE2 > ApoE3 > ApoE4 (Tokuda et coll., 2000). La force du lien entre les différentes isoformes de l'ApoE et l'A β serait donc corrélée de manière inverse au risque de développer la MA.

Après avoir montré la différence pour chaque isoforme spécifique concernant l'interaction entre l'ApoE et l'A β , les effets des différentes isoformes de l'ApoE sur l'agrégation de l'A β ont été étudiés intensément *in vitro*. Une étude démontre notamment que les 3 isoformes de l'ApoE favorisent la fibrillation de l'A β 42, mais celle-ci serait plus importante avec l'ApoE4 qu'avec l'ApoE3 et l'ApoE2 (Ma et coll., 1994). D'autres études montrent que l'ApoE4 serait plus à même d'augmenter l'agrégation de la forme moins toxique d'A β 40 que l'ApoE3 (Castano et coll., 1995 ; Wisniewski et coll., 1994). L'ensemble de ces résultats irait donc dans le même sens de ce qui est observé chez l'Homme, c'est-à-dire une augmentation du nombre de plaques amyloïdes chez les sujets porteurs de l'allèle ϵ 4 (Tiraboschi et coll., 2004).

Bien que les études *in vitro* portant sur la relation entre l'ApoE et l'A β aient été très informatives, l'environnement cérébral *in vivo* qui comporte l'ApoE et l'A β se trouve très différent de celui trouvé dans les préparations artificielles des expériences réalisées *in vitro*. C'est pourquoi des modèles de souris transgéniques ont été développés pour l'étude de l'interaction entre l'ApoE et l'A β de façon plus intégrée.

Les études initiales réalisées sur des souris transgéniques APP développant de l'A β , comme les souris PDAPP et Tg2576, démontrent que le manque l'ApoE murine résulte en une diminution significative des dépôts amyloïdes, avec une perte presque complète des plaques amyloïdes et des neurites dystrophiques (Bales et coll., 1997 ; Holzman et coll., 1999, 2000). De plus, chez les souris transgéniques PDAPP dépourvues d'ApoE murine, le pattern anatomique des dépôts amyloïdes est complètement différent de ce qui est observé chez des souris PDAPP classiques (Fagan et coll., 2002 ; Irizarry et coll., 2000). Ces résultats mettent en évidence que l'ApoE murine jouerait un rôle aussi bien dans l'étendue que dans la distribution des dépôts amyloïdes (Raber et coll., 1998 ; Sun et coll., 1998 ; Xu et coll., 1996).

A la suite de ces études initiales réalisées avec des souris ApoE-KO, plusieurs lignées de souris transgéniques ont été générées pour étudier le rôle des différentes isoformes de l'ApoE humaine. L'expression des transgènes des différentes isoformes de l'ApoE humaine chez des souris PDAPP résulte en un retard d'apparition des dépôts $A\beta$ en comparaison avec des souris PDAPP exprimant l'ApoE murine ou non (Fagan et coll., 2002 ; Holzman et coll., 1999, 2000). De manière très intéressante, ces souris transgéniques exprimant l'ApoE humaine montrent une augmentation des dépôts d' $A\beta$ dans l'hippocampe, et de manière différente pour chaque isoforme. En effet, les souris exprimant l'ApoE4 humaine ont une augmentation des niveaux d' $A\beta$ et de plaques thioflavine-S-positives plus importante que les souris exprimant l'ApoE3 humaine (Fagan et coll., 2002 ; Holzman et coll., 2000). D'autres études utilisant des souris transgéniques qui possèdent les différents transgènes humains de l'ApoE montrent la même différence isoforme spécifique (E4>E3) en ce qui concerne l'augmentation des dépôts d' $A\beta$ (Buttini et coll., 2002 ; Dolev et Michaelson, 2004).

Bien que les modèles de souris transgéniques aient été très utiles pour étudier le rôle des différentes isoformes humaines de l'ApoE dans la MA, ce n'est que la création des modèles de souris ApoE *Knock-in* (ApoE-TR)⁵ exprimant l'ApoE sous contrôle des éléments de régulation endogènes murins qui a permis l'étude de l'implication des différentes isoformes dans des conditions physiologiquement adaptées (Hamanaka et coll., 2000 ; Sullivan et coll., 1997, 1998). Lorsque des souris ApoE3-TR et ApoE4-TR ont été croisées avec des souris Tg2576, il a été observé un retard dans l'apparition des dépôts d' $A\beta$ en comparaison avec des souris qui possèdent uniquement l'ApoE murine, et avec les souris Tg2576/ApoE4 possédant plus de dépôts amyloïdes que les souris Tg2576/ApoE3 (Fryer et coll., 2005). Récemment, le croisement de souris PDAPP avec des souris ApoE2-TR, ApoE3-TR et ApoE4-TR, a permis de confirmer un effet isoforme dépendant (E4>E3>E2) sur l'accumulation d' $A\beta$ (Bales et coll., 2009). Ainsi, l'ensemble de ces résultats observés dans l'étude de modèles transgéniques relate une réelle implication de l'ApoE dans le processus amyloïdogénique.

D'un point de vue plus mécanistique, une hypothèse a pu voir le jour récemment concernant le mécanisme par lequel l'ApoE influencerait l'accumulation d' $A\beta$ depuis le clonage, par Herz et ses collaborateurs (1990), d'une protéine endogène contenant un précurseur homologue au LDLR : la protéine LRP1.

⁵ ApoE-TR : TR pour *target replacement*.

En effet, il se trouve que cette protéine constitue un récepteur pouvant lier plus de 30 ligands dont l'ApoE. Elle est fortement exprimée dans le foie et dans le cerveau. On la retrouve aussi bien sur les astrocytes que sur les neurones. En temps normal, la protéine LRP1 intervient dans les processus d'endocytose, dont le but est de transporter des ligands de la surface de la cellule au compartiment intracellulaire. Or, les études montrent que cette protéine LRP1, une fois activée par l'un ou l'autre de ses ligands (ApoE), peut interagir avec l'APP et moduler le processus amyloïdogénique. En effet, la protéine LRP1 est capable de lier l'APP soluble qui contient ou non le domaine KPI (Kounnas et coll., 1995 ; Kinoshita et coll., 2001) et permet l'endocytose de l'APP. En conséquence, l'association entre l'APP et LRP1 accélère le transport de l'APP endocyté et, de ce fait, favorise le processus menant à la production d'A β (Ulery et coll., 2000). Car il est à noter que la β -sécrétase BACE1 est présente de manière abondante dans les endosomes acides (Cole et coll., 2007). L'accumulation d'APP dans les endosomes favorise ainsi le risque de synthèse d'A β intracellulaire. L'ApoE peut donc réguler les niveaux d'A β *via* un mécanisme qui dépend des fonctions de LRP1.

Il faut noter que cette régulation de l'A β est ApoE isoforme spécifique. En effet, il a été montré, que l'ApoE4, en comparaison avec l'ApoE3, est susceptible d'augmenter de manière plus importante les niveaux de production de l'A β dans des cellules neuronales qui surexpriment l'APP (Ye et coll., 2005). Sur le même principe d'action, d'autres récepteurs de l'ApoE, à savoir les récepteurs LRP1B et APOER2, sont également impliqués dans ces processus menant à la production et à l'accumulation d'A β .

Ainsi, l'ensemble de ces résultats obtenus par des études réalisées *in vitro* ou *in vivo* permet de mettre en exergue un rôle important des différentes isoformes de l'ApoE, et notamment de l'ApoE4, dans la production, l'agrégation et l'accumulation des dépôts A β au niveau cérébral.

3.2.2.2. L'ApoE4 et la clairance de l'A β

De par les observations faites sur l'affinité de l'ApoE pour l'A β , il a également été proposé que l'ApoE jouerait un rôle dans la clairance de l'A β . Par exemple, une étude *in vitro* de Russo et collaborateurs (1998) montre que l'A β liée à l'ApoE est plus facilement dégradée que l'A β libre. De plus, les études *in vitro* ont été confirmées par plusieurs autres réalisées *in*

vivo chez la Souris. De manière très intéressante, il a été montré chez de jeunes souris PDAPP (avant les dépôts d'A β) que le manque d'ApoE provoque une augmentation du niveau d'A β soluble (Dodart et coll., 2002 ; Fagan et coll., 2002). L'ApoE jouerait donc un rôle préventif pour les dépôts amyloïdes par des processus de clairance de l'A β .

Au niveau cérébral, la clairance est réalisée par deux voies principales, *via* les cellules du parenchyme cérébral (microglie, astrocytes et neurones) ou à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE). Sur ces deux acteurs, cellules du parenchyme ou BHE, on retrouve les récepteurs LRP1, LRP1B et APOER2. Ainsi, en interagissant avec ses récepteurs, l'ApoE aurait un rôle dans la facilitation de la clairance de A β (Jiang et coll., 2008 ; Koistinaho et coll., 2004 ; Zlokovic et coll., 2008).

Il semblerait que ce processus de clairance soit dépendant du type d'isoforme de l'ApoE. En effet, une étude récente réalisée chez la Souris montre que la clairance sanguine des lipides au niveau de la BHE *via* l'ApoE4 est significativement inférieure et plus lente par rapport à celle induite par l'ApoE3 et l'ApoE2 (Deane et coll., 2008). De plus, comme nous l'avons vu ci-dessus, le lien entre l'ApoE4 et l'A β est beaucoup moins stable que pour l'ApoE3, et encore moins que pour l'ApoE2. Par voie de conséquence, le complexe ApoE4-A β et donc l'A β est moins susceptible de pouvoir être évacué.

Ainsi, l'ApoE4 jouerait un rôle délétère dans la MA en favorisant, d'une part, la production de l'A β *via* l'action de ses récepteurs LRP1, LRP1B et APOER2 et, d'autre part, en limitant sa dégradation notamment par son incapacité à favoriser une bonne clairance de la protéine A β . Elle confirme ainsi son rôle de facteur de risque non négligeable de la MA.

3.2.3. L'ApoE après neurodégénérescence : rôle dans les phénomènes de plasticité

Aussi bien au niveau périphérique qu'au niveau central, il est observé que les niveaux d'ApoE sont augmentés à la suite d'une atteinte neuronale (Schauwecker et coll., 1998 ; Poirier et coll., 1991). En effet, l'ApoE interviendrait dans la réparation du système nerveux en redistribuant les lipides et cholestérols nécessaires à la réparation des membranes cellulaires.

Après neurodégénérescence, l'ApoE serait impliquée dans certaines formes de plasticité synaptique (Slezak et Pfrieger, 2003). En effet, des études *in vitro* ont montré que l'ApoE3 peut favoriser la croissance neuritique, contrairement à l'ApoE4 (Nathan et coll., 2002 ; Teter et coll., 1999).

En agissant sur l'organisation et la stabilité des microtubules, l'ApoE4 réduit la possibilité de croissance neuritique (Nathan et coll., 1995). En effet, les études réalisées *in vivo* sur des souris porteuses du gène de l'ApoE humaine vont dans ce sens. Chez des souris transgéniques⁶ ApoE4 et ApoE3, White et collaborateurs (2001) ont montré que l'ApoE4 altère spécifiquement la synaptogénèse et le bourgeonnement collatéral observé en temps normal suite à une lésion du CE. Une étude de Blain et collaborateurs (2006), réalisée sur une autre variété de souris *knock-in*⁷ pour $\epsilon 4$ et $\epsilon 3$ (ApoE4-TR et ApoE3-TR respectivement), montre également que les souris exprimant l'ApoE4 ont un mécanisme de compensation cérébral altéré après lésion du CE. Cette dernière est donc néfaste pour les processus de plasticité cérébrale.

4. Les facteurs de risque environnementaux

4.1. Age

L'âge est le facteur de risque le plus important pour la MA. Plusieurs études montrent que la prévalence augmente de manière importante passé un certain âge. Avant 60 ans, le risque de démence est quasiment inexistant. Ce n'est qu'après cet âge que la prévalence⁸ augmente sensiblement. En effet, elle doublerait tous les 5 ans entre 60 et 90 ans (*cf* figure 8). A partir de 85 ans, le risque de développer une MA augmente très fortement.

⁶ Il est important de noter que ces souris sont issues d'une construction génétique réalisée par Xu et coll., 1996. Il s'agit de souris ayant reçu l'intégralité de la séquence du gène humain et également le promoteur humain (ApoE-TR : TR pour *target replacement*). En d'autres termes, l'expression de l'ApoE se fera sous contrôle du promoteur humain, et sera donc exprimée dans les mêmes cellules que chez l'Homme.

⁷ Dans cette étude, les souris transgéniques utilisées sont des souris construites par Sullivan et collaborateur (1997), dont le gène de l'ApoE humaine vient remplacer la séquence codante de l'ApoE murine mais sans le promoteur humain. C'est-à-dire que la production d'ApoE sera sous contrôle du promoteur murin.

⁸ La prévalence correspond au nombre de cas évalués dans une année.

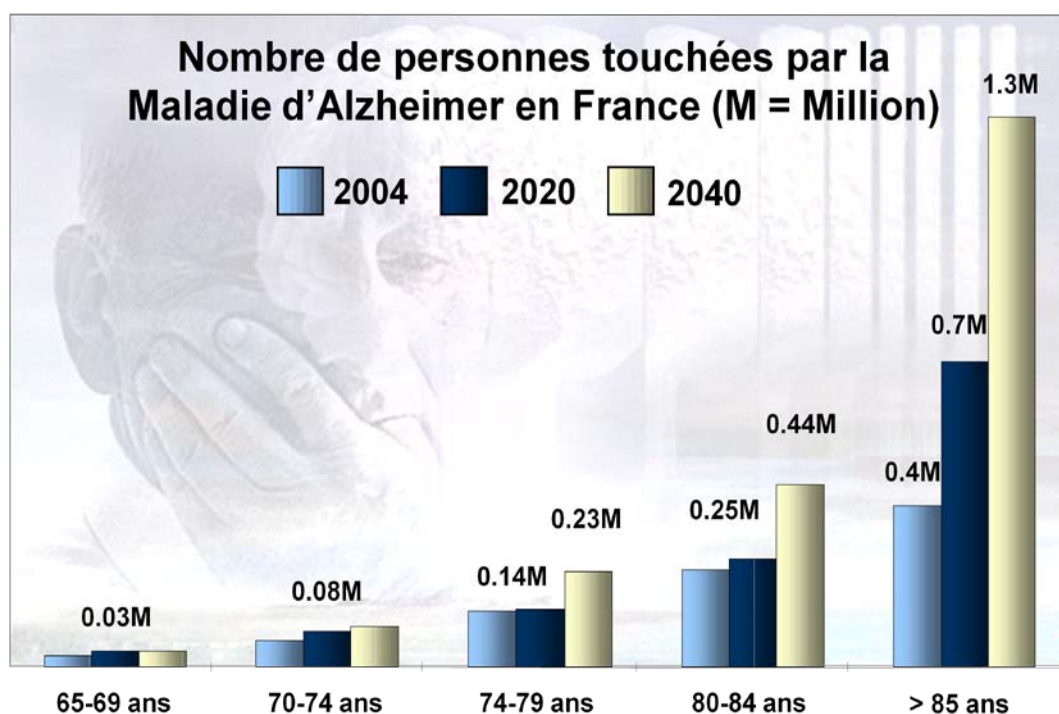


Figure 8 : Estimation du nombre de personnes touchées en France par la MA selon une étude PAQUID 2003 et une étude de l'INSEE 2003.

4.2. Niveau d'éducation et stimulation cognitive

Le faible niveau d'éducation semble constituer un autre facteur de risque pour la MA. Il faut néanmoins noter qu'établir un lien clair entre le niveau d'éducation et le risque de développer la MA est relativement difficile, car le niveau d'éducation englobe d'autres sous-facteurs pouvant être liés au risque de développer la maladie, comme les capacités cognitives, le statut socio-économique ou la qualité de vie des personnes. Cependant, il est relativement bien établi que le lien entre le niveau d'éducation et la MA s'explique par le maintien d'une "réserve cognitive" qui permettrait de compenser l'arrivée des premiers symptômes cognitifs liés à la maladie. Il est souvent noté que des troubles des fonctions cognitives apparaissent plus rapidement après l'arrêt d'une activité professionnelle. De ce fait, un faible niveau d'éducation est souvent associé à une faible réserve cognitive et donc à plus de risques de développer la maladie. C'est pourquoi une des voies de traitements non pharmacologiques utilisées par les neuropsychologues est basée sur des outils de stimulation cognitive pour maintenir cette réserve cognitive et retarder l'apparition des symptômes.

4.3. Le genre

Le genre serait un facteur de risque non négligeable. Vraisemblablement, les femmes ont plus de risques de développer la maladie que les hommes (Katzman et coll., 1994 ; Lautenschlager et coll., 1996). L'étude PAQUID, réalisée en France en 2003, a montré que, chez les sujets de 75 ans et plus, la prévalence est globalement estimée à 13,2% pour les hommes et 20,5% pour les femmes. Une autre étude réalisée par Letenneur et collaborateurs en 1999 montre que l'incidence⁹ de la MA est plus forte pour les femmes que pour les hommes, indépendamment du niveau d'éducation.

Cette différence face à la maladie entre les femmes et les hommes pourrait être due à une différence au niveau hormonal. Avec l'âge et l'arrivée de la ménopause, les femmes ont une baisse du niveau d'œstrogènes. Or des études montrent que la mise place d'une stratégie de restauration du niveau des œstrogènes après la ménopause est associée à une diminution du risque de développer la MA (Paganini-Hill et coll., 1996 ; Henderson et coll., 1997 ; Kawas et coll., 1997).

4.4. Traumatismes crâniens

La répétition de traumatismes crâniens ayant entraîné une perte de conscience ou une hospitalisation au cours de la vie d'une personne est associée à l'augmentation du risque de développer la MA (Katzman et coll., 1994). C'est, par exemple, le cas des boxeurs, qui subissent de multiples traumatismes crâniens au cours de leur carrière.

4.5. Risques cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires ont également été associées à une augmentation du risque de déclencher une pathologie Alzheimer (Katzman et coll., 1994). Snowdon et collaborateurs (1997) montrent que l'athérosclérose vasculaire et les ischémies cérébrales peuvent être impliquées dans la physiopathologie de la maladie. Il est d'ailleurs à noter que

⁹ L'incidence correspond au nombre de nouveaux cas de maladie décelés dans une année.

les traitements visant la diminution de l'hypertension artérielle semblent réduire l'incidence de la MA (Forette et coll., 1998).

CHAPITRE 2

MALADIE D'ALZHEIMER ET MEMOIRE

CHAPITRE 2

MALADIE D'ALZHEIMER ET MEMOIRE

La mémoire peut être définie comme l'ensemble des processus mentaux qui permettent d'acquérir, de stocker et de restituer une information. Le processus de mémorisation est un processus complexe qui nécessite plusieurs étapes : l'encodage (acquisition et transformation d'une information en représentation mentale), la consolidation (modifications structurelles et fonctionnelles des réseaux neuronaux permettant le maintien de cette représentation mentale en mémoire), puis le rappel (restitution de l'information).

La mémoire n'est en rien un processus statique, isolé ou une fonction cérébrale unique. C'est pourquoi il est plus approprié de parler de "systèmes de mémoires". En effet, ces systèmes sont régis par des réseaux de neurones qui diffèrent de par leur localisation, leur anatomie et leur fonction, permettant ainsi le traitement spécifique d'un type d'informations (Tulving, 1972). Les systèmes de mémoires peuvent être subdivisés et classés en fonction du contenu des informations qu'ils véhiculent : déclaratives (pour des informations explicites et verbalisables) et non-déclaratives (pour des informations implicites ; Squire et coll., 1992), ou bien selon la durée de la représentation mentale (mémoire à court terme vs mémoire à long terme).

La mémoire déclarative fait référence aux souvenirs conscients d'expériences ou de faits pouvant être décrits verbalement. Cette forme de mémoire est connue comme dépendant de l'hippocampe. La mémoire déclarative peut être subdivisée en deux sous-catégories : la mémoire sémantique et la mémoire épisodique (Tulving, 1972). La mémoire sémantique fait appel aux connaissances des concepts généraux, des règles apprises, des faits non reliés à un contexte spatio-temporel spécifique ; tandis que la mémoire épisodique représente des souvenirs conscients et détaillés d'expériences vécues replacées dans un contexte spatio-temporel donné. A l'opposé, la mémoire non-déclarative s'applique aux souvenirs

inconscients, comme les habitudes et les compétences, et elle n'engage pas l'hippocampe (Squire, 1982 ; Micheau et coll., 2004).

Comme nous l'avons vu dans le chapitre I, le diagnostic neuropsychologique de la MA montre une atteinte progressive de l'ensemble des formes de mémoire. Pour rappel, dans les débuts de la maladie, il est observé une atteinte de la mémoire épisodique et notamment des capacités d'orientation dans l'espace. Avec l'avancée de la maladie, la mémoire de travail, tout comme la mémoire sémantique, se dégrade fortement. L'état amnésique s'aggrave au point que la mémoire procédurale, jusqu'alors intacte, se trouve finalement altérée à un stade très avancé. Du point de vue expérimental, l'étude de l'ensemble de ces mémoires touchées dans la MA fait l'objet de nombreuses recherches réalisées aussi bien chez l'Homme (notamment chez des patients Alzheimer) que chez le Rongeur. Dans ce travail de thèse, nous n'avons pas évalué l'ensemble des mémoires affectées dans la maladie, c'est pourquoi je ne ferai état, dans ce chapitre II, que des formes de mémoire que nous avons étudiées expérimentalement chez nos souris : la mémoire spatiale, qui intègre les capacités d'orientation, et la mémoire de reconnaissance.

I. La mémoire spatiale

En pratique, la MA est bien souvent caractérisée par la présence de déficits de mémoire qui nécessite un rapport verbalisé, tel que la mémoire épisodique par exemple. Chez le Rongeur, la mémoire ne peut évidemment pas être évaluée sous forme verbalisée, ce qui complique sérieusement la possibilité d'étude de la mémoire épisodique observée dans les modèles animaux de la pathologie. En revanche, les troubles de mémoire spatiale ne nécessitent pas nécessairement une verbalisation dans leur évaluation. Cette forme de mémoire est donc la plus facile à évaluer chez l'animal. C'est pourquoi, au cours de cette thèse, nous nous sommes focalisés principalement sur la mémoire spatiale, notamment dans des tâches d'orientation dans l'espace.

1. Définition

La mémoire spatiale fait référence au traitement et à la mémorisation d'informations relatives à l'environnement d'un individu lui permettant de s'y orienter. Elle est définie comme une fonction cérébrale responsable de l'encodage, du stockage et de la reconnaissance d'informations spatiales relatives à un arrangement d'indices ou de routes spécifiques (Kessels, 2001).

2. La théorie de la carte cognitive et des cellules de lieu

Tolman, en 1948, observe que les animaux arrivent à réaliser une tâche spatiale en associant des stimuli externes à leur propre réponse comportementale. Il suggère que les animaux sont capables d'utiliser des indices leur permettant de résoudre une tâche dans un labyrinthe après une période d'entraînement. Ces observations l'amènent à proposer une théorie selon laquelle les animaux seraient capables de se forger une représentation globale de l'environnement, qu'il nommera "la carte cognitive". Cette carte cognitive est une représentation interne de l'environnement du sujet organisée à partir d'indices spatiaux présents dans l'environnement. Elle permet ainsi aux animaux de s'orienter, de "naviguer" et d'optimiser facilement l'adaptation à un environnement familier ou nouveau. Les théories de Tolman ont amené O'Keefe et Nadel (1978) à en fonder une autre, basée sur l'utilisation de "cartes" et de "routes". Ils distinguent ainsi deux stratégies importantes sous-tendues par deux systèmes de navigation spatiale impliqués différemment en fonction du type et de la nature des informations traitées.

Premièrement, ils distinguent un système de "routes" (*taxon system*), également nommé stratégie "égocentrique". Cette stratégie est indépendante des indices spatiaux et nécessite l'utilisation d'informations relatives à l'espace corporel du sujet. En effet, l'animal se déplace en se fondant sur l'orientation de son corps (sensations proprioceptives, informations kinesthésiques). Dans cette stratégie, l'individu lui-même est le point central et la position des objets présents dans l'environnement est définie par rapport à la position du sujet dans l'espace (O'Keefe et Nadel, 1978). Cette stratégie reste efficace à partir du moment où le trajet demandé dans la tâche spatiale est toujours identique et ne nécessite pas la mise en place de détours. Une fois établie, elle n'est pas sensible aux interférences. Elle engendre

une certaine rigidité comportementale et des représentations spatiales relativement peu flexibles. Des structures non-hippocampiques seraient impliquées dans la gestion des informations issues de cette "stratégie égocentrique".

Dans un second temps, les auteurs distinguent un système de "cartes" également appelé stratégie "allocentrique". Cette stratégie, qui dépend des indices spatiaux, nécessite l'utilisation d'informations relatives à l'espace extra-personnel, au-delà du corps, et implique l'utilisation de relations spatiales entre les indices composant l'environnement pour se forger une "carte", c'est-à-dire une représentation spatiale permettant de s'orienter (O'Keefe et Nadel, 1978). Le sujet mémorise l'emplacement d'une cible en fonction de la position d'indices de référence présents dans son environnement. Contrairement à la stratégie égocentrique, cette représentation est caractérisée par une grande flexibilité comportementale. En effet, plusieurs trajets (détours, raccourcis) peuvent être utilisés pour parvenir à un même but. L'hippocampe serait la structure clé dans l'utilisation de cette stratégie allocentrique.

En 1971, O'Keefe et Dotrovsky découvrent dans l'hippocampe une variété de cellules qui ont la propriété de s'activer spécifiquement lorsque l'animal est à un endroit donné de son environnement : les cellules de lieu (*place cells*). Ces dernières sont situées dans les régions CA1 et CA3 de l'hippocampe dorsal et ventral. L'activité de ces cellules n'est pas fixe mais varie en fonction du déplacement de l'animal dans son environnement (Muller et coll., 1987). Par contre, le champ d'activité (espace dans lequel une cellule de lieu est activée) peut, lui, rester stable pendant des semaines, lorsque l'animal est placé dans un environnement spécifique (Muller et coll., 1987). Cependant, si l'on place l'animal dans un environnement distinct (nouveau ou modifié), l'activité des cellules se réadapte en variant d'intensité, de forme ou de position, ou bien en interrompant leur activité. Ce procédé est appelé *remapping* (Wilson et McNaughton, 1993 ; Muller et Kubie, 1987). Ce phénomène adaptatif pourrait être à l'origine de la flexibilité comportementale observée et inhérente à l'utilisation d'une stratégie allocentrique. En effet, ces cellules de l'hippocampe présentent des propriétés électrophysiologiques leur permettant de jouer un rôle dans la formation de représentations allocentriques de l'espace.

Il est important de noter que l'activité des cellules de lieu dépend principalement des informations de nature visuelle. Cependant, en leur absence, d'autres informations sensorielles, comme les odeurs ou les informations vestibulaires et proprioceptives, permettent aux cellules de lieu d'établir ou de maintenir leur champ d'activité. Ces informations ont une telle importance pour ces cellules que des rats aveugles, n'ayant jamais perçu leur environnement au préalable, présentent un même pattern d'activité des cellules de lieu que des rats non-aveugles (Save et coll., 1998 ; Poucet et coll., 2003).

La découverte de ces cellules de lieu chez le Rat (O'Keefe et Dotrovsky, 1971) et chez l'Homme (Ekstrom et coll., 2003) pose une question importante sur le lien entre l'activité de ces cellules et la mémoire spatiale. De nombreux travaux se sont penchés sur la question, cherchant à caractériser le rôle précis des cellules de lieu dans les processus spatiaux (Poucet, 1993 ; Jung et McNaughton, 1993 ; Poucet et coll., 1994 ; Poucet et Benhamou, 1997). Plusieurs données expérimentales ont permis d'établir un lien fonctionnel entre l'activité des cellules de lieu et les performances de mémoire spatiale chez le Rongeur. En effet, plusieurs études montrent que l'altération des propriétés électrophysiologiques des cellules de lieu perturbe les performances des animaux dans des tâches spatiales, ce qui suggère que lorsque le champ d'activité des cellules de lieu se trouve en incohérence avec la localisation des indices spatiaux, la carte cognitive des rats s'en trouve altérée (Wiener et coll., 1989 ; Lenck-Santini et coll., 2001, 2002). L'ensemble de ces résultats suggère ainsi un rôle des cellules de lieu et, implicitement, de l'hippocampe dans la mémoire spatiale et l'établissement d'une carte cognitive. Cette carte facilite ainsi l'orientation dans un environnement familier et permet une adaptation rapide à une nouvelle situation.

Nous verrons par la suite que l'hippocampe n'est pas le seul acteur dans les processus de mémoire spatiale, le CE et les neurones cholinergiques de la base du cerveau antérieur (NCB) ayant également un rôle à jouer.

3. Outils d'évaluation de la mémoire spatiale chez l'Homme dans l'étude des déficits mnésiques de la MA

Les données obtenues chez l'Homme, le Primate et le Rongeur tendent à montrer que les processus de mémoire spatiale impliqués dans l'orientation et la navigation spatiale

présentent une forte ressemblance entre les espèces (Maguire et coll., 1999 ; Uttal, 2000). C'est pourquoi les tests utilisés pour évaluer la mémoire spatiale sont relativement similaires pour l'homme et l'animal, en particulier dans le cadre d'études sur la MA.

La majorité des techniques de diagnostic clinique des déficits de mémoire spatiale chez l'Homme est basé sur des tests verbaux. Néanmoins, plusieurs groupes de chercheurs ont développé des techniques inspirées de ce qui est réalisé chez le Rongeur. Basées sur l'utilisation d'un environnement virtuel, elles permettent d'étudier les capacités d'apprentissage et de mémoire spatiale chez l'Homme (Sandstrom et coll., 1998 ; Astur et coll., 1998). A l'heure actuelle, la technique la plus populaire en recherche expérimentale sur la mémoire spatiale chez l'Homme, et notamment sur la MA, est l'utilisation d'un environnement virtuel représentant une ville virtuelle (*cf* figure 9A ; Weniger et coll., 2011 ; Cushman et coll., 2008). Dans la tâche illustrée dans la figure 9B, les sujets doivent apprendre quelle route emprunter pour aller de leur lieu de travail à leur maison personnelle. Ayant le choix des trajectoires, ils peuvent s'aider des indices locaux (vue du sol) et globaux (carte) présents tout au long de leur parcours (Jheng et coll., 2009).

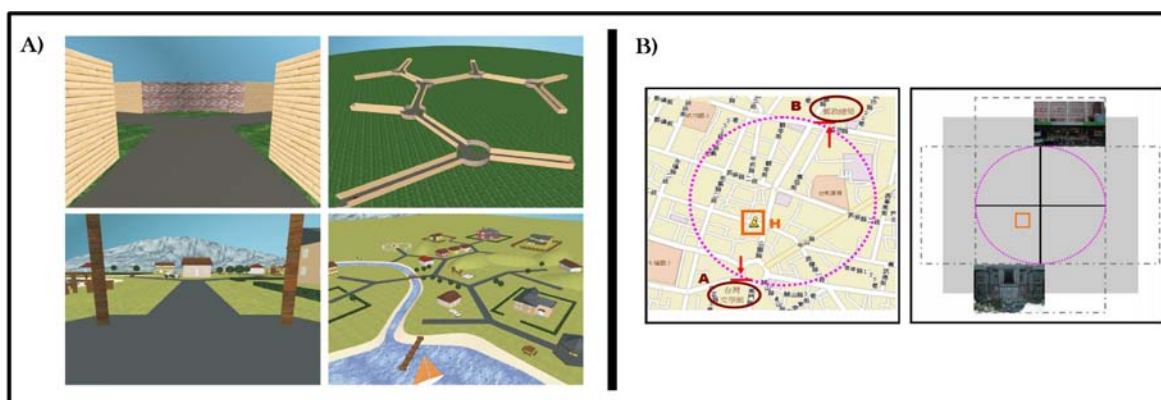


Figure 9 : Exemple de ville virtuelle utilisée en expérimentation chez l'Homme. A) ville utilisée par Weniger et coll., 2011, (B) ville utilisée par Jheng et coll., 2009.

D'autres études utilisent un bâtiment virtuel, comme le montrent les figures 10 et 11. Cette technique a pour avantage d'établir un bon parallèle entre la réalité et l'environnement virtuel (Cushman et coll., 2008). Cette technique de réalité virtuelle permet de s'affranchir de l'étape de verbalisation des réponses et permet ainsi d'évaluer la mémoire dans des tâches relativement similaires et comparables à celles qui sont utilisées avec les modèles

animaux de la MA (piscine de Morris, labyrinthe radial, etc.). En effet, beaucoup d'études montrent que les patients atteints de MA, aussi bien dans les premiers stades qu'à un stade avancé, présentent des déficits massifs d'orientation et de navigation dans ces tâches en environnements virtuels (Kessels et coll., 2005 ; Hort et coll., 2007 ; Kalova et coll., 2005 ; Cushman et coll., 2008 ; Zazkanis et coll., 2009). Ces études confirment que les symptômes de désorientation spatiale observés dans leur vie quotidienne sont liés à une perturbation de la mémoire spatiale.



Figure 10 : Exemple d'environnement réel (Cushman et coll., 2008).



Figure 11 : Exemple d'environnement virtuel (Cushman et coll., 2008).

4. Outils d'évaluation de la mémoire spatiale chez le Rongeur

Classiquement, les tests comportementaux utilisés pour évaluer les déficits de mémoire spatiale chez le Rongeur sont souvent basés sur des tâches de navigation. Dans cette thèse nous avons choisi d'utiliser deux tests pour évaluer la mémoire spatiale, à savoir la piscine de Morris et le labyrinthe de Barnes.

4.1. La piscine de Morris

La piscine de Morris (*cf* figure 12) est le test le plus couramment utilisé pour l'évaluation de la mémoire spatiale de référence¹⁰ chez le rongeur. Il a été développé par Richard G.M. Morris en 1981 dans le but d'évaluer le rôle spécifique des indices visuels d'un environnement dans l'apprentissage et la mémoire spatiale chez le Rat (Morris et coll., 1982). Pour l'animal, le but est de rejoindre une plate-forme immergée dans un bassin rempli d'eau opacifiée. L'environnement aquatique étant considéré comme un renforcement plutôt aversif, il motive l'animal pour y échapper par l'unique possibilité de sortie : trouver la plate-forme immergée.

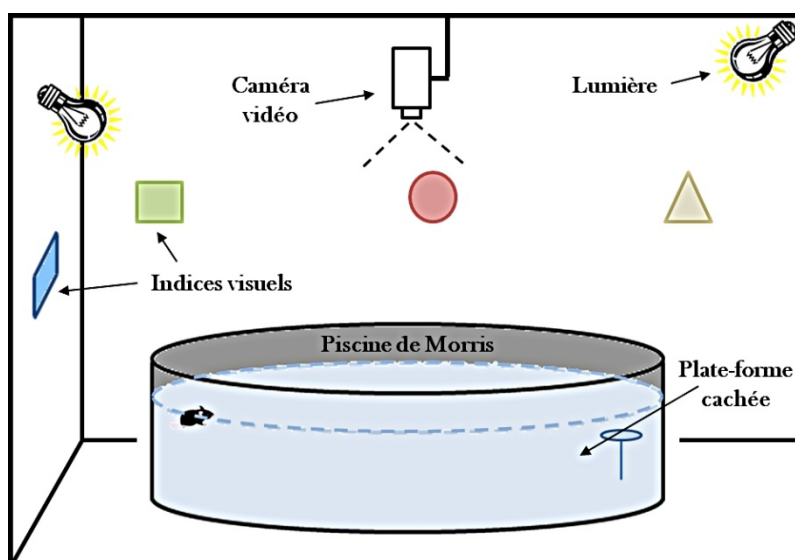


Figure 12 : Schéma du dispositif de la piscine de Morris.

Typiquement, le test de la piscine de Morris est considéré comme un test qui favorise l'exploration et stimule l'utilisation d'une stratégie dite "spatiale", basée sur l'utilisation d'indices visuels (stratégie allocentrique). Les indices visuels les plus utiles à la navigation sont essentiellement distaux, c'est-à-dire situés en dehors de la piscine elle-même. Celle-ci est classiquement uniforme et n'offre donc pas de repères proximaux, intra-labyrinthe, pertinents. La capacité à trouver la plate-forme est liée essentiellement aux capacités de

¹⁰ La mémoire de référence présente les caractéristiques d'une mémoire à long terme : elle concerne les règles et les procédures générales propres à une situation, de même que les informations dépendantes d'un contexte particulier. Chez l'animal lorsque le souvenir fait partie du système de mémoire à long terme, on parlera de mémoire de référence.

navigation spatiale de l'animal, ce qui suggère qu'au cours de ce test, la résolution de la tâche dépendra de son aptitude à construire une carte cognitive de son environnement à partir des indices (visuels) distaux (Baldi, 2005). Cependant, certaines études montrent qu'il est possible de développer des stratégies plus égocentriques pour résoudre la tâche, notamment lorsque les animaux sont surentraînés (Kealy et coll., 2008).

Dans ce test, il est possible d'évaluer différentes formes de mémoire spatiale en fonction du type de protocole utilisé. Pour un protocole de mémoire de référence, la plate-forme est positionnée au même endroit d'un essai à l'autre et d'un jour à l'autre, et seuls les points de lâcher de l'animal varient. Lors d'un essai, l'animal est placé dans l'eau et lâché face à la paroi. Il nage jusqu'à trouver la plate-forme, après quoi il y est laissé quelques secondes. Cette situation favorise l'exploration et l'utilisation de repères distaux lors du trajet ou du moment que passe l'animal sur la plate-forme. Ainsi, jour après jour, une diminution marquée de la latence pour rejoindre la plate-forme traduit, normalement, un bon apprentissage spatial. A la fin de la période d'apprentissage, un test de rétention est réalisé dans le but d'évaluer la mémoire spatiale. La plate-forme alors est retirée et on laisse l'animal nager pendant un temps donné (classiquement 1 à 2 min). S'il a bien intégré la relation entre les indices (distaux) présents dans son environnement et la position de la plate-forme, il nagera préférentiellement à l'endroit où celle-ci se trouvait précédemment.

Ce test est également utilisé pour évaluer d'autres formes de mémoire, comme la mémoire de travail. Dans ce type de protocole, la position de la plate-forme est fixe lors d'une séance journalière, mais varie d'un jour à l'autre, de manière à ce que chaque nouvel emplacement soit retenu chaque jour lors de la séance.

Ce test se trouve être un bon outil pour tester la mémoire spatiale et la mémoire de travail chez les Rongeurs et pour évaluer les déficits cognitifs dans des modèles de la MA.

4.2. Le labyrinthe de Barnes

Le test du labyrinthe de Barnes (*cf* figure 13) a été créé en 1979 par Carol A. Barnes dans le but d'évaluer l'apprentissage et la mémoire spatiale chez le Rat (Barnes et coll.,

1979). Dans ce test, l'animal est placé sur une vaste plate-forme circulaire percée de trous en périphérie.

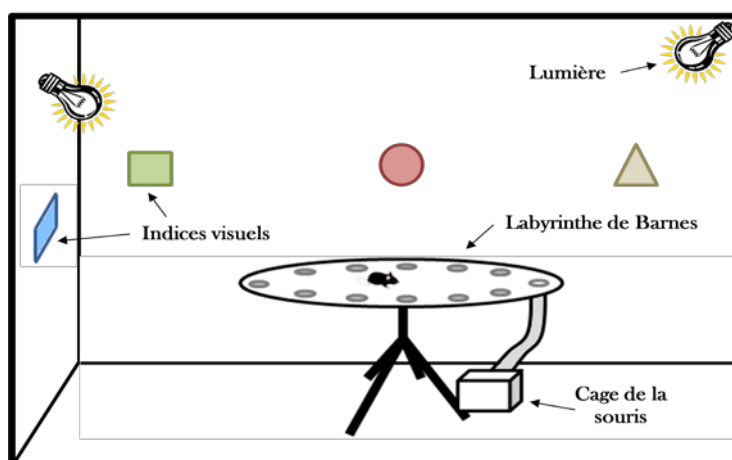


Figure 13 : Schéma du dispositif du labyrinthe de Barnes utilisé au laboratoire pour les souris.

Le principe de la tâche consiste à trouver la position du trou menant à un refuge (boîte ou cage de l'animal placées sous la surface du labyrinthe). En effet, ce test est basé sur la tendance naturelle des rongeurs à trouver un refuge pour éviter un environnement à découvert et inconnu, voire désagréable. Dans ce dispositif, le côté aversif est moindre par rapport à la piscine de Morris mais reste toujours présent par la mise en place d'une lumière intense ou d'autres stimuli (ventilateur, bruit fort), motivant l'animal à se réfugier dans sa cage. Tout comme dans la tâche de la piscine de Morris, les animaux sont censés se forger une représentation allocentrique à partir des indices distaux situés dans la pièce et leur permettant de retrouver la localisation du refuge.

A l'instar du test de la piscine de Morris, la mémoire spatiale est généralement évaluée avec un protocole de mémoire de référence. Dans celui-ci, l'apprentissage se fait classiquement sur plusieurs jours, au rythme d'un à trois essais par jour. La localisation du trou menant à la cage de l'animal est fixe essai après essai et jour après jour. A la fin de la période d'apprentissage, l'animal est soumis à un test de rétention au cours duquel le trou relié à la cage de l'animal est obturé. Si l'animal a établi une relation entre les indices présents dans son environnement et la position du trou le menant à sa cage (stratégie allocentrique), il visitera préférentiellement celui-ci.

Ce test est très bien adapté aux souris et aux rats de par leur tendance à se cacher dans des anfractuosités (petits trous) de leur environnement (Barnes et coll., 1990 ; Paganelli et coll., 2004).

Ethologiquement parlant, le labyrinthe de Barnes apparaît également comme un test adapté aux rongeurs et particulièrement à la Souris contrairement aux environnements aquatiques, tels que la piscine de Morris. En effet, il est observé que la Souris présente des performances amoindries dans des protocoles de mémoire spatiale en milieu aquatique, en comparaison avec le Rat, alors qu'elles réalisent aussi bien ces protocoles dans des tests "secs" (Whishaw et Tomies, 1996). Cette différence s'expliquerait, non pas en termes de capacités cognitives différentes, mais plutôt en termes de difficulté dans la réalisation de la tâche. En effet, selon Schenk (1987), les souris seraient incapables d'établir des routes directes pour réaliser une tâche en piscine de Morris de par l'utilisation instinctive de stratégies d'évitement des prédateurs. Du fait de leurs observations, Whishaw et Tomies (1996) proposent une autre hypothèse selon laquelle les souris, contrairement aux rats, ne sont pas de bonnes nageuses en raison de difficultés plutôt d'ordre moteur. Garder la tête hors de l'eau demanderait un effort trop important à la souris, entraînant une mauvaise orientation spatiale lors de la nage et, de ce fait, une moins bonne visualisation des indices distaux. Ainsi, le labyrinthe de Barnes apparaît comme un test moins stressant et plus adapté aux souris. De plus, il semblerait que les souris C57BL/6J (que nous utilisons dans ce travail) y soient très performantes (Koopmans et coll., 2003). Ainsi, le labyrinthe de Barnes constitue un bon outil pour modéliser et évaluer les déficits de mémoire dans des modèles de pathologies de la mémoire comme la MA (Pompl et coll., 1999).

II. La mémoire de reconnaissance

La mémoire de reconnaissance est une des formes de mémoire touchées par la MA et pouvant être assimilée à un trouble de l'agnosie.

1. Définition

La mémoire de reconnaissance peut être définie comme la capacité à discriminer, reconnaître une personne ou un objet rencontrés au préalable. Ce processus mnésique permet aussi bien la détection d'un nouvel objet, basée sur un traitement de ses caractéristiques propres (reconnaissance d'objets), que la détection d'un déplacement de l'objet (reconnaissance spatiale). La mémoire de reconnaissance peut donc être subdivisée en trois processus bien distincts, à partir des zones cérébrales impliquées et des processus mis en jeu (Brown et Aggleton, 2001).

Globalement, plusieurs structures cérébrales, faisant partie du lobe temporal médian, sont impliquées dans la mémoire de reconnaissance. Il est classiquement établi que le cortex périrhinal et d'autres structures associées (l'hippocampe, le cortex para-hippocampique ou postrhinal chez le Rongeur, et le CE) joueraient un rôle important dans les processus de mémoire de reconnaissance, particulièrement dans le traitement des caractéristiques propres des objets et de leur localisation (Yonelinas, 2002 ; Aggleton et Brown, 1999).

Pour le traitement de la mémoire de reconnaissance, plusieurs théories sont évoquées dans la littérature. Eichenbaum et collaborateurs (2007) proposent que deux voies bien distinctes seraient impliquées (*cf* figure 14). Une première voie est appelée *visual object-analyser pathway* autrement dit la "voie d'analyse visuelle des objets". Elle relie la majorité des projections néocorticales venant des aires associatives au cortex périrhinal, qui, lui-même, projette sur la partie latérale du CE. L'ensemble de cette voie coderait les informations de type sensoriel à partir d'un traitement bien précis, par exemple celui des caractéristiques propres à un objet. Autrement dit, cette voie serait impliquée dans le traitement du "quoi". La deuxième voie relie d'autres projections venant du néocortex mais *via* le cortex parahippocampique qui, lui-même, est relié à la partie médiane du CE. Cette seconde voie traiterait plutôt des informations de nature spatiale "où" (*where stream*). Par la suite,

l'ensemble de ces deux voies converge ensemble vers l'hippocampe (CA1 et CA3) qui ferait le lien entre les deux types d'information. Il associerait la caractéristique du "quoi" et du "où", permettant à l'individu d'associer la nature d'un objet avec son emplacement dans un environnement donné.

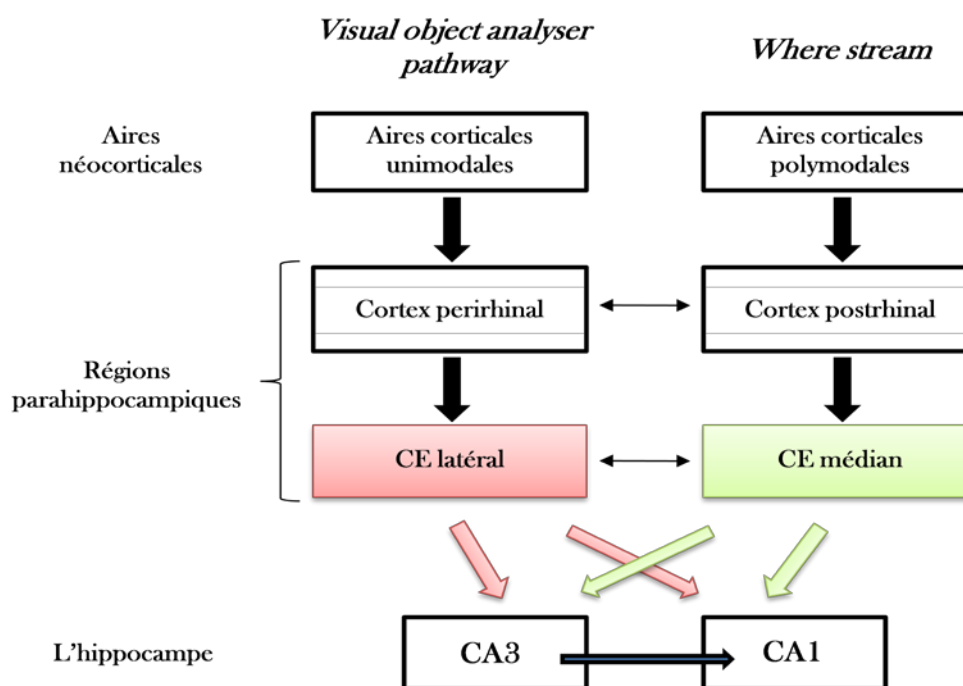


Figure 14 : Représentation schématique des connexions anatomiques entre les régions du néocortex, les régions parahippocampales et l'hippocampe dans la mémoire de reconnaissance selon Eichenbaum et coll., 2008.

Une autre théorie est proposée par Brown et Aggleton (2001) selon laquelle les systèmes centrés sur le cortex périrhinal sont essentiels pour la discrimination d'objets et pour la mémoire de reconnaissance d'objets. Le cortex périrhinal serait spécifiquement impliqué dans les processus d'acquisition et de consolidation nécessaires à la reconnaissance des objets (pour revue Brown et coll, 2010). Les systèmes impliquant l'hippocampe seraient, quant à eux, essentiels pour les associations d'objets et la création d'une relation spatiale entre eux. En interaction avec le cortex périrhinal, le cortex préfrontal médian semble également être impliqué dans les mécanismes qui sous-tendent la mémoire de reconnaissance des objets (Kessner et Ragozzino, 2003 ; Barker et coll., 2007 ; Barker et Warburton, 2009).

2. Notions de familiarité

Depuis quelques années, une nouvelle distinction est faite au sein des processus impliqués dans la mémoire de reconnaissance. Deux phénomènes sont considérés comme pouvant contribuer à la reconnaissance d'expériences passées : l'identification et la familiarité (Yonelinas et coll., 2002 ; Mandler et coll., 1978).

Reconnaître une personne ou un objet peut refléter un sentiment de familiarité. Par exemple, il arrive que l'on rencontre une personne dans la rue qui nous semble familière mais qu'il nous est difficile de replacer dans un contexte particulier. Si l'on croit la reconnaître, il est souvent difficile de se souvenir où et quand on l'a rencontrée, ou simplement pourquoi nous la "reconnaissons". Ce n'est qu'à partir du moment où elle nous rappelle un moment de la précédente rencontre que l'on se souvient de son nom, de l'endroit où nous l'avons rencontrée et des conditions de cette rencontre. Ces processus d'identification font appel à la mémoire épisodique, voire sémantique.

Cet exemple fait bien la distinction entre deux composantes, à savoir "le sentiment de familiarité", qui est considéré comme les connaissances relatives à un élément présenté au préalable, et "l'identification" précise d'éléments appris, replacés éventuellement dans un contexte spatio-temporel. Ces deux processus sont considérés comme bien séparés, mais intervenant dans la mémoire de reconnaissance (Yonelinas et coll., 2002). Ils seraient soutenus par des réseaux de structures différents. Par exemple, l'hippocampe serait plutôt impliqué dans un traitement du souvenir, notamment dans le traitement d'une composante plus épisodique, alors que le cortex périrhinal serait impliqué dans un traitement de la familiarité. Cependant, cette distinction ne fait pas encore l'unanimité chez les chercheurs et des travaux sont en cours pour déterminer les composantes du réseau des structures impliquées dans la "familiarité" et "l'identification".

CHAPITRE 3

CONSIDERATIONS NEUROANATOMIQUES ET FONCTIONNELLES

CHAPITRE 3

CONSIDERATIONS NEUROANATOMIQUES ET FONCTIONNELLES

I. Le cortex entorhinal

1. Neuroanatomie et neurotransmission du CE

1.1. Localisation

Le CE (Aire de Brodman 28) est nommé ainsi en raison de la scissure rhinale qui l'entoure partiellement. Cette caractéristique est particulièrement frappante chez le Primate, tout comme chez le Rongeur. Chez eux comme chez l'Humain, le CE fait partie intégrante de la zone cérébrale appelée lobe temporal médian. Ce dernier contient tout un groupe de structures interconnectées comprenant l'hippocampe (gyrus denté ; CA3-CA1 ; subiculum), l'amygdale, le cortex périrhinal, le cortex parahippocampique et le CE.

Chez le Rongeur, le CE est entouré par de nombreuses structures corticales. La position générale du CE est présentée sur la figure 15. Au niveau rostral, il est bordé médialement par le cortex amygdaloïde (cortex périamygdaloïde et le noyau cortical postérieur de l'amygdale), latéralement par le cortex piriforme, et latéro-caudalement par le cortex périrhinal. Au niveau médian, le CE est en contact avec les structures de la formation hippocampique et d'autres structures de la région parahippocampique, comme le parasubiculum et le champ transitionnel amygdalo-hippocampique. Le CE s'étend jusqu'à l'extrémité caudale, où il forme l'arrondi ventro-postérieur des hémisphères cérébraux et se retrouve bordé dorsalement par le cortex postrhinal.

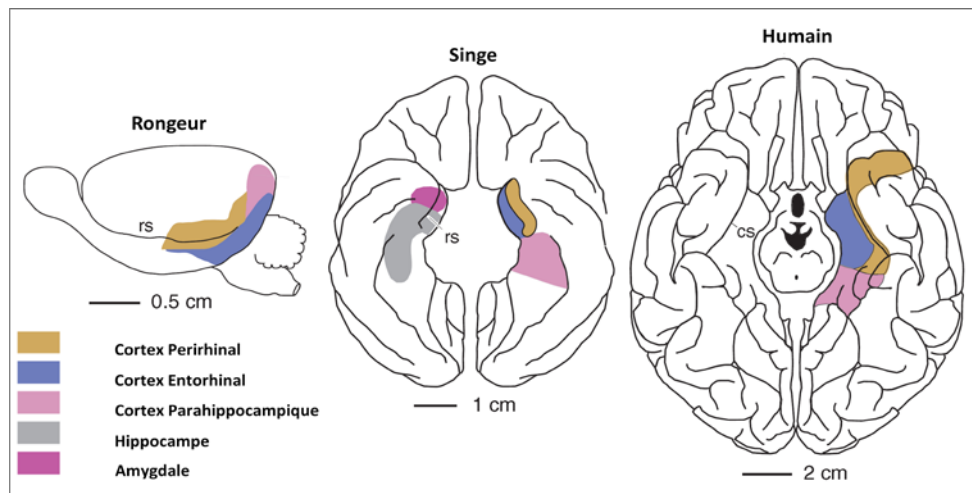


Figure 15 : Représentation de la surface latérale de cerveau de rat (à gauche), de la surface ventrale d'un cerveau de singe (au centre) et d'un cerveau humain (à droite). Cette représentation permet de localiser les différentes structures du lobe temporal (Murray et coll., 2007).

Chez l'Homme, le CE a été subdivisé par Brodman (1909) en deux parties sur la base de critères cytoarchitectoniques. Il distingue le CE latéral (CEL ; aire 28a) et le CE médian (CEM ; aire 28b). Comme le montre la figure 16, cette distinction est également appliquée au CE du Rongeur (Witter et coll., 2000 ; Van Groen, 2001).

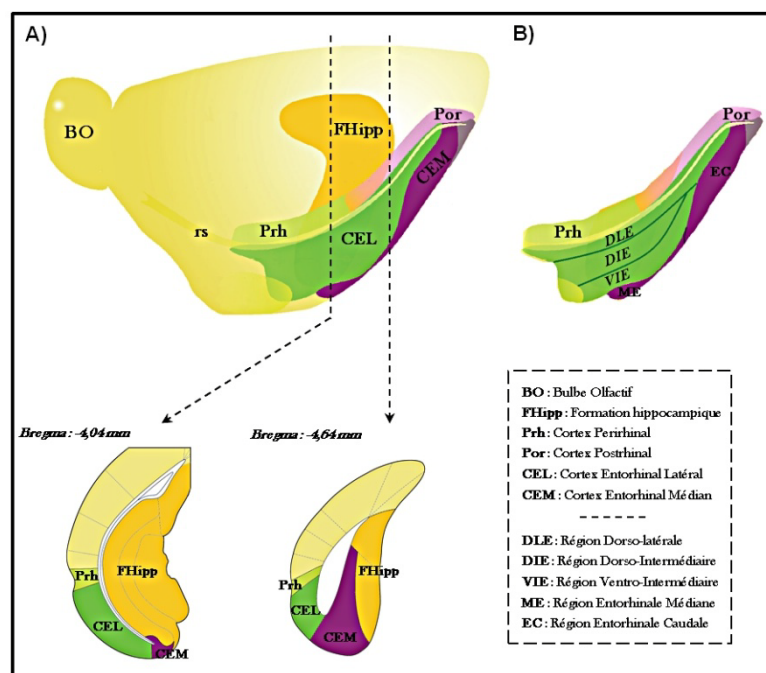


Figure 16 : Représentation schématique d'un cerveau de rongeur adapté de Witter et Moser, 2006. La figure A) représente une vue postérolatérale d'un cerveau de rat, avec la formation hippocampique (dans cette figure, la

formation hippocampique regroupe le gyrus denté, CA1-CA3, le subiculum, le pré- et le parasubiculum) localisée sous la surface corticale. La surface corticale latérale et postérieure contient une indexation faible contenant la scissure rhinale (rs) située entre le CE et le cortex perirhinal (Prh) et le cortex postrhinal (Por). Dans cette indexation, le CE est subdivisé en deux parties, le cortex entorhinal latéral (CEL) et le cortex entorhinal médian (CEM). La figure comporte également deux vues frontales, adaptées de Paxinos et Franklin (2004), permettant d'observer la position neuroanatomique du CE à deux niveaux d'antériorité par rapport à bregma. La figure B) représente les subdivisions du CEL et du CEM affinées par Insausti et collaborateurs (1997). Dans cette indexation, le CEL est subdivisé en trois régions : la région dorso-latérale (DLE), la région dorso-intermédiaire (DIE) et la région ventro-intermédiaire (VIE). Le CEM, quant à lui, est subdivisé en deux régions : la région entorhinale médiane (ME) et la région entorhinale caudale (EC).

Le CEL, comme indiqué dans la figure 16, constitue la partie rostromatérale du CE, et sa bordure dorso-caudale longe la scissure rhinale. Au niveau rostral, il est bordé dorsalement, sur toute son étendue rostro-caudale, par les cortex périrhinal et postrhinal. Quant au CEM, il constitue la partie caudomédiane du CE. Il est limité au niveau dorsolatéral par le cortex postrhinal et au niveau dorsomédian par le parasubiculum (Dolorfo et Amaral, 1998).

D'autres auteurs ont affiné la nomenclature anatomique du CE chez le Rat (Insausti et coll., 1997). Suivant cette classification, le CEL peut encore être subdivisé en trois régions : la région dorso-latérale (DLE), la région dorso-intermédiaire (DIE) et la région ventro-intermédiaire (VIE). Le CEM est également subdivisé en deux régions : la région entorhinale caudale (CE) et la région entorhinale médiane (ME).

1.2. Cytoarchitecture

Suivant les descriptions de Ramon y Cajal (1911), le CE est divisé en six couches, dont quatre sont des couches cellulaires et deux sont des couches plexiformes (Van Groen, 2001). La couche I est la couche moléculaire du CE. Superficielle, elle est riche en fibres nerveuses, mais ne contient que très peu de corps cellulaires de neurones. Les quelques neurones dispersés sont des cellules GABAergiques dites "étoilées" et "horizontales". La couche II est une couche composée principalement de cellules étoilées, de taille moyenne à grande, regroupées en amas (îlots de cellules). Elle contient également des cellules pyramidales multipolaires et horizontales, ainsi qu'une classe de cellules axo-axoniques. La

couche III a un aspect hétérogène et contient des cellules ayant des formes et des tailles variées. On y trouve principalement des cellules pyramidales, mais également d'autres types cellulaires, comme des cellules multipolaires, étoilées, fusiformes, horizontales et bipolaires. La couche IV est appelée *lamina dissecans* et, tout comme la couche I, elle contient un tout petit nombre de neurones. Cette *lamina dissecans* sépare les couches III et V et, de ce fait, permet de distinguer les couches superficielles (I-III) des couches profondes (V-VI). D'un point de vue des connexions, on distinguera, chez le Rongeur, les couches superficielles comme les couches d'entrées (projections vers le CE), alors que les couches profondes correspondent aux couches de sorties (Sewards et Swards, 2003 ; Witter et coll., 2000). La couche V est subdivisée en deux sous-couches. La première, couche Va, constitue une large bande de cellules pyramidales et contient également des cellules étoilées, horizontales et multipolaires. La deuxième, couche Vb, est constituée de neurones pyramidaux de plus petite taille que ceux de la couche Va et est organisée de manière irrégulière. Pour terminer, la couche VI est constituée d'une population de cellules très hétérogène en forme et en taille, et dont la densité diminue en fonction de la profondeur, c'est-à-dire lorsque l'on s'approche des limites de la substance blanche.

1.3. Connectivité du CE

De par sa localisation, le CE est la structure clé dans le traitement et la transmission des informations analysées par l'hippocampe. En effet, le CE est une structure charnière positionnée à l'interface du néocortex et de la formation hippocampique. Il est l'une des principales voies d'entrée et de sortie des informations de nature sensorielle provenant des aires corticales et sous-corticales. En ce qui concerne l'étude des projections chez la Souris, très peu d'études de la neuroanatomie du CE ont été réalisées chez celle-ci. Cependant, les projections étant relativement similaires entre Souris et Rat, cette partie distinguera, selon les études, si les projections (afférences ou efférences) sont observées chez le Rat ou chez la Souris.

1.3.1. Afférences

Chez le Rongeur, les différentes afférences ont été détectées grâce à des méthodes de traçage rétrograde qui consistent à injecter un traceur dans le CE. L'origine des voies de projections afférentes est ensuite signalée par la présence du traceur dans les structures corticales, sous-corticales, et hippocampiques (pour exemple : chez le Rat : Insausti et coll., 1997 ; Burwell et Amaral, 1998 ; chez la Souris : Van Groen et coll., 2003). Ainsi, par cette technique, il a pu être comptabilisé environ 80 structures corticales, sous-corticales et hippocampiques interconnectées avec le CE (Kerr et coll., 2007). Dans un premier temps, les principales afférences du CE proviennent des projections d'une grande variété de **régions corticales** (comptabilisées au nombre de 26). Globalement, dans la description des afférences du CE, ces 26 régions corticales sont réparties par contingents de fibres provenant de groupes de régions. En effet, le CE reçoit un grand nombre de projections originaires des structures olfactives (constituant un tiers environ des afférences corticales), des régions temporales (un quart environ des afférences), mais également de la région frontale, des régions cingulaires, insulaires, pariétales et occipitales (l'ensemble de toutes ces projections est détaillé dans la figure 17). Il est cependant à noter, qu'en règle générale, aussi bien chez le Primate que chez le Rat, les cortex périrhinal et parahippocampique (Primates)/postrhinal (Rongeurs) constituent les principales projections du CE.

Le CE reçoit également l'innervation de diverses **régions sous-corticales** (36 régions), parmi lesquelles on retrouve des noyaux composant la base du cerveau antérieur, comme le complexe du septum médian et de la bande diagonale de Broca (SM/BDB). Le CE reçoit les projections de ce complexe différemment au niveau du CEM et du CEL. En effet, la partie latérale du septum médian innerve de manière préférentielle le CEM (couches II, IV et V), alors que sa partie médiane innerve le CEL (couches II et III ; Gaykema et coll., 1990). Le CEL est également innervé par des projections provenant du bras horizontal et la partie caudale du bras vertical de la bande de Broca au niveau des couches I, III et IV). Le noyau *basalis magnocellularis* (Ch4 ; NBM), tout comme la substance innommée, semble également innerver le CE (Luiten et coll., 1987 ; Manns et coll., 2001). L'ensemble de ces projections est constitué essentiellement de projections cholinergiques, GABAergiques et glutamatergiques (Manns et coll., 2001).

D'autres structures sous-corticales innervent également le CE, parmi lesquelles on retrouve le complexe amygdalien, le thalamus (noyau réuniens et noyau *medialis centralis*), l'hypothalamus, puis des projections venant de l'aire tegmentale ventrale, le *locus caeruleus* et les noyaux du raphé.

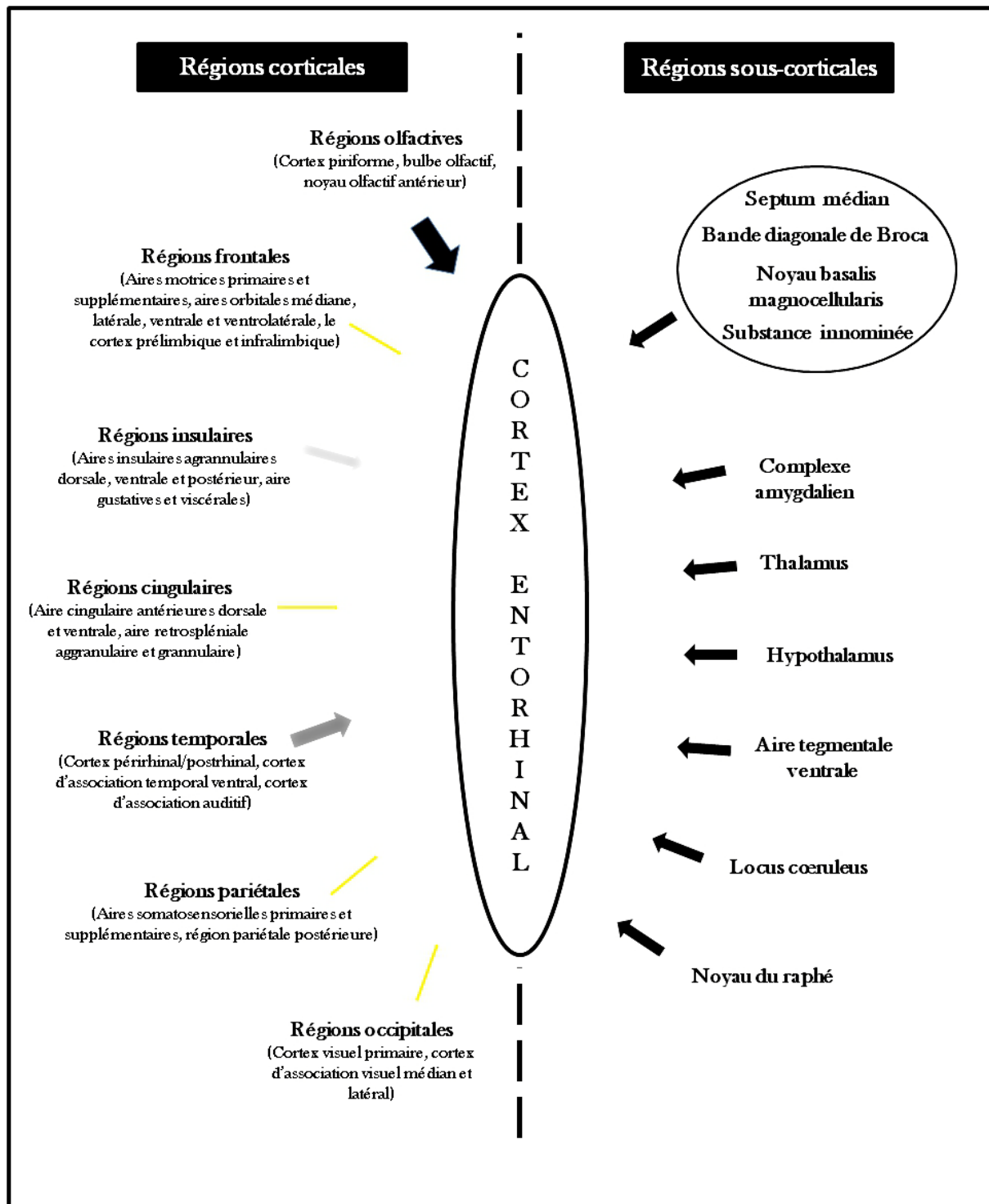


Figure 17 : Représentation schématique des principales afférences du CE.

1.3.2. Efférences

Contrairement aux voies afférentes, les voies efférentes sont étudiées à l'aide de techniques de traçage antérograde. Le traceur est également injecté dans le CE mais il se déplacera cette fois vers les structures recevant les projections du CE. Des études réalisées par traceur chez le Rat, notamment les travaux d'Insausti et collaborateurs (1997), montrent que toutes les subdivisions du CE envoient de nombreuses projections vers les **structures corticales**. Il est à noter que la plupart des efférences du CE sont réciproquement connectées aux structures afférentes. En effet, le CEM et le CEL projettent tous les deux sur des structures olfactives, comme le noyau olfactif antérieur et le cortex piriforme, des structures temporales, notamment les cortex postrhinal, temporal et périrhinal, des structures frontales, comme les cortex infralimbique, prélimbique, pédonculaire dorsal ou moteur, ainsi que des structures cingulaires, insulaires, pariétales et occipitales.

On retrouve également un groupe important de projections du CE vers des **structures sous-corticales**, telles que l'amygdale, la base du cerveau antérieur et le striatum. En effet, le CE innerve tous les noyaux amygdaliens (Pitkanen et coll., 2000). Il projette également sur le septum *via* les couches II et V, notamment le septum latéral. Quelques fibres atteignent le septum médian et le bras vertical de la bande diagonale de Broca. Pour terminer, le CE innerve la région striatale ventrale, notamment le noyau *accumbens* (Krayniak et coll., 1981).

Ainsi, comme nous l'avons vu, le CE est une structure interconnectée avec de nombreuses structures corticales ou sous-corticales (*cf* figure 18), ce qui favorise un rôle d'intégrateur d'informations avant leur transmission à l'hippocampe. En effet, le CE est très fortement interconnecté avec l'hippocampe grâce à la boucle entorhino-hippocampique. Comme nous le verrons plus tard, cette boucle joue vraisemblablement un rôle dans le traitement, la transmission et la mémorisation des informations corticales et sous-corticales nécessaires aux processus cognitifs.

1.3.3. Connexions hippocampo-entorhinales

Avant de présenter le lien anatomique entre le CE et l'hippocampe, il est nécessaire de développer succinctement l'anatomie de l'hippocampe.

L'hippocampe est une structure occupant une part importante du lobe temporal médian et à la formation hippocampique¹¹. Il possède une forme de double C imbriqué formant la corne d'Ammon, d'une part, et le gyrus denté, d'autre part. La corne d'Ammon est subdivisée en trois aires nommées champs ammoniques 1, 2 et 3 (CA1, CA2 et CA3). Chacune d'entre elles diffère des autres en fonction de la connectivité et de la taille des cellules présentes. La corne d'Ammon est composée de cinq couches différentes. La couche principale est la couche des neurones pyramidaux. Il s'agit de gros neurones excitateurs glutamatergiques dont les projections forment les collatérales de Schaffer. Elles traversent l'intégralité des champs ammoniques CA3, CA2 et CA1 pour rejoindre, au final, le subiculum. Ces neurones pyramidaux représentent 90% des neurones hippocampiques (Freund et Buzsaki, 1996). Le gyrus denté est également composé de trois couches cellulaires. La couche la plus externe est la couche moléculaire, elle contient très peu de neurones. La couche intermédiaire est la couche granulaire, composée principalement des corps cellulaires des cellules granulaires glutamatergiques dont les axones convergent vers le hile du gyrus denté. Enfin, la couche la plus interne est une couche polymorphique où se trouvent des neurones de grande taille. De par leurs connexions internes, les différentes aires de l'hippocampe sont reliées entre elles de manière sérielle en une "boucle trisynaptique". En effet, les cellules granulaires du gyrus denté, qui reçoivent des projections du CE *via* la voie perforante, projettent à leur tour leurs fibres moussues jusqu'aux cellules pyramidales de l'aire CA3. Ces cellules envoient leurs axones, les collatérales de Schaffer, vers les cellules pyramidales de l'aire CA1, qui, elles-mêmes, projettent vers le subiculum et le CE.

Le CE se trouve donc être dans une position charnière avec la boucle trisynaptique de la formation hippocampique dans la transmission et le traitement des informations.

¹¹ En utilisant la nomenclature décrite par Witter et Amaral (2004) ou Van Strien et coll., 2009, la formation hippocampique est composée de trois sous-régions : le gyrus denté, l'hippocampe à proprement parler (région CA1, CA2 et CA3) et le subiculum.

Appartenant à la région parahippocampique¹², il constitue également la principale voie d'entrée et de sortie des informations de la formation hippocampique.

Classiquement, dans la littérature, les principales études traitant des projections entre le CE et l'hippocampe ont été réalisées chez le Rat. A notre connaissance, il n'existe que très peu d'études relatives à l'organisation de ces projections chez la Souris. C'est pourquoi la description des connexions spécifiques aux Souris, qui seront évoquées dans cette partie et présentées dans la figure 18, est principalement issue du travail réalisé par Van Groen et collaborateurs en 2003.

La voie perforante, qui constitue la principale voie d'entrée des informations au niveau du gyrus denté, a été décrite pour la première fois par Ramón y Cajal (1901). Dans sa première description, il fait état d'un ensemble de fibres qui proviennent du CE et rejoignent le gyrus denté et d'autres régions de l'hippocampe. Cette voie provient des couches II et III du CE chez le Rongeur. Chez la Souris, les neurones de la couche II projettent exclusivement sur le gyrus denté et n'auraient pas de collatérales sur les autres parties de l'hippocampe, contrairement à ce qui est observé chez le Rat¹³. La majorité des neurones de la couche III projette sur l'aire CA1 et le subiculum, tandis qu'une petite quantité de fibres venant de la couche III et des couches profondes du CE projette sur l'aire CA3. L'ensemble de ces projections est essentiellement ipsilatéral, mais il existe également des projections contralatérales venant des neurones de la couche III sur les aires CA1 et CA3. Toutes ces connexions entre le CE et l'hippocampe sont organisées topographiquement. Il existe un premier niveau d'organisation au sein même de la voie perforante en fonction des subdivisions du CE. Le CEL est à l'origine de la partie latérale de la voie perforante, alors que le CEM constitue la partie médiane de la voie perforante. De plus, ces connexions sont aussi organisées topographiquement en fonction des régions innervées. Les neurones de la partie latérale du CEL et du CEM projettent sur la partie dorsale/septale de l'hippocampe, alors que

¹² Selon Van Strien et collaborateurs (2009) chez le rat, la région parahippocampique est composée de cinq sous-régions, à savoir le presubiculum, le parasubiculum, le CE (CEL et CEM), le cortex perirhinal et le cortex postrhinal.

¹³ Chez le Rat les neurones de la couche II projettent principalement sur le gyrus denté mais également sur l'aire CA3. De plus, un petit contingent de fibres projette directement sur le subiculum (Insausti et coll., 1997)

les projections entorhinales vers l'hippocampe ventral proviennent de la partie médiane du CEL et du CEM. Chez la Souris, les neurones du CEL projettent sur la partie septale du gyrus denté et ceux du CEM sur sa partie temporale. Au niveau des aires CA1-CA3, l'organisation des projections est identique. Les axones arrivant du CEL et du CEM établissent des contacts, respectivement aux niveaux septal et temporal de CA1-CA3.

En ce qui concerne les efférences de l'hippocampe vers le CE, elles constituent les principales voies de sortie des informations traitées par l'hippocampe. Elles sont issues de l'aire CA1 et du subiculum. Les fibres provenant du subiculum projettent massivement sur la *lamina dissecans* (couche IV) et en profondeur pour contacter les neurones de la couche V, tandis que les neurones de l'aire CA1 projettent directement en profondeur sur la couche V.

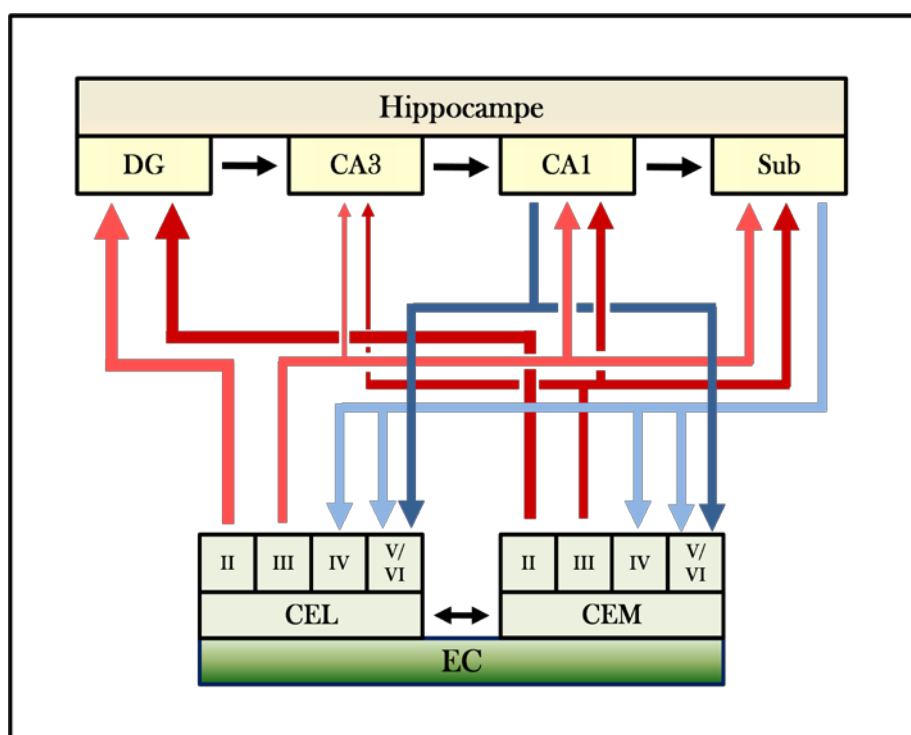


Figure 18 : Schéma modifié et adapté de Van Strien et collaborateurs (2009) concernant l'organisation des projections entorhino-hippocampiques.

En conclusion, la Souris montre une organisation des efférences du CE vers l'hippocampe relativement similaire à celle qui est observée dans les autres espèces comme le Rat, le Chat et le Primate. Cependant, quelques différences d'organisation apparaissent entre la Souris et le Rat : l'absence de projections controlatérales entre le CE et

l'hippocampe chez la Souris, ainsi que la différence de projections au niveau de CA3. Chez la Souris, les projections vers l'aire CA3 sont issues de la couche III, alors que, chez le Rat, elles sont issues de la couche II et III.

2. Le CE et la MA

La MA est une maladie neurodégénérative progressive, provoquant l'atteinte d'un ensemble important de structures cérébrales. Y sont observées une dilatation ventriculaire imposante ainsi qu'une atrophie corticale massive, associée à une perte de matière cérébrale et cellulaire importante qui touche particulièrement l'ensemble du lobe temporal médian dès les premiers temps de la maladie. En effet le volume du CE, tout comme celui de l'hippocampe, se trouve être particulièrement diminué dans les premiers stades de la MA (Gomez-Isla et coll., 1996 ; Stoub et coll., 2005 ; Braak et Braak, 1985).

Les premières études d'imagerie ou d'analyse histologique du tissu cérébral de patients touchés par la MA montrent plusieurs modifications au niveau du CE. Le premier signe majeur évoqué ci-dessus est une réduction importante de la taille du CE (Kiliany et coll., 2002 ; Du et coll., 2003 ; Teipel et coll., 2006). Une perturbation de la cytoarchitecture (pertes cellulaire et synaptique ; Terry et coll., 1991 ; Gomez-Isla et coll., 1996) et de la neurotransmission est également détectée. Braak et Braak, en 1996, ont caractérisé plusieurs stades d'évolution de la maladie (Stades I à VI) en corrélation avec l'apparition de ces perturbations. Dans les premiers stades de la pathologie, l'atteinte cérébrale est spécifique en fonction des couches cellulaires et des régions. En effet, dans les phases précoces de la MA, l'atteinte neuronale démarre au niveau des couches II et III avant d'atteindre les couches profondes V et VI. De plus, le CEL est touché avant le CEM (Braak et Braak, 1985). Il est également observé, parallèlement à la dégénérescence neuronale, l'apparition de DNF dans ces mêmes couches (Gomez-Isla et coll., 1996), tout comme la présence de plaques amyloïdes dès les premiers stades de la MA (Thal et coll., 2000).

L'ensemble de ces perturbations cellulaires est associé aux premiers déficits de mémoire épisodique observés dans la pathologie et chez des individus non déments ayant des déficits cognitifs légers (*mild cognitive impairment*, MCI), ces derniers ayant un grand risque de développer la MA (Van Hoesen et coll., 2000 ; Du et coll., 2003 ; Rodrigue et coll., 2004 ; Di

Paola et coll., 2007 ; Stoub et coll., 2006). Ainsi, l'évolution de l'atrophie du CE est considérée comme un bon prédicteur de l'évolution de l'état MCI en MA (Killiany et coll., 2002 ; Jack et coll., 2004 ; Holland et coll., 2009).

3. Le CE et la mémoire chez le Rongeur

Depuis les descriptions neuroanatomiques cytoarchitectoniques du CE, beaucoup d'études ont tenté de découvrir le(s) rôle(s) de cette structure. Ce n'est que depuis la mise en évidence d'un lien entre les déficits mnésiques observés dans la MA et l'atrophie du CE qu'une multitude d'études a vu le jour et que des modèles animaux ont été créés pour étudier le rôle précis de cette structure dans l'apprentissage et la mémoire.

L'encodage et la mémorisation des informations spatiales dépendent des interactions entre l'hippocampe et plusieurs structures corticales, en particulier avec des aires corticales associatives. Le CE constitue la première voie d'entrée des informations dans l'hippocampe et reçoit les principales voies de retour provenant de ce dernier. Cette organisation hippocampo-entorhinale suggère que le CE joue un rôle important dans la transmission des informations corticales, requise pour la navigation spatiale, vers l'hippocampe. De ce fait, l'ensemble des études cherchant à caractériser le rôle du CE dans les processus mnésiques s'est basé sur des techniques lésionnelles. En effet, en partant du principe que l'hippocampe se trouve isolé, déconnecté, de la source d'information sensorielle corticale par la lésion du CE, les performances des rongeurs devraient être déficitaires dans des tâches comportementales.

3.1. Outils de lésion du CE

Différentes techniques lésionnelles ont été développées pour léser le CE. Une première technique consiste à déconnecter l'hippocampe du CE par des lésions de type mécanique, en attaquant directement les voies de projections (section de la voie perforante : *knife cut*) ou la structure elle-même (lésions électrolytiques¹⁴ ou aspiration du

¹⁴ Le principe consiste à implanter des électrodes de stimulation et de faire passer un courant de forte intensité à travers le CE dans le but de créer une lésion de cette structure.

CE). Ces techniques présentent un avantage majeur, qui est l'atteinte massive de la structure ciblée, mais provoquent aussi un certain nombre de dommages collatéraux, comme par exemple des dommages importants sur les structures adjacentes. De plus, les lésions électrolytiques ou par aspiration entraînent une atteinte marquée, voire une disparition, des fibres dites "de passage"¹⁵ ainsi que des vaisseaux sanguins qui traversent le CE. Ainsi ce type de techniques semble présenter des inconvénients importants, qui se traduisent principalement par un manque de sélectivité de la lésion par rapport à la structure cible.

Pour pallier à ce problème, plusieurs groupes ont procédé à des lésions de nature excitotoxique. Contrairement aux lésions mécaniques, cette technique présente l'avantage de réaliser des lésions plus sélectives. Dans un grand nombre d'études, les lésions du CE sont réalisées avec des agonistes des récepteurs N-Methyl-D-Aspartate (NMDA), comme le NMDA ou l'acide iboténique. Le NMDA est un dérivé d'acide aminé synthétique qui se fixe sélectivement au récepteur glutamatergique qui porte son nom. L'acide iboténique est un composé extrait d'un champignon qui agit sur le même récepteur. Ces excitotoxines provoquent une sur-stimulation des récepteurs NMDA, qui entraîne un courant calcique entrant massif, ce qui détruit les corps cellulaires proches du site d'injection (Schwarcz et coll., 1984). Cette technique permet donc d'obtenir une lésion spécifique des cellules, notamment des neurones, en laissant les fibres de passages intacts.

3.2. Le CE et la mémoire spatiale

3.2.1. Effet de la lésion du CE dans les tâches de navigation

Des études de lésions excitotoxiques ou électrolytiques du CE chez le Rongeur montrent une altération des performances d'acquisition et de rétention dans une tâche de mémoire de référence et de mémoire de travail en piscine de Morris (Parron et coll., 2004 ; Eijkenboom et coll., 2000 ; Hardman et coll., 1997 ; Galani et coll., 1997 ; Nagahara et coll., 1995 ; Ramirez et coll., 1991 ; Roof et coll., 1993 ; Myhrer et coll., 1989 ; Staubli et coll.,

¹⁵ Ces fibres sont considérées comme étant des projections provenant de structures corticales adjacentes au CE connectées directement à l'hippocampe par la voie perforante.

1986 ; Steward et coll., 1981). Cependant, d'autres études n'ont pas retrouvé ces mêmes déficits en piscine de Morris (Kopniczky et coll., 2006 ; Pouzet et coll., 1999 ; Burwell et coll., 2004 ; Bannerman et coll., 2001 ; Galani et coll., 1998 ; Ward-Robinson et coll., 2005). La variabilité de l'impact de ces lésions est également observée dans des tâches de mémoire spatiale dans le labyrinthe radial. En effet, si certaines études montrent des déficits après une lésion du CE (Jarrard et coll., 1984 ; Pouzet et coll., 1999 ; Hölscher et Schmidt, 1994 ; Olton et coll., 1978 ; Cho et coll., 1993 - 1995), certaines ne font pas ce constat (Galani et coll., 2002).

En résumé (*cf* tableau 1), tous ces résultats pris dans leur ensemble montrent que l'atteinte du CE n'induit pas systématiquement des déficits de mémoire spatiale au niveau des capacités d'apprentissage tout comme de mémorisation à long terme. L'impact d'une lésion du CE sur les processus mnésiques pourrait donc varier en fonction des techniques de lésion utilisées, mais aussi de la nature de la tâche comportementale utilisée et du mode d'évaluation des performances. En effet, le CE n'est pas simplement une interface entre les régions corticales et l'hippocampe, mais semble jouer un rôle dans certains aspects spécifiques des processus de traitement des informations spatiales, comme le traitement d'indices spatiaux (Oswald et coll., 2003).

Tâches	Structure	Traitement	Mémoire	Espèce	Résultats	Références	
Piscine de Morris	CE unilatéral	Lésion par électrocoagulation	Mémoire spatiale de référence	Rat	Pas de déficit (acquisition). Pas de déficit (rétention)	Kopiczky et coll., 2006	
	CE unilatéral ou bilatéral	Lésion électrolytique	Mémoire spatiale de référence	Souris	Déficits (unilatérale : acquisition). Déficits (bilatérale : acquisition + rétention à court terme)	Hardman et coll., 1997	
	CE bilatéral	Lésion par aspiration	Mémoire spatiale de référence	Rat	Déficits modérés (acquisition). Déficits délai dépendant (rétention)	Nagahara et coll., 1995	
	CE bilatéral	Iboténate	Mémoire spatiale de référence	Rat	Déficits (acquisition). Déficits (rétention)	Galani et coll., 1997	
	CE bilatéral	Iboténate	Mémoire spatiale de référence	Rat	Pas de déficit (acquisition). Déficits modérés (rétention)	Galani et coll., 1998	
	CE bilatéral	NMDA	Mémoire spatiale de référence	Rat	Déficits (acquisition)	Oswald et coll., 2000	
	CE bilatéral	NMDA	Mémoire spatiale de référence	Rat	Pas de déficit (acquisition)	Oswald et coll., 2003	
	CE bilatéral	NMDA ou Lésion par aspiration	Mémoire spatiale de référence	Rat	Pas de déficit en fonction des deux types de lésions	Bannerman et coll., 2001	
	CE bilatéral	NMDA	Mémoire spatiale de référence	Rat	Pas de déficit (acquisition). Pas de déficit (rétention)	Pouzet et coll., 1999	
	CE bilatéral	Lésion électrolytique	Mémoire spatiale de référence	Rat	Déficits (acquisition). Déficits (rétention)	Parron et coll., 2004	
	CE+POR+PER bilat	NMDA	Mémoire spatiale de référence	Rat	Pas de déficit	Burwell et coll., 2004	
	CE dorso latéral	NMDA	Mémoire spatiale de référence	Rat	Déficits (Rétention)	Steffenach et coll., 2005	
	CE ventro médian	NMDA	Mémoire spatiale de référence	Rat	Pas de déficit (Rétention)	Steffenach et coll., 2005	
	CE unilatéral	Lésion électrolytique	Mémoire spatiale de travail	Rat	Déficits modérés	Roof et coll., 1993	
	CE unilatéral	Lésion électrolytique	Mémoire spatiale de travail	Rat	Déficits	Ramirez et coll., 1991	
	CE bilatéral	Iboténate	Mémoire spatiale de travail	Rat	Déficits	Galani et coll., 1997	
	CE bilatéral	Iboténate	Mémoire spatiale de travail	Rat	Déficits	Galani et coll., 1998	
	CE bilatéral	NMDA	Mémoire spatiale de travail	Rat	Pas de déficit	Pouzet et coll., 1999	
	Labyrinthe radial	CE bilatéral	NMDA	Mémoire spatiale de référence	Rat	Déficits	Pouzet et coll., 1999
		CE bilatéral	Iboténate	Mémoire spatiale de référence	Souris	Déficits de mémoire antérograde	Cho et coll., 1993
CEM bilatéral		NMDA	Mémoire spatiale de référence	Rat	Pas de déficit	Galani et coll., 2002	
CE bilatéral		NMDA	Mémoire spatiale de travail	Rat	Déficits	Pouzet et coll., 1999	
CEM bilatéral		NMDA	Mémoire spatiale de travail	Rat	Pas de déficit	Galani et coll., 2002	
CE bilatéral		Iboténate	DNMTP (RS)	Souris	Déficits (rétention)	Cho et coll., 1994	

Tâches	Structure	Traitement	Mémoire	Espèce	Résultats	Références
Labyrinthe en T	CE bilatéral	NMDA, Lésion par aspiration	Mémoire spatiale de travail	Rat	Déficits	Bannerman et coll., 2001
	CE bilatéral	NMDA	Mémoire spatiale de Travail	Rat	Pas de déficit	Marighetto et coll., 1998
Open field (RO/RS)	CE bilatéral	Iboténate	Mémoire de reconnaissance	Rat	Déficits en RS. Déficits en RO	Galani et coll., 1998
	CE bilatéral	Lésion électrolytique	Mémoire de reconnaissance	Rat	Déficits en RS. Déficits léger en RO	Parron et coll., 2004
	CE bilatéral	Lésion électrolytique	Mémoire de reconnaissance	Rat	Déficits en RS. Pas de déficit en RO	Van Cauter et coll., 2008

Tableau 1 : Résumé des principaux résultats des études évaluant l'effet de la lésion du CE sur la mémoire spatiale de référence, la mémoire spatiale de travail et la mémoire de reconnaissance (RO pour reconnaissance d'objet et RS pour reconnaissance spatiale) en fonction du type de lésion, de la structure ciblée, du test utilisé et de l'espèce utilisée. (DNMTP : *delayed non matching-to-position*)

3.2.2. Le CE comme intégrateur de l'information spatiale

Récemment, Van Strien et collaborateurs (2009) ont argumenté en faveur d'un rôle plus complexe du CE dans le traitement des informations sur la base de ses connexions neuroanatomiques. Il serait impliqué notamment dans l'élaboration d'associations plus complexes entre différents types d'information. Plusieurs arguments étayent cette hypothèse. Premièrement, les projections provenant des cortex périrhinal et postrhinal se chevauchent au niveau du CE. Deuxièmement, il existe un réseau de connexions réciproques important entre le CEL et le CEM, ce qui laisse à penser que le CE à lui seul pourrait traiter ou associer des informations de nature différente (spatiale et non-spatiale) issues de voies différentes. Troisièmement, les couches profondes et superficielles du CE sont anatomiquement connectées entre elles, ce qui peut expliquer que les caractéristiques de décharge des cellules de toutes les couches du CEM sont corrélées lors d'une tâche spatiale. Quatrièmement, les projections provenant des couches superficielles du CE projettent sur la formation hippocampique, donc transmettent les informations à l'hippocampe, alors que les couches les plus profondes reçoivent les informations directement de la formation hippocampique. Cependant, des études ont montré qu'il existe des projections venant des couches profondes du CE sur la formation hippocampique, et l'activation des neurones de ces couches profondes peut à elle seule activer les neurones du gyrus denté. Ainsi, Van

Strien et collaborateurs (2009) proposent que le CE n'est pas uniquement un centre transmetteur de l'information mais peut, tout comme la formation hippocampique, réaliser des associations entre des informations de différentes natures. Cependant, comparé à l'hippocampe, il n'associerait les informations que pour élaborer une représentation globale, dite "universelle", alors que l'hippocampe, lui, serait impliqué dans le traitement des détails. Le CE traiterait donc les informations dans leur globalité et à un niveau plus précoce que l'hippocampe.

Cette théorie est étayée par les travaux récents du groupe de Moser et de ses collaborateurs. En effet, ils découvrent, dans le CE, des cellules dont l'activité dépend de la localisation spatiale de l'individu et se caractérise par un pattern régulier d'expressions dans l'espace, d'où leur nom de cellules grilles, ou *grid cells* (Fyhn et coll., 2004). Ces cellules se trouvent interconnectées *via* la voie perforante aux cellules de lieu présentes dans la région septale de la formation hippocampique. Elles permettraient ainsi, tout comme les cellules de lieu, de coder des représentations spatiales de l'environnement (Hafting et coll., 2005). En plus des cellules grilles, une deuxième variété de cellules impliquées dans la navigation a été découverte dans le CE : les cellules de direction de la tête¹⁶ (Sargolini et coll., 2006). Ainsi, le CE pourrait jouer un rôle dans le traitement de l'information spatiale en amont de l'hippocampe. Il constituerait, avec les cellules grilles et les cellules de direction de la tête, un système qui, à lui seul, serait capable de calculer des relations métriques entre différents repères, tout comme l'hippocampe (Muller et coll., 1996 ; O'Keefe et Dostrovsky, 1971 ; Taube et coll., 1990 ; Witter et Moser, 2006). Cependant, il s'agirait d'un système avec une précision moindre dans le traitement de l'information spatiale que celui de l'hippocampe et des cellules de lieu. En effet, lors d'une tâche spatiale, les informations nécessaires à la navigation sont traitées par les cellules de lieu de l'hippocampe présentes dans les aires CA1 et CA3 et dans le subiculum. Il est important de noter que la taille du champ récepteur de ces cellules varie en fonction de l'emplacement de celles-ci. En effet, les cellules situées au niveau septal de la formation hippocampique ont des champs d'activité de petites

¹⁶ Ces cellules ont également été trouvées dans le présubiculum et postsubiculum (Taube et coll., 1990 ; Taube, 1995a, 1995b), dans les noyaux antérieur et latéral du thalamus dorsal (Mizumori et Williams, 1993 ; Taube, 1995 ; Stackman et Taube, 1997), dans le noyau mammillaire latéral (Sharp et Koester, 2008), dans le cortex retrosplénial (Chen et coll., 1994) et dans le striatum (Wiener, 1993).

dimensions, alors que celles situées au niveau septo-temporal intermédiaire de la formation hippocampique sont deux fois plus larges (Jung et coll., 1994). Elles le sont encore davantage au niveau temporal (Kjelstrup et coll., 2008 ; Jung et coll., 1994 ; Maurer et coll., 2005). Cela laisse à penser qu'il y aurait une gradation dans la précision du traitement de l'information en fonction de l'endroit où il s'effectue sur l'axe dorso-temporal de l'hippocampe. Cette théorie va dans le sens d'un traitement précis de l'information par l'hippocampe. Cependant, ce système de codage de l'information peut poser problème pour le stockage de l'information. Le traitement de celle-ci est si détaillé que l'hippocampe pourrait garder en mémoire de nombreuses cartes détaillées n'ayant aucun point commun. C'est pourquoi plusieurs auteurs ont proposé que la formation hippocampique puisse utiliser une carte universelle située dans une autre structure (O'Keefe et coll., 1976 ; Touretzky et coll., 1996 ; Sharp et coll., 1999) et dont le CE serait le siège, en particulier le CEM.

Ainsi, plusieurs rôles généraux ont pu être attribués au CE quant à son implication dans la navigation spatiale. De par sa position stratégique, il est impliqué avec l'hippocampe dans l'utilisation et le traitement des informations spatiales utilisées dans la création d'une représentation spatiale allocentrée, et dans la mémorisation à long terme des informations de nature spatiale.

3.3. Le CE et la mémoire de reconnaissance

Chez le Rongeur, l'étude de la mémoire de reconnaissance, que ce soit celle d'un environnement contextuel, de la relation positionnelle d'objets entre eux, ou des objets eux-mêmes, fait souvent appel à des tâches d'exploration d'objets. En effet, les Rongeurs ont une tendance naturelle à explorer préférentiellement des éléments de leur environnement qui ont un caractère nouveau. C'est pourquoi l'habituation et la réaction aux changements spatiaux et non-spatiaux sont évaluées par l'étude des niveaux d'exploration d'objets disposés dans un champ ouvert (*open field*). Dans cette tâche, des études réalisées chez le Rat et basées sur une approche lésionnelle montrent une implication du CE dans les processus de mémoire de reconnaissance.

Trois études en particulier ont analysé l'impact de la lésion du CE dans une tâche d'exploration d'objets (cf tableau 1, Galani et coll., 1998 ; Parron et coll., 2004 ; Van Cauter et coll., 2008). Pour ce faire, les auteurs ont étudié les capacités des Rongeurs à se familiariser avec un environnement, à détecter un nouvel objet ou le changement spatial d'une configuration.

Ils montrent tous les trois que des rats ayant subi une lésion électrolytique ou cytotoxique du CE ont des capacités d'habituation à un nouvel environnement relativement préservées (indiquées par une baisse d'exploration des objets en fonction du temps), ce qui est interprété comme une préservation des capacités à encoder les caractéristiques globales d'un environnement. En revanche, au cours des séances de changement spatial, les animaux lésés ont perdu la tendance naturelle à ré-explorer préférentiellement les objets déplacés. Il semblerait que la lésion du CE provoque une altération des capacités de détection d'un objet ayant changé de position dans un environnement familier. De plus, les rats porteurs d'une lésion du CE présentent également des difficultés à discriminer le nouvel objet parmi les autres objets disposés au cours de la séance de reconnaissance d'objets *per se*. Il est cependant à noter que dans l'étude menée par Van Cauter et collaborateurs (2008), les rats porteurs d'une lésion du CE présentent une légère préférence pour le nouvel objet, mais à niveau moindre que celui des rats témoins, lorsque le délai entre la phase de présentation des objets familiers et la phase de présentation du nouvel objet est relativement courte (4 min). Le CE serait donc impliqué dans la capacité à encoder ou rappeler des informations sur les caractéristiques précises des objets et leur relation topographique.

Cependant, il n'est pas étonnant que la lésion affecte les deux types de performances de reconnaissance. En effet, comme nous l'avons décrit dans le chapitre II, le CE fait partie d'un réseau de structures, connectées anatomiquement, et impliqué dans les processus de reconnaissance. Pour rappel, le CEL fait partie intégrante d'un réseau impliqué dans la reconnaissance des objets *via* la *visual object-analyser pathway*, et le CEM d'un réseau impliqué dans le traitement des informations de nature spatiale (cf partie II ; cf figure 16 ; Eichenbaum et coll., 2007). Ainsi, de par sa position centrale entre l'hippocampe et le cortex, le CE jouerait un rôle important dans les processus de reconnaissance.

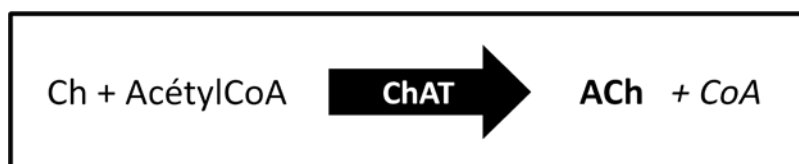
II. Le système cholinergique

1. Le système cholinergique central et la neurotransmission

1.1. L'acétylcholine

L'acétylcholine (ACh) est produite à partir de deux précurseurs, la choline (Ch) et l'acétyl coenzyme A (acétylCoA). La Ch est issue de la dégradation des phospholipides membranaires, de l'alimentation ou de l'hydrolyse de l'ACh libérée au niveau des terminaisons synaptiques. Elle est transportée au niveau des boutons synaptiques par un mécanisme de transport axonal à haute affinité (HACU : *High Affinity Choline Uptake*). L'acétylCoA est produite au niveau des mitochondries à partir du cycle de Krebs, suite à la dégradation du pyruvate issu de la dégradation du glucose.

L'ACh est ainsi synthétisée dans le cytoplasme des terminaisons pré-synaptiques par une enzyme de synthèse, la choline acetyltransférase (ChAT). Cette enzyme est synthétisée dans le corps cellulaire puis transportée par un transport antérograde lent jusqu'aux terminaisons axoniques où se fera la synthèse d'ACh.



L'ACh produite s'accumule à l'intérieur de vésicules en vue d'un stockage grâce à un transporteur spécifique (VACHT : *Vesicular Acetylcholine Transporteur*). Le VACHT utilise l'énergie du gradient de proton (H^+) établi par le transport actif d'ions H^+ du cytoplasme vers l'intérieur des vésicules par une pompe H^+ /ATPase. L'ACh se trouve donc présente dans le cytoplasme et dans les vésicules des terminaisons axoniques.

Une fois le neurone activé, l'ACh présente dans les vésicules est libérée dans la fente synaptique. Après son action sur son récepteur, l'ACh est dégradée par deux enzymes de dégradation, l'acétylcholinestérase (AChE) ou la butyrylcholinestérase (BuChE), ce qui entraîne la production d'acide acétique et de Ch. Cette dernière est recapturée, puis réutilisée pour la synthèse de nouvelles molécules d'ACh.

1.2. Les neurones cholinergiques et leurs connexions

Mesulam et collaborateurs (1983) ont introduit une nomenclature largement acceptée concernant les neurones cholinergiques à projection diffuse chez le Rat. Dans cette classification, six groupes de neurones cholinergiques se distinguent par leur localisation anatomique, leurs caractéristiques fonctionnelles et leurs projections (*cf* figure 19).

Tout d'abord, on considère un premier groupe composé des neurones du SM (Ch1), et un deuxième composé des neurones du bras vertical de la bande diagonale de Broca (vBDB ; Ch2). Ces deux groupes projettent principalement sur la formation hippocampique (hippocampe, gyrus denté, subiculum) et sur le CE. Il est à noter que les neurones cholinergiques de Ch2 projettent également sur l'hypothalamus, le cortex cingulaire, le bulbe olfactif et le cortex occipital (Gaykema et coll., 1990).

Les neurones du bras horizontal de la bande diagonale de Broca (hBDB) projettent également sur les régions impliquées dans les fonctions olfactives (bulbe olfactif, noyau antérieur, tubercule olfactif et cortex piriform) et ils constituent le groupe (Ch3).

Un quatrième groupe (Ch4) est associé aux neurones cholinergiques du NBM qui est un analogue du noyau basal de Meynert chez l'Homme. On retrouve également dans ce noyau Ch4 la substance innominée, le noyau de l'anse lenticulaire et la lame médulaire du globus pallidus. Ces neurones de Ch4 constituent la majeure partie de l'innervation cholinergique du néocortex (Wenk et coll., 1980 ; Vogels et coll., 1990) et de l'amygdale (Wenk, 1996).

Classiquement les groupes Ch1, Ch2, Ch3 et Ch4 constituent les NCB. La plupart des études s'intéressant au rôle du système cholinergique sur les processus d'apprentissage et de mémoire sont basées sur le rôle de ces quatre noyaux et notamment de leurs projections vers l'hippocampe et le cortex.

Les deux derniers noyaux décrits comme appartenant au système cholinergique sont les groupes (Ch5) et (Ch6), localisés respectivement dans le noyau tegmental pedonculopontin (TPP) et dans le noyau tegmental dorsolatéral (TDL). Ces deux noyaux se trouvent être la principale source de l'innervation cholinergique des structures sous-corticales, à savoir le thalamus, la formation réticulée, et les noyaux cérébelleux. De plus, ils innervent également les NCB et les noyaux contenant des neurones dopaminergiques (substance noire, aire

tegmentale ventrale), sérotoninergiques (noyaux du raphé) et noradrenergiques (*locus caeruleus*).

En dehors de la classification de Mesulam et collaborateurs (1983), deux autres groupes de neurones ont été mis en évidence comme appartenant au système cholinergique : les neurones de l'habénula médiane (Ch7), projetant sur le noyau interpedonculaire, et ceux du noyau parabigéminale (Ch8), qui innervent le colliculus supérieur.

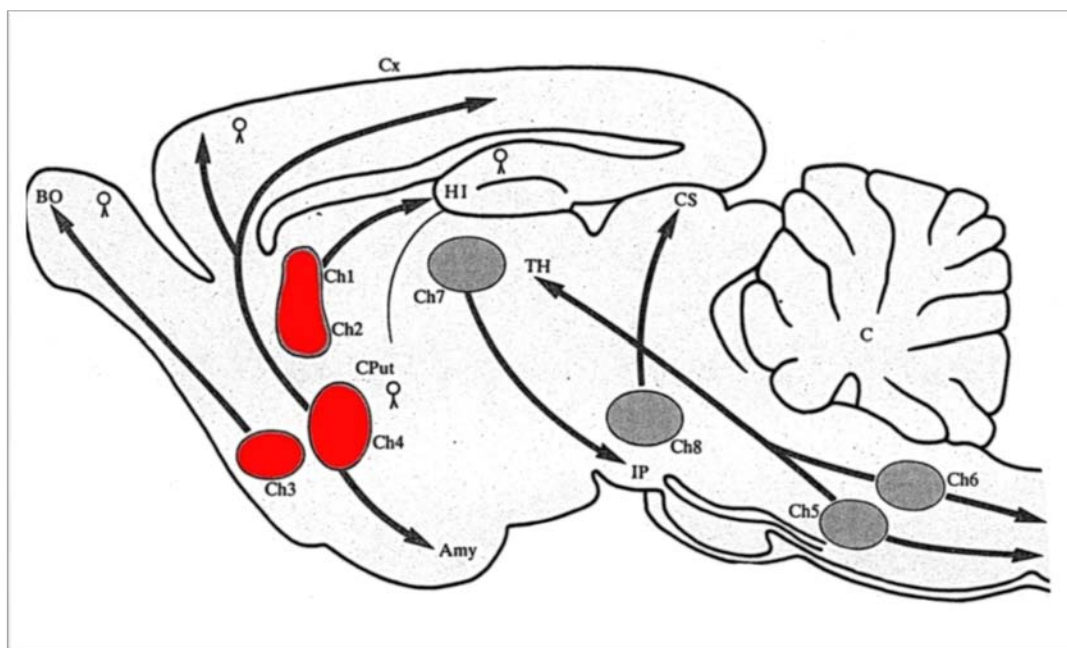


Figure 19 : Schéma indicatif de la localisation des différents noyaux cholinergiques dans le cerveau d'un rongeur (voir le texte pour une description détaillée ; schéma issu de l'ouvrage "Neuropeptides et Neuromédiateurs", Epelbaum J, Ed 1992).

1.3. Les récepteurs cholinergiques

Les récepteurs cholinergiques se divisent en deux grandes classes de récepteurs : les récepteurs nicotiques et les récepteurs muscariniques.

1.3.1. Les récepteurs nicotiques

Les récepteurs nicotiques (nAChR) appartiennent à la superfamille des récepteurs ionotropiques et sont sensibles à la nicotine. Ils sont constitués de protéines

transmembranaires pentamériques (3 sous-unités α et 2 sous-unités β ; Corringer et coll., 2000) formant un canal ionique (sodique ou calcique) reliant le cytoplasme et le milieu extracellulaire. L'ouverture du canal est provoquée par la fixation de deux molécules d'ACh sur les sous-unités α , ce qui provoque le changement de conformation du pentamère et, ainsi, l'ouverture du canal permettant l'entrée de sodium ou de calcium. Cette réponse se traduit par une dépolarisation membranaire provoquant une excitation rapide et intense. Les récepteurs nicotiques sont majoritairement situés au niveau du système nerveux périphérique (SNP) autonome, notamment au niveau de la jonction neuromusculaire et des ganglions autonomes, et, de manière moins importante, dans le SNC.

La distribution des différentes sous-unités a fait l'objet de plusieurs revues de la littérature (Changeux et coll., 1998 ; Gotti et coll., 2004). Les techniques d'identification de gène ont permis de mettre en évidence 9 sous-unités de type α ($\alpha 2$ à $\alpha 10$) et 3 sous-unités de type β ($\beta 2$ à $\beta 4$) conférant, selon leur nature et leur arrangement, un rôle fonctionnel et pharmacologique différent aux récepteurs nicotiques (Arneric et coll., 1995 ; Wonnacott, 1997 ; Lukas et coll., 1999). Dans le SNC, la localisation des sous-unités diffère en fonction des zones cérébrales. On retrouve une distribution des $\alpha 2$ dispersée et faible dans l'hippocampe et les structures corticales. La distribution des $\alpha 3$ est dense dans la couche 4 du cortex et dans le thalamus ventral et dorsal. La sous-unité $\alpha 4$ est fortement représentée au niveau du cortex, du thalamus, de l'amygdale et un peu dans l'hippocampe. La sous-unité $\alpha 7$ est exprimée modérément dans l'hippocampe, le cortex, le tronc cérébral et le cervelet, et, pour finir, la sous-unité $\beta 2$ est présente dans tout le SNC (Arneric et coll., 1995).

1.3.2. Les récepteurs muscariniques

Les récepteurs muscariniques (mAChR) appartiennent à la superfamille des récepteurs métabotropiques et sont sensibles à la muscarine, d'où ils tirent leur nom. Ils sont composés de sept domaines transmembranaires et interagissent avec une protéine G pouvant être couplée avec un second messager différent (phospholipase C ou adénylate cyclase) en fonction du sous-type de récepteur.

A ce jour, les techniques de clonage en biologie moléculaire ont permis de mettre en évidence cinq gènes codant pour les protéines de ces récepteurs : $m_1 - m_5$ ¹⁷ (Bonner et coll., 1987 ; Buckley et coll., 1989). Il a été ainsi distingué cinq sous-types de mAChRs : M_1-M_5 ¹⁸. Ces récepteurs sont différenciés en fonction du mécanisme de transduction activé par la liaison de l'ACh au récepteur et par leur réponse fonctionnelle.

Des techniques d'autoradiographie, basées sur l'utilisation de radioligands ou d'anticorps et complétées par des études d'hybridation *in situ*, ont permis d'établir une distribution des mAChRs au niveau du SNC et du SNP. Au niveau périphérique, chez le Rat, les récepteurs M_1 sont prédominants dans les ganglions sympathiques et dans les glandes exocrines (Buckley et coll., 1989). Dans le SNC, les récepteurs M_1 sont largement distribués dans le cortex cérébral, l'hippocampe et l'amygdale. Les récepteurs M_2 sont abondants dans le myocarde et sont présents en faible quantité dans le bulbe olfactif et l'hypothalamus. Les récepteurs M_3 sont denses dans les muscles lisses et les glandes exocrines, alors qu'ils sont plus largement distribués dans le cortex, l'hippocampe et le thalamus. L'hybridation *in situ* des récepteurs M_4 a révélé une distribution éparpillée dans le cortex et le striatum. Pour finir, les récepteurs M_5 se trouvent en faible quantité dans l'hippocampe, l'habenula et le thalamus.

Du point de vue fonctionnel, l'activation des récepteurs M_1 , M_3 et M_5 induit un effet excitateur, alors que l'effet provoqué est inhibiteur pour les récepteurs M_2 et M_4 .

2. Le système cholinergique et la MA

Depuis les années 1970, plusieurs groupes ont montré une altération sévère des marqueurs cholinergiques présynaptiques corticaux dès les premiers temps de la MA (Davies et Maloney, 1976 ; Bowen et coll., 1980 ; Perry et coll., 1977). L'observation d'une corrélation entre les niveaux de démence et la réduction de nombreux marqueurs cholinergiques corticaux, tels que les niveaux de ChAT, de récepteurs cholinergiques nicotiques et muscariniques (Bierer et coll., 1995 ; Gsell et coll., 1997, 2004 ; Nordberg et coll., 1992 ; Sofic et coll., 1989), a mené Bartus, en 1982, à proposer l'hypothèse selon laquelle les déficits de mémoire observés dans la MA et au cours du vieillissement seraient

¹⁷ Les lettres minuscules désignent les gènes et leurs produits.

¹⁸ Les lettres majuscules désignent les récepteurs.

liés à un dysfonctionnement cholinergique (Bartus, 2000). En effet, les déficits cholinergiques sont observables cliniquement (évaluation à l'aide du test du *Mini mental state*) à partir du moment où l'on observe une diminution d'un minimum de 30% du nombre des NCB (Arendt et coll., 1999).

Ainsi, dans la MA, il est observé une perte des NCB, de leurs projections et une diminution des supports trophiques de ces neurones. Les pertes neuronales sont localisées dans le NBM et la perte des projections est documentée aussi bien chez le Primate âgé (Kitt et coll., 1984) et des modèles murins de la MA (Wong et coll., 1999 ; Hernandez et coll., 2001) que chez les patients Alzheimer (Davies et Mahoney, 1976). Des études montrent également que la diminution marquée de l'activité de la ChAT (30 à 90%) est essentiellement liée à une réduction du nombre de neurones cholinergiques du NBM (Henke et Lang, 1983 ; Bird et coll., 1983 ; Etienne et coll., 1986). Les niveaux de ChAT sont également diminués dans l'hippocampe des patients Alzheimer à un stade terminal (Dekosky et coll., 2002). La réduction de la ChAT dans plusieurs régions corticales est corrélée négativement avec la densité de plaques séniles et des DNF, ce qui suggère éventuellement un rôle de l'une ou l'autre de ces lésions dans l'atteinte cholinergique (Perry et coll., 1981 ; Mountjoy et coll., 1984).

3. Etude du système cholinergique dans la mémoire

Historiquement, les NCB ont été associés aux processus d'apprentissage et de mémoire pour plusieurs raisons : (1) ils constituent la principale source de projections et d'innervation du cortex et de l'hippocampe (Mesulam et coll., 1983), (2) les antagonistes muscariniques perturbent l'apprentissage et la mémorisation, et (3) la perte des neurones cholinergiques dans le vieillissement et la MA est corrélée avec l'atteinte des processus cognitifs. Depuis l'hypothèse de Bartus, de nombreuses recherches ont tenté de caractériser le rôle exact du système cholinergique dans ces processus. Beaucoup d'études ont évalué l'effet de la lésion des NCB dans des tâches de mémoire chez le Rongeur.

3.1. Outils de lésion des neurones ou des projections cholinergiques

3.1.1. Lésion des neurones cholinergiques à l'aide d'excitotoxines

L'utilisation d'excitotoxines, comme l'acide quinolinique ou l'acide iboténique dont le principe d'action est présenté dans le paragraphe 3.1 de la partie attribuée au CE, a été parmi la première technique efficace pour léser les NCB. Ce type de lésion permet d'induire une réduction atteignant jusqu'à plus de 50% du nombre de NCB et du nombre de projections cholinergiques hippocampiques (Waite et Thal, 1996 ; Heckers et coll., 1994). Cependant, ces techniques ne présentent que peu de sélectivité par rapport au système cholinergique.

Une façon plus spécifique de léser les NCB est basée sur l'utilisation de toxines cholinergiques. L'AF64A est un analogue de la choline, l'éthylcholine, qui aurait dû être plus spécifique du système cholinergique (Fisher et Hanin, 1980). Cette toxine est captée par le transporteur à haute affinité de la choline (VAcHT), ce qui lui permet d'accélérer la synthèse des enzymes impliquées dans la synthèse de l'ACh et d'entraîner la mort cellulaire (Fisher et Hanin, 1980 ; Hanin, 1996). Malheureusement, les injections intracérébroventriculaire (i.c.v.) ou intraparenchymateuse de l'AF64A au voisinage des NCB détruisent aussi des neurones non cholinergiques (Dunnett et coll., 1991 ; McGurk et coll., 1987).

L'utilisation de ces toxines permet d'obtenir une atteinte massive des NCB, mais sans grande sélectivité, ce qui pose un problème pour l'étude du rôle des systèmes cholinergiques dans les processus mnésiques.

3.1.2. Lésion des neurones cholinergiques par une immunotoxine sélective

Wiley et collaborateurs (1991) ont créé la première toxine sélective des neurones cholinergiques : la 192 IgG-saporine. Cette immunotoxine, utilisée exclusivement chez le Rat, se compose d'un anticorps monoclonal (la 192 IgG) dirigé contre le récepteur p75NTR à

basse affinité au NGF¹⁹ (*Nerve Growth Factor*) et d'une protéine d'inactivation ribosomal, la saporine. Ce n'est qu'en 2001 que Berger-Sweeney et collaborateurs ont introduit cette même approche de lésion sélective des neurones cholinergiques chez la Souris. Pour ce faire, ils ont utilisé une nouvelle immunotoxine, la mu p75-saporine, que nous avons choisi d'utiliser dans le cadre de cette thèse.

3.1.2.1. Mécanisme d'action de la mu p75-saporine

Son mécanisme d'action, schématisé dans la figure 20, est basé sur le même principe que celui de la 192 IgG-saporine utilisée chez le Rat. Lorsque la mu p75-saporine est injectée dans les ventricules latéraux par injection i.c.v., la toxine se fixe sur le récepteur p75NTR des neurones cholinergiques, puis le complexe immunotoxine-récepteur est endocyté et transporté de manière rétrograde jusqu'aux corps cellulaires. Un découplage de la saporine et de l'anticorps permet la libération de la saporine dans le cytoplasme. Classiquement, la saporine bloque la synthèse protéique par inactivation irréversible des ribosomes, entraînant la mort cellulaire. Les premiers signes de dégénérescence, comme l'apparition de vacuoles et une légère atrophie des neurones, apparaissent 2 jours après l'injection. La déplétion cholinergique est très avancée à 7 jours (Waite et coll., 1994) et complète 2 semaines après l'opération (Book et coll., 1995 ; Holley et coll., 1994 ; Schliebs et coll., 1996 ; Wiley et coll., 1995).

¹⁹ Le NGF, ou facteur de croissance des nerfs (*Nerve Growth Factor*), est un polypeptide qui appartient à la famille des neurotrophines.

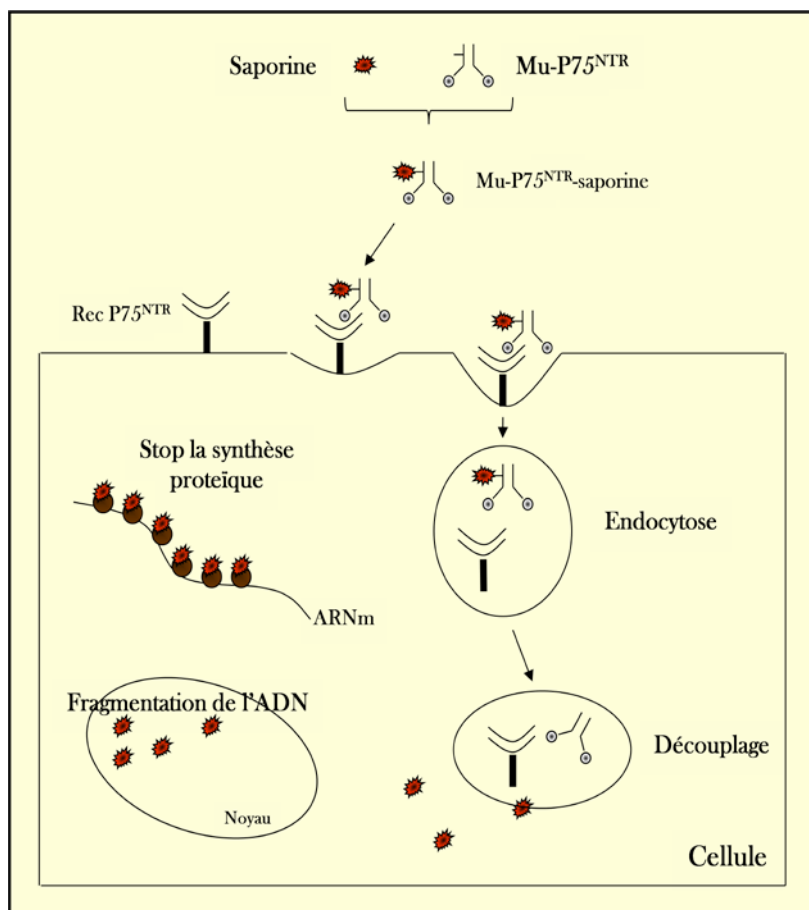


Figure 20 : Représentation schématique du mécanisme d'action de la mu p75-saporine.

Comme l'immunotoxine cible les récepteurs p75NTR, la sélectivité de la lésion dépendra de la localisation de ces récepteurs. Concernant le système cholinergique, des techniques d'immunohistochimie ont permis de localiser les récepteurs p75NTR sur les corps cellulaires et les projections des neurones cholinergiques du SM, du vBDB et du hBDB, et au niveau du NBM (Rossner et coll., 2000). Par contre, les neurones cholinergiques du striatum et du néocortex ne semblent pas exprimer le récepteur p75NTR (Eckenstein, 1988 ; Rossner et coll., 2000). De même, les interneurons cholinergiques du cortex et de l'hippocampe sont dépourvus de récepteurs p75 (Batchelor et coll., 1989).

Par contre, une population limitée de cellules non cholinergiques localisée dans le tronc cérébral et les cellules de Purkinje du cervelet expriment aussi le récepteur p75 (Waite et coll., 1994, 1995 ; Heckers et coll., 1994). Ces deux populations sont donc susceptibles d'être touchées par l'administration des immunotoxines cholinergiques décrites ci-dessus.

3.1.2.2. *Marqueurs de lésion et effets histologiques et neurochimiques de la mu p75-saporine*

De manière à observer les effets de l'immunotoxine, les composés en lien avec l'ACh présentés ci-dessus sont utilisés comme marqueurs de la lésion cholinergique. En effet, la révélation immunohistochimique de l'enzyme de synthèse de l'ACh, la ChAT, permet de visualiser l'ensemble des corps cellulaires cholinergiques et donc de quantifier la perte cellulaire provoquée par la toxine mu p75-saporine. De plus, l'évaluation enzymohistochimique de l'enzyme de dégradation de l'ACh, l'AChE, est considérée comme marqueur de la densité de l'innervation cholinergique dans les zones de projections des neurones cholinergiques (hippocampe, cortex). Elle permet ainsi de mesurer l'atteinte des fibres de projection consécutive à la lésion.

L'injection i.c.v. de mu p75-saporine dans les ventricules latéraux provoque une dégénérescence importante des neurones cholinergiques du SM/BDB (Hunter et coll., 2004) et une diminution moins importante au niveau des neurones cholinergiques du NBM (Berger-Sweeney et coll., 2001). Au niveau des projections des neurones cholinergiques, l'injection i.c.v. de mu p75 saporine diminue les niveaux de ChAT de 60% au niveau de l'hippocampe et de 20% au niveau du néocortex (Berger-Sweeney et coll., 2001). Les quantités d'AChE sont également diminuées de façon drastique dans le cortex et l'hippocampe, particulièrement dans la couche moléculaire (Hunter et coll., 2004). Il est cependant à noter que les deux travaux princeps faisant état de l'utilisation de mu p75-saporine chez la souris ont été réalisés avec une ancienne version de l'immunotoxine. Celle que nous avons utilisée, apparue en 2007, est plus efficace et nous sommes les premiers à en avoir évalué les effets, ce que nous verrons plus tard.

Néanmoins, l'utilisation de cette immunotoxine permet une lésion spécifique des NCB et de leurs projections respectives. Cette technique se trouve être un bon outil pour l'étude du rôle fonctionnel des neurones cholinergiques dans les processus mnésiques.

3.2. Le système cholinergique et la mémoire spatiale

Certains auteurs ont montré que les niveaux d'ACh variaient au niveau de l'hippocampe au cours d'une tâche d'apprentissage spatial (Park et coll., 1992). Il semblerait,

en effet, que les tâches dites hippocampo-dépendantes entraînent une augmentation des niveaux de ChAT dans le milieu extracellulaire, qui semble corrélée aux niveaux d'ACh hippocampique (Chang et Gold, 2003 ; McIntyre et coll., 2002, 2003 ; Stefani et Gold, 2001). De plus, d'autres études montrent que l'injection intra-septale de nombreux agents pharmacologiques altère l'activité de l'ACh hippocampique et les performances mnésiques (Durkin, 1992 ; Brioni et coll., 1990 ; Marighetto et coll., 1989 ; Herzog, 2000 ; Ragozzino et Gold, 1995 ; Ragozzino et coll., 1992). La navigation spatiale étant un processus hippocampique, beaucoup d'études ont cherché à caractériser l'implication d'une dénervation cholinergique massive sur les performances de mémoire spatiale, notamment dans des tâches de navigation.

3.2.1. Effet de la lésion des NCB dans des tâches de navigation

Sans compter les interneurons cholinergiques hippocampiques, la source principale de projections cholinergiques dans l'hippocampe provient du SM. Il est donc tout naturel que les travaux initiaux se soient focalisés sur des lésions du SM. Ces travaux montrent que des lésions non sélectives des neurones cholinergiques du SM entraînent un déficit de performance dans plusieurs tâches de mémoire spatiale (Miyamoto et coll., 1987 ; Kelsey et Landry, 1988 ; M'Harzi et Jarrard, 1992 ; Hepler et coll., 1985 ; Hagan et coll., 1988 ; Mizumori et coll., 1990). Cependant les techniques lésionnelles, souvent électrolytiques, ne touchaient pas uniquement les neurones cholinergiques du SM, mais également d'autres populations neuronales le composant (neurones GABAergiques, et glutamatergiques).

Le passage aux nouvelles techniques de lésion, basées sur l'utilisation de l'immunotoxine 192 IgG-saporine chez le Rat ou de l'immunotoxine mu p75-saporine chez la Souris, a apporté des résultats plus variables que ceux obtenus auparavant avec des techniques moins sélectives. En effet, comme il est observé dans le tableau 2, des études réalisées chez le Rat montrent que la lésion des NCB par une administration i.c.v. de 192 IgG-saporine n'affecte que légèrement les performances d'apprentissage spatial malgré une dénervation hippocampique cholinergique importante. Cependant, d'autres études obtiennent des déficits massifs à l'aide des mêmes protocoles lésionnels similaires.

Des auteurs ont proposé que certaines différences puissent être liées à l'apparition de dommages collatéraux en fonction des doses de toxines. En effet, lorsque la lésion est réalisée par une injection i.c.v. d'immunotoxine à forte dose et qu'elle est comparée à une toxine ciblant spécifiquement les cellules de Purkinje du cervelet, l'amplitude des déficits de performance s'explique en partie par une atteinte cérébelleuse qui provoque des déficits moteurs (Waite et coll., 1995, 1999). D'autres études viennent également appuyer cette hypothèse. En effet, elles montrent que l'injection de 192 IgG saporine, lorsqu'elle est réalisée directement dans le SM, provoque des déficits de performance moins importants (Berger-Sweeney et coll., 1994 ; Torres et coll., 1994 ; Baxter et Gallagher, 1996 ; Dornan et coll., 1997 ; Walsh et coll., 1996).

Ainsi, le rôle des NCB dans la mémoire spatiale, et notamment dans la navigation spatiale, reste à l'heure actuelle relativement conflictuel. Néanmoins, de par le lien privilégié qu'ils entretiennent avec l'hippocampe, *via* la voie septo-hippocampique, il est relativement bien accepté que ces neurones joueraient un rôle dans l'établissement de la carte cognitive. Ils seraient impliqués notamment dans la modulation de l'activité des cellules de lieux de l'hippocampe. En effet, les champs d'activité des cellules de lieu sont complètement altérés au cours d'une tâche de labyrinthe radial à 8 branches suite à une lésion du SM à l'acide quinolinique (Leutgeb et Mizumori, 1999), ce qui perturbe les capacités des Rats pour différencier deux environnements partiellement identiques (même labyrinthe radial mais avec des indices visuels nouveaux). D'autres études, se focalisant cette fois-ci sur une lésion spécifique des neurones cholinergiques du SM, montrent que la perte de ces cellules provoque une diminution de la sélectivité spatiale des cellules de lieu, leur champ d'activité se trouvant élargi, et qu'elles présentent une certaine rigidité, ne parvenant plus à faire un *remapping* dans un nouvel environnement (Ikonen et coll., 2002).

L'ensemble de ces résultats laisse à penser que l'hippocampe, sans les neurones cholinergiques du SM, n'arriverait plus à encoder correctement de nouvelles informations spatiales, ce qui peut entraîner une perturbation de la navigation du rongeur dans des tâches de mémoire spatiale.

Tâches	Structure	Traitement (injection)	Mémoire	Espèce	Résultats	Références
Piscine de Morris	SM	192 IgG-saporine (Intraseptale)	Mémoire spatiale de référence	Rat	Pas de déficit	Craig et coll., 2009
	SM	192 IgG-saporine (Intraseptale)	Mémoire spatiale de référence	Rat	Très légers déficits (acquisition). Pas de déficit (rétention)	Pang et coll., 2001
	SM	Lésion électrolytique	Mémoire spatiale de référence	Rat	Déficits légers (acquisition)	Compton, 1997
	SM	192 IgG-saporine (Intraseptale)	Mémoire spatiale de référence	Rat	Déficits (acquisition et rétention)	Janis et coll., 1998
	SM/BDB +NBM	192 IgG-saporine (i.c.v. unilatérale)	Mémoire spatiale de référence	Rat	Déficits doses dépendants (acquisition + rétention)	Waite et coll., 1995
	SM/BDB +NBM	193 IgG-saporine (i.c.v. bilatérale)	Mémoire spatiale de référence	Rat	Déficits (acquisition). Légers déficits (rétention)	Aztiria et coll., 2007
	SM/BDB +NBM	192 IgG-saporine (i.c.v. , 3ème ventricule)	Mémoire spatiale de référence	Rat	Légers déficits (acquisition)	Gil-Bea et coll., 2010
	SM/BDB +NBM	192 IgG-saporine (i.c.v. bilatérale)	Mémoire spatiale de référence	Rat	Déficits (acquisition). Déficits (rétention)	Aztiria et coll., 2009
	SM/BDB +NBM	193 IgG-saporine (i.c.v. bilatérale)	Mémoire spatiale de référence	Rat	Pas de déficit (acquisition + rétention)	Waite et coll., 1999
	SM/BDB +NBM	193 IgG-saporine (i.c.v. bilatérale)	Mémoire spatiale de référence	Rat	Déficits	Leanza et coll., 1995
	SM/BDB +NBM	192 IgG-saporine (i.c.v. bilatérale)	Mémoire spatiale de référence	Rat	Déficits (acquisition). Déficits (rétention)	Leanza et coll., 1998
	SM/BDB +NBM	Mu p75-saporine (i.c.v. bilatérale)	Mémoire spatiale de référence	Souris	Déficits (acquisition). Déficits (rétention)	Berger-Sweeney et coll., 2001
	SM/BDB +NBM	192 IgG-saporine (i.c.v. bilatérale)	Mémoire spatiale de travail	Rat	Déficits	Aztiria et coll., 2007
Labyrinthe radial	SM	192 IgG-saporine (Intraseptale)	Mémoire spatiale de référence	Rat	Déficits	Janis et coll., 1994
	SM	192 IgG-saporine (Intraseptale)	Mémoire spatiale de référence	Rat	Déficits	Janis et coll., 1998
	SM	192 IgG-saporine (Intraseptale)	Mémoire spatiale de travail	Rat	Pas de déficit	Pang et coll., 2001
	SM	192 IgG-saporine (Intraseptale)	Mémoire spatiale de travail	Rat	Pas de déficit	Chappell et coll., 1998
	SM ou NBM	192 IgG-saporine (Intraseptale ou intraNBM bilatérale)	Mémoire spatiale de travail	Rat	NBM : pas de déficit SM : déficits	Lehmann et coll., 2003
Labyrinthe radial (aquatique)	SM/BDB +NBM	Mu p75-saporine (i.c.v. bilatérale)	Mémoire spatiale de référence	Souris	Déficits	Hunter et coll., 2004
	SM/BDB +NBM	Mu p75-saporine (i.c.v. bilatérale)	Mémoire spatiale de travail	Souris	Déficits	Hunter et coll., 2004
Labyrinthe en T	SM	192 IgG-saporine (Intraseptale)	Mémoire spatiale de travail (DMTP)	Rat	Pas de déficit mais utilisation plus importante de stratégie égocentrique	Fitz et coll., 2008

Tableau 2 : Résumé des principaux résultats des études évaluant l'effet de la lésion des NCB sur la mémoire spatiale de référence, la mémoire spatiale de travail, en fonction du type de lésion, de la structure ciblée, du test utilisé et de l'espèce utilisée (DMTP : *delayed matching-to-position* ; i.c.v. : Intracérébroventriculaire).

L'implication des NCB dans la navigation spatiale n'est pas forcément liée uniquement à l'interaction des neurones du SM et de l'hippocampe. D'autres processus cognitifs, contrôlés par les NCB, pourraient être impliqués dans la navigation, comme la mémoire de travail ou les processus attentionnels.

3.2.2. Effet de la lésion des NCB dans la mémoire de travail

Selon certaines études basées sur la lésion des NCB par l'immunotoxine 192 IgG-saporine, les neurones du SM seraient impliqués dans les processus de mémoire de travail, notamment dans des tâches de mémoire spatiale dans le labyrinthe radial ou la piscine de Morris (Lehmann et coll., 2002, 2003 ; Chang et Gold., 2004 ; Cassel et coll., 2002 ; cf tableau 2).

3.2.3. Effet de la lésion des NCB dans les processus attentionnels

Les NCB auraient également un rôle dans les processus attentionnels. Comme nous l'avons vu ci-dessus, ils sont répartis dans deux régions bien distinctes, le SM/BDB et le NBM. Ce dernier est connu pour être à l'origine des principales voies de projections cholinergiques vers le néocortex, qui forment la voie basalo-corticale (Mesulam et coll., 1983). L'ACh corticale joue un rôle important dans les processus attentionnels (Everitt et Robbins, 1997 ; Sarter et coll., 1997, 2001). Des expériences montrent que la lésion excitotoxique du NBM, englobant notamment les neurones cholinergiques et diminuant ainsi les niveaux d'ACh cortical, entraîne des déficits dans un test visuel d'attention spatiale soutenue, le test de temps de réaction aux 5 choix (*5-Choice reaction time task* ; Muir et coll., 1994 ; Robbins et coll., 1989). Les études de lésion spécifique des NCB montrent également un rôle de ces neurones cholinergiques dans les processus attentionnels, tout particulièrement les neurones du NBM (McGaughy et coll., 1999 ; Burk et coll., 2008 ; Lehmann et coll., 2003). En effet, dans le test des 5 choix, tout comme dans une tâche de vigilance, la lésion des neurones cholinergiques du NBM altère les performances des rats (Mc-Gaughy et coll.,

1996 ; Burk et Sarter, 2001). Ainsi, la lésion des neurones cholinergiques du NBM, qu'elle soit sélective ou non-sélective, semble avoir un impact sur les processus attentionnels.

3.3. Le système cholinergique et la mémoire de reconnaissance

Il est bien établi, à l'heure actuelle, que la transmission cholinergique a un rôle crucial dans la mémoire de reconnaissance, et plus particulièrement dans le phénomène de la familiarité (Easton et Gaffan, 2000 ; Warburton et coll., 2003 ; Winters et Bussey, 2005). Une étude récente propose également un rôle de ce système dans la détection d'objets déplacés (Barker et coll., 2009). En effet, cette étude montre que le blocage des récepteurs cholinergiques du circuit cortex périrhinal/cortex préfrontal médian altère dramatiquement les performances d'acquisition, mais pas de rétention, dans une tâche de détection d'un objet déplacé. Les auteurs proposent d'ailleurs une hypothèse selon laquelle le cortex périrhinal serait principalement impliqué dans l'acquisition des informations concernant les caractéristiques des objets, alors que le cortex préfrontal médian aurait plutôt un rôle d'intégrateur des caractéristiques des objets avec leur position dans l'espace.

Curieusement, il n'existe que très peu d'études dans la littérature concernant les effets de la lésion des NCB dans des tâches de mémoire de reconnaissance. Néanmoins, les trois études menées par Paban et collaborateurs (2005a ; 2005b ; 2011) chez le Rat montrent que la lésion des NCB, aussi bien du SM/VDB que du NBM, altère autant les capacités de reconnaissance d'objets que celles de détection d'un objet déplacé. Cependant, le rôle exact des NCB dans les processus de reconnaissance reste difficile à éclaircir dans ces études. En effet, les projections cholinergiques provenant des NCB, notamment celles émanant des neurones cholinergiques du SM/BDB ou du NBM, ont été identifiées comme jouant un rôle important dans d'autres processus cognitifs impliqués dans les tâches de mémoire de reconnaissance, comme les processus attentionnels, la mémoire de travail et les processus d'apprentissages (Bartus et coll., 1982 ; Decker et coll., 1990 ; Collerton, 1986 ; Olton, 1990 ; Evertitt et Robbins, 1997 ; Sarter et Bruno, 1997). De plus, des études récentes attribueraient un rôle important du système cholinergique dans les déficits de mémoire et d'apprentissage *via* le cortex préfrontal (Burton et coll., 2009). Plus précisément, la suppression des projections cholinergiques corticales altérerait la capacité de détection

d'indices ou d'objets, tout comme les processus attentionnels (Hasselmo et Giocomo, 2006 ; Hasselmo et Stern, 2006).

C'est pourquoi il semblerait que l'acétylcholine, et notamment le système cholinergique (SM/BDB et NBM), de par ses projections, jouerait un rôle important dans les processus de mémoire de reconnaissance.

CHAPITRE 4

OBJECTIFS DE THESE

CHAPITRE 4

OBJECTIFS DE THESE

Comme nous l'avons vu dans ce chapitre introductif, la MA est caractérisée par un déclin progressif et irréversible de la mémoire épisodique et une forte désorientation spatiale, qui évolue vers un état de démence menant à une perte d'autonomie des patients. Au niveau cérébral, la MA est notamment caractérisée par la présence de plaques amyloïdes (constituées notamment d'A β), de DNF (formées de protéine tau hyperphosphorylée) et de pertes neuronales massives dans certaines structures. Des études d'imagerie *in vivo* et d'histologie *post-mortem* ont mis en relation différents stades de déclin des capacités mnésiques et la progression des atteintes structurelles du cerveau. Elles montrent notamment une atteinte précoce du CE et de l'hippocampe, caractérisant un stade préclinique de la maladie, suivi d'une dégénérescence progressive et sévère des NCB projetant vers le cortex et l'hippocampe. Récemment, notre équipe a montré chez le Rat que la lésion combinée de ces deux structures, mais pas chaque lésion séparément, supprimait toute capacité à apprendre et retenir dans des tâches de mémoire spatiale (Traissard et coll., 2007). La nature et la sévérité des déficits rappellent celles observées en phase avancée de la maladie. Nous avons posé l'hypothèse d'une synergie délétère de ces deux lésions typiques de la MA qui pourrait jouer un rôle important dans la bascule d'un stade présymptomatique (atteinte du CE) vers un stade d'amnésie clairement déclarée, caractérisé notamment par une forte désorientation spatiale (atteinte conjointe du CE et des NCB).

Ainsi, l'objectif principal de cette thèse est d'appliquer l'atteinte de ces deux structures clés observée dans la MA chez des souris non transgéniques et transgéniques et d'évaluer l'ampleur et la spécificité des déficits cognitifs associés à la combinaison de ces deux lésions.

L'étude de Traissard et collaborateurs (2007) a été la première à s'intéresser à l'impact de la lésion combinée des NCB, par l'immunotoxine 192 IgG-saporine, et du CE, par injection de NMDA, sur l'activité locomotrice et sur la mémoire spatiale (mémoire spatiale de référence et mémoire spatiale de travail) dans trois paradigmes différents : ceux de la piscine de Morris, du labyrinthe de Hebb Williams et du labyrinthe radial. Ils montrent, dans cette étude, que seule la lésion combinée du CE et des NCB, contrairement à chaque lésion seule (CE ou NCB), est capable d'induire une hyperactivité aussi bien en phase nocturne que diurne. Dans les tâches de mémoire spatiale, la lésion du CE seule altère la mémoire de travail et induit des déficits de mémoire de référence qui sont relativement modérés dans l'ensemble de ces tâches comportementales. La lésion des NCB seule induit des déficits encore plus limités, puisqu'elle ne perturbe que les performances de rétention dans la tâche de la piscine de Morris et les performances de mémoire de référence dans la tâche du labyrinthe radial. Elle ne perturbe en aucun cas la mémoire de travail dans l'ensemble de ces tâches. Par contre, dans l'ensemble des tâches de mémoire spatiale, la lésion combinée du CE et des NCB altère dramatiquement les performances des rats, aussi bien dans des protocoles de mémoire de référence que de mémoire de travail. Les performances dans les tâches de la piscine de Morris et du labyrinthe radial ne montrent aucun signe d'amélioration, et celle-ci est peu marquée dans la tâche du labyrinthe de Hebb en comparaison à celles des autres groupes. Ainsi, l'ensemble de ces résultats va dans le sens d'une implication synergique du CE et des NCB dans les processus mnésiques et locomoteurs. Ces auteurs sont ainsi les premiers à suggérer que la lésion combinée de ces deux structures pourrait modéliser chez le Rat les déficits de mémoire antérograde et l'hyperactivité observés dans la MA.

Ces résultats apportés par Traissard et collaborateurs (2007) nous ont amenés à établir mon premier objectif de thèse, qui était d'étudier l'implication de la lésion combinée du CE et des NCB mais, cette fois-ci, dans une autre espèce : la souris.

Pour la réalisation de ce premier objectif, nous avons tout d'abord adapté la lésion des NCB à la souris, grâce à une nouvelle immunotoxine (commercialisée en 2007) spécifique à cette espèce, la mu p75-saporine, et nous avons étudié ses effets dans une batterie de tâches comportementales, à savoir la piscine de Morris, le labyrinthe de Barnes, le test de la barre et un test d'activité locomotrice (**Publication 1**). Puis, dans un deuxième temps, nous avons

étudié l'effet des deux lésions (CE et NCB), seules ou en combinaison, sur les performances cognitives de souris non transgéniques C57BL/6J âgées de 3,5 mois. Les lésions du CE sont induites par trois injections bilatérales de N-Methyl-D-Aspartate réparties sur l'ensemble du CE. La lésion des NCB est réalisée par une injection bilatérale et i.c.v de mu p75-saporine. Les performances des souris lésées ont ensuite été évaluées dans les mêmes tâches de mémoire spatiale que précédemment, auxquelles nous avons rajouté une tâche de mémoire de reconnaissance d'objets effectuée selon deux versions : spatiale et non spatiale (**Publication 2**).

Le deuxième objectif de cette thèse est de combiner cette approche lésionnelle, validée pour la première fois chez la souris, avec une approche transgénique à partir de souris double transgéniques portant à la fois le gène de l'hAPP et le gène humain de l'ApoE $\epsilon 4$ (hAPP/hApoE4). En effet, ce dernier (h-ApoE4) a été identifié comme un facteur de risque génétique majeur pour la MA de type sporadique, qui représente plus de 90% des cas des patients Alzheimer. Cette protéine semble augmenter les dépôts amyloïdes chez des patients porteurs de l'ApoE4 de par sa faible affinité pour l'A β . De plus, il a été montré que lorsque l'on introduit ce gène chez des souris, elles présentent des déficits de mémoire spatiale aussi modérés et spécifiques que ceux décrits chez des humains âgés non déments et porteurs de ce gène (Grootendorst et coll., 2005 ; Bour et coll., 2008 : **publication 3** présentée en annexe). Cependant, du point de vue neuroanatomique, ces souris ne présentent pas de plaques séniles ou de DNF. Ces animaux sont donc un bon modèle représentatif d'une population à risque de développer une MA. Ainsi, en associant les approches lésionnelle et transgénique, dont l'idée a fait l'objet d'une revue de questions (Cassel et coll., 2008 : **publication 4** présentée en annexe), la lésion combinée pourrait déclencher une pathologie clinique et neuronale correspondant à un stade plus avancé de la maladie. Nous aurions ainsi un modèle animal de la MA sporadique encore inexistant à l'heure actuelle.

Pour évaluer l'effet de la lésion combinée du CE et des NCB chez les souris double transgéniques hAPP/hApoE3 ou hAPP/hApoE4, nous avons utilisé le même modèle lésionnel que celui présenté ci-dessus. Les souris sont opérées à l'âge de 5 mois, puis laissées en stabulation pendant 10 mois. Nous avons évalué leurs performances à partir de l'âge de 15 mois dans le test d'anxiété des cages claire-obscur, puis dans une tâche de navigation

spatiale (le labyrinthe de Barnes). Pour terminer, l'activité locomotrice a également été contrôlée au cours de trois séances d'actographie réalisées avant opération, après opération et après passation des tests.

Ainsi ce travail de thèse, visant la compréhension de l'interaction de la dégénérescence de deux structures clés, le CE et les NCB, dans l'atteinte des processus mnésiques et comportementaux, s'inscrit dans un cadre d'étude ayant pour but la modélisation des altérations mnésiques observées dans la MA.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

I. Animaux

1. Souris consanguines C57BL/6J

Dans la première partie de ce travail (chapitre I), les études ont été réalisées sur des souris mâles consanguines C57BL/6J@ICo, pesant entre 21 et 26 g et provenant de Charles River Laboratories (Les Oncins, France). Nous avons choisi de travailler sur des souris C57BL/6J (cf image²⁰) en raison des qualités que présente cette souche pour certaines tâches comportementales ou pour des expériences de vieillissement. En effet, il a été montré que cette lignée de souris présente de bonnes capacités d'apprentissage, notamment dans des tâches de mémoire spatiale (Ammassari-Teule et coll., 1993 ; Upchurch et coll., 1989) et possède une grande espérance de vie. Ce choix a également été motivé par le fait que cette souche de souris consanguines est fréquemment utilisée comme fond génétique des modèles de souris transgéniques pour la maladie d'Alzheimer.



En ce qui concerne les conditions d'élevage, dès leur arrivée, les souris sont hébergées par groupes de 5 (cages en Makrolon transparentes : 22 x 20 x 14 cm) dans une animalerie à température ambiante ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) et à hygrométrie contrôlées. Elles disposent de nourriture et d'eau *ad libitum*. Toutes les pièces sont éclairées selon un cycle 12h/12h (période éclairée 7h-19h). Une semaine après leur arrivée, les souris sont isolées et disposent d'une feuille de papier absorbant pour faire leur nid. Chaque animal est régulièrement pesé et manipulé pour se familiariser avec l'expérimentateur. L'ensemble des

²⁰ Photographie issue de l'article publié par Boguski (2002).

expériences a été réalisé selon le règlement international en vigueur (Directives du conseil 87/848, 19 octobre 1987, Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, service vétérinaire de la santé et de la protection animale ; publication NIH 86-23, révisée en 1985 ; N° d'autorisation C. Mathis : 67.292. N'ayant pas de numéro d'autorisation, j'ai travaillé durant cette thèse sous la responsabilité de C. Mathis).

2. Souris transgéniques hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons décidé d'appliquer le modèle de double lésion du CE et des NCB sur des souris transgéniques hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4. Les souris sont élevées par Taconic (Germantown, NY, USA) pour le compte de l'entreprise Merck Sharp & Dohme Corp. (Boston, USA). L'utilisation de ces souris dans le cadre de cette thèse est soumise à un accord de transfert de matériel (MTA : *Material Transfer Agreement*) de 3,5 ans impliquant le Dr J.C Dodart, puis le Dr C. Zerbinatti pour le compte de Merck Sharp & Dohme Corp. (anciennement Merck & Co., Inc.) et le Dr C. Mathis pour notre laboratoire. Celui-ci possède également l'agrément d'utilisation confiné d'OGM du groupe I n°5016 en date du 2 octobre 2008.

2.1. Construction génétique des souris hAPP-YAC

Les souris hAPP-YAC ont été générées par la méthode de transfert de chromosomes artificiels de levure (*YAC : yeast artificial chromosome* ; Lamb et coll., 1993). Cette technique permet ainsi d'obtenir des souris transgéniques qui surexpriment l'APP humaine (hAPP) non mutée.

La première étape de construction a consisté à intégrer le gène d'intérêt codant pour hAPP dans un chromosome artificiel de levure (*cf* figure 23). Dans un premier temps, le chromosome 21 humain contenant le gène de l'APP a été fractionné en larges fragments par des enzymes de digestions. Dans un deuxième temps, le fragment contenant le gène hAPP a été sélectionné, puis intégré à un chromosome de levure AB1380 grâce à des enzymes de recombinaison et de liaison de l'ADN, afin d'obtenir un chromosome artificiel contenant le gène d'intérêt. Ce YAC APP humain, contenant la séquence entière du gène APP humain

(APP-8 : clone B142F9 de 650kb), a été transféré dans une autre lignée de levure, YPH857, contenant de nombreux marqueurs de sélection, notamment plusieurs cassettes néo²¹ résistantes à la néomycine, permettant ainsi la sélection des cellules pour lesquelles l'intégration du YAC a été réalisée par recombinaison homologue.

La deuxième étape a eu pour but l'implantation du YAC APP humain dans une cellule embryonnaire souche. Cette étape a débuté par l'intégration du chromosome artificiel contenant le gène codant pour l'hAPP dans un plasmide P8, en utilisant la technique de transformation sphéroplastique (*spheroplast transformation*). Par la suite, le plasmide P8 sélectionné a été transféré directement dans une cellule embryonnaire de souche 23G418^f.

Pour finir, les cellules possédant le plasmide P8 ont été implantées dans des embryons au stade de blastocyste. Puis, ces embryons ont été transférés dans une mère porteuse de souche C57BL/6J, qui a donné naissance à des souris chimères porteuses de l'hAPP. La technique de transfert de chromosomes de levure permet ainsi de conserver l'expression normale de l'APP murin et d'exprimer l'hAPP à des niveaux similaires à celui de l'APP murin endogène. Ainsi, l'ensemble de ces souris chimères présentait une co-expression de l'APP humain ou murin au niveau du cerveau, du cœur et des reins dès l'âge de 3 mois (Lamb et coll., 1993).

²¹ Cette cassette néo' est une cassette de résistance aux antibiotiques eucaryotes (ici la néomycine). Il s'agit ainsi d'un marqueur de sélection positif permettant la sélection des cellules ayant réalisées une recombinaison homologue du gène. Ainsi, ce marqueur permet de sélectionner les cellules qui ont intégré le YAC dans leur génome et d'éliminer celles pour lesquelles l'intégration s'est faite sans recombinaison homologue.

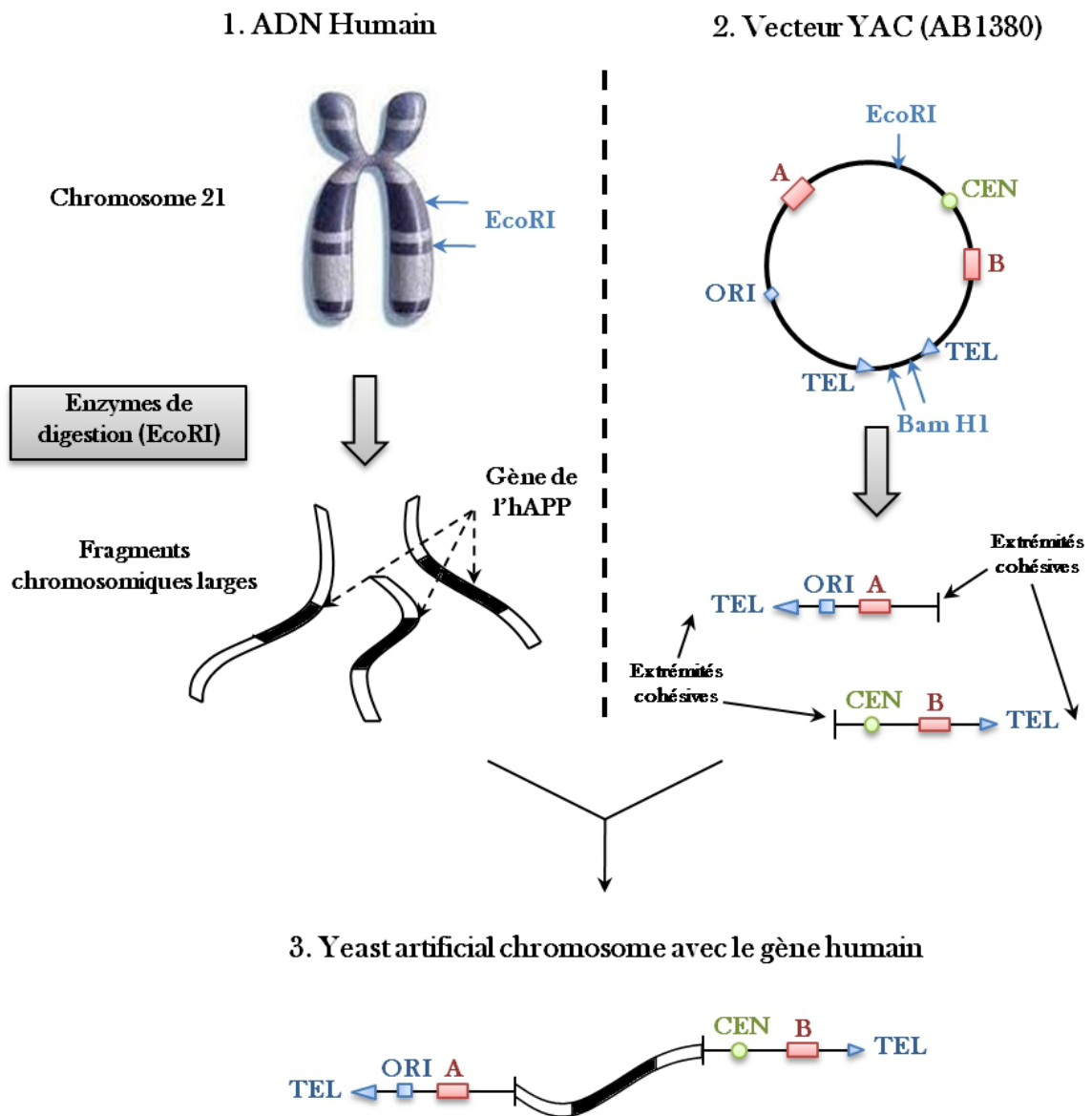


Figure 21 : Représentation schématique de la construction d'un chromosome artificiel de levure dont le schéma est adapté du site www.accessexcellence.org. La partie 1 montre l'obtention des fragments chromosomiques humains larges contenant le gène de l'hAPP par digestion du chromosome 21. La partie 2 montre la préparation du vecteur YAC utilisé pour recevoir les fragments chromosomiques humains. Le vecteur est constitué de plusieurs parties : 2 télomères (TEL) et un centromère (CEN). Il contient plusieurs séquences géniques : la séquence d'origine de la réplication du vecteur (ORI) et les séquences de deux marqueurs de sélection (A et B) utilisés pour la sélection des cellules de levure et la sélection des chromosomes artificiels. Le vecteur initial est divisé en deux fragments par deux enzymes de digestion BamHI et EcoRI. Ainsi, en partie 3, le fragment chromosomique humain contenant le gène de l'hAPP est intégré aux deux fragments du vecteur pour obtenir, au final, un YAC contenant le gène d'intérêt humain.

2.2. Construction génétique des souris hapoE3-TR et hapoE4-TR

Les souris hapoE3-TR et hapoE4-TR ont été créées par la méthode de remplacement ciblé du gène (TR : *targeted gene replacement*) de l'apoE murin par l'allèle du gène codant pour l'apoE3 ou apoE4 humaine (Sullivan et coll., 2004). Par cette manipulation génétique du "knock-in", les souris possèdent un allèle du gène humain (allèles $\epsilon 3$ ou $\epsilon 4$) à la place de leur gène murin de l'apoE. Cependant, l'ensemble des séquences régulatrices du gène murin reste inchangé. De ce fait, l'expression de l'apoE reste sous le contrôle du promoteur murin, ce qui confère l'avantage d'obtenir des souris qui expriment la forme humaine de l'apoE avec la même distribution que l'apoE murine et à des niveaux physiologiques comparables à ceux d'une souris non transgénique.

La méthode de remplacement ciblé du gène a été effectuée en injectant un vecteur portant le transgène humain dans des cellules embryonnaires E14TG2a provenant d'une lignée de souris 129P2 (Sullivan et coll., 1997). Après sélection, les cellules qui possédaient le vecteur ont été implantées dans des embryons. Par la suite, ces embryons ont été transplantés dans une mère porteuse qui donna naissance à plusieurs souris chimères. Ces souris ont été croisées sur deux générations (F1 et F2) avec des souris C57BL/6J, de manière à obtenir des souris homozygotes pour l'allèle humain $\epsilon 3$ ou $\epsilon 4$ en F2. Pour finir, les souris parentales hapoE3 ou hapoE4, utilisées pour générer les souris doubles mutantes, ont été obtenues par rétrocroisement (*backcrossing*) sur 7 générations avec des souris C57BL/6J, plus un dernier avec la souris C57BL/6 de chez Taconic.

2.3. Génération des souris double transgéniques hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4

Les souris double transgéniques ont été obtenues en croisant des souris transgéniques qui sur-expriment la protéine humaine APP (souris hAPP-Yac) avec des souris *knock-in* pour le gène $\epsilon 3$ ou $\epsilon 4$ (souris hapoE3-TR ou hapoE4-TR). Ainsi, l'utilisation de ces souris confère le double avantage d'appliquer notre modèle de double lésion à des souris exprimant, à la fois, le gène humain $\epsilon 3$ ou $\epsilon 4$ et la protéine APP humaine. L'utilisation de ces souris double transgéniques permet d'étudier l'interaction entre chaque forme d'ApoE

humaine (3 ou 4) avec l'APP humaine et ses dérivés dont l'A β humaine, qui serait différente de l'A β murine. Dans ce chapitre, nous avons utilisé la lignée de souris C57BL/6J comme témoin pour le fond génétique des souris transgéniques hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4.

3. Conditions d'élevage

L'ensemble des souris expérimentales hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4 est né au laboratoire. La raison de ce choix a été fortement motivée par le fait que le génotype hApoE est susceptible d'influencer les fonctions cognitives et la réponse au stress (Grootendorst et coll., 2001). Il nous a donc paru crucial d'éviter tout transport des souris destinées aux expérimentations.

Ainsi, les souris transgéniques parentales (10 mâles et 20 femelles) proviennent des Etats-Unis (TACONIC pour le compte de Merck Sharp & Dohme Corp., Boston, USA) et font l'objet d'un accord de transfert comme décrit précédemment. Les géniteurs ont donné naissance aux souris expérimentales en une seule génération, ce qui a permis d'éviter tout risque d'une dérive génétique inhérente au maintien d'une lignée par croisement homozygote. Les souris sont stabulées dans une animalerie d'élevage maintenue à une température de $26\pm 1^\circ\text{C}$. Afin de faciliter leur identification, les souris reproductrices tout comme les souris expérimentales ont reçu une puce électronique par injection sous-cutanée (*Résaumatique*[®], Bernay, France). Après sevrage, les souris expérimentales obtenues sont maintenues par groupes de même génotype, de même portée, et de même sexe dans l'animalerie d'élevage. L'identité des animaux est régulièrement contrôlée au cours de l'entretien des litières et de la période expérimentale. Durant les périodes d'élevage et d'expérimentation, l'ensemble des souris a accès à l'eau et à la nourriture *ad-libitum*. Avant chaque expérience, les souris expérimentales sont isolées 7 jours en cage individuelle, disposant d'une feuille de papier absorbant pour faire leur nid, et sont transférées dans une animalerie à température ambiante ($26^\circ\text{C}\pm 1$), éclairée selon un cycle 12h/12h (période éclairée 7h-19h).

II. Opérations chirurgicales

1. Lésion du CE

La lésion du CE est réalisée en utilisant une technique d'injection multiple de NMDA (80mmol/L), d'après une concentration adaptée de Traissard et collaborateur (2007). Nous avons choisi cette technique de lésion car le NMDA, agoniste de synthèse des récepteurs glutamatergiques de type NMDA, induit une lésion excitotoxique des neurones sans léser les fibres de passage comme avec d'autres techniques de lésion moins spécifiques (Corbit et coll., 2002).

1.1. Préparation de la solution de NMDA

Avant utilisation, le NMDA est maintenu en poudre au réfrigérateur à 4°C. La solution de NMDA est ensuite préparée en diluant le NMDA dans du tampon phosphate salin (PBS : *Phosphate Buffer Saline* ; 0,1 mM à pH=7,4) préparé au préalable. Le tout est mélangé à l'aide d'un vortex, puis maintenu soit à -80°C pour une conservation de longue durée ou dans de la glace pilée pour une utilisation immédiate.

1.2. Préparation de l'animal et anesthésie

Les souris sont pesées puis anesthésiées par une injection intrapéritonéale (i.p.) de pentobarbital sodique (Ceva santé animal ; 70 mg.kg⁻¹) 20 min avant le début de l'opération. L'analgésie limitée induite par le pentobarbital sodique est palliée par l'utilisation d'une substance morphinique. En effet, 10 min après l'anesthésie, les souris reçoivent une injection sous-cutanée de buprénorphine (BUPRECAR, 0,05 mg.kg⁻¹). Les souris sont positionnées dans un cadre stéréotaxique et leurs yeux sont recouverts d'une goutte de Lacrigel (Europhtha). La température corporelle des animaux est contrôlée par un système de plaque thermorégulatrice avec sonde rectale.

1.3. Injection bilatérale de NMDA

Après incision longitudinale du scalp, la boîte crânienne est perforée à l'aide d'une fraise dentaire aux coordonnées présentées dans le tableau 3. L'ensemble de ces coordonnées d'injection est déterminé par rapport au point de référence Bregma à partir de l'atlas de stéréotaxie Paxinos et Franklin (2004). Cependant, en ce qui concerne les coordonnées dorso-ventrales, les variations neuroanatomiques observées chez nos souris nous ont empêchés d'utiliser une coordonnée identique pour chacune d'entre elles. C'est pourquoi nous avons descendu la micropipette d'injection jusqu'à toucher le plancher de la boîte crânienne, puis nous sommes remontés de 1 mm avant d'effectuer l'injection (technique du *Touch and Up*). L'ensemble des lésions bilatérales du CE est effectué avec 6 injections consécutives (3 par côté). La solution est injectée à l'aide d'un système d'injection composé d'une micropipette de verre (1 μm de diamètre à l'extrémité) reliée à un tube de polyéthylène, lui-même fixé à une microseringue Exmire de 10 μL (ITO Corporation, Fuji, Japon). Ce système est relié à une micropompe (CMA model 100) qui délivre la solution au rythme de 0,1 $\mu\text{L}/\text{min}$. Après injection, la micropipette est laissée en place pendant 5 min, avant d'être retirée. Cette procédure est utilisée dans le but de minimiser l'aspiration du NMDA au cours du retrait de la canule. Pour finir, l'animal est suturé et replacé dans une cage disposée au chaud, jusqu'au réveil complet. Concernant les souris témoins, la même procédure est appliquée, mais aucune solution n'est délivrée.

Expériences	Sites	Coordonnées (mm)			Volume (μL)
		AP	ML	AP	
Expérience 2	1	-4,1	+/- 4,3	T&U	0,075
	2	-4,7	+/-3,5	T&U	0,1
Expérience 3	1	-4,1	+/- 4,2	T&U	0,075
	2	-4,7	+/-3,4	T&U	0,1

Tableau 3 : Tableau récapitulatif de l'ensemble des coordonnées utilisées pour chaque expérience visant la lésion du CE (T&U : Touch and Up). L'expérience 2 fait référence à l'étude II du chapitre I des résultats, et l'expérience 3 fait référence à l'étude II du chapitre II des résultats.

2. Lésion des NCB

Nous avons utilisé la technique de lésion sélective des NCB par la mu p75-saporine (ATS, San Diego, USA). Cette immunotoxine, utilisée spécifiquement chez la Souris, est comparable, sur le principe, à celle utilisée pour le Rat (192 IgG-saporine). La formule de mu p75-saporine étant nouvelle sur le marché au début de nos expériences, nous n'avions aucun recul sur les doses à utiliser. C'est pourquoi il a fallu paramétrer les coordonnées stéréotaxiques d'injection, puis la dose à injecter. Les coordonnées ont été déterminées par des essais d'injection intracérébroventriculaire (i.c.v.) de bleu de méthylène.

2.1. Préparation de la solution de mu p75-saporine et choix de la dose utilisée

Avant utilisation, l'immunotoxine mu p75-saporine arrive au laboratoire sous forme d'une solution à une concentration différente en fonction des lots d'arrivages. Pour éviter de congeler et de décongeler à répétition la solution, celle-ci est aliquotée dans plusieurs petits épendorfs contenant chacun environ 25 μL de solution. Pour la préparation de la solution à la concentration souhaitée, la mu p75-saporine est diluée dans du PBS à pH=7,4, le tout mélangé par centrifugation 2 min à 1000 tour/min, puis conservé soit dans de la glace pilée pour une utilisation immédiate ou à -80°C pour une utilisation ultérieure.

La dose efficace d'immunotoxine a été déterminée à partir des résultats d'expériences préliminaires ciblant différentes concentrations (0,2 à 2,6 $\mu\text{g}/\text{souris}$). La dose retenue est de 0,4 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ pour les souris non transgéniques C57BL/6J et de 0,6 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ pour les souris transgéniques hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4. Ces doses d'immunotoxine sont différentes pour chaque lignée de souris car une petite variation d'efficacité a été décelée en fonction des lots de mu p75-saporine. A ces doses, l'immunotoxine permet de léser de manière efficace et sélective la majorité des neurones cholinergiques du CAB sans effets secondaires : l'apparition de crises convulsives, l'atteinte des cellules de Purkinje (à 1,2 et 2,6 $\mu\text{g}/\text{souris}$) et le risque de mortalité (à partir de 1,2 $\mu\text{g}/\text{souris}$).

2.2. Préparation de l'animal et anesthésie

Les souris sont pesées puis anesthésiées par une injection intrapéritonéale d'un mélange de xylazine (10 mg.kg^{-1} , Rompun 2%, Bayer Pharma) et de kétamine (100 mg.kg^{-1} , Imalgène 500, Merial). Les souris sont positionnées dans un cadre stéréotaxique et leurs yeux sont recouverts d'une goutte de Lacrigel (Europhtha). Tout comme pour les lésions du CE, la température corporelle des souris est contrôlée par une plaque thermorégulatrice avec sonde rectale.

2.3. Injection bilatérale de mu p75-saporine

Après incision longitudinale du scalp, la boîte crânienne est perforée à l'aide d'une fraise dentaire. La solution de mu p75-saporine est délivrée par injection i.c.v bilatérale. Nous avons préféré utiliser la technique d'injection i.c.v. plutôt que la technique intraparenchymateuse pour deux raisons. Premièrement, elle permet d'obtenir une lésion spécifique des neurones cholinergiques du SM et du NBM en une seule injection. Deuxièmement, ce type d'injection permet de minimiser le risque d'atteinte non spécifique du septum par la canule d'injection. Les coordonnées d'injection ont été sélectionnées d'après le travail de Berger-Sweeney et collaborateurs (2001), puis adaptées au référentiel de nos cadres stéréotaxiques grâce aux essais d'injection de bleu de méthylène. Les coordonnées, déterminées par rapport au point de référence *Bregma*, sont résumées dans le tableau 4.

L'immunotoxine est administrée à l'aide d'une canule d'injection (0,28 mm de diamètre externe, 0,18 mm de diamètre interne) reliée à un cathéter en polyéthylène, lui-même relié à une microseringue de $2 \mu\text{L}$. Les injections de $0,5 \mu\text{L}$ par côté sont réalisées manuellement sur une durée de $1 \text{ mn } 30 \text{ s } \pm 10 \text{ s}$. La canule d'injection est laissée en place pendant 5 min, puis relevée de 0,5 mm et laissée à nouveau 3 min avant son retrait. Cette procédure est utilisée dans le but de minimiser l'aspiration de la toxine durant la rétractation de la canule. L'animal est suturé et replacé dans une cage disposée au chaud jusqu'au réveil complet. Durant quelques jours, en plus de leur nourriture habituelle, les souris reçoivent des pâtes alimentaires en guise de complément nutritionnel, de manière à favoriser leur

rétablissement. Toutes les souris témoins subissent une injection de 0,5 μ L de PBS par côté dans les mêmes conditions que pour la solution de mu p75-saporine.

Expériences	Coordonnées (mm)			Volume par côté (μ L)
	AP	ML	AP	
Expérience 1 (Moreau et coll., 2008)	-0,4	+/- 0,6	-2	0,5
Expérience 2	-0,4	+/- 0,6	-2	0,5
Expérience 3	-0,4	+/- 0,6	-2,2	0,5

Tableau 4 : Tableau récapitulatif de l'ensemble des coordonnées utilisées pour chaque expérience visant la lésion des NCB. L'expérience 2 fait référence à l'étude II du chapitre I des résultats, et l'expérience 3 fait référence à l'étude II du chapitre II des résultats.

III. Tests comportementaux

1. Actographie

Ce test est couramment utilisé au laboratoire pour évaluer les effets d'un traitement sur l'activité locomotrice générale. Ces effets sur la locomotion sont intéressants à caractériser du fait de leur interaction potentielle avec d'autres mesures comportementales destinées à évaluer les fonctions cognitives, en particulier dans des tâches de navigation spatiale.

1.1. Dispositif expérimental

Le dispositif (*cf* figure 22) consiste en deux faisceaux infrarouges traversant chaque extrémité de la cage ; ils sont disposés à 4,5 cm au-dessus du niveau du plancher de la cage, et à 28 cm de distance. Les passages de la souris d'un bout à l'autre de la cage sont détectés par des cellules photoélectriques et enregistrés à l'aide d'un ordinateur. Quelques minutes avant le début du test, les souris sont placées dans des cages (42 x 26 x 15 cm) adaptées aux dimensions du système.

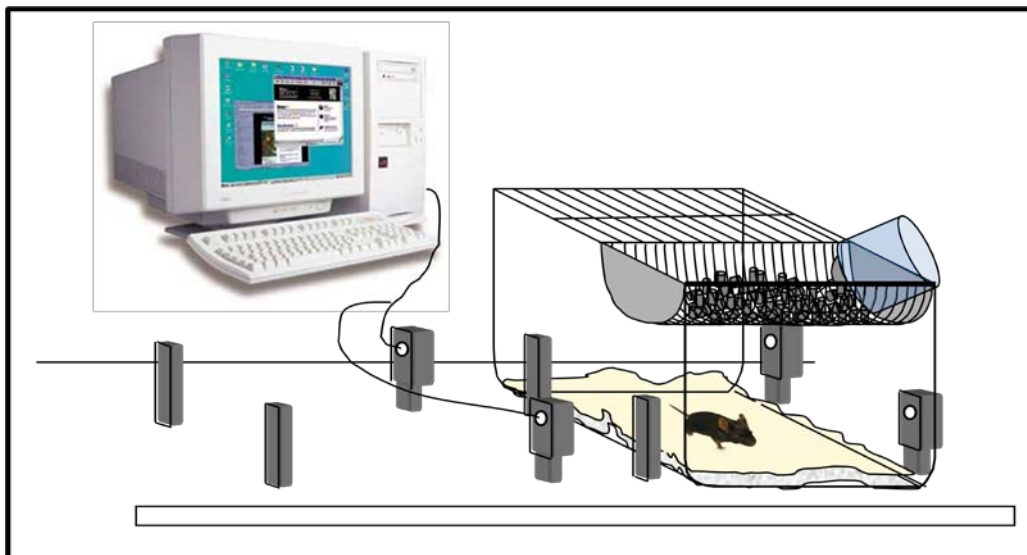


Figure 22 : Représentation graphique du dispositif d'actographie.

1.2. Protocole

L'actographie se passe en deux étapes. La première, relevant l'activité locomotrice pendant une première phase de 3 h et appelée phase d'habituation, permet d'évaluer l'adaptation des animaux à la nouveauté de la situation. La seconde se passe sur les 21 h suivantes, donnant ainsi une évaluation de l'activité locomotrice de base pendant les périodes diurne et nocturne.

2. **Test de la barre**

Le test du franchissement de la barre permet d'évaluer la coordination sensorimotrice des souris. Il permet de vérifier l'existence de biais sensorimoteurs pouvant affecter les résultats obtenus dans les autres tests comportementaux. Ces biais sensorimoteurs pourraient notamment apparaître dans le cas où l'immunotoxine mu p75-saporine détruirait les cellules de Purkinje chez nos souris, comme cela a été décrit après l'injection i.c.v. de 192 IgG-saporine chez le Rat (Traissard et coll., 2007).

2.1. Dispositif expérimental

Le dispositif comprend une planche en bois (80 cm x 10 cm x 1 cm) avec une plateforme rectangulaire située à une extrémité. La planche est orientée horizontalement sur la tranche et est maintenue par un trépied à 90 cm du sol. Un matelas est placé sous le dispositif dans le cas où une souris tomberait (*cf* figure 23).



Figure 23 : Photographie illustrant le test de la barre (le matelas ne figure pas sur cette illustration).

2.2. Protocole

Les souris sont testées individuellement lors de 4 essais successifs. Avant de commencer le test proprement dit, on réalise un essai de familiarisation consistant à déposer la souris sur la barre à quelques centimètres de la plate-forme et à attendre son déplacement vers celle-ci, tout en bloquant tout déplacement de l'autre côté. Lors des 4 essais suivants, les souris sont déposées à l'extrémité dépourvue de plate-forme. Trois paramètres sont mesurés : le temps mis pour dépasser le premier segment de 10 cm, ce temps permettant d'évaluer l'impact des facteurs émotionnels liés aux conditions du test ; le temps total nécessaire pour traverser les 70 cm restants qui permet d'objectiver la performance de coordination sensorimotrice ; puis le nombre de chutes (très rares chez les animaux intacts).

3. **Piscine de Morris**

Le principe du test de la piscine de Morris ayant été présenté dans la partie II de l'introduction, seuls le dispositif expérimental que nous avons utilisé ainsi que les protocoles de tests choisis seront présentés ici.

3.1. Dispositif expérimental

Le dispositif consiste en une piscine circulaire, de 140 cm de diamètre pour 40 cm de hauteur, posée sur un socle l'élevant à 58 cm du sol (*cf* figure 24). Elle est remplie d'eau opacifiée par du lait en poudre à une hauteur de 20 cm. La température de l'eau est de 20°C \pm 1°C. Cette température rend le dispositif suffisamment aversif pour éviter les comportements de flottement passif typiquement observés chez les souris C57BL/6J. La piscine est située dans une pièce expérimentale comportant divers éléments (chauffe-eau, portoir à cages, formes contrastées sur le mur, radio) pouvant servir d'indices aux souris. La plate-forme est circulaire, mesure 10 cm de diamètre et est immergée à 1 cm sous l'eau. La tâche des souris consiste à retrouver cette plate-forme le plus directement possible. Une caméra, positionnée au plafond et reliée à un ordinateur (système Ethovision video tracking system, version 2.3, Noldus Information Technology, Wageningen, Pays-Bas) permet de suivre et d'enregistrer la trajectoire des animaux. A partir de cet enregistrement, il est

possible d'obtenir la latence d'arrivée à la plate-forme, la distance parcourue ou la durée de séjour dans des zones d'intérêt ou sur la totalité de la piscine.



Figure 24 : Photographie illustrant le dispositif expérimental de la piscine de Morris utilisé dans le cadre de cette thèse.

3.2. Protocole

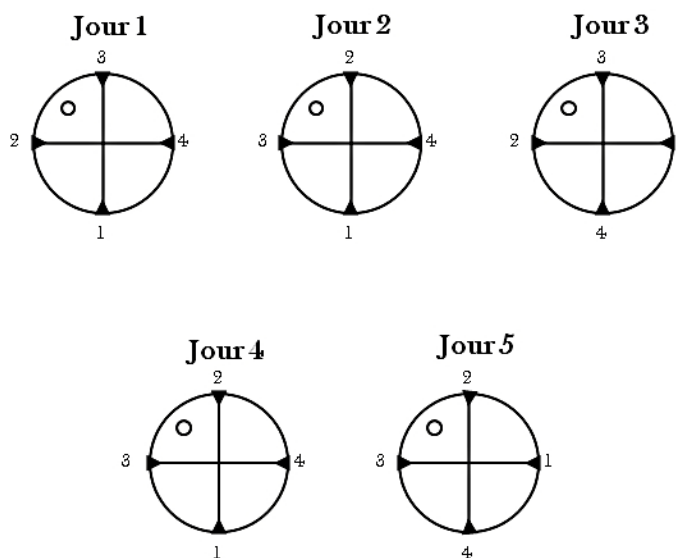
3.2.1. Protocole de mémoire de référence

De manière à avoir une habitude au contexte, les souris sont amenées dans la pièce au minimum 30 min avant chaque séance. Ce protocole est réalisé en plusieurs étapes et sur 8 jours consécutifs. La première étape a pour but de familiariser les animaux au dispositif expérimental lors d'une séance d'habitude d'une minute. Les souris sont placées individuellement au centre de la piscine avec 3,5 cm d'eau. Le couvercle de la plate-forme est visible et positionné à quelques centimètres du bord, de manière à ce que les souris puissent facilement la trouver et se hisser dessus. Le deuxième jour, une séance de 2 min d'exploration libre est effectuée avec la piscine remplie, mais sans plate-forme, ce qui oblige les souris à s'habituer à nager dans ces conditions. Le jour suivant, les souris entament la phase d'acquisition de 5 jours (*cf* figure 25A), au cours de laquelle elles apprennent à retrouver la plate-forme immergée à une position fixe dans la piscine et par rapport aux

indices de la pièce. L'ensemble des souris passe par un protocole d'essais discrets. En effet, elles passent par groupes de 3, l'une après l'autre selon un roulement, au rythme de 4 essais par jour, ce qui donne un intervalle d'environ 5 min entre chaque essai pour chaque souris. Pour éviter le développement de stratégies égocentriques (mémorisation d'une trajectoire à partir d'un point fixe), le point de départ des animaux varie tous les jours selon un ordre bien précis et pseudo-aléatoire. Cependant, les points de départ de chaque premier et dernier essai de chaque séance sont situés à la même distance (la plus éloignée) de la plate-forme, de manière à pouvoir éventuellement comparer l'évolution des performances entre ces essais au cours d'une séance, et d'un jour à l'autre. Pratiquement, les souris sont placées dans l'eau face à la paroi et disposent de 60 s maximum pour trouver la plate-forme. Si, à ce terme, les souris nagent encore, elles sont guidées délicatement à la plate-forme pour y séjourner 10 s.

Vingt-quatre heures après la dernière séance d'entraînement, les performances de mémoire spatiale sont évaluées lors d'un test de rétention (essai libre) de 60 s sans plate-forme (cf figure 25B). On mesure le temps passé dans le quadrant cible où se trouvait précédemment la plate-forme. Ces données sont comparées à celles mesurées dans les trois autres quadrants.

A. Protocole d'Acquisition (5 jours)



B. Test de rétention (24h)

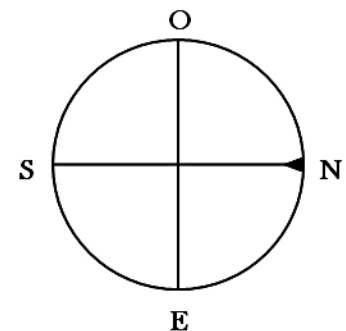


Figure 25 : Protocole de mémoire de référence en piscine de Morris (▲: points de lâcher).

3.2.2. Protocole de piscine avec plate-forme visible

Cette tâche a pour but de vérifier l'absence de biais sensorimoteurs ou le manque de motivation pour échapper à l'eau. Au cours du test, la plate-forme est visible, car elle dépasse de 1 cm la surface de l'eau. Les souris passent toujours par groupes de 3, chacune à leur tour, selon 4 essais dont le point de départ est pseudo-aléatoire, mais cette fois toujours à la même distance de la plate-forme (cf figure 26). Comme précédemment, la distance parcourue et la latence d'arrivée à la plate-forme sont mesurées.

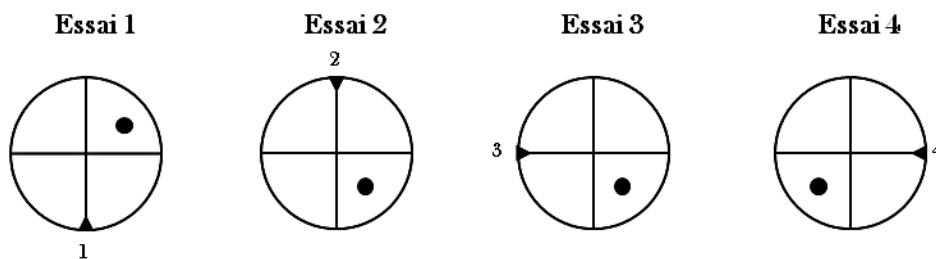


Figure 26 : Protocole de plate-forme visible en piscine de Morris (▲: points de lâcher).

4. Labyrinthe de Barnes

Tout comme pour la piscine de Morris, le principe du test du labyrinthe de Barnes étant développé dans la partie II de l'introduction, seuls le dispositif expérimental et le protocole utilisé seront ici présentés.

4.1. Dispositif expérimental

Le dispositif est une plate-forme circulaire d'1 mètre de diamètre avec 12 trous de 4 cm de diamètre situés sur la circonférence, à 9 cm du bord (cf figure 27). La plate-forme est placée au milieu de la pièce, à 65 cm de hauteur, et posée sur un tabouret à siège rotatif permettant de la tourner aisément. Un tube flexible en plastique blanc relie l'un des trous de la plate-forme à la cage de la souris. Cette cage est placée centralement sous la plate-forme. La pièce comporte plusieurs indices (étagères, armoire, formes sur les murs, meubles, radio) facilitant l'orientation des souris. Au cours des premières expériences (**Publications 1 et 2**) nous avons opté pour une forme peu aversive de la situation, reposant sur un éclairage

modéré (40 lux) de l'ensemble de la plate-forme. Cependant, nous nous sommes rapidement aperçus que la situation n'était pas assez aversive pour les souris, celles-ci avaient tendance à explorer de manière plus importante la plate-forme en fin d'apprentissage en négligeant (plusieurs fois) le trou cible. C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser un éclairage plus fort (200 lux) pour les dernières expériences concernant les souris transgéniques, et de réduire le nombre de jours d'apprentissage de 6 à 5 jours car ce regain d'exploration affectait les performances.



Figure 27 : Photographie illustrant le dispositif expérimental du labyrinthe de Barnes utilisé dans le cadre de cette thèse.

4.2. Protocole

En ce qui concerne le protocole d'apprentissage et de rappel de la tâche, nous avons suivi un protocole de mémoire de référence. Celui-ci a changé au cours des différentes expériences, c'est pourquoi le nombre de jours d'apprentissage ainsi que le temps écoulé entre le dernier jour de la phase d'apprentissage et le test de rétention (*cf* tableau 5). Cependant le principe reste fondamentalement le même pour toutes les expériences.

Trois jours avant le test, les souris sont familiarisées au système de tube flexible par un entraînement, sur la base de 3 essais quotidiens. Elles doivent, à chaque essai, passer de la main de l'expérimentateur à leur cage en empruntant le tube flexible. Les 5/6 jours suivants constituent la phase d'apprentissage. La cage est connectée, *via* le tube flexible, à un trou (le trou cible) dont la position reste rigoureusement la même pour une souris donnée. Quatre positions de trou cible ont été utilisées et attribuées au hasard aux souris. Les souris passent, tout comme pour le test de la piscine de Morris, par un protocole d'essai discret. En effet, elles réalisent la tâche par groupes de 4, à tour de rôle, au cours de 3 essais par jour. Pour une souris donnée, l'intervalle entre deux essais est d'environ 15 min. La souris est placée dans un cylindre opaque posé au centre de la plate-forme, puis celui-ci est retiré quelques secondes après. Elle dispose alors de 3 min pour entrer dans le trou cible. Au terme de l'essai, la souris est guidée délicatement vers le trou si nécessaire. Entre chaque essai, la plate-forme est essuyée avec un chiffon imbibé d'alcool à 70%, de manière à éviter au mieux le risque d'un guidage par traces olfactives, puis elle est tournée selon un protocole pseudo-aléatoire très strict. A chaque essai, on relève la latence de visite et d'entrée dans le trou cible et l'ordre de visite des trous. Ce dernier permet de calculer le nombre d'erreurs effectuées par les souris.

Pour évaluer les performances de mémoire spatiale, un test de rétention est réalisé quelques jours après la dernière séance d'apprentissage (*cf* tableau 5). La souris explore librement la plate-forme pendant un essai libre de 2 min, sans qu'aucun trou ne soit relié à sa cage. Pendant cet essai, sont relevés l'ordre de visites des trous ainsi que la latence pour atteindre le trou cible précédemment relié à la cage.

Expériences	Acquisition	Test de rétention
Expérience 1 (Moreau et coll., 2008)	6 jours	16 jours
Expérience 2 (Moreau et coll., 2010)	6 jours	16 jours
Expérience 3	5 jours	11 jours

Tableau 5 : Tableau illustrant le nombre de jours d'acquisition et le délai entre la phase d'acquisition et le test de rétention pour chaque expérience.

5. Tâche de reconnaissance spatiale et de reconnaissance d'objets

La tâche de reconnaissance a pour but d'évaluer les capacités des souris à détecter un objet déplacé dans un environnement familier comprenant plusieurs objets, ou bien un objet nouveau parmi d'autres familiers. Elle est basée sur un comportement spontané de l'animal, en l'occurrence sur la tendance naturelle des rongeurs à explorer préférentiellement un élément nouveau par rapport à un élément connu.

5.1. Dispositif expérimental

Le dispositif, présenté dans la figure 28, consiste en une enceinte ouverte (*open field*) en plexiglas composée d'un plancher horizontal carré translucide mesurant 52 cm de côté et de parois verticales noires d'une hauteur de 40 cm. La surface du plancher est translucide et divisée en 25 carreaux identiques par des lignes noires. Le plancher est éclairé modérément par une ampoule de 60W centré 32 cm en dessous de la surface. Une carte plastifiée (21 cm x 29,7 cm), présentant des bandes verticales noires sur fond blanc, est fixée sur l'une des parois de l'enceinte. Lors de la tâche, nous avons utilisé 5 objets différents en taille, en couleur et en texture. Les objets utilisés pour la tâche de reconnaissance spatiale et d'objets sont : un dé à coudre de porcelaine collé sur un jeton de couleur jaune, une roue dentée en plastique gris, un "éventail" de plastique jaune, un "essieu" de plastique blanc collé sur un jeton rectangulaire de plastique bleu, une attache murale de couleur beige et une bille de verre noire. A la fin de chaque session, tous les objets sont plongés dans l'alcool (éthanol 70

%) puis séchés, afin d'éliminer les odeurs laissées par les souris au cours de la passation du test, et chaque objet est toujours manipulé avec des gants. Durant la procédure, l'expérimentateur observe les déplacements des souris à partir du reflet de l'enceinte sur une des parois pour perturber le moins possible le comportement des animaux.



Figure 28 : Illustration du dispositif de reconnaissance spatiale et d'objets présentant, en haut, l'*open field* et, en bas, les objets utilisés pour chacun des deux protocoles.

5.2. Protocoles

5.2.1. Protocole de reconnaissance spatiale

Le protocole de test a été adapté de Bour et collaborateurs (2008). Dans ce protocole, le principe pour la souris est de détecter le déplacement de 2 objets parmi les 5 présentés au préalable, les 3 autres étant laissés à la même position. La tâche comporte 3 phases d'exploration, espacées chacune par une pause de 5 min au cours de laquelle les souris sont replacées dans leur cage (cf figure 31).

5.2.1.1. La phase d'habituation

La première phase est la phase d'habituation. Elle a pour but de familiariser la souris à l'environnement dans lequel seront placés les différents objets. La souris est toujours placée la tête dirigée vers un coin de l'enceinte. Au cours de cette phase, elle explore librement l'enceinte, sans objet, pendant 5 min. Durant l'exploration, on mesure l'activité locomotrice des souris par le nombre de carreaux traversés. Les comptages sont effectués minute par minute.

5.2.1.2. La phase d'acquisition

La deuxième phase est la phase d'acquisition. La souris est replacée au même endroit que pour la séance d'habituation et est laissée 15 min en exploration libre. Durant cette phase, 5 objets sont présents dans l'enceinte, selon la configuration indiquée sur la figure 31. Le temps d'exploration de chaque objet est chronométré manuellement (en secondes) et l'on considère que l'animal explore lorsque son museau est à moins de 1 cm de l'objet d'intérêt. A partir du moment où une souris mordille un objet, monte sur celui-ci ou frôle l'objet en passant à côté, ces comportements ne sont pas chronométrés.

5.2.1.3. La phase de rétention

La troisième phase est la phase de rétention. L'animal est replacé dans l'enceinte durant 15 min et explore librement les objets dont la configuration spatiale a été modifiée par le déplacement de deux objets (cf figure 31 ; dé à coudre en porcelaine et roue dentée en plastique gris).

5.2.2. Protocole de reconnaissance d'objets

Ce protocole permet de vérifier que la souris est bien capable de discriminer un objet nouveau remplaçant un des objets familiers. Vingt-quatre heures après la dernière phase de la tâche de reconnaissance spatiale, les souris sont soumises à une dernière séance d'exploration de 15 min. Au cours de cette séance, un des 5 objets familiers (l'attache murale de couleur beige) est remplacé par un nouvel objet (cf figure 29 ; bille de verre

noire). L'ensemble des objets est situé dans la même configuration spatiale que lors de la phase de rétention. A nouveau, le temps d'exploration de chaque objet est mesuré manuellement à l'aide de chronomètre.

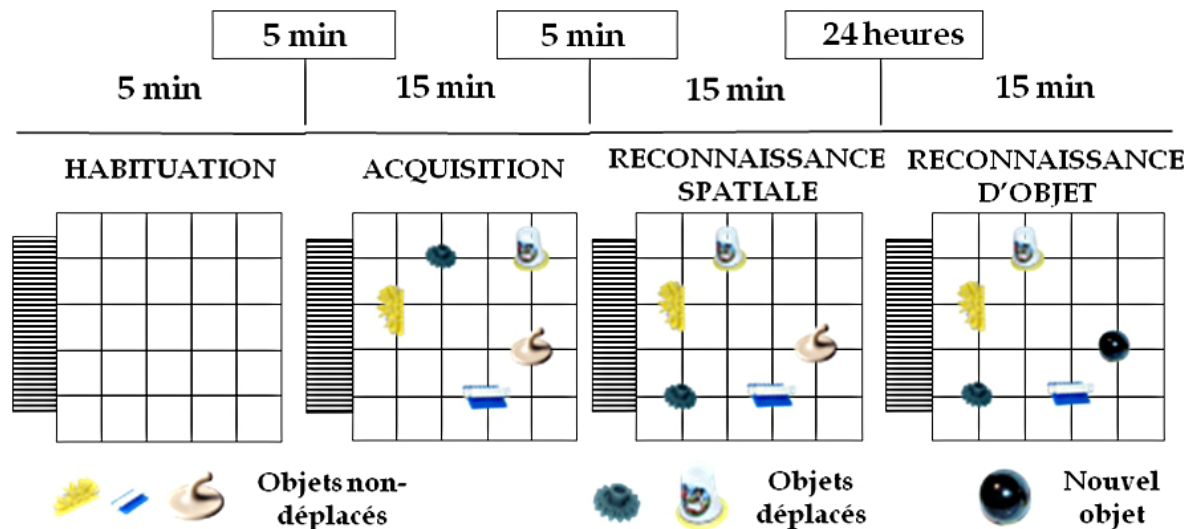


Figure 29 : Schéma illustrant le protocole utilisé pour le test de mémoire de reconnaissance.

6. Tâche des cages claire-obscur

La tâche des cages claire-obscur est un test couramment utilisé pour évaluer l'anxiété chez les souris (Belzung et coll., 1989). Elle est basée sur la tendance naturelle des souris à fuir les environnements fortement éclairés et ouverts en se réfugiant plutôt dans un environnement sombre et fermé.

6.1. Dispositif expérimental

Le test des cages claire-obscur est composé de deux cages de taille équivalente (19 cm x 19 cm x 14,5 cm) recouvertes d'un couvercle de plexiglas (*cf* figure 30). Les deux cages sont reliées par un couloir (7 cm x 5 cm x 10 cm) permettant à la souris de se déplacer de l'une à l'autre. L'une des cages est maintenue dans l'obscurité par des parois et un couvercle opaque tandis que l'autre, avec parois et couvercle transparents, est fortement éclairée par une lampe (40W) placée à 25 cm au-dessus du couvercle.

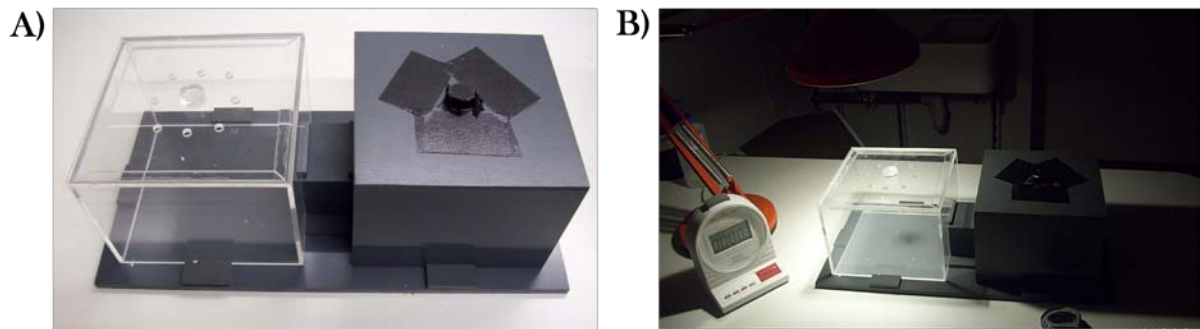


Figure 30 : Photographies représentant le dispositif expérimental des cages claire-obscur utilisées dans le cadre de cette thèse. (A) Vue générale du dispositif ; (B) Vue du dispositif lors de la passation du test.

6.2. Protocole de test

Les souris sont évaluées en phase nocturne, durant leur pic d'activité (20h30-22h30). Lors de la phase de test, les souris sont introduites dans la cage obscure. Pendant 5 min, l'animal est libre d'explorer le dispositif. Trois variables comportementales sont mesurées : (1) le temps mis par l'animal pour entrer dans la cage claire ; (2) le nombre de transitions effectuées entre les deux cages ; (3) le temps passé dans la cage claire.

IV. Techniques histologiques et immunohistochimiques

1. Euthanasie des souris et fixation des tissus par perfusion

A l'issue de la période de test, les souris reçoivent une injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (365 mg.kg^{-1}). Pour fixer leur cerveau, les souris sont perfusées pendant 7 min avec une solution de paraformaldéhyde à 4% (tampon phosphate 0,1M ; pH 7,4 ; 4°C). Le cerveau est extrait et placé pendant encore 4 h dans cette solution. Une cryoprotection est réalisée en immergeant les cerveaux pendant 48 h dans une solution de saccharose à 20 % (tampon phosphate 0,1M ; pH 7,4 ; 4°C). Au final, le cerveau est congelé dans une solution d'isopentane refroidi dans de la carboglace à -40°C environ. Les cerveaux sont conservés dans un congélateur à -80°C. Des coupes de 40 μm d'épaisseur sont effectuées à l'aide d'un microtome dans un cryostat. Une partie est recueillie sur lame gélatinée, destinée aux différents marquages histochimiques (Crésyl, AChE), tandis que l'autre est mise en puits de cryoprotectants pour les marquages immunologiques (ChAT, Parv, Calb). Les coupes en puits et les lames destinées au marquage AChE sont conservées à -20°C. Les coupes destinées au marquage crésyl sèchent à température ambiante.

2. Coloration au violet de crésyl

Cette coloration est principalement utilisée pour évaluer l'étendue des lésions du CE et, éventuellement, pour vérifier les traces de canule d'injection et d'éventuelles pertes cellulaires ou gliales au niveau du septum. Après plusieurs bains de rinçage à l'eau distillée, les coupes sont passées dans un bain de violet de crésyl chauffé à 50°C. Ce colorant marque sélectivement les corps de Nissl, permettant de ce fait une visualisation aisée des noyaux cellulaires (neurones, glie, etc...). Les coupes sont ensuite rincées dans de l'eau distillée, puis différenciées dans une solution d'alcool-acide. Elles sont ensuite déshydratées dans des bains d'alcool de concentration croissante. Pour terminer, les lames sont montées sous lamelle dans un milieu d'inclusion (Eukitt) et sont observées au microscope optique.

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

3.1. Protocole de coloration

La révélation de l'AChE (enzyme de dégradation de l'acétylcholine) est effectuée pour visualiser les lésions induites par l'injection de mu p75-saporine. Cette technique de coloration a été mise au point par Koelle (1954) et améliorée par Butcher en 1984. L'AChE se situe principalement dans les terminaisons des projections cholinergiques du SM/BDB, de la BDB et du NBM. Cette technique de révélation est réalisée en 2 étapes, dont la première est l'incubation des coupes. Celles-ci sont tout d'abord rincées à l'eau distillée, puis plongées pendant 15 à 18 h dans une solution mère chauffée à 37°C composée de glycine, de sulfate de cuivre (CuSO₄, 5H₂O), d'acétate de sodium et contenant de l'éthopropazine ou de l'isompa, qui sont tous deux des inhibiteurs des cholinestérases non spécifiques, et de l'acétylthiocholine iodique, qui constitue un substrat pour l'AChE. Au cours de la deuxième phase, la révélation a pour but de visualiser le produit de dégradation par un bain de sulfure de sodium (8mM) pour révéler, par une coloration brune, le produit de la réaction donnant une indication de l'activité de l'enzyme et donc de la présence de terminaisons des neurones cholinergiques. Pour ce faire, les coupes sont rincées dans des bains successifs d'eau distillée, puis passées dans une solution de sulfure de sodium (8 mM), suivie de bains d'alcool de concentration croissante. Les lames sont finalement montées sous des lamelles dans un milieu d'inclusion (Eukitt).

3.2. Quantification de l'activité de l'AChE

Le marquage de l'activité de l'AChE est quantifié par densité optique (DO). Pour ce faire, nous avons utilisé un logiciel d'analyse d'image (Explora Nova, La Rochelle, France). Les coupes sont numérisées et agrandies 22 fois à l'aide d'un banc optique Kaiser Prolite 5000 (Kaiser Fototechnik, Buchen, Germany) couplé à une caméra vidéo (Model XC 77CE) équipée d'un objectif Nikkon 60 mm monté sur un tube d'extension Triplux. La DO est mesurée à partir des images obtenues par numérisation, après avoir délimité les régions cérébrales d'intérêt (le cortex somatosensoriel, piriforme, rétrosplénial, auditif, visuel, périrhinal et

entorhinal, l'amygdale et l'hippocampe dorsal et ventral). La moyenne des DO enregistrées au niveau du corps calleux est prise comme valeur de référence sur chaque coupe. Celui-ci ne contenant pas d'AChE, cette valeur contrôle est soustraite à toutes les mesures d'une même coupe avant le début des analyses.

4. Marquages immunohistochimiques

4.1. Protocole de coloration

Les coupes destinées aux marquages immunohistologiques sont plongées trois fois 10 min dans du PBS, de manière à rincer la solution de cryoprotection. Puis les coupes sont incubées pendant 1 h dans du sérum d'âne (Biowest, Nuaille, France), dilué à 10% dans du PBS, afin de saturer les sites non spécifiques où peuvent se fixer les anticorps. Après 3 nouveaux rinçages au PBS, les coupes sont incubées à température ambiante pendant 18 h avec l'anticorps primaire (cf tableau 6).

Antigène	Espèce	Dilution	Fournisseur
ChAT	Chèvre (Polyclonal)	1:500	Chemicon International, Temecula, CA
Parv	Souris (Monoclonal)	1:2000	Chemicon International, Temecula, CA
Calb	Lapin (Polyclonal)	1:1000	Chemicon International, Temecula, CA

Tableau 6 : Anticorps primaires.

Après 3 rinçages au PBS, les coupes pré-incubées avec l'anticorps primaire sont trempées pendant 1 h dans une solution contenant l'anticorps secondaire biotinylé (cf tableau 7).

Antigène	Espèce	Dilution	Fournisseur
Anti-chèvre	Ane	1:500	Chemicon International, Temecula, CA
Anti-souris	Cheval	1:500	Vector Laboratories, Burlingame, CA
Anti-lapin	Chèvre	1:500	Vector Laboratories, Burlingame, CA

Tableau 7 : Anticorps secondaires.

Les coupes pré-incubées avec un anticorps couplé à un fluorochrome sont rincées puis montées entre lame et lamelle avec un milieu de montage pour fluorescence (VectaShield Hard Set, Vector laboratories, Burlingame, CA).

Les coupes incubées avec un anticorps biotinylé sont rincées puis trempées pendant 45 min avec le complexe standard avidine-biotine-peroxidase (1:500 ; Vectastain Elite ABC, Vector Labs, Burlingame, CA), puis rincées deux fois dans une solution de PBS contenant 0,6% de tampon Tris (pH 7,6), avant d'être exposées à un mélange composé de 0,0125% de 3.3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride et de tampon Tris contenant 0,0075% de H₂O₂ (Peroxidase Substrate Kit DAB, Vector laboratories, Burlingame, CA), jusqu'à l'obtention d'un bon rapport marquage/bruit de fond. La réaction est alors arrêtée par deux rinçages au PBS. Les coupes sont montées sur des lames gélatinées, laissées séchées à température ambiante, puis déshydratées et montées entre lame et lamelle avec de l'Eukitt.

Des coupes sans traitement avec un anticorps primaire servent de contrôle négatif (absence de marquage).

4.2. Comptage des neurones dans le SM/BDB et NBM

L'ensemble du protocole de comptage neuronal pour l'ensemble de ce travail est présenté en détail dans la **publication 1**.

CONTRIBUTION EXPERIMENTALE

CHAPITRE 1

Modélisation de l'atteinte du cortex entorhinal et des neurones cholinergiques de la base antérieure chez des souris non transgéniques C57BL/6J.

CHAPITRE 1

Modélisation de l'atteinte du cortex entorhinal et des neurones cholinergiques de la base antérieure chez des souris non transgéniques C57BL/6J.

Dans ce chapitre, le travail consigné se rattache à deux de mes principales études dont le but, *in fine*, est d'établir un modèle de lésions combinées du CE et des NCB chez la souris. Nous avons ainsi, dans un premier temps, paramétré la lésion des NCB et testé ses effets comportementaux sur des souris mâles C57BL/6J. Puis, dans un deuxième temps, nous avons évalué et comparé l'effet comportemental de la lésion combinée du CE et des NCB et l'effet de chaque lésion seule sur des souris mâles C57BL/6J. Ce chapitre est ainsi structuré en deux parties faisant l'objet de deux publications, la première publiée en 2008 et la deuxième présentée sous forme rédigée.

EXPERIENCE 1

Mise au point de la lésion des neurones cholinergiques de la base du cerveau antérieur et caractérisation des effets comportementaux

Dans un premier temps, cette expérience visait à mettre au point la lésion des NCB. Pour ce faire, nous avons utilisé la méthode d'injection i.c.v de mu p75-saporine. Il s'agit d'une immunotoxine spécifique des neurones cholinergiques adaptée à la Souris. Tout comme celle utilisée chez le Rat (192 IgG-saporine), la mu p75-saporine est une cytotoxine d'inactivation ribosomale couplée à un anticorps dirigé contre le récepteur p75 du facteur de croissance *nerve growth factor* (NGF) murin. Ce récepteur étant situé sur les neurones cholinergiques du SM, de la BDB et du NBM, il nous a paru intéressant d'utiliser la toxine mu p75-saporine pour léser sélectivement les NCB. Une immunotoxine semblable fut déjà utilisée dans deux études en vue d'analyser le rôle fonctionnel du système cholinergique murin (Berger-Sweeney et coll., 2001 ; Hunter et coll., 2004). Néanmoins, cette version de l'immunotoxine manquant d'efficacité, nous avons donc choisi d'utiliser et de tester l'effet d'une nouvelle formule, disponible sur le marché en début d'année 2007. Pour cette première étude, il a été indispensable de valider les coordonnées stéréotaxiques des points d'injection de la toxine et la dose nécessaire et suffisante pour obtenir une lésion massive et sélective des neurones cholinergiques. Lors de cette mise au point, nous avons testé quatre doses croissantes de mu p75-saporin : 0,2 µg/souris, 0,6 µg/souris, 1,2 µg/souris et 2,6 µg/souris. Vingt jours après l'opération, la qualité de la lésion a été vérifiée par un marquage immunohistochimique de la ChAT pour visualiser les neurones cholinergiques du SM, de la BDB et du NBM. Nous avons également effectué un marquage enzymohistochimique de l'AChE dans l'optique de vérifier la perte des projections cholinergiques aussi bien dans le manteau cortical que dans l'hippocampe. D'autres vérifications histologiques ont été réalisées en raison des résultats observés par Berger-Sweeney et collaborateurs en 2001,

selon lesquels l'ancienne version de l'immunotoxine mu p75-saporine provoquait une atteinte des neurones GABAergiques du SM chez des souris de même lignée que les nôtres. De plus, chez le Rat, la 192 IgG-saporine injectée en i.c.v. entraîne également une atteinte des neurones GABAergiques du SM tout comme une diminution du nombre de cellules de Purkinje dans le cervelet. C'est pourquoi, en complément de la ChAT et de l'AChE, nous avons réalisé un immunomarquage de la parvalbumine, qui permet de marquer sélectivement les cellules GABA, et de la calbindine, qui marque sélectivement les cellules de Purkinje, pour contrôler respectivement la survie des cellules GABA existantes et les cellules de Purkinje.

Une fois la dose sélectionnée, nous avons évalué les effets de l'immunotoxine mu p75-saporine sur les fonctions cognitives, locomotrices et sensorimotrices. Pour ce faire, nous avons utilisé plusieurs tests comportementaux : des tâches de mémoire spatiales, telles que la piscine de Morris et le labyrinthe de Barnes, et deux autres tâches, telles que l'actographie et le test de la Barre.

L'ensemble de ces travaux a été réalisé pendant mon master II et en début de thèse. Il fait l'objet de la **publication 1**.

PUBLICATION 1

Moreau P-H., Cosquer B., Jeltsh H., Cassel J-C., Mathis C.

**Neuroanatomical and behavioral effects of a novel version of the
cholinergic immunotoxin mu p75-saporin in mice.**

Hippocampus (2008), 18:610-622.

HIPPOCAMPUS 18:610–622 (2008)

Neuroanatomical and Behavioral Effects of a Novel Version of the Cholinergic Immunotoxin mu p75-Saporin in Mice

Pierre-Henri Moreau, Brigitte Cosquer, Hélène Jeltsch,
Jean-Christophe Cassel, and Chantal Mathis*

ABSTRACT: The selective lesion of basal forebrain cholinergic neurons (BFCNs) is an unestimable tool to study the implication of these neurons in cognition, an interest widely motivated by their degeneration in Alzheimer's disease. Here we evaluated the histochemical and behavioral effects of a selective lesion of BFCNs in C57BL/6J mice treated intracerebroventricularly (ICV) with a novel version of the immunotoxin mu p75-saporin (0.4 µg/mouse). There was a 100% postsurgical survival rate, no abnormal loss of weight, no disruption of sensorimotor coordination, and no noncognitive bias in a water-maze test. This immunotoxin induced a loss of choline acetyltransferase-positive neurons in the medial septum (−82%) and in the nucleus basalis (−55%). Preserved parvalbumine-immunostaining suggests that the lesion was specific to BFCNs. Septo-hippocampal and basalo-cortical projections of BFCNs degenerated as suggested by massive loss of acetylcholinesterase-positive staining in the hippocampus and the cortical mantle. Moreover, anticalbindin immunostaining showed no damage to cerebellar Purkinje cells. Lesioned mice displayed increased diurnal and nocturnal locomotor activity. Their spatial learning/memory performances in a water maze and in a Barnes maze were significantly impaired: learning was substantially slowed down, although not obliterated, and memory retention was altered. These behavioral consequences are comparable, with fewer side effects, to those reported after ICV 192 IgG-saporin in rats. In conclusion, the new version of mu p75-saporin provides a safe and powerful tool for BFCN lesion in mice. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: cholinergic lesion model; cognition; Alzheimer's disease; basal forebrain; locomotor activity

INTRODUCTION

Usual characteristics of Alzheimer's disease (AD) include progressive impairments of memory and attention, neurofibrillary tangles (NFTs), amyloid deposits, and a loss of basal forebrain cholinergic neurons (BFCNs). NFTs and amyloid deposits were expressed in transgenic mice, which also exhibit memory impairments and some neurodegeneration, although rarely BFCN loss (Gotz et al., 2004; McGowan et al.,

2006). In AD patients, Perry et al. (1978) established a correlation between cholinergic degeneration and memory alterations, suggesting that this degeneration contributed to memory dysfunctions. This view was supported by clinical and experimental approaches investigating the cognitive consequences of anticholinergic drugs or various lesions affecting the basal forebrain (BF; Mesulam, 2004; Schliebs and Arendt, 2006). However, most of these lesions were criticized, among other reasons, for their lack of cholinergic selectivity. With the immunotoxin 192 IgG-saporin, an immunoglobulin recognizing p75^{N^TF} receptors coupled to the ribosomal toxin saporin, selective damage of the BFCNs became possible in rats (Leanza et al., 1995). Unfortunately, this immunotoxin does not recognize mouse cells. A similar neurotoxin in mice would allow the characterization of functional implications of BFCNs in this species and open interesting perspectives as regards possible interactions between the AD-related transgene(s) and BFCNs lesions in transgenic mouse models.

A first version of the mu p75-saporin (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA) has been tested by Berger-Sweeney et al. (2001). When injected intracerebroventricularly (ICV; 0.4 to 7.1 µg/mouse), significant cholinergic damage was found from 1.8 µg onwards: hippocampal choline acetyltransferase (ChAT) activity was decreased (at most −60%), and severe deficits were found in a water-maze task, although partly linked to noncognitive side effects. Contrasting with the effects of 192 IgG-saporin in rats, this toxin preserved other p75^{N^TF} receptor-bearing neurons like cerebellar Purkinje cells (Heckers et al., 1994). It also preserved BF GABAergic neurons, as deduced from near-normal glutamic acid decarboxylase activity in the cortex and the hippocampus. Surprisingly, cholinergic neurons in the nucleus basalis (NB) were weakly affected (−20% reduction of cortical ChAT activity), even at the highest dose (7.1 µg). In addition, the postsurgical death rates were high even at the dose used for behavioral testing (100% with 7.1 µg, 32% with 3.6 µg). These are probably reasons why this immunotoxin has been used in a very limited number of studies since 2001 (Berger-Sweeney et al., 2001; Hunter et al., 2004). Late in 2006, an improved version of mu p75-saporin became available, with an ED50 in the picomolar

Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives, UMR7191 CNRS, Equipe de Neurobiologie Cognitive et Comportementale, Université Louis Pasteur, IFR 37 de Neurosciences, GDR 2905 CNRS, 12 rue Goethe, 67000 STRASBOURG, France

Grant sponsors: University Louis Pasteur, the Centre National de la Recherche Scientifique.

*Correspondence to: Chantal Mathis, PhD, Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives, UMR7191 CNRS, Equipe de Neurobiologie Cognitive et Comportementale, ULP, 12 rue Goethe, 67000 STRASBOURG, France. E-mail: chantal.mathis@linc.u-strasbg.fr

Accepted for publication 11 January 2008

DOI 10.1002/hipo.20422

Published online 27 February 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

© 2008 WILEY-LISS, INC.

range vs. nanomolar for the former one (information on <http://www.atsbio.com/>; compare with Berger-Sweeney et al., 2001).

Using this novel version of *mu* p75-saporin in mice, the present study first aimed at establishing a dose for ICV injections enabling maximal postsurgical survival, extensive damage to BFCNs, and minimal nonspecific effects. This dose was subsequently used to characterize the effects of the lesions on locomotor activity, sensorimotor coordination, and cognitive abilities in two tests taxing spatial memory (water maze and Barnes maze; see reviews: D'Hooge and De Deyn, 2001; Holmes et al., 2002). ChAT immunostaining was used to visualize the effects of *mu* p75-saporin on cholinergic neurons in the septal and NB regions. Acetylcholinesterase (AChE) histochemistry was performed to verify the extent of the cholinergic denervation in both the cortical mantle and the hippocampus (see Traissard et al., 2007). Antiparvalbumine (Parv) immunostaining and anticalbindin immunostaining were performed to control for possible effects of *mu* p75-saporin on GABAergic neurons and Purkinje cells, respectively. To our knowledge, this is the first report on this new immunotoxin.

MATERIALS AND METHODS

Animals

We used 41 6-week old C57BL/6J@Ico males (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France), weighing 21–26 g upon arrival at the laboratory. They were first housed in groups of five in transparent Makrolon cages ($22 \times 20 \times 14 \text{ cm}^3$) under controlled temperature ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) and a 12/12 h light/dark cycle (lights on at 0700 h). Two weeks later, the mice were isolated in cages with a sheet of absorbent paper which they could use to make their nest. They were manipulated and weighed from the day of surgery throughout testing. All behavioral experiments and histological evaluations were performed by experimenters who were blind to the surgical treatment. Food and water were always provided ad libitum. All experimental procedures were conducted in conformity with the institutional guidelines (council directive 87/848, 19 October 1987, Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale; NIH publication, 86–23, revised 1985). Official permission references were 67–292 for CM, 67–14bis for HJ and 67–215 for J-CC; all other co-authors were under the responsibility of the former.

Surgery

About three weeks after their arrival, mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of xylazine (10 mg kg^{-1} , Rompun 2%, Bayer Pharma) and ketamine (100 mg kg^{-1} , Imalgène 500, Merial). Lesions of the BFCNs were produced with bilateral ICV injections of the immunotoxin *mu* p75-saporin (Cat. # IT-16–100, batch # 37–106; Advanced Targeting Systems, San Diego, CA) diluted in phosphate buffered saline (PBS). Control mice received PBS only. Injections were per-

formed stereotaxically through a thin stainless steel injection cannula (internal \varnothing : 0.18 mm, external \varnothing : 0.23 mm) connected via polyethylene tubing to a 2- μl Hamilton microsyringe driven manually. The cannula was lowered in the brain according to the following coordinates from Bregma (Paxinos and Franklin, 2004): *A*, -0.4 mm ; *L*, $\pm 0.6 \text{ mm}$; *V*, -2.0 mm . The solution was administered over 1.5 min, then the cannula was left in place for 5 min, retracted 0.5 mm, and a second delay of 3 min was allowed before complete retraction. This procedure was used to minimize aspiration of the toxin in the track during retraction of the cannula. Experiment 1 was performed to select the most efficient dose-range of *mu* p75-saporin (PBS only: $n = 2$, 0.2 $\mu\text{g}/\text{mouse}$: $n = 2$, 0.6 $\mu\text{g}/\text{mouse}$: $n = 2$, 1.2 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ $n = 2$, and 2.6 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ $n = 6$). The highest dose consisted of the stock solution of the immunotoxin administered in a volume of 1 $\mu\text{l}/\text{side}$; for the lower doses, the stock solution was diluted using sterile PBS and administered in a volume of 0.5 $\mu\text{l}/\text{side}$. Twenty days after surgery, the surviving mice (see below) were only tested in the beam-walking test the day before being euthanized for immunohistochemical verifications. Based on the outcome of this pilot experiment, a dose of 0.4 $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}/\text{mouse}$ was selected for Experiment 2, which was designated to analyze the morphological and behavioral effects of the BFCN lesions (PBS group: $n = 12$, group treated with 0.4 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ *mu* p75-saporin (SAP): $n = 15$). The day of surgery was considered as the reference Day 0.

Locomotor Activity (Day-8, Day-2, Day 12, Day 49)

Two sessions were performed at Day-8 and Day-2 in order to determine the preoperative activity levels of the subjects and to get them familiarized with the experimental setting. Two other sessions were performed at Day 12 and Day 49 to evaluate the effects of BFCN lesions on locomotor activity, i.e., before water maze testing and euthanasia, respectively. Five minutes before each session, the mice were placed individually in large transparent Makrolon cages ($42 \times 26 \times 15 \text{ cm}^3$) adapted to the shelves of the testing device (eight cages/shelf). Two infrared light beams, passing through each cage, were targeted on two photocells, 2.5 cm above the cage floor level and 28 cm apart. The number of cage crossings was recorded by a computer. The experiment began at 11:00 am for a complete 24-h nyctemeral cycle (8-h light, 12-h dark, 4-h light). Data recording was started at the end of a 3-h habituation period which enabled the mice to habituate to the novelty of the cage. The remaining 21-h period was separated in a diurnal (9 h) and a nocturnal (12 h) phase. One PBS mouse was discarded from all activity analyses due to a technical breakdown on the last session.

Morris Water Maze Testing (Day 14–Day 22)

This task used the hidden platform training procedure placing the emphasis on reference memory (storing context-independent information such as rules—the location of the plat-

form—on a long-term basis; see Morris, 1984). The water-maze testing procedure were adapted to mice according to those used by Traissard et al. (2007) with BFCN-lesioned rats. The water maze consisted of a circular pool (Ø: 140 cm, height: 40 cm) filled with 20°C water up to a height of 20 cm. The water was made opaque with milk powder and changed daily. The pool was located in an experimental room with many extra-maze cues (e.g., computer, water boiler, cage rack, pictures, lights, etc). It was virtually divided in four equal quadrants with four starting points identified as north (N), east (E), south (S), and west (W). A circular platform (Ø: 10 cm) was placed in the center of a quadrant, 1 cm underneath (hidden) or above (visible) the water surface depending on the procedure used. For each trial, the mouse was placed into the pool, facing the wall, at one starting point designated pseudorandomly among four possibilities (N, E, S, or W). After completion of a trial, the mouse was placed under a heating lamp until complete dryness to prevent hypothermia.

On Day 14, a water adaptation trial consisted of a 1-min swim in 3.5 cm deep water with a visible platform. On Day 15, the mice received a 2-min free swim trial (no platform). The following day, they began the acquisition phase of the reference memory procedure which consisted of four trials a day, over five consecutive days (Day 16–Day 20). For each trial, the mouse was given a maximum of 60 s to reach the hidden platform, which was invariably located in the center of the SW quadrant. The pseudorandom order of the four possible starting points was changed from day to day. When the mouse had climbed on the platform, it was allowed to stay there for 10 s. When a mouse failed to find the platform within 60 s, it was gently guided to it and allowed to stay there for 10 s. Three mice were tested in a row (20–30 min/session), which resulted in an intertrial-interval of about 5 min. On Day 21, the platform was removed from the pool and all the mice were given a 60-s probe trial. This delayed probe trial is considered to evaluate the strength and precision of an established spatial memory through the amount of the time spent in the goal quadrant, compared to a chance level time of 15 s. The number of crossings of the platform area were recorded. The day after the probe test, mice were tested for four trials with a visible platform procedure to check for possible motivation or sensory-motor biases that could have affected training performance. For each of the four trials, the position of the visible platform and the starting point was changed in a pseudorandom fashion, but the platform/start point distance remained the same over the four trials. The latency and the distance to reach the platform position, as well as the swimming velocity and tracks were recorded for each trial, using a video-tracking system (Noldus, Wageningen, The Netherlands). The trajectories of each mouse on every trial of the acquisition phase were classified into one of four operationally defined categories of search strategy (adapted from Janus, 2004): *thigmotaxis* characterized by a typical circular wall-hugging swim, *random search* over the entire pool area with zig-zag or wide circular patterns, *direct to platform* area which includes focal search in the platform area and direct swim to the platform, and *nonspecific search* with either

straight or circling swim paths restricted to a limited area of the pool and/or focal searches in the wrong quadrant.

Beam-Walking Test (Day 23)

Each mouse was placed on the 1-cm wide edge of a wooden beam (80-cm long) maintained horizontally on its edge with a tripod (90 cm above the floor level). The mouse had to walk all along the edge from the starting point on one extremity to a little platform fixed to the other extremity of the beam. Then the mouse could enter its home cage placed against the platform. A thick security pad was positioned under the testing device in case a mouse fell off the beam (in which case it was replaced on the beam on exactly the place where the fall had occurred). The mice were first familiarized with the testing device by placing them only 5 cm far from the arrival platform and blocking any move towards the other extremity with the experimenter's hand until it reached the platform. The testing phase followed with 4 successive trials. Three measures were taken for each trial: (i) the latency to leave the first 10-cm segment of the beam, (ii) the latency to cross the remaining 70 cm to reach the platform (both forepaws in contact with the platform), and (iii) the number of falls from the device, which are extremely rare in "normal" mice. The first measure was considered as being more susceptible to emotional factors than the two other measures.

Barnes Maze Testing (Day 24–Day 32, Day 49)

Mice are less adapted than rats to water-based learning tasks, not because of inferior spatial abilities, but eventually because of a higher level of stress induced by aquatic environments and/or some difficulty to orient their head toward cues while swimming (Whishaw and Tomies, 1996). Thus, we also tested our mice in another spatial reference memory task, namely the dry land Barnes maze (Barnes, 1979). The mice were trained to find out and learn which hole, among 12 possibilities, was the target hole leading to their home cage. The Barnes maze consisted of a PVC circular disk (Ø: 100 cm) affixed on the rotating seat of a stool (65 cm above the floor level). This setup allowed easy rotations of the whole maze. Twelve equally spaced holes (Ø: 4 cm) were located 9 cm from the edge. Each hole was equipped with a 6-cm long PVC tube, which could be closed by a lid. The mouse had to poke their head into the hole to check whether the bottom of the hole was obturated or not. A white flexible tubing inserted through a cage-lid was used to connect one of the 12 holes to the home cage of the mouse placed just under the stool seat. The maze was located in a room with many extra-maze cues (e.g., cage racks, furniture, pictures, lights, etc). The lightening was deliberately set at a low level (40 lux over the maze surface) to keep testing conditions at a reasonably low level of anxiogenicity. The mice were progressively familiarized to go through the tubing system (PVC tube, white tubing, cage) to reach their home cage t.i.d. for three days (Day 24–Day 26). The following day, the acquisition phase was started based on three trials per day over six consecutive days (Day 27–Day 32). On each trial, the mouse was placed in a dark green painted cylinder located in the center of the maze (to prevent any possibil-

ity of orientation before its release). A few seconds later, the mouse was released and allowed to freely explore the whole maze until it entered (four paws in) the target hole. If the mouse was still on the maze after 8 min, it was gently guided to its target hole, which it then always entered readily. Several precautions were taken to avoid the use of odor cues to find the target hole. Four hole locations evenly distributed on the maze (90° apart) were used as target holes, one of each being assigned to one mouse of a group of four mice tested in a row (5–15 min intertrial-interval). After each trial, the maze was rotated and entirely wiped with a 70° alcohol solution. Odors being presumably still detectable around the holes, despite conscientious wiping, we used a fixed pseudorandom schedule of maze rotation in order to disable an odor-based strategy (the holes used as target hole were never the same, but their allocentric location was constant). On Day 43, each mouse was submitted to a 120-s long delayed probe trial with all holes obturated, including the target hole. This probe trial gives an indication of the strength and the precision of long-term spatial memory through the comparison of the number of visits to the obturated target hole and those made on the other holes. On all trials (acquisition and probe), the latency of the first visit to the target hole, the latency to enter the target hole (except for the probe) and the order of the visits of all holes were recorded. From the latter, we calculated the total number of visits of nontarget holes during acquisition and for each hole during the probe trial, as well as the number of repetitive errors (cumulating all visits but the first for each hole) before the first visit to the target hole.

Perfusion (Day 55) and Tissue Preparation

After completion of all behavioral testing, each mouse was anesthetized with an overdose of sodium pentobarbital (365 mg kg⁻¹) and was transcardially perfused with 35 ml of phosphate-buffered 4% paraformaldehyde (pH 7.4; 4°C). The brain was then extracted, postfixed for 4 h in the same fixative (4°C), and transferred into a 0.1 M phosphate-buffered 20% sucrose solution for about 40–48 h (4°C). All brains were frozen using isopentane (–40°C), and subsequently kept at –80°C until sectioning with a freezing microtome (–22°C). Coronal sections of 30 µm for the forebrain and 60 µm for the cerebellum were collected in Experiment 1. In Experiment 2, all coronal sections were cut at 40 µm according to schedules in which all sections of the BF (anterior pole of the septum to posterior limit of the NB) were assigned to each of four histological treatments in a fixed order (AChE, cresyl violet, anti-ChAT, anti-Parv stainings, and so on). All following sections (from the hippocampus to the entorhinal cortex (EC)) were also assigned to one of three histological treatments in a fixed order (AChE, discarded, AChE, cresyl violet, cresyl violet, AChE stainings, and so on). Finally, 12–20 sections through the cerebellum were collected for anticalbindin immunostaining.

AChE Histochemistry and Cresyl Violet Staining

Sections were collected directly onto gelatin-coated slides, dried at room temperature and stained either with cresyl violet to ease

the identification of the structures of interest and enable rough examination of the lesion sites, or for AChE histochemistry. Although AChE is not considered a highly specific marker of the cholinergic innervation in all brain structures, it is well correlated with a more specific cholinergic marker, namely ChAT, at least in the hippocampus and the cortex (Hoover et al., 1978; Satoh et al., 1983). In the cortex, however, there are some exceptions such as the medial prefrontal, cingulate, and retrosplenial regions where AChE is not necessarily associated with cholinergic neurotransmission (Lysakowski et al., 1989). Furthermore, in many studies using 192 IgG-saporin to damage BFCNs, AChE histochemistry is used routinely, whether in combination or not with anti-ChAT immunohistochemical staining (e.g., Heckers et al., 1994).

Quantification of AChE-Positive Staining

The extent of cholinergic denervation was quantified by optical density (OD) measurements. Using a computer-assisted image analysis system (Explora Nova, LA Rochelle, France) coupled to a video camera (Model XC 77CE) equipped with a 60 mm Nikkon objective (Nikkor) and a Triplux extension tube, the mean OD was measured on digitalized images after precise delineation of each brain region of interest (i.e., the somatosensory, piriform, retrosplenial, auditory and perirhinal, visual and entorhinal cortices, the amygdala, and both the dorsal and ventral hippocampi). For digitalization, sections were placed in a Kaiser Prolite 5000 light box (Kaiser Fototechnik, Buchen, Germany). Magnification from section to computer screen was 22. The mean OD considered as a “background” and subtracted from all measures before analysis was obtained from a value taken for each mouse in the corpus callosum, where almost no AChE-positive reaction products could be identified. Although the experimenter performing the OD assessments was blind to the treatment allocation, the obvious reduction of AChE positivity in sections from SAP mice made it easy to distinguish them from those of PBS mice.

Anti-ChAT, Anti-Parv, and Anticalbindin Immunostaining

For ChAT and Parv immunostaining, 30- (experiment 1) or 40-µm-thick (Experiment 2) coronal sections through the medial septum (MS) and the NB were used. For calbindin immunostaining, 60- (Experiment 1) or 40-µm-thick (Experiment 2) coronal sections through the cerebellum of the same mice were used. The sections were rinsed three times for 10 min in PBS (0.1 M, pH 7.4), soaked for 1 h in 5% normal donkey serum (BioWest, Nuaille, France) in PBS containing 0.5% triton X-100, and then transferred without rinsing into the primary antibody solution: a goat polyclonal antibody directed against ChAT (1:500; Chemicon International, AB 144 P, Temecula, CA), a mouse monoclonal antibody directed against Parv (1:2,000; Chemicon International, AB 144 P, Temecula, CA) or a rabbit polyclonal antibody directed against calbindin (1:1,000; Chemicon International, AB1778, Temecula, CA). The incubation at room temperature for 18 h with the primary antibody was followed by three PBS rinses. Then all the sections preincubated with the anti-ChAT primary

Hippocampus

antibody were soaked for 1 h in a buffer solution containing biotinylated donkey anti-goat antibody (1:500; Chemicon International, AB1778, Temecula, CA), those preincubated with the anti-Parv primary antibody in a buffer solution containing biotinylated horse antimouse antibody (1:500, Vector Laboratories International, BA2001, Burlingame, CA), and those preincubated with the anticalbindin primary antibody in a buffer solution containing biotinylated goat antirabbit antibody (1:500; Vector Laboratories International, BA 1000, Burlingame, CA). After three PBS washes, the sections were incubated for 45 min in a standard avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain Elite ABC, Vector Laboratories International, Burlingame, CA). Afterwards, the sections were rinsed twice in PBS, once in a 0.6% Tris-buffer (pH = 7.6), and then exposed to a solution of 0.0125% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Vector Laboratories International, BA2001, Burlingame, CA) in Tris-buffer containing 0.0075% H₂O₂ until background staining saturation. Finally, after three PBS rinses, the sections were mounted onto gelatin-coated slides, dried at room temperature and cover-slipped. Verification that the omission of the primary antibody resulted in no staining was made routinely.

ChAT- and Parv-Positive Cell Counting

To get an estimation of the lesion extent/selectivity by μ p75-saporin, a limited number of sections were processed for immunostaining (four at the MS/diagonal band of Broca (DBB) level, three at the NB/substantia innominata (SI) level for anti-ChAT and anti-Parv, four to six for anticalbindin). Sections were obtained for all experimental animals except one SAP mouse for anti-Parv immunostaining. According to a stereotaxic atlas (Paxinos and Franklin, 2004), anatomical landmarks were used to select, define, and standardize the location of cell counting frames of a set size in the MS, the NB, the SI, and the striatum (Fig. 1). We did not use an unbiased stereological method. Counting was made on three to four sections corresponding to an anteriority of Bregma $+1.0 \pm 0.3$ mm for counting of MS and striatal neurons, and Bregma -0.6 ± 0.3 mm for counting of NB and SI neurons. As for a given antibody the sections were 40- μ m thick and separated from each other by at least 40 μ m, there was no risk of confusion by counting twice the same cell body. The number of ChAT-positive neurons in the striatum were counted bilaterally. The background of anti-Parv immunostaining appeared relatively high. To ensure reliable and easy counting, slides with sections showing the highest background were eliminated a priori in each group (three PBS mice and four SAP mice, $n = 8$ per group for this counting). Although the experimenter performing cell counting was blind to the treatment allocation, the obvious loss of ChAT-positive neurons in sections from SAP mice made it easy to distinguish them from those of PBS mice.

Statistical Analyses

All data are expressed as mean \pm standard error of mean (SEM). Most data were processed using an analysis of variance (ANOVA) for a single factor (ANOVA) or repeated measures (rANOVA). For the analysis of morphological data, only a

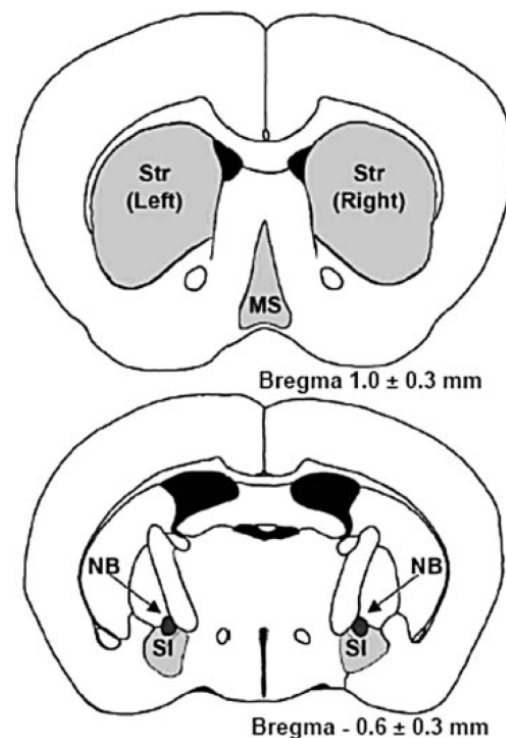


FIGURE 1. Diagram of coronal plates of the mouse brain showing the region delineations used for ChAT-positive cell counting in the medial septum (MS, light gray), the striatum (Str, light gray), the nucleus basalis (NB, dark gray) and the substantia innominata (SI, light gray).

Group factor was considered. Depending on the behavioral test, factors were Group (PBS, SAP), Session (four sessions for locomotor activity), Day (five or six training days in the water maze and the Barnes maze, respectively), Trial (4 trials of the visible platform training and the beam-walking test) and 4 or 12 Holes (visits in the Barnes maze). Direct comparisons between groups were performed with the Student Newman-Keuls (SNK) test (Howell, 1992). For each group in the probe test of the water-maze task, the time spent in each quadrant was compared to a 15-s chance level with a Student *t*-test. All these tests were performed using the software Statistica 6.0 (Statsoft, Inc., Tulsa, OK).

RESULTS

Experiment 1

Immunotoxin dose-response from 0.2 to 2.6 μ g/mouse

Between the first and the eleventh day, most mice treated ICV with high doses of μ p75-saporin (0.6–2.6 μ g/mouse) exhibited several signs reminiscent of the development of epileptic-like epi-

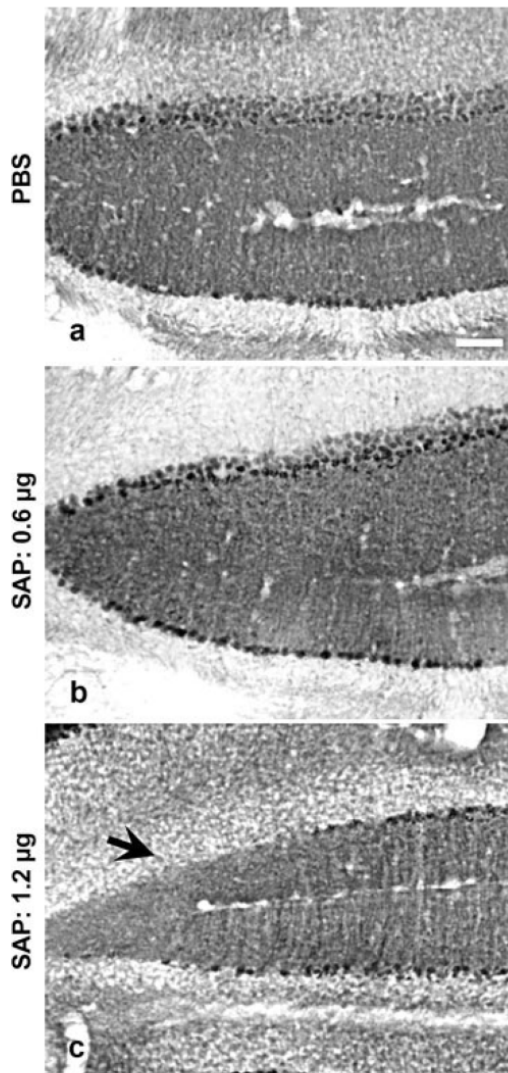


FIGURE 2. Microphotographs illustrating anticalbindin immunostaining on coronal sections of the cerebellum of mice treated ICV with PBS (a), 0.6 (b), and 1.2 μ g/mouse μ 75-saporin (c). A loss of calbindin-positive Purkinje cells is detected (arrow) only at the highest dose used. Scale bar = 500 μ m.

sodes with a peak of expression around Day 7. These signs began with wet dog shakes and/or sudden jumps, then wild running, sometimes followed by myoclonic and/or tonic convulsions. These events were concomitant with a marked loss of weight. Two mice treated with the dose of 2.6 μ g/mouse died seven to eight days after surgery, presumably after a convulsive episode as suggested by their death position (lying on the side with the hindlimbs often stretched backwards). Three out of the four surviving mice also appeared in a bad shape and were euthanized. At the dose of 0.6 and 1.2 μ g/mouse, convulsive episodes were observed at the latest 11 days after surgery, and the mice started to regain weight. Body-

weights had returned to preoperative levels at the time of euthanasia, 20 days after surgery. PBS and 0.2 μ g/mouse treated mice appeared in a satisfactory health state. Brain sections of the surviving mice were processed for histochemistry and analyzed qualitatively. The loss of AChE-positive staining in the hippocampus and the cortex, and the loss of ChAT-positive neurons in the septal region were clearly detectable at the dose of 0.2 μ g/mouse, but it was more pronounced at higher doses (0.6 μ g/mouse and above). In the same region, there was no alteration of Anti-Parv immunostaining. Signs of Purkinje cells loss were observed at the dose of 1.2 μ g/mouse (Fig. 2). The mice were submitted to the beam-walking test, which consisted walking all along the edge of a beam. Interestingly, only those treated with the 1.2 μ g/mouse dose showed a major deficit on the first trial and, to a lesser extent, on the next three trials (latency: Trial 1: PBS = 56.6 \pm 15.0 s, 1.2 μ g = 230.0 \pm 48.5 s; Trial 4: PBS = 5.0 \pm 1.2 s, 1.2 μ g = 14.0 \pm 7.6 s).

Experiment 2

General behavior and group size

Taken together, the results of the dose-response pilot experiment led us to choose a dose of 0.4 μ g/mouse for Experiment 2 in order to (1) induce a higher level of BFCN damage than that observed at the dose of 0.2 μ g/mouse, and (2) avoid the convulsions, body weight loss, motor coordination deficits, and Purkinje cells loss observed at doses equal or higher than 0.6 μ g/mouse. Several observations suggested that the health of all SAP mice was satisfactory. Indeed, the evolution of the body weight was similar between PBS and SAP mice over the five days following surgery (Day 0–Day 5 period: Group $F_{(1,110)} = 2.00$, NS, Group \times Day $F_{(5,110)} = 0.46$, NS: Day 0 weight = 23.1 \pm 0.3 g and Day 5 weight = 22.3 \pm 0.3 g; see Figure 3) and on the last experimental day (Day 49: $F_{(1,22)} = 3.72$, NS). No signs of convulsive episodes were observed. One PBS-treated mouse died following surgery and two SAP-treated mice were discarded, as one showed no loss of AChE-posi-

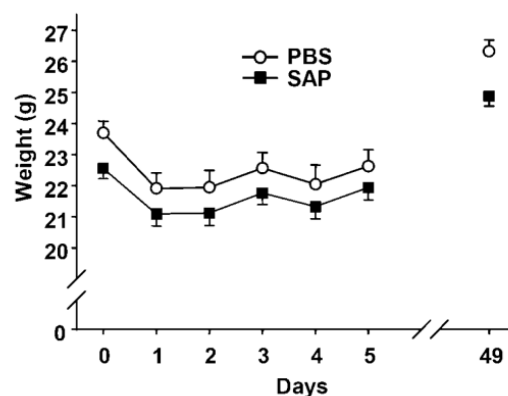


FIGURE 3. Postsurgical weight evolution during the first six days and the last experimental day (D49). The mice received an ICV injection of 0.4 μ g/mouse μ 75-saporin (SAP) or PBS on Day 1. The two groups did not differ: they showed minimal postsurgical weight loss and a similar gain of weight by the end of the experimental period.

Hippocampus

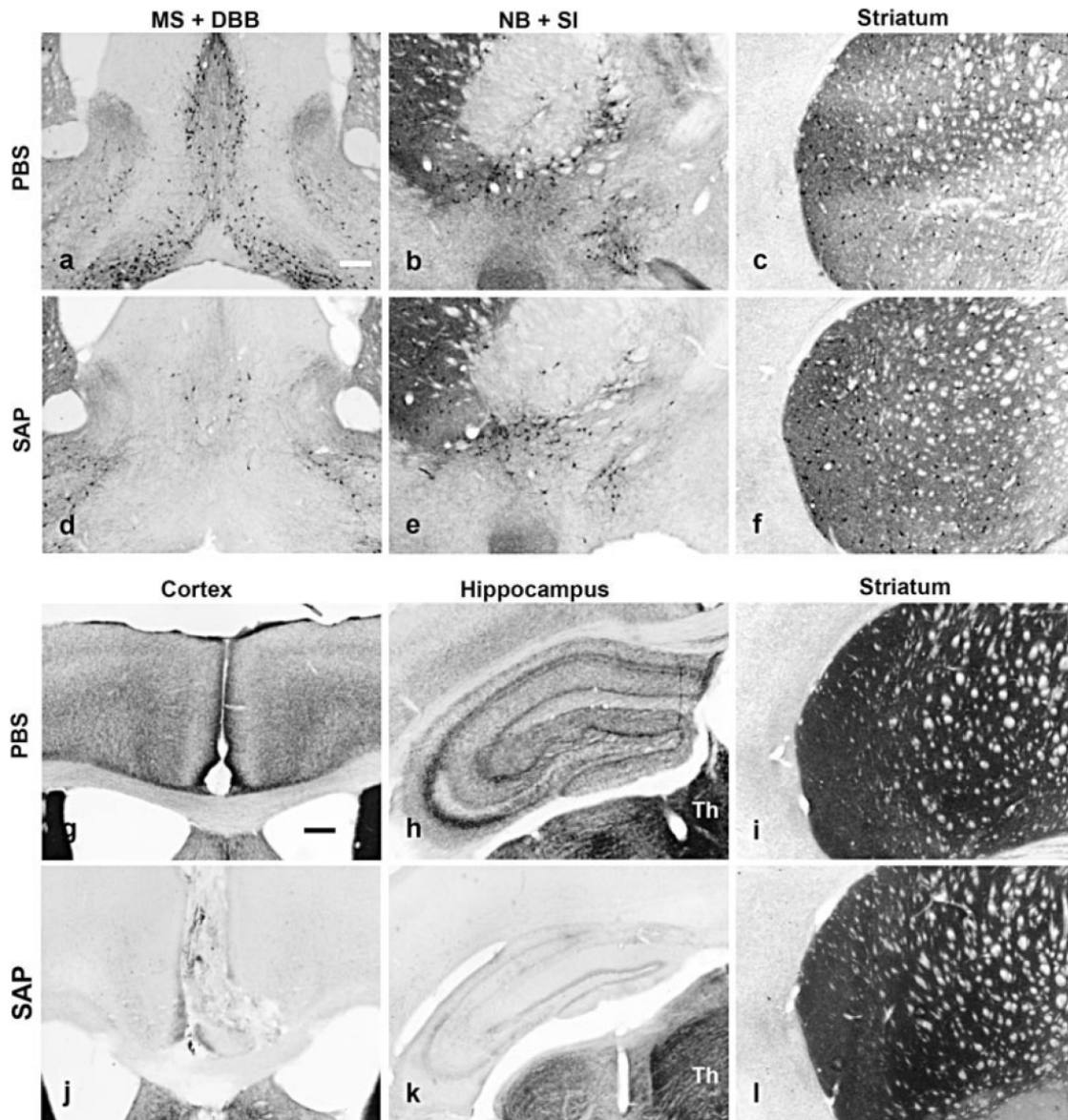


FIGURE 4. Microphotographs illustrating anti-ChAT immunostaining (a–f) and AChE histochemical staining (g–l) on brain coronal sections of mice treated ICV with PBS and 0.4 µg/mouse mu p75-saporin (SAP). The number of ChAT-positive neurons was dramatically reduced in the MS and the DBB (a,d), and to a lesser

extent in the NB/SI complex (b,e). No change was detected in the striatum (c,f). AChE-positive staining was massively depleted in the cortical mantle (g,j) and the hippocampus (h,k) of SAP mice compared to PBS mice. No change was detected in the thalamic nuclei (Th, h,k) and the striatum (i,l). Scale bar = 200 µm.

tive staining (presumably an injection failure) and the other one showed persistent circling behavior, and was therefore euthanized.

Anti-ChAT-, anti-Parv- and anticalbindin-immunostaining

Mice treated with mu p75-saporin showed a dramatic loss of ChAT-positive neurons in the MS and the DBB, and a clear

reduction in the NB, but no observable effect in the striatum (Fig. 4a–f). Cell counting confirmed that SAP mice had a 82% drop in the number of ChAT-positive neurons in the MS, a 55% reduction in the NB, but no change in the striatum compared to PBS mice (MS: PBS = 99.9 ± 4.6 ; SAP = 17.9 ± 2.8 , $F_{(1,22)} = 243.5$, $P < 0.0001$; NB: PBS = 21.0 ± 0.9 ; SAP = 9.8 ± 0.4 , $F_{(1,22)} = 131.1$, $P < 0.0001$; striatum: PBS

Hippocampus

CHOLINERGIC LESIONS WITH A NEW μ p75-SAPORIN 617

TABLE 1. *Optical Density of AChE-Positive Reaction Product in Various Brain Regions of Mice and Rats*

Brain region	PBS	SAP	$F_{(1,22)}$	% (Mice)	% (Rat)
Dorsal hippocampus	11.1 ± 0.4	1.8 ± 0.2*	167.16	-84%	-83%
Ventral hippocampus	12.5 ± 0.5	4.8 ± 0.5*	72.21	-61.60%	-73%
Striatum	50 ± 2.8	52 ± 1.7	0.21	4%	n.d.
Amygdala	22.2 ± 1	24.5 ± 0.8	0.67	10%	-32%
Retrosplenial Cortex	5.4 ± 0.3	0.6 ± 0.2*	55.03	-89%	-94%
Visual Cortex (V1, V2)	4.1 ± 0.3	0.6 ± 0.3*	31.7	-85%	-92%
Somatosensory Cortex	5.8 ± 0.3	1.3 ± 0.4*	35.82	-78%	-86%
Auditory Cortex	5.3 ± 0.3	5.1 ± 0.5	0.06	-4%	-60%
Entorhinal Cortex	6.5 ± 0.9	6.5 ± 1	0.023	0%	-66%
Piriform Cortex	8.5 ± 0.5	9.6 ± 0.5	1.13	13%	-59%
Perirhinal Cortex	5.6 ± 0.4	7.1 ± 0.6	1.7	27%	-60%

In the two first columns, data are expressed as mean optical density (arbitrary units) ± SEM in PBS and SAP mice. The corresponding Group effect are shown in the third column by the ANOVA F -value ($*P < 0.02$, significantly different from PBS). SAP mice treated ICV with μ p75-saporin show dramatic reductions in AChE activity in the whole hippocampus and in several cortical regions. For comparison purpose, the fourth and fifth (gray) columns show the percentage of optical density reduction compared to control group values obtained in the present study and the work of Traissard et al. (2007) in rats treated ICV with 192 IgG-saporin, respectively. (n.d.: not done).

= 143.8 ± 3.4; SAP = 141.8 ± 4.5, $F_{(1,22)} = 0.12$, NS). Interestingly, the number of ChAT-positive cells was also reduced by 43% in the SI ($F_{(1,22)} = 31.1$, $P < 0.0001$). Con-

versely, no significant effect of the immunotoxin was detected in the population of Parv-positive neurons of the MS (number of Parv-positive neurons: PBS = 101.2 ± 9.6; SAP = 81.1 ± 6.8, $F_{(1,14)} = 2.92$, NS). In addition, the anticalbindin immunostaining appeared unaffected in the cerebellum of SAP mice (data not shown), as was expected from our pilot experiment which showed no observable cerebellar damage at a higher dose (0.6 µg/mouse, see Fig. 2).

AChE-staining and OD measurements

ICV administration of the immunotoxin induced a strong depletion of AChE-positive reaction products in both the cortical mantle and the entire hippocampus, suggesting a serious loss of their afferent BFCNs (Fig. 4g-l). Interestingly, there was no observable effect on highly stained neighboring regions such as the striatum and thalamic nuclei. The OD analyses confirmed the clear reduction of AChE-positivity in the dorsal and ventral hippocampus, as well as in several cortical regions evaluated (somatosensory, retrosplenial and visual (V1,V2) cortices; see Table 1). However, other regions known to receive cholinergic inputs appeared unaffected (amygdala and the piriform, auditory, perirhinal, and entorhinal cortices).

Locomotor activity (Day-8, Day-2, Day 12, and Day 49)

Locomotor activity was evaluated twice before surgery and then before and after the spatial learning and memory testing period. The diurnal phase (9 h) and the nocturnal phase (12 h) were analyzed separately (Table 2). Conversely to the preoperative

TABLE 2. *Behavioral Effects of the Cholinergic Lesion Induced by ICV Injection of μ p75-Saporin*

Water maze Probe test (time in s)	Quadrant	SE	NW	SW (Target)	NE
	PBS	8.81 ± 1.40**	17.49 ± 1.86	27.01 ± 2.52**	6.67 ± 1.20**
	SAP	12.18 ± 1.61	18.35 ± 2.60	20.69 ± 2.55*	8.76 ± 2.35*
Barnes maze probe test (number of visits)	Hole	Opposite	-90	Target	90
	PBS	2.63 ± 0.41***	4.00 ± 0.55***	7.00 ± 0.62	4.45 ± 0.57***
	SAP	3.69 ± 0.30	4.23 ± 0.41	5.46 ± 0.69	3.76 ± 0.37
Water maze visual task (distance in cm)	Trial	1	2	3	4
	PBS	223.09 ± 46.20	232.60 ± 28.29	142.34 ± 23.60	178.11 ± 25.85
	SAP	291.40 ± 45.29	271.74 ± 90.65	255.96 ± 88.71	216.66 ± 70.26
Beam-walking test (time in s)	Trial	1	2	3	4
	PBS	29.19 ± 5.42	12.45 ± 2.41	9.63 ± 1.83	11.29 ± 3.79
	SAP	69.61 ± 26.33 ²	21.45 ± 6.90	10.58 ± 2.40	28.15 ± 11.88
Diurnal locomotor activity (cage crossings/hour)	Days	-8	-2	+12	+49
	PBS	15.64 ± 1.88	7.51 ± 0.62	13.44 ± 1.32	13.84 ± 1.52
	SAP	16.23 ± 1.44	9.58 ± 1.38	34.78 ± 7.94 ⁰⁰	25.76 ± 3.23
Nocturnal locomotor activity (cage crossings/hour)	Days	-8	-2	+12	+49
	PBS	65.14 ± 11.82	41.73 ± 5.88	49.85 ± 4.66	42.93 ± 3.36
	SAP	58.53 ± 4.94	49.14 ± 6.29	152.90 ± 17.98 ⁰⁰	92.64 ± 12.44 ^{00,a}

SAP mice treated ICV with μ p75-saporin show moderate deficits in the probe tests of the water-maze and the Barnes-maze tasks, but no deficits in the beam-walking and water-maze visual task. SAP mice appear hyperactive on the two postsurgical sessions of a locomotor activity test. $*P < 0.05$ and $**P < 0.01$, significantly different from chance level (15 s), Student t -test; $***P < 0.01$ significantly different from the target hole; $^2P = 0.0001$, D12 vs. D49; $^0P < 0.05$ and, $^{00}P < 0.01$ significantly different from PBS, SNK test.

Hippocampus

scores, at both postsurgical delays the locomotor activity of SAP mice was much higher than that of PBS mice (Group \times Day: diurnal $F_{(3,63)} = 4.24$, $P = 0.008$; nocturnal $F_{(3,63)} = 15.83$, $P < 0.0001$). The SAP group hyperactivity was more pronounced on Day 12 than on Day 49 during the nocturnal phase.

Reference memory training in the water maze (day 14–day 20)

Analyses of the distance and the latency to reach the platform led to similar results, thus only the distances are illustrated in Figure 5a. All mice improved their performance over the 5-day training phase (distance: $F_{(4,88)} = 28.75$, $P < 0.0001$; latency: $F_{(4,88)} = 32.59$, $P < 0.0001$). However, the rate of acquisition of the task differed among the two groups (distance: Group \times Day $F_{(4,88)} = 4.50$, $P = 0.002$; Group $F_{(1,22)} = 6.49$, $P = 0.018$; latency: Group \times Day $F_{(4,88)} = 4.69$, $P = 0.002$; Group $F_{(1,22)} = 11.22$, $P = 0.003$). Indeed, SAP and PBS mice showed similar levels of performance on the first day, but SAP mice showed significantly lower performance than PBS mice on the second and the third day (see Fig. 5a). By the end of training, SAP mice performed as well as PBS mice. The analyses of swim speed showed no difference between groups (Group: $F_{(1,22)} = 2.06$, NS; PBS = 19.3 ± 0.5 cm s⁻¹ and SAP = 17.9 ± 0.8 cm s⁻¹; no significant Day or Group \times Day interaction effects). To check whether the delayed learning performance of SAP mice was due to the persistence of poorly efficient strategies used to find the platform, the trajectories of each mouse were analyzed trial by trial. As shown in Figure 5b,c, PBS mice rapidly adopted a goal directed strategy, whereas SAP mice persisted on a thigmotaxis-based search strategy before shifting to a goal-directed strategy: this strategy shift happened concomitantly to their improvement of performance.

Probe test in the water maze (day 21)

On the day following the end of the training phase, mice were submitted to a 60-s memory retention test in the water maze without the platform. As shown in Table 2, both groups spent more than 15 s in the target quadrant. The PBS mice tended to spend more time in the target quadrant, and to cross more often the previous platform location than SAP mice, but these effects did not reach significance (time spent in the target quadrant: $F_{(1,22)} = 3.04$, $P = 0.095$; platform crossings: PBS = 3.3 ± 0.5 and SAP = 2.0 ± 0.5 , $F_{(1,22)} = 4.16$, $P = 0.053$).

Visible platform training in the water maze (day 22)

Within a single 4-trial session on Day 22, all mice were tested in the visible platform procedure. As shown in Table 2, both groups efficiently reached the platform with no performance evolution over the four trials (no significant Group, Trial and Group \times Trial interaction effects).

Beam-walking test (day 23)

On the following day, mice were submitted to the beam-walking test. As shown in Table 2, both groups similarly

Hippocampus

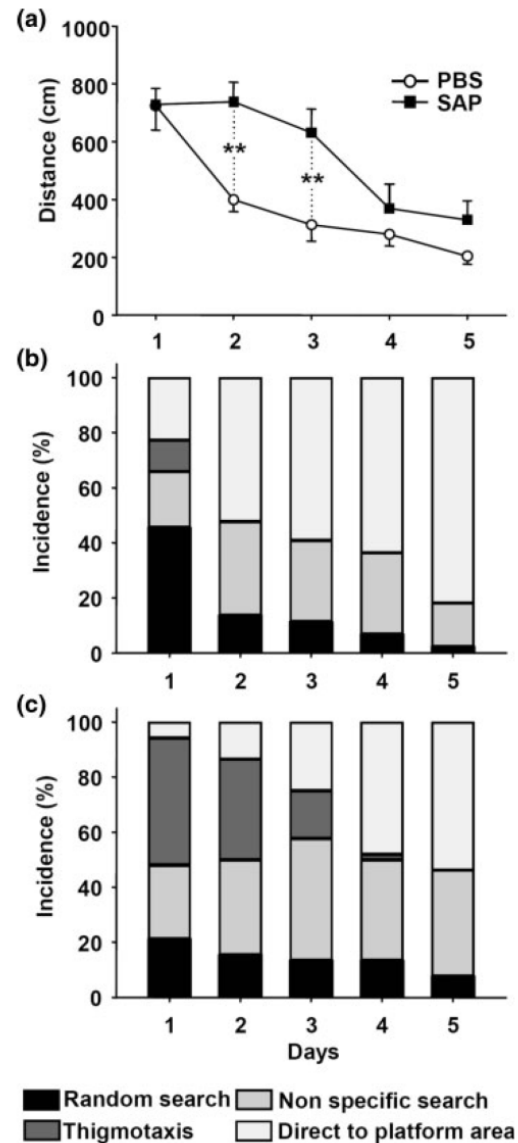


FIGURE 5. Training performance of mice treated ICV with PBS or mu p75-saporin (SAP) in the spatial reference memory task in the water maze. (a) Average distance (\pm SEM) swam by the mice to reach the hidden platform. SAP mice showed slower learning. Incidence of different types of strategies used by PBS mice (b) and SAP mice (c). Thigmotaxis was markedly expressed by SAP mice until they started to improve their performance in the water maze task (i.e., from Day 4 onwards). * $P < 0.01$, significantly different from PBS, SNK test.

improved their performance over the four trials (Trial: $F_{(3,66)} = 4.33$, $P = 0.007$; Group \times Trial interaction: $F_{(3,66)} = 1.04$, $P = 0.380$). There was a trend for the two groups to differ in

global performance (Group: $F_{(1,22)} = 4.25$, $P = 0.051$), but their performance only differed significantly on the first trial (see Table 2). Indeed, during this initial trial, SAP mice tended to stop their walk, stand and wait a while, and/or sometimes even turn and walk the wrong way back (opposite to the platform). No mice fell from the beam during this test. The latency to leave the first 10-cm of the beam was similar among groups and across trials (no significant Group, Trial, and Group \times Trial interaction effects).

Training in the Barnes maze task (day 24–day 32)

The numbers of errors before visiting the target hole and the latency to reach it were considered as reflecting different aspects of performance on the reference memory component of the task. In general, SAP mice made more errors than PBS mice ($F_{(1,22)} = 6.29$, $P = 0.019$; see Fig. 6a). However, the two groups similarly improved their performance over training (day: $F_{(5,110)} = 9.67$, $P < 0.0001$, Group \times Day: $F_{(5,110)} = 0.94$, $P = 0.45$). As shown in Figure 6b, the latency decreased over the training period (Day: $F_{(5,110)} = 36.86$, $P < 0.0001$). SAP mice appeared slower to reach the target hole than PBS mice at the beginning of training (Group: $F_{(1,22)} = 6.53$, $P = 0.017$; Group \times Day: $F_{(5,110)} = 4.91$, $P = 0.0004$). The number of repetitive errors (visits to previously visited holes) was considered as reflecting errors on a working memory component of the task. SAP mice made more repetitive errors than PBS mice only on the first day (Group: $F_{(1,22)} = 6.21$, $P = 0.021$; see Fig. 6c). For both groups, this behavior tended to disappear as the training progressed (Day: $F_{(5,110)} = 10.26$, $P < 0.0001$, Group \times Day: $F_{(5,110)} = 1.55$, NS). When we analyzed the total latency and total number of errors (before entering the hole), the results were similar to those described above (data not shown). Indeed, over the whole training, the mice rarely visited the target hole without entering readily the flexible tubing leading to their cage (PBS = 0.82 ± 0.35 visits and SAP = 1.15 ± 0.30 visits; $F_{(1,22)} = 0.54$, NS).

Probe test in the Barnes maze (day 43)

Eleven days after the end of the training phase, mice were submitted to a 120-s probe test in the Barnes maze with the target hole obturated. The total number of visits was similar for PBS and SAP groups (PBS = 53.8 ± 2.9 and SAP = 51.8 ± 4.6 ; $F_{(1,22)} = 0.12$, NS). However, all 12 holes were not visited with the same frequency (12 holes: $F_{(11,242)} = 15.03$, $P < 0.0001$; Group \times 12 holes: $F_{(11,242)} = 2.58$, $P = 0.004$). To simplify the analysis and data presentation, we compared only four equidistant holes including the target hole (opposite hole and those located $\pm 90^\circ$ from the target hole: four holes: $F_{(3,66)} = 17.21$, $P < 0.0001$; Group \times four holes: $F_{(3,66)} = 3.26$, $P = 0.026$). As shown in Table 2, the PBS mice visited the target hole significantly more often than any other hole, and significantly more than did the SAP mice.

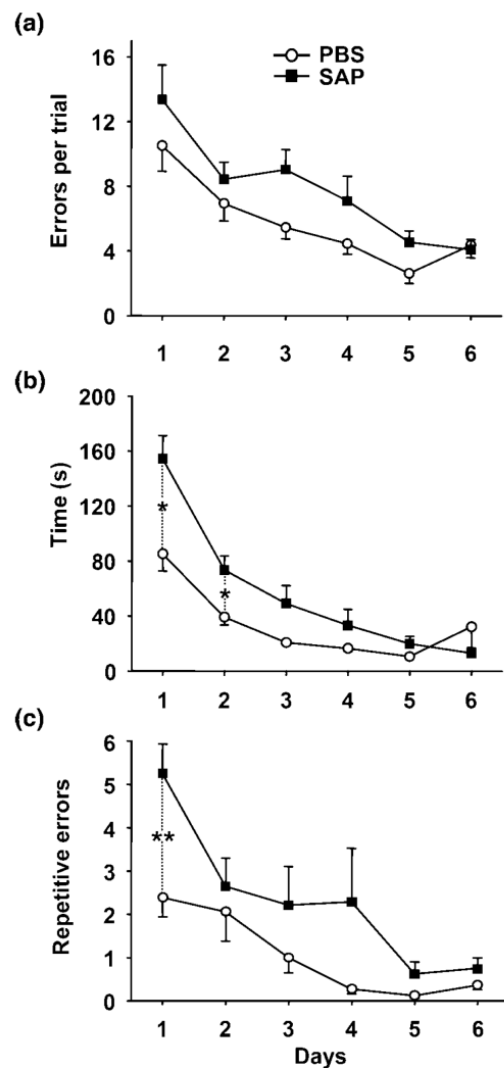


FIGURE 6. Training performance in mice treated ICV with PBS or μ p75-saporin (SAP) in the Barnes maze task. (a) Average number of errors (\pm SEM) before visiting the target hole. SAP mice performed worse than PBS mice. (b) Average latency (\pm SEM) to reach the target hole. SAP mice were slower than PBS mice, especially at the beginning of the training. (c) Average number of repetitive errors (\pm SEM) before visiting the target hole. Throughout testing, SAP mice tended to visit repeatedly the holes compared to PBS mice. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, significantly different from PBS, SNK test.

DISCUSSION

As far as we know, this is the first study characterizing the neurochemical and behavioral effects of ICV injection of the new version of μ p75-saporin. This immunotoxin induces a massive and selective degeneration of BFCNs without altering

cholinergic neurons in other structures such as the striatum. The SAP mice showed moderate but significant deficits in learning and memory testing phases of two spatial memory tasks, which they ultimately acquired. They also showed a higher level of locomotor activity, especially during the nocturnal phase. Their performance was normal in a beam-walking test and a water-maze visible platform test. These tests were used to evaluate motor coordination, motivation, and visual capacities, respectively. Finally, and most importantly, several indicators of the animals' general health suggest that this new version of mu p75-saporin is well tolerated by the mice at the dose selected for behavioral testing.

When using immunotoxins or any other means to induce a cerebral lesion with the aim of studying its impact on cognitive function, it is essential to minimize lethality and discard behavioral biases which could interfere with cognitive measures. Bilateral ICV administration of the first available version of mu p75-saporin was 100% lethal at the dose of 7.1 µg and offered a survival rate of 68–70% at that of 3.6 µg used for behavioral testing (Berger-Sweeney et al., 2001; Hunter et al., 2004). The new immunotoxin offers a better survival rate since all mice survived at doses lower than 2.6 µg (83% lethality at this dose). After surgery, mice treated with doses ranging from 0.6 to 2.6 µg exhibited myoclonic seizures in addition to other side effects (e.g., abnormal loss of weight and jumpy) also reported by Berger-Sweeney et al. (2001). These seizures might be a consequence of degenerative events and/or cellular rearrangement, which are known to take place within a few days after injection of cholinergic immunotoxins (Heckers et al., 1994; Hunter et al., 2004; Chambon et al., 2007). More importantly, at the dose of 0.4 µg/mouse chosen for behavioral testing, there was neither abnormal weight loss nor any of the previously reported side effects.

All the cholinergic markers used in this study indicate that the new mu p75-saporin induces a massive lesion of the BFCNs. Indeed, the population of BFCNs was dramatically affected, as suggested by a sharp drop in the number of ChAT-positive neurons within the MS (–82%) and the DBB, and to a lesser extent within the NB (–55%) and the SI (–43%). The septohippocampal and basolateral projections degenerated, as shown by the marked reduction of AChE-positive staining in the dorsal (–84%) and ventral (–62%) hippocampus and a wide portion of the cortical mantle, especially the somatosensory, retrosplenial, and visual (V1,V2) cortices (–78 to –89%). However, other cortical areas considered here were not significantly affected. On one hand, this novel mu p75-saporin is more efficient at the dose of 0.4 µg than its former version at the dose of 3.6 µg, which induced a smaller loss of BFCNs (MS, –69% and DBB, –74%; see Hunter et al., 2004) and a lower decrease in hippocampal and cortical cholinergic markers (–57.9% and –19.3% ChAT activity, respectively; Berger-Sweeney et al., 2001). On the other hand, the novel mu p75-saporin appears slightly less efficient in mice than 192 IgG-saporin in rats in lesioning BFCNs (septal region –90% and NB –65%) and reducing AChE activity (see Table 1) after ICV administration (Traissard et al., 2007). This appa-

rent difference in neurotoxicity might also be a question of dosage. Interestingly, all aforementioned studies using ICV cholinergic immunotoxin in rats or mice found a larger preservation of NB cholinergic neurons compared to the MS. This differential effect might be related to the site of injection allowing a better diffusion of the toxin through the parenchyma to the MS/DBB region than to the NB/SI complex, which is more distant from the lateral ventricles. Alternatively, this difference could also be related to the sparing of a subpopulation of NB/SI cholinergic neuron that are not p75 immunoreactive (Heckers et al., 1994; Rossner et al., 2000). In any case, one might suggest that the amygdala and the cortical areas, which showed normal AChE activity in the present study, may still be innervated by a surviving fraction of NB/SI cholinergic neurons. It must be noted that we used a histological approach to evaluate the extent of the cholinergic lesions, thus our experiment does not provide direct evidence for functional impairment of the cholinergic system in the hippocampus and the cortical mantle. Therefore, we cannot exclude that, despite a 80% reduction of the number of ChAT-positive neurons in the septal region, there may have been some residual cholinergic activity in the hippocampus that could have been sufficient to compensate for the loss of cholinergic inputs, as suggested by Chang and Gold (2004). In that concern, however, one has to mention other studies which found almost no or even no evidence for acetylcholine (ACh) release in the hippocampus of rats subjected to saporin lesions (e.g., Birthelmer et al., 2002; 2003). Nevertheless, the lesions appeared quite specific to the BFCNs since markers of noncholinergic neurons remained systematically unaffected, as well as cholinergic neurons in other structures such as the striatum. In adult rodents, striatal cholinergic neurons do not bear p75^{N^{TF}} receptors (Heckers et al., 1994; Rossner et al., 2000). Interestingly, at doses that produce extensive cholinergic damage, a clear advantage of both versions of mu p75-saporin in mice, vs. 192 IgG-saporin in rats, is the sparing of Purkinje cells (present study; Berger-Sweeney et al., 2001; Hunter et al., 2004). This peculiarity most probably explains the absence of marked motor coordination deficits in the beam-walking test. The low performance restricted to the very first of four successive beam-walking trials is most probably related to difficulties to adapt or learn rapidly a new behavioral response rather than motor coordination deficits per se. At higher doses, however, a more pronounced deficit appeared concomitantly with a partial degeneration of these neurons. The relative resistance of mice Purkinje cells to a p75-directed immunotoxin is quite puzzling and remains to be explained. Nevertheless, it fortunately improves the selectivity of the BFCN lesion model in mice.

Usually, BF lesion models with 192 IgG-saporin in rats show reproducible, but moderate learning and memory performance deficits in spatial-memory tasks such as the water maze (e.g., Leanza et al., 1995; for reviews, see Wrenn and Wiley, 1998; Parent and Baxter, 2004). Herein, SAP mice were impaired on the second and third day of training, but did ultimately learn the task. The delay in mastering the task seems to be related to a persistent thigmotaxis behavior shown by SAP mice within

the first three days of training, whereas this behavior was only moderately expressed and limited to the first day in PBS mice. On the day following training, the water maze probe trial revealed a slight memory deficit in SAP mice, which might be related to less-efficient learning or reflect memory deficits affecting encoding, storage and/or retrieval processes. Future experiments using mice that are all trained to the same criterion would be useful to address this issue. In the Barnes maze, the performance of SAP mice were moderately impaired throughout training in terms of hole errors, and mainly at the beginning of training in terms of repetitive errors and latency. The Barnes-maze probe trial was performed after a long retention delay (11 days), which might explain that the memory performance deficit of the SAP mice was more pronounced than in the water-maze probe trial. It must be noted that the deficits in both spatial memory tasks were not related to differences in the swim velocity (first day performance and swim speed similar to controls in the water maze), in the frequency of hole visits (same number of hole visits in the Barnes-maze probe trial), or in motivation and/or gross visual capabilities (visible platform training). Surprisingly, the diurnal hyperactivity shown by SAP mice did not seem to affect behavioral measures during learning and memory testing. Conversely, noncognitive effects were shown to explain part of the massive learning deficits obtained with the former version of the toxin (Berger-Sweeney et al., 2001). Finally, our results are remarkably in line with those obtained in rats subjected to 192 IgG-saporin lesions, namely a moderate deficit during training, a preserved ability to acquire the task with further training, and a moderate deficit in memory probe trials (Traissard et al., 2007). As in rats, both the reference- (e.g., distance to platform, number of errors) and the working-memory (i.e., repetitive errors) components of the tasks were affected. The nature of these cognitive deficits is not easy to define since both septohippocampal and basalocortical projections are affected after ICV administration of the immunotoxin. As the former and the latter are considered to be involved in learning/memory and attentional processes, respectively, both cognitive aspects may be affected (Lehmann et al., 2003). The locomotor hyperactivity prominently expressed during the nocturnal phase by SAP mice has not been systematically reported in 192 IgG-saporin treated rats (Leanza et al., 1995; Traissard et al., 2007). Rat and mice mechanisms of regulation of locomotor activity might partly differ or *mu* p75-saporin might be more destructive than 192 IgG-saporin on the pathways involved in these mechanisms. In addition, there might be some sort of recovery or reorganization processes within these pathways since the locomotor hyperactivity of lesioned mice appears less pronounced on Day 49 than on Day 12 following immunotoxin administration. However, further studies are needed to confirm this effect.

The new version of *mu* p75-saporin tested herein has minimal side effects at a dose inducing marked and selective cholinergic damage in the BF. It appears more efficient and safer than its predecessor, and therefore provides a powerful and promising tool to study the role of these neurons in cognitive processes in C57BL/6J male mice. Although its efficiency needs to

be confirmed in other mouse strains, *mu* p75-saporin may be particularly adapted to study the impact of selective BFCN lesions in transgenic models of AD, which are mostly bred on a C57BL/6J genetic background, and in which amyloid and/or tangle pathologies are expressed, but do not result in extensive loss of cholinergic neurons.

Acknowledgments

We thank Sarah Schimchowitsch and Karin Herbeaux for their help in immunocytochemistry experiments, and Anne Pereira de Vasconcelos for her comments on the final draft.

REFERENCES

- Berger-Sweeney J, Stearns NA, Murg SL, Floerke-Nashner LR, Lappi DA, Baxter MG. 2001. Selective immunolesions of cholinergic neurons in mice: Effects on neuroanatomy, neurochemistry, and behavior. *J Neurosci* 20:8164–8173.
- Birtheimer A, Dommes E, Jeltsch H, Cassel JC, Jackisch R. 2002. Septal grafts and evoked acetylcholine release in the rat hippocampus after 192 IgG-saporin lesions. *Neuroreport* 7:973–976.
- Birtheimer A, Ehret A, Amtage F, Forster S, Lehmann O, Jeltsch H, Cassel JC, Jackisch R. 2003. Neurotransmitter release and its presynaptic modulation in the rat hippocampus after selective damage to cholinergic or/and serotonergic afferents. *Brain Res Bull* 5:371–381.
- Chambon C, Paban V, Manrique C, Alescio-Lautier B. 2007. Behavioral and immunohistological effects of cholinergic damage in immunolesioned rats: Alteration of c-Fos and polysialylated neural cell adhesion molecule expression. *Neuroscience* 4:893–905.
- Chang Q, Gold PE. 2004. Impaired and spared cholinergic functions in the hippocampus after lesions of the medial septum/vertical limb of the diagonal band with 192 IgG-saporin. *Hippocampus* 2:170–179.
- Chauhan NB. 2006. Cholinergic immunolesioning produced tangle-like inclusions in TgCRND8 Brain. *Soc Neurosci (Abs)*: 271.8/KK9.
- D'Hooge R, De Deyn PP. 2001. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Rev* 1:60–90.
- Gotz J, Streffer JR, David D, Schild A, Hoerndli F, Pennanen L, Kurkoski P, Chen F. 2004. Transgenic animal models of Alzheimer's disease and related disorders: Histopathology, behavior and therapy. *Mol Psychiatry* 7:664–683.
- Heckers S, Ohtake T, Wiley RG, Lappi DA, Geula C, Mesulam MM. 1994. Complete and selective cholinergic denervation of rat neocortex and hippocampus but not amygdala by an immunotoxin against the p75 ngf receptor. *J Neurosci* 3 (Part 1):1271–1289.
- Holmes A, Wrenn CC, Harris AP, Thayer KE, Crawley JN. 2002. Behavioral profiles of inbred strains on novel olfactory, spatial and emotional tests for reference memory in mice. *Genes Brain Behav* 1:55–69.
- Hoover DB, Muth EA, Jacobowitz DM. 1978. A mapping of the distribution of acetylcholine, choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in discrete areas of rat brain. *Brain Res* 153:295–306.
- Howell D. 1992. *Statistical Methods for Psychology*. Belmont: Duxbury Press. 338 p.
- Hunter CL, Quintero EM, Gilstrap L, Bhat NR, Granholm AC. 2004. Minocycline protects basal forebrain cholinergic neurons from *mu* p75-saporin immunotoxic lesioning. *Eur J Neurosci* 12: 3305–3316.

- Janus C. 2004. Search strategies used by APP transgenic mice during navigation in the Morris water maze. *Learn Mem* 3:337–346.
- Leanza G, Nilsson OG, Wiley RG, Bjorklund A. 1995. Selective lesioning of the basal forebrain cholinergic system by intraventricular 192 igG-saporin: Behavioural, biochemical and stereological studies in the rat. *Eur J Neurosci* 2:329–343.
- Lehmann O, Grottick AJ, Cassel JC, Higgins GA. 2003. A double dissociation between serial reaction time and radial maze performance in rats subjected to 192 IgG-saporin lesions of the nucleus basalis and/or the septal region. *Eur J Neurosci* 3:651–666.
- Lysakowski A, Wainer BH, Bruce G, Hersh LB. 1989. An atlas of the regional and laminar distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in rat cerebral cortex. *Neuroscience* 2:291–336.
- McGowan E, Eriksen J, Hutton M. 2006. A decade of modeling Alzheimer's disease in transgenic mice. *Trends Genet* 5:281–289.
- Mesulam M. 2004. The cholinergic lesion of Alzheimer's disease: Pivotal factor or side show? *Learn Mem* 1:43–49.
- Morris R. 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11:47–60.
- Paxinos G, Franklin K. 2004. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. London: Elsevier Academic Press.
- Perry EK, Perry RH, Blessed G, Tomlinson BE. 1978. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathol Appl Neurobiol* 4:273–277.
- Rossner S, Schliebs R, Bigl V. 2000. Intracerebroventricular infusion of CHO5, a rat monoclonal antibody directed against mouse low-affinity nerve growth factor receptor (p75NTR), specifically labels basal forebrain cholinergic neurons in mouse brain. *Metab Brain Dis* 1:17–27.
- Satoh K, Armstrong DM, Fibiger HC. 1983. A comparison of the distribution of central cholinergic neurons as demonstrated by acetylcholinesterase pharmacohistochemistry and choline acetyltransferase immunohistochemistry. *Brain Res Bull* 11:693–720.
- Schliebs R, Arendt T. 2006. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 11:1625–1644.
- Traissard N, Herbeaux K, Cosquer B, Jeltsch H, Ferry B, Galani R, Pernon A, Majchrzak M, Cassel JC. 2007. Combined damage to entorhinal cortex and cholinergic basal forebrain neurons, two early neurodegenerative features accompanying Alzheimer's disease: Effects on locomotor activity and memory functions in rats. *Neuropsychopharmacology* 4:851–871.
- Whishaw IQ, Tomie JA. 1996. Of mice and mazes: Similarities between mice and rats on dry land but not water mazes. *Physiol Behav* 5:1191–1197.
- Wrenn CC, Wiley RG. 1998. The behavioral functions of the cholinergic basal forebrain: Lessons from 192 igg-saporin. *Int J Dev Neurosci* 7–8:595–602.

EXPERIENCE 2

Evaluation comportementale des effets des lésions combinées du cortex entorhinal et des neurones cholinergiques de la base du cerveau antérieur

Dans cette deuxième étude, l'objectif principal était de modéliser, chez des souris non transgéniques, les déficits mnésiques observés dans la MA par une approche lésionnelle des deux structures clés touchées dans la maladie. Les premiers résultats obtenus lors de l'expérience précédente nous ont permis de constater que la lésion des NCB seule entraîne un léger retard d'acquisition dans deux tâches de mémoire spatiale, mais n'abolit pas complètement les facultés d'apprentissage et de rétention des souris C57BL/6J. Ce résultat nous conforte dans l'hypothèse principale de ce travail de thèse, proposée par notre équipe (Traissard et coll., 2007), selon laquelle la lésion des NCB seule n'induirait qu'un déficit modéré des performances de mémoire spatiale, tout comme la lésion du CE. Ce ne serait que la combinaison de l'atteinte de ces deux structures qui serait à l'origine de déficits massifs de désorientation spatiale n'étant pas sans rappeler ceux observés dans la MA à un stade d'amnésie profonde.

C'est pourquoi, dans cette deuxième expérience, nous avons réalisé et testé les effets de la lésion du CE combinée à celle des NCB chez des souris mâles C57BL/6J. La lésion du CE est provoquée par des injections multiples et bilatérales de NMDA à une dose deux fois plus concentrée que chez le Rat (80mM ; 0,075 µL dans le CEL et 0.15 µL dans le CEM). Puis, cinq jours plus tard, la lésion des NCB est réalisée par une injection i.c.v bilatérale de 0,5 µl de mu p75-saporine à la dose de 0,6 µg/µL. L'évaluation de l'impact de ces lésions combinées sur les performances cognitives et non cognitives a été réalisée 15 jours après la lésion cholinergique dans une batterie de tests comportementaux. Nous avons choisi d'éprouver

les effets de la lésion combinée du CE et des NCB dans deux tâches de navigation spatiale, à savoir tâche de la piscine de Morris puis le labyrinthe de Barnes. En effet, la tâche de la piscine de Morris est couramment utilisée pour évaluer les capacités de navigation spatiale chez le rongeur. De plus, en la choisissant, nous voulions reproduire les bons résultats obtenus dans l'expérience 1, tout en ayant une base de comparaison avec ceux obtenus chez des rats double lésés (CE + NCB) évalués dans la même tâche (Traissard et coll., 2007). Nous avons également éprouvé les souris dans une version spatiale et non spatiale de la tâche de reconnaissance d'objets, nous permettant d'évaluer l'impact de la lésion combinée du CE et des NCB sur une autre forme de mémoire spatiale basée davantage sur l'utilisation d'indices proximaux par rapport à l'utilisation d'indices distaux comme dans les protocoles de la tâche de la piscine de Morris et du labyrinthe de Barnes réalisés dans cette étude. Pour terminer, nous avons évalué l'activité locomotrice des souris dans une tâche d'actographie. En effet, dans l'expérience 1, la lésion des NCB seule affectait l'activité locomotrice, c'est pourquoi dans cette deuxième étude nous voulions étudier l'interaction des deux lésions du CE et des NCB sur celle-ci.

L'ensemble de ces travaux fait l'objet de la **publication 2** présentée sous forme rédigée.

PUBLICATION 2

**Moreau P-H., Cosquer B., Geiger K., Muller C., Kelche C.,
Cassel J-C., Mathis C.**

**Massive spatial disorientation
in mice carrying a double lesion which
reproduces two degenerative events in Alzheimer's disease**

(Avant soumission)

**MASSIVE SPATIAL DISORIENTATION IN MICE CARRYING A DOUBLE LESION WHICH
REPRODUCES TWO KEY DEGENERATIVE EVENTS IN ALZHEIMER'S DISEASE.**

Moreau P-H.^{1,2}, Cosquer B.¹, Geiger K.¹, Muller C.^{1,4}, Kelche C.¹, Cassel J-C.¹, Mathis C.^{1,2,3}

Affiliation of authors :

- ⁽¹⁾ Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives, UMR 7237 CNRS-UDS, Equipe de Neurobiologie Cognitive et Comportementale, Université de Strasbourg, IFR 37 de Neurosciences, GDR 2905 CNRS, 12 rue Goethe, 67000 STRASBOURG, France.

Running title: Double lesion abolishes spatial navigation memory.

Number of text pages: 31 (Including 7 figures and 2 tables)

Words in the abstract: 274

Words in the introduction: 484

Words in the discussion: 2681

-
- ⁽²⁾ The work has been presented at the 7th FENS Forum European Neuroscience, Amsterdam, Nederland, July 3-7, 2010 and 10^{ème} colloque de la société des Neurosciences, Marseille, France, May 24-27, 2011.

- ⁽³⁾ Address for correspondence: Dr. Chantal Mathis, LINC, UMR 7237 CNRS-UDS, 12 rue Goethe, F-67000 Strasbourg (France)
Email: chantal.mathis@unistra.fr

- ⁽⁴⁾ Current address: ETAP – Applied Ethology, 13 rue du Bois de la Champelle, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Acknowledgements: This work was supported by Alsace Alzheimer 68, the Alsace region, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Université de Strasbourg (UdS). The authors would also like to acknowledge Lucas Lecourtier for his comments on the final draft.

Key words: Entorhinal cortex – Cholinergic Neurons – Basal Forebrain – Navigation – Mu p75-saporin – immunotoxic lesion – NMDA – Spatial memory – Recognition memory

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is characterized by a progressive cognitive decline leading to dementia. Early memory deficits are associated with shrinkage of the entorhinal cortex (EC), whereas the severe deficits appearing at later stages are correlated with the massive degeneration of basal forebrain cholinergic neurons (BFCNs). Traissard and collaborators (2007) showed in rats that combined lesions of the EC and BFCNs, but not each lesion separately, induced massive memory deficits in spatial tasks. The severity and the nature of these deficits are reminiscent of those found in advanced stages of AD. Thus, we hypothesized that the deleterious synergy of these lesions might play an important role in the shift from a mild symptomatic stage to a clear amnesic stage. The current study investigated in mice the effects of combined and single lesions in two spatial navigation tasks and in both a spatial and an object recognition task. As found in rats, the mice with combined lesions showed no evidence of learning and memory retention in the water maze task, whereas each lesion alone induced only moderate impairments. Mice carrying the combined lesions were the most affected in learning the Barnes maze task and this lesion was the only one to disrupt completely memory retention in the probe test. Both the BFCN and the combined lesions abolished object recognition. Finally, all lesions selectively affected object exchange detection in the spatial recognition task. In conclusion, the combined lesion seems to affect dramatically and specifically the mechanisms underlying spatial memory in navigation tasks. The aggravation of spatial disorientation in AD patients could be related to the summation of degenerative events occurring in the EC and on the BFCNs.

INTRODUCTION

Early stages of Alzheimer's disease (AD) are characterized by deficits in hippocampal-dependent episodic memory (memory for events) and spatial disorientation (Almkvist, 1996; Hort et al., 2007; Cushman et al., 2008; Weniger et al., 2011). In the course of the disease several other aspects of cognitive functions are affected including recognition memory, attention and executive functions, before falling into deep dementia (Almkvist, 1996). The main neuropathological features associated with memory impairments, along with the well known amyloid plaques and neurofibrillary tangles, is the degeneration of neuronal populations including the basal forebrain cholinergic neurons (BFCNs) and the entorhinal cortex (EC) (Bartus et al., 1982; Braak and Braak, 1996), which both send major inputs to the hippocampus. More than 20 years ago, the loss of BFCNs was considered as the key event responsible for the cognitive impairments associated with AD (Perry et al., 1978; Bartus et al., 1982). This view has been recently challenged, partly because selective lesions of BFCNs in rodents repeatedly failed to induce dramatic memory deficits (Parent and Baxter, 2004). Recently, *in vivo* imaging and *post-mortem* histological studies showed that an early shrinkage of the EC and the hippocampus characterizes the early stage of AD (Gomez-Isla et al., 1996; Stoub et al., 2005). Moreover, EC atrophy has been associated with deficits in episodic memory and spatial orientation in AD patients (Eustache et al., 2001; Di Paola et al., 2007; Weniger et al., 2011) and it has been considered as a good predictor for the transition from a state of mild cognitive impairment into AD (Killiany et al., 2002; Stoub et al., 2005). Interestingly, fiber-sparing EC lesions in rodents have also been reported to induce modest spatial memory deficits (Coutureau and Di Scala, 2009). These observations recently led us to hypothesize that the aggravation memory impairments seen in AD could be, at least partly, a consequence of a synergistic dysfunction of BFCNs and EC neurons. Therefore, we assessed the effects of combined BFCN and EC lesions on memory functions in rats and demonstrated that, although each lesion alone had minor effects, the double lesion led to massive spatial memory impairments (Traissard et al., 2007). Thus, the shift from a pre-symptomatic stage (protracted EC shrinkage) to a clear amnesic stage (more extended EC and BFCN degeneration) could be the consequence of the progressive combination of both neurodegenerative events. The present study aimed at investigating in mice the potentially deleterious effects of BFCN or/and EC lesions on cognitive functions known to be affected in

AD: we used the object exploration paradigm to assess object recognition memory *per se* and detection of spatial rearrangement of a set objects, as well as the Morris water maze and the Barnes maze tasks to evaluate spatial navigation performance which depends essentially on the use of distal landmarks (allocentric based navigation). Moreover, the possible induction of non cognitive AD-like symptoms such as agitation was assessed by monitoring locomotor activity for 24 h.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

Fifty-three C57BL/6J@lco males (Charles River Laboratories, France) were housed by groups of four upon arrival at the colony room (23±1 °C; 12/12 h cycle with lights on at 07h00; food and water *ad lib*). All experimental procedures were conducted in conformity with the institutional guidelines (Council Directive 87/848, october 19th, 1987, Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale; NIH publication, 86-23, revised 1985). Official permission references were 67-292 for CM, and 67-215 for J-CC; all other co-authors were under the responsibility of the former.

Surgery

Lesion of the EC. Thirteen-week old mice were anesthetized (sodium pentobarbital: 70 mg.kg⁻¹, IP, Ceva Santé Animale, France) and lesions were performed with multiple-site injections of NMDA (80 mM in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4). The NMDA solution was injected through a glass micropipette which was lowered into the brain at two sites according to the following coordinates from Bregma (Paxinos and Franklin, 2004): site1 A - 4.1 mm; L ± 4.3 mm; site 2a/b A -4.7 mm; L ± 3.5 mm. Microinjections were performed 0.5 mm above the bottom of the skull at site 1 (0.075 µl), 0.5 mm above at site 2a (0.1 µl) and 1 mm above at site 2b (0.05 µl) at the rate of 0.1 µl/min. The micropipette was left in place for 5 mn before retraction. The same procedure was applied to the control group but no solution was injected.

Cholinergic lesion. About four days after the EC lesion, mice were anesthetized with xylazine/ketamine (IP; 10 mg.kg⁻¹ Rompun 2%, Bayer Pharma and 100 mg.kg⁻¹ Imalgène

500, Merial, respectively). BFCNs were lesioned according to Moreau et al. (2008). Briefly, mu p75-saporin (Cat. # IT-16-250, batch # 59-24; Advanced Targeting Systems, San Diego, CA) diluted in PBS was injected ICV at a dose of 0.6 µg/µl/mouse (0.5 µl/side). Control mice received PBS only. Injections were performed through a cannula (internal Ø: 0.18 mm, external Ø: 0.23 mm) lowered according to the following coordinates from Bregma (Paxinos and Franklin, 2004): A, -0.4 mm; L, ± 0.6 mm; V, -2.0 mm. The four final groups were controls with no lesion (PBS: n = 12), BFCN lesion (SAP: n = 12), EC lesion (NMDA: n = 15) and both lesions (SAP+NMDA: n = 14). The day of the second surgery was the reference day 0.

Behavioural Testing

Locomotor activity (Day-9, Day-2, Day 15 and Day 98). Locomotion activity was measured at four key periods of surgery and behavioural testing. The four sessions were performed the day before the EC lesion for preoperative activity levels, 4 days later for the effect of the EC lesion, 15 days after the second surgery and 24h after completion of behavioural testing for the short term and the long term effects of the lesions, respectively. Two infrared light beams allowed the detection and recording of the number of cage crossings. The experiment began at 11:00 am for a complete 24-h light-dark cycle (8-h light, 12-h dark, 4-h light). Data were analyzed over the last 21h in order to avoid high levels of activity due to habituation to the experimental device, i.e., locomotor activity decreased within 3 h to reach the low level of activity under light period. This 21-h period was separated in light (9h) and dark (12h) phases.

Spatial recognition task (Day 17). The spatial recognition task is based on the spontaneous tendency of mice to explore preferentially displaced versus non-displaced objects from a familiar arrangement of objects. The open field (52 cm x 52 cm x 40 cm) had a black and white striped card fixed on a wall and a translucent floor divided into 25 equal squares by black lines. The floor was dimly illuminated by a 60W bulb placed underneath (50 lx in corners and 100 lx in the centre). A black and white striped card (21cm x 29.7cm) was fixed against one wall. We used the procedure described in Bour et al. (2008). Briefly, the task consisted of three exploration phases separated by 5 min: a 5-min habituation phase in an empty open-field, a 15-min acquisition phase with an arrangement of five different objects and a 15-min retention phase with a new arrangement of an identical set of object (two of

them being relocated). The exploration time for each category of objects, displaced objects (DO: thimble and gray wheel) category and non displaced objects (NDO: marble, rod on counter and yellow wheel), was divided by the number of objects per category to obtain the mean DO and NDO exploration times which were compared to evaluate spatial recognition. We also re-analysed our data in terms of *reactivity to spatial changes* (according to Parron and Save, 2004) assessed by the difference in exploration time between the retention phase and the acquisition phase for each category of objects and for each displaced object (gray wheel and thimble). Locomotor activity was evaluated in terms of number of floor square crossings during the 5-min habituation phase.

Object recognition task (Day 18). Twenty-four hours after the spatial recognition task, mice were tested in a 15-min object recognition task during which one of the three non-displaced familiar objects was replaced by a new object. Again, the number of object for each category was taken into account to calculate the mean exploration time for the new object (NO) and the four familiar objects (FO).

Morris Water Maze tasks (Days 23 to 31). This task is used to evaluate the spatial reference memory in mice with the hidden platform training procedure described in Moreau et al. (2008). Briefly, the circular pool (\emptyset : 140cm) filled with opaque water (20°C) was virtually divided in four equal quadrants with four starting points identified as north (N), east (E), south (S) and west (W). The circular platform (\emptyset : 10 cm) was placed in the centre of a quadrant, 1 cm underneath (hidden) or above (visible) the water surface. After two days of familiarization with the pool, the mice were trained in the reference memory task for 5 days (4 trials per day, maximum 60s per trial). Twenty four hour after the last acquisition day, the platform was removed from the pool and all the mice were given a 60-s probe trial. The amount of the time spent in the goal quadrant was compared to a 15-s chance level time. On the last day, the mice were tested for 4 trials with a visible platform in the opposite quadrant to check for possible motivation or sensorimotor biases. The latency and the distance to reach the platform, the duration of thigmotaxis (time spent within 10cm from the border of the pool) as well as the swimming velocity were recorded for each trial, using a video-tracking system (Noldus, Wageningen, The Netherlands).

Barnes maze task (Days 39 to 47 and Day 63). Four days after water-maze testing, a spatial reference memory task in a Barnes maze was performed as described in Moreau et al.

(2008). The Barnes maze consisted of a circular disk (\varnothing : 100 cm), fixed on a rotating seat (65 cm above the floor) with twelve equally spaced holes (\varnothing : 4 cm) located 9 cm from the edge. Briefly, the mice were trained to find the target hole leading to their home cage through a tubing system. After a 3-day habituation to this device, the acquisition phase was launched for six consecutive days (3 trials per day). One each trial, the mouse was released from the centre of the maze and allowed to find the target hole within 3 min (otherwise gently guided to it). The latency to enter the target hole and the order of the hole-visits were recorded. The visits to non-target holes were considered as errors. In addition, the each trial was classified into one of three operationally categories of search strategy (adapted from Harrison et al., 2006) defined as either *direct strategy* (direct or an adjacent hole visit before the target), *serial strategy* (minimum of two adjacent hole visits in a serial manner before the target) or *mixed strategy* (remaining trials). Sixteen days after training, each mouse was submitted to a 120-s probe trial with all holes closed. Long-term spatial memory is evaluated by comparing the ratio of the number of visits to the target hole/total number of visits to those of three equidistant holes (the opposite hole and those located $\pm 90^\circ$ from the target hole).

Histological verification

histochemistry on brain sections (Day 105). One week after the last injection, each mouse was anesthetized with an overdose of sodium pentobarbital (365 mg.kg⁻¹,IP) and was transcardially perfused with 35 ml of 4% paraformaldehyde (pH 7.4; 4°C). The brain was postfixed, cryprotected, and stored at -80°C. All 40 μ m sections were assigned to each histological treatment in a fixed order in order to work on regularly spaced sections for a given staining. The sections for acetylcholinesterase (AChE) activity and cresyl violet staining were collected onto gelatine-coated slides. All staining and immune-histological procedures, as well as quantification of AChE-positive staining and counts of immunopositive cells are described Moreau et al. (2008). Cresyl violet slides were used to evaluate the extent of EC lesion sites: no lesion, unilateral lesions or lesions extending to adjacent structures led to exclusion of the animal. The AChE histochemistry was used to verify the extent of the cholinergic denervation in both the hippocampus and the cortical mantle. Floating sections from the medial septum (MS)/diagonal band of Broca (DBB) complex and the nucleus basalis

(NB) were used for anti-cholineacetyltransferase (ChAT), anti-parvalbumin (Parv), and anti-Calbindin (Calb) Immunostainings. Animals with a cell loss lower than 65% in the MS were discarded from the study.

Statistical Analyses

Most data were processed using an analysis of variance (ANOVA) for two factors (EC and BFCN lesion), eventually with repeated measures for Object, Hole, Session, Day or Trial depending on the task. For morphological data, only the 4-group factor was considered. When appropriate, multiple post-hoc comparisons were performed with the Newman-Keuls test (NK). A Student t-test was used to compare time in quadrant (water maze) and object exploration to a chance level (15 s per quadrant) and to no re-exploration level (0 s indicating no change in exploration), respectively.

RESULTS

Verifications of the lesions

The EC lesion. The use of multiple-injections of NMDA solution induced reproducible partial lesions of lateral and medial part of the EC. Typical (i.e. smallest and largest) lesion extents are presented in figure 1. Cell loss occurred mostly in the anterior part of the lateral EC, whereas the medial EC was mostly affected on its dorsal portion. There was a visible reduction of the number of neurons in the layer II in all mice.

BFCN lesion. SAP and NMDA+SAP mice showed a dramatic loss of ChAT-positive neurons in the MS and the DBB, and, to a lesser extent, in the NB compared to PBS mice (figure 2). Mu p75-saporin induced a mean loss of 79% of immuno-positive neurons for both SAP and NMDA+SAP mice in the MS (cell counts: PBS = 98.9 ± 4.2 ; NMDA = 97.9 ± 4.2 ; SAP = 21.2 ± 3.5 ; NMDA+SAP = 20.9 ± 3.0 ; $F(1,49)=139.8$, $p<0.001$) and approximately 50% in the NB (cell counts: PBS = 16.6 ± 0.9 ; NMDA = 16.9 ± 0.5 ; SAP = 8.4 ± 0.8 ; NMDA+SAP = 8.5 ± 0.8 ; $F(1,49)=41.5$, $p<0.001$). SAP and NMDA+SAP groups had significantly less ChAT-positive neurons than PBS and NMDA groups in the MS and in the NB ($p<0.001$ for each comparison, NK). There was no difference between SAP and NMDA+SAP groups. Immunostaining directed against Parv in the MS, ChAT in the striatum and Calb in the cerebellum were not

affected by mu p75-saporin (data not shown). After exclusion on the basis of the EC lesion (size and specificity) and ChAT-positive cell loss (see methods), the group sizes were $n=12$ for PBS, $n=15$ for NMDA, $n=12$ for SAP and $n=14$ for NMDA+SAP.

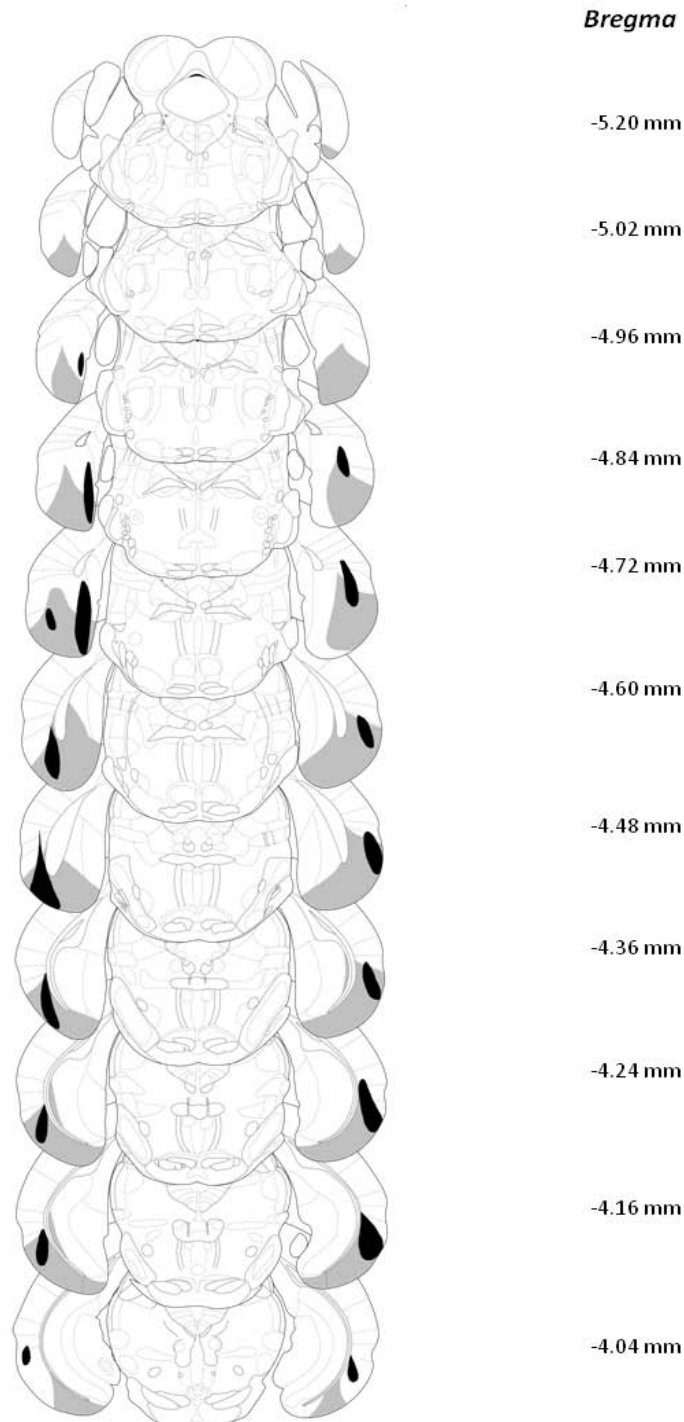


Figure 1. Representative coronal sections through the mouse brain (between -4.04 mm and -5.20 mm from bregma) showing the maximal extent (gray + dark) and the minimal extent (dark) of the EC lesion of the NMDA and NMDA+SAP mice.

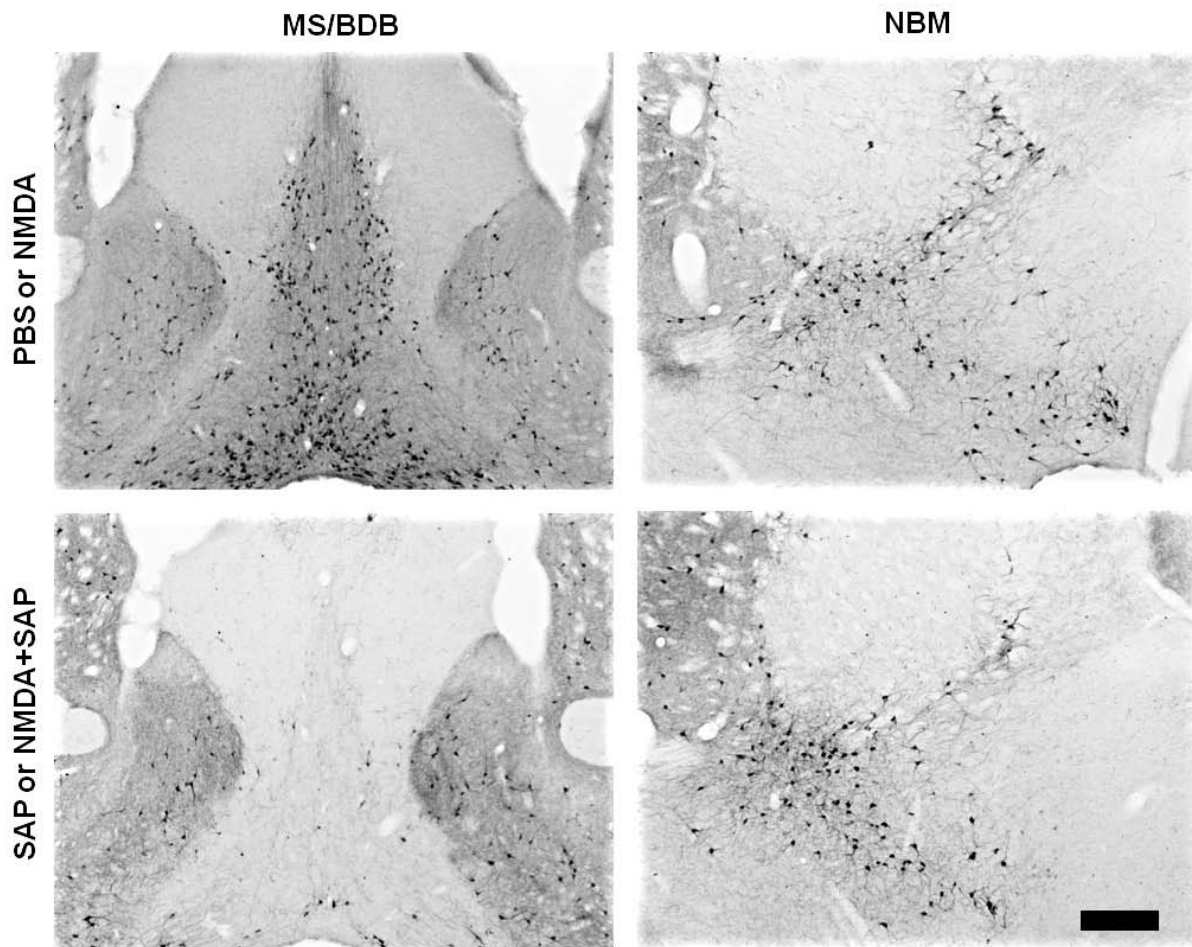


Figure 2. Microphotographs illustrating anti-ChAT immunostaining (a-f) on brain coronal sections in representative mouse treated with PBS or 0.6 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ mu p75-saporin. In mice injected with mu p75-saporin, the number of ChAT-positive neurons was markedly reduced in the MS/BDB (a, d) and to a lesser extent in the NBM (b,e). Scale bar = 200 μm .

AChE activity-staining. The AChE-positive staining was dramatically reduced in several regions of the cortical mantle and the entire hippocampus (Table 1). In SAP and NMDA+SAP mice, staining was significantly reduced in the dorsal and ventral hippocampus, as well as in the retrosplenial, visual and somatosensory cortices. Interestingly, the AChE-positive staining also differed between the dorsal and the ventral hippocampus in SAP and NMDA+SAP groups ($p < 0.001$ for each comparison, NK). No difference of AChE-staining was observed between groups in other sampled cortical regions.

Table 1: Optical density of AChE-Positive Reaction Product in Various Brain Regions of Mice.

Régions cérébrales	PBS	NMDA	SAP	NMDA+SAP	%(NMDA)	%(SAP)	%(NMDA+SAP)
Hippocampe dorsal	2,62 ± 0,31	2,89 ± 0,31	0,70 ± 0,14 ^{ns}	0,46 ± 0,09 ^{ns}	10%	-73%	-82%
Hippocampe ventral	2,89 ± 0,27	3,87 ± 0,39*	0,98 ± 0,16 ^{ns}	1,05 ± 0,10 ^{ns}	34%	-66%	-64%
Cortex retrosplénial	0,22 ± 0,03	0,54 ± 0,24	0,08 ± 0,02	0,16 ± 0,03	145%	-63%	-27%
Cortex visuel (V1, V2)	0,48 ± 0,06	0,51 ± 0,08	0,35 ± 0,09	0,26 ± 0,06	6%	-27%	-46%
Cortex somatosensoriel	0,41 ± 0,13	0,52 ± 0,12	0,17 ± 0,04	0,18 ± 0,03	27%	-58%	-56%
Cortex auditif	1,04 ± 0,24	1,36 ± 0,24	0,74 ± 0,15	0,55 ± 0,15 ^s	31%	-29%	-47%
Cortex entorhinal	1,31 ± 0,35	1,64 ± 0,23	0,95 ± 0,21	0,67 ± 0,13 ^s	25%	-27%	-49%
Cortex piriforme	1,12 ± 0,35	1,45 ± 0,34	0,54 ± 0,19	0,61 ± 0,24	29%	-52%	-46%
Cortex perirhinal	1,07 ± 0,25	0,98 ± 0,20	0,96 ± 0,26	0,84 ± 0,33	-8%	-10%	-21%

The data are presented as mean of optical density of AChE activity (arbitrary units) \pm SEM for illustrate the effect of the mu p75-saporin or PBS in PBS, NMDA, SAP and NMDA + SAP mice. For comparison the last four columns show the percentage of optical density reduction compared to the control group value for the four groups. (* $p < 0.05$, significantly different from PBS).

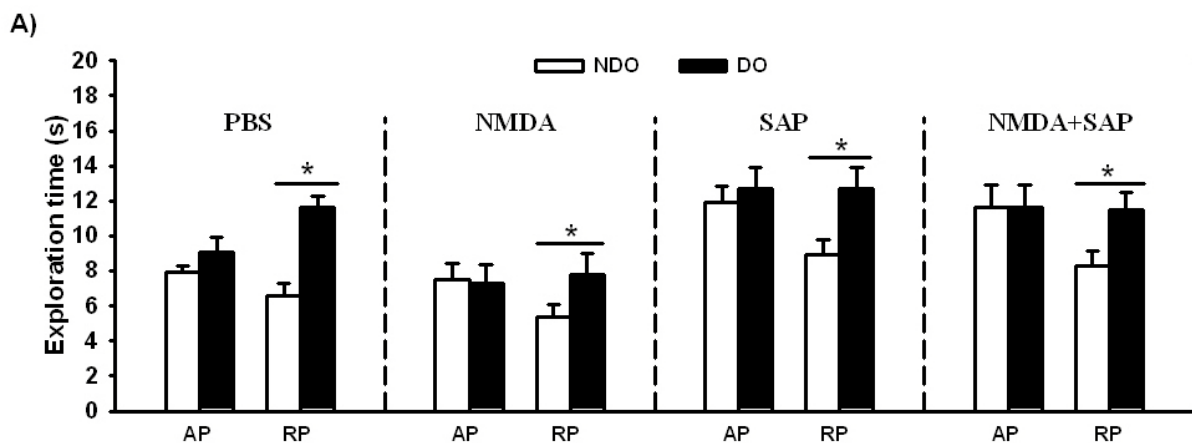
Behavioral data

Locomotor activity. At both pre- and postoperative EC lesion delays, the levels of activity were similar for the four groups in the dark phase as well as in the light phase (see table 2). After the BFCN lesion, the activity scores of SAP and SAP+NMDA groups were higher than those of both PBS and NMDA groups, especially during the dark phase (BFCN lesion x Session: light $F_{(3,147)}=8.38$, $p < 0.001$; dark: $F_{(3,147)}=20.66$, $p < 0.001$). In other words, the BFCN lesion, but not the EC lesion, increased locomotor activity levels. During the last final session, activity levels of the four groups returned to the basal levels observed before surgeries.

Spatial recognition task. During the habituation phase, the BFCN lesion induced an increase in the number of square crossed (BFCN lesion: $F_{(1,49)}=4,75$, $p < 0.05$). However, there was no statistical difference between the four groups. During the acquisition phase, the mice showed similar levels of exploration for the DO and the NDO categories (Object: $F_{(1,49)}=1.46$, $p=0.23$, see figure 3A). Thus, there was no preference for one category of object (DO: $10.08 \pm 4.49s$; NDO: $9.69 \pm 4.02s$). During the retention phase, the mice explored more the DO than the NDO (Object: $F_{(1,49)}=69.75$, $p < 0.001$). Interestingly, the EC lesion tend to reduce the preference for the DO (Object x CE lesion: $F_{(1,49)}=3.35$, $p=0.07$). The *re-exploration* levels presented in figure 3B confirm the global preference for DO (Object: $F_{(1,49)}=37,65$, $p < 0.001$), although it is expressed in different ways among groups. PBS mice showed increased

reactivity to the DO, i.e., increased their exploration between the two testing phases (PBS: $t_{1,11} = 2.28$, $p < 0.05$), but not the NDO. Conversely, lesioned groups showed no change in DO exploration, but selectively reduced their reactivity to the NDO (NMDA: $t_{1,14} = -3.70$, $p < 0.01$; SAP: $t_{1,11} = -4.15$, $p < 0.01$; NMDA+SAP: $t_{1,13} = -2.92$, $p < 0.01$). Moreover, figure 3C shows that the lesioned mice differentially explored the two DO as opposed to PBS mice. Indeed, NMDA, SAP and NMDA+SAP mice reacted selectively to the gray wheel which takes a new position (PBS: $t_{1,11} = 1.93$, $p = 0.07$; NMDA: $t_{1,14} = 2.12$, $p = 0.05$; SAP: $t_{1,11} = 2.06$, $p = 0.05$; NMDA+SAP: $t_{1,13} = 2.27$, $p < 0.05$), whereas they tended to neglect the thimble which replaces the gray wheel (no significant change for each group). Finally, the BFCN lesion significantly increased global exploration of the five objects during both phases of the task (acquisition: BFCN lesion $F_{(1,49)} = 16.29$, $p < 0.001$; retention: BFCN lesion $F_{(1,49)} = 10.23$, $p < 0.002$, see table 2). Total exploration of SAP and NMDA+SAP groups was higher than that of PBS and NMDA groups during the acquisition phase ($p < 0.02$ for each comparison, NK). The NMDA group showed a slightly lower exploration than that of the three other groups during the retention phase ($p < 0.05$ for each comparison, NK).

Object recognition task. Twenty four hours later, the mice were evaluated in the object recognition test. Only the BFCN lesion affected the object recognition performances (Object x BFCN lesion: $F_{(1,49)} = 13.33$, $p < 0.001$; see figure 4). Indeed, PBS and NMDA mice showed a significant preference for the NO (PBS: $p < 0.001$ and NMDA: $p = 0.02$, NK). There was no main effect of the lesions on global exploration.



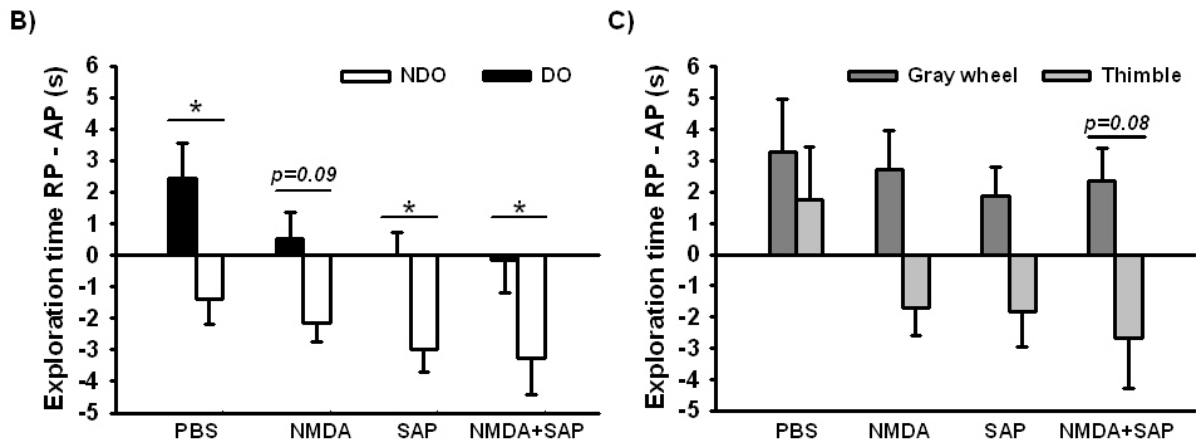


Figure 3. Performance of PBS, NMDA, SAP and NMDA+SAP mice in the spatial recognition task. (A) Exploration time (s) of each object categories during the acquisition (AP) and the retention phase. During the 15-min acquisition phase (AP), all groups of mice explored equally the two object categories. During the 15-min retention phase (RP) all groups explore more the displaced objects (DO) than the non-displaced objects (NDO). (B) Difference in the mean (\pm SEM) exploration time of the DO and the NDO between the RP and the AP. A positive score indicates an increase of interest in the objects and a negative score a decrease of interest. PBS mice explore preferentially the DO whereas NMDA, SAP and NMDA+SAP mice decrease those for the NDO. (C) Difference in the mean (\pm SEM) exploration time of the “gray wheel” and the “thimble” between the RP and the AP. A positive score indicates an increase of interest in the objects and a negative score a decrease of interest. All groups show increased exploration of the gray wheel, whereas NMDA, SAP and NMDA+SAP mice show a decreased exploration of the thimble. * $p < 0.05$, DO significantly different from the NDO, SNK test.

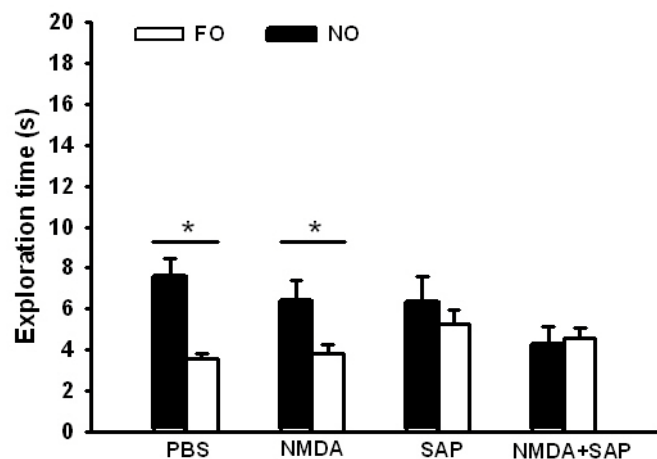
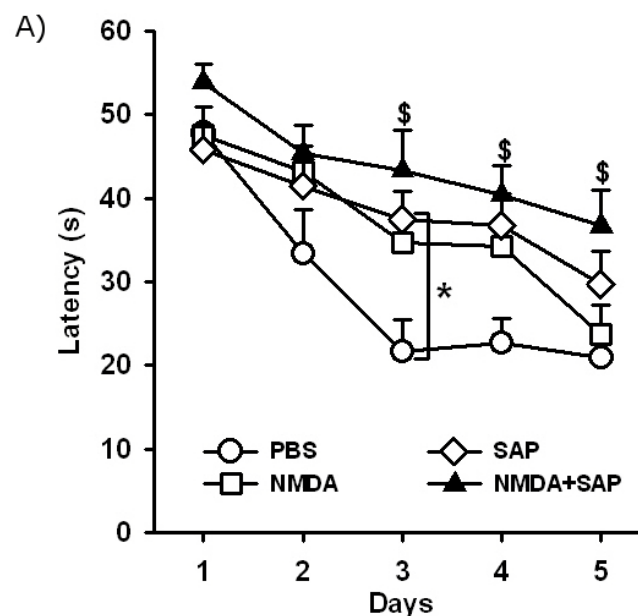


Figure 4. Performance of PBS, NMDA, SAP and NMDA+SAP mice in the object recognition task. The data are represented as the mean (\pm SEM) exploration time (s) of the novel object (NO) and the familiar objects (FO) during the 15 min exploration session. SAP and NMDA+SAP mice equally explore the NO than the FO. * $p < 0.05$, NO significantly different from the FO, SNK test.

Water-maze reference memory task. Analyses of the distance and the latency to reach the platform led to similar results, thus only latency data are presented in figure 5A. During the training phase, the mice globally improved their performance across days (latency and distance: Day: $F_{(4,196)} \geq 19.96$, $p < 0.0001$). However, the two types of lesion affected the performances (latency and distance: EC lesion: $F_{(1,49)} \geq 4.73$, $p \leq 0.03$; BFCN lesion: $F_{(1,49)} \geq 12.22$, $p \leq 0.001$). There was no interaction between the effects of the two lesions, presumably because of a ceiling effect due to the marked effect of each single lesion. Indeed, SAP mice showed significantly lower performance than PBS mice on day 3 ($p < 0.05$, NK), although they performed as well as PBS mice by the end of training. The most pronounced effect is shown by the NMDA+SAP mice with significantly lower performance compared to PBS mice on days 3, 4 and 5 ($p < 0.0001$, $p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively, NK). During the whole task, there was no significant difference in swim speed between the different groups. Thigmotaxis behavior is characterized by a typical circular wall-hugging swim (figure 5B). Globally, the duration of thigmotaxis decreased over days (Day: $F_{(4,196)} = 45.61$, $p < 0.0001$), but there is a main effect of each type of lesion (EC lesion: $F_{(1,49)} = 4.95$, $p = 0.03$; BFCN lesion: $F_{(1,49)} = 13.25$, $p < 0.0001$). However, thigmotaxis duration differed only between NMDA+SAP mice and PBS mice, most significantly on the second and the third days and close to significance on the fourth day. During the 60-s probe trial, only PBS and NMDA mice showed a clear preference for the target quadrant (see figure 5C). SAP mice tended to spend more than the 15-s chance level duration in the target quadrant, but it just failed to reach significance. Finally, NMDA+SAP mice were completely impaired in the probe trial.



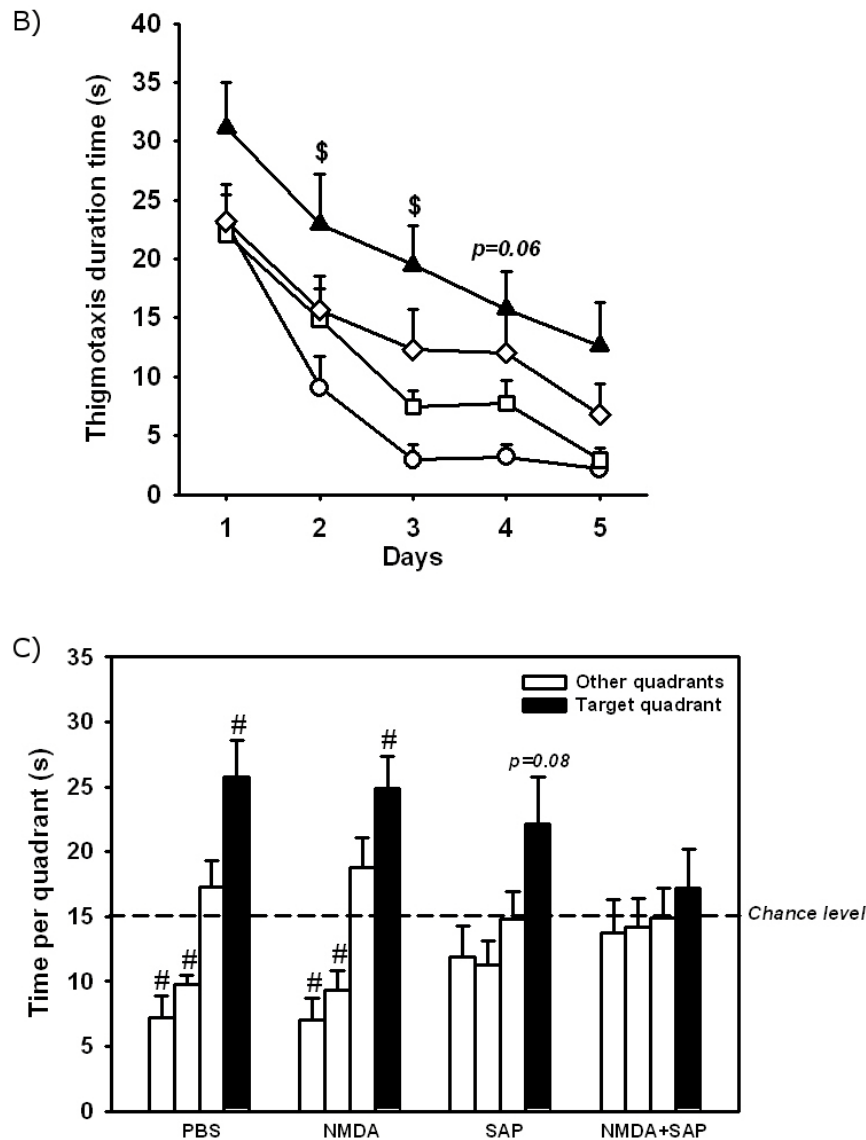


Figure 5. Performance of PBS, NMDA, SAP and NMDA+SAP mice during the 5 training days and in the 24h-delayed probe trial in the water maze task. (A) Average latency (\pm SEM) spent to reach the hidden platform. SAP and NMDA mice showed slower learning, but the most pronounced effect is shown by the NMDA+SAP mice. (B) Average thigmotaxis duration time (\pm SEM). Thigmotaxis was markedly expressed by NMDA+SAP mice. (C) Average time spent in the fourth water maze virtual quadrants (other quadrant: NO, NE and SE; target quadrant: SO) during the probe trial. NMDA+SAP mice spent equivalent times in each of the fourth quadrants. * $p < 0.05$, SAP significantly different from PBS; \$ $p < 0.05$, NMDA+SAP significantly different from PBS, SNK test; # $p < 0.001$, significantly different from chance level (15 s), Student *t*-test.

Water-maze visible platform task. All groups improved their performance over the four trials of the visible platform task (trials: $F_{(3,147)} = 2.86$, $p < 0.05$, see Table 2).

Barnes-Maze reference memory task. As shown in figure 6A, the evolution of number of errors was similar for the four groups and their performance improved over the five days of training (day: $F_{(4,196)}=24.02$, $p<0.0001$). The BFCN lesion clearly affected the latency to enter the target hole (BFCN lesion: $F_{(1,49)}=27.42$, $p<0.0001$; BFCN lesion x Day: $F_{(1,49)}=10.63$, $p<0.0001$; see figure 6B). On the beginning of the training phase (days 1 and 2), SAP and NMDA+SAP mice were significantly slower compared to PBS and NMDA mice ($p<0.0001$ for each comparison, NK). Moreover, NMDA+SAP mice performed even worse than SAP mice on the first day ($p<0.02$, NK). As shown in figure 6C, all groups used mostly a *serial search strategy* rather than a *direct goal strategy* to find the target hole.

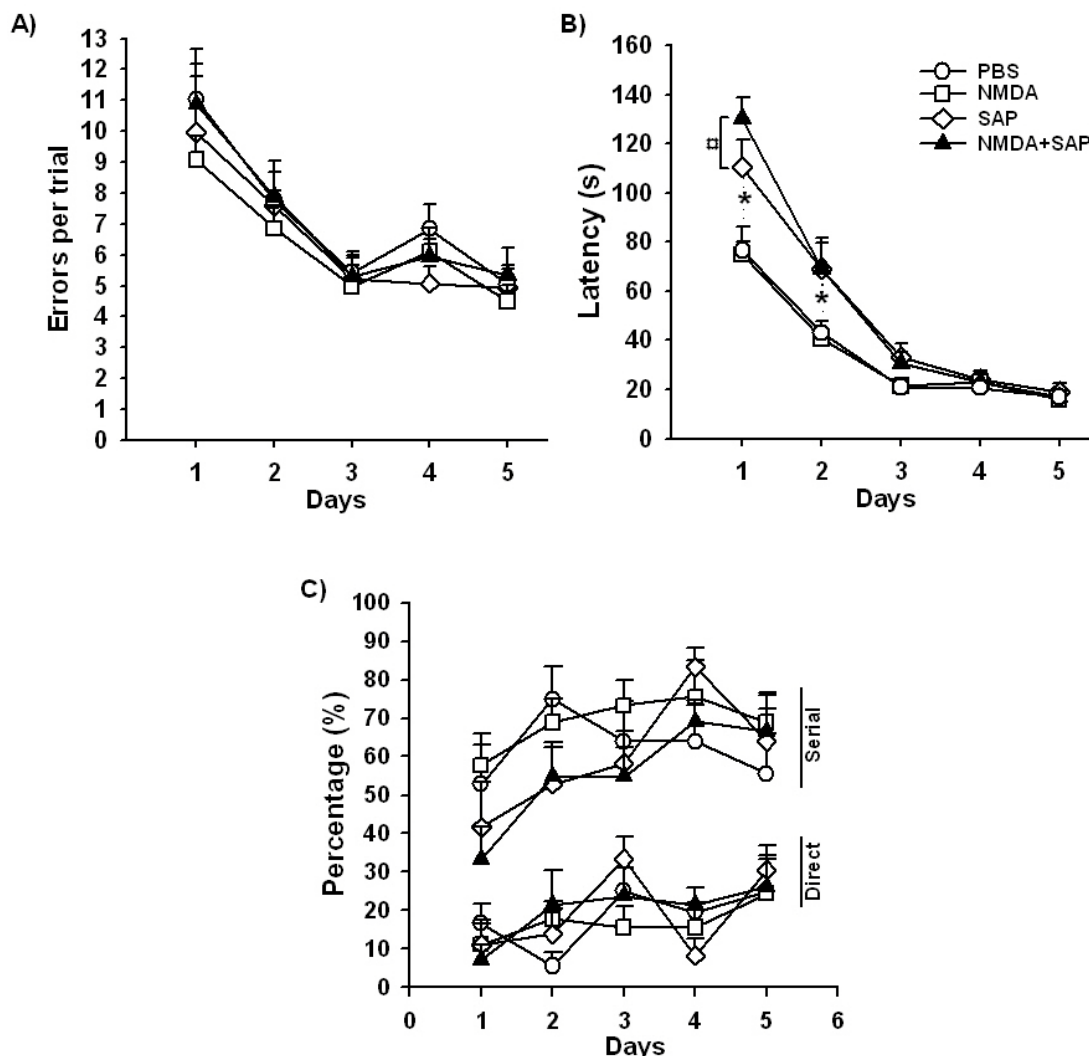


Figure 6. Performance of PBS, NMDA, SAP and NMDA+SAP mice during the 5 training days in the Barnes maze task. (A) Average number of errors (\pm SEM) before visiting the target hole. All mice performed equally. (B) Average latency (\pm SEM) to reach the target hole. SAP mice were slower, and NMDA+SAP mice even more, at the beginning of the training. (C) Percentage of different types of strategies used by the mice. The curve on the

top of the figure represents serial strategy and those on the bottom represent the direct strategy. Serial strategy was markedly expressed by the mice in comparison to the direct strategy. * $p < 0.001$, SAP and NMDA+SAP significantly different from PBS and NMDA mice; $\$ p < 0.05$, NMDA+SAP significantly different from SAP, SNK test.

Sixteen days after the end of the acquisition phase, the mice displayed a pattern of visit favoring the target hole during the probe test (hole: $F_{(3,147)} = 10.92$, $p = 0.0001$, see figure 7). There was a tendency for a main effect of the EC lesion (Hole x EC lesion: $F_{(3,147)} = 2.30$, $p = 0.07$). PBS mice explored the target hole significantly more than the other holes, as opposed to NMDA, SAP and NMDA+SAP mice. In addition, only the NMDA+SAP group differed significantly from the PBS groups in terms of target hole preference.

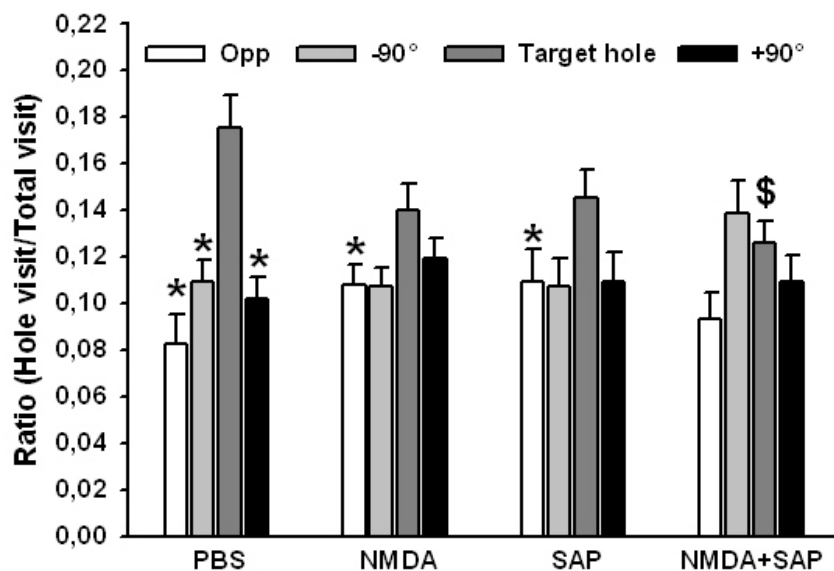


Figure 7. Performance of PBS, NMDA, SAP and NMDA+SAP mice in the 16-day postacquisition probe trial in the Barnes maze task. The data are expressed as a ratio (\pm SEM) calculated as the number of visits to the target hole divided by the total number of visits. NMDA+SAP mice show preference for the target hole. * $p < 0.02$, significantly different from the target hole, \$ $p < 0.02$, NMDA+SAP significantly different from PBS, SNK test.

Table 2: Behavioral effects of the EC and BFCNs lesion

		Before surgery	Post EC lesion	Post BFCN lesion	Final session	
Light phase activity (cage crossings/hour)	Days	-2	5	22	100	
	PBS	22,73 ± 2,28	15,34 ± 1,50	15,34 ± 1,14	20,74 ± 2,02	
	NMDA	21,12 ± 1,85	16,91 ± 1,93	20,50 ± 1,50	18,84 ± 1,78	
	SAP	17,85 ± 1,26	14,75 ± 1,99	29,06 ± 5,13	23,59 ± 2,90	
	NMDA+SAP	22,01 ± 1,96	16,01 ± 2,34	32,30 ± 5,27 ^{##}	31,62 ± 6,65	
Dark phase activity (cage crossings/hour)	PBS	42,06 ± 2,46	40,23 ± 4,32	41,59 ± 5,05	35,23 ± 3,93	
	NMDA	42,93 ± 4,58	44,52 ± 4,86	60,73 ± 6,33	34,91 ± 2,68	
	SAP	42,11 ± 4,89	41,68 ± 5,16	103,95 ± 18,35 ^{***}	50,72 ± 5,85	
	NMDA+SAP	42,91 ± 2,83	48,14 ± 2,83	125,28 ± 13,45 ^{***,§}	51,91 ± 8,08	
Habituation 0-5min	Treatment	PBS	NMDA	SAP	NMDA+SAP	
	Activity	173,00±14,49	190,53±10,90	161,58±15,08	138,92±16,81	
Spatial recognition task	Treatment	PBS	NMDA	SAP	NMDA+SAP	
	Acquisition	Total exploration	32,59 ± 2,23	30,79 ± 3,88	46,25 ± 3,76 ^{**}	46,23 ± 5,06 ^{**}
	Retention	Total exploration	43,04 ± 2,53	31,67 ± 4,30 [§]	52,14 ± 4,79	47,89 ± 3,54
Object recognition task	Treatment	PBS	NMDA	SAP	NMDA+SAP	
	Acquisition	Total exploration	21,88 ± 1,41	21,76 ± 2,43	27,30 ± 3,51	22,47 ± 2,95
Water maze visual task (distance in cm)	Trial	1	2	3	4	
	PBS	184 ± 18	207 ± 34	158 ± 18	193 ± 34	
	NMDA	193 ± 18	178 ± 37	141 ± 22	255 ± 82	
	SAP	233 ± 30	240 ± 33	176 ± 27	165 ± 18	
	NMDA+SAP	272 ± 42	240 ± 34	147 ± 21	186 ± 34	

Table 2. The data are presented as mean ± SEM for each type of behavioral data. The mice treated with the mu p75-saporin appear hyperactive after the cholinergic lesion, and more particularly the NMDA+SAP mice. In the recognition tasks, SAP mice show high level of exploration of the whole set of objects during the acquisition phase of the spatial recognition task but not during both the retention phase and the object recognition task. No difference is observed in the habituation phase of the spatial recognition task and in the water maze visual task for the four groups. (***) p<0.001, ** p<0.01, significantly different from PBS and NMDA, § p<0.02 significantly different from SAP, ## p<0.01, significantly different from PBS, ♂ p<0.05 from PBS, SAP and NMDA+SAP, SNK test)

DISCUSSION

The aim of this study was to determine in mice the cognitive effects of the combined lesion of the EC and BFCNs, two key structures affected in Alzheimer's disease. Cognitive effects were evaluated in tasks taxing spatial navigation (water-maze and Barnes-maze tasks) and both spatial and object recognition (object exploration paradigm) because these forms of

memory are known to be affected early in the course of AD (Burguess et al., 2001; Cushman et al., 2008; Kessels et al., 2010; Goudour et al., 2011; Weniger et al., 2011). The most important result of the present work is that combining the two lesions aggravated the deficits induced by single lesions on acquisition and retention performances in both spatial navigation tasks.

1. Behavioral effects of EC lesions.

The EC lesion aimed at modeling the EC shrinkage observed in early stages of AD. Our multiple-site NMDA injection procedure damaged both the lateral EC and the medial EC. In particular, there was a massive cell loss in layer II, as also reported in early stages of AD (Gómez-Isla et al., 1996; Kordower et al., 2001). The neurons of layer II are known to constitute the major projection of the EC to the hippocampus. Thus, such a lesion is expected to disconnect, at least partially, the two structures and disrupt hippocampal-dependent memory processing. Indeed, EC mice acquired the water-maze task more slowly than PBS mice, but ultimately reached the same level of performance. These acquisition deficits were not related to differences in general activity (actography), in swim velocity, as well as in motivation and sensori-motor abilities (visible platform training). Retention performances were relatively preserved during the water-maze probe trial, which suggests that EC mice were able to overcome their initial deficit with training. EC mice acquired the Barnes maze task as quickly as PBS mice and they both used the same serial search strategy to solve the task. It must be noted that the use of such a non spatial strategy during training may have hampered the detection of spatial memory deficits. The probe test, however, is more likely to reflect spatial memory as it is based on the mouse's selective preference for the target hole. Indeed, EC mice exhibited reduced memory performance after a 16-day retention delay which suggests that the EC contributes to remote spatial memory. To the best of our knowledge, the effect of excitotoxic lesions of the EC in mice has never been investigated in water-maze and Barnes-maze tasks. However, ibotenate-induced EC lesions in mice also induced delayed learning and remote memory deficits in radial-maze tasks (Cho et al., 1993; Cho and Jaffard 1994, 1995). In addition, fiber sparing excitotoxic lesions of the EC in rats induced only moderate acquisition and retention deficits in spatial memory tasks (Pouzet et al., 1999; Bannerman et al., 2001; Traissard et al. 2007). At first, these moderate

effects might appear quite surprising as it is assumed that EC degeneration would disrupt hippocampal information-processing involved in spatial memory functions (Aggleton et al., 2000). However, alternative strategies (e.g., as “cue guidance” strategy) sustained by other intact structures can partially compensate for the deficits in allocentric navigation consecutive to lesions of the hippocampal formation (Cho and Jaffard, 1995; Pearce et al., 1998; Pouzet et al., 1999; Oswald et al., 2003). Thus, our results are in line with the widely accepted role of the EC in allocentric spatial memory (Parron et al., 2004; Coutureau and Di Scala, 2009).

In a few studies, conventional EC lesions in rats deeply affected spatial recognition performances and moderately affected in object recognition performance (Galani et al., 1998; Parron and Save, 2004; Van Cauter et al., 2008). Here, EC mice showed a preference for the DO category which suggests that they were able to detect a spatial rearrangement among 5 familiar objects. However, when we re-analyzed our results in terms of “reactivity” to DO vs NDO like the three studies cited above, we also found that EC mice did react to the DO as opposed to PBS mice. Moreover, EC mice expressed a subtle impairment in the sense that they reacted to an object which occupies a new position, but they were unable to detect an object replacement. On the other hand, EC mice succeeded in the object recognition task. The mice were over-familiarized to the objects (2 times 15-min sessions), thus, the memory trace was most certainly robust even after a 24-h delay. Taken together, our results confirm that EC lesions affect more specifically the detection of a spatial rearrangement of objects than object recognition *per se* as found in rats (Galani et al., 1998; Parron and Save, 2004; Van Cauter et al., 2008). However, the spatial deficit reported here is clearly more subtle than that reported in rats.

To conclude on EC lesions as a model of early AD-related EC atrophy, excitotoxic lesions have some interesting features (partial lesion, fiber sparing, layer II) in common with the initial degeneration observed in AD patients. The resulting deficits were mild and limited to spatial disorientation while sparing object recognition which is affected later in the course of AD (Westerberg et al., 2006). Both navigational difficulties and episodic memory impairments characterize early AD. In this regard, the mild effect of our EC lesions in the object-in-place task might appear somewhat disappointing because it has been proposed to evaluate episodic-like memory in rodents (Good et al., 2007). However, this kind of task can also be

successfully performed by animals or early AD patients on the basis of relative familiarity judgements which does not depend on the integrity of the hippocampus-EC circuitry (Aggleton and Brown, 1999; Kessels et al., 2005; Westerberg et al., 2006).

2. Cognitive and non cognitive effects of BFCN lesions

BFCNs lesion were induced to mimic the basal forebrain cholinergic degeneration observed in AD. Mu p75 saporin induced a massive loss of ChAT-positive neurons in both the MS and the DBB (-79%), and, to lesser extent, in the NB (50%). In addition, the marked reduction of AChE-positive staining in the hippocampus and several cortical regions is in line with an extended degeneration of septohippocampal and basocortical cholinergic projections. The specificity of the BFCNs lesion was confirmed by the preservation of p75NTR bearing cerebellar cells and non-p75NTR striatal cholinergic neurons (Heckers et al., 1994; Rossner et al., 2000). Selectivity for the cholinergic system is suggested by stable counts of parv-positive neurons, presumably GABAergic neurons (Moreau et al., 2008). Interestingly, the loss of BFCNs reported in AD patients is close to that achieved presently in our mice and has been correlated with the degree of intellectual impairment (Lehericy et al., 1993).

The BFCN lesion delayed the acquisition of the water maze task: SAP mice were significantly impaired on day 3, but reached control levels on day 5. Retention performances after a 24-h retention delay were marginally impaired in the probe trial. Again, these deficits are not due to differences in motivation, in swimming or sensory-motor abilities. In the Barnes maze, the acquisition performances of SAP mice are similar to those of BPS mice in terms of number of errors, but they took a longer time to reach the target hole on days 1 and 2. They also maintained a non spatial search strategy throughout training as previously noted for EC and PBS mice. Nevertheless, SAP mice only showed a moderate reduction of performance in the probe trial. In general, our results in the water-maze and the Barnes-maze tasks are in line with previous studies showing that selective lesion of the BFCNs induces modest spatial deficits in mice and rats (Dornan et al., 1997; Moreau et al., 2008; Traissard et al., 2007). The nature of these deficits remains controversial and is further complicated by the differential contribution of each cholinergic nucleus (Parent and Baxter, 2004). Deficits in spatial memory tasks following MS/VDB lesions in rats have been related to various dysfunctions, such as impaired short-term spatial memory re-updating, strategy selection and/or

attentional processing, rather than impaired ability to use environmental cues *per se* (Baxter et al., 1995; Shen et al., 1996; Lehmann et al., 2003; Bizon et al., 2003; Fletcher et al., 2007). Interestingly, septohippocampal cholinergic deafferentation selectively affects remapping of place cells as result of environmental change (Ikonen et al., 2002; Leutgeb, et al., 1999). Thus, deficits in initial training and short-term spatial memory could be explained by difficulties in re-updating spatial representations in the hippocampus. On the other hand, NBM cholinergic lesions in rats also induce initial training deficits and the mild impairments in spatial tasks which are essentially interpreted as reflecting attentional dysfunctions (Baxter et al., 1995; Lehmann et al., 2003).

BFCNs are known to project to the perirhinal cortex and the hippocampus, two structures known to play a major role in object recognition memory (Brown and Aggleton, 2001). Therefore it is not surprising that long-term retention performance in the object recognition task was dramatically reduced in SAP mice, despite an extensive habituation to the familiar objects. This is in general agreement with a role of the NB and the BFCNs in object recognition in rats (Bartolini et al., 1996; Nimmrich et al., 2008; Paban et al., 2005). In the spatial recognition task, SAP mice showed a deficit similar to that of EC mice: they were still able to detect the appearance of a familiar object in a new location, but they were unable to detect a positional exchange of object. First, the deep impairment of SAP mice in object recognition could explain this pattern of deficit. Alternatively, a selective deficit in object-in-place association is also possible, especially since the septal cholinergic input of the hippocampus appears to be specifically involved in short-term updating of salient spatial locations (Easton et al., 2010; Ikonen et al., 2002). Attentional deficits consecutive to the NB degeneration may also contribute to the deficits obtained presently in both phases of this 5-object exploration paradigm.

Finally, the BFCN lesion induced a transient hyperactivity 2 weeks, but not 13 weeks, post-operatively as found previously in mice and rats (Traissard et al., 2007; Moreau et al., 2008). This hyperactivity could be related to a transient inflammatory response to the lesion (Nag et al., 2009). Alternatively, it may also result from a reactive hypersensitivity of striatal dopamine receptors consecutive to hippocampal cholinergic deafferentation (Mittelman et al., 1998).

3. Combined EC and BFCN lesions

The progressive degeneration of the BFCNs combined to the early EC atrophy, and the concurrent loss of their functional interactions, has been proposed to play a major role in the severity of memory decline in AD (Cassel et al., 2008). Here, NMDA+SAP mice hardly improved their water-maze acquisition performance and showed virtually no preference for the target quadrant in the probe trial. Their great difficulty in solving the task is also illustrated by increased thigmotaxis behavior during acquisition. The double lesion did not induce swimming, emotional or sensory-motor disturbances, thus, the most economic explanation for such massive deficits is that mechanisms involved in spatial navigation are deeply hampered by this lesion. The latency to reach the target hole during initial training in the Barnes maze was even more affected in NMDA+SAP than in SAP mice. Moreover, the double lesion completely impaired retention performance in the probe trial. The magnitude of these deficits tends to confirm our hypothesis that the use of a serial strategy preserved the level of errors performances, even in double lesioned mice. The massive impairment of spatial navigation induced by the double lesion contrasts with the mild deficit induced by each single lesion, which is in general agreement with the results obtained in rats (Traissard et al., 2007). However, the nature of the profound deficit induced by the double lesion is far from clear. The moderate impact of each single lesion tends to confirm that each region contributes to separate aspects of spatial memory processing, the EC being more specifically involved in allocentric navigation and the BFCNs more involved in spatial memory re-updating and in attentional processes, as evoked previously. The combination of BFCN lesion and EC lesions is expected to affect both distinct and overlapping roles of these regions, thus it is not surprising that it led to larger deficits than those induced by each single lesion. Moreover, the double lesion very likely affected some structures and/or connections more than each single lesion, for example, the septoentorhinal pathway which is known to be particularly involved in memory for novel stimuli and in modulating hippocampal activity (McGaughy et al., 2005; Mizumori et al., 1992).

In the object recognition task, NMDA+SAP mice are totally impaired like SAP mice. It is difficult to conclude on a specific impact of the double lesion because the BFCN lesion itself is sufficient to abolish object recognition. The impairment of NMDA+SAP mice in the spatial version of the task was similar to that observed in SAP and NMDA mice, i.e., they were

unable to detect a positional exchange of object. It seems surprising that mice with massive cortical and hippocampal cholinergic deafferentation and EC lesion, which removes the main inputs of the hippocampus, are still able to detect one of the two types of spatial change (i.e., new location vs object exchange). As suggested earlier, lesioned mice might have been able to detect the familiar object on a new location based on a relative familiarity judgment independent of the hippocampus (Aggleton and Brown, 1999). Alternatively, BFCN and/or EC lesions may not have been sufficiently extensive to affect significantly hippocampal activity and its primary role in coding object location information over object identity information (Manns et Eichenbaum, 2009; Lenck-Santini et al., 2005).

Finally, the EC lesion potentiated the locomotor hyperactivity induced by the SAP lesion as found in rats (Traissard et al., 2007). Although the EC lesion alone failed to induce hyperactivity in the present study, it has been shown that both single lesions induce modifications in the regulation of the dopaminergic tonus in rats (Coutureau et al., 2000; Mattsson et al., 2002; Jeltsch et al., 2004; Yee et al., 1995). Thus, the double lesion might potentiate this dopaminergic hyperactivity.

The nature and the severity of the deficits reported here for the EC lesion alone and the double lesion are relatively in accordance with the evolution of similar forms of deficits in patients, i.e., spatial disorientation, recognition memory impairment and non cognitive changes (wandering and agitation). However, there are many other cognitive functions (e.g., attention, episodic-like memory, working memory, procedural memory) to be evaluated to challenge this model. Traissard et al (2007) suggest effect on working memory. In addition, it would also be of prime interest to determine the impact of the EC lesion and the double lesion on some aspects of hippocampal neural activity (theta activity, place cells), on neurogenesis and on compensatory phenomena such as synaptic rearrangements (sprouting) within the hippocampus. Indeed, a selective effect of the double lesion on each of these particular phenomena is susceptible to provide some physiological and neuroanatomical bases for its massive effects on spatial navigation tasks. Taken together, extensive characterizations of the pattern of cognitive deficits and of the neurobiological changes induced by the double lesion should help to understand the relative contribution of the degeneration of these two key structures in the progression of AD's symptoms. However, the present approach has some drawbacks: one is that both lesions are performed

acutely, which does not reflect the slow progression of degenerative events and their interplay in the disease, another one is that neuropathological signs such as amyloid plaques and neurofibrillary tangles are absent, although this needs to be formally proven. In this view, recent works suggests that lesion approach and transgenic model may be complementary. The BFCN lesion promotes amyloid deposition in rabbits and APP transgenic mice, thereby confirming the suspected interplay between cholinergic degeneration and amyloid deposition in AD patients (Arendt et al., 1988; Beach et al., 2000; Chauhan et al., 2006). The role of the locus coeruleus in the development of AD-like pathology has also been successfully studied by combining transgenic and lesion approaches (Heneka et al., 2006). Therefore, we are currently applying this double lesion approach on transgenic mouse models of AD in order to further investigate the interaction between two key degenerative events and the expression of clinical and neuropathological markers of AD.

REFERENCE

- Aggleton, J.P. and Brown, M.W. 1999. Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. *Behav. Brain Sci.* **22**: 425-444.
- Aggleton, J.P., Vann, S.D., Oswald, C.J., and Good, M. 2000. Identifying cortical inputs to the rat hippocampus that subserve allocentric spatial processes: a simple problem with a complex answer. *Hippocampus* **10**: 466-474.
- Almkvist, O. 1996. Neuropsychological features of early Alzheimer's disease: preclinical and clinical stages. *Acta Neurol. Scand. Suppl* **165**: 63-71.
- Arendt, T., Taubert, G., Bigl, V., and Arendt, A. 1988. Amyloid deposition in the nucleus basalis of Meynert complex: a topographic marker for degenerating cell clusters in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **75**: 226-232.
- Bannerman, D.M., Yee, B.K., Lemaire, M., Wilbrecht, L., Jarrard, L., Iversen, S.D., Rawlins, J.N., and Good, M.A. 2001. The role of the entorhinal cortex in two forms of spatial learning and memory. *Exp. Brain Res.* **141**: 281-303.
- Bartolini, L., Casamenti, F., and Pepeu, G. 1996. Aniracetam restores object recognition impaired by age, scopolamine, and nucleus basalis lesions. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **53**: 277-283.
- Bartus, R.T., Dean, R.L., III, Beer, B., and Lippa, A.S. 1982. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* **217**: 408-414.
- Baxter, M.G., Bucci, D.J., Gorman, L.K., Wiley, R.G., and Gallagher, M. 1995. Selective immunotoxic lesions of basal forebrain cholinergic cells: effects on learning and memory in rats. *Behav. Neurosci.* **109**: 714-722.
- Beach, T.G., Kuo, Y.M., Spiegel, K., Emmerling, M.R., Sue, L.I., Kokjohn, K., and Roher, A.E. 2000. The cholinergic deficit coincides with Abeta deposition at the earliest histopathologic stages of Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **59**: 308-313.
- Bizon, J.L., Han, J.S., Hudon, C., and Gallagher, M. 2003. Effects of hippocampal cholinergic deafferentation on learning strategy selection in a visible platform version of the water maze. *Hippocampus* **13**: 676-684.
- Bour, A., Grootendorst, J., Vogel, E., Kelche, C., Dodart, J.C., Bales, K., Moreau, P.H., Sullivan, P.M., and Mathis, C. 2008. Middle-aged human apoE4 targeted-replacement mice show retention deficits on a wide range of spatial memory tasks. *Behav. Brain Res.* **193**: 174-182.
- Braak, H. and Braak, E. 1996. Evolution of the neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand. Suppl* **165**: 3-12.

Cassel, J.C., Mathis, C., Majchrzak, M., Moreau, P.H., and Dalrymple-Alford, J.C. 2008. Coexisting cholinergic and parahippocampal degeneration: a key to memory loss in dementia and a challenge for transgenic models? *Neurodegener. Dis.* **5**: 304-317.

Chauhan, N.B., 2006. Cholinergic immunolesioning produced tanglelike inclusion in TgCRND8 brain. *Soc Neurosc (Abs)*: 271.8/KK9.

Cho, Y.H., Beracochea, D., and Jaffard, R. 1993. Extended temporal gradient for the retrograde and anterograde amnesia produced by ibotenate entorhinal cortex lesions in mice. *J. Neurosci.* **13**: 1759-1766.

Cho, Y.H. and Jaffard, R. 1994. The entorhinal cortex and a delayed non-matching-to-place task in mice: emphasis on preoperative training and presentation procedure. *Eur. J. Neurosci.* **6**: 1265-1274.

Cho, Y.H. and Jaffard, R. 1995. Spatial location learning in mice with ibotenate lesions of entorhinal cortex or subiculum. *Neurobiol. Learn. Mem.* **64**: 285-290.

Coutureau, E., Galani, R., Jarrard, L.E., and Cassel, J.C. 2000. Selective lesions of the entorhinal cortex, the hippocampus, or the fimbria-fornix in rats: a comparison of effects on spontaneous and amphetamine-induced locomotion. *Exp. Brain Res.* **131**: 381-392.

Coutureau, E. and Di Scala, G. 2009. Entorhinal cortex and cognition. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **33**: 753-761.

Cushman, L.A., Stein, K., and Duffy, C.J. 2008. Detecting navigational deficits in cognitive aging and Alzheimer disease using virtual reality. *Neurology* **71**: 888-895.

Di Paola, M., Macaluso, E., Carlesimo, G.A., Tomaiuolo, F., Worsley, K.J., Fadda, L., and Caltagirone, C. 2007. Episodic memory impairment in patients with Alzheimer's disease is correlated with entorhinal cortex atrophy. A voxel-based morphometry study. *J. Neurol.* **254**: 774-781.

Dornan, W.A., McCampbell, A.R., Tinkler, G.P., Hickman, L.J., Bannon, A.W., Decker, M.W., and Gunther, K.L. 1997. Comparison of site specific injections into the basal forebrain on water maze and radial arm maze performance in the male rat after immunolesioning with 192 IgG saporin. *Behav. Brain Res.* **86**: 181-189.

Easton, A., Fitchett, A.E., Eacott, M.J., and Baxter, M.G. 2010. Medial septal cholinergic neurons are necessary for context-place memory but not episodic-like memory. *Hippocampus.*

Eustache, F., Desgranges, B., Giffard, B., de, I.S., V, and Baron, J.C. 2001. Entorhinal cortex disruption causes memory deficit in early Alzheimer's disease as shown by PET. *Neuroreport* **12**: 683-685.

Fletcher, B.R., Baxter, M.G., Guzowski, J.F., Shapiro, M.L., and Rapp, P.R. 2007. Selective cholinergic depletion of the hippocampus spares both behaviorally induced Arc transcription and spatial learning and memory. *Hippocampus* **17**: 227-234.

Gomez-Isla, T., Price, J.L., McKeel, D.W., Jr., Morris, J.C., Growdon, J.H., and Hyman, B.T. 1996. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **16**: 4491-4500.

Goudour, A., Samson, S., Bakchine, S., and Ehrle, N. 2011. Agnosic or semantic impairment in very mild Alzheimer's disease? *Neuropsychol. Dev. Cogn B Aging Neuropsychol. Cogn* **18**: 230-253.

Harrison, F.E., Reiserer, R.S., Tomarken, A.J., and McDonald, M.P. 2006. Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze. *Learn. Mem.* **13**: 809-819.

Heneka, M.T., Ramanathan, M., Jacobs, A.H., Dumitrescu-Ozimek, L., Bilkei-Gorzo, A., Debeir, T., Sastre, M., Galldiks, N., Zimmer, A., Hoehn, M., Heiss, W.D., Klockgether, T., and Staufenbiel, M. 2006. Locus ceruleus degeneration promotes Alzheimer pathogenesis in amyloid precursor protein 23 transgenic mice. *J. Neurosci.* **26**: 1343-1354.

Hort, J., Laczó, J., Vyhnaček, M., Bojar, M., Bures, J., and Vlček, K. 2007. Spatial navigation deficit in amnesic mild cognitive impairment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**: 4042-4047.

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

Jeltsch, H., Lazarus, C., Cosquer, B., Galani, R., and Cassel, J.C. 2004. No facilitation of amphetamine- or cocaine-induced hyperactivity in adult rats after various 192 IgG-saporin lesions in the basal forebrain. *Brain Res.* **1029**: 259-271.

Kessels, R.P., Meulenbroek, O., Fernandez, G., and Olde Rikkert, M.G. 2010. Spatial working memory in aging and mild cognitive impairment: effects of task load and contextual cueing. *Neuropsychol. Dev. Cogn B Aging Neuropsychol. Cogn* **17**: 556-574.

Killiany, R.J., Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Moss, M.B., Kikinis, R., Jolesz, F., Tanzi, R., Jones, K., and Albert, M.S. 2002. MRI measures of entorhinal cortex vs hippocampus in preclinical AD. *Neurology* **58**: 1188-1196.

Kordower, J.H., Chu, Y., Stebbins, G.T., DeKosky, S.T., Cochran, E.J., Bennett, D., and Mufson, E.J. 2001. Loss and atrophy of layer II entorhinal cortex neurons in elderly people with mild cognitive impairment. *Ann. Neurol.* **49**: 202-213.

Lehericy, S., Hirsch, E.C., Cervera-Pierot, P., Hersh, L.B., Bakchine, S., Piette, F., Duyckaerts, C., Hauw, J.J., Javoy-Agid, F., and Agid, Y. 1993. Heterogeneity and selectivity of the degeneration of cholinergic neurons in the basal forebrain of patients with Alzheimer's disease. *J. Comp Neurol.* **330**: 15-31.

Lehmann, O., Grottick, A.J., Cassel, J.C., and Higgins, G.A. 2003. A double dissociation between serial reaction time and radial maze performance in rats subjected to 192 IgG-saporin lesions of the nucleus basalis and/or the septal region. *Eur. J. Neurosci.* **18**: 651-666.

Lenck-Santini, P.P., Rivard, B., Muller, R.U., and Poucet, B. 2005. Study of CA1 place cell activity and exploratory behavior following spatial and nonspatial changes in the environment. *Hippocampus* **15**: 356-369.

Leutgeb, S. and Mizumori, S.J. 1999. Excitotoxic septal lesions result in spatial memory deficits and altered flexibility of hippocampal single-unit representations. *J. Neurosci.* **19**: 6661-6672.

Manns, J.R. and Eichenbaum, H. 2009. A cognitive map for object memory in the hippocampus. *Learn. Mem.* **16**: 616-624.

McGaughy, J., Koene, R.A., Eichenbaum, H., and Hasselmo, M.E. 2005. Cholinergic deafferentation of the entorhinal cortex in rats impairs encoding of novel but not familiar stimuli in a delayed nonmatch-to-sample task. *J. Neurosci.* **25**: 10273-10281.

Mittleman, G., Bratt, A.M., and Chase, R. 1998. Heterogeneity of the hippocampus: effects of subfield lesions on locomotion elicited by dopaminergic agonists. *Behav. Brain Res.* **92**: 31-45.

Mizumori, S.J., Ward, K.E., and Lavoie, A.M. 1992. Medial septal modulation of entorhinal single unit activity in anesthetized and freely moving rats. *Brain Res.* **570**: 188-197.

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

Nag, N., Baxter, M.G., and Berger-Sweeney, J.E. 2009. Efficacy of a murine-p75-saporin immunotoxin for selective lesions of basal forebrain cholinergic neurons in mice. *Neurosci. Lett.* **452**: 247-251.

Nimmrich, V., Szabo, R., Nyakas, C., Granic, I., Reymann, K.G., Schroder, U.H., Gross, G., Schoemaker, H., Wicke, K., Moller, A., and Luiten, P. 2008. Inhibition of Calpain Prevents N-Methyl-D-aspartate-Induced Degeneration of the Nucleus Basalis and Associated Behavioral Dysfunction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **327**: 343-352.

Oswald, C.J., Bannerman, D.M., Yee, B.K., Rawlins, J.N., Honey, R.C., and Good, M. 2003. Entorhinal cortex lesions disrupt the transition between the use of intra- and extramaze cues for navigation in the water maze. *Behav. Neurosci.* **117**: 588-595.

Paban, V., Jaffard, M., Chambon, C., Malafosse, M., and Alescio-Lautier, B. 2005. Time course of behavioral changes following basal forebrain cholinergic damage in rats: Environmental enrichment as a therapeutic intervention. *Neuroscience* **132**: 13-32.

Paban, V., Chambon, C., Jaffard, M., and Alescio-Lautier, B. 2005. Behavioral effects of basal forebrain cholinergic lesions in young adult and aging rats. *Behav. Neurosci.* **119**: 933-945.

Parron, C. and Save, E. 2004. Comparison of the effects of entorhinal and retrosplenial cortical lesions on habituation, reaction to spatial and non-spatial changes during object exploration in the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* **82**: 1-11.

- Paxinos, G., Franklin, K.B.J., 2004. The mouse brain atlas in stereotaxis coordinates. London: Elsevier Academic Press.
- Pearce, J.M., Roberts, A.D., and Good, M. 1998. Hippocampal lesions disrupt navigation based on cognitive maps but not heading vectors. *Nature* **396**: 75-77.
- Pearce, J.M., Roberts, A.D., and Good, M. 1998. Hippocampal lesions disrupt navigation based on cognitive maps but not heading vectors. *Nature* **396**: 75-77.
- Perry, E.K., Tomlinson, B.E., Blessed, G., Bergmann, K., Gibson, P.H., and Perry, R.H. 1978. Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *Br. Med. J.* **2**: 1457-1459.
- Pouzet, B., Welzl, H., Gubler, M.K., Broersen, L., Veenman, C.L., Feldon, J., Rawlins, J.N., and Yee, B.K. 1999. The effects of NMDA-induced retrohippocampal lesions on performance of four spatial memory tasks known to be sensitive to hippocampal damage in the rat. *Eur. J. Neurosci.* **11**: 123-140.
- Rossner, S., Schliebs, R., and Bigl, V. 2000. Intracerebroventricular infusion of CHO5, a rat monoclonal antibody directed against mouse low-affinity nerve growth factor receptor (p75NTR), specifically labels basal forebrain cholinergic neurons in mouse brain. *Metab Brain Dis.* **15**: 17-27.
- Shen, J., Barnes, C.A., Wenk, G.L., and McNaughton, B.L. 1996. Differential effects of selective immunotoxic lesions of medial septal cholinergic cells on spatial working and reference memory. *Behav. Neurosci.* **110**: 1181-1186.
- Stoub, T.R., Bulgakova, M., Leurgans, S., Bennett, D.A., Fleischman, D., Turner, D.A., and deToledo-Morrell, L. 2005. MRI predictors of risk of incident Alzheimer disease: a longitudinal study. *Neurology* **64**: 1520-1524.
- Traissard, N., Herbeaux, K., Cosquer, B., Jeltsch, H., Ferry, B., Galani, R., Pernon, A., Majchrzak, M., and Cassel, J.C. 2007. Combined damage to entorhinal cortex and cholinergic basal forebrain neurons, two early neurodegenerative features accompanying Alzheimer's disease: effects on locomotor activity and memory functions in rats. *Neuropsychopharmacology* **32**: 851-871.
- Van Cauter, T., Poucet, B., and Save, E. 2008. Delay-dependent involvement of the rat entorhinal cortex in habituation to a novel environment. *Neurobiol. Learn. Mem.* **90**: 192-199.
- Weniger, G., Ruhleder, M., Lange, C., Wolf, S., and Irle, E. 2011. Egocentric and allocentric memory as assessed by virtual reality in individuals with amnesic mild cognitive impairment. *Neuropsychologia* **49**: 518-527.
- Westerberg, C.E., Paller, K.A., Weintraub, S., Mesulam, M.M., Holdstock, J.S., Mayes, A.R., and Reber, P.J. 2006. When memory does not fail: familiarity-based recognition in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neuropsychology*. **20**: 193-205.

**DISCUSSION GENERALE
DU CHAPITRE 1**

DISCUSSION GENERALE DU CHAPITRE 1

Avant de commencer cette partie de discussion, je tiens à rappeler que l'ensemble des points, pour la plupart, a été discuté dans les **publications 1 et 2** et que, par conséquent, cette partie ne sera pas exhaustive mais présentera une synthèse des résultats obtenus. Je ne reviendrai ainsi que sur quelques points importants non discutés dans les manuscrits.

I. Synthèse des principaux résultats

1. La mu p75-saporine comme outil d'étude des déficits liés à la perte spécifique des NCB chez la souris

Dans cette première expérience, nous avons mis en évidence que la nouvelle version de mu p75-saporine, injectée en i.c.v. à la dose de $0,4 \mu\text{g}/\mu\text{L}^{-1}$, induit spécifiquement une perte de neurones ChAT-positifs massive dans le complexe SM/BDB (82 %) et dans le NBM (55%), tout en préservant les neurones GABAergiques parv-positifs et les cellules de Purkinje calb-positives. Suite à cette perte neuronale, nous avons observé une diminution drastique des fibres AChE-positives dans l'hippocampe et le manteau cortical, ce qui suggère une dénervation massive des voies septo-hippocampique et basalo-corticale.

Du point de vue des effets sur les performances comportementales des souris, un résumé des résultats est présenté dans le tableau 8. Rappelons que nous avons montré, sur le plan non cognitif, que la lésion des NCB induit une augmentation de l'activité locomotrice, en phases nocturne et diurne, qui semble s'atténuer avec le temps. De plus, les capacités de coordination sensorimotrice sont préservées dans la tâche de la barre. Sur le plan cognitif, la perte des NCB chez la souris perturbe modérément les capacités d'apprentissage et de

réretention à long terme dans deux tâches de mémoire spatiale, à savoir la piscine de Morris et le labyrinthe de Barnes.

Ainsi nous avons montré (pour la première fois) que la nouvelle version de mu p75-saporine est un bon outil pour réaliser une lésion spécifique des NCB chez la souris C57BL/6J. Elle permet également d'obtenir des déficits comportementaux relativement similaires à ce qui est obtenu chez le rat avec la 192 IgG-saporine, suite à la perte des NCB.

Expérience		Résultats
Tâches	Caractéristiques / protocoles	
Opération	Injection i.c.v. de mu p75-saporine (0,5 µL/côté à 0,4 µg/µL)	Diminution du nombre de neurones ChAT-positifs dans SM/BDB (82 %) et NBM (55 %)
Actographie	Séance 1 et 2 : avant opération	Pas de différence entre PBS et SAP
	Séance 3 : après lésion SAP (J12)	SAP hyperactives par rapport à PBS
	Séance 4 : après passation des tests (J49)	SAP hyperactives par rapport à PBS, mais <u>hyperactivité amoindrie</u> par rapport à la séance après lésion SAP
Test de la barre	4 essais	Pas de différence entre PBS et SAP
Piscine de Morris	5 jours d'acquisition	<u>Déficits modérés</u> , mais retard aux jours 2 et 3
	Test de réretention à 24 h	Pas de déficit pour les SAP, mais <u>performances amoindries</u> comparées aux PBS
Labyrinthe de Barnes	6 jours d'acquisition	<u>Déficits modérés</u> des SAP, retard aux jours 1 et 2
	Test de réretention à 16 jours	<u>Déficits modérés</u> car encore une petite préférence pour le trou cible

Tableau 8 : Synthèse des résultats de l'expérience 1 : **Mise au point de la lésion des NCB et caractérisation des effets comportementaux.**

2. La lésion combinée du CE et des NCB : effets comportementaux

Cette deuxième étude a montré que l'injection de NMDA dans le CE induit une lésion partielle du CEL et du CEM à la dose de 80 mM, et altère massivement les neurones de la couche II du CE. Comme dans l'expérience 1, l'injection de mu p75-saporine en i.c.v. induit une perte très importante des neurones du complexe SM/BDB (79%) et moindre dans le NBM (50%), affectant de ce fait l'ensemble des projections septo-hippocampique et basalo-corticale.

L'ensemble des résultats comportementaux est résumé dans le tableau 8. A travers cette étude nous avons pu montrer, pour la première fois chez la souris, que la lésion combinée du CE et des NCB induit un déficit massif d'apprentissage et de rétention dans l'ensemble des tâches de navigation spatiale (piscine de Morris, labyrinthe de Barnes), alors que chaque lésion seule (NMDA ou SAP) n'induit qu'un déficit modéré. Ces résultats ne sont pas sans rappeler ceux obtenus par Traissard et collaborateurs (2007) chez le rat dans des tâches similaires. De plus, dans cette expérience 2, nous avons montré pour la première fois chez la souris que la lésion des NCB seule ou en combinaison avec la lésion du CE altère dramatiquement les performances des souris dans la version non spatiale de la tâche de reconnaissance d'objets, mais ne semble pas, à première vue, perturber les performances dans une version spatiale. La lésion du CE, quant à elle, ne perturbe pas les performances des souris dans cette tâche aussi bien dans la version spatiale que non spatiale, ce qui laisse à penser que l'effet observé, quant aux performances des souris SAP et NMDA+SAP dans la version non spatiale, est vraisemblablement lié à la perte des NCB uniquement.

Pour terminer, nous avons également montré, à travers cette étude, que la lésion combinée du CE et NCB provoque une hyperactivité, aussi bien nocturne que diurne, encore plus importante que celle observée avec la lésion cholinergique seule.

Ainsi cette étude nous a permis : (1) de reproduire et confirmer les résultats obtenus dans l'expérience 1 quant à l'effet de la perte des NCB seule sur les performances comportementales, (2) d'asseoir les résultats obtenus par Traissard et collaborateurs (2007) quant à l'effet de la lésion combinée du CE et des NCB sur les performances cognitives et non cognitives, chez une autre espèce, (3) de montrer pour la première fois l'implication des NCB, suite à une lésion spécifique, dans une version non spatiale de la tâche de reconnaissance d'objets. Notre modèle de lésion combinée est donc mis au point, applicable à la souris et semble donner des déficits comportementaux similaires à ce qui est observé à un stade avancé de MA.

Expérience		Résultats	
Tâches	Caractéristiques / protocoles		
Opérations	Injections intraparenchymateuses multiples (80 mM ; site 1 : 0,075 µL, site 2a : 0,05 µL, site 2b : 0,1 µL)	Lésions partielles du CEL et du CEL avec atteinte importante de la couche II	
	Injection i.c.v. de mu p75-saporine (0,5 µL/côté à 0,6 µg/µL)	Diminution du nombre de neurones ChAT-positifs dans SM/BDB (79 %) et NBM (50 %)	
Actographie	Séance 1 : avant opération (J-2)	Pas de différence entre les groupes	
	Séance 2 : après lésion NMDA (J5)	Pas de différence entre les groupes	
	Séance 3 : après lésion SAP (J22)	SAP hyperactives par rapport à PBS ; NMDA+SAP hyperactives par rapport à PBS et SAP	
	Séance 4 : après passation des tests (J100)	Pas de différence entre les groupes	
Open field	Reconnaissance spatiale (5 min)	NMDA	Pas de déficit, mais <u>difficultés</u> à détecter un simple échange d'objets
		SAP	Pas de déficit, mais <u>difficultés</u> à détecter un simple échange d'objets
		NMDA+SAP	Pas de déficit, mais <u>difficultés</u> à détecter un simple échange d'objets
	Reconnaissance d'objet (24 h)	NMDA	Pas de déficit
		SAP	Déficits importants
		NMDA+SAP	Déficits importants
Piscine de Morris	5 jours d'acquisition	NMDA	<u>Déficits modérés</u> , léger retard d'acquisition par rapport aux PBS
		SAP	<u>Déficits modérés</u> , mais retard au jours 3 par rapport aux PBS
		NMDA+SAP	Déficits importants
	Test de rétention à 24 h	NMDA	Pas de déficit
		SAP	Pas de déficit
		NMDA+SAP	Déficits importants
Labyrinthe de Barnes	6 jours d'acquisition	NMDA	Pas de déficit
		SAP	<u>Déficits modérés</u> des SAP, retard aux jours 1 et 2
		NMDA+SAP	Déficits , retard encore plus important que SAP aux jours 1 et 2
	Test de rétention à 16 jours	NMDA	<u>Déficits modérés</u> car encore petite préférence pour le trou cible
		SAP	<u>Déficits modérés</u> car encore petite préférence pour le trou cible
		NMDA+SAP	Déficits importants

Tableau 9 : Synthèse des résultats de l'expérience 2 : **Caractérisation des effets cognitifs et comportementaux de la lésion combinée du CE et des NCB chez les souris non transgéniques C57BL/6J.**

II. La lésion des NCB : la mu p75-saporine et étendue de lésion (aspects techniques)

Depuis le début des années 1980, la recherche de l'implication des NCB dans les processus mnésiques a été étudiée principalement chez le Rat grâce à l'arrivée d'une immunotoxine spécifique, la 192 IgG saporine, qui permet une lésion ciblée des neurones cholinergiques. L'étude spécifique de ces NCB chez la souris n'est que très récente et ne compte que deux publications traitant de l'utilisation d'une première version de mu p75-saporine (Berger-Sweeney et coll., 2001 ; Hunter et coll., 2004). Ce n'est qu'en 2007 qu'est parue une nouvelle version de cette immunotoxine dédiée à la Souris, ce qui explique que, dans la littérature, très peu d'études traitent actuellement de l'utilisation de la nouvelle forme de l'immunotoxine mu p75-saporine dont nous sommes les premiers à avoir testé l'efficacité et les effets sur les performances cognitives des souris. Comme nous avons pu le voir dans les résultats présentés dans ce travail (**Publications 1 et 2**), qui font écho aux travaux de Ho et collaborateurs (2009) ainsi que de Nag et collaborateurs (2009), cette immunotoxine provoque une diminution importante du nombre de neurones cholinergiques présents dans le complexe SM/BDB (80% environ), mais une diminution moins importante des neurones cholinergiques du NBM (50 à 60% environ) lorsque l'injection de mu p75-saporine est réalisée par voie i.c.v.

A l'heure actuelle, nous ne pouvons apporter que des hypothèses quant à la différence de perte neuronale entre les deux noyaux cholinergiques, car aucune étude dans la littérature n'a exploré les causes de cette différence. Ainsi, d'après nos observations (*cf* figure 31), il semblerait que la perte des neurones cholinergiques soit décroissante selon l'axe rostro-caudale malgré une injection i.c.v. relativement postérieure, en comparaison à la localisation des deux noyaux cholinergiques du complexe SM/BDB.

Au vu de ce résultat, une première hypothèse peut être proposée sur la base du déplacement du flux de liquide céphalo-rachidien. En effet, si ce liquide se déplace selon un axe caudo-rostral, il se pourrait que, suite à l'injection, la quantité d'anticorps se retrouve plus proche des neurones cholinergiques du SM/BDB, plus antérieurs, que ceux du NBM, plus postérieurs. Une deuxième hypothèse peut être liée à la position anatomique de ces

deux noyaux. En effet le NBM, en comparaison au SM/BDB, se trouve situé plus en profondeur. Ainsi, la différence observée pourrait s'expliquer par une difficulté d'accessibilité des anticorps à ces deux noyaux. Pour terminer, une dernière hypothèse pourrait être postulée au regard d'un résultat observé dans deux études selon lesquelles une petite population de neurones cholinergiques du NBM ne posséderait pas de récepteurs p75, ce qui pourrait expliquer une résistance probable de certains de ces neurones à la toxine (Heckers et coll., 1994 ; Rossner et coll., 2000).

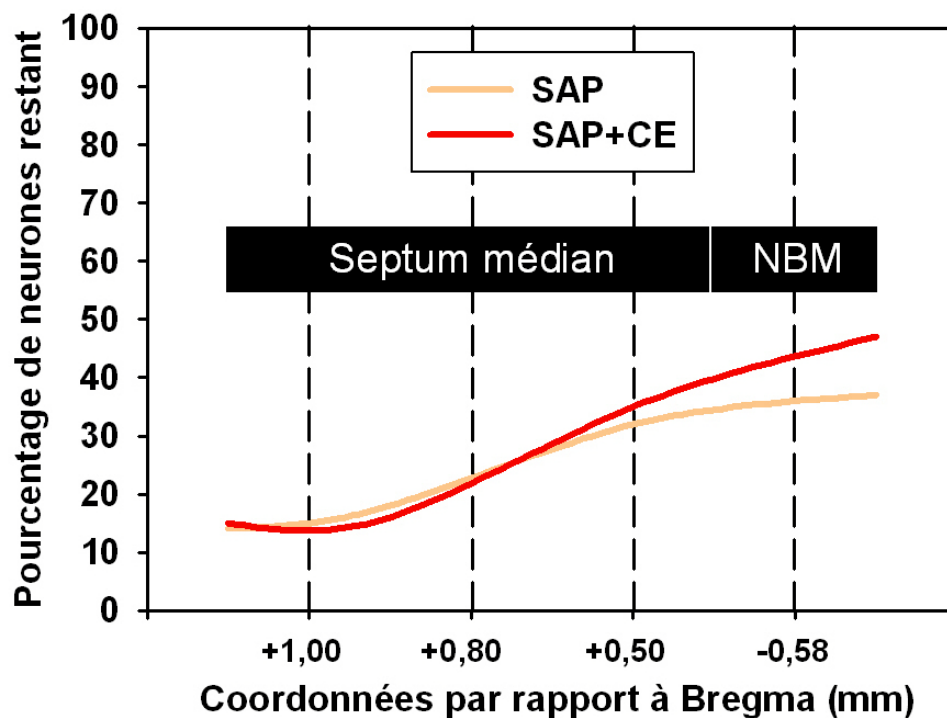


Figure 31 : Illustration de la répartition du pourcentage de neurones cholinergiques restants après injection de mu p75-saporine obtenue dans l'expérience 2.

III. Effet comportemental de la lésion du CE et des NCB

1. La lésion des NCB et activité locomotrice

Comme nous avons pu le voir dans les résultats présentés dans la **publication 1** et la **publication 2**, les souris ayant reçu une lésion des NCB ont une hyperactivité exacerbée par rapport aux souris témoins, surtout en phase nocturne. Ce résultat témoigne d'un effet important de la lésion des NCB et de la dénervation septo-hippocampique et basalo-corticale sur l'activité locomotrice. En effet, chez le rat, la dénervation des voies cholinergiques affecte les fonctions du noyau *accumbens* et induit une hyperactivité (Glick et coll., 1971). Elle pourrait être liée à une perturbation du contrôle inhibiteur exercé par l'hippocampe sur la composante dopaminergique du noyau *accumbens*, impliqué dans la modulation de l'activité locomotrice (Gray et McNaughton, 1983 ; Wilkinson et coll., 1993 ; Weiner et coll., 1996). Cependant, ce phénomène n'est pas encore clairement élucidé à l'heure actuelle. La perte des projections septo-hippocampiques pourrait induire une altération fonctionnelle des connexions entre le *subiculum* (une des principales voies de sortie de l'hippocampe) et le noyau *accumbens* (Bannerman et coll., 2001 ; O'Donnell et Grace, 1995). De plus, la perte des projections vers le cortex moteur (voie basalo-corticale) pourrait exacerber cette perte de contrôle de l'activité locomotrice. En revanche, les rats traités à la 192 IgG-saporine ne montrent pas d'hyperactivité aussi forte (Traissard et coll., 2007 ; Lecourtier et coll., 2010), ce qui laisse à penser que la lésion induite par la mu p-75 saporine est plus efficace, ou bien que les processus de régulation de l'activité locomotrice diffèrent entre les deux espèces.

Néanmoins, il est à noter que cette hyperactivité, induite par la lésion des NCB, semble être transitoire et diminue progressivement avec le temps. En effet, dans la première étude, les souris SAP présentent une activité locomotrice importante 15 jours après la lésion, alors que celle-ci se trouve significativement diminuée à 49 jours. De plus, dans la deuxième étude, aussi bien les souris SAP que NMDA+SAP présentent toutes une hyperactivité marquée à 15 jours, celle-ci retrouvant un niveau normal 100 jours après la lésion. Ces résultats laissent à penser que des mécanismes de compensation peuvent se mettre en place pour réguler cette hyperactivité liée à la lésion. En effet, il est connu que la désafférentation de l'hippocampe peut stimuler un bourgeonnement hétérotopique sympathique monoaminergique provenant du ganglion cervical supérieur (Loy et coll., 1980 ; Bjorklund et Stenevi, 1981 ;

Crutcher et coll, 1981), qui viendrait compenser la perte des projections cholinergiques. De plus, un bourgeonnement spontané venant de la voie septo-hippocampique ventrale pouvant coloniser les zones désafférentées de l'hippocampe pour y restaurer une innervation cholinergique compensatoire (Cassel et coll., 1997) a également été mis en évidence. Cependant, à l'heure actuelle, aucune étude n'a pu mettre en lien un quelconque rétablissement de l'activité locomotrice avec ces phénomènes compensatoires.

2. Le CE et la mémoire spatiale : la lésion du CE n'induit que des déficits modérés

Les effets modérés de la lésion du CE observés dans notre étude sont globalement en accord avec ce qui est obtenu dans d'autres études relatant le rôle supposé du CE, après une lésion excitotoxique sélective, dans les capacités de navigation spatiale. Chez des souris Balb/c, Cho et Jaffard (1994, 1995) ont montré que des lésions du CE, similaires aux nôtres (partielles et préférentiellement centrées sur le CEL) et réalisées à l'acide iboténique, induisaient uniquement un retard d'apprentissage spatial dans une tâche de labyrinthe radial à huit branches selon un protocole de mémoire spatiale de référence et un protocole de mémoire spatiale de travail. De plus aucun effet, ou uniquement des déficits modérés de performances d'acquisition et de rétention, n'a été rapporté avec des lésions excitotoxiques chez les rats (Pouzet et coll., 1999 ; Traissard et coll., 2007 ; Sipos et coll., 2007 ; Bannerman et coll., 2001), alors que des déficits massifs pour les deux phases peuvent apparaître avec des lésions conventionnelles plus étendues (*e.g.* aspiration, radiofréquence, électrolytique ; Parron et coll., 2004 ; Nagahara et coll., 1995 ; Hardman et coll., 1997 ; Schenk et Morris, 1985). Il est possible que les lésions excitotoxiques soient plus susceptibles d'épargner les fibres de passage et de n'affecter préférentiellement qu'une sous-population de neurones plus vulnérables du CE, tout comme ceux trouvés de la couche II (Stranahan et Mattson, 2010), et, par ce fait, n'affecter que modérément les performances d'acquisition et de rétention. De manière alternative, l'impact limité sur la navigation spatiale peut également être expliqué en termes d'étendue de lésion, ou de lésion plus spécifique, c'est-à-dire en fonction des sous-régions du CE touchées (Steffenach et coll., 2005). Cependant, nos lésions partielles touchent aussi bien les bandes dorsolatérale que ventromédiane du CE. Dans tous les cas, le reste du tissu non touché pourrait être suffisant pour préserver certains processus

impliqués dans la mémoire spatiale. De plus, d'autres connexions et/ou d'autres structures restées intactes peuvent avoir compensé un déficit d'utilisation des relations géométriques entre les indices pour réussir la tâche (stratégie allocentrique ; Aggleton et Brown, 1999 ; Pouzet et coll., 1999 ; Aggleton et coll., 2000). En effet, il a été proposé que les rongeurs dont le CE est lésé peuvent améliorer leurs performances de navigation en utilisant une stratégie alternative guidée par un indice (*cue guidance*). Cette stratégie est définie comme l'utilisation d'un indice saillant (*distal*) proche de la zone cible (Colley et coll., 1986 ; Cho et Jaffard, 1995 ; Oswald et Good, 2000). L'utilisation d'une telle stratégie est susceptible de dépendre de connexions sous-corticales à l'hippocampe telles que celles venant du noyau thalamique antérieur (Warburton et coll., 2000 ; Burwell et coll., 2004). A l'inverse, dans le labyrinthe de Barnes, tous les groupes de souris ont développé et utilisé une stratégie de type sériel. Les bonnes performances des souris témoins lors du test de rétention suggèrent que celles-ci ont acquis des connaissances de nature spatiale malgré l'utilisation d'une stratégie sérielle, et sont donc capables de passer d'une stratégie à l'autre (allocentrique vs *cue guidance*). De manière évidente, les souris ayant une lésion du CE comptent uniquement sur une stratégie sérielle pour réussir la tâche du labyrinthe de Barnes, comme le suggèrent leurs faibles performances lors du test de rétention. En conséquence nos résultats, en dépit des divergences apparentes quant aux observations faites dans les deux tâches de navigation spatiale, sont en lien avec un rôle du CE dans la mémoire spatiale allocentrique et dans la flexibilité comportementale nécessaire pour modifier les stratégies de réponse (Cho et Jaffard, 1995 ; Pouzet et coll., 1999 ; Oswald et Good, 2000 ; Oswald et coll., 2003 ; Coutureau et Di Scala, 2009).

3. Le CE impliqué dans les processus de rétention à très long terme ?

Lors du test de rétention réalisé dans la tâche du labyrinthe de Barnes, nous avons observé que les souris ayant reçu une lésion du CE avaient une réduction du nombre de visites pour le trou cible en comparaison aux souris contrôles (PBS). Cette observation laisse à penser que la lésion du CE affecte également la mémoire spatiale à long terme. De manière très intéressante, l'altération des performances de rétention, dans ce test, n'apparaît qu'après un délai de rétention de 16 jours alors que, dans la tâche de la piscine de

Morris, les performances sont correctes à un délai de 24 h, et ce malgré des capacités d'acquisition préservées dans les deux tâches. En conséquence, le CE pourrait être davantage impliqué dans l'expression de la mémoire spatiale ancienne. En effet, après lésion du CE chez la souris, Cho et collaborateurs (1993) ont rapporté un déficit de rétention dépendant du délai dans une tâche de labyrinthe radial et à des délais similaires aux nôtres (1 jour et 2 semaines). Ils ont interprété ce déficit comme résultant d'un oubli plus rapide lié à la lésion car, tout comme pour nous, les souris présentaient des performances d'acquisition relativement correctes.

4. Déficiences de mémoire spatiale suite à la lésion combinée du CE et des NCB : un déficit de mémoire de travail ?

De manière très intéressante, cette lésion combinée du CE et des NCB altère dramatiquement des capacités d'apprentissage et de rétention dans les deux tâches de mémoire spatiale utilisées, ce qui est en accord avec ce qui est observé dans l'étude princeps réalisée chez le rat (Traissard et coll., 2007). Comme il est discuté dans la **publication 2**, nos résultats suggèrent que la dénervation massive corticale et hippocampique cholinergique et la lésion du CE, qui prive l'hippocampe de ces voies d'entrée de l'information, peut avoir affecté aussi bien les processus de mémoire spatiale, sous-tendus par le CE, que d'autres processus tels que les processus attentionnels pouvant être sous-tendus également par le CE (Coutureau et coll., 1999 ; Oswald et coll., 2001) et par les NCB - plus particulièrement le NBM (Lehmann et coll., 2003). L'altération de ces deux processus pourrait donc perturber fortement la mémoire allocentrique.

D'autres fonctions cognitives, pourraient être affectées par la double lésion, comme la mémoire épisodique-like, ou la mémoire de travail. En effet, Traissard et collaborateurs (2007) ont observé un effet important de la double lésion sur la mémoire de travail. Dans leur étude, ils montrent également, dans la tâche de la piscine de Morris et dans la tâche du labyrinthe radial, que les rats ayant reçu une lésion combinée du CE et des NCB présentent des déficits de mémoire de travail bien plus marqués que les rats ayant reçu chaque lésion seule. Généralement, il est bien établi dans la littérature que la lésion spécifique de l'une ou l'autre de ces deux structures semble perturber les processus de mémoire spatiale de travail

dans des tâches telles que la piscine de Morris (Galani et coll., 1997, 1998 ; Aztiria et coll., 2007), le labyrinthe radial (Pouzet et coll., 1999 ; Lehmann et coll., 2003) ou le labyrinthe en T (Bannerman et coll., 2001). Cependant, l'implication du CE ou des NCB seuls dans les processus de mémoire spatiale de travail reste controversée par d'autres études qui ne trouvent pas d'altération dans ces mêmes tâches après la lésion (Roof et coll., 1993 ; Pouzet et coll., 1999 ; Galani et coll., 2002 ; Marighetto et coll., 1998 ; Pang et coll., 2001 ; Chappell et coll., 1998). Ainsi, le rôle précis de chaque structure dans ce processus cognitif n'est pas clairement établi mais les résultats obtenus par Traissard et collaborateurs (2007) suggèrent fortement qu'il est perturbé après la lésion combinée du CE et des NCB. Si cela peut être le cas dans notre étude, des expériences complémentaires seront nécessaires pour clarifier ce point chez la souris.

5. Le modèle de lésions combinées du CE et des NCB : un modèle de déficits cognitifs similaires à ce qui est observé dans la MA ?

La nature et la sévérité des déficits cognitifs rapportés dans notre étude et dans celle réalisée par Traissard et collaborateurs (2007) sur deux espèces différentes, quant à l'effet de la lésion du CE seule et la lésion combinée du CE et des NCB, sont relativement en accord avec l'évolution des déficits observés chez les patients atteints de la MA, comme la désorientation spatiale et des troubles de la mémoire de reconnaissance et de comportements non cognitifs (comme une forte déambulation ou des troubles de l'agitation). Notre modèle semble donc bien mimer les troubles cognitifs associés à la MA. Dans la maladie, cependant, une altération progressive des troubles des fonctions cognitives est observée. En effet, chez l'Homme, il est suggéré que la région retrohippocampique du lobe temporal médian est la région cérébrale montrant les premiers signes de neurodégénérescence dans la MA. De par ses connexions intrinsèques avec la formation hippocampique, il est présumé que ces premières altérations structurelles jouent un rôle dans l'apparition des premiers déficits de mémoire épisodique dans les premiers temps de la maladie (Braak et Braak, 1993). C'est pourquoi ces changements morphologiques observés dans le CE constituent un bon marqueur du passage de l'état de MCI à celui de malade Alzheimer (Masdeu et coll., 2005 ; Rodrigue et coll., 2004 ; Stoub et coll., 2005 ; Whitwell et

coll., 2007). Puis, ces signes de dégénérescences se poursuivent par une atrophie progressive du lobe temporal et tout particulièrement de l'hippocampe, qui s'étend par la suite à l'ensemble des régions cérébrales. Cette neurodégénérescence provoque ainsi une aggravation progressive des fonctions cognitives impliquant ces régions (mémoire spatiale, épisodique et de travail), et de certains troubles comportementaux (déambulation et agitation).

Il est important de noter que notre travail de modélisation ne peut reproduire le côté progressif de la maladie car les lésions, aussi massives soient-elles, sont effectuées de manière ponctuelle. Ne pouvant évaluer l'apparition progressive des déficits cognitifs, ce modèle de lésion combinée du CE et des NCB chez le rongeur semble modéliser des déficits cognitifs observés à un stade très avancé de MA. Nos résultats pourraient néanmoins permettre de supposer une certaine chronologie dans l'apparition des troubles par rapport aux structures touchées. En effet, ce travail décrit largement que la lésion combinée du CE et des NCB chez le rat et la souris altère profondément les capacités de mémoire spatiale alors que chaque lésion seule n'induit que des déficits modérés. De plus, dans notre étude réalisée chez la souris, nous montrons que la lésion des NCB seule est capable d'induire des troubles importants de la reconnaissance et de la détection de nouveaux objets. Ainsi, notre travail combiné à celui de Traissard et collaborateurs (2007) permet de suggérer que l'apparition des troubles légers de désorientation spatiale, voire de mémoire spatiale de travail, observée dans les premiers temps de maladie, pourrait être associée à l'atteinte légère du CE, notamment des neurones de la couche II (Levisohn et Isacson, 1991 ; Gomez-Isla., 1996 ; Kordower et coll., 2001). Ce n'est que lorsque les NCB sont touchés qu'apparaîtraient des troubles plus importants de l'orientation, de la mémoire spatiale, de la reconnaissance d'objets et des troubles comportementaux, tels que les déambulations et l'agitation.

CHAPITRE 2

Modélisation de l'atteinte du cortex entorhinal et des neurones cholinergiques de la bse antérieure chez des souris transgéniques hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4.

CHAPITRE 2

Modélisation de l'atteinte du cortex entorhinal et des neurones cholinergiques de la bse antérieure chez des souris transgéniques hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4.

Rappelons, en ce début de chapitre, que l'ensemble du travail présenté dans cette thèse est basé sur les résultats obtenus par Traissard et collaborateurs (2007), qui démontrent que la lésion combinée du CE et des NCB, mais pas chaque lésion séparément, induit un déficit massif des performances de mémoire spatiale chez le Rat. Dans le premier chapitre de cette thèse, nous avons montré que le principe d'une interaction délétère entre ces deux lésions s'applique également à la Souris vu l'aggravation des déficits cognitifs obtenus avec la lésion combinée. De plus, notre travail apporte une information supplémentaire quant à la sélectivité des processus mnésiques affectés par la lésion combinée, à savoir que cette aggravation concerne plus particulièrement ceux mis en jeu dans des tâches de navigation spatiale. La reconnaissance spatiale en est relativement préservée, tandis que les processus mis en jeu dans la reconnaissance d'objets semblent plutôt dépendre de la dégénérescence des NCB. Les résultats de ces deux études réalisées chez deux espèces différentes nous confortent donc dans notre hypothèse de travail qui postulait que l'effet combiné de l'atteinte de ces deux structures pourrait jouer un rôle important dans la bascule d'un état pré-symptomatique (correspondant au rétrécissement du CE dans les premiers temps de la maladie) à un stade d'amnésie plus poussée, notamment en regard de la forte désorientation spatiale des patients, suite à l'atteinte plus importante du CE combinée à l'atteinte des NCB.

Par ailleurs, deux études comportementales des souris hApoE4-TR ont été menées au laboratoire par Grootendorst et collaborateurs (2005) et par Bour et collaborateurs (2008 ; **Publication 3** présentée en annexe) dans le but d'analyser l'impact de l'ApoE4 sur l'évolution des performances cognitives en fonction de l'âge. En effet, plusieurs travaux s'accordent à montrer une accélération du déclin cognitif chez les personnes âgées porteuses du gène $\epsilon 4$ de l'ApoE humaine (Caselli et coll., 1999 ; Mayeux et coll., 2001 ; Savitz et coll., 2006). Il est à noter que ce déclin cognitif est très modéré et son amplitude n'est en aucun cas comparable à celle observée dans la MA. De plus, des perturbations cognitives ont également été décrites à un âge plus précoce, aux alentours de 46 ans (Flory et coll., 2000 ; Lind et coll., 2006). Enfin, Le déclin cognitif serait plus marqué chez les femmes post-ménopausées (Bartres-Faz et coll., 2001 ; Mortensen et Hogh, 2001 ; Azad et coll., 2007). Or, les deux études (Grootendorst et coll., 2005 ; Bour et coll., 2008) montrent que le modèle de souris transgéniques hApoE-TR est un excellent candidat pour l'étude des déficits mnésiques associés à l'ApoE4 car il présente des perturbations cognitives très similaires à ce qui est observé chez l'Homme. Les souris hApoE4-TR, en comparaison aux souris hApoE3-TR, développent des déficits cognitifs, âge-dépendants et sélectifs, pour des formes de mémoire également affectées chez l'Homme (altération des processus de consolidation, de la mémoire spatiale et de la mémoire épisodique). De plus, le déclin cognitif se trouve être plus prononcé chez les femelles que chez les mâles. Soulignons enfin que ces déficits sont très modérés et, en ce sens, reproduisent la subtilité de ceux décrits chez les individus sains porteurs du gène de l'ApoE4. Pour toutes ces raisons, nous avons conclu que ce modèle est, à lui seul, un bon modèle des effets délétères de l'ApoE4 sur la cognition chez l'Homme (Bour et coll., 2008). Comme nous l'avons déjà évoqués dans l'introduction, chez l'Homme, cette population est également plus encline à développer un état de MCI, voire une MA, puisque $\epsilon 4$ est le facteur de risque majeur de la MA. Or les souris hApoE4-TR ne présentent pas de marqueurs biologiques de la pathologie (plaques séniles, DNF ou pertes neuronales). Néanmoins, il serait théoriquement possible que nous puissions déclencher l'un ou l'autre signe histologique de MA chez ces souris si l'on amorce une cascade d'évènements neuropathologiques aggravée par la présence de l'ApoE4, en perturbant par exemple le métabolisme de l'APP dans le sens de l'amyloïdogénèse ou en introduisant l'une ou l'autre neurodégénérescence caractéristique de la MA. Dans cette ligne de raisonnement, Belinson

et collaborateurs (2010) ont réussi à induire des dépôts amyloïdes et une perte de neurones de l'aire CA1 chez les souris hApoE4-TR en inhibant la dégradation de l'A β .

Par rapport aux autres lignées de souris exprimant l'ApoE humaine, notamment celles intégrant plusieurs copies de transgènes, les souris hApoE4-TR et hApoE3-TR ont l'avantage d'exprimer respectivement l'ApoE3 ou l'ApoE4 de manière physiologique car le gène humanisé est sous le contrôle des séquences régulatrices murines (Sullivan et coll., 1997, 1998). De plus, ce modèle a récemment été amélioré par Merck *Sharp & Dohme Corp.* (Boston, USA) grâce à un croisement avec une souris exprimant l'APP humain pour donner naissance à deux nouvelles lignées de souris double transgéniques permettant d'étudier les interactions complexes entre l'ApoE et l'A β (cf introduction générale partie I). L'intérêt de combiner l'expression l'ApoE et l'APP humaine dans un seul modèle est notamment illustré dans les travaux montrant que l'ApoE4 augmente les dépôts amyloïdes et les plaques neuritiques chez des souris exprimant l'APP humain sous forme mutée (Fagan et coll., 2002 ; Holtzman et coll., 1999). La seule étude publiée à ce jour sur les souris hAPP/hApoE-TR montre qu'elles présentent également des déficits cognitifs subtils (mémoire de reconnaissance spatiale, peur conditionnée et processus attentionnels) qui sont plus prononcés chez les femelles que chez les mâles (Kornecook et coll., 2010).

Au vu de l'ensemble des résultats obtenus sur les souris hApoE-TR et hAPP/hApoE-TR, il devient très intéressant d'appliquer les lésions du CE et/ou des NCB sur ces souris transgéniques plutôt asymptomatiques. L'idée de combiner les approches lésionnelles et transgéniques pour étudier la MA a fait l'objet d'une revue présentée en annexe (**Publication 4**). Dans ce travail, nous espérons mettre en évidence une plus grande sensibilité des souris hAPP/hApoE4 aux lésions et/ou à leurs conséquences comportementales, et induire éventuellement une neuropathologie de type Alzheimer (des dépôts amyloïdes ou une phosphorylation anormale de tau, par exemple).

Ce chapitre expérimental sera composé de deux parties. En effet, avant d'évaluer l'implication des lésions combinées du CE et des NCB sur les souris hAPP/hApoE-TR, il nous a été nécessaire de réaliser deux petites expériences préliminaires visant, dans un premier temps, à perfectionner la lésion du CE chez des souris C57BL/6J en faisant varier la dose d'excitotoxine utilisée. Puis, dans un second temps, nous avons évalué l'effet de la lésion cholinergique seule sur les performances cognitives de souris hAPP/hApoE4 et hAPP/hApoE3.

EXPERIENCES PRELIMINAIRES

I. Perfectionnement de la lésion du CE

1. Objectif de l'étude

Comme le titre de cette première partie le souligne bien, ce travail préliminaire a eu pour objectif d'améliorer la lésion du CE avant de commencer l'étude des lésions combinées chez les souris transgéniques. En effet, au cours de l'expérience précédente (**Publication 2**), nous sommes parvenus à obtenir des lésions bilatérales des régions latérales et médianes du CE qui soient satisfaisantes et reproductibles, en doublant la dose de NMDA utilisée chez le Rat (80mM). Cependant, ces lésions partielles, aussi satisfaisantes soient-elles d'un point de vue de l'impact comportemental attendu, présentaient une étendue relativement limitée autour des points d'injections. C'est pourquoi la première étude de ce deuxième chapitre avait pour objectif l'induction d'une lésion du CE aussi reproductible que précédemment, mais plus étendue en triplant et quadruplant les doses de NMDA utilisées chez le Rat (NMDA3 = 120mM et NMDA4 = 160mM). Les effets comportementaux liés à chaque forte dose choisie n'ont été caractérisés que dans un seul test, la tâche de navigation spatiale de la piscine de Morris, pour obtenir rapidement des résultats en vue d'éventuelles expériences complémentaires avec de nouvelles doses. Le choix de cette tâche, en particulier, est justifié par son utilisation systématique dans tous nos travaux sur la lésion combinée. Nous avons ajouté une phase que nous avons appelée phase de renforcement cognitif (ajout de 3 jours d'acquisition supplémentaires, la plate-forme étant toujours dans le même quadrant) pour permettre aux souris lésées de renforcer l'apprentissage effectué lors de la phase d'acquisition. Par ce biais, nous espérons augmenter les chances de différencier les effets des deux doses de NMDA sur les performances comportementales des souris. Un second test de rétention a ensuite été effectué pour évaluer les performances spatiales à l'issue de

ce renforcement. Pour finir, la caractérisation de l'étendue des lésions a été réalisée par une coloration au violet de crésyl.

2. Analyses statistiques

Pour l'analyse des données obtenues dans la phase d'acquisition de la tâche de la piscine de Morris, les variables considérées (moyenne des distances parcourues ou latences d'accès à la plate-forme en fonction des jours) ont fait l'objet d'une analyse de variance (ANOVA) à mesures répétées (facteur "Jour" à 5 modalités : jour 1, 2, 3, 4 et 5). Le second facteur est le facteur "groupe", comprenant 3 modalités : PBS, NMDA3 et NMDA4. A partir du moment où l'analyse se trouve justifiée, nous avons réalisé une comparaison deux à deux pour rechercher les différences significatives entre les groupes avec le test de comparaisons multiples de Newman-Keuls (Winer, 1971). Nous avons analysé les données de la phase de renforcement cognitif indépendamment de la phase d'acquisition. Cependant, l'analyse de ces données est rigoureusement la même que pour la phase d'acquisition.

Pour l'analyse des performances des souris dans le test de rétention de la piscine de Morris, nous avons comparé, à l'aide d'un test de Student, les moyennes des temps passés dans les quatre quadrants par rapport à une valeur standard.

3. Résultats

3.1. Etendue des lésions

Le groupe NMDA3 traité avec la dose de 120 mM de NMDA présente une atteinte des régions latérales et médianes du CE plus étendue que celle obtenue à la dose de 80 mM. De plus, ces lésions restent sélectives par rapport aux structures adjacentes et touchent une grande partie des neurones de la couche II du CE. En revanche, le groupe NMDA4 traité avec la dose de 160 mM induit une lésion beaucoup trop étendue et non spécifique au CE. En effet, l'ensemble des structures voisines du CE, l'hippocampe ventral, le subiculum, le cortex perirhinal, ectorhinal, auditif, et même le cervelet, est touché par les injections de NMDA. De plus, plusieurs petites perforations du parenchyme sont observées proches des sites d'injections à la dose la plus forte. Au vu de ces résultats histologiques, nous avons opté

pour l'utilisation du NMDA à la dose de 120 mM pour les expériences réalisées sur les souris double transgéniques.

3.2. Effet de deux doses neurotoxiques du NMDA sur les performances de mémoire spatiale dans la piscine de Morris

3.2.1. Protocole de mémoire de référence

3.2.1.1. Acquisition (5 jours)

Pendant la phase d'acquisition, les souris améliorent significativement leurs performances en termes de distance parcourue sur les 5 jours (Jour : $F_{(4,88)} = 4,81$, $p < 0.001$; cf figure 32). Néanmoins, les souris NMDA4 parcourent une distance plus importante que les souris témoins PBS pour trouver la plate-forme immergée (Groupe : $F_{(2,22)} = 15,63$, $p < 0.001$). En effet, lors des jours 2, 4 et 5, les souris NMDA4 ont des performances significativement inférieures à celles des souris PBS. En ce qui concerne les souris NMDA3, leurs performances sont similaires à celles des témoins et ne diffèrent des souris NMDA4 qu'aux jours 2 et 4. L'analyse statistique des données en termes de latence d'arrivée à la plate-forme donne des effets significatifs comparables (Jour : $F_{(4,88)} = 8,86$, $p < 0.001$; Groupe : $F_{(2,22)} = 18,01$, $p < 0.001$).

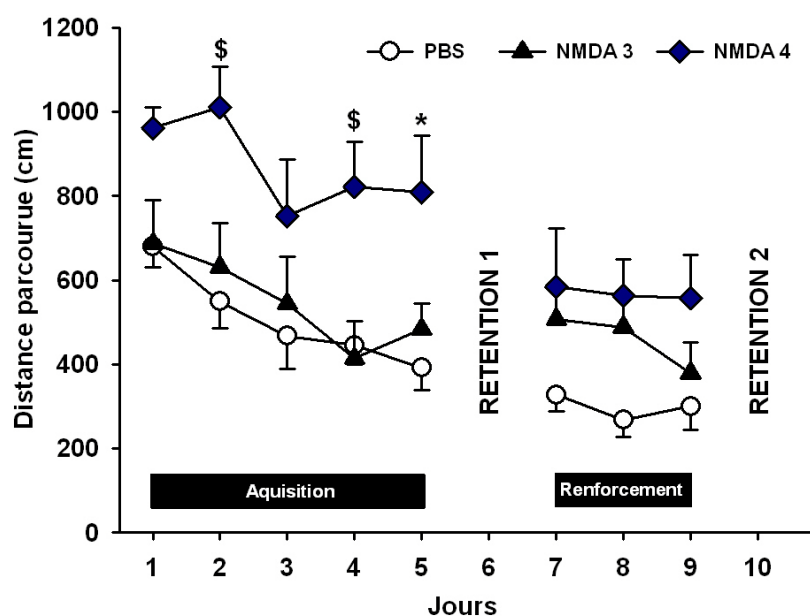


Figure 32 : Effet de deux doses neurotoxiques de NMDA sur les performances des souris lors des phases d'acquisition, de rétention et de renforcement dans la piscine de Morris. Les valeurs représentent des

moyennes + erreur type de la distance parcourue pour atteindre la plate-forme. § : $p < 0.05$, NMDA4 significativement différent de NMDA3 et PBS ; * : $p < 0.05$, NMDA4 significativement de PBS (ANOVA à mesure répétée suivie d'un test de Newman-Keuls).

3.2.1.2. Rétention 1 (24 heures)

Le premier test de rétention a été réalisé 24 h après la séance d'acquisition du 5^{ème} jour. La figure 33 montre que les souris NMDA3 et NMDA4, en comparaison aux souris PBS, ne présentent pas de préférence pour le quadrant cible (SO) comparé aux trois autres quadrants (NO, NE et SE). Pour chacun des groupes, le temps passé dans le quadrant cible est comparé avec un temps correspondant au hasard (15 s ; test t de Student). Les performances des groupes NMDA3 et NMDA4 ne diffèrent pas significativement du hasard, contrairement à celles des souris PBS (PBS : $t_{12} = 3,28$, $p < 0,05$; NMDA3 : $t_6 = 1,38$, $p = 0,21$; NMDA4 : $t_4 = 1,54$, $p = 0,19$).

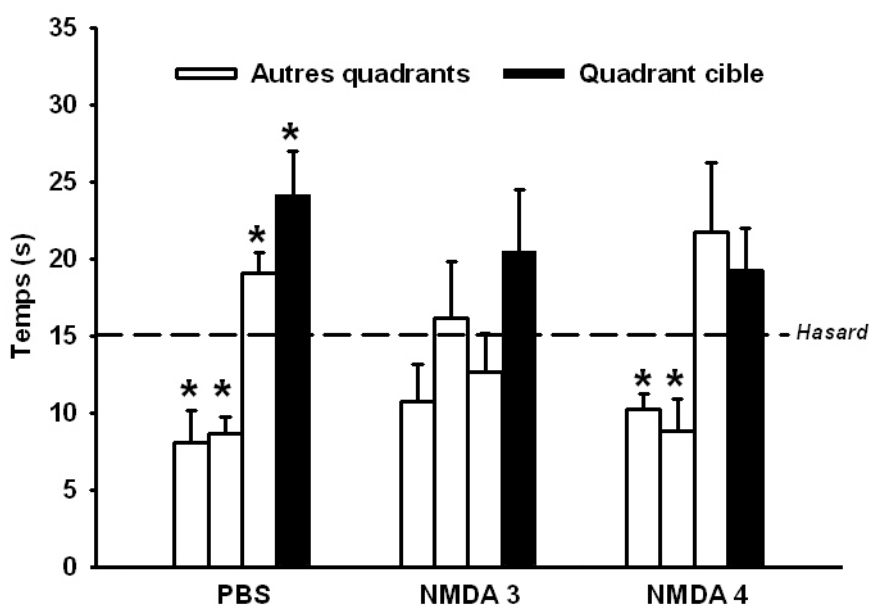


Figure 33 : Effet de deux doses neurotoxiques de NMDA sur les performances de rétention dans la piscine de Morris évaluées 24 h après le dernier jour d'acquisition. Les valeurs représentent le temps moyen total + erreur type passé dans chaque quadrant de la piscine. Pour ce test de rétention, le quadrant cible est le SO. * : $p < 0.05$, différence significative par rapport à la valeur correspondant au hasard (15s ; test t de Student).

3.2.1.3. Phase de renforcement (3 jours)

Pendant ces trois jours de renforcement, les souris n'améliorent pas leurs performances en termes de distance d'accès à la plate-forme cachée (Jour : $F_{(2,44)} = 0,64$, $p < 0,52$; cf figure 32). Globalement, les souris NMDA3 et NMDA4 parcourent une distance plus importante que les souris PBS (Groupe : $F_{(2,22)} = 8,62$, $p < 0,001$). Concernant l'analyse des données en termes de latence, les résultats obtenus sont comparables (Jour : $F_{(4,88)} = 0,30$, $p = 0,73$; Groupe : $F_{(2,22)} = 6,53$, $p = 0,005$).

3.2.1.4. Rétention 2 (24 heures)

Lors du deuxième test de rétention, réalisé 24 h après le 3^{ème} jour de la période de renversement, la figure 34 montre que seules les souris NMDA4 ne présentent pas de préférence pour le quadrant cible (SO) en comparaison avec les autres quadrants. Leurs performances, contrairement à celles des groupes PBS et NMDA3, ne diffèrent pas du hasard (PBS : $t_{12} = 6,72$, $p < 0,05$; NMDA3 : $t_6 = 3,13$, $p < 0,05$; NMDA4 : $t_4 = 0,87$, $p = 0,42$).

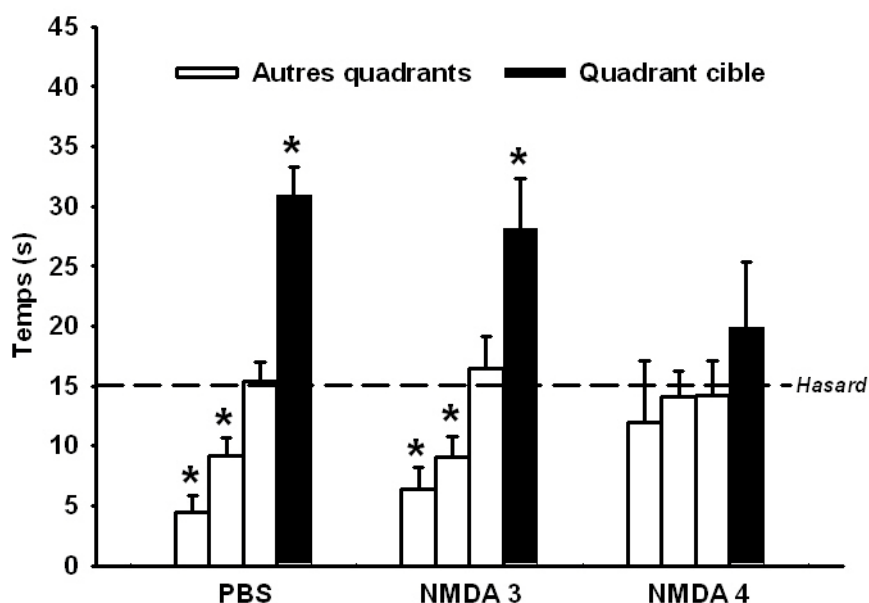


Figure 34 : Effet de deux doses neurotoxiques de NMDA sur les performances de rétention dans la piscine de Morris 24 h après le dernier jour d'acquisition. Les valeurs représentent le temps moyen total + erreur type passé dans chaque quadrant de la piscine. Pour ce test de rétention, le quadrant cible est le SO. * : $p < 0,05$, différence significative par rapport à la valeur correspondant au hasard (15s ; test de Student).

En conclusion, la dose neurotoxique de 160 mM (groupe NMDA 4) induit des lésions trop massives, touchant des structures adjacentes, ce qui pose un problème sérieux d'interprétation des conséquences de ces lésions en termes de spécificité par rapport au CE. L'ampleur des effets obtenus tend à confirmer l'implication des lésions adjacentes dans les effets comportementaux de cette dose de NMDA. En revanche, la dose de 120 mM (groupe NMDA 3) présente une bonne spécificité de la lésion pour le CE, sans affecter les structures adjacentes. De plus, les effets comportementaux sont relativement modérés dans la phase d'acquisition de 5 jours et le premier test de rétention dans la tâche de la piscine. Ces résultats correspondent bien à ceux généralement obtenus avec des lésions neurotoxiques du CE (par exemple, Traissard et coll., 2007). Nous utiliserons donc cette dose pour les expériences réalisées chez les souris transgéniques.

Il est intéressant de noter que les performances des souris NMDA 3, et *a fortiori* celles des souris NMDA 4, semblent légèrement perturbées dans la phase de renforcement. Cependant, lors du 2^{ème} test de rétention, les souris NMDA 4 ne retiennent toujours pas la localisation de la plate-forme malgré les 3 jours de renforcement supplémentaires, leurs mauvaises performances étant vraisemblablement liées à l'étendue des lésions adjacentes. Les souris NMDA 3, quant à elles présentent des performances de rétention correctes à l'issue de cette phase. Ainsi, les résultats obtenus chez les souris NMDA 3 confirment que les processus mnésiques impliqués dans la mémoire spatiale semblent être légèrement affectés par une lésion neurotoxique du CE.

II. Adaptation de la lésion des NCB aux souris transgéniques hAPP/hApoE et évaluation comportementale

1. Objectifs de l'étude

Cette deuxième expérience préliminaire a eu pour principal but d'adapter la lésion des NCB mise au point chez des souris C57BL6J à des souris transgéniques hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4, puis d'en tester les effets sur les performances de mémoire spatiale. Le protocole de cette expérience a été établi dans le but de pouvoir comparer nos résultats à ceux obtenus dans la première étude des lésions des NCB chez les souris C57BL/6J (présentée dans le chapitre I, cf **Publication 1**). C'est pourquoi dans cette étude, nous avons utilisé des souris doubles transgéniques mâles hAPP/hApoE3 ou hAPP/hApoE4 âgées de 13 semaines. Dans un premier temps, la moitié des effectifs, pour chacun des deux génotypes de souris, a reçu une injection bilatérale i.c.v. de mu p75-saporine à une dose de $0,6 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ pour produire une lésion des NCB tout à fait comparable à celle obtenue chez les souris C57BL/6J (**Publication 1**). Puis dans un deuxième temps, nous avons évalué les effets de l'immunotoxine mu p75-saporine sur les fonctions cognitives (piscine de Morris, labyrinthe de Barnes) et l'activité locomotrice (actographie).

Dans cette étude, les souris hAPP/hApoE4 pourraient se révéler plus sensibles que les souris hAPP/hApoE3 aux effets de la neurotoxine de par la moindre efficacité de l'apoE4 dans les processus de plasticité synaptique et de régénérescence, ainsi que dans la clairance de l'A β libérée suite à des lésions cérébrales. En appliquant la lésion des NCB sur des souris hAPP/ApoE, nous nous attendons donc à observer une différence d'efficacité de la neurotoxine et/ou d'un impact de la lésion sur les performances comportementales entre les deux lignées transgéniques. Il faut souligner que cette étude préliminaire a fait l'objet d'un premier rapport envoyé à nos collaborateurs de Merck Sharp & Dohme (Celina Zerbinatti à ce stade du travail, Boston, USA) le 19 janvier 2009. C'est pourquoi, dans ce paragraphe, je ferai état des conclusions de ce rapport.

2. Résultats (Rapport Merck)

Conséquences de la lésion des NCB sur les performances comportementales des souris hAPP/hApoE.

2.1. Activité locomotrice

La figure 35 représente l'activité locomotrice des souris enregistrée 24 h avant l'opération. Les deux lignées de souris s'habituent rapidement à leurs nouvelles cages au cours des 3 premières heures de test (Heure : $F_{(2,90)} = 119,68$, $p < 0,0001$). Cependant, les souris hAPP/hApoE4 sont légèrement moins actives que les souris hAPP/hApoE3 durant la première heure. Les phases diurne (9 h) et nocturne (12 h) sont analysées séparément. Au cours de l'actographie réalisée avant opération, l'activité locomotrice des souris hAPP/hApoE4 est inférieure à celle observée chez les souris hAPP/hApoE3 pendant la phase nocturne (Génotype x Phase : Phase diurne $F_{(1,48)} = 2,67$, $p = 0,10$; Phase nocturne $F_{(1,48)} = 8,15$, $p = 0,006$).

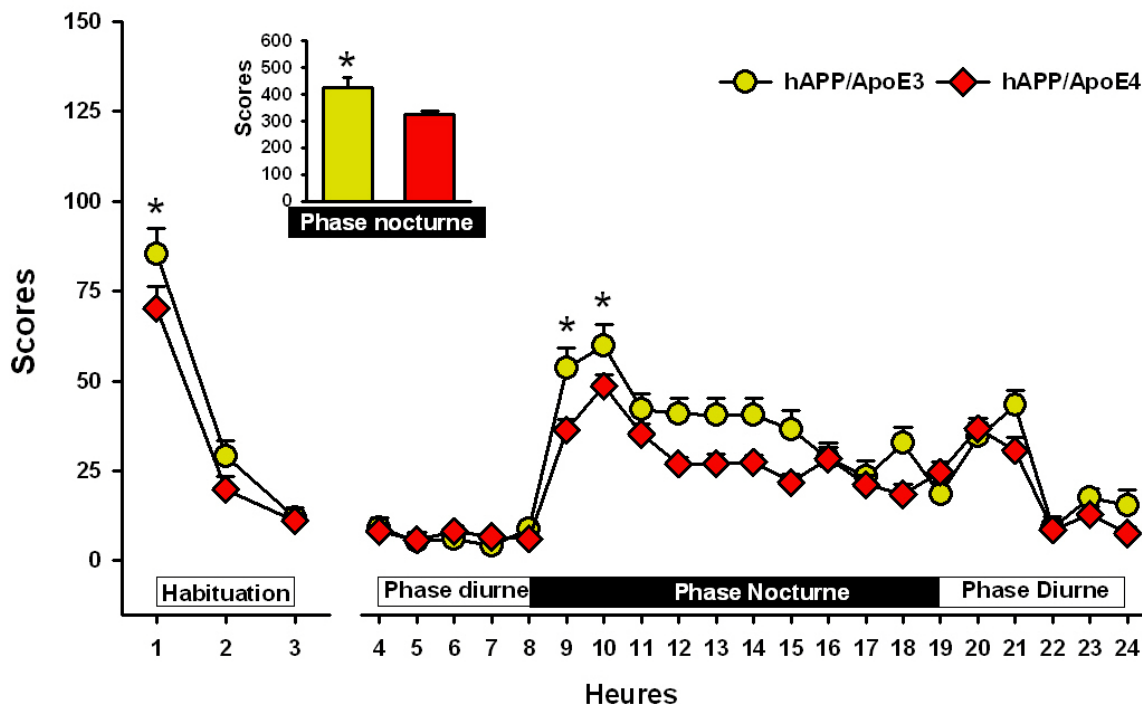


Figure 35 : Représentation graphique de l'activité locomotrice des souris hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4 avant opération. Les valeurs représentent les scores d'activité + erreur type par heure. L'histogramme représente la somme des scores pour les 2 génotypes au cours de la phase nocturne. * $p < 0,05$ pour une différence significative entre les souris hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4.

Deux semaines après l'opération, il n'y a pas d'effet significatif lié à la lésion ou au génotype sur l'activité locomotrice durant les 3 premières heures de la période l'habituaiton (cf figure 36). Durant les 21 heures suivantes, nous ne confirmons pas l'effet lié au génotype trouvé lors de la séance réalisée avant l'opération. En effet, le groupe SAP-E4 et, dans une moindre mesure, le groupe PBS-E4, augmentent leur activité après l'opération. De plus, au cours de la phase nocturne, les souris ayant reçu de la mu p75-saporine tendent à être plus actives que les souris PBS, en particulier les souris hAPP/hApoE4 (Génotype x Phase : $F_{(1,45)} = 3,87$, $p=0.055$).

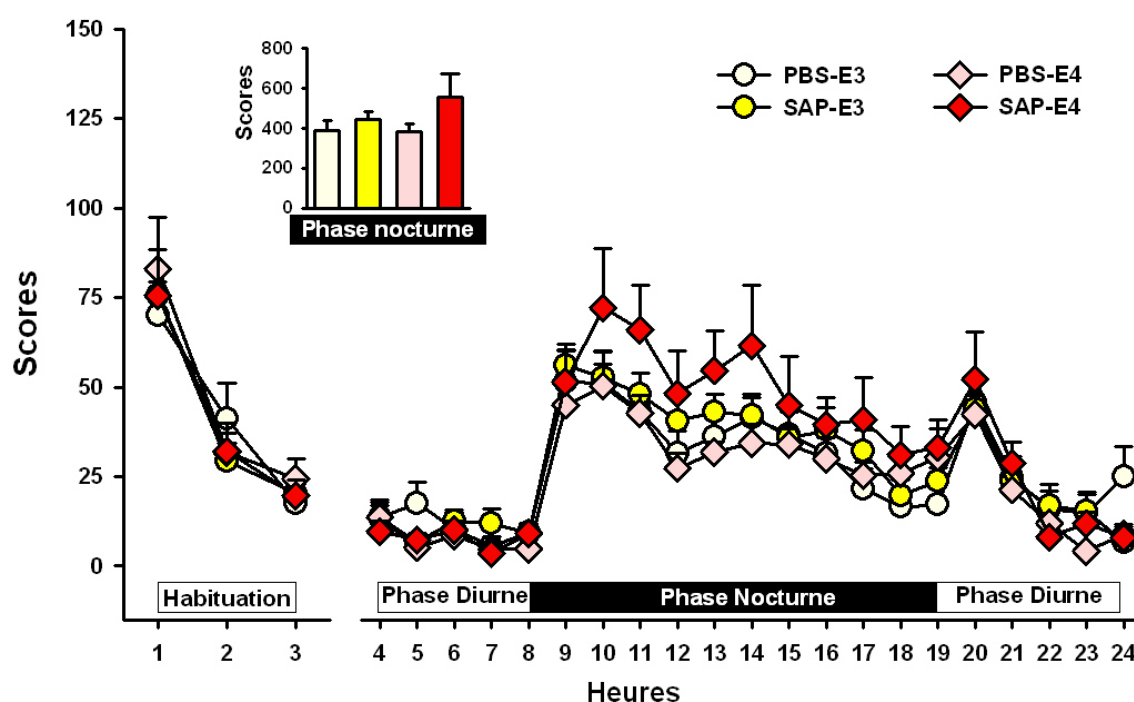


Figure 36 : Représentation graphique de l'effet des lésions des NCB sur l'activité locomotrice des souris hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4. Les valeurs représentent les scores + erreur type par heure. Les valeurs de l'histogramme représentent la somme des scores enregistrés durant la phase nocturne.

2.2. Test de la piscine de Morris : protocole de mémoire de référence

2.2.1. Acquisition (5 jours)

L'analyse de la latence et de la distance pour atteindre la plate-forme cachée nous amène à des résultats similaires entre les deux variables (cf figures 37a et b). Globalement,

toutes les souris améliorent leurs performances au cours des 5 jours d'acquisition, cependant cette amélioration n'est pas la même en fonction du génotype (Latence : Jour $F_{(4/180)} = 29,96$, $p < 0,0001$; Génotype x Jour $F_{(4, 180)} = 3,42$, $p = 0,01$; Distance : Jour $F_{(4/180)} = 14,02$, $p < 0,0001$; Génotype x Jour $F_{(4, 180)} = 2,71$, $p = 0,031$). En effet, durant les deux derniers jours d'acquisition, les performances des souris hAPP/hApoE3 se détériorent par rapport à celles des souris hAPP/hApoE4 qui, elles, continuent à les améliorer. Il n'y a pas d'effet de la lésion dans cette tâche.

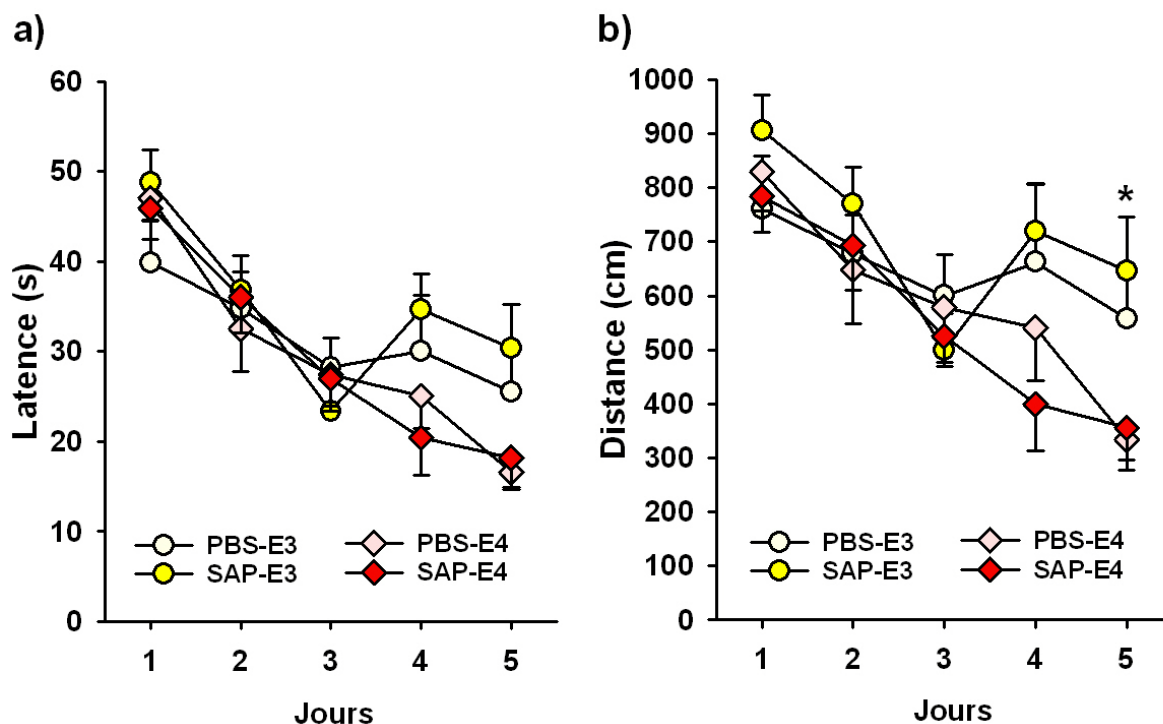


Figure 37 : Représentation graphique de l'effet de la lésion des NCB sur les performances dans la piscine de Morris lors de la phase d'acquisition de 5 jours. Les valeurs représentent des moyennes + erreurs type de la latence (A) et distance (B) parcourue pour atteindre la plate-forme lors de la phase d'acquisition. * $P < 0.05$ pour une différence significative entre les souris hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4.

2.2.2. Rétention (24 heures)

Comme le montre la figure 38, toutes les souris passent un temps supérieur au hasard dans le quadrant où était positionnée précédemment la plate-forme (PBS-E3 : $t_{14} = 3,27$, $p = 0,0003$; PBS-E4 : $t_{12} = 3,89$, $p = 0,002$; SAP-E3 : $t_{13} = 3,53$, $p = 0,004$; SAP-E4 : $t_{14} = 4,78$, $p = 0,0003$).

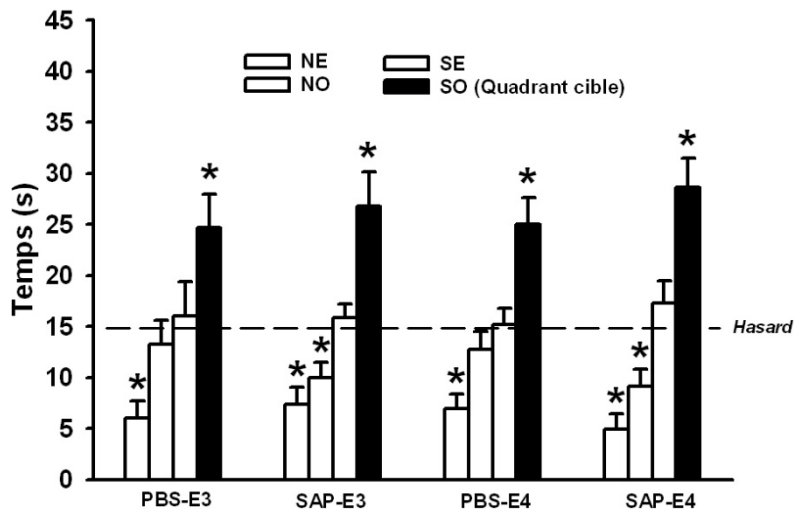


Figure 38 : Représentation graphique de l'effet de la lésion des NCB sur les performances de rétention évaluées 24 h après le dernier jour d'acquisition dans la piscine de Morris. Les valeurs représentent le temps moyen total + erreurs type passé dans chaque quadrant de la piscine. * : $p < 0.05$, différence significative par rapport à la valeur correspondant au hasard (15s ; test de Student).

2.2.3. Plate-forme visible (24 heures)

Dans la tâche de la plate-forme visible, tous les groupes de souris améliorent de manière similaire leurs performances au cours des 4 essais (Distance : Essai : $F_{(3,135)} = 12,63$, $p < 0,0001$, cf figure 39). Il n'y a pas d'effet lié au génotype ou à la lésion.

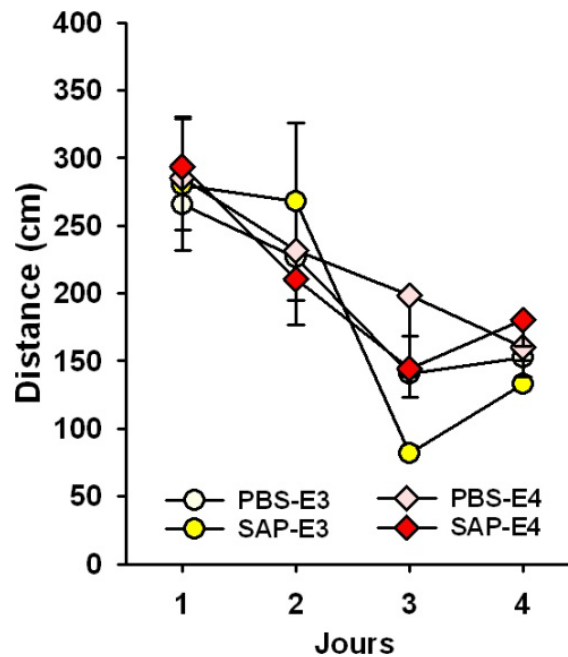


Figure 39 : Représentation graphique de l'effet de la lésion des NCB sur les performances dans la piscine de Morris lors du protocole de plate-forme visible. Les valeurs représentent des moyennes + erreurs type de la distance parcourue pour atteindre la plate-forme.

2.3. Test du labyrinthe de Barnes : protocole de mémoire de référence

2.3.1. Acquisition (6 jours)

Comme présenté dans la figure 40a, la latence pour entrer dans le trou cible menant à la cage de l'animal diminue pour toutes les souris au cours de la période d'acquisition (Jour : $F_{(5,175)} = 62,96$, $p < 0,0001$). Les quatre groupes améliorent significativement leurs performances.

Concernant le nombre d'erreurs (cf figure 40b), les quatre groupes apprennent également la tâche au cours de la phase d'acquisition (Jour : $F_{(5,175)} = 18,12$, $p < 0,0001$). Il n'y a pas d'effet lié à la lésion ou au génotype dans cette tâche.

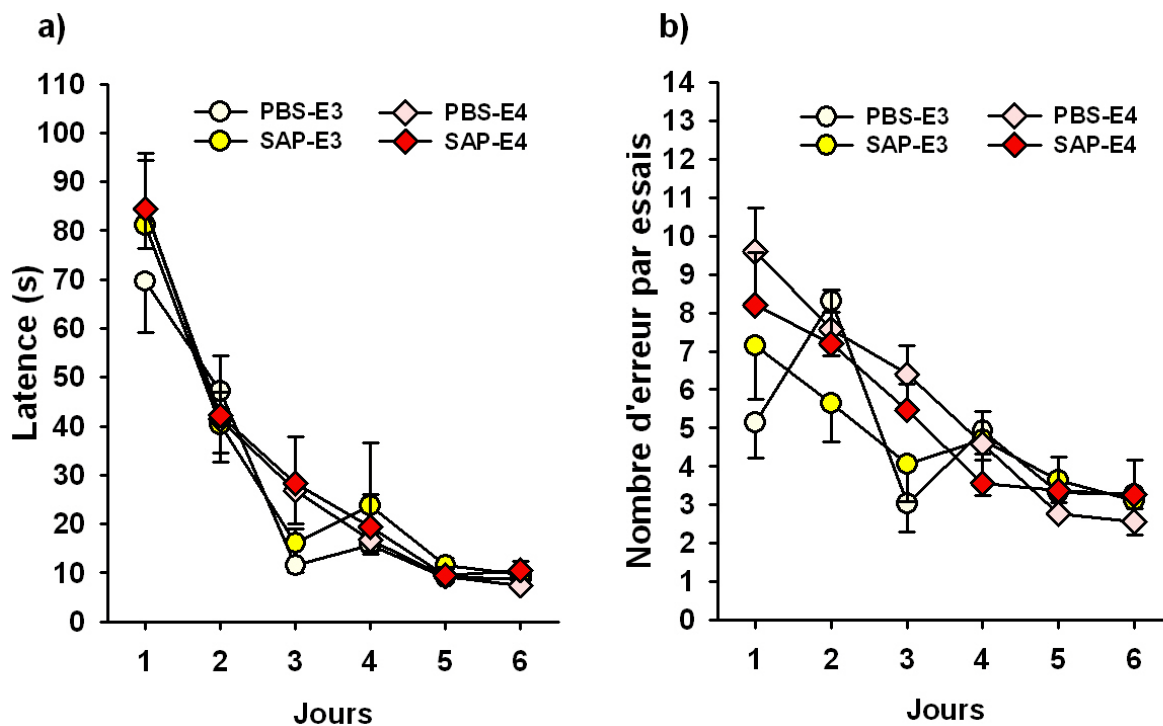


Figure 40 : Représentation graphique de l'effet de la lésion des NCB sur les performances des souris hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4 lors des 6 jours d'acquisition dans le labyrinthe de Barnes. Les valeurs représentent les moyennes + erreurs type du temps mis par les souris pour pénétrer dans le trou cible (a) et le nombre totales d'erreurs commises par séance (b).

2.3.2. Rétention (16 jours)

Dans le but de simplifier l'analyse et la présentation de ce résultat, nous avons comparé uniquement quatre trous équidistants incluant le trou cible, le trou opposé et les trous situés à $+90^\circ$ et -90° du trou cible. Comme illustré dans la figure 41, tous les groupes

visitent davantage le trou cible que les 3 autres de manière similaire (Trou : $F_{(3,105)} = 68,82$, $p < 0,0001$; Groupes x 4 trous : $F_{(9,105)} = 0,21$, $p < 0,99$). Il n'y a pas d'influence du génotype, ni de la lésion sur les performances dans ce test.

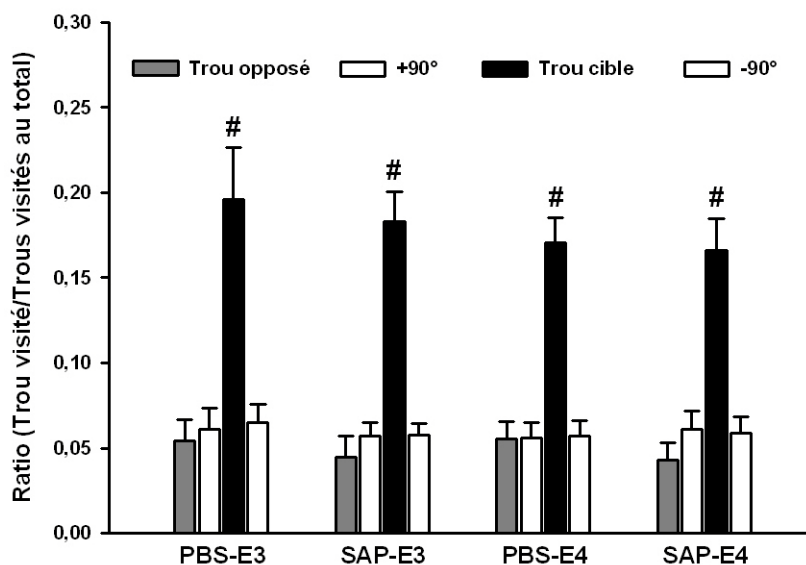


Figure 41 : Représentation graphique de l'effet de la lésion des NCB sur les performances des souris hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4 lors du test de rétention dans le labyrinthe de Barnes. Les valeurs représentent le ratio du nombre de visites pour un trou donné rapporté à la somme des visites totales effectuées au cours de la session (+ erreur type). Les statistiques portent sur 4 trous : opposé, -90°, +90°, et le trou cible. # $p < 0.05$ pour des différences significatives entre le trou cible et les trois autres trous.

3. Conclusions (Rapport Merck)

Cette étude montre que les souris hAPP/hApoE3 expriment un niveau d'activité locomotrice supérieur à celui des souris hAPP/hApoE4. Kornecook et collaborateurs (2009) ont testé l'activité locomotrice de souris *fémmelles* âgées de 6-7 mois provenant de la même lignée, mais dans un *dispositif différent* du nôtre. De manière intéressante, ils trouvent également un niveau d'activité supérieur pour les souris hAPP/hApoE3 en comparaison aux souris hAPP/hApoE4 dans la phase d'habituation à un nouvel environnement et pendant une phase d'évaluation de 24 h. De plus, il a été montré que les souris ApoE3-TR sont plus actives que les souris ApoE4-TR, ApoE KO et C57BL/6J durant une phase d'habituation de 5 min dans un test de champ ouvert (*open field* ; Grootendorst et coll., 2005). Pris ensemble, ces résultats suggèrent que c'est la présence de l'ApoE3 humaine qui augmente les niveaux d'activité chez les souris hAPP/ApoE3.

Deux semaines après l'opération, la lésion des NCB a tendance à augmenter la locomotion chez les souris hAPP/hApoE. Un tel effet est en accord avec celui obtenu dans l'expérience 1 du premier chapitre (Moreau et coll., 2008) et l'expérience 2 du premier chapitre (Moreau et coll., 2011 (*En préparation*)).

Dans la tâche du labyrinthe de Barnes, tous les groupes présentent le même niveau de performance durant l'acquisition et le test de rétention à un délai post-acquisition de 16 jours.

Dans la tâche de la piscine de Morris, les souris hAPP/hApoE3 montrent des performances moindres à la fin de la phase d'acquisition alors que les souris hAPP/hApoE4 continuent à améliorer leurs performances. De manière très intéressante, la même différence au niveau des courbes d'apprentissage a été obtenue chez de jeunes souris ApoE3 KI et ApoE4 KI dans une étude réalisée au sein du laboratoire, c'est-à-dire avec une petite détérioration des performances en fin d'acquisition chez les souris porteuses de l'ApoE3 (Grootendorst et coll., 2005). Dans cette étude, comme dans le présent travail sur des souris hAPP/hApoE, nous avons interprété le léger déficit des souris porteuses de l'ApoE3 humaine comme reflétant un effet de l'ApoE3 humaine sur les processus motivationnels ou émotionnels, mais pas sur les processus d'apprentissage et de mémoire. En effet, malgré un déficit en fin d'apprentissage, les performances des deux lignées au cours du test de rétention étaient comparables et très bonnes. Pour éprouver l'hypothèse d'une perturbation émotionnelle, nous avons planifié de tester les souris hAPP/hApoE3/4 dans un test d'anxiété, celui des cages claire-obscur, dans l'étude suivante.

A ce stade de notre rapport pour Merck Sharp & Dohme, nous avons conclu que la lésion des NCB n'a pas d'effet dans les tâches de mémoire spatiale de la piscine de Morris et du labyrinthe de Barnes. Néanmoins, nos conclusions sur l'effet de la lésion ne pouvaient pas être définitives tant que nous n'avons pas réalisé des vérifications histologiques détaillées. Cependant, pour expliquer le manque d'effets obtenus lié à la lésion dans toutes nos tâches de mémoire spatiale, nous avons proposé plusieurs possibilités : 1) la lésion n'était pas assez suffisante pour provoquer un effet comportemental, peu importe la lignée des souris, 2) la population de souris lésées était très hétérogène, comportant uniquement quelques souris avec une lésion marquée, ou, 3) il n'y avait pas d'effet de la lésion des NCB sur ces deux lignées de souris transgéniques.

4. Conclusions après immunohistochimie de la ChAT

Malheureusement, nos craintes concernant l'hétérogénéité des groupes de souris lésées se sont confirmées par l'analyse immunohistologique des neurones ChAT-positifs localisés dans le septum médian et dans le noyau *basalis magnocellularis*. En effet, afin d'avoir une population de souris lésées relativement homogène, nous fixons habituellement un critère de sélection élevé à 60% de perte neuronale après analyse histologique. Or, après application de ce critère d'exclusion, il ne resterait plus que deux souris SAP-E3 et trois souris SAP-E4 (*cf* figure 43). C'est pourquoi, le nombre très réduit de lésions réussies ne permettant pas d'analyser statistiquement les données et de conclure de façon raisonnable à un effet de la lésion, ces données ne seront pas présentées dans ce travail.

EXPERIENCE 3

Evaluation comportementale des effets des lésions combinées du CE et des NCB chez des souris doubles transgéniques hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4.

I. Objectif de l'étude

Cette étude a pour objectif de tester et de caractériser les effets de la lésion combinée du CE et des NCB sur les performances cognitives des souris double transgéniques hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4.

Dans la MA, il n'est pas inutile de rappeler que les formes sporadiques, chez des individus porteurs de l'allèle $\epsilon 4$, semblent affecter davantage les femmes que les hommes. Dans l'optique d'obtenir un modèle qui soit le plus isomorphe possible de ce qui est observé dans la MA, nous avons choisi d'appliquer le modèle de lésion combinée du CE et des NCB sur des souris hAPP/hApoE femelles. Les lésions ont été appliquées à un âge relativement jeune (6 mois et demi) avant l'apparition de probables déficits cognitifs modérés décrits par Kornecook et collaborateurs (2010). Les souris ont ensuite été laissées en vieillissement pendant 10 mois avant le début de l'évaluation comportementale. Ce choix fut motivé par plusieurs raisons. Tout d'abord, il est observé chez des souris hApoE4-TR une certaine fragilité vasculaire pouvant entraîner l'apparition d'accidents vasculaires à un âge avancé. Ainsi, nous craignons qu'en opérant nos souris à un âge trop avancé, le protocole de chirurgie (descente de canule ou micropipette à travers le cortex) provoque des lésions vasculaires corticales en plus des lésions du CE et des NCB. De plus, en laissant vieillir les souris pendant 10 mois, nous souhaitons obtenir une lésion complète des neurones et de leurs projections tout en espérant voir se développer des lésions neuropathologiques de type Alzheimer chez les souris hAPP/hApoE4, contrairement aux souris hAPP/ApoE3. De plus, Blain et collaborateurs (2006) montrent que la lésion du CE chez des souris hApoE4-TR, souris similaires aux nôtres concernant l'expression d'ApoE, n'entraîne aucune plasticité

synaptique, classiquement mise en place suite à une lésion cérébrale (bourgeoisement collatéral (*sprouting*)), en comparaison à des souris hApoE3-TR. C'est pourquoi nous nous attendons à ce que nos souris hAPP/hApoE4 présentent un déficit de plasticité pouvant être corrélé à une perturbation des capacités cognitives. Pour terminer, l'évaluation de l'impact des lésions combinées sur les performances cognitives et non cognitives a donc été réalisée 10 mois après la lésion cholinergique dans une batterie de tests comprenant les tâches de la piscine de Morris et du labyrinthe de Barnes, le test des cages claire-obscur, et un test d'activité locomotrice. Nous avons privilégié les tâches de navigation en raison des déficits subtils observés chez les souris femelles hAPP/hApoE4-TR dans ce type de tâches (Grootendorst et coll., 2005 ; Bour et coll., 2008). Ainsi, le protocole comportemental utilisé pour cette étude a pour but d'augmenter nos chances d'obtenir un déficit cognitif plus marqué chez les souris hAPP/hApoE-TR. Malheureusement, certaines données obtenues dans la tâche de la piscine de Morris ont été perdues de par un problème technique, c'est pourquoi uniquement les données du Barnes seront présentées dans cette étude. Cependant, les données rapidement analysées tendent à confirmer les résultats obtenus dans le labyrinthe de Barnes (données non montrées).

Dans cette dernière étude, nous avons ajouté quelques souris PBS C57BL/6J (C57 PBS) pour donner une indication sur le sens des variations possibles des effets entre les deux lignées par rapport au fond génétique de ces deux lignées. Comme l'étude était déjà très conséquente, nous n'avons pas pu constituer un groupe avec un effectif comparable à celui des autres groupes.

II. Analyses statistiques

Les analyses statistiques des données obtenues dans les expériences 1 et 2 du chapitre I sont présentées en détail dans les publications 1 et 2.

Concernant l'ensemble des données obtenues dans le chapitre II, elles ont été analysées en règle générale par analyse de la variance (ANOVA) à un ou plusieurs facteurs, ou par une ANOVA à mesures répétées selon le plan expérimental. A partir du moment où l'analyse se trouve justifiée, nous avons réalisé une comparaison deux à deux pour rechercher les différences significatives entre les groupes avec le test de comparaisons multiples de Newman-Keuls (Winer, 1971).

L'ensemble des facteurs pour cette expérience 3 est regroupé dans le tableau 10.

Facteurs	Modalités		Tâches
Génotype	2	hAPP/hApoE3 ; hAPP/hApoE4	Actographie ; Cages claire-obscur ; Labyrinthe de Barnes
Groupes PBS	3	hAPP/hApoE3 PBS ; hAPP/hApoE4 PBS ; C57 PBS	Actographie ; Cages claire-obscur ; Labyrinthe de Barnes
Groupe	4	PBS ; NMDA ; SAP ; NMDA+SAP	Actographie ; Cages claire-obscur ; Labyrinthe de Barnes
Séance	3	Avant opération ; Post-opération ; Post- tests	Actographie
Jours	5	Jour 1 à Jour 5	Labyrinthe de Barnes
Trou	2	Cible ; Opposé	Labyrinthe de Barnes

Tableau 10 : Résumé des principaux facteurs utilisés pour les analyses statistiques des résultats obtenus dans l'expérience 3.

III. Résultats

1. Effectifs des groupes obtenus après exclusion

Il est à rappeler que les lésions des NCB ont été réalisées à l'âge de 6 mois et approximativement 10 mois avant le début des tests comportementaux. Entre temps, les souris sont restées "en vieillissement" avec une période de regroupement à 4 par cage d'environ 6 mois. De manière très étrange, au cours de ce temps de repos, nous avons été confrontés à un problème majeur, nous avons été obligé d'euthanasier de nombreuses souris hAPP/hApoE3 ayant reçu de la mu p75-saporine (cf tableau 11). En effet, ces souris présentaient une épilation extrême (*barbering*) au point de provoquer des lésions tissulaires nécessitant l'euthanasie de l'animal. Seules quelques souris hAPP/hApoE4 sont décédées au cours des 10 mois, les souris étant retrouvées mortes dans leur cage le matin. Il semblerait donc que les souris de type hAPP/hApoE3 soient plus sensibles à certains effets de la lésion des NCB que les souris hAPP/hApoE4.

Ainsi, après décès et exclusion sur les critères spécifiques de chaque type de lésion (cf matériel et méthodes), les effectifs des groupes sont les suivants : hAPP/hApoE3 PBS = 13, NMDA = 9, SAP = 6, NMDA + SAP = 10 ; hAPP/hApoE4 PBS = 15, NMDA = 14, SAP = 13, NMDA+SAP = 15. Nous pouvons noter que le nombre de souris exclues est relativement comparable dans les différents groupes des souris hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4.

	C57BL/6J	hAPP/hApoE3				hAPP/hApoE4			
	PBS	PBS	NMDA	SAP	NMDA+SAP	PBS	NMDA	SAP	NMDA+SAP
Effectif après opération	9	15	16	20	24	16	19	19	25
Nombre de morts pendant le vieillissement	(1)	(1)	(3)	(11)	(10)	(1)	(2)	(3)	(4)
Nombre de morts pendant la période d'évaluation comportementale	(1)	(1)	(2)	(1)	/	/	/	/	/
Elimination pour cause de mauvaise lésion du CE	/	/	(2)	/	/	/	(3)	/	(2)
Elimination pour cause de mauvaise lésion des NCB	/	/	/	(2)	(4)	/	/	(3)	(4)
Effectif après élimination	7	13	9	6	10	15	14	13	15

Tableau 11 : Tableau représentant les effectifs par groupes avant et après les éliminations sur critères histologiques. Est représenté également le nombre de souris décédées pendant la période de vieillissement et pendant la période d'évaluation comportementale.

Nous rappelons que les résultats des quelques souris C57 PBS ne sont présentés qu'à titre indicatif et n'ont pas été intégrés dans la plupart des analyses statistiques. Par ailleurs, cette étude a généré une énorme quantité de données (4 groupes de lésions sur deux génotypes dans plusieurs tâches comportementales, avec éventuellement des mesures répétées). Nous avons donc fait le choix d'organiser les analyses statistiques et la présentation des données à partir de questions précises inspirées par les précédentes études ou en séparant chacune des lignées pour se focaliser sur l'impact des lésions.

2. Histologie

2.1. Evaluation de la lésion du CE

L'injection de NMDA dans le CE induit une lésion partielle et reproductible, aussi bien au niveau du CEL que du CEM, pour chacun des deux génotypes (*cf* figure 42). L'étendue des lésions est également relativement homogène entre les parties latérale et médiane du CE. Cependant, globalement, les souris hAPP/hApoE4 semblent avoir une lésion plus étendue et plus marquée que celle des souris hAPP/hApoE3. Elle s'étend dès l'apparition du CE

antérieurement jusqu'à un niveau très postérieur pour les souris hAPP/hApoE4, alors qu'elle semble localisée principalement autour des sites d'injections pour les souris hAPP/hApoE3. Il est également observé une réduction du nombre de neurones dans la couche II chez toutes les souris lésées. Je rappelle que les critères d'exclusion sont l'unitéarité ou l'absence de la lésion, ce qui n'a pas pu biaiser cette observation.

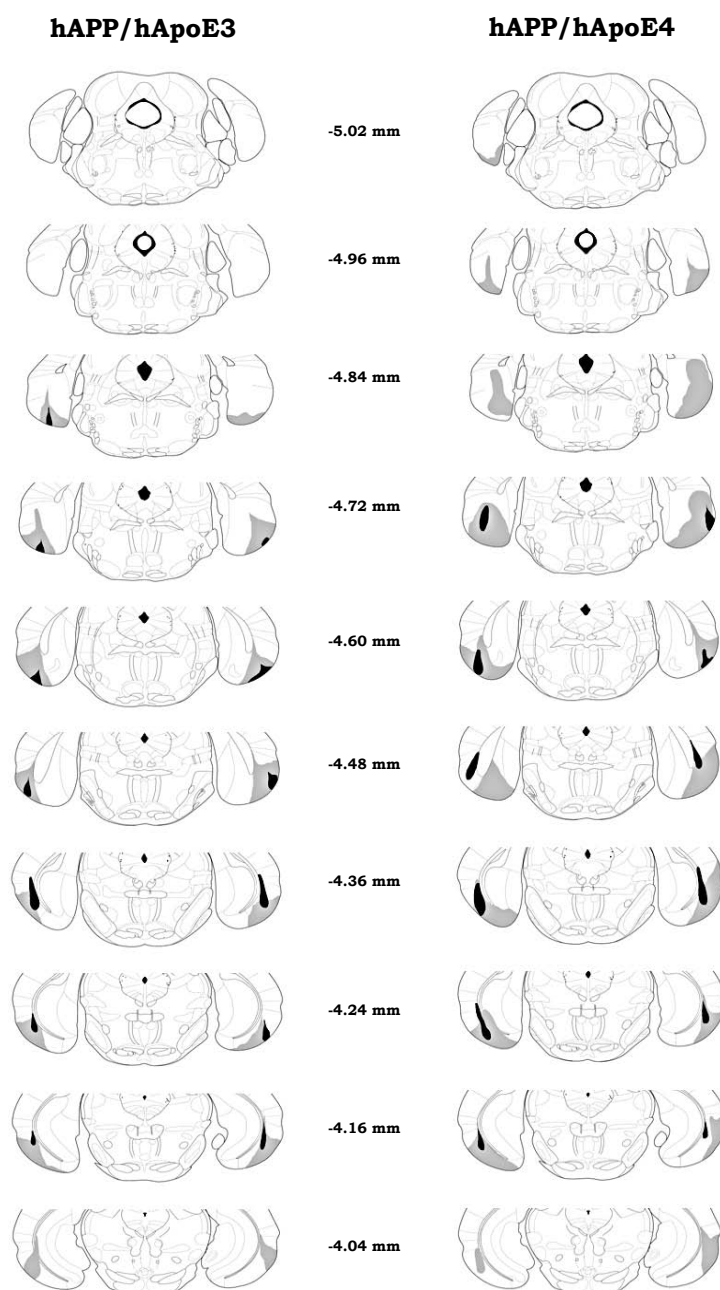


Figure 42 : Représentations schématiques de coupes coronales de cerveau de souris situées entre -4,04 mm et -5,02 mm depuis *bregma*. L'illustration montre l'étendue maximale (gris clair + noir) et l'étendue minimale (noir) des lésions du CE pour les groupes NMDA et NMDA+SAP des souris hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4.

2.2. Evaluation de la lésion des NCB

2.2.1. Immunohistochimie de la ChAT

Globalement, le marquage immunohistochimique de la ChAT ne révèle aucune différence en nombre de neurones ChAT-positifs dans le SM/BDB et le NBM entre les souris hAPP/hApoE3 et les souris hAPP/hApoE4 (SM/BDB : Génotype : $F_{(1,81)} = 2,06$, $p=0,15$; NBM : Génotype : $F_{(1,81)} = 3,24$, $p=0,08$). Chez les animaux PBS, les deux lignées ne diffèrent pas en termes de nombre de neurones ChAT-positifs dans les deux structures. En revanche, nous notons une perte importante du nombre de neurones cholinergiques présents dans le SM et la BDB, et une perte moindre dans le NBM pour les souris SAP et NMDA+SAP de chaque génotype (*cf* figures 43 et 44).

Le comptage des neurones immunomarqués dans le SM/BDB montre que la mu p75-saporine induit en moyenne une diminution significative du nombre de neurones cholinergiques de - 75 % chez les souris SAP et NMDA+SAP hAPP/hApoE3, et de - 86% chez les souris SAP et NMDA+SAP hAPP/hApoE4 (SM/BDB : groupe : $F_{(3,81)} = 134,50$, $p<0,0001$; génotype x groupe : $F_{(3,81)} = 4,30$, $p<0,01$; *cf* figure 43).

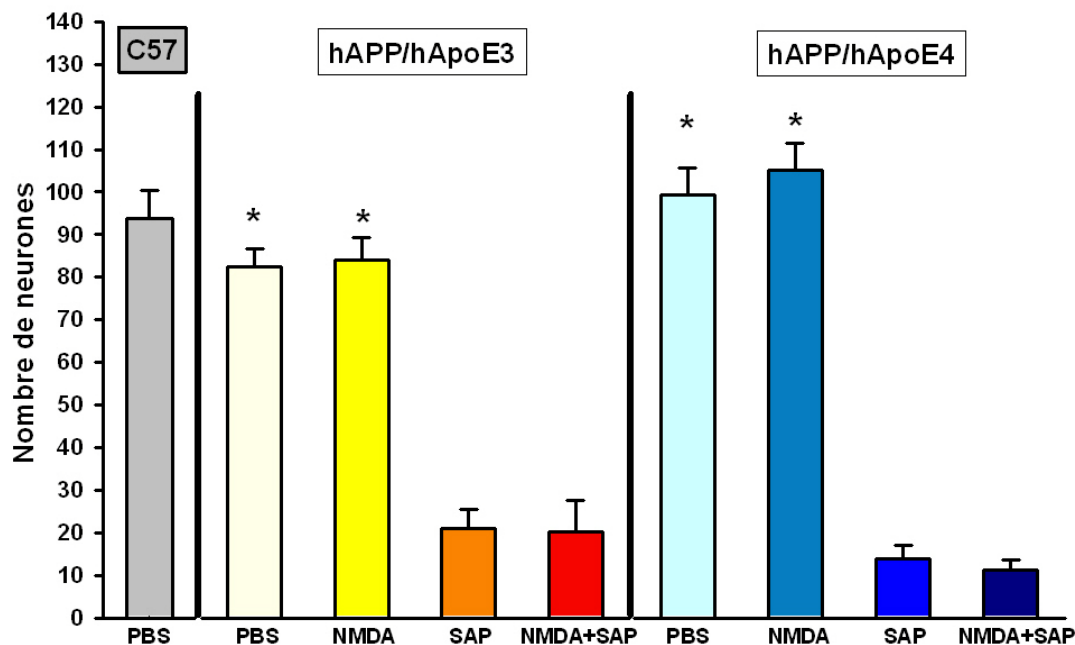


Figure 43 : Représentation graphique de l'effet de la lésion induite par la mu p75-saporine sur le nombre de neurones ChAT-positifs présents dans le SM. Les valeurs représentent la moyenne + erreur type du nombre de neurones par coupes. * : $p<0,001$, pour des différences significatives entre les groupes PBS ou NMDA comparés

et aux groupes SAP ou NMDA+SAP pour chaque génotype (ANOVA à un facteur suivie d'un test de Newman-Keuls).

Dans le NBM le nombre de neurones cholinergiques immunomarqués est diminué de 25% chez les souris SAP et NMDA+SAP hAPP/hApoE3 et de 51% chez les souris SAP et NMDA+SAP hAPP/hApoE4 après injection de mu p75-saporine (NBM : groupe : $F_{(3,81)} = 117,52$, $p < 0,0001$; génotype x groupe : $F_{(3,81)} = 1,30$, $p < 0,27$; cf figure 44). De plus, aucune différence n'a été observée entre les deux types de lésions (SAP et NMDA+SAP) au sein de chaque génotype dans le SM/BDB et dans le NBM.

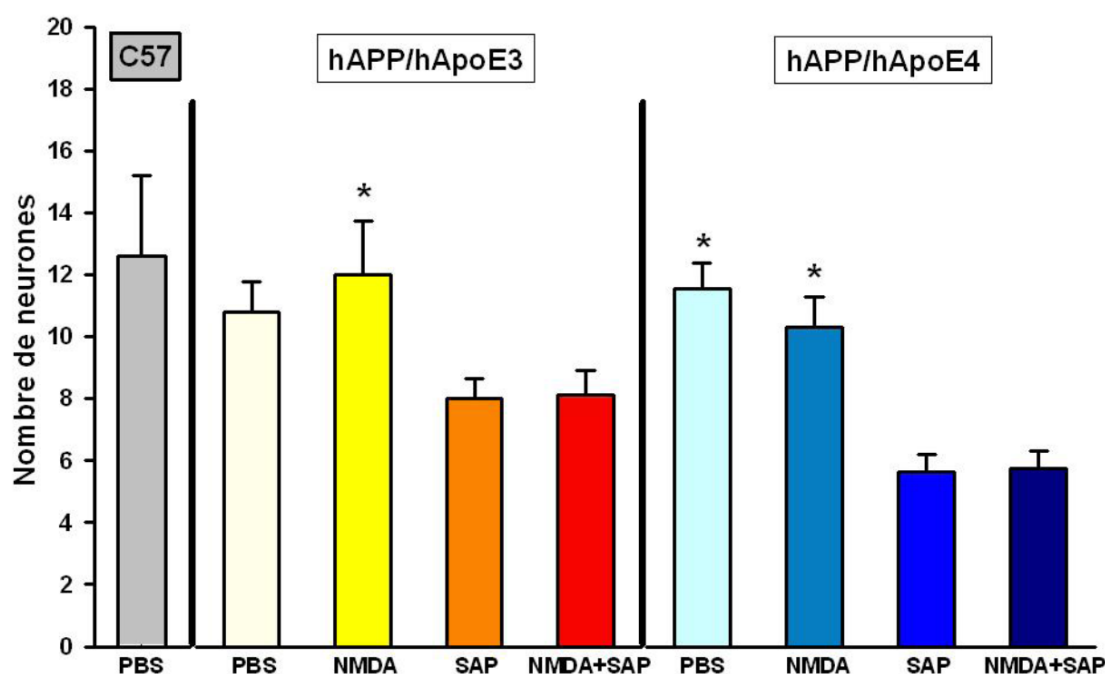


Figure 44 : Représentation graphique de l'effet de la lésion induite par la mu p75-saporine sur le nombre de neurones ChAT-positifs présents dans le NBM. Les valeurs représentent la moyenne + erreur type du nombre de neurones par coupes. * : $p < 0,001$, pour des différences significatives entre les groupes PBS ou NMDA comparés et aux groupes SAP ou NMDA+SAP pour chaque génotype (ANOVA à un facteur suivie d'un test de Newman-Keuls).

2.2.2. Enzymohistochimie de l'acétylcholinestérase

Indépendamment du génotype, le marquage obtenu après révélation de l'activité de l'AChE est fortement diminué dans l'hippocampe dorsal et ventral pour tous les groupes de souris portant une lésion des NCB (SAP et NMSA+SAP ; cf tableaux 12 A et B). De manière

très intéressante, l'activité de l'AChE semble augmenter dans l'hippocampe ventral pour les souris NMDA en comparaison à celle observée pour les souris PBS. Cette différence n'est néanmoins significative que chez les souris hAPP/hApoE4. Pour les souris hAPPapoE3, aucune différence n'est observée entre les groupes dans l'ensemble des régions corticales (cortex retrosplénial, visuel, somatosensoriel, auditif, entorhinal, piriforme et périrhinal). Pour les souris hAPP/hApoE4, seules les souris double lésées (NMDA+SAP) présentent une baisse significative du marquage limitée au cortex auditif et au CE.

En ce qui concerne le marquage de l'activité de l'AChE entre les souris PBS des deux génotypes, aucune différence n'est observée pour l'ensemble des structures ciblées, sauf pour le cortex rétrosplénial où les souris hAPP/hApoE4 présentent une activité de l'AChE moindre comparativement aux souris hAPP/hApoE3 (Cortex rétrosplénial : $F_{(1,22)} = 4,64$, $p < 0,05$).

A) hAPP/hApoE3

Régions cérébrales	PBS	NMDA	SAP	NMDA+SAP	% (NMDA)	% (SAP)	% (NMDA+SAP)
Hippocampe dorsal	2,13 ± 0,24	1,96 ± 0,34	0,70 ± 0,20*	1,11 ± 0,26*	-8%	-67%	-48%
Hippocampe ventral	2,38 ± 0,35	3,28 ± 0,24	1,33 ± 0,47 ^s	1,33 ± 0,30* ^s	37%	-44%	-44%
Cortex retrosplénial	0,46 ± 0,10	0,22 ± 0,07	0,14 ± 0,06	0,17 ± 0,06	-52%	-69%	-63%
Cortex visuel (V1. V2)	0,51 ± 0,12	0,47 ± 0,10	0,38 ± 0,14	0,59 ± 0,18	-8%	-25%	15%
Cortex somatosensoriel	0,52 ± 0,16	0,54 ± 0,17	0,35 ± 0,12	0,30 ± 0,10	4%	-32%	-42%
Cortex auditif	0,81 ± 0,17	0,94 ± 0,10	0,87 ± 0,37	1,65 ± 0,27	16%	7%	104%
Cortex entorhinal	0,97 ± 0,22	0,88 ± 0,17	1,12 ± 0,42	1,19 ± 0,23	-9%	15%	23%
Cortex piriforme	0,55 ± 0,15	0,99 ± 0,40	1,24 ± 0,50	1,60 ± 0,78	80%	125%	191%
Cortex périrhinal	0,60 ± 0,14	0,88 ± 0,26	1,48 ± 0,49	1,64 ± 0,49	46%	147%	173%

B) hAPP/hApoE4

Régions cérébrales	PBS	NMDA	SAP	NMDA+SAP	% (NMDA)	% (SAP)	% (NMDA+SAP)
Hippocampe dorsal	2,62 ± 0,31	2,89 ± 0,31	0,70 ± 0,14* ^s	0,46 ± 0,09* ^s	10%	-73%	-82%
Hippocampe ventral	2,89 ± 0,27	3,87 ± 0,39*	0,98 ± 0,16* ^s	1,05 ± 0,10* ^s	34%	-66%	-64%
Cortex retrosplénial	0,22 ± 0,03	0,54 ± 0,24	0,08 ± 0,02	0,16 ± 0,03	145%	-63%	-27%
Cortex visuel (V1. V2)	0,48 ± 0,06	0,51 ± 0,08	0,35 ± 0,09	0,26 ± 0,06	6%	-27%	-46%
Cortex somatosensoriel	0,41 ± 0,13	0,52 ± 0,12	0,17 ± 0,04	0,18 ± 0,03	27%	-58%	-56%
Cortex auditif	1,04 ± 0,24	1,36 ± 0,24	0,74 ± 0,15	0,55 ± 0,15 ^s	31%	-29%	-47%
Cortex entorhinal	1,31 ± 0,35	1,64 ± 0,23	0,95 ± 0,21	0,67 ± 0,13 ^s	25%	-27%	-49%
Cortex piriforme	1,12 ± 0,35	1,45 ± 0,34	0,54 ± 0,19	0,61 ± 0,24	29%	-52%	-46%
Cortex périrhinal	1,07 ± 0,25	0,98 ± 0,20	0,96 ± 0,26	0,84 ± 0,33	-8%	-10%	-21%

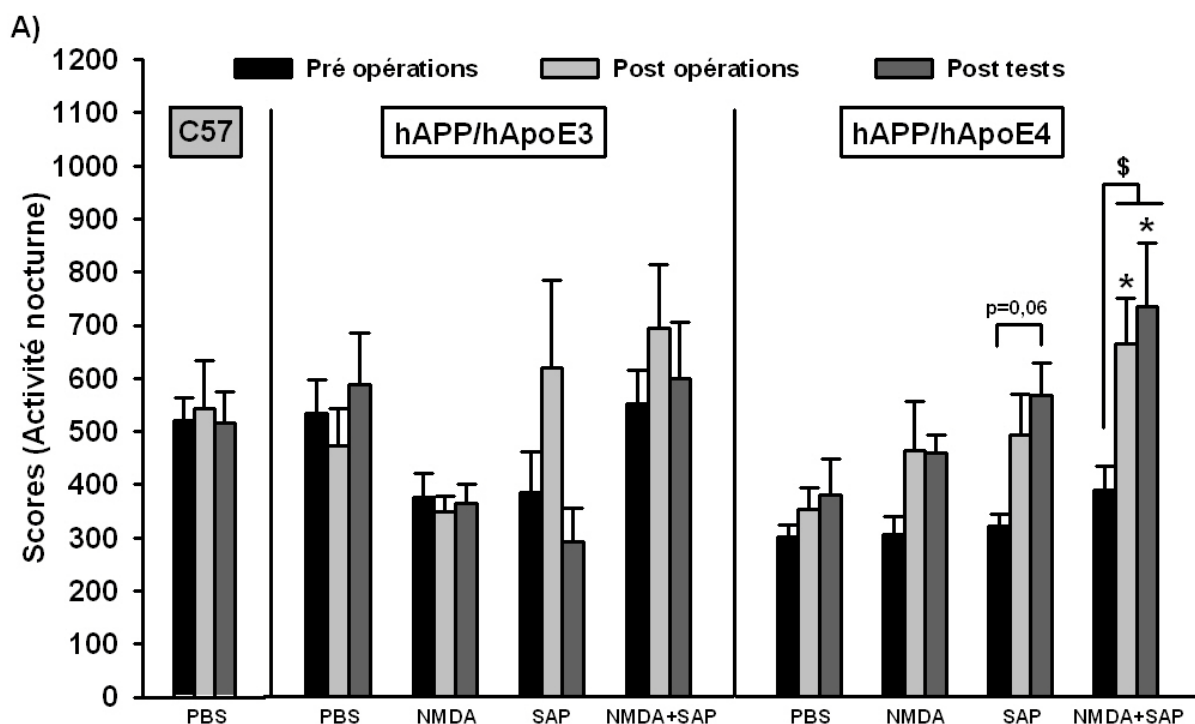
Tableau 12 : Tableaux représentant les valeurs de densité optique du produit de dégradation de l'AChE obtenues dans les différentes régions cérébrales pour les souris hAPP/hApoE3 (A) et hAPP/hApoE4 (B). Les données sont présentées en termes de moyenne de densité optique de l'activité de l'AChE (unités arbitraires) ± SEM pour illustrer les effets de la mu p75-saporine ou du PBS pour les souris PBS, NMDA, SAP + NMDA+SAP.

Pour faciliter les comparaisons, les trois dernières colonnes représentent le pourcentage de réduction de densité optique pour les trois groupes NMDA, SAP et NMDA + SAP en comparaison avec les valeurs du groupe témoins PBS pour chaque génotype indépendamment (* $p < 0.05$, différent significativement de PBS ; \$ $p < 0.05$, différent significativement de NMDA).

3. Evaluation comportementale

3.1. Effet des lésions sur l'activité locomotrice

L'activité locomotrice a été évaluée au cours de trois séances d'enregistrement sur 24 h. La première avait pour but d'évaluer l'activité de base des souris avant l'opération. Puis, les deux autres séances d'enregistrement ont été réalisées 5 mois après opération et après la passation des tests comportementaux (respectivement post-opération et post-tests). L'ensemble des résultats est présenté dans la figure 45. L'activité locomotrice au cours de la phase diurne a été analysée séparément de celle obtenue lors de la phase nocturne. Dans cette étude, deux souris (hAPP/hApoE3 SAP et hAPP/hApoE4 NMDA) ont été écartées des analyses en raison d'une activité locomotrice aberrante en comparaison à la moyenne de leurs groupes respectifs, vraisemblablement due à un problème technique. C'est pourquoi nous avons préféré les écarter pour les analyses statistiques de cette tâche.



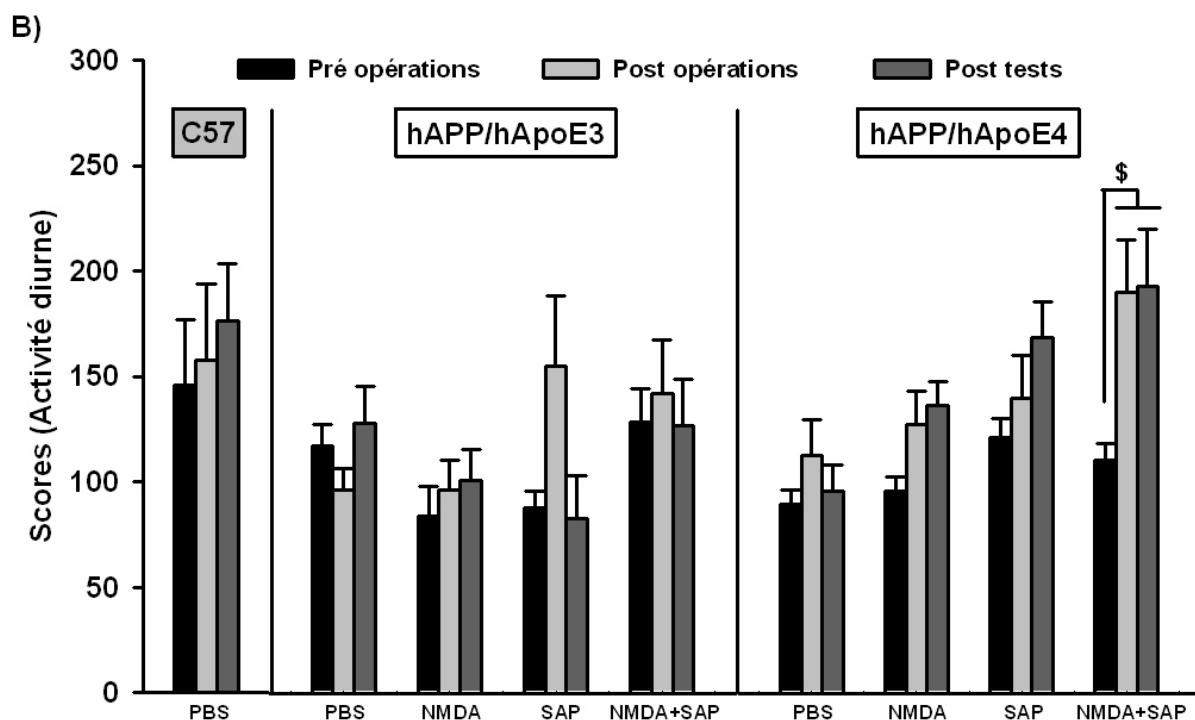


Figure 45 : Représentation graphique de l'effet des lésions du CE et des NCB sur l'activité locomotrice des souris hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4. Les valeurs représentent les moyennes des scores d'activité par heure + erreur type enregistrées durant la phase nocturne (A) et diurne (B) lors de l'enregistrement de l'activité locomotrice spontanée lors des séances réalisées pré-opération, post-opération et post-tests. * $p < 0.05$, pour des différences significatives par rapport au groupe PBS ; \$ $p < 0.05$, pour des différences significatives entre séances (ANOVA à mesure répétée suivie d'un test de Newman-Keuls).

3.1.1. Effet du génotype sur l'activité locomotrice avant opération

Lors de l'étude préliminaire visant l'adaptation de la lésion des NCB chez les souris mâles double transgéniques jeunes, nous avons observé une activité locomotrice globalement diminuée pour les souris hAPP/hApoE4 en comparaison aux souris hAPP/hApoE3 avant opération. C'est pourquoi la première question posée dans l'analyse de cette nouvelle étude était de vérifier si nous retrouvions cette hypoactivité des souris hAPP/hApoE4 chez des souris femelles double transgéniques plus âgées.

Ainsi, au cours de la phase nocturne de la session réalisée avant les opérations, les souris hAPP/hApoE4 PBS présentent globalement une activité locomotrice réduite en comparaison aux souris hAPP/hApoE3 PBS et C57 PBS (avant opération : groupes PBS : $F_{(2,29)} = 8,88$, $p < 0,001$; cf figure 45A). Lorsque l'on s'intéresse à la comparaison des scores des deux génotypes indépendamment du type de lésion, globalement les souris hAPP/hApoE4

présentent une activité locomotrice amoindrie en comparaison aux souris hAPP/hApoE3 (avant opération : hAPP/hApoE3 = $474,3 \pm 33,2$; hAPP/hApoE4 = $330,9 \pm 17,3$; génotype : $F_{(1,81)} = 14,31$, $p < 0,001$).

Lors de la phase diurne les souris hAPP/hApoE4 PBS présentent toujours une activité amoindrie mais, cette fois-ci, uniquement par rapport aux souris C57 PBS (avant opération : groupe : $F_{(2,29)} = 3,46$, $p < 0,05$; cf figure 45B). Aucune différence n'est observée entre les scores de l'ensemble des souris hAPP/hApoE3 comparée aux souris hAPP/hApoE4 (avant opération : scores hAPP/hApoE3 = $106,4 \pm 6,96$; hAPP/hApoE4 = $103,22 \pm 4,16$; génotype : $F_{(1,81)} = 0,01$, $p = 0,90$).

La deuxième question posée dans cette étude était de vérifier l'impact des lésions au sein de chaque génotype à long terme avant et après la passation des tests. C'est pourquoi nous avons analysé les données d'activité locomotrice sur les deux séances indépendamment pour chaque génotype.

3.1.2. Effet des lésions sur l'activité locomotrice des souris hAPP/hApoE3, 5 mois après opération et après la passation des tests

Pour comparer l'effet des lésions, nous avons comparé les scores obtenus lors des 3 séances d'actographie. Globalement, l'ensemble des groupes de souris présente un niveau d'activité relativement similaire au cours des 3 séances (nocturne : groupe x séance : $F_{(2,62)} = 1,53$, $p = 0,18$; diurne : $F_{(2,62)} = 1,17$, $p = 0,32$). Au vu de la figure 45A, la lésion des NCB semble néanmoins provoquer une augmentation de l'activité locomotrice, nocturne et diurne, uniquement pour les souris SAP lors de la séance réalisée post-opération. Cependant, ce résultat n'atteint pas la significativité lors du test de NK. Par contre, lors de la séance réalisée après les tests, ce niveau d'activité retourne à un état comparable à celui observé avant les opérations pour les souris SAP. Pour terminer, aucune différence n'est observée entre les trois sessions pour les groupes de souris PBS, NMDA et NMDA+SAP.

3.1.3. Effet des lésions sur l'activité locomotrice des souris hAPP/hApoE4, 5 mois après opération et après la passation des tests

Pour les souris hAPP/hApoE4, il semblerait également que les groupes SAP et NMDA+SAP aient une perturbation de l'activité locomotrice nocturne lors des deux séances réalisées après opération et après les tests, en comparaison à la séance réalisée avant opération. Comme le montre la figure 45B, les souris SAP et NMDA+SAP présentent une activité locomotrice augmentée lors de la séance post-opération et post-tests des souris SAP et NMDA+SAP, mais cet effet n'atteint pas la significativité au niveau de l'interaction entre les groupes et les séances (groupe x séance : nocturne $F_{(2,98)} = 1,22$, $p=0,29$; diurne $F_{(2,62)} = 1,79$, $p=0,17$). Néanmoins, avec le test de NK, l'activité du groupe NMDA+SAP diffère significativement de celle observée pour le groupe PBS au cours des séances post-opération et post-tests en phase nocturne. De plus, les scores des souris NMDA+SAP obtenus lors des deux séances réalisées après les opérations diffèrent de ceux obtenus avant opération. En ce qui concerne les souris NMDA, elles présentent un même niveau d'activité que les souris PBS, et la lésion ne semble avoir perturbé que modérément l'activité locomotrice au cours des trois séances.

En conclusion, la lésion des NCB induit globalement une hyperactivité locomotrice modérée avant les tests chez les souris hAPP/hApoE3, alors que cette lésion n'augmente de façon marquée l'activité des souris hAPP/hApoE4 (avant et après les tests) que lorsqu'elle est associée à la lésion du CE.

3.2. Effet des lésions sur l'anxiété

Dans cette tâche, nous avons évalué le niveau d'anxiété des souris dans le test des cages claire-obscur par l'analyse de trois variables comportementales : la latence d'entrée dans la cage claire, le nombre de transition entre les cages claire et obscure, puis le temps passé par la souris dans la cage claire. Nous rappelons que nous avons intégré ce test dans cette étude car nous soupçonnions éventuellement un effet de l'expression de l'hApoE3 sur la sphère émotionnelle des souris au vu des résultats des articles Bour et collaborateurs (2008) et des données comportementales du rapport adressé à Merck *Research Laboratories* (Department of Neurosymptomatic Disorders, West Point, PA 19486, USA).

3.2.1. Effet des lésions sur le temps passé dans la cage claire

Dans cette tâche, les souris hAPP/hApoE3 PBS, hAPP/hApoE4 PBS et C57 PBS passent le même temps dans le compartiment clair (groupes PBS : $F_{(2,29)} = 0,23$, $p=0,79$; cf figure 46). Globalement, et indépendamment des lésions, les souris hAPP/hApoE3 passent moins de temps que les souris hAPP/hApoE4 dans la cage claire (hAPP/hApoE3 : $50,15 \pm 9,63$; hAPP/hApoE4 : $79,76 \pm 7,20$; génotype : $F_{(1,83)} = 6,30$, $p=0,01$).

Si l'on s'intéresse uniquement aux performances des souris hAPP/hApoE3, il semblerait que le temps passé dans le compartiment clair soit moins important pour les souris NMDA+SAP en comparaison aux souris PBS alors que les souris NMDA et SAP n'y passent qu'un temps relativement réduit par rapport aux souris PBS, mais cet effet n'est pas significatif (Groupe : $F_{(3,33)} = 1,13$, $p=0,35$).

Pour les performances des souris hAPP/hApoE4, toutes les souris passent un temps relativement similaire dans la cage claire (groupe : $F_{(3,50)} = 0,25$, $p=0,85$).

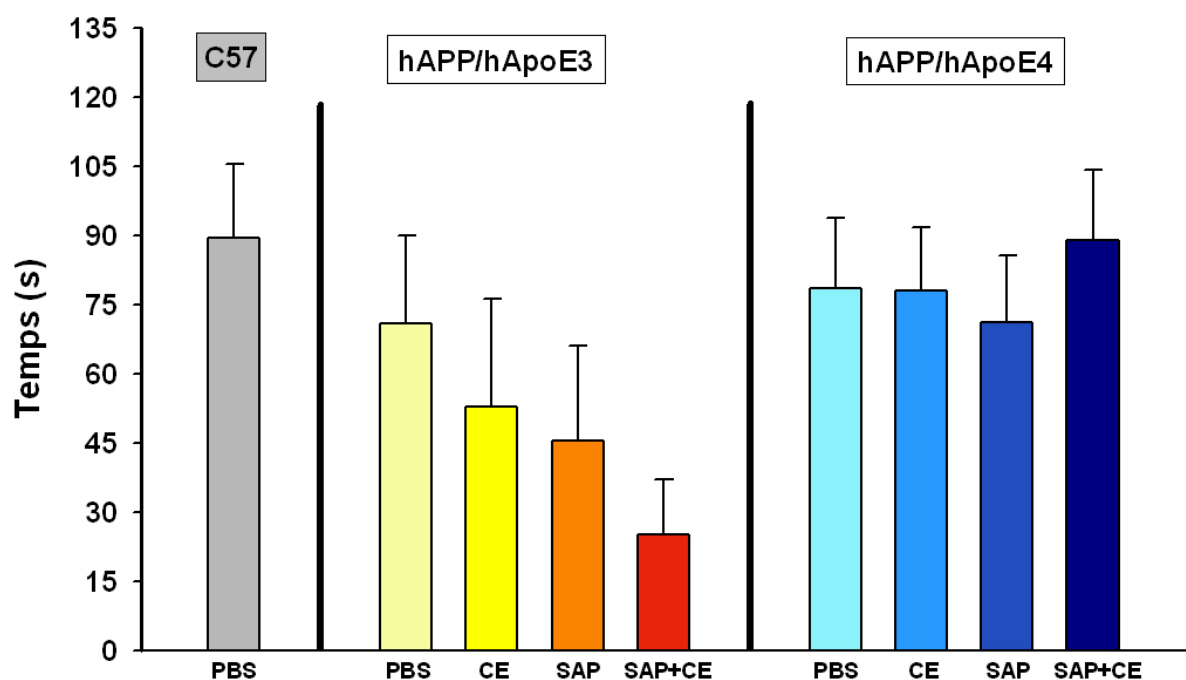


Figure 46 : Représentation graphique de l'effet des lésions du CE et des NCB sur le temps passé dans la cage claire pour les souris hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4. Les valeurs représentent la moyenne du temps + erreur type en fonction du génotype et du type de lésion.

3.2.2. Effet des lésions sur la latence d'entrée dans la cage claire

Concernant la latence d'entrée dans la cage claire, les trois groupes de souris PBS (hAPP/hApoE3, hAPP/hApoE4 et C57) ont relativement les mêmes performances (groupes PBS : $F_{(2,29)} = 0,69$, $p=0,50$; cf figure 47).

Les souris hAPP/hApoE3, quant à elles, semblent mettre un peu plus de temps à sortir de la cage obscure que les souris hAPP/hApoE4 (hAPP/hApoE3 : $152,88 \pm 19,44$; hAPP/hApoE4 : $128,57 \pm 13,03$). Néanmoins, aucune différence significative n'est observée entre les deux génotypes (génotype : $F_{(1,83)} = 1,33$, $p=0,25$).

Comme le montre la figure 47, les souris hAPP/hApoE3 NMDA+SAP présentent une latence bien supérieure aux souris hAPP/hApoE3 PBS, mais ce résultat n'atteint pas la significativité. De façon générale, les lésions NMDA et SAP seules n'affectent pas significativement la latence d'entrée des souris hAPP/hApoE3 (groupe : $F_{(3,33)} = 1,95$, $p=0,14$).

Pour les souris hAPP/hApoE4, aucune différence n'est observée entre les différents groupes de lésion (groupe : $F_{(3,50)} = 0,96$, $p=0,41$).

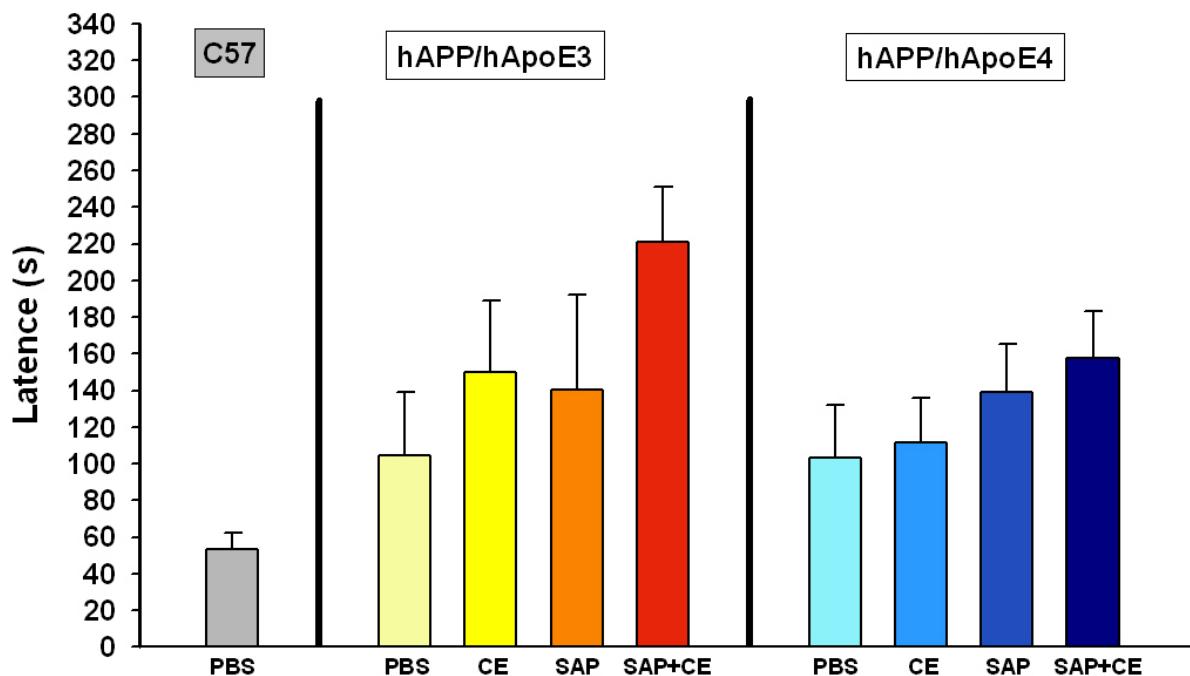


Figure 47 : Représentation graphique de l'effet des lésions du CE et des NCB sur la latence d'entrée dans la cage claire pour les souris hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4. Les valeurs représentent le temps passé en secondes + erreur type en fonction du génotype et du type de lésion.

3.2.2. Effet des lésions sur le nombre de transitions entre les cages obscure et claire

Concernant le nombre de transitions entre la cage obscure et la cage claire, les souris hAPP/hApoE3 PBS, hAPP/hApoE4 PBS et C57 PBS effectuent un nombre de transitions similaire (groupe PBS : $F_{(2,29)} = 0,24$, $p=0,78$; cf figure 48).

Concernant les performances des deux génotypes hAPP/hApoE3 vs hAPP/hApoE4, aucune différence significative n'est observée quant au nombre de transitions effectuées entre les deux cages pour les deux génotypes de souris (hAPP/hApoE3 : $6,75 \pm 1,25$; hAPP/hApoE4 : $8,59 \pm 0,90$; génotype : $F_{(1,83)} = 2,10$, $p=0,15$).

A travers les résultats observés pour les souris hAPP/hApoE3, il semblerait que la lésion NMDA, SAP ou combinée NMDA+SAP provoque une diminution du nombre de transitions. Cependant, aucune différence significative n'est observée pour chacun des groupes traités (groupe : $F_{(3,33)} = 1,73$, $p=0,17$).

Pour les souris hAPP/hApoE4, les souris NMDA+SAP semblent avoir un nombre de transitions moins important que les souris PBS et la lésion SAP tend à diminuer le nombre de transitions, alors que la lésion NMDA n'entraîne pas d'effet par elle-même (groupe : $F_{(3,50)} = 0,25$, $p=0,85$).

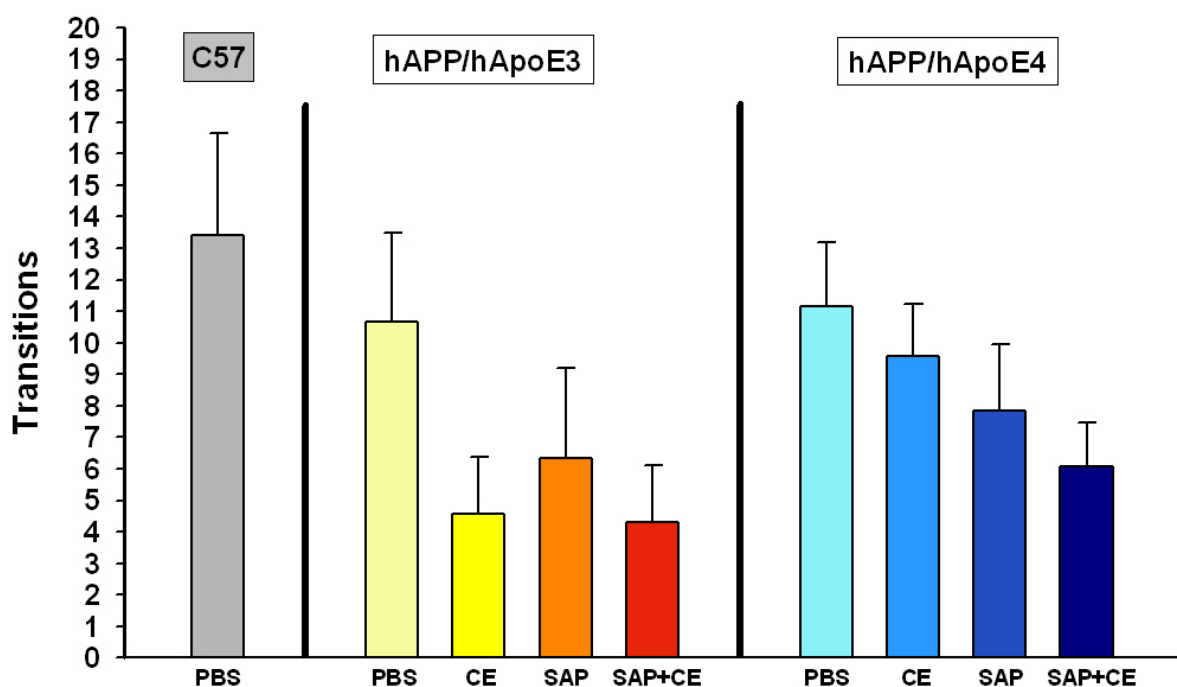


Figure 48 : Représentation graphique de l'effet des lésions du CE et des NCB sur le nombre de transitions des souris hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4. Les valeurs représentent le nombre moyen de transitions + erreur type en fonction du génotype et du type de lésion.

En conclusion, les souris hAPP/ApoE3 ont souvent des scores d'anxiété plus importants que ceux des souris hAPP/hApoE4, et cette indication d'anxiété tend à être plus marquée avec les lésions. Les souris hAPP/ApoE4 ont des scores d'anxiété comparables à ceux des souris C57BL/6J qui ne sont pas affectés par les lésions.

3.3. Effet des lésions sur les performances de navigation dans la tâche du labyrinthe de Barnes

Pour terminer, les capacités de navigation des souris ont été éprouvées dans une deuxième tâche de navigation spatiale : le labyrinthe de Barnes. Lors de la phase d'acquisition de 5 jours, les performances sont évaluées en termes de latence d'accès pour retrouver le trou cible et de nombre d'erreurs totales commises avant de trouver le trou cible au cours d'un essai (nombre de trous incorrects visités au cours d'un essai). Au vu du grand nombre de facteurs du fait de l'utilisation de deux génotypes différents, et au vu du nombre de jours d'acquisition, une analyse par groupe de traitement, groupe NCB ou groupe CE (*cf* **Publication 2**), s'est révélée trop complexe. C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser une analyse en fonction du génotype et en fonction des quatre types de lésions PBS, NMDA, SAP et NMDA+SAP pour les résultats obtenus dans cette tâche.

3.3.1. Acquisition (5 jours)

3.3.1.1. Latence d'accès au trou cible

Concernant la latence d'accès au trou cible pour les souris hAPP/hApoE3 PBS, hAPP/hApoE4 PBS et C57 PBS, aucune différence de performances n'est à signaler entre les groupes (groupe PBS : $F_{(2,29)} = 0,31$, $p=0,72$). Les trois groupes améliorent leurs performances de manière similaire au cours des 5 jours d'acquisition (groupe PBS x jour : $F_{(8,116)} = 0,22$, $p=0,98$).

Globalement, toutes les souris transgéniques améliorent significativement leurs performances en termes de latence d'accès au cours des 5 jours d'acquisition, indépendamment du génotype ou des lésions (Jour : $F_{(4,332)} = 85,43$, $p<0,01$; *cf* figure 49). Aucune différence globale de performances n'est à noter entre les génotypes hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4 (génotype : $F_{(1,83)} = 1,90$, $p=0,17$). De plus, l'effet des lésions est similaire sur

les deux génotypes de souris (génotype x groupe : $F_{(3,83)} = 1,05$, $p=0,37$) et entraîne un profil d'amélioration de performance similaire jour après jour (génotype x groupe x jour : $F_{(12,332)} = 0,75$, $p=0,69$).

Si l'on considère les performances des souris hAPP/hAPoE3 uniquement, l'ensemble des groupes traités améliore ses performances au cours de la période d'acquisition (jour : $F_{(4,132)} = 40,90$, $p<0,01$). Les souris NMDA+SAP sont plus lentes à trouver le trou cible que les souris PBS (groupe : $F_{(3,33)} = 5,63$, $p<0,01$; groupe x jour : $F_{(12,132)} = 1,81$, $p=0,05$). Cette latence est significativement plus importante que celle des souris témoins au 2^{ème} jour d'acquisition. Les souris SAP et NMDA, quant à elles, ont des performances tout à fait similaires aux souris PBS. En ce qui concerne les performances des souris hAPP/hAPoE4, tous les groupes traités améliorent également leurs performances au cours de la période d'acquisition (jour : $F_{(4,200)} = 49,53$, $p<0,01$). Néanmoins, les souris SAP et NMDA+SAP mettent plus de temps pour trouver le trou menant à la cage en comparaison au temps mis par les souris PBS et NMDA lors des premiers jours d'acquisition. Cependant, toutes finissent par améliorer leurs performances au dernier jour et obtiennent le même niveau de performances que les souris PBS et NMDA (groupe : $F_{(3,50)} = 8,52$, $p<0,01$; groupe x jour : $F_{(12,200)} = 0,76$, $p<0,68$).

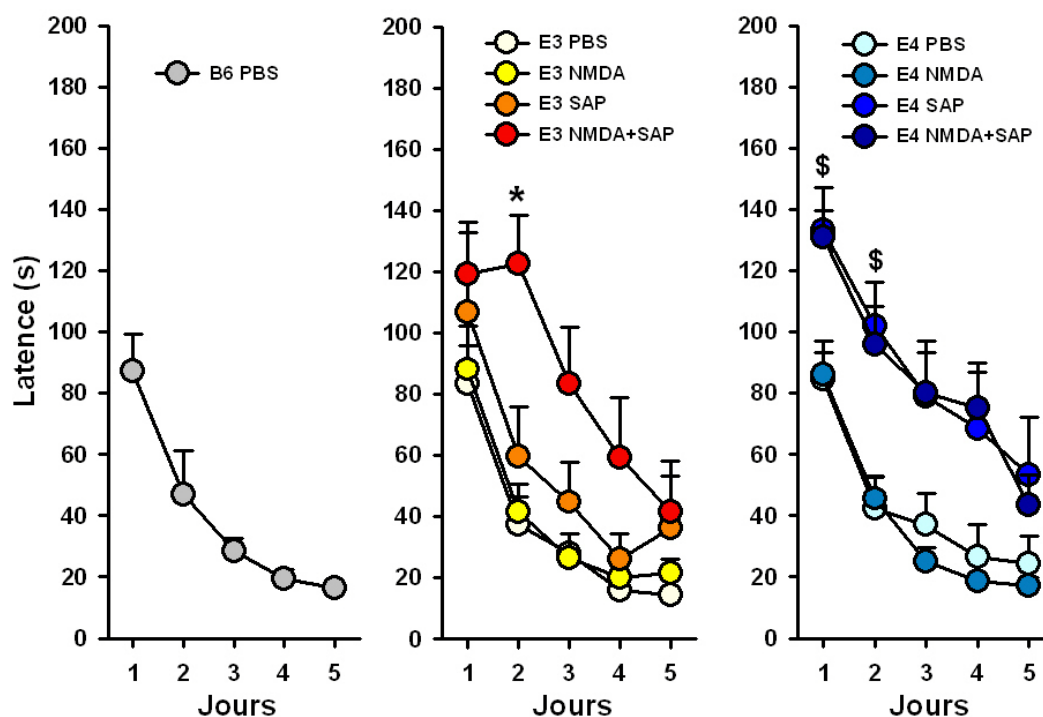


Figure 49 : Représentation graphique de l'effet de la lésion des NCB et du CE sur les performances dans le labyrinthe de Barnes des souris hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4. Les valeurs représentent les moyennes + erreur type du temps mis par les souris pour pénétrer dans le trou cible. * : $p<0,05$, pour des différences significatives entre les groupes NMDA+SAP et PBS lors d'une même séance de la phase d'acquisition ; \$: $p<0,05$, pour des

différences significatives entre les groupes SAP, NMDA+SAP et PBS (ANOVA à mesure répétée suivie d'un test de Newman-Keuls).

3.3.1.2. Nombre d'erreurs totales avant de rejoindre de trou cible

Concernant le nombre d'erreurs totales commises avant de rejoindre le trou cible, les trois groupes hAPP/hApoE3 PBS, hAPP/hApoE4 PBS et C57 PBS ont un niveau de performances similaire (groupe PBS : $F_{(2,29)} = 1,36$, $p=0,27$) et sur les 5 jours d'acquisition (groupe PBS x jour : $F_{(8,116)} = 0,40$, $p=0,91$).

Globalement, tous les groupes diminuent le nombre d'erreurs totales commises au cours des 5 jours d'acquisition (jour : $F_{(4,332)} = 14,75$, $p<0,01$; cf figure 50). Néanmoins, les souris hAPP/hApoE4 semblent commettre plus d'erreurs que les souris hAPP/hApoE3, notamment lors du premier jour d'acquisition (génotype : $F_{(1,83)} = 4,40$, $p<0,05$; génotype x jour : $F_{(4,332)} = 2,58$, $p<0,05$). Cependant, l'effet des lésions quant au nombre d'erreurs commises semble être similaire en fonction des deux génotypes et suivre la même progression au fil des jours (génotype x groupe x jour : $F_{(12,332)} = 0,96$, $p<0,47$).

Concernant le nombre d'erreurs réalisées par les souris hAPP/hApoE3, tous les groupes traités ont relativement les mêmes performances et les améliorent lors des 5 jours d'acquisition (jour : $F_{(4,132)} = 3,96$, $p<0,01$), aucune différence significative n'étant observée entre les groupes PBS, NMDA, SAP et NMDA+SAP (groupe : $F_{(3,33)} = 0,75$, $p=0,52$; groupe x jour : $F_{(12,132)} = 1,18$, $p=0,30$). Cependant, il est à noter que les performances observées au jour 1 ne diffèrent pas statistiquement de celles observées au jour 5 pour l'ensemble des quatre groupes traités.

Pour les souris hAPP/hApoE4, les performances en termes de nombre d'erreurs totales sont également similaires pour les quatre groupes traités, toutes améliorant leurs performances jour après jour (jour : $F_{(4,200)} = 15,18$, $p<0,01$; groupe : $F_{(3,50)} = 0,35$, $p=0,78$; groupe x jour : $F_{(12,200)} = 1,00$, $p=0,44$). Cette amélioration de performances chez les hAPP/hApoE4 est plutôt due au grand nombre d'erreurs commises au 1^{er} jour car elles rejoignent les performances des hAPP/hApoE3 en fin de tâche (génotype x groupe : $F_{(3,83)} = 0,15$, $p<0,92$; génotype x groupe x jour : $F_{(3,83)} = 1,05$, $p=0,37$).

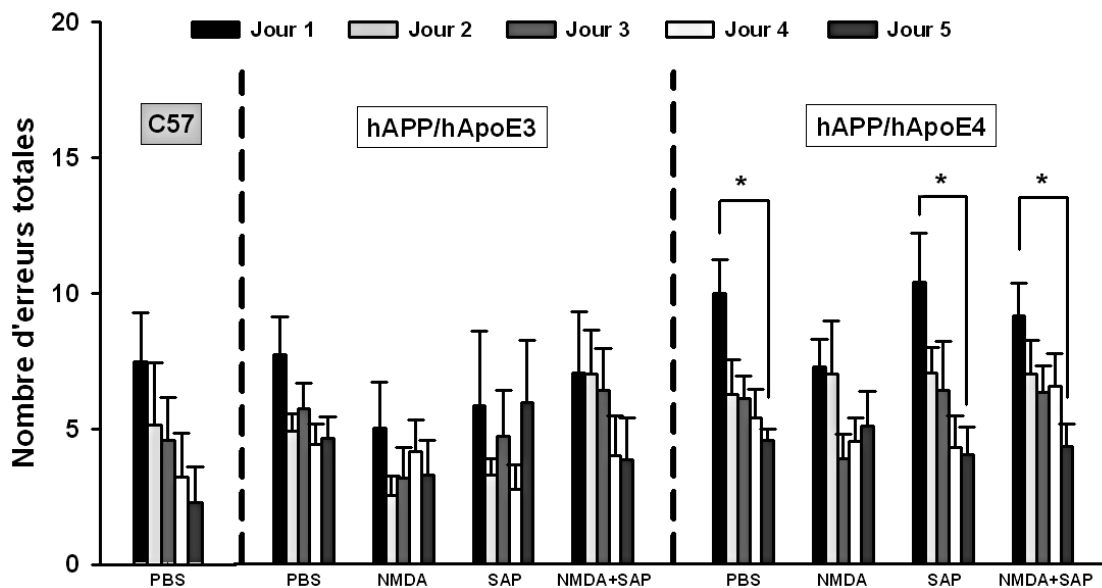


Figure 50 : Représentation graphique de l'effet de la lésion des NCB et du CE sur les performances dans le labyrinthe de Barnes des souris hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4. Les valeurs représentent les moyennes + erreur type du nombre d'erreurs totales commises par séance. * : $p < 0,05$, pour des différences significatives entre le nombre d'erreurs totales commises au jour 1 et au jour 5 (ANOVA à mesure répétée suivie d'un test de Newman-Keuls).

3.3.2. Test de rétention (11 jours)

Onze jours après la fin de la période d'acquisition, les souris sont soumises à un test de rétention de 120 s dans lequel le trou cible est obturé. Le nombre total de visites sur les 12 trous est similaire pour les deux génotypes de souris (hAPP/hApoE3 : $36,43 \pm 2,78$ et hAPP/hApoE4 : $35,11 \pm 2,53$; génotype : $F_{(1,89)} = 0,11$, $p = 0,73$). Pour simplifier l'analyse, les performances des souris sont évaluées en termes de différences entre le trou cible et le trou opposé.

Au cours de ce test de rétention aucune différence n'est observée entre les trois groupes de souris C57 PBS, hAPP/hApoE3 PBS et hAPP/hApoE4 PBS (groupe PBS : $F_{(2,29)} = 0,91$, $p = 0,41$). Globalement, l'ensemble des souris préfère le trou cible par rapport à l'opposé (trou : $F_{(1,29)} = 65,40$, $p < 0,01$; trou x groupe PBS : $F_{(2,29)} = 3,86$, $p = 0,29$).

Les performances des souris hAPP/hApoE3 montrent que les trous ne sont pas visités à la même fréquence (trou : $F_{(1,33)} = 52,12$, $p < 0,01$; trou x groupe : $F_{(1,33)} = 1,23$, $p < 0,31$). Comme il est présenté sur la figure 51, les souris PBS visitent plus le trou cible que le trou opposé, ce qui n'est étrangement pas le cas pour les souris NMDA. Les souris SAP et NMDA + SAP, quant à elles, visitent de manière similaire les deux trous.

Les performances des souris hAPP/hApoE4 montrent également que les trous ne sont pas visités à la même fréquence (trou : $F_{(1,50)} = 30,30$, $p < 0,01$; trou x groupe : $F_{(1,50)} = 1,78$, $p < 0,16$). Les souris PBS et NMDA visitent davantage le trou cible que le trou opposé, alors les souris SAP et NMDA visitent de manière équivalente les deux trous.

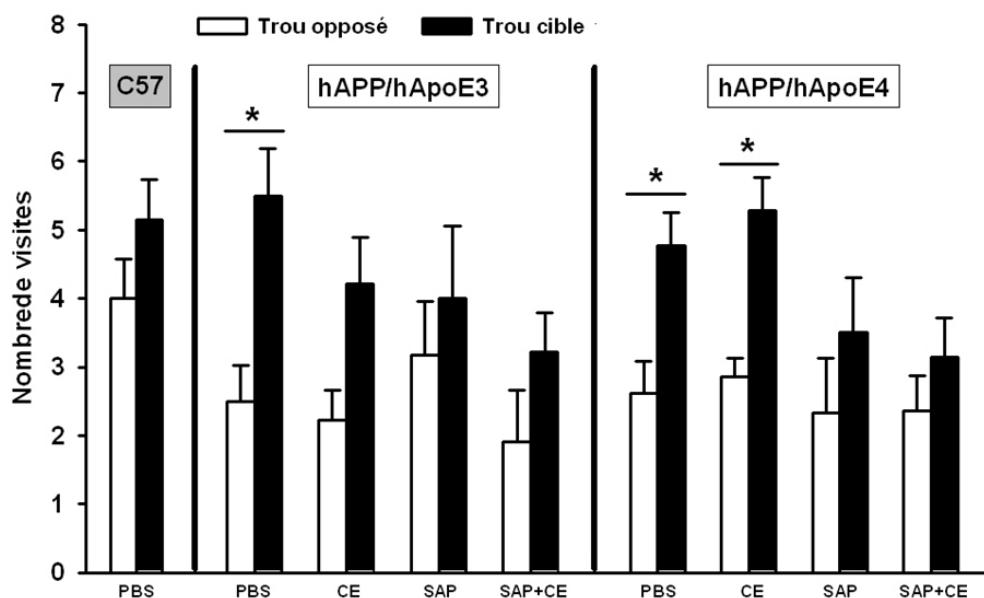


Figure 51 : Représentation graphique de l'effet des lésions du CE et des NCB sur les performances dans le labyrinthe de Barnes des souris hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4 lors du test de rétention. Les valeurs représentent le nombre moyen de visites par trou + erreur type. Les statistiques portent sur le trou opposé et le trou cible. * $p < 0,05$ pour des différences significatives entre le trou cible et le trou opposé (ANOVA à mesure répétée suivie d'un test de Newman-Keuls).

L'ensemble de tous les résultats est résumé dans le tableau 13. En conclusion, les souris hAPP/hApoE3 PBS et hAPP/hApoE4 PBS ne diffèrent pas quant à leurs performances observées dans le labyrinthe de Barnes, ces performances étant d'ailleurs équivalentes à celles des souris C57BL/6J lors de la phase d'acquisition et meilleures dans celle de rétention. Les scores des groupes de souris hAPP/hApoE4 ayant reçu une lésion des NCB (groupes SAP et NMDA+SAP) sont dramatiquement perturbés aussi bien lors de la phase d'acquisition que de rétention, alors que seule la lésion combinée du CE et des NCB perturbe fortement les performances des souris hAPP/hApoE3 au cours de ces deux phases, la lésion des NCB seule ne semblant perturber que modérément la phase d'acquisition et fortement celle de rétention. Pour terminer, la lésion du CE seule ne perturbe en rien les performances des souris hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4 dans cette tâche.

Expérience		Résultats		
		Comparaison entre C57 PBS vs E3 PBS vs E4 PBS	Effet lésion par génotype	E3 E4
Tâches	Caractéristiques / protocoles			
Opérations	Injections intraparenchymateuses multiples de NMDA (120 mM ; site 1 : 0,075 µL, site 2a : 0,05 µL, site 2b : 0,1 µL)	/	NMDA	Lésions partielles du CEL et du CEM avec atteinte importante de la couche II
	Injection i.c.v. de mu p75-saporine (0,5 µL/côté à 0,6 µg/µL)	Pas de lésion donc pas d'effet possible, cependant les souris E3 ont une tendance à avoir un nombre de neurones ChAT-positifs moindres dans le SM/BDB et dans le NBM	SAP	Diminution du nombre de neurones ChAT-positifs dans SM/BDB (75 %) et NBM (25 %)
Actographie	Séance 1 : avant opération (J-2)	Pas de différence	Pas de différence entre les groupes	Pas de différence entre les groupes
	Séance 2 : après lésion NMDA et SAP (5 mois)	Pas de différence	SAP <u>hyperactif</u> mais différence non significative	Hyperactivité des SAP et NMDA+SAP par rapport aux PBS, et tendance à l'hyperactivité pour les NMDA
	Séance 3 : après lésion SAP (18 mois)	Pas de différence	Activité similaire à celle observée lors de la séance réalisée avant opération pour tous des groupes	Hyperactivité des NMDA+SAP par rapport aux PBS, cependant l'hyperactivité semble maintenue entre la séance après opération et post tests pour les NMDA, SAP et NMDA+SAP
Cages claire-obscur	5 min de passation	Pas de différence	Temps passé dans la cage claire Latence d'entrée Transitions	Pas de différence entre les groupes Pas de différence entre les groupes
	5 jours d'acquisition	Pas de différence, très bonnes performances d'acquisition pour les 3 groupes	Très faible pour les NMDA+SAP, modérément faible pour les NMDA et SAP Très élevée pour les NMDA+SAP	Pas de différence entre les groupes Tendance à un nombre moins élevé pour les NMDA+SAP
Labyrinthe de Barnes	Test de rétention à 11 jours	Pas de différence, cependant moins bonne précision de recherche pour les souris C57 PBS	NMDA SAP NMDA+SAP NMDA SAP NMDA+SAP	Pas de déficit Déficits importants Déficits importants Pas de déficit Déficits importants Déficits importants

Tableau 13 : Synthèse des résultats de l'expérience 2 : **Caractérisation des effets cognitifs et comportementaux de la lésion combinée du CE et des NCB chez les souris double transgéniques hAPP/hApoE.**

DISCUSSION GENERALE
DU CHAPITRE 2

DISCUSSION GENERALE DU CHAPITRE 2

Le deuxième objectif de cette thèse était l'étude de l'effet de la lésion combinée du CE et des NCB sur des souris double transgéniques portant à la fois le gène de l'hAPP et le gène hAPoE $\epsilon 4$ ou $\epsilon 3$.

I. Evaluation comportementale des souris non lésées

1. Une activité locomotrice diminuée chez les souris hAPP/hAPoE4

Lors des deux expériences réalisées avec des souris mâles "jeunes" (3 mois) et des souris "âgées" (15 mois) hAPP/hAPoE, nous avons pu montrer que les souris hAPP/hAPoE4 non lésées présentaient une réduction globale de l'activité locomotrice en comparaison aux souris hAPP/hAPoE3 et C57. Ces résultats sont en accord avec la seule étude de la littérature ayant évalué ces souris, réalisée par Kornecook et collaborateurs (2010), qui montre que les souris hAPP/hAPoE4 présentent une activité locomotrice réduite lors d'enregistrements réalisés dans leur cage de stabulation. De plus, cette différence d'activité évoquée dans cette étude ne se manifeste pas seulement en termes de distance parcourue dans leur cage mais également en termes du nombre d'entrées dans les branches du labyrinthe en Y. Cette différence observée entre les souris hAPP/hAPoE4 et hAPP/hAPoE3 ne peut être expliquée à partir de déficits sensorimoteurs qu'auraient pu avoir les souris hAPP/hAPoE4. En effet, il semblerait qu'aucune différence de performance n'ait été observée entre ces deux lignées dans le test du *rotarod*, ni aucun problème d'ataxie musculaire, ni autres phénotypes neurologiques anormaux (Kornecook et coll., 2010). Je tiens également à préciser que nous n'avons pas décelé de problèmes sensorimoteurs apparents lors de la passation des tests comportementaux. De manière très intéressante, cette différence d'activité locomotrice a déjà été rapportée chez des souris hAPoE4-TR, souris présentant la même construction

généétique que les nôtres pour l'hApoE (Bour et coll., 2008 ; Grootendorst et coll., 2005). Cependant, nos résultats vont à l'encontre de ce qui est observé chez des souris exprimant l'hApoE4 sous contrôle du promoteur neuronal NSE (Raber et coll., 1998). En effet, dans cette étude, les souris femelles NSE-ApoE4 présentent un niveau d'activité comparable à celui des souris NSE-hApoE3 dans un champ ouvert (*open field*). Aucune réelle explication ne peut être apportée, mis à part que l'ensemble de ces résultats observé chez des souris exprimant l'hApoE4 sous contrôle du promoteur murin ou chez des souris exprimant l'hApoE4 sous contrôle du promoteur neuronal NSE, suggère que la distribution physiologique de l'expression de l'hApoE chez ces souris transgéniques peut avoir un effet différent sur la manière dont l'isoforme de l'ApoE (E3 ou E4) peut moduler l'activité locomotrice.

Néanmoins, ce résultat observé dans nos deux expériences est très intéressant et laisse à penser que les souris hAPP/hApoE4 et hAPP/hApoE3 pourraient avoir une réactivité émotionnelle différente lorsqu'elles sont dans une situation nouvelle ou face à la nouveauté.

2. Mesure d'une forme d'anxiété des souris hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4 dans la tâche des boîtes claire-obscur

Dans la tâche des boîtes claire-obscur, nous avons montré à travers nos résultats que les trois lignées de souris PBS ne présentent aucune différence en termes de performances. Aucun signe d'anxiété n'est détecté chez nos souris hAPP/hApoE4 PBS, contrairement à ce qui est observé dans la littérature sur des souris exprimant l'ApoE4 de manière similaire aux nôtres (Siegel et coll., 2010). Ces auteurs montrent que des souris femelles âgées hApoE4-TR présentent un niveau d'anxiété élevé en comparaison des souris hApoE3 et hApoE2 dans deux tests d'anxiété : le labyrinthe en croix surélevée et le labyrinthe surélevé en forme de zéro. Les isoformes de l'ApoE peuvent moduler différemment les niveaux d'anxiété en agissant sur l'amygdale qui, elle-même, joue un rôle dans la régulation des comportements liés à l'anxiété (Amaral, 2002 ; Davidson, 2002 ; Davis, 1992). En effet, il est montré que des souris mâles âgées de 6/8 mois NSE-ApoE4, plus anxieuses en comparaison aux souris NSE-ApoE3, présentent un niveau de protéines associées aux microtubules (MAP-2) des dendrites des neurones dans l'amygdale fortement

diminué par rapport aux souris NSE-ApoE3 (Robertson et coll., 2005), entraînant une réduction du nombre de dendrites. Les différentes isoformes de l'ApoE peuvent donc affecter différemment la fonctionnalité de l'amygdale et son intégrité, ayant pour conséquence un effet différent sur les niveaux d'anxiété. Ainsi, dans notre étude, les souris hAPP/hAPoE4 PBS ne montrent aucun signe d'anxiété.

Une autre possibilité concernant la différence de résultats observée entre notre étude et celle de Siegel et collaborateurs (2010) pourrait être que les conditions expérimentales et les conditions d'élevage soient différentes, moins stressantes dans notre expérience. En effet, je tiens à rappeler que nos souris double transgéniques hAPP/hApoE sont nées au laboratoire et ont été laissées dans les mêmes conditions d'élevage jusqu'au début des tests. Cette méthode d'élevage a été choisie, car nous savons que pour cette lignée de souris transgéniques (hApoE-TR), ainsi que pour les précédentes (GFAP-ApoE ; NSE-ApoE), l'ApoE peut jouer un rôle critique sur les comportements et les fonctions cognitives des souris après un stress (hypothèse expliquée dans Grootendorst et coll., 2005 ; Bour et coll., 2008). Il se pourrait ainsi qu'en choisissant cette méthode d'élevage les souris se soient habituées aux conditions environnementales dès la naissance, limitant ainsi un stress important, ce qui pourrait expliquer l'absence d'effet de l'hApoE4 sur les niveaux d'anxiété. Cependant, des études comportementales et histologiques complémentaires seront nécessaires pour éprouver cette hypothèse.

3. Des souris femelles hAPP/hAPoE4 non lésées âgées de 15 mois aux performances en mémoire spatiale excellentes

3.1. Les souris hAPP/hAPoE4 femelles âgées performantes : un résultat contradictoire aux données de la littérature

Dans l'expérience 3 présentée dans ce chapitre, nous avons pu étudier les performances de navigation spatiale de souris femelles "âgées", double transgéniques hAPP/hApoE3, hAPP/hAPoE4 et non transgéniques C57BL/6J, non lésées, dans la tâche du labyrinthe de Barnes. Lors de cette tâche, les souris hAPP/hApoE3 PBS et C57 PBS apprennent parfaitement bien la tâche lors de la phase d'acquisition. Lors du test de rétention réalisé à 11 jours, seules les souris hAPP/hApoE3 PBS montrent une préférence

marquée pour le trou cible, les souris C57 PBS ayant des performances relativement altérées. De manière très intéressante, nous avons observé une absence totale de déficits chez les souris hAPP/hAPoE4 PBS concernant les capacités d'apprentissage et de mémoire spatiale dans cette tâche. Leurs performances sont tout à fait comparables à celles des souris hAPP/hApoE3 PBS, ce qui est contraire à ce que nous avons obtenu précédemment dans deux études réalisées au laboratoire sur des souris exprimant uniquement l'hApoE4 (Bour et coll., 2008 ; Grootendorst et coll., 2005). En effet, dans ces deux études, les auteurs montrent que des souris hApoE4 femelles jeunes, âgées de 4-5 mois et de 15-18 mois, présentent une altération des capacités de rétention et des perturbations modérées lors de l'apprentissage dans une tâche de mémoire spatiale (la piscine de Morris). De plus, des déficits de rétention similaires sont également observés chez des souris femelles jeunes et âgées qui expriment l'ApoE4 aussi bien dans les astrocytes (GFAP-ApoE4 ; Van Meer et coll., 2007) que dans les neurones (NSE-ApoE4 ; Raber et coll., 2000). Il semblerait donc qu'indépendamment du mode d'expression, sous contrôle des séquences de régulation murine (hApoE4-TR), expression localisée dans les astrocytes (GFAP-ApoE4) ou dans les neurones (NSE-ApoE4), l'ApoE4 joue un rôle délétère dans les processus de rétention en mémoire spatiale, ce qui n'est pas le cas dans les résultats obtenus dans l'expérience 3, où les souris hAPP/hAPoE4 présentent un niveau de performance très similaire à celui des souris hAPP/hAPoE3.

3.2 Les souris hAPP/hAPoE4 femelles âgées performantes : un effet bénéfique de l'hAPP ?

Classiquement, dans la littérature, il est plutôt rapporté un effet délétère du gène de l'hAPP, du fait de son implication dans l'apparition d'une pathologie amyloïde telle que dans la MA. Il est rapporté, dans des modèles murins de la MA portant le gène humain APP (hAPP-YAC), une accumulation anormale de protéines amyloïdes formant des plaques (Sarsoza et coll., 2009 ; Kimura et Ohno, 2009), une dégénérescence progressive, avec l'âge, des neurones cholinergiques et un dysfonctionnement cognitif (Haass et coll., 1998 ; Harman, 2006).

La comparaison de nos résultats avec ceux de Bour et collaborateurs (2008) et de Grootendorst et collaborateurs (2005) nous amène à penser que l'expression de l'hAPP a dû jouer un rôle dans les bonnes performances des souris hAPP/hApoE4. Contrairement à ce qui est rencontré dans la littérature, nous nous positionnons sur l'idée que l'hAPP a pu avoir un rôle bénéfique, et non délétère, sur les performances de nos souris transgéniques *via* la production de sAPP. En effet, il est montré que des souris porteuses de l'hAPP-YAC sur-exprimant l'hAPP présentent un ratio $\beta A_{42/40}$ élevé avec une présence d' βA_{42} importante dans l'hippocampe notamment (Sarsoza et coll., 2009 ; Kimura et Ohno, 2009 ; Seo et Isacson, 2010). Cependant, plusieurs études montrent que la stimulation des récepteurs cholinergiques muscariniques M1 diminue le ratio $A\beta_{42/40}$ et favorise la production de sAPP au niveau de l'hippocampe (Seo et Isacson, 2010 ; Seo et coll., 2002). Cette sécrétion de sAPP serait contrôlée par les voies cholinergiques provenant des NCB agissant probablement sur les récepteurs M1 et M3 de l'hippocampe (Lin et coll., 1999 ; Muller et coll., 1998). De plus, il est bien établi dans la littérature que les tâches hippocampo-dépendantes, telles que le labyrinthe de Barnes, entraînent une stimulation des neurones cholinergiques projetant à l'hippocampe lors de la phase d'acquisition de la tâche (Ragozzino et coll., 1996 ; Stancampiano et coll., 1999). Cette stimulation provoque une augmentation des niveaux de ChAT dans le milieu extracellulaire de l'hippocampe et une augmentation des niveaux d'ACh hippocampique (Chang et Gold, 2003 ; McIntyre et coll 2002, 2003 ; Stephani et gold 2001 ; pour revue Parent et Baxter, 2004). Il est donc possible que la stimulation des neurones cholinergiques lors dans la tâche du labyrinthe de Barnes ait favorisé la production de sAPP chez nos souris double transgéniques et amélioré leurs performances notamment pendant l'acquisition et la phase de rétention. En plus, dans nos résultats, il est très intéressant de noter que les souris C57BL/6J, qui n'expriment pas l'hAPP, présentent des difficultés dans le test de rétention, alors qu'aussi bien les souris hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4 montrent de très bonnes performances. Dans sa thèse, A. Bour a montré que l'injection de sAPP humain pouvait contrer les effets délétères de l'ApoE4 sur les performances de rétention de souris femelles âgées hApoE4-TR dans la tâche de la piscine de Morris. L'effet du sAPP est connu dans la littérature pour jouer un rôle dans la plasticité synaptique et notamment dans l'hippocampe, modulant ainsi la potentialisation à long terme (Ishida et coll., 1997), mais également dans les processus de consolidation précoce et à long terme (Meziane et coll., 1998 ; Bohbot et coll., 1996 : thèse d'Alexandra Bour soutenue en 2004). Il se pourrait donc

qu'il ait joué un rôle bénéfique dans l'apprentissage et la mémorisation spatiale dans notre étude, notamment chez les souris hAPP/hAPoE4. Cependant, des études complémentaires de dosage du sAPP seraient nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

II. Effet des lésions du CE, des NCB seules ou combinées sur les performances comportementales des souris hAPP/hApoE

1. Effet étrange de la lésion des NCB chez les souris hAPP/hApoE3

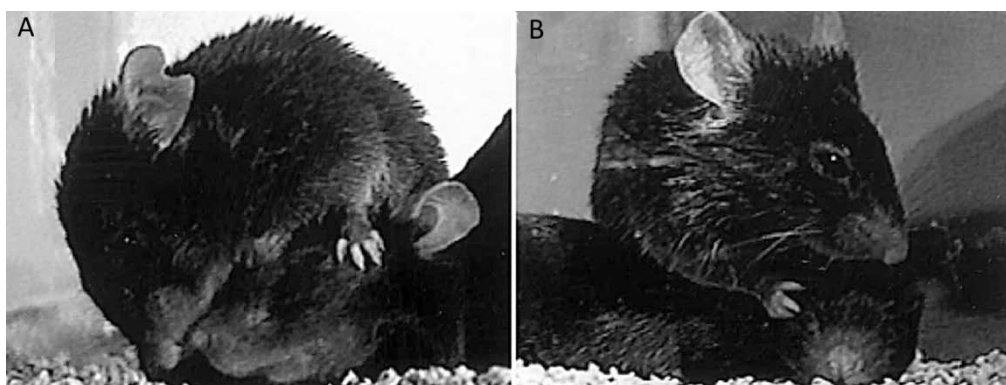
Comme nous l'avons signalé dans les résultats, nous nous sommes heurtés à un problème lors de la période de vieillissement de 10 mois après opération. En effet, nous avons observé une mortalité très importante des souris hAPP/hApoE3 SAP et NMDA+SAP. Cette mortalité était vraisemblablement liée à un comportement d'épilation (*barbering*) extrême ayant provoqué la mort de la souris dans sa cage ou par euthanasie pour des raisons éthiques. Toutes présentaient des lésions cutanées importantes pouvant être localisées sur l'abdomen, sur le dos et/ou même sur le museau.

Ce comportement de *barbering* est classique chez les souris C57BL/6J. Il a généralement été relié à la mise en place de liens sociaux entre les souris lorsque celles-ci sont regroupées à plusieurs par cage. Le *barbering* serait alors plutôt exécuté par la souris dominante (que nous appelons "l'épileuse") qui, pour marquer sa dominance, épile les vibrisses ou une partie du corps de ses congénères (*cf* figure 52), sans entraîner de lésion cutanée (*cf* figure 53). Néanmoins, pour Garner et collaborateurs (2004), ce comportement n'est pas lié à la relation de dominance, mais serait un comportement anormal et compulsif, s'apparentant à la trichotillomanie chez l'Homme, et qui se transmet d'une souris à l'autre notamment en fonction de facteurs environnementaux. Ce qu'il est intéressant de noter, c'est que ce trouble peut apparaître chez l'Homme à la suite d'un stress important. Or, nous avons observé ce comportement de façon excessive chez nos souris hAPP/hApoE3 SAP et NMDA+SAP, même lorsqu'elles étaient isolées dans leur cage d'élevage, ce qui signifie qu'elles pratiquaient ce comportement sur elles-mêmes, ce qui favorise l'hypothèse d'un trouble compulsif. Bour et collaborateurs (2008) ont observé un comportement similaire à nos souris mais de manière beaucoup moins extrême. Dans leur étude, ils ont dû exclure une souris hApoE3-TR et deux souris hApoE-KO qui montraient également des lésions cutanées probablement très prononcées. Les souris hApoE3 étant relativement susceptibles à

l'hypercholestérolémie et à l'athérosclérose d'après Sullivan et collaborateurs (1997), il se pourrait, comme souligné dans leur article, que ce comportement soit lié à du *xanthomas*²² extrême.

Cependant, nous n'avons observé ce comportement de *barbering* extrême que chez les souris hAPP/hApoE3 SAP et NMDA+SAP. Il semblerait donc que la lésion cholinergique ait pu agir sur les processus touchant à la régulation du cholestérol. Une étude de Wood et collaborateurs (1982) souligne notamment que la consommation de choline ou de lécithine prévient l'hypercholestérolémie et l'athérosclérose. Il se pourrait donc, à l'inverse, que la diminution des taux de choline favoriserait ces troubles vasculaires, surtout chez des souris présentant une susceptibilité particulière, comme les souris hApoE3 (Sullivan et coll., 1997).

Il est proposé également dans la littérature que le *barbering* pourrait apparaître suite à un stress important ou à une forte anxiété (Kalueff et coll., 2006), ce qui le rapproche du trouble de trichotillomanie évoqué chez l'Homme. Ainsi, une dernière possibilité serait que le *barbering* extrême observé chez nos souris hAPP/hApoE3 ait été provoqué par le développement d'un stress induit par la lésion des neurones cholinergiques. Notons qu'il est très possible que ces deux facteurs (hypercholestérolémie/xanthomas et stress de la lésion) interagissent en potentialisant leurs effets sur le *barbering* pour conduire à de graves lésions cutanées.



²² Le xanthomas se caractérise par l'apparition de nodules jaunes présents sous la peau au niveau des tendons, des coudes, des articulations, des genoux, des mains, des pieds et au niveau des hanches. Ces nodules sont liés à l'accumulation de cellules graisseuses (James et coll., 2006) et peuvent être attribués à plusieurs causes, comme l'hyperlipidémie notamment.

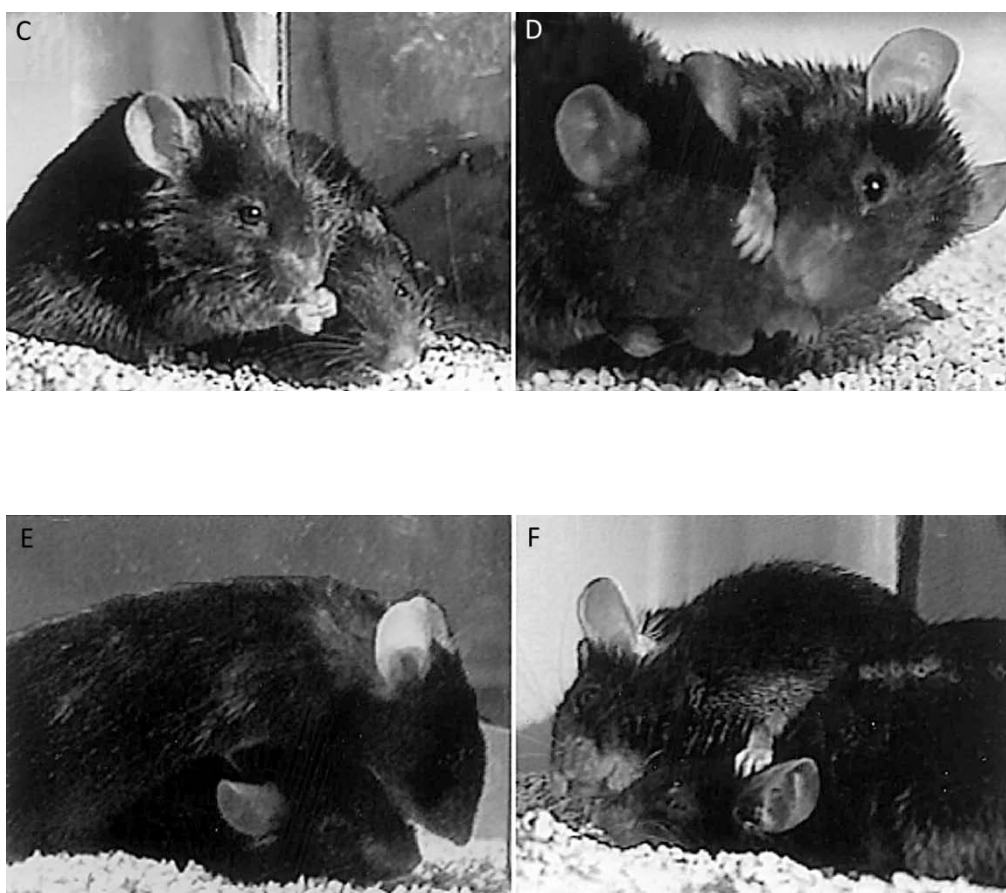


Figure 52 : Figure illustrant les postures de l'épileuse (Sarna et coll., 2000). (A) La souris épileuse est située sur le dessus de l'animal, la maintient au sol avec la patte de gauche pour agripper une vibrisse avec ses incisives. (B) La souris épileuse est située sur sa subordonnée et recherche des poils à arracher autour des yeux. (C) La souris épileuse est en train de ronger les vibrisses de sa subordonnée. (D) La souris épileuse est en train de tenir le museau de sa congénère. (E) La souris épileuse est située sur sa congénère et est en train de lui arracher une vibrisse. (F) La souris épileuse arrache une vibrisse en plaçant tout son corps et sa patte de gauche sur sa subordonnée. Il est à noter que, sur chaque image, la souris dominée adopte une posture sans résistance, les oreilles vers l'arrière, les yeux partiellement fermés.



Figure 53 : Figure représentant des exemples de souris épileptiques. Ces images illustrent des cas de souris C57BL/6J-129S1 subordonnées (Kalueff et coll., 2006).

2. Effet des lésions du CE et des NCB sur l'anxiété : des souris hAPP/hAPoE3 plus sensibles à la lésion combinée?

Dans cette étude, nous montrons que la lésion du CE ou des NCB seule, ainsi que la combinaison des deux lésions chez les souris hAPP/hAPoE4 ne modifie en aucune manière les performances dans le test des cages claire-obscur. Il semblerait donc que ces lésions ne modifient pas le niveau d'anxiété des souris hAPP/hAPoE4, contrairement aux souris hAPP/hAPoE3. En effet, notre étude semble montrer un effet progressif des lésions seules à la combinaison des lésions sur les performances dans le test d'anxiété des cages claire-obscur chez les souris hAPP/hAPoE3. Les souris hAPoE3 PBS ne montrent aucun signe d'anxiété à la base alors que la lésion combinée du CE et des NCB semble avoir un effet anxiogène, bien que non significatif, chez ces souris. L'absence de significativité est due à une grande variabilité de données, ce qui suggère que cet effet anxiogène ne se manifeste pas chez tous les animaux. Ceci ne peut être lié à des facteurs génétiques puisque ces souris sont sur un fond génétique consanguin et donc, *a priori*, génétiquement identiques les unes aux autres. Il est possible que des facteurs intrinsèques spécifiques à chaque animal, liés au vécu propre de l'animal par exemple, ait influencé l'apparition ou non de cet effet anxiogène de la lésion combinée. Comme des troubles de l'humeur ont également été décrits dans la symptomatologie des patients Alzheimer, il serait intéressant d'approfondir ce point en augmentant les effectifs pour analyser plus finement l'impact de la lésion.

Malheureusement, éthiquement, il paraît difficile de refaire cette expérience sans diminuer la dose de mu p75-saporine ou réduire le délai post-opératoire puisque une grande proportion des souris hAPP/ApoE3 sont mortes les unes après les autres tout au long de la période de vieillissement de 12 mois.

Comme nous l'avons évoqué plus haut, l'augmentation du *barbering* menant à un stade de graves lésions cutanées a été sélectivement montrée chez les souris hAPP/ApoE3 et pourrait être liée à cette augmentation, sélective aussi, du niveau d'anxiété chez cette lignée. En fait, nous avons peut-être là un modèle très intéressant de la trichotillomanie chez l'Homme. Il est intéressant d'apprendre que cette pathologie comportementale est souvent soignée avec des antidépresseurs, notamment la sertraline, qui sont des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine. Là où notre travail pourrait apporter un modèle intéressant, c'est que Dufour et collaborateurs (2010) ont montré que l'augmentation des niveaux cérébraux de sérotonine augmente le *barbering* chez la Souris jusqu'à atteindre le stade de dermatose ulcéreuse comme chez nos souris. Il serait donc intéressant de vérifier si la lésion cholinergique n'induit pas une augmentation des taux de sérotonine spécifiquement chez les souris hAPP/apoE3, par rapport aux souris hAPP apoE4. Il faut noter qu'une expérience récente nous a permis de constater le même effet des lésions cholinergiques chez des femelles C57BL/6J bénéficiant également d'une longue période de vieillissement. Les souris hAPP/apoE3 réagissent donc comme des souris normales, alors que les souris hAPP/ApoE4 semblent résistantes à cet effet secondaire des lésions cholinergiques.

3. Effet des lésions du CE et des NCB sur l'activité locomotrice : une hyperactivité post-lésion persistante jusqu'à 18 mois pour les souris hAPP/hApoE4

A l'aide des résultats observés dans les expériences 1 et 2, il semble bien établi que la lésion des NCB provoque une hyperactivité transitoire chez la souris (Moreau et coll., 2008). Dans cette expérience 3, nous n'avons pas observé de différence significative concernant l'activité locomotrice entre la séance réalisée avant opération et celle réalisée 5 mois après, chez les souris hAPP/hApoE3 ayant reçu une lésion des NCB. Nous n'observons qu'une tendance légère et transitoire des souris hAPP/hApoE3 SAP à être plus actives. A ma

connaissance, dans la littérature, aucune étude ne traite de l'impact de la lésion des NCB chez des souris exprimant l'hApoE. Cependant, le résultat observé chez les souris hAPP/hApoE3 SAP et NMDA+SAP n'est pas très surprenant. En effet, dans cette étude, la séance d'actographie est réalisée 5 mois après opération. Or, si l'on se réfère aux résultats obtenus dans les expériences 1 et 2, réalisées sur des souris non transgéniques C57BL/6J, nous avons montré que l'hyperactivité liée à la lésion des NCB était diminuée à 49 jours et tout à fait abolie 100 jours après lésion.

Cependant, de manière très intéressante, chez les souris hAPP/hApoE4, la lésion combinée du CE et des NCB provoque une hyperactivité nocturne et diurne importante qui persiste jusqu'à 150 jours après l'opération lors de la séance réalisée après la passation des tests. Par contre, la lésion seule du CE ou des NCB ne provoque qu'une tendance à l'hyperactivité lors de la même séance, et seulement en phase nocturne. Nous constatons donc une action synergique des lésions du CE et des NCB chez les souris hAPP/hApoE4 sur l'activité locomotrice.

Comme cela a déjà été développé dans la discussion du chapitre I, nous avons expliqué que le rétablissement d'une activité normale à partir de 100 jours après lésion pouvait être due à la mise en place de phénomènes de compensation liés à des processus de plasticité cérébrale. Par ailleurs, il est très intéressant de noter que nous n'avons observé aucune modification de l'activité locomotrice après lésion du CE, chez des souris C57BL/6J (Expérience 2). De plus, dans cette expérience 3, nous n'observons également aucune modification de l'activité locomotrice suite à la lésion du CE sauf chez les souris hAPP/hApoE4. Ainsi, la différence observée quant à l'activité des souris hAPP/hApoE3 et hAPP/hApoE4 5 mois et 18 mois après lésion suggère fortement un déficit de ces phénomènes de compensation spécifiquement chez nos souris hAPP/hApoE4 lésées. Dans la littérature, il est connu que les souris exprimant l'hApoE4 présentent des déficits de plasticité synaptique et que l'ApoE4, contrairement à l'ApoE3, joue un rôle négatif dans la croissance neuritique, bloquant ainsi les mécanismes de réparation et de plasticité neuronale (Nathan et coll., 1994 ; Bellosta et coll., 1995). L'expression de l'ApoE4 pourrait donc être néfaste à la mise en place de mécanismes de compensation. Deux études réalisées par White et collaborateurs (2001) et Blain et collaborateurs (2006) vont dans ce sens. Ils montrent tous deux que des souris exprimant l'ApoE4 sous contrôle du promoteur humain

(White et coll., 2001) ou du promoteur murin (Blain et coll., 2006), présentent des déficits de plasticité cérébrale après la lésion du CE. Ces déficits se manifestent par un retard important de la réparation neuronale et du bourgeonnement synaptique, causé par un dysfonctionnement des astrocytes réactifs présents normalement après une lésion.

4. Effet des lésions du CE et des NCB sur la mémoire spatiale

4.1. Pas d'effet de la lésion du CE chez les souris hAPP/hApoE4

Dans la tâche du labyrinthe de Barnes, la lésion du CE ne perturbe pas les performances d'acquisition et de rétention des souris hAPP/hApoE4, tout comme pour les souris hAPP/hApoE3. Les capacités d'apprentissage et de mémoire spatiale semblent donc être préservées après lésion du CE dans ces deux lignées. Comme nous l'avons montré et discuté précédemment, ces résultats sont en accord avec ce qui est observé dans la littérature chez des souris non transgéniques et chez le Rat (Cho et coll., 1994, 1995 ; Pouzet et coll., 1999 ; Traissard et coll., 2007 ; Sipos et coll., 2007).

Cependant, le résultat observé chez nos souris hAPP/hAPOE4 est très intéressant. En effet, il semblerait, au vu des résultats histologiques, que la lésion du CE soit plus étendue et plus importante que chez les souris hAPP/hApoE3. Or, les performances d'apprentissage et de mémoire sont similaires pour les deux lignées. De plus, la lésion du CE chez les souris hAPP/hApoE4 semble avoir un effet, certes modéré, sur l'activité locomotrice, ce qui n'est pas le cas pour les souris hAPP/hApoE3 et C57BL/6J (*cf publication 2*). Cette observation laisse à penser que les souris hAPP/hApoE4 sont plus sensibles à la neurotoxicité du NMDA, même si la lésion ainsi induite ne semble pas provoquer une perturbation marquée des processus impliqués dans la navigation et la mémoire spatiale. Il est possible que la différence d'étendue des lésions, qui ne sont encore que partielles dans les deux lignées, ne soit pas suffisamment importante pour affecter de façon différente les performances de navigation.

De plus, comme il a été discuté précédemment, il est possible que les souris portant une lésion du CE, transgéniques ou non, utilisent des stratégies alternatives pour pallier à leur déficit de mémoire spatiale et réussir dans la tâche du labyrinthe de Barnes.

4.2. Un effet massif de la lésion des NCB sur les performances d'apprentissage et de rétention des souris hAPP/hApoE4

Dans l'expérience 3, nous avons pu observer que les souris hAPP/hApoE4 SAP et NMDA+SAP ont des déficits de performances d'acquisition similaires pendant les 5 jours d'acquisition. Elles présentent toutes un retard marqué d'apprentissage, se manifestant par une latence élevée pour rejoindre le trou cible lors des 2 premiers jours, et elles atteignent difficilement le même niveau de performance que les souris témoins au 5^{ème} jour d'acquisition. Ce déficit d'apprentissage est confirmé dans le test de rétention réalisé à un délai de 11 jours, durant lequel les souris hAPP/hApoE4 SAP et NMDA ont des performances de rétention dramatiquement altérées. A l'opposé, les souris hAPP/hApoE4 NMDA présentent un niveau de performance similaire aux souris PBS, ce qui laisse à penser que le retard d'apprentissage et le déficit de rétention observé chez les souris hAPP/hApoE4 SAP et NMDA+SAP est lié principalement à la lésion des NCB.

Au vu des résultats obtenus dans la tâche des cages claire-obscur, nous pouvons écarter l'hypothèse d'un retard d'apprentissage dû à un problème d'anxiété puisque les souris hAPP/ApoE4 ne sont pas particulièrement anxieuses. Par contre, comme cela est évoqué dans la discussion du chapitre I, nous ne pouvons exclure un dysfonctionnement des processus attentionnels consécutifs à la lésion des NCB, notamment du NBM (Lehmann et coll., 2003 ; Baxter et coll., 1995). De plus, nous ne pouvons également écarter pour le moment un effet possible de la lésion sur les neurones GABAergiques du SM et des cellules de Purkinje du cervelet. Dans les expériences précédentes sur les souris C57BL/6J, nous n'avions pas mis en évidence d'effet de la mu p75-saporine sur ces populations des neurones dans la même gamme de doses que celle utilisée ici. Néanmoins, il sera nécessaire de vérifier ce point. Le temps qui nous était imparti ne nous a pas permis d'effectuer les vérifications histologiques, mais les marquages immunohistochimiques de ces deux populations de neurones seront effectués après la thèse.

Au vu des résultats obtenus, nous pouvons aussi poser l'hypothèse que la perte des neurones cholinergiques a entraîné une modification importante du traitement hippocampique des informations spatiales chez ces hAPP/ApoE4. En effet, comme nous l'avons discuté précédemment, la lésion sélective des NCB peut entraîner une perturbation du fonctionnement de l'hippocampe aussi bien en agissant sur le fonctionnement des cellules de lieu (Ikonen et coll., 2002 ; Leutgeb et coll., 1999), sur la modulation du rythme

thêta hippocampique (pour revue Colom et coll., 2006), que sur les processus de neurogénèse (Ho et coll., 2009), l'ensemble de ces processus pouvant être impliqué dans les processus de mémoire spatiale (Poucet et coll., 2010). Cependant, l'effet obtenu chez les souris hAPP/hApoE4 semble nettement plus drastique que chez les souris hAPP/hApoE3 (SAP seule). En effet, de façon générale, l'effet de la lésion spécifique des NCB chez des rongeurs non génétiquement modifiés reste relativement modéré (Dornan et coll., 1997 ; Moreau et coll., 2008 ; Traissard et coll., 2007). Nos résultats suggèrent donc que l'effet de la lésion des NCB pourrait être lié à une interaction délétère avec l'ApoE4 que l'on ne trouve donc que chez nos souris porteuses de l'hAPP/hApoE4.

Nous avons discuté ci-dessus d'un effet compensatoire probable de l'APP humaine, sous forme de sAPP, sur les performances cognitives des souris hAPP/hApoE4 témoins. En effet, la stimulation des récepteurs cholinergiques M1 ou M3 pourrait favoriser la production de sAPP dont on sait qu'elle est bénéfique pour les processus de rétention à court et à long termes. Par ailleurs, il se pourrait que la perte d'apport d'ACh au niveau de l'hippocampe consécutive à la lésion des NCB ait aboli la production de sAPP chez nos souris. De plus, cette lésion étant réalisée chez des souris qui présentent des déficits de plasticité cérébrale (Blain et coll., 2006), la possibilité de restaurer du sAPP par des mécanismes de compensation, tels que des phénomènes de bourgeonnement cholinergique des projections résiduelles, devient très faible. Un tel déficit de plasticité pourrait expliquer la différence de performance observée entre les souris hAPP/hApoE4 SAP et hAPP/hApoE3 SAP. Comme évoqué précédemment, il est également important de rappeler qu'en temps normal, les souris hAPP-YAC seules présentent un ratio $\beta A_{42/40}$ élevé et un niveau βA_{42} important dans l'hippocampe et le cortex préfrontal (Seo et Isacson, 2010). De plus, il semblerait que la perturbation du système cholinergique puisse favoriser le développement d'une pathologie amyloïde (Capsoni et coll., 2000 ; Beach et al, 2008). Ces observations nous amènent donc à poser une hypothèse selon laquelle la lésion des NCB, chez des souris double transgéniques porteuses de l'hAPP et de l'hApoE4, cette dernière étant connue pour favoriser l'accumulation d'A β et jouant un rôle négatif dans sa clairance, aurait pu entraîner le développement d'une pathologie amyloïde délétère, favorisant l'apparition de déficits cognitifs importants, notamment en mémoire spatiale. Cependant, des études histologiques et immunologiques seront nécessaires pour clarifier ce point.

Une dernière possibilité, quant à l'effet important des lésions des NCB sur les capacités de mémoire spatiale chez les souris hAPP/hApoE4, viendrait du rôle des interneurones GABAergiques hippocampiques dans la mémoire spatiale. En effet, il a été montré que les souris hApoE4-TR exprimant l'ApoE4 sous contrôle du promoteur murin présentent une perte des interneurones GABAergiques du hile de l'hippocampe de manière âge-dépendante : cette perte est corrélée positivement à l'apparition de déficits d'apprentissage et de mémoire spatiale (Andrews-Zwilling et coll., 2010). Or, des essais histologiques très récents, menés au laboratoire pendant la rédaction de ma thèse, ont révélé que seules les souris ayant reçu une lésion des NCB présentent une perte importante de neurones, vraisemblablement des interneurones GABAergiques, dans le hile du gyrus denté de l'hippocampe (données en cours de confirmation). Cette observation, si préliminaire soit-elle, pourrait expliquer les déficits d'apprentissage et de mémoire spatiale observés chez nos souris hAPP/hApoE4, mais il reste néanmoins tout un travail immunohistologique à réaliser pour confirmer cette hypothèse.

4.3. Des performances d'apprentissage altérées chez les souris hAPP/hAPoE3 : un effet synergique de la lésion du CE et des NCB ?

L'effet des lésions sur les capacités d'apprentissage semble être différent pour les souris hAPP/hAPoE3 comparativement aux souris hAPP/apoE4. En effet, chez les souris hAPP/ApoE3, seule la lésion combinée du CE et des NCB altère de façon massive les performances d'acquisition et de rétention à un délai de 11 jours dans la tâche du labyrinthe de Barnes, alors que chaque lésion seule ne semble pas les perturber. Il semblerait donc que la lésion combinée du CE et des NCB chez nos souris hAPP/hApoE3 ait un effet synergique délétère sur les capacités de navigation spatiale, contrairement aux souris hAPP/hAPoE4 pour lesquelles, si effet synergique il y a, celui-ci se trouve masqué par un fort effet de la lésion des NCB seule.

Nos résultats obtenus pour les souris hAPP/hApoE3 se trouvent être globalement comparables à ce que nous avons observé dans l'étude menée chez les souris C57BL/6J (**Publication 2**) et dans l'étude réalisée chez le Rat par Traissard et collaborateurs (2007). Cependant, il semblerait que les déficits observés après la lésion combinée du CE et des NCB

chez ces souris hAPP/hApoE3 soient plus importants que ceux observés chez les souris C57BL/6J (**Publication 2**). De ce fait, en plus des effets de la déafférentation de l'hippocampe sur son fonctionnement propre, ou l'impact des lésions sur l'altération d'autres processus cognitifs (*cf* discussion du chapitre I), il nous paraît très probable que l'âge des souris (hAPP/hApoE3 : 17 mois vs C57BL/6J : 3 mois) et leur genre (femelles hAPP/hApoE3 vs mâles C57BL/6J) aient pu accentuer l'impact de la lésion combinée.

5. L'ApoE4 comme facteur de risque chez l'Homme comme chez la Souris transgénique ?

Il est maintenant établi dans la littérature scientifique, suite à des observations épidémiologiques, qu'un grand nombre de gènes participe au risque génétique de développer une MA. Le gène de l'ApoE ϵ 4 reste encore le plus important dans ce domaine et a également été identifié comme un facteur de risque génétique d'apparition de déficits cognitifs chez des individus âgés non-déments (Corder et coll., 1993 ; Strittmater et coll., 1993a ; Farrer et coll., 1997 ; Caseli et coll., 1999 ; Mayeux et coll., 2001 ; Savitz et coll., 2006 ; Bertram et coll., 2009). En effet, comparé à des individus ne possédant pas l'allèle ϵ 4, l'augmentation du risque de développer une MA est 2 à 3 fois plus forte chez des individus porteurs d'un allèle ϵ 4 et 10 fois plus forte chez individus porteurs des 2 allèles (Bertram et coll., 2009 ; Roses, 1997). Cependant, dans certains groupes ethniques, l'allèle ϵ 4 semble induire un risque bien plus faible que celui décrit ci-dessus (Farrer et coll., 1997 ; Kalaria et coll., 2008 ; Mayeux et coll., 2003 ; Tang et coll., 1998). De plus, l'implication de l'ApoE dans le déclin cognitif observé tout au long de la maladie est plus conflictuelle. Certaines études suggèrent que les effets de ϵ 4 apparaissent dans les premiers stades de la MA et plus faiblement à un stade tardif, tandis que d'autres montrent l'inverse (Cosentino et coll., 2008 ; Juva et coll., 2000). Ainsi, la variabilité des données de la littérature sur certaines populations particulières ou sur certains stades particuliers de la MA suggèrent que les effets négatifs de l'ApoE4 pourraient être liés, au moins en partie, à des interactions particulières avec d'autres facteurs de risque, qu'ils soient génétiques ou environnementaux, tels que des conditions de vie spécifiques.

Les résultats obtenus dans ce chapitre chez des souris double transgéniques, en comparaison à la littérature observée chez des souris porteuses de $\epsilon 4$, vont également dans le sens d'une ApoE4 facteur de risque et non actrice principale du déclenchement de déficits cognitifs. En effet, cette controverse observée sur l'ensemble des modèles transgéniques murin porteurs de $\epsilon 4$, nous laisse vraiment penser que celle-ci a des effets délétères uniquement lorsqu'elle est combinée à d'autres facteurs de risques tels que des facteurs environnementaux (souris déficitaires dans des conditions stressantes vs non stressantes), le genre (souris femelles déficitaires vs mâles), l'apparition de traumatismes crâniens (effet massif des lésions des NCB chez les souris hAPP/hApoE4) ou même l'âge (effet bénéfiques paradoxaux chez les jeunes souris hAPP/hApoE4, effet plus marqué chez les individus âgés). Notre modèle de souris hAPP/hApoE4 combinée à l'approche lésionnelle s'inscrirait donc comme un bon modèle d'étude de l'influence de l'ApoE4 sur le développement des dégénérescences, des processus de compensation neuronales et des déficits cognitifs observés dans la MA et permettrait, en particulier, d'étudier son interaction avec d'autres facteurs de risque.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de mon travail de thèse a été d'appliquer une lésion combinée de deux structures clés touchées dans la MA (le CE et les NCB) chez des souris non transgéniques et transgéniques afin d'évaluer l'ampleur et la spécificité des déficits cognitifs associés à la double lésion.

Le premier objectif de ma thèse était d'étudier l'effet de la lésion combinée du CE et des NCB chez des souris non transgéniques dans l'optique de la modélisation des déficits cognitifs de la MA. Dans un premier temps, nous avons mis au point et validé, pour la première fois, l'utilisation de la nouvelle version de l'immunotoxine mu p75-saporine chez des souris C57BL/6J en confrontant nos résultats aux deux études princeps réalisées avec une ancienne version de mu p75-saporine (Berger-Sweeney et coll., 2001 ; Hunter et coll., 2004). Nous avons ainsi montré que la lésion des NCB seule provoque une perte massive des NCB chez des souris C57BL/6J et induit des déficits modérés en mémoire spatiale tel qu'il est décrit dans la littérature. Nous avons ainsi pu conclure sur l'intérêt de l'utilisation de la nouvelle version de mu p75-saporine comme outil d'étude de l'impact de la lésion des NCB sur les performances cognitives chez la souris.

Ce travail nous a amené à poursuivre notre premier objectif de thèse par l'élaboration du premier modèle d'étude des déficits cognitifs de la MA par une approche de lésion combinée du CE et des NCB chez une souris non transgénique C57BL/6J. Nous avons montré, dans un premier temps, que la lésion combinée du CE et des NCB perturbe massivement les performances d'apprentissage et de mémoire spatiale dans deux tâches de navigation spatiale, alors que chaque lésion seule n'induit que des déficits modérés. Nous avons également montré que la lésion des NCB seule et la lésion combinée du CE et des NCB altère dramatiquement les capacités de reconnaissance d'objets. Ce travail rejoint et vient

compléter les travaux de Traissard et collaborateurs (2007), et permet de postuler que l'aggravation des déficits de désorientation spatiale observés chez les patients Alzheimer peut être liée à la sommation de la dégénérescence du CE et des NCB. Notre modèle de lésion combinée se pose donc comme un bon modèle d'étude des bases neuroanatomiques de la progression des déficits cognitifs de la MA selon leur nature (exemple : navigation spatiale vs reconnaissance d'objet).

Cependant, ce modèle pose des questions fondamentales concernant l'impact de nos lésions combinées sur la fonctionnalité de l'hippocampe et son intégrité. En effet, la désafférentation des principales voies de projections à l'hippocampe pourrait modifier son fonctionnement propre de par une modification du fonctionnement normal des cellules de lieu, une perturbation possible du rythme thêta hippocampique, tout comme une altération probable des processus de neurogénèse et de plasticité. L'atteinte de ces phénomènes ayant pu jouer un rôle dans les déficits observés, il serait nécessaire d'explorer ces pistes dans des expériences futures.

De plus, de par l'approche ponctuelle de nos lésions combinées, nous avons posé notre modèle comme pouvant reproduire des déficits cognitifs assimilés à ceux observés à un stade très avancé de MA. Or, il est connu qu'à ce stage d'évolution, d'autres formes de mémoire peuvent être altérées dans la maladie (mémoire de travail, mémoire sémantique pouvant aller, si le stade est très avancé, à l'atteinte de la mémoire procédurale). Cependant, dans notre travail, nous avons choisi de nous focaliser uniquement sur les troubles de la désorientation spatiale et de la mémoire de reconnaissance. C'est pourquoi, afin de compléter notre modèle de déficits cognitifs de la MA, il serait très intéressant d'étudier les effets de la lésion combinée du CE et des NCB sur ces autres altérations cognitives pouvant être observées à un stade plus ou moins avancé de la maladie. En d'autres termes, cela nous permettrait d'évaluer dans quelle mesure ce modèle relativement simpliste (seulement deux lésions au regard des nombreuses dégénérescences caractérisant la maladie) peut prétendre rendre compte de l'évolution des atteintes cognitives dans la MA. Il serait aussi intéressant de faire varier la taille des lésions (particulièrement du CE), voire intégrer un aspect progressif dans l'installation des lésions, pour mimer la progression de la pathologie de façon plus fine que les deux lésions effectuées ponctuellement dans ce travail.

Le deuxième objectif de cette thèse était l'étude de l'effet de la lésion combinée du CE et des NCB sur des souris double transgéniques portant à la fois le gène de l'hAPP et le gène $\epsilon 4$ ou $\epsilon 3$ de l'ApoE humaine. Dans cette étude, nous avons pu montrer que les souris non lésées hAPP/hApoE4 ne présentaient aucun déficit de mémoire spatiale dans la tâche du labyrinthe de Barnes. Par contre, l'application de l'approche lésionnelle sur ces souris double transgéniques hAPP/hAPoE nous a permis de montrer que la lésion des NCB perturbe massivement les capacités d'apprentissage et de mémoire spatiale et induit une hyperactivité persistante jusqu'à 18 mois spécifiquement chez les souris hAPP/hApoE4. Ceci suggère que la lésion des NCB seule est suffisante pour provoquer des déficits massifs sur un modèle murin du principal facteur de risque génétique de la MA. Nous avons également montré que la lésion combinée du CE et des NCB, tout comme chez les souris non transgéniques et chez le Rat, a un impact massif sur les processus de mémoire spatiale des deux lignées de souris double transgéniques.

Suite à cette expérience, nous avons pu élaborer plusieurs hypothèses. Premièrement, nous supposons que la présence de l'hAPP a pu jouer un rôle conséquent aussi bien dans l'absence de déficits observée chez les souris hAPP/hAPoE4 PBS, que sur les effets liés à la lésion des NCB. D'après la littérature, il semblerait également que la présence d'ApoE4 puisse induire des modifications morphologiques au niveau de l'hippocampe (pertes de neurones GABAergiques) et jouer un rôle négatif dans les processus de plasticité et de mécanismes de réparation neuronale. C'est pourquoi, il nous faudrait vérifier ces hypothèses par un travail histologique approfondi visant à mettre en évidence les déficits de plasticité trouvés chez Blain et collaborateurs (2006) et White et collaborateurs (2001), et de vérifier l'intégrité hippocampique.

De plus, il est également important d'ajouter que l'intérêt principal de ce modèle de souris double transgéniques, porteuses à la fois de l'hAPP et de l'ApoE $\epsilon 4$, réside en l'étude de l'interaction entre l'hAPP et l'hAPoE4, deux protéines clés de la MA, sur le plan comportemental ainsi que d'un point de vue neurobiologique et moléculaire. Il serait donc très intéressant d'étudier l'impact de chaque lésion sur le métabolisme de l'APP *via* un dosage des différents dérivés de l'APP (sAPP, d'A β 40 ou d'A β 42, par exemple) dans différentes régions d'intérêt comme l'hippocampe ou encore rechercher la présence de

dépôts ou plaques amyloïdes, afin de vérifier si nos lésions n'ont pas déclenché une pathologie amyloïde.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

-A-

- Aggleton, J.P. and Brown, M.W. 1999. Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. *Behav. Brain Sci.* 22: 425-444.
- Aggleton, J.P., Vann, S.D., Oswald, C.J., and Good, M. 2000. Identifying cortical inputs to the rat hippocampus that subserve allocentric spatial processes: a simple problem with a complex answer. *Hippocampus* 10: 466-474.
- Aleshkov, S., Abraham, C.R., and Zannis, V.I. 1997. Interaction of nascent ApoE2, ApoE3, and ApoE4 isoforms expressed in mammalian cells with amyloid peptide beta (1-40). Relevance to Alzheimer's disease. *Biochemistry* 36: 10571-10580.
- Alzheimer, A., Stelzmann, R.A., Schnitzlein, H.N., and Murtagh, F.R. 1995. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin. Anat.* 8: 429-431.
- Amaral, D.G. 2002. The primate amygdala and the neurobiology of social behavior: implications for understanding social anxiety. *Biol. Psychiatry* 51: 11-17.
- Ammassari-Teule, M., Hoffmann, H.J., and Rossi-Arnaud, C. 1993. Learning in inbred mice: strain-specific abilities across three radial maze problems. *Behav. Genet.* 23: 405-412.
- Andrews-Zwilling, Y., Bien-Ly, N., Xu, Q., Li, G., Bernardo, A., Yoon, S.Y., Zwilling, D., Yan, T.X., Chen, L., and Huang, Y. 2010. Apolipoprotein E4 causes age- and Tau-dependent impairment of GABAergic interneurons, leading to learning and memory deficits in mice. *J. Neurosci.* 30: 13707-13717.
- Arendt, T., Holzer, M., Gertz, H.J., and Bruckner, M.K. 1999. Cortical load of PHF-tau in Alzheimer's disease is correlated to cholinergic dysfunction. *J. Neural Transm.* 106 : 513-523.
- Arneric, S.P., Sullivan, J.P., Decker, M.W., Brioni, J.D., Bannon, A.W., Briggs, C.A., Donnelly-Roberts, D., Radek, R.J., Marsh, K.C., Kyncl, J., and . 1995. Potential treatment of Alzheimer disease using cholinergic channel activators (ChCAs) with cognitive enhancement, anxiolytic-like, and cytoprotective properties. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 9 Suppl 2: 50-61.
- Astur, R.S., Ortiz, M.L., and Sutherland, R.J. 1998. A characterization of performance by men and women in a virtual Morris water task: a large and reliable sex difference. *Behav. Brain Res.* 93: 185-190.
- Azad, N.A., Al, B.M., and Loy-English, I. 2007. Gender differences in dementia risk factors. *Gend. Med.* 4: 120-129.
- Aztiria, E., Capodici, G., Arancio, L., and Leanza, G. 2007. Extensive training in a maze task reduces neurogenesis in the adult rat dentate gyrus probably as a result of stress. *Neurosci. Lett.* 416: 133-137.
- Aztiria, E., Cataudella, T., Spampinato, S., and Leanza, G. 2009. Septal grafts restore cognitive abilities and amyloid precursor protein metabolism. *Neurobiol. Aging* 30: 1614-1625.

-B-

- Baddeley, A. 2000. The episodic buffer: a new component of working memory? *Trends Cogn Sci.* **4** : 417-423.
- Baddeley, A. 2001. The concept of episodic memory. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **356**: 1345-1350.
- Baldi, E., Efofudebe, M., Lorenzini, C.A., and Bucherelli, C. 2005. Spatial navigation in the Morris water maze: working and long lasting reference memories. *Neurosci. Lett.* **378**: 176-180.
- Bales, K.R., Verina, T., Dodel, R.C., Du, Y., Altstiel, L., Bender, M., Hyslop, P., Johnstone, E.M., Little, S.P., Cummins, D.J., Piccardo, P., Ghetti, B., and Paul, S.M. 1997. Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. *Nat. Genet.* **17**: 263-264.
- Bales, K.R., Liu, F., Wu, S., Lin, S., Koger, D., DeLong, C., Hansen, J.C., Sullivan, P.M., and Paul, S.M. 2009. Human APOE isoform-dependent effects on brain beta-amyloid levels in PDAPP transgenic mice. *J. Neurosci.* **29**: 6771-6779.
- Bannerman, D.M., Yee, B.K., Lemaire, M., Wilbrecht, L., Jarrard, L., Iversen, S.D., Rawlins, J.N., and Good, M.A. 2001. The role of the entorhinal cortex in two forms of spatial learning and memory. *Exp. Brain Res.* **141**: 281-303.
- Barker, G.R., Bird, F., Alexander, V., and Warburton, E.C. 2007. Recognition memory for objects, place, and temporal order: a disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex. *J. Neurosci.* **27**: 2948-2957.
- Barker, G.R. and Warburton, E.C. 2009. Critical role of the cholinergic system for object-in-place associative recognition memory. *Learn. Mem.* **16**: 8-11.
- Barnes, C.A. 1979. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J. Comp Physiol Psychol.* **93**: 74-104.
- Barnes, C.A., McNaughton, B.L., Mizumori, S.J., Leonard, B.W., and Lin, L.H. 1990. Comparison of spatial and temporal characteristics of neuronal activity in sequential stages of hippocampal processing. *Prog. Brain Res.* **83**: 287-300.
- Bartres-Faz, D., Junque, C., Lopez-Alomar, A., Valveny, N., Moral, P., Casamayor, R., Salido, A., Bel, C., and Clemente, I.C. 2001. Neuropsychological and genetic differences between age-associated memory impairment and mild cognitive impairment entities. *J. Am. Geriatr. Soc.* **49**: 985-990.
- Bartus, R.T., Dean, R.L., III, Beer, B., and Lippa, A.S. 1982. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* **217**: 408-414.
- Bartus, R.T. 2000. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp. Neurol.* **163**: 495-529.
- Batchelor, P.E., Armstrong, D.M., Blaker, S.N., and Gage, F.H. 1989. Nerve growth factor receptor and choline acetyltransferase colocalization in neurons within the rat forebrain: response to fimbria-fornix transection. *J. Comp Neurol.* **284**: 187-204.
- Baxter, M.G., Bucci, D.J., Gorman, L.K., Wiley, R.G., and Gallagher, M. 1995. Selective immunotoxic lesions of basal forebrain cholinergic cells: effects on learning and memory in rats. *Behav. Neurosci.* **109**: 714-722.
- Baxter, M.G. and Gallagher, M. 1996. Intact spatial learning in both young and aged rats following selective removal of hippocampal cholinergic input. *Behav. Neurosci.* **110**: 460-467.
- Beach, T.G. 2008. Physiologic origins of age-related beta-amyloid deposition. *Neurodegener. Dis.* **5**: 143-145.

- Belinson, H., Kariv-Inbal, Z., Kayed, R., Masliah, E., and Michaelson, D.M. 2010. Following activation of the amyloid cascade, apolipoprotein E4 drives the in vivo oligomerization of amyloid-beta resulting in neurodegeneration. *J. Alzheimers. Dis.* **22**: 959-970.
- Bellosta, S., Nathan, B.P., Orth, M., Dong, L.M., Mahley, R.W., and Pitas, R.E. 1995. Stable expression and secretion of apolipoproteins E3 and E4 in mouse neuroblastoma cells produces differential effects on neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* **270**: 27063-27071.
- Belzung, C., Misslin, R., and Vogel, E. 1989. Behavioural effects of the benzodiazepine receptor partial agonist RO 16-6028 in mice. *Psychopharmacology (Berl)* **97**: 388-391.
- Berger-Sweeney, J., Heckers, S., Mesulam, M.M., Wiley, R.G., Lappi, D.A., and Sharma, M. 1994. Differential effects on spatial navigation of immunotoxin-induced cholinergic lesions of the medial septal area and nucleus basalis magnocellularis. *J. Neurosci.* **14**: 4507-4519.
- Berger-Sweeney, J., Stearns, N.A., Murg, S.L., Floerke-Nashner, L.R., Lappi, D.A., and Baxter, M.G. 2001. Selective immunolesions of cholinergic neurons in mice: effects on neuroanatomy, neurochemistry, and behavior. *J. Neurosci.* **21**: 8164-8173.
- Bertram, L., McQueen, M.B., Mullin, K., Blacker, D., and Tanzi, R.E. 2007. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat. Genet.* **39**: 17-23.
- Bertram, L. 2009. Alzheimer's disease genetics current status and future perspectives. *Int. Rev. Neurobiol.* **84**: 167-184.
- Bierer, L.M., Hof, P.R., Purohit, D.P., Carlin, L., Schmeidler, J., Davis, K.L., and Perl, D.P. 1995. Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.* **52**: 81-88.
- Bird, T.D., Stranahan, S., Sumi, S.M., and Raskind, M. 1983. Alzheimer's disease: choline acetyltransferase activity in brain tissue from clinical and pathological subgroups. *Ann. Neurol.* **14**: 284-293.
- Bjorklund, A. and Stenevi, U. 1981. In vivo evidence for a hippocampal adrenergic neuronotrophic factor specifically released on septal deafferentation. *Brain Res.* **229**: 403-428.
- Blain, J.F., Sullivan, P.M., and Poirier, J. 2006. A deficit in astroglial organization causes the impaired reactive sprouting in human apolipoprotein E4 targeted replacement mice. *Neurobiol. Dis.* **21**: 505-514.
- Boguski, M.S. 2002. Comparative genomics: the mouse that roared. *Nature* **420**: 515-516.
- Bohbot, V., Otahal, P., Liu, Z., Nadel, L., and Bures, J. 1996. Electroconvulsive shock and lidocaine reveal rapid consolidation of spatial working memory in the water maze. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**: 4016-4019.
- Bonner, T.I., Buckley, N.J., Young, A.C., and Brann, M.R. 1987. Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* **237**: 527-532.
- Book, A.A., Wiley, R.G., and Schweitzer, J.B. 1995. 192 IgG-saporin. 2. Neuropathology in the rat brain. *Acta Neuropathol.* **89**: 519-526.
- Borchelt, D.R., Thinakaran, G., Eckman, C.B., Lee, M.K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C.M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., Slunt, H.H., Wang, R., Seeger, M., Levey, A.I., Gandy, S.E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Price, D.L., Younkin, S.G., and Sisodia, S.S. 1996. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* **17**: 1005-1013.
- Bour, A., Little, S., Dodart, J.C., Kelche, C., and Mathis, C. 2004. A secreted form of the beta-amyloid precursor protein (sAPP695) improves spatial recognition memory in OF1 mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* **81**: 27-38.

- Bour, A., Grootendorst, J., Vogel, E., Kelche, C., Dodart, J.C., Bales, K., Moreau, P.H., Sullivan, P.M., and Mathis, C. 2008. Middle-aged human apoE4 targeted-replacement mice show retention deficits on a wide range of spatial memory tasks. *Behav. Brain Res.* **193**: 174-182.
- Bowen, D.M. and Davison, A.N. 1980. Biochemical changes in the cholinergic system of the ageing brain and in senile dementia. *Psychol. Med.* **10**: 315-319.
- Braak, H. and Braak, E. 1985. On areas of transition between entorhinal allocortex and temporal isocortex in the human brain. Normal morphology and lamina-specific pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **68**: 325-332.
- Braak, H. and Braak, E. 1993. Entorhinal-hippocampal interaction in mnemonic disorders. *Hippocampus* **3 Spec No**: 239-246.
- Braak, H. and Braak, E. 1996. Evolution of the neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand. Suppl* **165**: 3-12.
- Brion, J.P., Couck, A.M., Passareiro, E., and Flament-Durand, J. 1985. Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *J. Submicrosc. Cytol.* **17** : 89-96.
- Brioni, J.D., Decker, M.W., Gamboa, L.P., Izquierdo, I., and McGaugh, J.L. 1990. Muscimol injections in the medial septum impair spatial learning. *Brain Res.* **522**: 227-234.
- Brown, M.W. and Aggleton, J.P. 2001. Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nat. Rev. Neurosci.* **2**: 51-61.
- Brown, M.W., Warburton, E.C., and Aggleton, J.P. 2010. Recognition memory: material, processes, and substrates. *Hippocampus* **20**: 1228-1244.
- Buckley, N.J., Bonner, T.I., Buckley, C.M., and Brann, M.R. 1989. Antagonist binding properties of five cloned muscarinic receptors expressed in CHO-K1 cells. *Mol. Pharmacol.* **35**: 469-476.
- Burk, J.A. and Sarter, M. 2001. Dissociation between the attentional functions mediated via basal forebrain cholinergic and GABAergic neurons. *Neuroscience* **105**: 899-909.
- Burk, J.A., Lowder, M.W., and Altemose, K.E. 2008. Attentional demands for demonstrating deficits following intrabasalis infusions of 192 IgG-saporin. *Behav. Brain Res.* **195**: 231-238.
- Burton, B.G., Hok, V., Save, E., and Poucet, B. 2009. Lesion of the ventral and intermediate hippocampus abolishes anticipatory activity in the medial prefrontal cortex of the rat. *Behav. Brain Res.* **199**: 222-234.
- Burwell, R.D. and Amaral, D.G. 1998. Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *J. Comp Neurol.* **398**: 179-205.
- Burwell, R.D., Sadoris, M.P., Bucci, D.J., and Wiig, K.A. 2004. Corticohippocampal contributions to spatial and contextual learning. *J. Neurosci.* **24**: 3826-3836.
- Butcher, R.W. 1984. Phosphodiesterase after twenty years: an introduction. *Adv. Cyclic. Nucleotide. Protein Phosphorylation. Res.* **16**: 1-12.
- Buttini, M., Yu, G.Q., Shockley, K., Huang, Y., Jones, B., Masliah, E., Mallory, M., Yeo, T., Longo, F.M., and Mucke, L. 2002. Modulation of Alzheimer-like synaptic and cholinergic deficits in transgenic mice by human apolipoprotein E depends on isoform, aging, and overexpression of amyloid beta peptides but not on plaque formation. *J. Neurosci.* **22**: 10539-10548.

-C-

- Capsoni, S., Ugolini, G., Comparini, A., Ruberti, F., Berardi, N., and Cattaneo, A. 2000. Alzheimer-like neurodegeneration in aged antinerve growth factor transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**: 6826-6831.
- Caselli, R.J., Graff-Radford, N.R., Reiman, E.M., Weaver, A., Osborne, D., Lucas, J., Uecker, A., and Thibodeau, S.N. 1999. Preclinical memory decline in cognitively normal apolipoprotein E-epsilon4 homozygotes. *Neurology* **53**: 201-207.
- Cassel, J.C., Duconseille, E., Jeltsch, H., and Will, B. 1997. The fimbria-fornix/cingular bundle pathways: a review of neurochemical and behavioural approaches using lesions and transplantation techniques. *Prog. Neurobiol.* **51**: 663-716.
- Cassel, J.C., Gaurivaud, M., Lazarus, C., Bertrand, F., Galani, R., and Jeltsch, H. 2002. Grafts of fetal septal cells after cholinergic immunotoxic denervation of the hippocampus: a functional dissociation between dorsal and ventral implantation sites. *Neuroscience* **113**: 871-882.
- Cassel, J.C., Mathis, C., Majchrzak, M., Moreau, P.H., and Dalrymple-Alford, J.C. 2008. Coexisting cholinergic and parahippocampal degeneration: a key to memory loss in dementia and a challenge for transgenic models? *Neurodegener. Dis.* **5**: 304-317.
- Castano, E.M., Prelli, F., Wisniewski, T., Golabek, A., Kumar, R.A., Soto, C., and Frangione, B. 1995. Fibrillogenesis in Alzheimer's disease of amyloid beta peptides and apolipoprotein E. *Biochem. J.* **306 (Pt 2)**: 599-604.
- Chang, Q. and Gold, P.E. 2003. Switching memory systems during learning: changes in patterns of brain acetylcholine release in the hippocampus and striatum in rats. *J. Neurosci.* **23**: 3001-3005.
- Changeux, J.P., Bertrand, D., Corringier, P.J., Dehaene, S., Edelstein, S., Lena, C., Le, N.N., Marubio, L., Picciotto, M., and Zoli, M. 1998. Brain nicotinic receptors: structure and regulation, role in learning and reinforcement. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **26**: 198-216.
- Chappell, J., McMahan, R., Chiba, A., and Gallagher, M. 1998. A re-examination of the role of basal forebrain cholinergic neurons in spatial working memory. *Neuropharmacology* **37**: 481-487.
- Chen, L.L., Lin, L.H., Green, E.J., Barnes, C.A., and McNaughton, B.L. 1994. Head-direction cells in the rat posterior cortex. I. Anatomical distribution and behavioral modulation. *Exp. Brain Res.* **101**: 8-23.
- Cho, Y.H., Beracochea, D., and Jaffard, R. 1993. Extended temporal gradient for the retrograde and anterograde amnesia produced by ibotenate entorhinal cortex lesions in mice. *J. Neurosci.* **13**: 1759-1766.
- Cho, Y.H. and Jaffard, R. 1994. The entorhinal cortex and a delayed non-matching-to-place task in mice: emphasis on preoperative training and presentation procedure. *Eur. J. Neurosci.* **6**: 1265-1274.
- Cho, Y.H. and Jaffard, R. 1995. Spatial location learning in mice with ibotenate lesions of entorhinal cortex or subiculum. *Neurobiol. Learn. Mem.* **64**: 285-290.
- Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommens, J., Kim, S., Schenk, D., Fraser, P., St George, H.P., and Selkoe, D.J. 1997. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat. Med.* **3**: 67-72.
- Cole, S.L. and Vassar, R. 2007. The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1. *Mol. Neurodegener.* **2**: 22.

- Collerton, D. 1986. Cholinergic function and intellectual decline in Alzheimer's disease. *Neuroscience* **19**: 1-28.
- Colley, A. and Fossey, J. 1986. Reproduction of complex movements: the effects of the presence of vision during encoding or at recall. *Br. J. Psychol.* **77 (Pt 1)**: 75-84.
- Colom, L.V. 2006. Septal networks: relevance to theta rhythm, epilepsy and Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **96**: 609-623.
- Compton, D.M., Griffith, H.R., McDaniel, W.F., Foster, R.A., and Davis, B.K. 1997. The flexible use of multiple cue relationships in spatial navigation: a comparison of water maze performance following hippocampal, medial septal, prefrontal cortex, or posterior parietal cortex lesions. *Neurobiol. Learn. Mem.* **68**: 117-132.
- Corbit, L.H., Ostlund, S.B., and Balleine, B.W. 2002. Sensitivity to instrumental contingency degradation is mediated by the entorhinal cortex and its efferents via the dorsal hippocampus. *J. Neurosci.* **22**: 10976-10984.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., and Pericak-Vance, M.A. 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* **261**: 921-923.
- Corringer, P.J., Le, N.N., and Changeux, J.P. 2000. Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**: 431-458.
- Cosentino, S., Scarmeas, N., Helzner, E., Glymour, M.M., Brandt, J., Albert, M., Blacker, D., and Stern, Y. 2008. APOE epsilon 4 allele predicts faster cognitive decline in mild Alzheimer disease. *Neurology* **70**: 1842-1849.
- Coutureau, E., Galani, R., Gosselin, O., Majchrzak, M., and Di Scala, G. 1999. Entorhinal but not hippocampal or subicular lesions disrupt latent inhibition in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* **72**: 143-157.
- Coutureau, E. and Di Scala, G. 2009. Entorhinal cortex and cognition. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **33**: 753-761.
- Craig, L.A., Hong, N.S., Kopp, J., and McDonald, R.J. 2009. Selective lesion of medial septal cholinergic neurons followed by a mini-stroke impairs spatial learning in rats. *Exp. Brain Res.* **193**: 29-42.
- Crutcher, K.A., Brothers, L., and Davis, J.N. 1981. Sympathetic noradrenergic sprouting in response to central cholinergic denervation; a histochemical study of neuronal sprouting in the rat hippocampal formation. *Brain Res.* **210**: 115-128.
- Cummings, B.J. 1997. Plaques and tangles: searching for primary events in a forest of data. *Neurobiol. Aging* **18**: 358-362.
- Cummings, J.L. and Cole, G. 2002. Alzheimer disease. *JAMA* **287**: 2335-2338.
- Cushman, L.A., Stein, K., and Duffy, C.J. 2008. Detecting navigational deficits in cognitive aging and Alzheimer disease using virtual reality. *Neurology* **71**: 888-895.

-D-

- Davidson, R.J. 2002. Anxiety and affective style: role of prefrontal cortex and amygdala. *Biol. Psychiatry* **51**: 68-80.
- Davies, P. and Maloney, A.J. 1976. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* **2**: 1403.
- Davis, M. 1992. The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu. Rev. Neurosci.* **15**: 353-375.

- Deane, R., Sagare, A., Hamm, K., Parisi, M., Lane, S., Finn, M.B., Holtzman, D.M., and Zlokovic, B.V. 2008. apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *J. Clin. Invest* **118**: 4002-4013.
- Decker, M.W., Tran, T., and McGaugh, J.L. 1990. A comparison of the effects of scopolamine and diazepam on acquisition and retention of inhibitory avoidance in mice. *Psychopharmacology (Berl)* **100**: 515-521.
- Delpolyi, A.R., Rankin, K.P., Mucke, L., Miller, B.L., and Gorno-Tempini, M.L. 2007. Spatial cognition and the human navigation network in AD and MCI. *Neurology* **69**: 986-997.
- DeKosky, S.T. 2002. [Neurobiology and molecular biology of Alzheimer's disease]. *Rev. Neurol.* **35**: 752-760.
- Di Paola, M., Macaluso, E., Carlesimo, G.A., Tomaiuolo, F., Worsley, K.J., Fadda, L., and Caltagirone, C. 2007. Episodic memory impairment in patients with Alzheimer's disease is correlated with entorhinal cortex atrophy. A voxel-based morphometry study. *J. Neurol.* **254**: 774-781.
- Dickson, D.W. 1997. The pathogenesis of senile plaques. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **56**: 321-339.
- Dodart, J.C., Mathis, C., and Ungerer, A. 2000. The beta-amyloid precursor protein and its derivatives: from biology to learning and memory processes. *Rev. Neurosci.* **11**: 75-93.
- Dodart, J.C., Bales, K.R., Johnstone, E.M., Little, S.P., and Paul, S.M. 2002. Apolipoprotein E alters the processing of the beta-amyloid precursor protein in APP(V717F) transgenic mice. *Brain Res.* **955**: 191-199.
- Dolev, I. and Michaelson, D.M. 2004. A nontransgenic mouse model shows inducible amyloid-beta (Abeta) peptide deposition and elucidates the role of apolipoprotein E in the amyloid cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**: 13909-13914.
- Dolorfo, C.L. and Amaral, D.G. 1998. Entorhinal cortex of the rat: organization of intrinsic connections. *J. Comp Neurol.* **398**: 49-82.
- Dornan, W.A., McCampbell, A.R., Tinkler, G.P., Hickman, L.J., Bannon, A.W., Decker, M.W., and Gunther, K.L. 1997. Comparison of site specific injections into the basal forebrain on water maze and radial arm maze performance in the male rat after immunolesioning with 192 IgG saporin. *Behav. Brain Res.* **86**: 181-189.
- Du, A.T., Schuff, N., Zhu, X.P., Jagust, W.J., Miller, B.L., Reed, B.R., Kramer, J.H., Mungas, D., Yaffe, K., Chui, H.C., and Weiner, M.W. 2003. Atrophy rates of entorhinal cortex in AD and normal aging. *Neurology* **60**: 481-486.
- Dubois, B., Tounsi, H., Michon, H., & Deweer, B. (1997). Les déficits cognitifs dans la maladie d'Alzheimer, *Symposium en hommage à Yvon Lamour*. De la neuropsychologie à la maladie d'Alzheimer 183-197.
- Dufour, B.D., Adeola, O., Cheng, H.W., Donkin, S.S., Klein, J.D., Pajor, E.A., and Garner, J.P. 2010. Nutritional up-regulation of serotonin paradoxically induces compulsive behavior. *Nutr. Neurosci.* **13**: 256-264.
- Dunnett, S.B., Everitt, B.J., and Robbins, T.W. 1991. The basal forebrain-cortical cholinergic system: interpreting the functional consequences of excitotoxic lesions. *Trends Neurosci.* **14**: 494-501.
- Durkin, T.P. 1992. GABAergic mediation of indirect transsynaptic control over basal and spatial memory testing-induced activation of septo-hippocampal cholinergic activity in mice. *Behav. Brain Res.* **50**: 155-165.

-E-

- Easton, A. and Gaffan, D. 2000. Comparison of perirhinal cortex ablation and crossed unilateral lesions of the medial forebrain bundle from the inferior temporal cortex in the rhesus monkey: effects on learning and retrieval. *Behav. Neurosci.* **114**: 1041-1057.

Eckenstein, F. 1988. Transient expression of NGF-receptor-like immunoreactivity in postnatal rat brain and spinal cord. *Brain Res.* **446**: 149-154.

Eichenbaum, H., Yonelinas, A.P., and Ranganath, C. 2007. The medial temporal lobe and recognition memory. *Annu. Rev. Neurosci.* **30**: 123-152.

Eijkenboom, M., Blokland, A., and van der Staay, F.J. 2000. Modelling cognitive dysfunctions with bilateral injections of ibotenic acid into the rat entorhinal cortex. *Neuroscience* **101**: 27-39.

Ekstrom, A.D., Kahana, M.J., Caplan, J.B., Fields, T.A., Isham, E.A., Newman, E.L., and Fried, I. 2003. Cellular networks underlying human spatial navigation. *Nature* **425**: 184-188.

Etienne, P., Robitaille, Y., Gauthier, S., and Nair, N.P. 1986. Nucleus basalis neuronal loss and neuritic plaques in advanced Alzheimer's disease. *Can. J. Physiol Pharmacol.* **64**: 318-324.

Etienne, P., Robitaille, Y., Wood, P., Gauthier, S., Nair, N.P., and Quirion, R. 1986. Nucleus basalis neuronal loss, neuritic plaques and choline acetyltransferase activity in advanced Alzheimer's disease. *Neuroscience* **19**: 1279-1291.

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

-F-

Fagan, A.M., Holtzman, D.M., Munson, G., Mathur, T., Schneider, D., Chang, L.K., Getz, G.S., Reardon, C.A., Lukens, J., Shah, J.A., and LaDu, M.J. 1999. Unique lipoproteins secreted by primary astrocytes from wild type, apoE (-/-), and human apoE transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **274**: 30001-30007.

Fagan, A.M., Watson, M., Parsadanian, M., Bales, K.R., Paul, S.M., and Holtzman, D.M. 2002. Human and murine ApoE markedly alters A beta metabolism before and after plaque formation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* **9**: 305-318.

Farrer, L.A., Cupples, L.A., Haines, J.L., Hyman, B., Kukull, W.A., Mayeux, R., Myers, R.H., Pericak-Vance, M.A., Risch, N., and van Duijn, C.M. 1997. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* **278**: 1349-1356.

Ferreira, S.T., Vieira, M.N., and De Felice, F.G. 2007. Soluble protein oligomers as emerging toxins in Alzheimer's and other amyloid diseases. *IUBMB. Life* **59**: 332-345.

Fisher, A. and Hanin, I. 1980. Choline analogs as potential tools in developing selective animal models of central cholinergic hypofunction. *Life Sci.* **27**: 1615-1634.

Fitz, N.F., Gibbs, R.B., and Johnson, D.A. 2008. Selective lesion of septal cholinergic neurons in rats impairs acquisition of a delayed matching to position T-maze task by delaying the shift from a response to a place strategy. *Brain Res. Bull.* **77**: 356-360.

Flory, J.D., Manuck, S.B., Ferrell, R.E., Ryan, C.M., and Muldoon, M.F. 2000. Memory performance and the apolipoprotein E polymorphism in a community sample of middle-aged adults. *Am. J. Med. Genet.* **96**: 707-711.

Forette, F., Seux, M.L., Staessen, J.A., Thijs, L., Birkenhager, W.H., Babarskiene, M.R., Babeanu, S., Bossini, A., Gil-Extremera, B., Girerd, X., Laks, T., Lilov, E., Moissejev, V., Tuomilehto, J., Vanhanen, H., Webster, J., Yodfat, Y., and Fagard, R. 1998. Prevention of dementia in randomised double-blind placebo-controlled Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) trial. *Lancet* **352**: 1347-1351.

Freund, T.F. and Buzsaki, G. 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* **6**: 347-470.

Fryer, J.D., Demattos, R.B., McCormick, L.M., O'Dell, M.A., Spinner, M.L., Bales, K.R., Paul, S.M., Sullivan, P.M., Parsadanian, M., Bu, G., and Holtzman, D.M. 2005. The low density lipoprotein receptor regulates the level of central nervous system human and murine apolipoprotein E but does not modify amyloid plaque pathology in PDAPP mice. *J. Biol. Chem.* **280**: 25754-25759.

Fyhn, M., Molden, S., Witter, M.P., Moser, E.I., and Moser, M.B. 2004. Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science* **305**: 1258-1264.

-G-

Galani, R., Jarrard, L.E., Will, B.E., and Kelche, C. 1997. Effects of postoperative housing conditions on functional recovery in rats with lesions of the hippocampus, subiculum, or entorhinal cortex. *Neurobiol. Learn. Mem.* **67**: 43-56.

Galani, R., Weiss, I., Cassel, J.C., and Kelche, C. 1998. Spatial memory, habituation, and reactions to spatial and nonspatial changes in rats with selective lesions of the hippocampus, the entorhinal cortex or the subiculum. *Behav. Brain Res.* **96**: 1-12.

Galani, R., Obis, S., Coutureau, E., Jarrard, L., and Cassel, J.C. 2002. A comparison of the effects of fimbria-fornix, hippocampal, or entorhinal cortex lesions on spatial reference and working memory in rats: short versus long postsurgical recovery period. *Neurobiol. Learn. Mem.* **77**: 1-16.

Garner, J.P., Weisker, S.M., Dufour, B., and Mench, J.A. 2004. Barbering (fur and whisker trimming) by laboratory mice as a model of human trichotillomania and obsessive-compulsive spectrum disorders. *Comp Med.* **54**: 216-224.

Gaykema, R.P., Luiten, P.G., Nyakas, C., and Traber, J. 1990. Cortical projection patterns of the medial septum-diagonal band complex. *J. Comp Neurol.* **293**: 103-124.

Gil-Bea, F.J., Solas, M., Mateos, L., Winblad, B., Ramirez, M.J., and Cedazo-Minguez, A. 2010. Cholinergic hypofunction impairs memory acquisition possibly through hippocampal Arc and BDNF downregulation. *Hippocampus.*

Glick, S.D., Nakamura, R.K., and Jarvik, M.E. 1971. Recovery of function following frontal brain damage in mice: changes in sensitivity to amphetamine. *J. Comp Physiol Psychol.* **76**: 454-459.

Gomez-Isla, T., Price, J.L., McKeel, D.W., Jr., Morris, J.C., Growdon, J.H., and Hyman, B.T. 1996. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **16**: 4491-4500.

Gotti, C. and Clementi, F. 2004. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog. Neurobiol.* **74**: 363-396.

Gray, J.A. and McNaughton, N. 1983. Comparison between the behavioural effects of septal and hippocampal lesions: a review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **7**: 119-188.

Greene, J.D., Baddeley, A.D., and Hodges, J.R. 1996. Analysis of the episodic memory deficit in early Alzheimer's disease: evidence from the doors and people test. *Neuropsychologia* **34**: 537-551.

Grehan, S., Tse, E., and Taylor, J.M. 2001. Two distal downstream enhancers direct expression of the human apolipoprotein E gene to astrocytes in the brain. *J. Neurosci.* **21**: 812-822.

Grober, E. and Kawas, C. 1997. Learning and retention in preclinical and early Alzheimer's disease. *Psychol. Aging* **12**: 183-188.

Grootendorst, J., Oitzl, M.S., Dalm, S., Enthoven, L., Schachner, M., de Kloet, E.R., and Sandi, C. 2001. Stress alleviates reduced expression of cell adhesion molecules (NCAM, L1), and deficits in learning and corticosterone regulation of apolipoprotein E knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* **14**: 1505-1514.

Grootendorst, J., Bour, A., Vogel, E., Kelche, C., Sullivan, P.M., Dodart, J.C., Bales, K., and Mathis, C. 2005. Human apoE targeted replacement mouse lines: h-apoE4 and h-apoE3 mice differ on spatial memory performance and avoidance behavior. *Behav. Brain Res.* **159**: 1-14.

Gsell, W., Strein, I., Krause, U., and Riederer, P. 1997. Neurochemical abnormalities in Alzheimer's disease and Parkinson's disease--a comparative review. *J. Neural Transm. Suppl* **51**: 145-159.

Gsell, W., Jungkunz, G., and Riederer, P. 2004. Functional neurochemistry of Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Des* **10**: 265-293.

-H-

Haass, C. and Baumeister, R. 1998. What do we learn from a few familial Alzheimer's disease cases? *J. Neural Transm. Suppl* **54**: 137-145.

Hafting, T., Fyhn, M., Molden, S., Moser, M.B., and Moser, E.I. 2005. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* **436**: 801-806.

Hagan, J.J., Salamone, J.D., Simpson, J., Iversen, S.D., and Morris, R.G. 1988. Place navigation in rats is impaired by lesions of medial septum and diagonal band but not nucleus basalis magnocellularis. *Behav. Brain Res.* **27**: 9-20.

Hamanaka, H., Katoh-Fukui, Y., Suzuki, K., Kobayashi, M., Suzuki, R., Motegi, Y., Nakahara, Y., Takeshita, A., Kawai, M., Ishiguro, K., Yokoyama, M., and Fujita, S.C. 2000. Altered cholesterol metabolism in human apolipoprotein E4 knock-in mice. *Hum. Mol. Genet.* **9**: 353-361.

Hanin, I. 1996. The AF64A model of cholinergic hypofunction: an update. *Life Sci.* **58**: 1955-1964.

Hardman, R., Evans, D.J., Fellows, L., Hayes, B., Rupniak, H.T., Barnes, J.C., and Higgins, G.A. 1997. Evidence for recovery of spatial learning following entorhinal cortex lesions in mice. *Brain Res.* **758**: 187-200.

Hardy, J. 2007. Putting presenilins centre stage. Introduction to the Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease. *EMBO Rep.* **8**: 134-135.

Harman, D. 2006. Alzheimer's disease pathogenesis: role of aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1067**: 454-460.

Hasselmo, M.E. and Giocomo, L.M. 2006. Cholinergic modulation of cortical function. *J. Mol. Neurosci.* **30**: 133-135.

Hasselmo, M.E. and Stern, C.E. 2006. Mechanisms underlying working memory for novel information. *Trends Cogn Sci.* **10**: 487-493.

Hatters, D.M., Peters-Libeu, C.A., and Weisgraber, K.H. 2006. Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends Biochem. Sci.* **31**: 445-454.

Hauw, J.J., Verny, M., Delaere, P., Cervera, P., He, Y., and Duyckaerts, C. 1990. Constant neurofibrillary changes in the neocortex in progressive supranuclear palsy. Basic differences with Alzheimer's disease and aging. *Neurosci. Lett.* **119**: 182-186.

- Heckers, S., Ohtake, T., Wiley, R.G., Lappi, D.A., Geula, C., and Mesulam, M.M. 1994. Complete and selective cholinergic denervation of rat neocortex and hippocampus but not amygdala by an immunotoxin against the p75 NGF receptor. *J. Neurosci.* **14**: 1271-1289.
- Henderson, V.W., Mack, W., and Williams, B.W. 1989. Spatial disorientation in Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.* **46**: 391-394.
- Henderson, V.W. 1997. The epidemiology of estrogen replacement therapy and Alzheimer's disease. *Neurology* **48**: S27-S35.
- Henke, H. and Lang, W. 1983. Cholinergic enzymes in neocortex, hippocampus and basal forebrain of non-neurological and senile dementia of Alzheimer-type patients. *Brain Res.* **267**: 281-291.
- Hepler, D.J., Wenk, G.L., Cribbs, B.L., Olton, D.S., and Coyle, J.T. 1985. Memory impairments following basal forebrain lesions. *Brain Res.* **346**: 8-14.
- Hernandez, D., Sugaya, K., Qu, T., McGowan, E., Duff, K., and McKinney, M. 2001. Survival and plasticity of basal forebrain cholinergic systems in mice transgenic for presenilin-1 and amyloid precursor protein mutant genes. *Neuroreport* **12**: 1377-1384.
- Herz, J., Kowal, R.C., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. 1990. Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment. *EMBO J.* **9**: 1769-1776.
- Herzog, C.D., Gandhi, C., Bhattacharya, P., and Walsh, T.J. 2000. Effects of intraseptal zolpidem and chlordiazepoxide on spatial working memory and high-affinity choline uptake in the hippocampus. *Neurobiol. Learn. Mem.* **73**: 168-179.
- Ho, N.F., Han, S.P., and Dawe, G.S. 2009. Effect of voluntary running on adult hippocampal neurogenesis in cholinergic lesioned mice. *BMC. Neurosci.* **10**: 57.
- Holland, D., Brewer, J.B., Hagler, D.J., Fennema-Notestine, C., and Dale, A.M. 2009. Subregional neuroanatomical change as a biomarker for Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**: 20954-20959.
- Holley, L.A., Wiley, R.G., Lappi, D.A., and Sarter, M. 1994. Cortical cholinergic deafferentation following the intracortical infusion of 192 IgG-saporin: a quantitative histochemical study. *Brain Res.* **663**: 277-286.
- Holscher, C. and Schmidt, W.J. 1994. Quinolinic acid lesion of the rat entorhinal cortex pars medialis produces selective amnesia in allocentric working memory (WM), but not in egocentric WM. *Behav. Brain Res.* **63**: 187-194.
- Holsinger, R.M., McLean, C.A., Beyreuther, K., Masters, C.L., and Evin, G. 2002. Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **51**: 783-786.
- Holtzman, D.M., Bales, K.R., Wu, S., Bhat, P., Parsadanian, M., Fagan, A.M., Chang, L.K., Sun, Y., and Paul, S.M. 1999. Expression of human apolipoprotein E reduces amyloid-beta deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Clin. Invest* **103**: R15-R21.
- Holtzman, D.M., Bales, K.R., Tenkova, T., Fagan, A.M., Parsadanian, M., Sartorius, L.J., Mackey, B., Olney, J., McKeel, D., Wozniak, D., and Paul, S.M. 2000. Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**: 2892-2897.
- Hort, J., Laczó, J., Vyhnaček, M., Bojar, M., Bures, J., and Vlček, K. 2007. Spatial navigation deficit in amnesic mild cognitive impairment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**: 4042-4047.
- Hunter, C.L., Quintero, E.M., Gilstrap, L., Bhat, N.R., and Granholm, A.C. 2004. Minocycline protects basal forebrain cholinergic neurons from mu p75-saporin immunotoxic lesioning. *Eur. J. Neurosci.* **19**: 3305-3316.

-I-

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

Insausti, R., Herrero, M.T., and Witter, M.P. 1997. Entorhinal cortex of the rat: cytoarchitectonic subdivisions and the origin and distribution of cortical efferents. *Hippocampus* **7**: 146-183.

Irizarry, M.C., Cheung, B.S., Rebeck, G.W., Paul, S.M., Bales, K.R., and Hyman, B.T. 2000. Apolipoprotein E affects the amount, form, and anatomical distribution of amyloid beta-peptide deposition in homozygous APP(V717F) transgenic mice. *Acta Neuropathol.* **100**: 451-458.

Ishida, A., Furukawa, K., Keller, J.N., and Mattson, M.P. 1997. Secreted form of beta-amyloid precursor protein shifts the frequency dependency for induction of LTD, and enhances LTP in hippocampal slices. *Neuroreport* **8**: 2133-2137.

-J-

Jack, C.R., Jr., Shiung, M.M., Gunter, J.L., O'Brien, P.C., Weigand, S.D., Knopman, D.S., Boeve, B.F., Ivnik, R.J., Smith, G.E., Cha, R.H., Tangalos, E.G., and Petersen, R.C. 2004. Comparison of different MRI brain atrophy rate measures with clinical disease progression in AD. *Neurology* **62**: 591-600.

James, W.D., Berger, T.G., et coll., 2006. *Andrews' Diseases of the Skin: clinical Dermatology*. Saunders Elsevier.

Janis, L.S., Bishop, T.W., and Dunbar, G.L. 1994. Medial septal lesions in rats produce permanent deficits for strategy selection in a spatial memory task. *Behav. Neurosci.* **108**: 892-898.

Janis, L.S., Glasier, M.M., Fulop, Z., and Stein, D.G. 1998. Intraseptal injections of 192 IgG saporin produce deficits for strategy selection in spatial-memory tasks. *Behav. Brain Res.* **90**: 23-34.

Jarrard, L.E., Okaichi, H., Steward, O., and Goldschmidt, R.B. 1984. On the role of hippocampal connections in the performance of place and cue tasks: comparisons with damage to hippocampus. *Behav. Neurosci.* **98**: 946-954.

Jheng, S.S. and Pai, M.C. 2009. Cognitive map in patients with mild Alzheimer's disease: a computer-generated arena study. *Behav. Brain Res.* **200**: 42-47.

Jiang, Q., Lee, C.Y., Mandrekar, S., Wilkinson, B., Cramer, P., Zelcer, N., Mann, K., Lamb, B., Willson, T.M., Collins, J.L., Richardson, J.C., Smith, J.D., Comery, T.A., Riddell, D., Holtzman, D.M., Tontonoz, P., and Landreth, G.E. 2008. ApoE promotes the proteolytic degradation of Abeta. *Neuron* **58**: 681-693.

Jung, M.W. and McNaughton, B.L. 1993. Spatial selectivity of unit activity in the hippocampal granular layer. *Hippocampus* **3**: 165-182.

Jung, M.W., Wiener, S.I., and McNaughton, B.L. 1994. Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat. *J. Neurosci.* **14**: 7347-7356.

Juva, K., Verkkoniemi, A., Viramo, P., Polvikoski, T., Kainulainen, K., Kontula, K., and Sulkava, R. 2000. Apolipoprotein E, cognitive function, and dementia in a general population aged 85 years and over. *Int. Psychogeriatr.* **12**: 379-387.

-K-

- Kalaria, R.N., Maestre, G.E., Arizaga, R., Friedland, R.P., Galasko, D., Hall, K., Luchsinger, J.A., Ogunniyi, A., Perry, E.K., Potocnik, F., Prince, M., Stewart, R., Wimo, A., Zhang, Z.X., and Antuono, P. 2008. Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors. *Lancet Neurol.* **7**: 812-826.
- Kalova, E., Vlcek, K., Jarolimova, E., and Bures, J. 2005. Allothetic orientation and sequential ordering of places is impaired in early stages of Alzheimer's disease: corresponding results in real space tests and computer tests. *Behav. Brain Res.* **159**: 175-186.
- Kalueff, A.V., Minasyan, A., Keisala, T., Shah, Z.H., and Tuohimaa, P. 2006. Hair barbering in mice: implications for neurobehavioural research. *Behav. Processes* **71**: 8-15.
- Katzman, R., Kawas, C. Epidemiology of dementia and Alzheimer's disease. (Terry RD, Katzman R, Bick KL, Eds.) Alzheimer Disease. New York: Raven Press, 1994: 105-22.
- Kawas, C., Resnick, S., Morrison, A., Brookmeyer, R., Corrada, M., Zonderman, A., Bacal, C., Lingle, D.D., and Metter, E. 1997. A prospective study of estrogen replacement therapy and the risk of developing Alzheimer's disease: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Neurology* **48**: 1517-1521.
- Kayed, R., Head, E., Thompson, J.L., McIntire, T.M., Milton, S.C., Cotman, C.W., and Glabe, C.G. 2003. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* **300**: 486-489.
- Kealy, J., Diviney, M., Kehoe, E., McGonagle, V., O'Shea, A., Harvey, D., and Commins, S. 2008. The effects of overtraining in the Morris water maze on allocentric and egocentric learning strategies in rats. *Behav. Brain Res.* **192**: 259-263.
- Kelsey, J.E. and Landry, B.A. 1988. Medial septal lesions disrupt spatial mapping ability in rats. *Behav. Neurosci.* **102**: 289-293.
- Kerr, K.M., Agster, K.L., Furtak, S.C., and Burwell, R.D. 2007. Functional neuroanatomy of the parahippocampal region: the lateral and medial entorhinal areas. *Hippocampus* **17**: 697-708.
- Kesner, R.P. and Ragozzino, M.E. 2003. The role of the prefrontal cortex in object-place learning: a test of the attribute specificity model. *Behav. Brain Res.* **146**: 159-165.
- Kessels, R.P., de Haan, E.H., Kappelle, L.J., and Postma, A. 2001. Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **35**: 295-303.
- Kessels, R.P., Feijen, J., and Postma, A. 2005. Implicit and explicit memory for spatial information in Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn Disord.* **20**: 184-191.
- Kidd, M. 1963. Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* **197**: 192-193.
- Killiany, R.J., Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Moss, M.B., Kikinis, R., Jolesz, F., Tanzi, R., Jones, K., and Albert, M.S. 2002. MRI measures of entorhinal cortex vs hippocampus in preclinical AD. *Neurology* **58**: 1188-1196.
- Kim, J., Onstead, L., Randle, S., Price, R., Smithson, L., Zwizinski, C., Dickson, D.W., Golde, T., and McGowan, E. 2007. Abeta40 inhibits amyloid deposition in vivo. *J. Neurosci.* **27**: 627-633.
- Kimura, R. and Ohno, M. 2009. Impairments in remote memory stabilization precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5XFAD Alzheimer mouse model. *Neurobiol. Dis.* **33**: 229-235.
- Kinoshita, A., Whelan, C.M., Smith, C.J., Mikhailenko, I., Rebeck, G.W., Strickland, D.K., and Hyman, B.T. 2001. Demonstration by fluorescence resonance energy transfer of two sites of interaction between the low-density

lipoprotein receptor-related protein and the amyloid precursor protein: role of the intracellular adapter protein Fe65. *J. Neurosci.* **21**: 8354-8361.

Kitt, C.A., Price, D.L., Struble, R.G., Cork, L.C., Wainer, B.H., Becher, M.W., and Mobley, W.C. 1984. Evidence for cholinergic neurites in senile plaques. *Science* **226**: 1443-1445.

Kjelstrup, K.B., Solstad, T., Brun, V.H., Hafting, T., Leutgeb, S., Witter, M.P., Moser, E.I., and Moser, M.B. 2008. Finite scale of spatial representation in the hippocampus. *Science* **321**: 140-143.

Koelle, G.B. 1954. The histochemical localization of cholinesterases in the central nervous system of the rat. *J. Comp Neurol.* **100**: 211-235.

Koistinaho, M., Lin, S., Wu, X., Esterman, M., Koger, D., Hanson, J., Higgs, R., Liu, F., Malkani, S., Bales, K.R., and Paul, S.M. 2004. Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. *Nat. Med.* **10**: 719-726.

Koopmans, G., Blokland, A., van, N.P., and Prickaerts, J. 2003. Assessment of spatial learning abilities of mice in a new circular maze. *Physiol Behav.* **79**: 683-693.

Kopniczky, Z., Dochnal, R., Macsai, M., Pal, A., Kiss, G., Mihaly, A., and Szabo, G. 2006. Alterations of behavior and spatial learning after unilateral entorhinal ablation of rats. *Life Sci.* **78**: 2683-2688.

Kordower, J.H., Chu, Y., Stebbins, G.T., DeKosky, S.T., Cochran, E.J., Bennett, D., and Mufson, E.J. 2001. Loss and atrophy of layer II entorhinal cortex neurons in elderly people with mild cognitive impairment. *Ann. Neurol.* **49**: 202-213.

Kornecook, T.J., McKinney, A.P., Ferguson, M.T., and Dodart, J.C. 2010. Isoform-specific effects of apolipoprotein E on cognitive performance in targeted-replacement mice overexpressing human APP. *Genes Brain Behav.* **9**: 182-192.

Kounnas, M.Z., Moir, R.D., Rebeck, G.W., Bush, A.I., Argraves, W.S., Tanzi, R.E., Hyman, B.T., and Strickland, D.K. 1995. LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation. *Cell* **82**: 331-340.

Krayniak, P.F., Meibach, R.C., and Siegel, A. 1981. A projection from the entorhinal cortex to the nucleus accumbens in the rat. *Brain Res.* **209**: 427-431.

Kuusisto, J., Koivisto, K., Kervinen, K., Mykkanen, L., Helkala, E.L., Vanhanen, M., Hanninen, T., Pyorala, K., Kesaniemi, Y.A., Riekkinen, P., and . 1994. Association of apolipoprotein E phenotypes with late onset Alzheimer's disease: population based study. *BMJ* **309**: 636-638.

-L-

LaDu, M.J., Falduto, M.T., Manelli, A.M., Reardon, C.A., Getz, G.S., and Frail, D.E. 1994. Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid. *J. Biol. Chem.* **269**: 23403-23406.

LaDu, M.J., Gilligan, S.M., Lukens, J.R., Cabana, V.G., Reardon, C.A., Van Eldik, L.J., and Holtzman, D.M. 1998. Nascent astrocyte particles differ from lipoproteins in CSF. *J. Neurochem.* **70**: 2070-2081.

Lamb, B.T., Sisodia, S.S., Lawler, A.M., Slunt, H.H., Kitt, C.A., Kearns, W.G., Pearson, P.L., Price, D.L., and Gearhart, J.D. 1993. Introduction and expression of the 400 kilobase amyloid precursor protein gene in transgenic mice [corrected]. *Nat. Genet.* **5**: 22-30.

- Lautenschlager, N.T., Cupples, L.A., Rao, V.S., Auerbach, S.A., Becker, R., Burke, J., Chui, H., Duara, R., Foley, E.J., Glatt, S.L., Green, R.C., Jones, R., Karlinsky, H., Kukull, W.A., Kurz, A., Larson, E.B., Martelli, K., Sadovnick, A.D., Volicer, L., Waring, S.C., Growdon, J.H., and Farrer, L.A. 1996. Risk of dementia among relatives of Alzheimer's disease patients in the MIRAGE study: What is in store for the oldest old? *Neurology* **46**: 641-650.
- Leanza, G., Nilsson, O.G., Wiley, R.G., and Bjorklund, A. 1995. Selective lesioning of the basal forebrain cholinergic system by intraventricular 192 IgG-saporin: behavioural, biochemical and stereological studies in the rat. *Eur. J. Neurosci.* **7**: 329-343.
- Leanza, G., Martinez-Serrano, A., and Bjorklund, A. 1998. Amelioration of spatial navigation and short-term memory deficits by grafts of foetal basal forebrain tissue placed into the hippocampus and cortex of rats with selective cholinergic lesions. *Eur. J. Neurosci.* **10**: 2353-2370.
- Lecourtier, L., de Vasconcelos, A.P., Cosquer, B., and Cassel, J.C. 2010. Combined lesions of GABAergic and cholinergic septal neurons increase locomotor activity and potentiate the locomotor response to amphetamine. *Behav. Brain Res.* **213**: 175-182.
- Lehmann, O., Jeltsch, H., Lazarus, C., Tritschler, L., Bertrand, F., and Cassel, J.C. 2002. Combined 192 IgG-saporin and 5,7-dihydroxytryptamine lesions in the male rat brain: a neurochemical and behavioral study. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **72**: 899-912.
- Lehmann, O., Grottick, A.J., Cassel, J.C., and Higgins, G.A. 2003. A double dissociation between serial reaction time and radial maze performance in rats subjected to 192 IgG-saporin lesions of the nucleus basalis and/or the septal region. *Eur. J. Neurosci.* **18**: 651-666.
- Lenck-Santini, P.P., Save, E., and Poucet, B. 2001. Evidence for a relationship between place-cell spatial firing and spatial memory performance. *Hippocampus* **11**: 377-390.
- Lenck-Santini, P.P., Muller, R.U., Save, E., and Poucet, B. 2002. Relationships between place cell firing fields and navigational decisions by rats. *J. Neurosci.* **22**: 9035-9047.
- Letenneur, L., Gilleron, V., Commenges, D., Helmer, C., Orgogozo, J.M., and Dartigues, J.F. 1999. Are sex and educational level independent predictors of dementia and Alzheimer's disease? Incidence data from the PAQUID project. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **66**: 177-183.
- Leutgeb, S. and Mizumori, S.J. 1999. Excitotoxic septal lesions result in spatial memory deficits and altered flexibility of hippocampal single-unit representations. *J. Neurosci.* **19**: 6661-6672.
- Levisohn, L.F. and Isacson, O. 1991. Excitotoxic lesions of the rat entorhinal cortex. Effects of selective neuronal damage on acquisition and retention of a non-spatial reference memory task. *Brain Res.* **564**: 230-244.
- Lin, L., Georgievska, B., Mattsson, A., and Isacson, O. 1999. Cognitive changes and modified processing of amyloid precursor protein in the cortical and hippocampal system after cholinergic synapse loss and muscarinic receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**: 12108-12113.
- Lind, J., Larsson, A., Persson, J., Ingvar, M., Nilsson, L.G., Backman, L., Adolfsson, R., Cruts, M., Sleegers, K., Van, B.C., and Nyberg, L. 2006. Reduced hippocampal volume in non-demented carriers of the apolipoprotein E epsilon4: relation to chronological age and recognition memory. *Neurosci. Lett.* **396**: 23-27.
- Lipinska, B. and Backman, L. 1997. Encoding-retrieval interactions in mild Alzheimer's disease: the role of access to categorical information. *Brain Cogn* **34**: 274-286.
- Liu, H.C., Leu, S.J., Chang, J.G., Sung, S.M., Hsu, W.C., Lee, L.S., and Hu, C.J. 2003. The association of beta-site APP cleaving enzyme (BACE) C786G polymorphism with Alzheimer's disease. *Brain Res.* **961**: 88-91.
- Loy, R., Milner, T.A., and Moore, R.Y. 1980. Sprouting of sympathetic axons in the hippocampal formation: conditions necessary to elicit ingrowth. *Exp. Neurol.* **67**: 399-41.

Luiten, P.G., Gaykema, R.P., Traber, J., and Spencer, D.G., Jr. 1987. Cortical projection patterns of magnocellular basal nucleus subdivisions as revealed by anterogradely transported Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Brain Res.* **413**: 229-250.

Lukas, R.J., Changeux, J.P., Le, N.N., Albuquerque, E.X., Balfour, D.J., Berg, D.K., Bertrand, D., Chiappinelli, V.A., Clarke, P.B., Collins, A.C., Dani, J.A., Grady, S.R., Kellar, K.J., Lindstrom, J.M., Marks, M.J., Quik, M., Taylor, P.W., and Wonnacott, S. 1999. International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacol. Rev.* **51**: 397-401.

-M-

M'Harzi, M. and Jarrard, L.E. 1992. Effects of medial and lateral septal lesions on acquisition of a place and cue radial maze task. *Behav. Brain Res.* **49**: 159-165.

Ma, J., Yee, A., Brewer, H.B., Jr., Das, S., and Potter, H. 1994. Amyloid-associated proteins alpha 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer beta-protein into filaments. *Nature* **372**: 92-94.

Maccioni, R.B., Munoz, J.P., and Barbeito, L. 2001. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch. Med. Res.* **32**: 367-381.

Maguire, E.A., Frith, C.D., and Morris, R.G. 1999. The functional neuroanatomy of comprehension and memory: the importance of prior knowledge. *Brain* **122 (Pt 10)**: 1839-1850.

Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., and Huang, Y. 2006. Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**: 5644-5651.

Mandelkow, E.M. and Mandelkow, E. 1998. Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* **8**: 425-427.

Mandler, J.M. and Robinson, C.A. 1978. Developmental changes in picture recognition. *J. Exp. Child Psychol.* **26**: 122-136.

Manns, I.D., Mainville, L., and Jones, B.E. 2001. Evidence for glutamate, in addition to acetylcholine and GABA, neurotransmitter synthesis in basal forebrain neurons projecting to the entorhinal cortex. *Neuroscience* **107**: 249-263.

Marighetto, A., Durkin, T., Toumane, A., Lebrun, C., and Jaffard, R. 1989. Septal alpha-noradrenergic antagonism in vivo blocks the testing-induced activation of septo-hippocampal cholinergic neurones and produces a concomitant deficit in working memory performance of mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **34**: 553-558.

Marighetto, A., Yee, B.K., and Rawlins, J.N. 1998. The effects of cytotoxic entorhinal lesions and electrolytic medial septal lesions on the acquisition and retention of a spatial working memory task. *Exp. Brain Res.* **119**: 517-528.

Masdeu, J.C., Zubieta, J.L., and Arbizu, J. 2005. Neuroimaging as a marker of the onset and progression of Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* **236**: 55-64.

Maurer, A.P., Vanrhoads, S.R., Sutherland, G.R., Lipa, P., and McNaughton, B.L. 2005. Self-motion and the origin of differential spatial scaling along the septo-temporal axis of the hippocampus. *Hippocampus* **15**: 841-852.

Mayeux, R., Stern, Y., Ottman, R., Tatemichi, T.K., Tang, M.X., Maestre, G., Ngai, C., Tycko, B., and Ginsberg, H. 1993. The apolipoprotein epsilon 4 allele in patients with Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **34**: 752-754.

- Mayeux, R., Small, S.A., Tang, M., Tycko, B., and Stern, Y. 2001. Memory performance in healthy elderly without Alzheimer's disease: effects of time and apolipoprotein-E. *Neurobiol. Aging* **22**: 683-689.
- Mayeux, R. 2003. Apolipoprotein E, Alzheimer disease, and African Americans. *Arch. Neurol.* **60** : 161-163.
- McGaughy, J., Kaiser, T., and Sarter, M. 1996. Behavioral vigilance following infusions of 192 IgG-saporin into the basal forebrain: selectivity of the behavioral impairment and relation to cortical AChE-positive fiber density. *Behav. Neurosci.* **110**: 247-265.
- McGaughy, J. and Sarter, M. 1999. Effects of ovariectomy, 192 IgG-saporin-induced cortical cholinergic deafferentation, and administration of estradiol on sustained attention performance in rats. *Behav. Neurosci.* **113**: 1216-1232.
- McGowan, E., Sanders, S., Iwatsubo, T., Takeuchi, A., Saido, T., Zehr, C., Yu, X., Uljon, S., Wang, R., Mann, D., Dickson, D., and Duff, K. 1999. Amyloid phenotype characterization of transgenic mice overexpressing both mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin 1 transgenes. *Neurobiol. Dis.* **6**: 231-244.
- McGowan, E., Pickford, F., Kim, J., Onstead, L., Eriksen, J., Yu, C., Skipper, L., Murphy, M.P., Beard, J., Das, P., Jansen, K., Delucia, M., Lin, W.L., Dolios, G., Wang, R., Eckman, C.B., Dickson, D.W., Hutton, M., Hardy, J., and Golde, T. 2005. Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice. *Neuron* **47**: 191-199.
- McGurk, S.R., Hartgraves, S.L., Kelly, P.H., Gordon, M.N., and Butcher, L.L. 1987. Is ethylcholine mustard aziridinium ion a specific cholinergic neurotoxin? *Neuroscience* **22** : 215-224.
- McIntyre, C.K., Pal, S.N., Marriott, L.K., and Gold, P.E. 2002. Competition between memory systems: acetylcholine release in the hippocampus correlates negatively with good performance on an amygdala-dependent task. *J. Neurosci.* **22**: 1171-1176.
- McIntyre, C.K., Marriott, L.K., and Gold, P.E. 2003. Patterns of brain acetylcholine release predict individual differences in preferred learning strategies in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* **79**: 177-183.
- Meraz-Rios, M.A., Lira-De Leon, K.I., Campos-Pena, V., De Anda-Hernandez, M.A., and Mena-Lopez, R. 2010. Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **112**: 1353-1367.
- Mesulam, M.M., Mufson, E.J., Wainer, B.H., and Levey, A.I. 1983. Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience* **10**: 1185-1201.
- Meziane, H., Dodart, J.C., Mathis, C., Little, S., Clemens, J., Paul, S.M., and Ungerer, A. 1998. Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**: 12683-12688.
- Micheau, J., Riedel, G., Roloff, E.L., Inglis, J., and Morris, R.G. 2004. Reversible hippocampal inactivation partially dissociates how and where to search in the water maze. *Behav. Neurosci.* **118**: 1022-1032.
- Miyamoto, M., Kato, J., Narumi, S., and Nagaoka, A. 1987. Characteristics of memory impairment following lesioning of the basal forebrain and medial septal nucleus in rats. *Brain Res.* **419**: 19-31.
- Mizumori, S.J., Perez, G.M., Alvarado, M.C., Barnes, C.A., and McNaughton, B.L. 1990. Reversible inactivation of the medial septum differentially affects two forms of learning in rats. *Brain Res.* **528**: 12-20.
- Mizumori, S.J. and Williams, J.D. 1993. Directionally selective mnemonic properties of neurons in the lateral dorsal nucleus of the thalamus of rats. *J. Neurosci.* **13**: 4015-4028.
- Montalto, M.C., Farrar, G., and Hehir, C.T. 2007. Fibrillar and oligomeric beta-amyloid as distinct local biomarkers for Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1097**: 239-258.

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

Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N., and O'Keefe, J. 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* **297**: 681-683.

Mortensen, E.L. and Hogh, P. 2001. A gender difference in the association between APOE genotype and age-related cognitive decline. *Neurology* **57**: 89-95.

Mountjoy, C.Q., Rossor, M.N., Iversen, L.L., and Roth, M. 1984. Correlation of cortical cholinergic and GABA deficits with quantitative neuropathological findings in senile dementia. *Brain* **107 (Pt 2)**: 507-518.

Muir, J.L., Everitt, B.J., and Robbins, T.W. 1994. AMPA-induced excitotoxic lesions of the basal forebrain: a significant role for the cortical cholinergic system in attentional function. *J. Neurosci.* **14**: 2313-2326.

Muller, D., Wiegmann, H., Langer, U., Moltzen-Lenz, S., and Nitsch, R.M. 1998. Lu 25-109, a combined m1 agonist and m2 antagonist, modulates regulated processing of the amyloid precursor protein of Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* **105**: 1029-1043.

Muller, R.U. and Kubie, J.L. 1987. The effects of changes in the environment on the spatial firing of hippocampal complex-spike cells. *J. Neurosci.* **7**: 1951-1968.

Muller, R.U., Kubie, J.L., and Ranck, J.B., Jr. 1987. Spatial firing patterns of hippocampal complex-spike cells in a fixed environment. *J. Neurosci.* **7**: 1935-1950.

Muller, R.U., Ranck, J.B., Jr., and Taube, J.S. 1996. Head direction cells: properties and functional significance. *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**: 196-206.

Murray, E.A., Bussey, T.J., and Saksida, L.M. 2007. Visual perception and memory: a new view of medial temporal lobe function in primates and rodents. *Annu. Rev. Neurosci.* **30**: 99-122.

Myhrer, T., Iversen, E.G., and Fonnum, F. 1989. Impaired reference memory and reduced glutamergic activity in rats with temporo-entorhinal connections disrupted. *Exp. Brain Res.* **77**: 499-506.

-N-

Nag, N., Baxter, M.G., and Berger-Sweeney, J.E. 2009. Efficacy of a murine-p75-saporin immunotoxin for selective lesions of basal forebrain cholinergic neurons in mice. *Neurosci. Lett.* **452**: 247-251.

Nagahara, A.H., Otto, T., and Gallagher, M. 1995. Entorhinal-perirhinal lesions impair performance of rats on two versions of place learning in the Morris water maze. *Behav. Neurosci.* **109**: 3-9.

Naidu, A., Xu, Q., Catalano, R., and Cordell, B. 2002. Secretion of apolipoprotein E by brain glia requires protein prenylation and is suppressed by statins. *Brain Res.* **958**: 100-111.

Naslund, J., Thyberg, J., Tjernberg, L.O., Wernstedt, C., Karlstrom, A.R., Bogdanovic, N., Gandy, S.E., Lannfelt, L., Terenius, L., and Nordstedt, C. 1995. Characterization of stable complexes involving apolipoprotein E and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease brain. *Neuron* **15**: 219-228.

Nathan, B.P., Bellosta, S., Sanan, D.A., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W., and Pitas, R.E. 1994. Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science* **264**: 850-852.

Nathan, B.P., Chang, K.C., Bellosta, S., Brisch, E., Ge, N., Mahley, R.W., and Pitas, R.E. 1995. The inhibitory effect of apolipoprotein E4 on neurite outgrowth is associated with microtubule depolymerization. *J. Biol. Chem.* **270**: 19791-19799.

Nathan, B.P., Jiang, Y., Wong, G.K., Shen, F., Brewer, G.J., and Struble, R.G. 2002. Apolipoprotein E4 inhibits, and apolipoprotein E3 promotes neurite outgrowth in cultured adult mouse cortical neurons through the low-density lipoprotein receptor-related protein. *Brain Res.* **928**: 96-105.

Nordberg, A., Alafuzoff, I., and Winblad, B. 1992. Nicotinic and muscarinic subtypes in the human brain: changes with aging and dementia. *J. Neurosci. Res.* **31**: 103-111.

-O-

O'Donnell, P. and Grace, A.A. 1995. Synaptic interactions among excitatory afferents to nucleus accumbens neurons: hippocampal gating of prefrontal cortical input. *J. Neurosci.* **15**: 3622-3639.

O'Keefe, J. and Dostrovsky, J. 1971. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* **34**: 171-175.

O'Keefe, J. 1976. Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Exp. Neurol.* **51**: 78-109.

O'Keefe, J., Nadel, L. (1978) *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford: Oxford University Press.

Olton, D.S., Walker, J.A., and Gage, F.H. 1978. Hippocampal connections and spatial discrimination. *Brain Res.* **139**: 295-308.

Olton, D.S. 1990. Dementia: animal models of the cognitive impairments following damage to the basal forebrain cholinergic system. *Brain Res. Bull.* **25**: 499-502.

Oswald, C.J. and Good, M. 2000. The effects of combined lesions of the subicular complex and the entorhinal cortex on two forms of spatial navigation in the water maze. *Behav. Neurosci.* **114**: 211-217.

Oswald, C.J., Yee, B.K., Rawlins, J.N., Bannerman, D.B., Good, M., and Honey, R.C. 2001. Involvement of the entorhinal cortex in a process of attentional modulation: evidence from a novel variant of an IDS/EDS procedure. *Behav. Neurosci.* **115**: 841-849.

Oswald, C.J., Bannerman, D.M., Yee, B.K., Rawlins, J.N., Honey, R.C., and Good, M. 2003. Entorhinal cortex lesions disrupt the transition between the use of intra- and extramaze cues for navigation in the water maze. *Behav. Neurosci.* **117**: 588-595.

-P-

Paban, V., Chambon, C., Jaffard, M., and Alescio-Lautier, B. 2005a. Behavioral effects of basal forebrain cholinergic lesions in young adult and aging rats. *Behav. Neurosci.* **119**: 933-945.

Paban, V., Jaffard, M., Chambon, C., Malafosse, M., and Alescio-Lautier, B. 2005b. Time course of behavioral changes following basal forebrain cholinergic damage in rats: Environmental enrichment as a therapeutic intervention. *Neuroscience* **132**: 13-32.

Paban, V., Chambon, C., Farioli, F., and Alescio-Lautier, B. 2011. Gene regulation in the rat prefrontal cortex after learning with or without cholinergic insult. *Neurobiol. Learn. Mem.* **95**: 441-452.

Paganelli, R.A., Benetolli, A., Lima, K.C., Cestari-Junior, L.A., Favero Filho, L.A., and Milani, H. 2004. A novel version of the 8-arm radial maze: effects of cerebral ischemia on learning and memory. *J. Neurosci. Methods* **132**: 9-18.

- Paganini-Hill, A. 1996. Oestrogen replacement therapy and Alzheimer's disease. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **103 Suppl 13**: 80-86.
- Pai, M.C. and Jacobs, W.J. 2004. Topographical disorientation in community-residing patients with Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **19**: 250-255.
- Pang, K.C., Nocera, R., Secor, A.J., and Yoder, R.M. 2001. GABAergic septohippocampal neurons are not necessary for spatial memory. *Hippocampus* **11**: 814-827.
- Parent, M.B. and Baxter, M.G. 2004. Septohippocampal acetylcholine: involved in but not necessary for learning and memory? *Learn. Mem.* **11**: 9-20.
- Park, G.A., Pappas, B.A., Murtha, S.M., and Ally, A. 1992. Enriched environment primes forebrain choline acetyltransferase activity to respond to learning experience. *Neurosci. Lett.* **143**: 259-262.
- Parron, C., Poucet, B., and Save, E. 2004. Entorhinal cortex lesions impair the use of distal but not proximal landmarks during place navigation in the rat. *Behav. Brain Res.* **154**: 345-352.
- Paxinos, G., Franklin, K.B.J. 2004. The mouse brain atlas in stereotaxis coordinates. London: Elsevier Academic Press.
- Perry, E.K., Perry, R.H., Blessed, G., and Tomlinson, B.E. 1977. Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia. *Lancet* **1**: 189.
- Perry, E.K., Tomlinson, B.E., Blessed, G., Perry, R.H., Cross, A.J., and Crow, T.T. 1981. Noradrenergic and cholinergic systems in senile dementia of Alzheimer type. *Lancet* **2**: 149.
- Perry, R.J. and Hodges, J.R. 2000. Relationship between functional and neuropsychological performance in early Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **14**: 1-10.
- Pitas, R.E., Boyles, J.K., Lee, S.H., Foss, D., and Mahley, R.W. 1987. Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* **917**: 148-161.
- Pitkanen, A., Pikkarainen, M., Nurminen, N., and Ylinen, A. 2000. Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **911**: 369-391.
- Poirier, J., Hess, M., May, P.C., and Finch, C.E. 1991. Astrocytic apolipoprotein E mRNA and GFAP mRNA in hippocampus after entorhinal cortex lesioning. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **11**: 97-106.
- Poirier, J., Davignon, J., Bouthillier, D., Kogan, S., Bertrand, P., and Gauthier, S. 1993. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* **342**: 697-699.
- Pompl, P.N., Mullan, M.J., Bjugstad, K., and Arendash, G.W. 1999. Adaptation of the circular platform spatial memory task for mice: use in detecting cognitive impairment in the APP(SW) transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Methods* **87**: 87-95.
- Poucet, B. 1993. Spatial cognitive maps in animals: new hypotheses on their structure and neural mechanisms. *Psychol. Rev.* **100**: 163-182.
- Poucet, B., Thinus-Blanc, C., and Muller, R.U. 1994. Place cells in the ventral hippocampus of rats. *Neuroreport* **5**: 2045-2048.
- Poucet, B. and Benhamou, S. 1997. The neuropsychology of spatial cognition in the rat. *Crit Rev. Neurobiol.* **11**: 101-120.

Poucet, B., Lenck-Santini, P.P., Paz-Villagran, V., and Save, E. 2003. Place cells, neocortex and spatial navigation: a short review. *J. Physiol Paris* **97**: 537-546.

Poucet, B., Alvernhe, A., Hok, V., Renaudineau, S., Sargolini, F., and Save, E. 2010. [The hippocampus and the neural code of spatial memory]. *Biol. Aujourd'hui*. **204**: 103-112.

Pouzet, B., Welzl, H., Gubler, M.K., Broersen, L., Veenman, C.L., Feldon, J., Rawlins, J.N., and Yee, B.K. 1999. The effects of NMDA-induced retrohippocampal lesions on performance of four spatial memory tasks known to be sensitive to hippocampal damage in the rat. *Eur. J. Neurosci.* **11**: 123-140.

Price, D.L. and Sisodia, S.S. 1998. Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models. *Annu. Rev. Neurosci.* **21**: 479-505.

-R-

Raber, J., Wong, D., Buttini, M., Orth, M., Bellosta, S., Pitas, R.E., Mahley, R.W., and Mucke, L. 1998. Isoform-specific effects of human apolipoprotein E on brain function revealed in ApoE knockout mice: increased susceptibility of females. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**: 10914-10919.

Raber, J., Wong, D., Yu, G.Q., Buttini, M., Mahley, R.W., Pitas, R.E., and Mucke, L. 2000. Apolipoprotein E and cognitive performance. *Nature* **404**: 352-354.

Ragozzino, M.E., Parker, M.E., and Gold, P.E. 1992. Spontaneous alternation and inhibitory avoidance impairments with morphine injections into the medial septum. Attenuation by glucose administration. *Brain Res.* **597**: 241-249.

Ragozzino, M.E. and Gold, P.E. 1995. Glucose injections into the medial septum reverse the effects of intraseptal morphine infusions on hippocampal acetylcholine output and memory. *Neuroscience* **68**: 981-988.

Ragozzino, M.E., Unick, K.E., and Gold, P.E. 1996. Hippocampal acetylcholine release during memory testing in rats: augmentation by glucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**: 4693-4698.

Rajavashisth, T.B., Kaptein, J.S., Reue, K.L., and Lusis, A.J. 1985. Evolution of apolipoprotein E: mouse sequence and evidence for an 11-nucleotide ancestral unit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **82**: 8085-8089.

Ramirez, J.J., Fass-Holmes, B., Karpiak, S.E., Harshbarger, R., Zengel, D., Wright, P., and Valbuena, M. 1991. Enhanced recovery of learned alternation in ganglioside-treated rats after unilateral entorhinal lesions. *Behav. Brain Res.* **43**: 99-101.

Reiman, E.M., Chen, K., Liu, X., Bandy, D., Yu, M., Lee, W., Ayutyanont, N., Keppler, J., Reeder, S.A., Langbaum, J.B., Alexander, G.E., Klunk, W.E., Mathis, C.A., Price, J.C., Aizenstein, H.J., DeKosky, S.T., and Caselli, R.J. 2009. Fibrillar amyloid-beta burden in cognitively normal people at 3 levels of genetic risk for Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**: 6820-6825.

Ring, S., Weyer, S.W., Kilian, S.B., Waldron, E., Pietrzik, C.U., Filippov, M.A., Herms, J., Buchholz, C., Eckman, C.B., Korte, M., Wolfer, D.P., and Muller, U.C. 2007. The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J. Neurosci.* **27**: 7817-7826.

Robbins, T.W., Everitt, B.J., Marston, H.M., Wilkinson, J., Jones, G.H., and Page, K.J. 1989. Comparative effects of ibotenic acid- and quisqualic acid-induced lesions of the substantia innominata on attentional function in the rat: further implications for the role of the cholinergic neurons of the nucleus basalis in cognitive processes. *Behav. Brain Res.* **35**: 221-240.

Robertson, J., Curley, J., Kaye, J., Quinn, J., Pfankuch, T., and Raber, J. 2005. apoE isoforms and measures of anxiety in probable AD patients and Apoe^{-/-} mice. *Neurobiol. Aging* **26**: 637-643.

Rodrigue, K.M. and Raz, N. 2004. Shrinkage of the entorhinal cortex over five years predicts memory performance in healthy adults. *J. Neurosci.* **24**: 956-963.

Roof, R.L., Zhang, Q., Glasier, M.M., and Stein, D.G. 1993. Gender-specific impairment on Morris water maze task after entorhinal cortex lesion. *Behav. Brain Res.* **57**: 47-51.

Roses, A.D. 1997. A model for susceptibility polymorphisms for complex diseases: apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Neurogenetics.* **1**: 3-11.

Rossner, S., Schliebs, R., and Bigl, V. 2000. Intracerebroventricular infusion of CHO5, a rat monoclonal antibody directed against mouse low-affinity nerve growth factor receptor (p75NTR), specifically labels basal forebrain cholinergic neurons in mouse brain. *Metab Brain Dis.* **15**: 17-27.

Russo, C., Angelini, G., Dapino, D., Piccini, A., Piombo, G., Schettini, G., Chen, S., Teller, J.K., Zaccheo, D., Gambetti, P., and Tabaton, M. 1998. Opposite roles of apolipoprotein E in normal brains and in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**: 15598-15602.

-S-

Sanan, D.A., Weisgraber, K.H., Russell, S.J., Mahley, R.W., Huang, D., Saunders, A., Schmechel, D., Wisniewski, T., Frangione, B., Roses, A.D., and . 1994. Apolipoprotein E associates with beta amyloid peptide of Alzheimer's disease to form novel monofibrils. Isoform apoE4 associates more efficiently than apoE3. *J. Clin. Invest* **94**: 860-869.

Sandstrom, N.J., Kaufman, J., and Huettel, S.A. 1998. Males and females use different distal cues in a virtual environment navigation task. *Brain Res. Cogn Brain Res.* **6**: 351-360.

Sargolini, F., Fyhn, M., Hafting, T., McNaughton, B.L., Witter, M.P., Moser, M.B., and Moser, E.I. 2006. Conjunctive representation of position, direction, and velocity in entorhinal cortex. *Science* **312**: 758-762.

Sarna, J.R., Dyck, R.H., and Whishaw, I.Q. 2000. The Dalila effect: C57BL6 mice barber whiskers by plucking. *Behav. Brain Res.* **108**: 39-45.

Sarsoza, F., Saing, T., Kayed, R., Dahlin, R., Dick, M., Broadwater-Hollifield, C., Mobley, S., Lott, I., Doran, E., Gillen, D., Anderson-Bergman, C., Cribbs, D.H., Glabe, C., and Head, E. 2009. A fibril-specific, conformation-dependent antibody recognizes a subset of A β plaques in Alzheimer disease, Down syndrome and Tg2576 transgenic mouse brain. *Acta Neuropathol.* **118**: 505-517.

Sarter, M. and Bruno, J.P. 1997. Cognitive functions of cortical acetylcholine: toward a unifying hypothesis. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **23**: 28-46.

Sarter, M., Givens, B., and Bruno, J.P. 2001. The cognitive neuroscience of sustained attention: where top-down meets bottom-up. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **35**: 146-160.

Save, E., Cressant, A., Thinus-Blanc, C., and Poucet, B. 1998. Spatial firing of hippocampal place cells in blind rats. *J. Neurosci.* **18**: 1818-1826.

Savitz, J., Solms, M., and Ramesar, R. 2006. Apolipoprotein E variants and cognition in healthy individuals: a critical opinion. *Brain Res. Rev.* **51**: 125-135.

- Schauwecker, P.E., Cogen, J.P., Jiang, T., Cheng, H.W., Collier, T.J., and McNeill, T.H. 1998. Differential regulation of astrocytic mRNAs in the rat striatum after lesions of the cortex or substantia nigra. *Exp. Neurol.* **149**: 87-96.
- Schenk, F. and Morris, R.G. 1985. Dissociation between components of spatial memory in rats after recovery from the effects of retrohippocampal lesions. *Exp. Brain Res.* **58**: 11-28.
- Schenk, F. 1987. Comparison of spatial learning in woodmice (*Apodemus sylvaticus*) and hooded rats (*Rattus norvegicus*). *J. Comp. Psychol.* **101**:150-158.
- Schliebs, R., Rossner, S., and Bigl, V. 1996. Immunolesion by 192IgG-saporin of rat basal forebrain cholinergic system: a useful tool to produce cortical cholinergic dysfunction. *Prog. Brain Res.* **109**: 253-264.
- Schwarcz, R., Foster, A.C., French, E.D., Whetsell, W.O., Jr., and Kohler, C. 1984. Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. *Life Sci.* **35**: 19-32.
- Selkoe, D.J. 1998. The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* **8**: 447-453.
- Selkoe, D.J. 2004. Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann. Intern. Med.* **140**: 627-638.
- Seo, H., Ferree, A.W., and Isacson, O. 2002. Cortico-hippocampal APP and NGF levels are dynamically altered by cholinergic muscarinic antagonist or M1 agonist treatment in normal mice. *Eur. J. Neurosci.* **15**: 498-506.
- Seo, H. and Isacson, O. 2010. The hAPP-YAC transgenic model has elevated UPS activity in the frontal cortex similar to Alzheimer's disease and Down's syndrome. *J. Neurochem.* **114**: 1819-1826.
- Sewards, T.V. and Sewards, M.A. 2003. Input and output stations of the entorhinal cortex: superficial vs. deep layers or lateral vs. medial divisions? *Brain Res. Brain Res. Rev.* **42**: 243-251.
- Shankar, G.M., Li, S., Mehta, T.H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N.E., Smith, I., Brett, F.M., Farrell, M.A., Rowan, M.J., Lemere, C.A., Regan, C.M., Walsh, D.M., Sabatini, B.L., and Selkoe, D.J. 2008. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* **14**: 837-842.
- Sharp, P.E. 1999. Subicular place cells expand or contract their spatial firing pattern to fit the size of the environment in an open field but not in the presence of barriers: comparison with hippocampal place cells. *Behav. Neurosci.* **113**: 643-662.
- Sharp, P.E. and Koester, K. 2008. Lesions of the mammillary body region severely disrupt the cortical head direction, but not place cell signal. *Hippocampus* **18**: 766-784.
- Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Foncin, J.F., Bruni, A.C., Montesi, M.P., Sorbi, S., Rainero, I., Pinessi, L., Nee, L., Chumakov, I., Pollen, D., Brookes, A., Sanseau, P., Polinsky, R.J., Wasco, W., Da Silva, H.A., Haines, J.L., Perkicak-Vance, M.A., Tanzi, R.E., Roses, A.D., Fraser, P.E., Rommens, J.M., and St George-Hyslop, P.H. 1995. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* **375**: 754-760.
- Siegel, J.A., Haley, G.E., and Raber, J. 2010. Apolipoprotein E isoform-dependent effects on anxiety and cognition in female TR mice. *Neurobiol. Aging.*
- Sipos, E., Kurunczi, A., Kasza, A., Horvath, J., Felszeghy, K., Laroche, S., Toldi, J., Parducz, A., Penke, B., and Penke, Z. 2007. Beta-amyloid pathology in the entorhinal cortex of rats induces memory deficits: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience* **147**: 28-36.
- Slezak, M. and Pfrieder, F.W. 2003. New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci.* **26**: 531-535.

- Snowdon, D.A., Greiner, L.H., Mortimer, J.A., Riley, K.P., Greiner, P.A., and Markesbery, W.R. 1997. Brain infarction and the clinical expression of Alzheimer disease. The Nun Study. *JAMA* **277**: 813-817.
- Sofic, E., Halket, J., Przyborowska, A., Riederer, P., Beckmann, H., Sandler, M., and Jellinger, K. 1989. Brain quinolinic acid in Alzheimer's dementia. *Eur. Arch. Psychiatry Neurol. Sci.* **239**: 177-179.
- Squire, L.R. 1982. The neuropsychology of human memory. *Annu. Rev. Neurosci.* **5**: 241-273.
- Squire, L.R. 1992. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol. Rev.* **99**: 195-231.
- Stackman, R.W. and Taube, J.S. 1997. Firing properties of head direction cells in the rat anterior thalamic nucleus: dependence on vestibular input. *J. Neurosci.* **17**: 4349-4358.
- Stancampiano, R., Cocco, S., Cugusi, C., Sarais, L., and Fadda, F. 1999. Serotonin and acetylcholine release response in the rat hippocampus during a spatial memory task. *Neuroscience* **89**: 1135-1143.
- Staubli, U., Fraser, D., Kessler, M., and Lynch, G. 1986. Studies on retrograde and anterograde amnesia of olfactory memory after denervation of the hippocampus by entorhinal cortex lesions. *Behav. Neural Biol.* **46**: 432-444.
- Stefani, M.R. and Gold, P.E. 2001. Intrahippocampal infusions of k-atp channel modulators influence spontaneous alternation performance: relationships to acetylcholine release in the hippocampus. *J. Neurosci.* **21**: 609-614.
- Steffenach, H.A., Witter, M., Moser, M.B., and Moser, E.I. 2005. Spatial memory in the rat requires the dorsolateral band of the entorhinal cortex. *Neuron* **45**: 301-313.
- Steward, O. 1981. Evaluation of short-term cue recollection following entorhinal cortical lesions in rats. *Behav. Neural Biol.* **31**: 187-197.
- Storey, E., Slavin, M.J., and Kinsella, G.J. 2002. Patterns of cognitive impairment in Alzheimer's disease: assessment and differential diagnosis. *Front Biosci.* **7**: e155-e184.
- Stoub, T.R., Bulgakova, M., Leurgans, S., Bennett, D.A., Fleischman, D., Turner, D.A., and deToledo-Morrell, L. 2005. MRI predictors of risk of incident Alzheimer disease: a longitudinal study. *Neurology* **64**: 1520-1524.
- Stoub, T.R., deToledo-Morrell, L., Stebbins, G.T., Leurgans, S., Bennett, D.A., and Shah, R.C. 2006. Hippocampal disconnection contributes to memory dysfunction in individuals at risk for Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**: 10041-10045.
- Stranahan, A.M. and Mattson, M.P. 2010. Selective vulnerability of neurons in layer II of the entorhinal cortex during aging and Alzheimer's disease. *Neural Plast.* **2010**: 108190.
- Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S., and Roses, A.D. 1993a. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**: 1977-1981.
- Strittmatter, W.J., Weisgraber, K.H., Huang, D.Y., Dong, L.M., Salvesen, G.S., Pericak-Vance, M., Schmechel, D., Saunders, A.M., Goldgaber, D., and Roses, A.D. 1993b. Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**: 8098-8102.
- Sullivan, P.M., Mezdour, H., Aratani, Y., Knouff, C., Najib, J., Reddick, R.L., Quarfordt, S.H., and Maeda, N. 1997. Targeted replacement of the mouse apolipoprotein E gene with the common human APOE3 allele enhances diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis. *J. Biol. Chem.* **272**: 17972-17980.

Sullivan, P.M., Mezdour, H., Quarfordt, S.H., and Maeda, N. 1998. Type III hyperlipoproteinemia and spontaneous atherosclerosis in mice resulting from gene replacement of mouse Apoe with human Apoe*2. *J. Clin. Invest* **102**: 130-135.

Sullivan, P.M., Mace, B.E., Maeda, N., and Schmechel, D.E. 2004. Marked regional differences of brain human apolipoprotein E expression in targeted replacement mice. *Neuroscience* **124**: 725-733.

Sun, Y., Wu, S., Bu, G., Onifade, M.K., Patel, S.N., LaDu, M.J., Fagan, A.M., and Holtzman, D.M. 1998. Glial fibrillary acidic protein-apolipoprotein E (apoE) transgenic mice: astrocyte-specific expression and differing biological effects of astrocyte-secreted apoE3 and apoE4 lipoproteins. *J. Neurosci.* **18**: 3261-3272.

-T-

Tang, M.X., Stern, Y., Marder, K., Bell, K., Gurland, B., Lantigua, R., Andrews, H., Feng, L., Tycko, B., and Mayeux, R. 1998. The APOE-epsilon4 allele and the risk of Alzheimer disease among African Americans, whites, and Hispanics. *JAMA* **279**: 751-755.

Taube, J.S., Muller, R.U., and Ranck, J.B., Jr. 1990. Head-direction cells recorded from the postsubiculum in freely moving rats. II. Effects of environmental manipulations. *J. Neurosci.* **10**: 436-447.

Taube, J.S. and Burton, H.L. 1995a. Head direction cell activity monitored in a novel environment and during a cue conflict situation. *J. Neurophysiol.* **74**: 1953-1971.

Taube, J.S. 1995b. Head direction cells recorded in the anterior thalamic nuclei of freely moving rats. *J. Neurosci.* **15**: 70-86.

Teipel, S.J., Pruessner, J.C., Faltraco, F., Born, C., Rocha-Unold, M., Evans, A., Moller, H.J., and Hampel, H. 2006. Comprehensive dissection of the medial temporal lobe in AD: measurement of hippocampus, amygdala, entorhinal, perirhinal and parahippocampal cortices using MRI. *J. Neurol.* **253**: 794-800.

Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A., and Katzman, R. 1991. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol.* **30** : 572-580.

Teter, B., Xu, P.T., Gilbert, J.R., Roses, A.D., Galasko, D., and Cole, G.M. 1999. Human apolipoprotein E isoform-specific differences in neuronal sprouting in organotypic hippocampal culture. *J. Neurochem.* **73**: 2613-2616.

Thal, D.R., Schultz, C., Dehghani, F., Yamaguchi, H., Braak, H., and Braak, E. 2000. Amyloid beta-protein (Abeta)-containing astrocytes are located preferentially near N-terminal-truncated Abeta deposits in the human entorhinal cortex. *Acta Neuropathol.* **100**: 608-617.

Tiraboschi, P., Hansen, L.A., Masliah, E., Alford, M., Thal, L.J., and Corey-Bloom, J. 2004. Impact of APOE genotype on neuropathologic and neurochemical markers of Alzheimer disease. *Neurology* **62**: 1977-1983.

Tokuda, T., Calero, M., Matsubara, E., Vidal, R., Kumar, A., Permanne, B., Zlokovic, B., Smith, J.D., LaDu, M.J., Rostagno, A., Frangione, B., and Ghiso, J. 2000. Lipidation of apolipoprotein E influences its isoform-specific interaction with Alzheimer's amyloid beta peptides. *Biochem. J.* **348 Pt 2**: 359-365.

Tolman, E.C. 1948. Cognitive maps in rats and men. *Psychol. Rev.* **55**: 189-208.

Torres, E.M., Perry, T.A., Blockland, A., Wilkinson, L.S., Wiley, R.G., Lappi, D.A., and Dunnet, S.B. 1994. Behavioural, histochemical and biochemical consequences of selective immunolesions in discrete regions of the basal forebrain cholinergic system. *Neuroscience* **63**: 95-122.

Touretzky, D.S. and Redish, A.D. 1996. Theory of rodent navigation based on interacting representations of space. *Hippocampus* **6**: 247-270.

Traissard, N., Herbeaux, K., Cosquer, B., Jeltsch, H., Ferry, B., Galani, R., Pernon, A., Majchrzak, M., and Cassel, J.C. 2007. Combined damage to entorhinal cortex and cholinergic basal forebrain neurons, two early neurodegenerative features accompanying Alzheimer's disease: effects on locomotor activity and memory functions in rats. *Neuropsychopharmacology* **32**: 851-871.

Tulving, E. (1972). Episodic and semantic memory. (Tulving E, et Donaldson W, Eds.) *Organization of memory*. pp. 381-403. New York: Academic Press.

Tyler, S.J., Dawbarn, D., Wilcock, G.K., and Allen, S.J. 2002. alpha- and beta-secretase: profound changes in Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **299**: 373-376.

-U-

Ueki, A., Kawano, M., Namba, Y., Kawakami, M., and Ikeda, K. 1993. A high frequency of apolipoprotein E4 isoprotein in Japanese patients with late-onset nonfamilial Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **163**: 166-168.

Ulery, P.G., Beers, J., Mikhailenko, I., Tanzi, R.E., Rebeck, G.W., Hyman, B.T., and Strickland, D.K. 2000. Modulation of beta-amyloid precursor protein processing by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence that LRP contributes to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **275**: 7410-7415.

Upchurch, M. and Wehner, J.M. 1989. Inheritance of spatial learning ability in inbred mice: a classical genetic analysis. *Behav. Neurosci.* **103**: 1251-1258.

Uttal, W.R. 2000. Summary: let's pay attention to attention. *J. Gen. Psychol.* **127**: 100-111.

-V-

Van Hoesen, G.W., Augustinack, J.C., Dierking, J., Redman, S.J., and Thangavel, R. 2000. The parahippocampal gyrus in Alzheimer's disease. Clinical and preclinical neuroanatomical correlates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **911**: 254-274.

Van Strien, N.M., Cappaert, N.L., and Witter, M.P. 2009. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**: 272-282.

Van Cauter, T., Poucet, B., and Save, E. 2008. Delay-dependent involvement of the rat entorhinal cortex in habituation to a novel environment. *Neurobiol. Learn. Mem.* **90**: 192-199.

Van Groen T. 2001. Entorhinal cortex of the mouse: cytoarchitectonical organization. *Hippocampus* **11**: 397-407.

Van Groen, T., Miettinen, P., and Kadish, I. 2003. The entorhinal cortex of the mouse: organization of the projection to the hippocampal formation. *Hippocampus* **13**: 133-149.

Van Meer P., Acevedo, S., and Raber, J. 2007. Impairments in spatial memory retention of GFAP-*apoE4* female mice. *Behav. Brain Res.* **176**: 372-375.

Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M.A., Biere, A.L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J.C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., and Citron, M. 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* **286**: 735-741.

Vogels, O.J., Broere, C.A., ter Laak, H.J., ten Donkelaar, H.J., Nieuwenhuys, R., and Schulte, B.P. 1990. Cell loss and shrinkage in the nucleus basalis Meynert complex in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **11**: 3-13.

-W-

Waite, J.J., Wardlow, M.L., Chen, A.C., Lappi, D.A., Wiley, R.G., and Thal, L.J. 1994. Time course of cholinergic and monoaminergic changes in rat brain after immunolesioning with 192 IgG-saporin. *Neurosci. Lett.* **169**: 154-158.

Waite, J.J., Chen, A.D., Wardlow, M.L., Wiley, R.G., Lappi, D.A., and Thal, L.J. 1995. 192 immunoglobulin G-saporin produces graded behavioral and biochemical changes accompanying the loss of cholinergic neurons of the basal forebrain and cerebellar Purkinje cells. *Neuroscience* **65**: 463-476.

Waite, J.J. and Thal, L.J. 1996. Lesions of the cholinergic nuclei in the rat basal forebrain: excitotoxins vs. an immunotoxin. *Life Sci.* **58**: 1947-1953.

Waite, J.J., Wardlow, M.L., and Power, A.E. 1999. Deficit in selective and divided attention associated with cholinergic basal forebrain immunotoxic lesion produced by 192-saporin; motoric/sensory deficit associated with Purkinje cell immunotoxic lesion produced by OX7-saporin. *Neurobiol. Learn. Mem.* **71**: 325-352.

Walsh, D.M. and Selkoe, D.J. 2007. A beta oligomers - a decade of discovery. *J. Neurochem.* **101**: 1172-1184.

Walsh, T.J., Herzog, C.D., Gandhi, C., Stackman, R.W., and Wiley, R.G. 1996. Injection of IgG 192-saporin into the medial septum produces cholinergic hypofunction and dose-dependent working memory deficits. *Brain Res.* **726**: 69-79.

Warburton, E.C., Baird, A.L., Morgan, A., Muir, J.L., and Aggleton, J.P. 2000. Disconnecting hippocampal projections to the anterior thalamus produces deficits on tests of spatial memory in rats. *Eur. J. Neurosci.* **12**: 1714-1726.

Warburton, E.C., Koder, T., Cho, K., Massey, P.V., Duguid, G., Barker, G.R., Aggleton, J.P., Bashir, Z.I., and Brown, M.W. 2003. Cholinergic neurotransmission is essential for perirhinal cortical plasticity and recognition memory. *Neuron* **38**: 987-996.

Ward-Robinson, J., Coutureau, E., Honey, R.C., and Killcross, A.S. 2005. Excitotoxic lesions of the entorhinal cortex leave gustatory within-event learning intact. *Behav. Neurosci.* **119**: 1131-1135.

Weiner, I., Gal, G., Rawlins, J.N., and Feldon, J. 1996. Differential involvement of the shell and core subterritories of the nucleus accumbens in latent inhibition and amphetamine-induced activity. *Behav. Brain Res.* **81**: 123-133.

Weisgraber, K.H. and Mahley, R.W. 1996. Human apolipoprotein E: the Alzheimer's disease connection. *FASEB J.* **10**: 1485-1494.

Wengenack, T.M., Whelan, S., Curran, G.L., Duff, K.E., and Poduslo, J.F. 2000. Quantitative histological analysis of amyloid deposition in Alzheimer's double transgenic mouse brain. *Neuroscience* **101**: 939-944.

Weniger, G., Ruhleder, M., Lange, C., Wolf, S., and Irle, E. 2011. Egocentric and allocentric memory as assessed by virtual reality in individuals with amnesic mild cognitive impairment. *Neuropsychologia* **49**: 518-527.

- Wenk, G.L., Stoehr, J.D., Mobley, S.L., Gurney, J., and Morris, R.J. 1996. Age-related decrease in vulnerability to excitatory amino acids in the nucleus basalis. *Neurobiol. Aging* **17**: 1-7.
- Wenk, H., Bigl, V., and Meyer, U. 1980. Cholinergic projections from magnocellular nuclei of the basal forebrain to cortical areas in rats. *Brain Res.* **2**: 295-316.
- Whishaw, I.Q. and Tomie, J. 1996. Of mice and mazes: similarities between mice and rats on dry land but not water mazes. *Physiol Behav.* **60**: 1191-1197.
- White, F., Nicoll, J.A., Roses, A.D., and Horsburgh, K. 2001. Impaired neuronal plasticity in transgenic mice expressing human apolipoprotein E4 compared to E3 in a model of entorhinal cortex lesion. *Neurobiol. Dis.* **8**: 611-625.
- Whitwell, J.L., Przybelski, S.A., Weigand, S.D., Knopman, D.S., Boeve, B.F., Petersen, R.C., and Jack, C.R., Jr. 2007. 3D maps from multiple MRI illustrate changing atrophy patterns as subjects progress from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Brain* **130**: 1777-1786.
- Wiener, S.I., Paul, C.A., and Eichenbaum, H. 1989. Spatial and behavioral correlates of hippocampal neuronal activity. *J. Neurosci.* **9**: 2737-2763.
- Wiener, S.I. 1993. Spatial and behavioral correlates of striatal neurons in rats performing a self-initiated navigation task. *J. Neurosci.* **13**: 3802-3817.
- Wiley, R.G., Oeltmann, T.N., and Lappi, D.A. 1991. Immunolesioning: selective destruction of neurons using immunotoxin to rat NGF receptor. *Brain Res.* **562**: 149-153.
- Wiley, R.G., Berbos, T.G., Deckwerth, T.L., Johnson, E.M., Jr., and Lappi, D.A. 1995. Destruction of the cholinergic basal forebrain using immunotoxin to rat NGF receptor: modeling the cholinergic degeneration of Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* **128** : 157-166.
- Wilkinson, L.S., Mittleman, G., Torres, E., Humby, T., Hall, F.S., and Robbins, T.W. 1993. Enhancement of amphetamine-induced locomotor activity and dopamine release in nucleus accumbens following excitotoxic lesions of the hippocampus. *Behav. Brain Res.* **55**: 143-150.
- Wilson, M.A. and McNaughton, B.L. 1993. Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. *Science* **261**: 1055-1058.
- Winer B. 1971. Statistical principles in experimental design. McGraw-Hill, New York.
- Winters, B.D. and Bussey, T.J. 2005. Removal of cholinergic input to perirhinal cortex disrupts object recognition but not spatial working memory in the rat. *Eur. J. Neurosci.* **21**: 2263-2270.
- Wisniewski, T., Castano, E.M., Golabek, A., Vogel, T., and Frangione, B. 1994. Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro. *Am. J. Pathol.* **145**: 1030-1035.
- Witter, M.P., Wouterlood, F.G., Naber, P.A., and van, H.T. 2000. Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **911**: 1-24.
- Witter, M.P. et Amaral, D.G. 2004. *Hippocampal formation*. In "The rat nervous system, third edition" (Paxinos, G., Ed.), Chap21, Academic Press, San Diego.
- Witter, M.P. and Moser, E.I. 2006. Spatial representation and the architecture of the entorhinal cortex. *Trends Neurosci.* **29**: 671-678.
- Wong, T.P., Debeir, T., Duff, K., and Cuellar, A.C. 1999. Reorganization of cholinergic terminals in the cerebral cortex and hippocampus in transgenic mice carrying mutated presenilin-1 and amyloid precursor protein transgenes. *J. Neurosci.* **19**: 2706-2716.

Wonnacott, S. 1997. Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci.* **20**: 92-98.

Wood, J.L. and Allison, R.G. 1982. Effects of consumption of choline and lecithin on neurological and cardiovascular systems. *Fed. Proc.* **41**: 3015-3021.

-X-

Xu, P.T., Schmechel, D., Rothrock-Christian, T., Burkhart, D.S., Qiu, H.L., Popko, B., Sullivan, P., Maeda, N., Saunders, A.M., Roses, A.D., and Gilbert, J.R. 1996. Human apolipoprotein E2, E3, and E4 isoform-specific transgenic mice: human-like pattern of glial and neuronal immunoreactivity in central nervous system not observed in wild-type mice. *Neurobiol. Dis.* **3**: 229-245.

Xu, Q., Bernardo, A., Walker, D., Kanegawa, T., Mahley, R.W., and Huang, Y. 2006. Profile and regulation of apolipoprotein E (ApoE) expression in the CNS in mice with targeting of green fluorescent protein gene to the ApoE locus. *J. Neurosci.* **26**: 4985-4994.

-Y-

Yang, D.S., Smith, J.D., Zhou, Z., Gandy, S.E., and Martins, R.N. 1997. Characterization of the binding of amyloid-beta peptide to cell culture-derived native apolipoprotein E2, E3, and E4 isoforms and to isoforms from human plasma. *J. Neurochem.* **68**: 721-725.

Ye, S., Huang, Y., Mullendorff, K., Dong, L., Giedt, G., Meng, E.C., Cohen, F.E., Kuntz, I.D., Weisgraber, K.H., and Mahley, R.W. 2005. Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid beta peptide production in cultured neuronal cells: apoE structure as a potential therapeutic target. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**: 18700-18705.

Yonelinas, A.P., Kroll, N.E., Quamme, J.R., Lazzara, M.M., Sauve, M.J., Widaman, K.F., and Knight, R.T. 2002. Effects of extensive temporal lobe damage or mild hypoxia on recollection and familiarity. *Nat. Neurosci.* **5**: 1236-1241.

-Z-

Zakzanis, K.K., Quintin, G., Graham, S.J., and Mraz, R. 2009. Age and dementia related differences in spatial navigation within an immersive virtual environment. *Med. Sci. Monit.* **15**: CR140-CR150.

Zlokovic, B.V. 2008. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* **57**: 178-201.

ANNEXES

PUBLICATION 3

Bour A., Grootendorst J., Vogel E., Kelche C., Dodart J-C.,

Bales K., Moreau P-H., Sullivan P-M., Mathis C.

**Middle-aged human apoE4 targeted-replacement mice show retention
deficits on a wide range of spatial memory tasks.**

Behavioural brain research (2008), 193(2): 174-82.



Research report

Middle-aged human apoE4 targeted-replacement mice show retention deficits on a wide range of spatial memory tasks

Alexandra Bour^a, Jeannette Grootendorst^a, Elise Vogel^a, Christian Kelche^a, Jean-Cosme Dodart^c, Kelly Bales^c, Pierre-Henri Moreau^a, Patrick M. Sullivan^b, Chantal Mathis^{a,*}

^a Laboratoire de Neurosciences Comportementales et Cognitives, Université Louis Pasteur, CNRS-UMR 7191, IFR 37, GDR CNRS 2905, 12 rue Goethe, 67000 Strasbourg, France

^b Department of Medicine, Division of Geriatrics and Center for Aging, Duke University, Durham, NC 27710, USA

^c Neuroscience Discovery Research, Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN 46285, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 May 2008

Accepted 12 May 2008

Available online 18 May 2008

Keywords:

ApoE isoform
Gene-targeted mouse
Spatial memory
Avoidance response
Gender differences
Knock-in mouse
Alzheimer's disease
Cognitive decline

ABSTRACT

Apolipoprotein (apo) E4, one of three human apoE (h-apoE) isoforms, has been identified as a major genetic risk factor for Alzheimer's disease and for cognitive deficits associated with aging. However, the biological mechanisms involving apoE in learning and memory processes are unclear. A potential isoform-dependent role of apoE in cognitive processes was studied in human apoE targeted-replacement (TR) mice. These mice express either the human apoE3 or apoE4 gene under the control of endogenous murine apoE regulatory sequences, resulting in physiological expression of h-apoE in both a temporal and spatial pattern similar to humans. Male and female apoE3-TR, apoE4-TR, apoE-knockout and C57BL/6J mice (15–18 months) were tested with spatial memory and avoidance conditioning tasks. Compared to apoE3-TR mice, spatial memory in female apoE4-TR mice was impaired based on their poor performances in; (i) the probe test of the water-maze reference memory task, (ii) the water-maze working memory task and (iii) an active avoidance Y-maze task. Retention performance on a passive avoidance task was also impaired in apoE4-TR mice, but not in other genotypes. These deficits in both spatial and avoidance memory tasks may be related to the anatomical and functional abnormalities previously reported in the hippocampus and the amygdala of apoE4-TR mice. We conclude that the apoE4-TR mice provide an excellent model for understanding the mechanisms underlying apoE4-dependent susceptibility to cognitive decline.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

There is widespread agreement that the function of hepatocyte secreted apolipoprotein (apo) E is to maintain lipid homeostasis, however the function of astrocyte secreted apoE remains equivocal. Many theories abound to explain the function of brain apoE, including lipid homeostasis [1,2], neural regeneration and remodeling [3,4], immunomodulation and mediating estrogen effects [5–8]. In humans, three major isoforms of apoE (apoE2, apoE3 and apoE4) result from three allelic variants (ϵ 2, ϵ 3 and ϵ 4) of a single gene on chromosome 19. This APOE genetic polymorphism influences the prevalence of cardiovascular and Alzheimer's disease (AD) ([9–11], also for reviews [12,13]). Indeed, apoE4 has been identified as the most significant genetic risk factor for AD and also appears associ-

ated with increased cognitive decline in healthy elderly individuals [14–16]. Memory decline associated with the APOE4 genotype has also been reported in middle-aged populations [17–19], and seems to be particularly pronounced in women at post-menopausal ages [20–22].

Our understanding of how apoE influences behavior was first investigated in transgenic apoE animal models which expressed human apoE under the control of either the neuron-specific-enolase (NSE) or glial-fibrillary-acidic-protein (GFAP) promoters. NSE-apoE4 mice showed an age- and sex-dependent spatial learning impairment compared to NSE-apoE3 mice [6,7,23]. Compared to their GFAP-apoE3 counterparts, spatial working memory deficits appeared in GFAP-apoE4 males only at an age of 11–14 months, whereas spatial memory retention was already affected in 6-month-old GFAP-apoE4 females [24,25]. Thus, an isoform-dependent effect of apoE on cognition could be observed regardless of whether the human apoE gene was expressed under the control of the neuronal or the glia-specific promoter. However, these mouse lines show varying levels of transgene expression and/or no physiological distribution of human apoE due to non-physiological

* Corresponding author at: Laboratoire d'Imagerie de Neurosciences Cognitives, Université Louis Pasteur, CNRS-UMR-7191, 12 rue Goethe, 67000 Strasbourg, France. Tel.: +33 390 24 18 76; fax: +33 390 24 19 58.

E-mail address: chantal.mathis@inc.u-strasbg.fr (C. Mathis).

promoters. Human apoE targeted-replacement (TR) mice were created using a gene targeting strategy, which allows the physiological expression of human apoE isoforms without disturbing any of the known regulatory sequences [26]. Our initial work assessed the behavioral phenotype of young (4–5 months) apoE TR mice using a battery of behavioral tests to measure cognitive ability [27]. Briefly, only female apoE4-TR mice showed impaired spatial recognition memory compared to apoE3-TR mice. Additionally, apoE4-TR mice showed poor performance during the probe trial in the water-maze reference memory task. These results support the hypothesis that apoE4 has a deleterious effect on spatial cognitive processes.

In this study, we asked whether the early memory deficits in the apoE4-TR mice worsen with age as observed in humans. Thus, we tested 15-month-old apoE-TR mice in the same behavioral paradigms used in the young cohort. Human apoE4 carriers show deficits in recognition memory, memory for location, delayed recall, working memory, new learning and episodic memory [17,18,20,28,29]. Thus, apoE-TR mice were tested in learning and memory tasks testing similar forms of memory. These included; (i) a spatial object recognition task, (ii) acquisition and delayed memory retention evaluations in a spatial reference memory task, (iii) a delayed matching to place (DMP) task requiring working memory (trial 1 to trial 2), episodic-like memory and a new learning within each daily session [30] and (iv) two avoidance tasks testing long-term memory retention. Since gender-dependent effects of apoE on cognitive abilities have been described in both humans and transgenic apoE mice, we examined both male and female mice [6,21]. C57BL/6J and apoE deficient (–/–) mice were included in the study to compare expression of mouse apoE and lack of apoE to human apoE isoform specific expression. Since our study of the young cohorts showed smaller differences between genotypes, as seen in humans without disease [20,21,31], we applied statistical analyses limited to within-genotype group effects and apoE3-TR/apoE4-TR restricted comparisons in addition to those including the four genotypes.

2. Materials and methods

2.1. Origin of the mice

The apoE TR mice were created by replacing the mouse apoE gene with either APOE*3 or APOE*4 genomic fragments of human alleles using mouse embryonic stem cells as described previously [32,33]. The parental mice of either apoE3-TR or apoE4-TR lines used in this study were backcrossed for eight generations to C57BL/6J. ApoE–/– mice were included as a control to study the absence of apoE, and the C57BL/6J mice were included to compare the expression of mouse apoE to the expression human apoE. The apoE–/– mice have also been backcrossed to C57BL/6J for at least nine generations. ApoE–/– (apoE^{tm1Unc}/C57BL/6J) and C57BL/6J mice were purchased from Charles River Laboratories (IFFA CREDO, France). Experimental mice of all genotypes were bred in our own animal facilities in order to avoid stress related to local or overseas shipping. Breeding was kept within two generations to avoid genetic background divergence. Male and female cohorts were littermates for 56% and 78%, respectively. Upon weaning, all mice received electronic chips subcutaneously (ABBI Sarl, France) for identification purposes. Identity was regularly checked when changing cages and during testing periods. No discrepancy with conventional cage label was ever noted.

2.2. Housing and testing of the mice

All mice were group housed with littermates in the breeding room (12-h light:12-h dark cycle, lights on 07:00–19:00; food and tap water available *ad libitum*). All experimental mice were fed a Normal Diet formulation (crude proteins 22%, crude fat 4.3%, crude fiber 4% and ash 5.5%; A03 from UAR France). At 15 months of age, mice were weighed and housed individually on day 1 of the testing schedule. One week later, mice were daily weighed and handled for 2–3 min (days 6–11). Then, mice were successively tested in a spatial recognition task in an open field, in a spatial reference memory task, a spatial DMP task and a visible platform task in a water-maze, a Y-maze active avoidance task, a step-through passive avoidance task and a footshock threshold determination. The sequence of behavioral tasks followed the principle of testing from the least to the most invasive, and from the most to the least sensitive to prior test history [34,35]. This battery of task has been successfully

pre-tested on C57BL/6J and apoE–/– male mice before being applied to a cohort similar in origin, housing, genetic background, sex and group size, but younger (4–5 months old), than those used in the present study [27]. The experimenter was blind to the genotype of the mice under examination throughout the whole testing period. In between the tasks, mice were left undisturbed for 1–2 weeks. In order to minimize sex-related effects of recent olfactory traces on behavior, male and female mice were tested separately, 4 weeks apart, with the testing devices being cleaned thoroughly with alcohol between male and female series. Indeed, our testing schedule allowed 32 mice, all males or all females, to be tested in one series (i.e., testing began with eight mice per genotype). Three mice were excluded from statistical analysis for all tasks except the initial spatial recognition one. Indeed, two apoE–/– males and one apoE3-TR female progressively developed extensive cutaneous lesions, presumably related to severe xanthomas. These lesions were associated to intensive scratching and increasingly altered swimming and locomotion. Mice were weighed after completion of testing, on day 81. Weight of day 81 minus weight of day 1 (Wt81 – Wt1) was calculated for each mouse to evaluate the weight evolution over the testing period.

All experiments were performed during the light period. All procedures involving animals were conducted in conformity with the institutional guidelines that are in compliance with national (council directive #87–848, 19 October 1987, Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animales; animal experimentation permissions #67–292 to C.M. and #67–217 to C.K.; A.B., P.-H.M. and J.G. under the responsibility of the former persons) and international (European Communities Council Directive of 24 November 1986; 86/609/EEC) laws and policies. All efforts were made to reduce the number of subjects used to a minimum regarding statistical constraints, and to minimize suffering throughout the experiments. The project received an assent registered #3570 from the Ministère de la Recherche (2 November 2000) and the approval of the Commission de Génie Génétique (7 September 2000).

2.3. Spatial recognition task (days 12–15)

The spatial recognition task is based on the spontaneous tendency of mice to explore preferentially displaced versus non-displaced objects from a familiar arrangement of objects [36,37]. The apparatus consisted of a Plexiglas open field (52 cm × 52 cm) with black walls (40 cm high) and a translucent floor divided into 25 equal squares by black lines. The floor was dimly illuminated by a 60 W bulb, placed 32 cm centrally underneath. At the mouse level, it resulted in 50 lx (corners) to 100 lx (center) light intensity. A black and white striped card (21 cm × 29.7 cm) was fixed against one wall. We used five objects different in shape (size ranging from 2.4 to 3.8 cm), color and material (a glass black marble, a porcelain thimble, a gray plastic toothed wheel, a white plastic rod on a blue rectangular counter, and a red plastic half gear wheel).

Mice were submitted to three exploration phases separated by 5-min resting periods in their home cage. The task began with a 5-min habituation period in an empty open-field, a 15-min acquisition phase in presence of an arrangement of five different objects, and a 15-min retention phase with a new arrangement of an identical set of object, two of them being relocated. Thus, two categories of objects were considered: the displaced objects (marble and gray wheel) and the non-displaced objects (thimble, rod on counter and red wheel). Object exploration was defined as the mouse nose pointing to the object at a distance less than 1 cm. The amount of time spent exploring each category of objects was recorded with stopwatches over the 15-min phases. These values were divided by the number of objects for each category in order to obtain the mean exploration time for displaced objects (D) and non-displaced objects (ND). We analyzed spatial recognition performance in terms of a spatial recognition index for two reasons: (i) as a ratio of exploration duration: D/(D + ND), it is independent from the duration of exploration which might differ among groups and (ii) it was also adopted in our previous study on a younger cohort, and therefore enables some comparisons for the reader [27]. Total exploration over the two categories of objects (2D + 3ND) provided an indication on the mice reaction towards the whole set of objects during each phase. Locomotor activity was evaluated in terms of distance traveled (expressed in cm/5 min period for each phase) by means of a videotracking system (Ethovision 2.3, Noldus Information Technology, The Netherlands). We verified that the two categories of objects, D and ND, were equally explored by the mice during the acquisition session in order to avoid a bias due to spontaneous preference for an object or a set of objects.

2.4. Water-maze task (days 21–36)

Mice were weighed daily before the first trial in the water-maze (diameter: 140 cm; platform size: 10 cm; water temperature: 19 ± 1 °C). The water was made opaque by the addition of milk powder and the milky water was changed daily. All tasks proposed to our mice consisted in finding a platform to escape from the water. Trajectories were recorded and analyzed with the videotracking system (Noldus, The Netherlands). When the mouse did not find the platform, it was gently guided and allowed to stay on it for 10 s. Once the mouse voluntarily climbed on a transporting grid, it was placed in its home cage under a red heating lamp to prevent hypothermia.

During the first week, mice were trained in the *spatial reference memory protocol*. They first received a water adaptation trial (a 1-min walk in 2-cm deep water with a

visible platform) on day 21 followed by a 120-s free swim trial (no platform present) on day 22. Spatial reference memory training *per se* began on day 25. Mice received four trials a day for 4 consecutive days with the submerged platform always on the same location (center of the west virtual quadrant). Each trail started from one of four possible start positions, the sequence of which varied daily. Three mice were tested within a 20–30-min session which resulted in an inter-trial-interval (ITI) of 5–10 min. The day following the end of reference memory training (day 29), mice were subjected to a probe trial (60 s, no platform) in order to examine their long-term spatial memory performance.

After a 2-day resting period, mice were trained on a *DMP protocol* using the same water-maze (adapted from [38]). From day 32 to 35, the position of the submerged platform varied daily from one quadrant center to the other (sequence: east, north, south and west quadrants). Mice started from one of two possible starting points, both opposite and equidistant to the platform's position. Again, training consisted of four trials a day for 4 consecutive days. An ITI of 1 h was set between trials 1 and 2 and then 5-min ITIs between trials 2–3 and 3–4. This protocol was used to determine retention memory after a 1-h delay between trials 1 and 2. The remaining trials with short ITIs allowed all groups to reach a common level of performance by the end of each daily session.

The day after completion of the DMP task, mice were tested for their visual/motivational abilities in a *visible platform task*. For each of the four trials, the position of the visible platform (1 cm above the water surface) changed from one quadrant center to the other. The start position changed as well, but remained at the same distance from the platform. All trials were recorded and analyzed with the videotracking system.

2.5. Y-maze task (days 46–49)

Two weeks after the last water-maze trial, mice were subjected to the Y-maze avoidance learning task which involves procedural memory with a place discrimination component and a temporal component. The procedural aspect of this task lies in the need of a large number of trials to learn a specific motor response (go to the left alley within 5 s) and the existence of a spontaneous improvement of performance (also called “off-line” improvement) on the temporal component of the task. This improvement, which develops several hours after initial training in C57BL/6J and other mouse strain, is known to be extremely sensitive to amnesic agents [39,40]. Mice were trained in a transparent Plexiglas apparatus with three identical arms in a Y shape. At the end of each alley (13 cm × 4.5 cm × 5.5 cm) was a mobile box (10 cm × 4.5 cm × 5.5 cm), which allowed to transport the mouse from the goal alley to the start position without having to handle it. In each trial, the mouse had to leave the start-alley of the maze within 5 s (temporal component) and had to choose the left alley (discrimination component) to avoid footshocks. Therefore, a mouse could make two types of errors within a trial: an active avoidance error when it failed to leave the start alley within 5 s and/or a discrimination error when it chose the wrong alley. Footshocks were delivered every 7 s until the mouse entered the right alley. The footshock level was individually set (maximum 40 V, ac) over the first trial or two in such a way that the mouse lifted suddenly one or two paws from the grid. The mouse underwent one trial every minute until it reached a criterion of seven correct out of eight consecutive trials. Retention memory performance was tested 48 h later with the same criterion and the same individually set footshock level. Avoidance errors and discrimination errors were recorded in order to evaluate the mouse performance on both the temporal component and the discrimination component of the task, respectively.

2.6. Passive avoidance task (days 55–57)

One week after the Y-maze task, mice were tested in a step-through passive avoidance task. The apparatus consisted of a light, white compartment

(8 cm width × 23 cm long × 14 cm high) and a dark, black compartment (8 cm width × 15 cm long × 14 cm high) separated by a guillotine door. During the acquisition trial, the mouse was placed in the light compartment. The door was opened 1 min later. The time to enter the dark compartment was recorded. Once all four paws were in the dark compartment, the door was closed and the mouse immediately received two footshocks (40 V, ac; 0.3 s duration; 5 s apart). After 15 s, the mouse was removed from the dark compartment, and returned to its home cage. The mouse was placed back into the light compartment 24 h later. After 10 s, the door was opened and the following measures were taken over 10 min: (1) latency to enter the dark compartment; (2) number of black/white compartment transitions; (3) total time spent in the black compartment. The mouse was always placed against the wall opposite to the dark compartment, so it had to cross the white compartment to reach the guillotine door. Approach behavior towards the dark compartment was evaluated through the latency to cross the white compartment (all four paws in the second half of this compartment).

2.7. Footshock sensitivity threshold (days 63–64)

One week after the passive avoidance task, the threshold for footshock sensitivity was determined with the same apparatus than that used in the passive avoidance paradigm. This test was conducted to verify that our different mouse lines had similar footshock sensitivity threshold. Indeed, since the level of footshock used in the passive avoidance task was fixed (40 V), the occurrence of different levels of retention performance could have potentially been interpreted as due to different sensitivities to the footshocks. The mouse was placed in a long black alley (8 cm width × 50 cm long × 14 cm high). The level of footshocks was progressively increased (2 V intervals) starting at 16 V with a maximum of 40 V. Mice received shocks of increasing voltage every 15–45 s until a footshock induced a flight response. This level of footshock was considered as the threshold of the mouse.

2.8. Statistics

Because the *e4* allele effect on learning and memory performance is discrete in humans [20,21,31], we suspected that the inter-group differences could be small in apoE-TR mice. Therefore, and despite a large number of statistical test performed, we adopted a level of significance of 0.05 to improve the sensitivity of this exploratory study. Most data were subjected to ANOVA, with two factors (sex and genotype) and, when appropriate, a repeated measure factor (day or trial). Significant genotype effects were further analyzed by means of a Fisher's PLSD post hoc test. As male and female cohorts were tested in close succession, but separately, additional analyses were also performed within each sex. Since the most crucial issue of the present work consisted in the detection of h-apoE-isoform-related effects, complementary analyses were restricted to apoE3-TR and apoE4-TR mouse lines. The time spent in the platform quadrant during the water-maze probe trial was also compared to chance level (a 15 s time) by means of a within-group *t*-test. In some cases, the Spearman rank correlation test was applied to the whole population, as well as sex, genotype and individual experimental groups. Results are presented as mean ± S.E.M.

3. Results

3.1. Bodyweight

On day 1, when mice were 15 months old, their weight differed among genotypes ($F(3,53) = 8.68$, $P < 0.0001$, see Table 1). The apoE4-TR mice were heavier than those of the other lines ($P \leq 0.004$

Table 1
For each mouse line and each sex, the table presents the results concerning body weight, probe trial in the water-maze and footshock level determination in the avoidance tasks

	Body weight (g)		Spatial recognition task	Water-maze (probe trial)		Y-maze active avoidance task	Footshock voltage (V)
	Day 1	Weight loss	Recognition index	Time in the correct quadrant target	Mean time in the other quadrants	Footshock threshold (V)	
apoE3-TR ♂	42.25 ± 1.85	3.34 ± 1.97	0.59 ± 0.01 [#]	21.30 ± 1.95 [#]	12.90 ± 0.65	46.00 ± 0.57 ⁵	32.50 ± 1.95
♀	30.71 ± 1.89 ^{**}	1.50 ± 0.61	0.45 ± 0.05	24.57 ± 4.82	11.81 ± 1.60	43.71 ± 0.52	26.86 ± 2.22
apoE4-TR ♂	45.38 ± 2.39	0.63 ± 1.53	0.55 ± 0.01 [#]	23.45 ± 2.35	12.18 ± 0.78	44.62 ± 1.05 ⁵	32.25 ± 1.16
♀	38.38 ± 1.29	3.00 ± 1.25	0.59 ± 0.04	17.85 ± 3.08 [#]	14.05 ± 1.03	43.00 ± 1.25	25.75 ± 1.90
C57BL/6J ♂	40.00 ± 1.12	0.19 ± 0.99	0.56 ± 0.02 [#]	22.58 ± 3.21 [#]	12.47 ± 1.07	46.50 ± 1.40 ⁵	33.25 ± 1.25
♀	31.13 ± 1.46 ^{**}	0.38 ± 1.12	0.54 ± 0.01	21.88 ± 4.97	12.71 ± 1.66	43.25 ± 0.73	22.00 ± 1.56
apoE-/- ♂	35.00 ± 2.24 ^{**}	0.83 ± 1.22	0.58 ± 0.02 [#]	21.33 ± 4.04	12.89 ± 1.35	37.50 ± 2.14	31.67 ± 2.09
♀	32.38 ± 1.03 [*]	3.06 ± 1.55	0.64 ± 0.04 [#]	25.18 ± 3.92 [#]	11.61 ± 1.31	43.50 ± 0.85	28.50 ± 2.89

D1 weight: ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.005$, significantly different from apoE4-TR mice within a sex. Recognition index and time in target quadrant: [#] $P \leq 0.05$, compared to chance level. Y-maze footshock voltage: ⁵ $P < 0.001$, significantly different from apoE-/- mice within a sex. Values are expressed as mean ± S.E.M.

vs. each other line). Females were much lighter than males over the whole population ($F(1,53)=39.06, P<0.0001$). The weight of apoE4-TR mice was confirmed to be the highest even within each sex (females: $F(3,27)=6.31, P=0.002$; males: $F(3,26)=4.62, P=0.010$). The whole population showed a slight loss of weight over the 81-day testing period (whole population and TR-restricted analyzes: no sex or genotype effect, no interaction).

3.2. Spatial recognition

3.2.1. Exploratory activity in the open field (data not illustrated)

During the 5-min habituation phase, the distance traveled by apoE3-TR mice was higher than that of other lines ($F(3,56)=10.89, P<0.0001$; apoE3-TR line vs. each other line: $P\leq 0.006$). This genotype effect was confirmed at each level of our analysis (whole population: females $F(3,28)=3.93, P=0.018$, apoE3-TR vs. apoE4-TR and apoE-/- lines $P\leq 0.029$, males $F(3,28)=11.49, P<0.0001$, apoE3-TR vs. each other line $P<0.0001$; TR-restricted: $F(1,28)=20.66, P<0.0001$). Over the whole population, females were generally more active than males ($F(1,56)=8.78, P=0.004$). During the 15-min acquisition phase, apoE3-TR mice still traveled a longer distance than mice of other lines (whole population: $F(3,56)=3.71, P=0.017$; apoE3-TR line vs. each other line: $P\leq 0.042$; TR-restricted: $F(1,28)=7.44, P=0.011$). During this second testing phase, when objects were present in the open field, the sex effect disappeared as females were even slightly less active than males (whole population: $F(1,56)=3.78, P=0.057$; TR-restricted: $F(1,28)=3.41, P=0.075$). During the 15-min retention phase, the locomotor activity of the apoE3-TR line was still higher than that from other mouse lines, but this effect was not significant. Females were clearly less active than males during this last testing phase (whole population: $F(1,56)=11.45, P=0.001$; TR-restricted: $F(1,28)=8.81, P=0.006$).

In summary, apoE3-TR mice showed high levels of locomotor activity, especially during initial phases of the task. Females were more active during the habituation phase, but tended to be less active than males on the following phases in the presence of objects.

During the acquisition phase and the retention phase, the exploration of the whole set of objects differed significantly among genotypes (acquisition: $F(3,56)=3.60, P=0.019$; retention: $F(3,56)=3.33, P=0.026$). During the acquisition phase, apoE3-TR mice explored more than apoE-/- mice ($P=0.003$). During the retention phase, both TR lines explored more than the C57BL/6J line and the apoE-/- line (apoE3-TR vs. C57BL/6J and apoE-/-: $P\leq 0.049$; apoE4-TR vs. apoE-/-: $P=0.022$). Whatever the phase considered, total object exploration of apoE3-TR and apoE4-TR mice did not differ (even in TR-restricted analyzes). The males explored much more than the females independently from genotype (whole population: acquisition $F(1,56)=23.12, P<0.0001$, retention $F(1,56)=25.13, P<0.0001$; TR-restricted: acquisition $F(1,28)=12.46, P=0.001$, retention $F(1,28)=13.82, P=0.0009$). Interestingly, there is a correlation between the distance traveled and the total object exploration within each phase for the whole population, each sex group and each genotype group (Spearman rank test: $z\geq 2.12, P\leq 0.034$), except for the C57BL/6J line and males during the retention phase. These results confirm our choice to use the spatial recognition index because it is independent from the duration of exploration and it did not correlate with the distance traveled during the retention phase whatever be the group: whole population, each sex or each genotype (Spearman rank test: $z\leq 1.11, P\geq 0.26$).

3.2.2. Recognition of a spatial configuration of objects

As expected from above, the use of a spatial recognition index avoided a locomotor activity related bias as males and females globally performed similarly ($F(1,56)=0.37, P=0.55$). However, as

shown in Table 1, the performances of males and females differed depending on the genotype (whole population: $F(3,56)=4.08, P=0.011$), although this sex effect was significant only in apoE3-TR mice ($F(1,14)=8.26, P=0.012$). There was no clear effect of genotype (whole population: $F(3,56)=2.41, P=0.076$). All male groups reacted to the spatial rearrangement of the objects (males: $F(3,28)=1.28, P=0.30$). Conversely, there was a greater index variability in female groups ($F(3,28)=1.28, P=0.026$), with that of apoE3-TR females appearing below chance level and that of apoE-/- females expressing the best performance. The performance of females appeared less stable than that of males (see high standard errors in Table 1). We may have reached the limits of accuracy in measuring the performance of middle-aged females in this task.

3.3. Water-maze

3.3.1. Swim speed in the water-maze (data not illustrated)

In the free swim trial before training, apoE3-TR mice tended to swim slower than mice of other genotypes (whole population: $F(3,53)=2.70, P=0.055$; TR-restricted: $F(1,27)=4.70, P=0.039$; C57BL/6J: 16.6 ± 0.6 cm/s; apoE-/-: 15.6 ± 0.3 cm/s; apoE3-TR: 14.8 ± 0.6 cm/s; apoE4-TR: 16.6 ± 0.6 cm/s). There was no effect of sex or interaction with sex. During the probe test, there was no significant difference in swim speed between genotypes, sex and no interaction between these factors. Since genotypes differed in terms of swim speed at the beginning of water-maze testing, we chose to illustrate our water-maze data in terms of distance traveled rather than latency to reach the platform. It is noteworthy that the statistical analyses of both sets of data led to similar patterns of effects and interactions.

3.3.2. Reference memory training in the water-maze

During training in the reference memory task, the platform was situated in the center of the west quadrant of the pool. The distance traveled was similar among genotypes and sex on the very first trial. As the training proceeded, the mice globally reduced their swim distance over the 4 days of training (see Fig. 1; $F(3,159)=53.75, P<0.0001$). Males performed generally better than females ($F(1,53)=20.10, P<0.0001$; no interaction with genotype). There was a main effect of genotype related to better performance of apoE4-TR mice compared to apoE3-TR and C57BL/6J mice ($F(3,26)=4.153, P=0.016$, apoE4-TR vs. C57BL/6J and apoE3-TR: $P\leq 0.023$). Analyzes restricted to TR mice confirmed that apoE4-TR mice performed better than apoE3-TR mice, and that TR

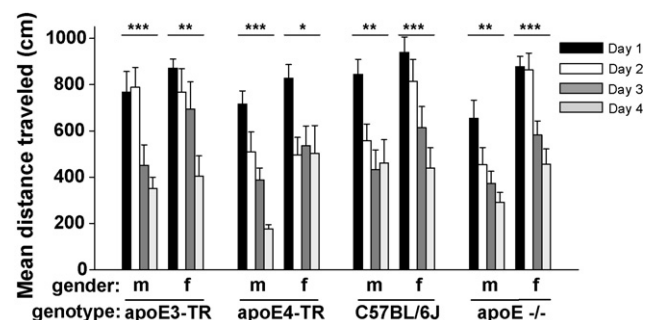


Fig. 1. Spatial learning performance of males (m) and females (f) apoE3-TR, apoE4-TR, apoE-/- and C57BL/6J mice in the water-maze reference memory training. Results are expressed as mean distances (cm) to find the submerged platform for each of 4 days of training (4 trials/day). The platform remained on the same position throughout testing. Note that female apoE4-TR mice did not improve their performance as well as the other groups. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ and *** $P<0.001$, significant improvement of performance over training within a genotype/sex group.

males performed better than their female counterparts (genotype: $F(1,27)=6.37$, $P=0.018$; sex: $F(1,27)=6.41$, $P=0.017$). Interestingly, all individual groups improved their performance over training, but this effect was less significant in female apoE4-TR mice (see Fig. 1). All genotypes reached similar levels of performance on the last training day ($F(3,27)=0.18$, $P=0.56$).

In summary, all sex- and genotype-groups were able to learn the reference memory task. Although the apoE4-TR group performed the best among genotypes, the females exhibited the least significant improvement of performance. Globally, males showed better performance than females regardless of the genotype.

3.3.3. Probe trial of the water-maze reference memory task

One day after the last training trial, spatial memory retention was tested during a 60-s probe trial with no platform present in the target quadrant. The mean time spent in this quadrant is shown in Table 1 for each individual group. The four genotype groups explored the target quadrant significantly more than chance level (15 s, $P \leq 0.023$). However, when each group was considered individually, only apoE3-TR, apoE4-TR males and C57BL/6J, as well as apoE-/- females spent significantly more than 15 s in the target quadrant. Interestingly, among the remaining groups, apoE4-TR females showed the lowest preference (apoE3-TR females: $P=0.09$; apoE-/- males: $P=0.18$; C57BL/6J females: $P=0.21$; apoE4-TR females: $P=0.39$).

In summary, most groups showed a preference for the target quadrant, but apoE4-TR females performed worse than all other groups.

3.3.4. Delayed matching to place task in the water-maze

In the DMP task, the platform location was changed every day, but remained constant over the four daily trials. On the sample trial (trial 1), when the mice had to find the new platform location, the path lengths were similar among genotypes and sex with no interaction (Fig. 2). The mice improved significantly their performance over the four trials (distance: $F(3,159)=23.54$, $P<0.0001$). In addition, global distances tended to differ as a function of genotype ($F(3,53)=2.38$, $P=0.080$). Only apoE4-TR mice did not reduce their path length over the four trials (C57BL/6J: $F(3,45)=10.28$, $P<0.0001$; apoE-/-: $F(3,39)=12.84$, $P<0.0001$; apoE3-TR: $F(3,42)=5.83$, $P=0.002$; apoE4-TR: $F(3,45)=2.07$, $P=0.12$). When we analyzed the evolution of performance within each individual group, there was no improvement in apoE4-TR and C57BL/6J females (see Fig. 2). Data

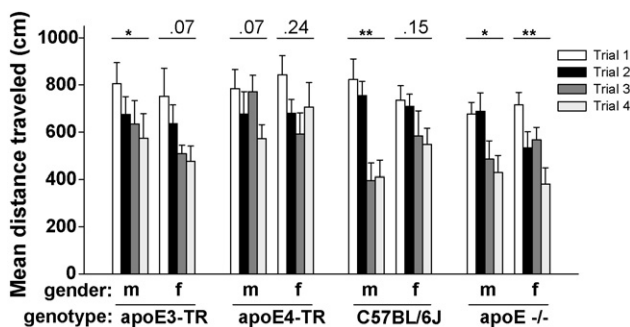


Fig. 2. Spatial learning performance of males (m) and females (f) apoE3-TR, apoE4-TR, apoE-/- and C57BL/6J mice in the water-maze DMP training. Results are expressed as mean distances (cm) to find the submerged platform for each of four daily trials given over 4 consecutive days. The platform location changed every day. There was an ITI of 1 h between trials 1 and 2, and then, an ITI of 5 min on the remaining trials. Note that female apoE4-TR and C57BL/6J mice did not improve their performance as well as the other groups. * $P \leq 0.05$, ** $P < 0.001$, significant improvement of performance over the four trials within a genotype/sex group.

were also analyzed on the two parts of the task as trials 1 and 2 were separated by a 1-h delay, whereas the trials 2–4 were separated from each other by 5-min ITIs. On the first part of the task, the whole population showed improved performance between trials 1 and 2 ($F(1,53)=11.05$, $P=0.002$) with no significant sex, genotype or interactions effects. The decrease in path length was relatively modest: a few groups showed a significant trial effect, as shown by within-group analyses (apoE3-TR mice: $P=0.044$; apoE-/- females: $P=0.025$). On the second part of the task, the mice further improved their performance over trials 2–4 ($F(1,53)=26.23$, $P<0.0001$). However, it seems that all lines did not express this improvement to the same extent ($F(3,53)=2.42$, $P=0.077$). The distance traveled clearly decreased for C57BL/6J and apoE-/- mice. This decrease was less pronounced in apoE3-TR mice. In h-apE4 mice, there was no significant evolution of performance over the three trials (C57BL/6J: $P=0.0004$; apoE-/-: $P=0.0005$, apoE3-TR: $P=0.059$; apoE4-TR: $P=0.61$). On the last trial, apoE4-TR mice still had a longer path length than in most of the other lines ($F(3,53)=3.05$, $P=0.036$; apoE4-TR vs. C57BL/6J and apoE-/-, $P \leq 0.043$).

In summary, performance of apoE4-TR mice did not improve to the same degree as that observed in the other groups in the DMP task.

3.3.5. Visible platform task in the water-maze

The day after the DMP task, mice were trained to reach a visible platform for four trials separated by 5-min ITTs. In this task, the mice swam a shorter distance than in the reference memory task and in the DMP task (248 ± 10 cm, 593 ± 13 cm and 631 ± 13 cm, respectively). There were no genotype, sex or trial effects and no interaction between these factors (C57BL/6J: 262 ± 21 cm; apoE-/-: 258 ± 24 cm; apoE3-TR: 250 ± 23 cm; apoE4-TR: 225 ± 20 cm).

3.4. Y-maze active avoidance task

The footshock level was individually set at the beginning of the acquisition session. There was a genotype effect and a genotype \times sex interaction ($F(3,53)=6.48$, $P=0.0008$; $F(3,53)=6.84$, $P=0.0006$, respectively, see Table 1). Females had very similar levels of footshock, whereas apoE-/- males had much lower levels of footshock than males of the other lines ($F(3,26)=8.96$, $P=0.0003$). When considering only TR mice, there was no difference between lines, but the level of footshock appeared higher in males than in females apoE-TR ($F(1,27)=4.45$, $P=0.044$). There was no correlation between the body weight and the level of footshock ($z=1.80$, $P=0.072$).

During the acquisition session, all groups reached the learning criterion within a similar number of trials. During this session, males made more avoidance errors than females ($F(1,53)=5.76$, $P=0.020$), whereas females made more discrimination errors than males ($F(1,53)=4.09$, $P=0.048$). These effects did not depend on genotype. During the retention session, males underwent less trials to reach the criterion than females ($F(1,53)=5.55$, $P=0.022$; but TR-restricted: $F(1,27)=2.84$, $P=0.103$). When each genotype was analyzed separately, there was a sex difference only in apoE4-TR mice ($F(1,14)=7.79$, $P=0.014$). As shown in Fig. 3, the number of avoidance errors tended to differ between males and females depending on the genotype (whole population: $F(3,53)=2.39$, $P=0.079$; TR-restricted: $F(1,27)=5.15$, $P=0.031$). Male groups had similar avoidance performance, but females showed wide genotype differences with apoE4-TR females performing the worst (whole female population: $F(3,27)=3.36$, $P=0.033$; female TR-restricted: $F(1,13)=5.93$, $P=0.030$). Again, females made globally more discrimination errors than males as reported during the

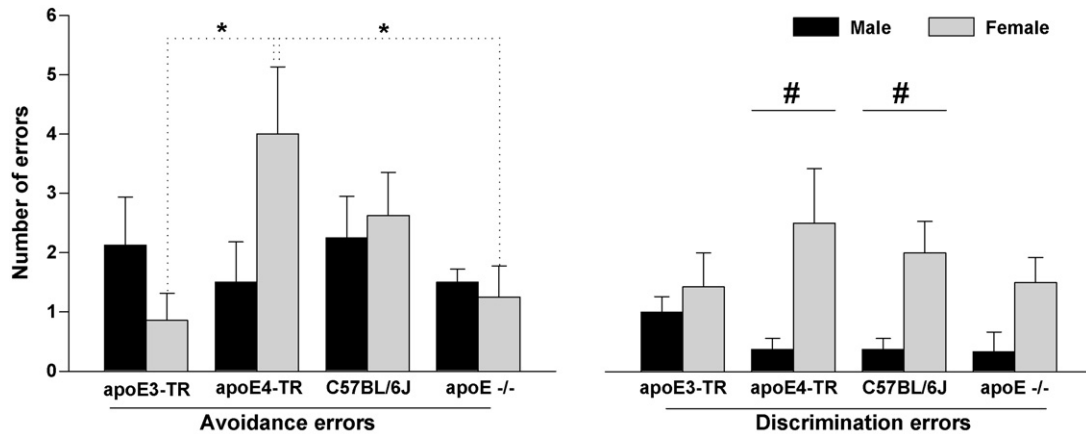


Fig. 3. Retention performance of males and females apoE3-TR, apoE4-TR, apoE-/- and C57BL/6J mice on the avoidance and discrimination components of the Y-maze active avoidance task. Results are expressed as mean number of avoidance errors (left panel) and discrimination errors (right panel). On each trial, an avoidance error was scored when the mouse failed to leave the central alley within 5 s and a discrimination error was scored when it entered, at least once, the right alley. Female apoE4-TR mice showed the highest number of avoidance errors. * $P < 0.02$, significantly different from females apoE4-TR. # $P < 0.05$, significant difference between male and female.

acquisition session (whole population: $F(1,53) = 14.47$, $P = 0.0004$; TR-restricted: $F(1,27) = 5.03$, $P = 0.033$, no genotype effect, no interaction with genotype). Within each genotype, this sex effect was significant only in apoE4-TR and C57BL/6J mice (see Fig. 3).

In summary, males and females showed differential performances on the avoidance and the discrimination components of the task. The apoE4-TR females exhibited the lowest retention performances on the avoidance component of the task.

3.5. Passive avoidance task and footshock sensitivity threshold

During the acquisition session of the task, all mice entered readily the dark compartment and had similar approach behaviors toward this compartment. There was no genotype sex effect, nor was there an interaction between factors on the latencies to cross the midline of the lighted compartment and to enter the dark compartment. During the retention session, 24 h later, the groups did not differ in terms of the time spent in the dark compartment, the number of transition made between the two compartments, and the latency to enter the dark compartment. Considering the whole population, the latency to enter this compartment increased substantially between the acquisition session and the retention session ($F(1,53) = 26.37$, $P < 0.0001$ no genotype and sex effect, no interaction). However, when each genotype was analyzed separately, all lines improved their performance except the apoE4-TR line (see Fig. 4).

There was no effect of genotype, and no interaction with genotype, on the threshold for footshocks (see Table 1). The voltage necessary to initiate a flight response was lower for females than for males ($F(1,53) = 23.14$, $P < 0.0001$). The level of footshock previously set during the acquisition session of the Y-maze task correlated globally with this footshock intensity threshold determined after the passive avoidance task ($z = 2.02$, $P = 0.044$).

4. Discussion

Several studies show a direct correlation between the $\epsilon 4$ allele and cognitive decline or lower episodic-memory scores in non-demented elderly subjects [14–19,29]. We set out to determine whether the apoE4-TR mice modeled the cognitive decline observed in human E4 carriers. The same behavioral tests used in the young cohorts were applied to the 15-month-old mice [27]. Our main findings revealed that the apoE4 mice are impaired in (i) the probe test of the water-maze reference memory task, (ii) the water-

maze working memory task and (iii) an active avoidance Y-maze task (summarized in Table 2).

The performance of apoE4-TR mice were different than those of apoE3-TR mice in most spatial memory tasks and both avoidance conditioning tasks. ApoE4-TR males show slightly, but significantly, better performances than those of apoE3 and C57BL/6 males only during the acquisition phase of the reference memory task in the water-maze. It is noteworthy that this effect was not found in the younger cohort [27]. Thus, one might question the meaning/robustness of this effect, which definitely needs to be confirmed. In contrast, apoE4-TR females showed the lowest improvement of performance during acquisition and no quadrant preference in probe trial of the reference memory task. In addition, apoE4-TR females expressed no performance improvement in the DMP task as opposed to females of other mouse lines. A deficit in the probe trial was already detected in 4–5-month-old apoE4-TR mice [27], which suggests that some spatial memory retention processes were already compromised at this age. DMP performances were similar in young apoE4-TR and apoE3-TR mice. Thus, this specific ability to learn a new platform location over a limited number of

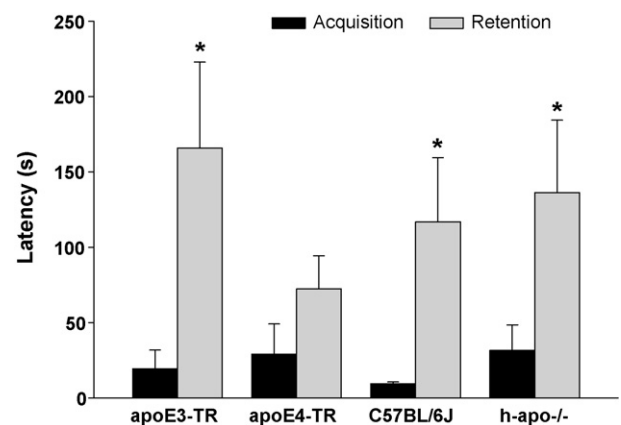


Fig. 4. Passive avoidance performance of apoE3-TR, apoE4-TR, apoE-/- and C57BL/6J mice during the acquisition session and the retention session of the task. Results are expressed as mean latencies (s) to enter the dark compartment. Only apoE4-TR mice did not increase their latency to enter the punished compartment on the retention session. *Significant improvement of performance between the two sessions within a genotype group (repeated-measure ANOVA; apoE3: $F(1,13) = 7.85$, $P = 0.015$; apoE4: $F(1,14) = 1.92$, $P = 0.187$; C57BL/6J: $F(1,14) = 6.06$, $P = 0.027$; apoE-/-: $F(1,12) = 17.09$, $P = 0.001$).

Table 2
Recapitulative table of all significant differences between or within apoE3-TR and apoE4-TR mouse lines, between these TR lines and the C57BL/6J inbred strain (genetic background) and, finally, between the latter and apoE^{-/-} mice on the same genetic background

	apoE3-TR and apoE4-TR	apoE-TR and C57BL/6J	apoE ^{-/-} and C57BL/6J
None mnemonic effects			
Weight on day 1	apoE4-TR heavier than apoE3-TR	apoE4-TR heavier than C57BL/6J	–
Locomotor activity (habituation and acquisition)	apoE3-TR more active than apoE4-TR	apoE3-TR more active than C57BL/6J	–
Object exploration (retention)	–	apoE3-TR and apoE4-TR explore more the objects than C57BL/6J	–
Swim speed (free swim trial)	apoE3-TR slower than apoE4-TR	apoE3-TR slower than C57BL/6J	–
Morris water-maze			
Distance to platform (reference memory training)	apoE4-TR better than apoE3-TR and lowest improvement in ♀ apoE4-TR	apoE4-TR better than C57BL/6J	–
Time in target quadrant (retention probe trial)	No preference in ♀ apoE4-TR	–	–
Distance to the platform over four trials (DMP task)	No improvement in ♀ apoE4-TR	No improvement in ♀ C57BL/6J	–
Distance on the 4th trial (DMP task)	–	apoE4-TR longer distance than C57BL/6J	–
Y-maze			
Y-maze voltage	–	–	♂ apoE ^{-/-} lower than ♂ C57BL/6J
Number of trials to reach the criteria (retention)	apoE4-TR only: ♀ need more trials than ♂	–	–
Avoidance errors (retention)	♀ apoE4-TR made more errors than ♀ apoE3-TR	–	–
Discrimination errors (retention)	apoE4-TR only: ♀ made more errors than ♂	C57BL/6J only: ♀ made more errors than ♂	–
Passive avoidance			
Latency to enter dark compartment (retention)	No improvement in apoE4-TR	–	–

trials seems to be affected in an age-dependent manner in female apoE4-TR mice. The motivation and visual abilities in the visible platform task and the swimming abilities did not differ among genotypes. Thus, the physical ability to perform water-maze tasks is similar among all lines and spatial memory deficits of apoE4-TR females are not due to non-mnemonic effects of apoE4. Taken together, our results suggest that apoE4-TR females show a spatial memory deficit which may worsen with age since it is progressively revealed in tasks which are the most demanding on memory capacities. Indeed, the water-maze probe trial evaluates the strength of long-term (24 h) spatial memory, whereas the DMP task requires the mouse to assimilate a new platform location within only four trials. The lack of genotype effect in the spatial recognition task may be related to the very low level and the high variability of performance of this middle-aged cohort, especially in females. In general, there was a reduction of retention performance in the 15 months aged cohort compared to the young cohort in the passive avoidance task as reported elsewhere in C57BL/6J mice [27,41]. Despite this global loss of performance, a retention performance deficit emerged in apoE4-TR mice, suggesting that apoE4 may also affect mechanisms underlying memory retention of contextual information. Finally, the retention performance of apoE4-TR females was lower than that of apoE3-TR females on the avoidance component of the Y-maze active avoidance task. This is particularly interesting since the avoidance component of this task takes more time to consolidate and is more sensitive to various amnesic agents than its discrimination component [39,40]. In conclusion, expression of apoE4 in females results in significant memory deficits compared to either males or apoE3 expressors which worsens with age. Considering the largest demographic of AD patients in the world are aged (post-menopausal) female apoE4 carriers underscores the significance of this model.

Interestingly, conventionally derived transgenic female apoE mice which overexpress apoE4 also exhibit spatial memory deficits [7,24]. Six-month-old female mice expressing apoE4 in astrocytes (GFAP-apoE4 mice) are impaired in the retention probe trial, but not during the acquisition, of a reference memory water-maze task [25]. Female mice expressing apoE4 in neurons (NSE-apoE4 mice)

show spatial retention deficits at 6 months and massive deficits during both reference memory acquisition and probe trial retention at 18 months [8]. This is similar to the age-dependent spatial memory deficit found in our female apoE4-TR mice. GFAP-apoE4 mice showed a profound deficit in a radial maze working memory paradigm at 11–14 months of age [24]. In a water-maze task similar to our DMP task (platform moved every day), NSE-apoE4 females showed subtle impairments as early as 3 months, and striking deficits at an age of 6 months [7]. These results confirm that tasks (e.g., working memory and DMP tasks) in which new spatial information must be rapidly acquired, stored and retrieved are more sensitive to apoE4 effects. Some possible explanations for why the NSE-apoE4 and GFAP-apoE4 transgenic mice exhibit a more pronounced memory deficit compared to the apoE4-TR mice are (i) overexpression of the apoE4 protein, (ii) an inability to regulate expression or respond to external stimuli or (iii) the apoE^{-/-} background on CNS function.

Overall, it appears that apoE4 expression in animal models or in humans results in memory deficits. In the reference memory and DMP water-maze tasks, allocentric spatial learning is dependent on hippocampal integrity [38,42,43], especially in good “spatial learners” such as the C57BL/6J inbred strain which uses preferentially spatial navigation strategies [44,45]. Furthermore, in fear-related memory tasks, the C57BL/6J strain has a predisposition to show contextual-based responses which depend on the hippocampus [46,47]. ApoE may play a role in synaptogenesis and axonal growth [48,49], which are impaired in apoE4 transgenic mice [50]. The apoE4-TR mice have functional deficits in hippocampal plasticity. Young apoE4-TR males show a reduced magnitude of dentate gyrus (DG) long-term potentiation (LTP), a widely accepted model for the neuronal basis of learning and memory [51]. LTP in apoE4-TR mice is less sensitive to nicotinic acetylcholine receptor blockade, but more sensitive to the inhibitory effects of amyloid- β 1-42 (the major constituent of senile plaques in AD) [52,53]. Thus, there are important morphological and functional changes in the hippocampus of apoE4-TR which might play a role in their deficits in hippocampal-dependent memory tasks. Young apoE4-TR mice also show reduced excitatory synaptic transmission and dendritic

arborization in the amygdala [54]. In fact, the apoE4 mice show a twofold reduction in the number of spines (indicative of synapses) compared to apoE3 mice. It is not known whether these alterations are still present or worsen as a function of age in older apoE4-TR subjects. Such alterations would probably contribute to their poor performance in passive and active avoidance tasks, which are expected to involve amygdala-related emotional regulations, in addition to an engagement of the hippocampus [55,56]. Interestingly, hippocampal and amygdalar morphology is also affected in middle-aged, non-demented, human apoE4 carriers. The $\epsilon 4$ allele is associated with hippocampal atrophy in cognitively normal twins and middle-aged individuals [19,57,58], and with an increased rate of hippocampal volume loss in healthy women in their sixth decade [59]. Other studies also found amygdalar atrophy, in addition to the hippocampal atrophy [60,61]. Thus, the memory deficits shown by mice and human apoE4 carriers might be related to similar structural and functional alterations.

The higher sensitivity of females to apoE4 effects on memory performance has also been reported in human studies [20–22]. According to Raber et al. [6], this age- and gender-dependent sensitivity to the effects of apoE4 might be related to decreased levels of sexual hormones and/or their receptors. In addition, the age-dependent decrease in water-maze spatial memory performance has been attributed to the cessation of estrous cycling and can be alleviated by estrogen replacement in C57BL/6J mice [62]. Interestingly, estrogen has been shown to improve LTP in the DG of old apoE4-TR, but not apoE3-TR females [63]. Thus, the increased vulnerability of female apoE4-TR to age-related cognitive decline might be related to an earlier onset of cycling perturbations and/or arrest, possibly influenced by the presence of apoE4. Further studies in humans and mouse models are warranted to determine the role of sexual hormones and apoE4 expression on memory.

In the present study, apoE $-/-$ mice showed good performances in all spatial tasks. Some studies, but not all, show learning and memory deficits in apoE $-/-$ mice ([64–66], but see [24,67]). These discrepancies could be related to environmental factors, compensation by other proteins, genetic background effects as well as protocol differences [7,68]. Our present results and those reported on the young cohort [27] suggest that the presence of apoE4 induces cognitive deficits, whereas its absence has no effect. This confirms the hypothesis of deleterious effect of apoE4 on cognitive functions. In general, apoE deficiency did not seem to affect much the behavioral phenotype in the present study, except a higher sensitivity to footshocks in the Y-maze task (Table 2). ApoE $-/-$ males lifted one or two paws at a lower footshock voltage than C57BL/6J males. However, this effect was not confirmed when footshock sensitivity threshold was determined with the flight response in a different apparatus. The later footshock determination was performed after the Y-maze and passive avoidance tasks, which might indicate that some behavioral adaptation took place in the mean time. Finally, in the young cohort, there was no genotype effect on footshock sensitivity whatever the test considered [27]. Therefore, this eventual effect of apoE deficiency on footshock sensitivity remains to be confirmed in future studies.

Interestingly, in a spatial recognition task, apoE3-TR mice showed a higher locomotor- and object-exploration activity as compared to the three other genotypes. A higher exploratory activity of this mouse line was also found in the young cohort [27]. On the initial free swim trial of water-maze testing, the swim speed of middle-aged apoE3-TR was lower than that found in the other genotypes, although this effect disappeared in the probe trial. Since these behavioral perturbations seem to be restricted to the initial phases of a new task, we hypothesize that apoE3-TR differ in their emotional reactivity, especially in novel situations. It is note-

worthy that such behavioral manifestations were not reported in mice overexpressing apoE3. As an example, swim speed did not differ between apoE3 and apoE4 in the study of Raber et al. [7]. This could be related to differences in experimental designs or data collection (measures on individual phases vs. global means). Alternatively, these behavioral effects of apoE3 could be specific to the apoE3-TR mouse line. Further studies will be necessary to clarify this issue.

In conclusion, our results suggest that the apoE4-TR mouse serves as an excellent model for studying apoE4-associated cognitive deficits. Indeed, it shows several characteristics in common with human apoE4 carriers when compared to apoE3 carriers: (i) moderate cognitive deficits, (ii) with similar types of memory affected in humans and apoE4-TR mice (alterations of memory consolidation and episodic-like memory), (iii) an age-dependent memory decline, (iv) deficits that are concomitant with hippocampal and amygdala dysfunctions and (v) cognitive functions being more affected in females than in males. Thus, the apoE4-TR mouse model should help us understand the mechanisms underlying the susceptibility of apoE4 carriers to cognitive decline.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Steven M. Paul for his contribution to the present work. This research was supported by Université Louis Pasteur, Centre National de la Recherche Scientifique and grants from the ULP-CNRS-Eli Lilly foundation awarded to C.M. and Association Alsace Alzheimer 68 awarded to A.B.

References

- [1] Poirier J. Apolipoprotein E, cholesterol transport and synthesis in sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2005;26:355–61.
- [2] Mahley RW, Rall Jr SC. Apolipoprotein E, far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000;1:507–37.
- [3] Champagne D, Rochford J, Poirier J. Effect of apolipoprotein E deficiency on reactive sprouting in the dentate gyrus of the hippocampus following entorhinal cortex lesion: role of the astroglial response. *Exp Neurol* 2005;194:31–42.
- [4] Blain JF, Sullivan PM, Poirier J. A deficit in astroglial organization causes the impaired reactive sprouting in human apolipoprotein E4 targeted replacement mice. *Neurobiol Dis* 2006;21:505–14.
- [5] Laskowitz DT, Goel S, Bennett ER, Matthew WD. Apolipoprotein E suppresses glial cell secretion of TNF alpha. *J Neuroimmunol* 1997;76:70–4.
- [6] Raber J, Bongers G, LeFevour A, Buttini M, Mucke L. Androgens protect against apolipoprotein E4-induced cognitive deficits. *J Neurosci* 2002;22:5204–9.
- [7] Raber J, Wong D, Buttini M, Orth M, Bellosta S, Pitas RE, et al. Isoform-specific effects of human apolipoprotein E on brain function revealed in ApoE knockout mice: increased susceptibility of females. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:10914–9.
- [8] Raber J, Wong D, Yu GQ, Buttini M, Mahley RW, Pitas RE, et al. Apolipoprotein E and cognitive performance. *Nature* 2000;404:352–4.
- [9] Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993;261:921–3.
- [10] Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK, Hyman BT. Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron* 1993;11:575–80.
- [11] Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, et al. Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:9649–53.
- [12] Smith JD. Apolipoproteins and aging: emerging mechanisms. *Ageing Res Rev* 2002;1:345–65.
- [13] Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:5644–51.
- [14] Caselli RJ, Graff-Radford NR, Reiman EM, Weaver A, Osborne D, Lucas J, et al. Preclinical memory decline in cognitively normal apolipoprotein E-epsilon4 homozygotes. *Neurology* 1999;53:201–7.
- [15] Mayeux R, Small SA, Tang M, Tycko B, Stern Y. Memory performance in healthy elderly without Alzheimer's disease: effects of time and apolipoprotein-E. *Neurobiol Aging* 2001;22:683–9.
- [16] Savitz J, Solms M, Ramesar R. Apolipoprotein E variants and cognition in healthy individuals: a critical opinion. *Brain Res Rev* 2006;51:125–35.

- [17] Baxter LC, Caselli RJ, Johnson SC, Reiman E, Osborne D. Apolipoprotein E epsilon 4 affects new learning in cognitively normal individuals at risk for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2003;24:947–52.
- [18] Flory JD, Manuck SB, Ferrell R, Ryan CM, Muldoon MF. Memory performance and the apolipoprotein E polymorphism in a community sample of middle-aged adults. *Am J Med Genet* 2000;96:707–11.
- [19] Lind J, Larsson A, Persson J, Ingvar M, Nilsson LG, Backman L, et al. Reduced hippocampal volume in non-demented carriers of the apolipoprotein E epsilon4: relation to chronological age and recognition memory. *Neurosci Lett* 2006;396:23–7.
- [20] Bartres-Faz D, Junque C, Moral P, Lopez-Alomar A, Sanchez-Aldeguer J, Clemente IC. Apolipoprotein E gender effects on cognitive performance in age-associated memory impairment. *J Neuropsychiatr Clin Neurosci* 2001;14:80–3.
- [21] Mortensen EL, Hogh P. A gender difference in the association between APOE genotype and age-related cognitive decline. *Neurology* 2001;57:89–95.
- [22] Azad NA, Al Bugami M, Loy-English I. Gender differences in dementia risk factors. *Gend Med* 2007;4:120–9.
- [23] Pfankuch T, Rizk A, Olsen R, Poage C, Raber J. Role of circulating androgen levels in effects of apoE4 on cognitive function. *Brain Res* 2005;1053:88–96.
- [24] Hartman RE, Wozniak DF, Nardi A, Olney JW, Sartorius L, Holtzman DM. Behavioral phenotyping of GFAP- apoE3 and - apoE4 transgenic mice: apoE4 mice show profound working memory impairments in the absence of Alzheimer's-like neuropathology. *Exp Neurol* 2001;170:326–44.
- [25] van Meer P, Acevedo S, Raber J. Impairments in spatial memory retention of GFAP- apoE4 female mice. *Behav Brain Res* 2007;176:372–5.
- [26] Sullivan PM, Mace BE, Maeda N, Schmechel DE. Marked regional differences of brain human apolipoprotein E expression in targeted replacement mice. *Neuroscience* 2004;124:725–33.
- [27] Grootendorst J, Bour A, Vogel E, Kelche C, Sullivan PM, Dodart JC, et al. Human apoE targeted replacement mouse lines: h- apoE4 and h- apoE3 mice differ on spatial memory performance and avoidance behavior. *Behav Brain Res* 2005;159:1–14.
- [28] Lind J, Persson J, Ingvar M, Larsson A, Cruts M, Van Broeckhoven C, et al. Reduced functional brain activity response in cognitively intact apolipoprotein E epsilon4 carriers. *Brain* 2006;129:1240–8.
- [29] Albert M, Blacker D, Moss MB, Tanzi R, McArdle JJ. Longitudinal change in cognitive performance among individuals with mild cognitive impairment. *Neuropsychology* 2007;21:158–69.
- [30] Morris RG. Episodic-like memory in animals: psychological criteria, neural mechanisms and the value of episodic-like tasks to investigate animal models of neurodegenerative disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001;356:1453–65.
- [31] Bondi MW, Salmon DP, Monsch AU, Galasko D, Butters N, Klauber MR, et al. Episodic memory changes are associated with the APOE-epsilon 4 allele in nondemented older adults. *Neurology* 1995;45:2203–6.
- [32] Sullivan PM, Mezdour H, Aratani Y, Knouff C, Najib J, Reddick RL, et al. Targeted replacement of the mouse apolipoprotein E gene with the common human APOE3 allele enhances diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis. *J Biol Chem* 1997;272:17972–80.
- [33] Sullivan PM, Mezdour H, Quarfordt SH, Maeda N. Type III hyperlipoproteinemia and spontaneous atherosclerosis in mice resulting from gene replacement of mouse Apoe with human Apoe^2 . *J Clin Invest* 1998;102:130–5.
- [34] McLlwin KL, Merriweather MY, Yuva-Paylor LA, Paylor R. The use of behavioral test batteries: effects of training history. *Physiol Behav* 2001;73:705–17.
- [35] Voikar V, Vasar E, Rauvala H. Behavioral alterations induced by repeated testing in C57BL/6j and 129S2/Sv mice: implications for phenotyping screens. *Genes Brain Behav* 2004;3:27–38.
- [36] Thinus-Blanc C, Save E, Rossi-Arnaud C, Tozzi A, Ammassari-Teule M. The differences shown by C57BL/6 and DBA/2 inbred mice in detecting spatial novelty are subserved by a different hippocampal and parietal cortex interplay. *Behav Brain Res* 1996;80:33–40.
- [37] Bour A, Little S, Dodart JC, Kelche C, Mathis C. A secreted form of the beta-amyloid precursor protein (sAPP695) improves spatial recognition memory in OF1 mice. *Neurobiol Learn Mem* 2004;81:27–38.
- [38] Steele RJ, Morris RG. Delay-dependent impairment of a matching-to-place task with chronic and intrahippocampal infusion of the NMDA-antagonist D-AP5. *Hippocampus* 1999;9:118–36.
- [39] Ungerer A, Mathis C, Melan C, De Barry J. The NMDA receptor antagonists, CPP and gamma-L-glutamyl-L-aspartate, selectively block post-training improvement of performance in a Y-maze avoidance learning task. *Brain Res* 1991;549:59–65.
- [40] Ungerer A, Melan C, De Barry J. Strain-dependent effects of gamma-L-glutamyl-L-aspartate, a NMDA antagonist, on retention of a Y-maze avoidance learning task in mice. *Behav Brain Res* 1993;55:69–75.
- [41] Fagioli S, Ammassari-Teule M, Rossi-Arnaud C, Casellano C. Age-dependent learning performance during development and aging in C57BL/6 mice. *Dementia* 1992;3:247–50.
- [42] Schenk F, Morris RG. Dissociation between components of spatial memory in rats after recovery from the effects of retrohippocampal lesions. *Exp Brain Res* 1985;58:11–28.
- [43] Bohbot V, Otahal P, Liu Z, Nadel L, Bures J. Electroconvulsive shock and lidocaine reveal rapid consolidation of spatial working memory in the water maze. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:4016–9.
- [44] Arns M, Sauvage M, Steckler T. Excitotoxic hippocampal lesions disrupt allocentric spatial learning in mice: effects of strain and task demands. *Behav Brain Res* 1999;106:151–64.
- [45] Holmes A, Wrenn CC, Harris AP, Thayer KE, Crawley JN. Behavioral profiles of inbred strains on novel olfactory, spatial and emotional tests for reference memory in mice. *Genes Brain Behav* 2002;1:55–69.
- [46] Balogh SA, Wehner JM. Inbred mouse strain differences in the establishment of long-term fear memory. *Behav Brain Res* 2003;140:97–106.
- [47] Ammassari-Teule M, Passino E, Restivo L, de Marsanich B. Fear conditioning in C57BL/6 and DBA/2 mice: variability in nucleus accumbens function according to the strain predisposition to show contextual- or cue-based responding. *Eur J Neurosci* 2000;12:4467–74.
- [48] Mauch DH, Nagler K, Schumacher S, Goritz C, Muller EC, Otto A, et al. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* 2001;294:1354–7.
- [49] Vance JE, Campenot RB, Vance DE. The synthesis and transport of lipids for axonal growth and nerve regeneration. *Biochim Biophys Acta* 2000;1486:84–96.
- [50] Teter B, Xu PT, Gilbert JR, Roses AD, Galasko D, Cole GM. Defective neuronal sprouting by human apolipoprotein E4 is a gain-of-negative function. *J Neurosci Res* 2002;68:331–6.
- [51] Trommer BL, Shah C, Yun SH, Gamkrelidze G, Pasternak ES, Ye GL, et al. ApoE isoform affects LTP in human targeted replacement mice. *Neuroreport* 2004;15:2655–8.
- [52] Trommer BL, Shah C, Yun SH, Gamkrelidze G, Pasternak ES, Stine WB, et al. ApoE isoform-specific effects on LTP: blockade by oligomeric amyloid-beta-142. *Neurobiol Dis* 2005;18:75–82.
- [53] Yun SH, Park KA, Sullivan P, Pasternak JF, LaDu MJ, Trommer BL. Blockade of nicotinic acetylcholine receptors suppresses hippocampal long-term potentiation in wild-type but not ApoE4 targeted replacement mice. *J Neurosci Res* 2005;82:771–7.
- [54] Wang C, Wilson WA, Moore SD, Mace BE, Maeda N, Schmechel DE, et al. Human apoE4-targeted replacement mice display synaptic deficits in the absence of neuropathology. *Neurobiol Dis* 2005;18:390–8.
- [55] Roozendaal B, Koolhaas JM, Bohus B. The central amygdala is involved in conditioning but not in retention of active and passive shock avoidance in male rats. *Behav Neural Biol* 1993;59:143–9.
- [56] Ambrogio Lorenzini CG, Baldi E, Bucherelli C, Sacchetti B, Tassoni G. Neural topography and chronology of memory consolidation: a review of functional inactivation findings. *Neurobiol Learn Mem* 1999;71:1–18.
- [57] Plassman BL, Welsh-Bohmer KA, Bigler ED, Johnson SC, Anderson CV, Helms MJ, et al. Apolipoprotein E epsilon 4 allele and hippocampal volume in twins with normal cognition. *Neurology* 1997;48:985–9.
- [58] Hashimoto M, Yasuda M, Tanimukai S, Matsui M, Hirono N, Kazui H, et al. Apolipoprotein E epsilon 4 and the pattern of regional brain atrophy in Alzheimer's disease. *Neurology* 2001;57:1461–6.
- [59] Cohen RM, Small C, Lalonde F, Friz J, Sunderland T. Effect of apolipoprotein E genotype on hippocampal volume loss in aging healthy women. *Neurology* 2001;57:2223–8.
- [60] den Heijer T, Oudkerk M, Launer LJ, van Duijn CM, Hofman A, Breteler MM. Hippocampal, amygdalar, and global brain atrophy in different apolipoprotein E genotypes. *Neurology* 2002;59:746–8.
- [61] Pennanen C, Testa C, Boccardi M, Laakso MP, Hallikainen M, Helkala EL, et al. The effect of apolipoprotein polymorphism on brain in mild cognitive impairment: a voxel-based morphometric study. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2006;22:60–6.
- [62] Frick KM, Fernandez SM, Bulinski SC. Estrogen replacement improves spatial reference memory and increases hippocampal synaptophysin in aged female mice. *Neuroscience* 2002;115:547–58.
- [63] Yun SH, Park KA, Kwon S, Woolley CS, Sullivan PM, Pasternak JF, et al. Estradiol enhances long term potentiation in hippocampal slices from aged apoE4-TR mice. *Hippocampus* 2007;17:1153–7.
- [64] Gordon I, Grauer E, Genis I, Sehayek E, Michaelson DM. Memory deficits and cholinergic impairments in apolipoprotein E-deficient mice. *Neurosci Lett* 1995;199:1–4.
- [65] Oitzl MS, Mulder M, Lucassen PJ, Havekes LM, Grootendorst J, de Kloet ER. Severe learning deficits in apolipoprotein E-knockout mice in a water maze task. *Brain Res* 1997;752:189–96.
- [66] Veinbergs I, Mallory M, Mante M, Rockenstein E, Gilbert JR, Masliah E. Differential neurotrophic effects of apolipoprotein E in aged transgenic mice. *Neurosci Lett* 1999;265:218–22.
- [67] Anderson R, Barnes JC, Bliss TV, Cain DP, Cambon K, Davies HA, et al. Behavioural, physiological and morphological analysis of a line of apolipoprotein E knockout mouse. *Neuroscience* 1998;85:93–110.
- [68] Grootendorst J, de Kloet ER, Vossen C, Dalm S, Oitzl MS. Repeated exposure to rats has persistent genotype-dependent effects on learning and locomotor activity of apolipoprotein E knockout and C57BL/6 mice. *Behav Brain Res* 2001;125:249–59.

PUBLICATION 4

Cassel J-C., Mathis C., Majchrzak M., Moreau P-H., Dalrymple-Alford J-C.

**Coexisting cholinergic and parahippocampal degeneration: a key to
memory loss in dementia and a challenge for transgenic models?**

Neuro-degenerative diseases (2008), 5(5): 304-17.

Coexisting Cholinergic and Parahippocampal Degeneration: A Key to Memory Loss in Dementia and a Challenge for Transgenic Models?

Jean-Christophe Cassel^a Chantal Mathis^a Monique Majchrzak^a
Pierre-Henri Moreau^a John C. Dalrymple-Alford^b

^aLINC UMR 7191, Université Louis Pasteur, CNRS, Institut Fédératif de Recherche IFR 37, GDR CNRS 2905, Strasbourg, France, ^bVan der Veer Institute for Parkinson's and Brain Research, and Department of Psychology, University of Canterbury, Christchurch, New Zealand

Key Words

Alzheimer's disease · Lesion models · Cholinergic basal forebrain · Entorhinal cortex · Memory · Transgenic models

Abstract

One century after Alzheimer's initial report, a variety of animal models of Alzheimer's disease (AD) are being used to mimic one or more pathological signs viewed as critical for the evolution of cognitive decline in dementia. Among the most common are, (a) traditional lesion models aimed at reproducing the degeneration of one of two key brain regions affected in AD, namely the cholinergic basal forebrain (CBF) and the transentorhinal region, and (b) transgenic mouse models aimed at reproducing AD histopathological hallmarks, namely amyloid plaques and neurofibrillary tangles. These models have provided valuable insights into the development and consequences of the pathology, but they have not consistently reproduced the severity of memory deficits exhibited in AD. The reasons for this lack of correspondence with the severity of expected deficits may include the limited replication of multiple neuropathology in potentially key brain regions. A recent lesion model in the rat found that severe memory impairment was obtained only

when the two traditional lesions were combined together (i.e. conjoint CBF and entorhinal cortex lesions), indicative of a dramatic impact on cognitive function when there is coexisting, rather than isolated, damage in these two brain regions. It is proposed that combining AD transgenic mouse models with additional experimental damage to both the CBF and entorhinal regions might provide a unique opportunity to further understand the evolution of the disease and improve treatments of severe cognitive dysfunction in neurodegenerative dementias. Copyright © 2008 S. Karger AG, Basel

From Alzheimer to Transgenic Mice

On November the 3rd 1906, at a local psychiatry meeting in Germany (the 37th Meeting of Southwest German Psychiatrists, Tübingen), Alois Alzheimer (1864–1915) presented one of the most important observations in brain science and published these findings the following year [1]. As is well known, he had found two neuropathological abnormalities in the cortex of a 56-year-old dementia patient, Auguste Deter. The first neuropathological feature was the presence of intracellular neuro-

fibrillary tangles (NFTs), now known to result from hyperphosphorylation of the cytoskeletal protein tau [2], which is involved in microtubule assembly and stabilization. The second hallmark was the presence of what are now called senile plaques, which are extracellular deposits of β -amyloid peptide ($A\beta$) that result from the abnormal cleavage of the amyloid protein precursor (APP) [see, for example 2, 3]. The two hallmarks described by Alzheimer allow postmortem confirmation of a prior Alzheimer's dementia, but the clinical course of the condition itself is characterized by a protracted decline in functional independence through progressive worsening of a broad range of higher cognitive functions, of which severe deficits in long-term episodic memory and spatial disorientation are of the most prominent neurobehavioral signs [4]. Some recent evidence suggests that neuritic plaques are more influential than tangles in the earlier stages of Alzheimer's disease (AD) [e.g. 5, but see 6]. The modern era of interest in the pathological events that lead to this dementia began in the mid-1970s with a focus on the degenerative changes in cholinergic basal forebrain (CBF) projections [7, 8]. The most significant of these findings was that a decline in neocortical cholinergic markers in the temporal lobes correlated strongly with the degree of overall cognitive impairment [9] and the association between cholinergic dysfunction and dementia continues to receive support [e.g. 10–15, but see 16]. Parallel clinical and experimental work led to the influential cholinergic hypothesis of Bartus et al. [17] of geriatric memory dysfunction based on the idea of a causal link between CBF degeneration and the early memory deficits that provide the essential cognitive signature of dementia of the Alzheimer type [18]. The cholinergic hypothesis provided the rationale for developing cholinomimetic therapy, which remains the frontline drug treatment for dementia, although its efficacy has been less promising than initially expected [3, 19–22]. However, the pioneering work by Perry et al. [9] has been based on information derived from AD patients with severe dementia. Actually, neither patients at risk for AD (MCI) nor mild AD patients appear to have marked depletion of cholinergic indicators in the neocortex [e.g. 2, 23 vs. 24–26]. Some MCI patients even show upregulation of cholinergic function, which may reflect early adaptive mechanisms in response to ongoing neurodegenerative processes [26].

More recently, the retrohippocampal region in the medial temporal lobe has been proposed as the brain area that shows some of the earliest signs of neurodegeneration. Given this region's complex interconnections with

the hippocampal formation, it is presumed that it must play an essential role in the emergence of prominent episodic memory deficits [27]. In particular, early atrophy and hypometabolism of the transentorhinal region has been highlighted by postmortem and recent *in vivo* brain imaging studies of dementia patients [e.g. 28–30]. Moreover, changes in the entorhinal cortex, specifically, have been found to be good predictors for the conversion from MCI to AD [14, 31–34]. In addition to the atrophy of medial temporal lobe structures, afferent and efferent pathways and functionally connected regions contribute to the memory impairments found in patients at the earliest stages of AD [30, 35]. For example, a recent study by Nestor et al. [36] is particularly revealing in showing that medial temporal lobe degeneration, in isolation, does not explain the marked episodic memory impairment characteristic of AD. While these authors focused on the importance of limbic-diencephalic neurocircuitry beyond the medial temporal lobe, their findings point to the more general importance of considering multiple, conjoint degenerative processes in explaining severe episodic memory loss. We suggest that the recent approach focusing almost exclusively on the CBF or the entorhinal cortex region with respect to memory decline in AD ignores the potential influence of changes to multiple neural systems. Specifically, it may be the concurrent degeneration in both the CBF and the entorhinal cortex, and the loss of their functional interactions that provides a major reason for the severity of memory decline in dementia. While it is clear that AD represents a complex disorder, and the role of neuropathological changes are central to an understanding of AD, the prominence of cognitive deficits must remain a central focus of attention because it is the cognitive and behavioral deficits that pose the daily handicap for the patient and their relatives.

In the following brief review, we summarize evidence on some of the more common rodent models of AD, including those using transgenic manipulations to induce amyloid and/or tangle histopathology in mice, and those using classic lesion methodologies to mimic either CBF or entorhinal cortex degeneration. The main contributions and limitations of each approach to understand AD pathology and cognitive changes are reviewed. It is clear that the extent of cognitive impairment expressed in most single lesion or transgenic models appears to be relatively limited, even with extensive lesions or heavy amyloid or tangle histopathology. We then briefly describe the dramatic memory deficits obtained in a recent rat AD model, which examined the effects of combined CBF and

entorhinal cortex lesions to reproduce the effects of conjoint degenerative changes in these regions. The success of the latter strategy prompts us to propose the advantage of combining the strengths of this multiple lesion model with those of transgenic mouse models to optimize new models of AD.

Benefits and Limits of Transgenic Mouse Models Bearing Plaques and/or NFTs

The aim of transgenic manipulations in mice is to model the fundamental neuropathology underlying AD and develop molecular treatment strategies aimed at reversing this neuropathology [for more detailed reviews, see for example 37–39]. Recent advances in the molecular neurobiology and genetics of AD have engendered several mouse lines bearing plaques and/or NFTs, which resulted in valuable progress in understanding some key steps in the development of AD-like pathophysiology and its consequences for brain function. For example, single and multiple transgenic models have proven to be powerful tools to study both the individual role of several AD-related proteins (e.g. ApoE, BACE-1, presenilin-1) in the abnormal metabolism of APP, A β and tau, as well as the synergistic relationships between A β and tau pathologies [e.g. 24, 40–44]. However, a further motivation in creating these lines was to evaluate the impact of either amyloid plaques, NFTs or both on memory function as a means to clarify their involvement in the cognitive symptomatology of AD. Table 1 summarizes the neuropathology and cognitive deficits reported for some of the more representative AD transgenic mouse models. The first transgenic models, which were mainly plaque-bearing mice overexpressing human APP (h-APP) mutated genes, have now been characterized in terms of cognitive ability at different developmental stages [e.g. 37, 38, 45] (table 1).

Unfortunately, some mouse lines, such as PDAPP mice, display age-independent memory deficits in some tasks and age-dependent deficits in other tasks, the latter deficits emerging well before amyloid plaques are detected. The age-independent deficits are presumably related to early neurodevelopmental abnormalities, consistent with a role of APP in brain ontogeny [e.g. 41, 136]. By contrast, many other h-APP transgenic lines, such as APP23 mice and Tg 2576 mice, show age-dependent amyloid deposits and memory deficits, which is more desirable for an animal model of AD. Of particular interest in modeling the progressive changes in AD, these models also of-

ten display some behavioral deficits before the onset of plaque formation. Such findings pointed to the deleterious effects of the soluble forms of A β (e.g. A β oligomers) on synaptic and cognitive function, which suggests that soluble A β may play a role in early AD cognitive impairments [25, 40, 42, 93, 127, 137, 138]. The major problem with the h-APP transgenic models is, however, that even the oldest mice with a severe amyloid burden may show greater than expected improvements in spatial learning tasks, such as the water maze or the Barnes maze [e.g. 54, 119]. Deficits in spatial working memory and spatial reference memory tasks are important because they provide useful animal analogues of AD-related impairments in episodic memory and spatial disorientation [139]. However, even the same transgenic mouse model may produce mixed findings, sometimes even when the same task is used (memory is impaired in some of the tasks and not in others or, using the same task, memory is impaired in some studies and not in others; table 1). For instance, PSAPP have been reported to exhibit impaired acquisition in a water-maze task but normal retention, or normal acquisition but then impaired retention, or alterations of both (table 1), and the same remark applies to NFT transgenic models, such as JNPL3 mice, in the same task [109].

Thus, current transgenic mouse models of AD are extremely valuable, but have certain limitations because they reproduce only partially the progression, severity and range of deficits in spatial memory tasks used to model those found in AD. As it is known that degeneration of the CBF and the entorhinal regions are both involved in the AD cognitive decline, it is pertinent to examine whether similar cholinergic and transentorhinal neurodegenerative events are found in transgenic mouse models.

As shown in table 1, however, most research on transgenic mice has focused on pathological signs in the hippocampus and the whole neocortical mantle, rather than in the transentorhinal region even though the latter shows the earliest evidence for neurodegeneration in AD [e.g. 29]. A few studies have shown some histopathological and functional alterations in the entorhinal region of transgenic mouse lines, such as Tg 2576 or PSAPP mice [42, 52, 140, 141] (table 1). However, no quantitative evidence for cell loss or hypometabolism in the entorhinal cortex has been reported in transgenic mouse models yet [142, 143]. In contrast to the paucity of data concerning the entorhinal cortex, the cholinergic system of several h-APP transgenic mice has been examined more frequently, although not systematically, most probably be-

cause of the popularity of the cholinergic hypothesis of AD dementia. Most h-APP transgenic mice do show some alterations of cholinergic markers, although these are mainly restricted to the hippocampus and the cortex, which are the target structures of the basal forebrain projections [50, 51, 85, 138, 142, 144] (table 1). The disruption of their cholinergic inputs is usually explained in terms of the deleterious effect of local (target) amyloid load, which perturbs cholinergic presynaptic terminals and fibers [87, 140, 142, 144]. Within the basal forebrain, reduced size of cholinergic cells or weakened cholinergic enzyme activities have been observed in two but not all transgenic mouse models [51, 142]. Moreover, the few studies that have tried to quantify the cholinergic neurons in the basal forebrain did not report a significant loss of cell bodies [e.g. 73]. Clearly, such weak cholinergic neuropathology fails to replicate that seen in dementia, which in turn might be one reason for the incomplete correspondence between the expected cognitive phenotype in old h-APP transgenic mice when modeling deficits found in AD patients. This lack of cholinergic neuron loss may be related to compensatory effects of the APP transgene, too short life span of the mouse for development of a complete neuropathologic scheme or resistance of the mouse basal forebrain to A β neurotoxicity. With regard to NFT models, it is interesting that some show a general atrophy of the forebrain, which suggests a significant cell loss in this area, but it is not yet known whether this atrophy includes any substantial cholinergic cell loss per se [106]. Of more direct relevance, multiple transgenic mice expressing both amyloid plaques and NFTs do show evidence of neuronal loss in the entorhinal cortex (table 1). Evidently, further neuroanatomical and behavioral data are needed to establish their complete neuropathological scheme and try to relate it to the extent of their cognitive impairment.

In conclusion, transgenic mouse models of AD have enabled considerable progress in understanding the genesis and consequences of the amyloid and/or NFT burden, but they have thus far provided little specific evidence on the influence of regional pathology. Many of the approaches in transgenic mice have tried to focus on possible relationships between the two neuropathological hallmarks of AD and the cognitive phenotype, but only a few of them have tried to establish a more direct connection between the neurodegenerative consequences of the transgene and the cognitive phenotype. Thus transgenic mice studies could focus more specifically on regional neurodegenerative changes and behavior, particularly the CBF and the transentorhinal region.

Lesions of the CBF or Lesion of the Entorhinal Cortex as Models of AD? Combining Both Lesions Provides a Better Model

By contrast with transgenic models, models based on a traditional lesion approach can provide a more direct test of the critical importance of one or more degenerating regions as a basis for severe memory loss in dementia. Initially, the proposed relationship between cholinergic dysfunction and AD or age-related memory alteration was supported by experimental studies using animal models based on either systemically administered anticholinergic drugs or nonspecific lesions of the basal forebrain region. The fundamental basis of the cholinergic hypothesis faltered, however, when evidence emerged from a series of experimental studies that used more selective, even if extensive, immunotoxic cholinergic lesions of the basal forebrain in rats [e.g. 15, 16]. Contrary to expectations, these selective cholinergic lesions more consistently induced impairments in attention rather than memory, or they produced deficits on some learning tasks that provided ambiguous models of episodic memory. These newer observations were useful in terms of characterizing cognitive decline related to dementia, because dementia entails deficits well beyond any isolated memory impairment, but they conflict with the notion of the key importance of the CBF in episodic memory deficits. Deficits in attention were evident in animal lesion studies that damaged the nucleus basalis magnocellularis, the source of cholinergic afferents of the cortical mantle [e.g. 43, 145, 146]. Conversely, cholinergic lesions in the septohippocampal system did not reliably alter attention [e.g. 147], but, beside a few exceptions showing clear-cut memory deficits, they also generally failed to consistently induce dramatic effects on memory function [e.g. 16; but see 147]. It is noteworthy that these findings were apparent even with massive (>90%) depletion of cholinergic markers such as choline acetyltransferase or acetylcholinesterase in the cortical mantle and/or the hippocampus [e.g. 15, 16]. Clearly, the manner in which cholinergic damage can account for memory impairment is an unresolved issue.

Similar conclusions can be drawn from lesions made in the transentorhinal region. Indeed, it is interesting that while fiber-sparing damage to the perirhinal and even the entorhinal cortex may result in some memory impairment, these deficits are seldom as dramatic as might be expected on the basis of the neural connectivity of this region with the hippocampus or the severity of memory impairment found in dementia patients [139].

Table 1. Summary of the main physiopathological alterations in the cortex, cholinergic basal forebrain and hippocampus, and cognitive status reported in the most frequent transgenic models of AD (references in square parentheses)

Transgenic mouse model (name)	Gene expressed	Amyloid deposits	NFTs	Neuropathology (cortex, hippocampus) or physiopathological alterations
APP23	APP Swe Mut cDNA	Yes (Ctx, Hp) Onset between the age of 12 and 18 months [46]	No (but hP-Tau is present) [e.g. 46]	Cell loss in CA1 (no loss in Ctx) [46] Fiber distortion in Hp plaque vicinity + aberrant sprouting in Hp [47] Reduction of synaptic transmission in the Hp, but LTP is normal; no effects in the frontal Ctx [48] No change in the number of synaptophysin-positive terminals in the Ctx, even at 24 months [49]
PDAPP	APP minigene, v717F mutation	Yes (Ctx and Hp) Onset between the age of 6 and 12 months [e.g. 60–63]	No (but hP-Tau is present) [62]	Hypometabolism in several subcortical and cortical regions [64] Reduced Hp volume, shortened corpus callosum, shrunken fornical commissure [65–67] Dentate gyrus shrinkage and reduced corpus callosum [68, 69] Amyloid deposits in Hp, especially in the projection areas of the EC [63] Reduced spine density in Hp [70] Reduced size of neurons in the locus coeruleus [71] Reduced hippocampal neurogenesis [72]
Tg2576	APP Swe cDNA	Yes (Ctx, Hp) Onset between the age of 14 and 18 months [e.g. 80, but see 81]	No (but hP-Tau is present) [e.g. 82]	Decreased synapse density in dentate gyrus outer molecular layer [83] No cell loss in CA1 [61] Increased cholinergic synapse density in the frontal [84] and parietal cortices [85] Loss of dendritic spines in CA1 [70] Normal ChAT activity in the frontolateral sensorimotor cortex [86] Decreased spine density; no marked volumetric change in the Hp [87]
JNPL3, pR5, also ALZ7 or ALZ17 in Spires and Hyman[39]	4R tau (4R tau P301 L)	No	Yes (Ctx, Hp, amygdala, locus coeruleus and substantia nigra) Onset between the age of 18 and 20 months, but reports show earlier appearance [101–104] Injections of A 42 accelerates NFTs formation [105]	Reactive astrocytes in Ctx and amygdala; apoptosis in the somatosensory Ctx, not in the Hp [105] Brain atrophy, especially in the temporal lobe and Hp (almost complete loss of pyramidal neurons in CA1 and CA2) [103, 106]
PSAPP	Tg2576 + PS1 M146L	Yes (Ctx and Hp, mainly C1A) Onset between the age of 8 and 12 weeks [111–113]	hP-Tau is present [112]	Decreased cholinergic synapses density in frontal Ctx [84] and Hp [85] Minor loss of neurons in Ctx and Hp, mainly CA1 [112] Reduced ChAT activity in occipital Ctx, but not the Hp [114] Neuron-free holes in the Ctx [113] Reduced mRNA of several synaptic plasticity-related genes in amyloid-containing regions [115] Marked reduction of number of CA1 neurons [116] Normal LTP in Hp, but accelerated decay [117]; abnormal LTP [118]
TAPP	Tg2576x + JNPL3	Yes (Ctx, Hp) Onset at 6–7 months, numerous deposits at 8.5–15 months [43] Amyloid burden increased in Ctx and Hp, more in females [125]	Yes (olfactory, entorhinal Ctx, amygdala, subiculum Hp-tau) Onset at 3 months (in spinal cord and pons in females at 9–11 months) [43]	Granulovacuolar degeneration in the subiculum [43] Age-dependent reduction of the number of neurons in the Hp (CA1) [125]
3xTg-AD	APP (Swe mut) + PS1 + tau	Yes (Ctx, then Hp) Onset at about 3 months [e.g. 126, 127]	Yes (Hp then Ctx) Later onset, with tau apparent at 6 months, undergoing hP much later[e.g. 126]	LTP deficits in Hp before tangle and plaque formation [e.g. 128]

This table provides a nonexhaustive glance at the literature concerning the most frequent and/or some recent transgenic models of AD, with particular focus on neuropathological features in the cortex, the hippocampus, and more specifically in the cholinergic basal forebrain and the entorhinal cortex (when available). This table also briefly summarizes the various learning and memory deficits that could be identified (or not) so far, and in various tests, in each of these models.

AChE = Acetylcholinesterase; Acq = acquisition; Barnes = Barnes maze; ChAT = choline acetyltransferase; Cons = consolidation; CTA = conditioned taste aversion; Ctx = cortex; Cxtf fear Cond = contextual fear conditioning; EC = entorhinal cortex; Hp = hippocampus; hP-Tau = hyperphosphorylated Tau; H-W Mz = Hebb and Williams maze; LTP = long-term potentiation; MW Mz = Morris water maze; NBM = nucleus basalis magnocellularis; n.d. = not determined; NFTs = neurofibrillary tangles; Obj Rec = object recognition task; Pass Av = passive avoidance; PS1 = preseniline 1; RAD Mz = radial maze; Ret = retrieval; Ref Mem = reference memory; Swe Mut = Swedish mutation; Y-Mz = Y-maze alternation; T-Mz = T-maze alternation; vAChT = vesicular acetylcholine transporter; WM = working memory.

Cholinergic basal forebrain	EC	Memory deficits
AChE-positive fiber distortion in Ctx plaque vicinity [46] Reduction of ChAT activity in the frontal Ctx, but no change in the number of neurons in the NBM complex [50] AChE and ChAT activity reduced in the basal forebrain [51]	Qualitative loss of neurons in the EC [52, 53] Reduction of ChAT-positive boutons in the EC [50]	Pass Av: Ret impaired at 25 months [54] MW Mz: deficit in Acq before amyloid deposits [55]; attenuated by cholinesterase inhibitors [56] Plus-shaped water maze: impaired Acq, Cons still possible, WM impaired but not obliterated [57] RAD Mz: no deficit of WM [58] 'Complex' Mz: impaired, but improved performance [58] Barnes Mz: slower Acq, preserved Cons and Ret [59]
Hypometabolism in the septum [64] Decreased cholinergic terminals in the Ctx and Hp, but no loss of cholinergic neurons in the medial septum and diagonal band of Broca; reduction of ChAT activity in the cingulate Ctx [73] Reduced acetylcholine release (microdialysis) in hippocampus and attenuated responsiveness of the release towards scopolamine; augmented high affinity uptake of choline [74]	A β deposits in molecular and laminar layers II, III of the EC (also in the Hp) [75] No metabolic change in the EC [64]	Obj Recog: age-dependent deficit [64]; impairments also found in other studies [e.g., 76]; no deficit in another study [77]. RAD Mz: robust, age-dependent deficits in hetero- and homozygotes [64] MW Mz: age-independent and age-dependent deficits [77]; marked deficit from an early age onwards [60, see also 78] Barnes Mz: age-dependent deficit [79] Eyeblink conditioning: impaired [69] Holeboard task: impaired [76]
Normal size of neurons in the medial septum and the NBM [85] Normal ChAT and AChE activity, vAChT and choline uptake in Ctx, cerebellum, Hp and striatum [88] Normal AChE and ChAT activity, reduced choline uptake, reduced M1, M2 and nACh receptor binding in some regions [89, 90] Degeneration of ChAT-positive fibers in the Ctx [91] Normal ChAT activity in frontal Ctx [86] Reduced ChAT activity in pedunculopontine nucleus, but not in laterodorsal tegmentum and medial septum [92]	Decreased synapse density in layers II and III [83] Normal size or density of cholinergic boutons in EC [85] Perforant path stimulation-induced LTP is altered in dentate gyrus [87]	MW Mz: age-dependent deficit, although ACq is not totally prevented; CONS and RET seem impaired [80, 81, 93, 94] or no deficit [95] Barnes Mz: no deficit [96] RAD Mz: no deficit of WM [97]; impaired WM in aquatic version of the task [94] Y-Mz: alternation is at random [81, 94, 98, 99] Obj Recog: impaired, especially after relocation [99] Fear conditioning: contextual processing impaired [100]; severely impaired in an age-dependent manner [87]
No data found in the literature	Tauopathy in the lateral EC [102,104] Tau inclusions in oligodendrocytes of the EC [107] Neurons with degenerated cytoplasm and condensed nuclei in the EC [103]	CTA: impaired memory (with considerable heterogeneity) [103]; accelerated extinction in another study [104] MW Mz: normal Acq and Ret of Ref Mem [94, 103], but WM impaired [103]; Ref Mem performance negatively correlated with the number of tau-positive neurons in the Hp [94]; impaired [106, 108,]; normal Ref Mem and impaired WM [109] Y-Mz: alternation rates are normal [94] RAD Mz: deficit, but performance improves over trials; deficit more pronounced with tangles vs. pretangles [103]; normal in aquatic version [94] Obj Recog: normal performance at a short post-Acq delay (1 h), but not at a longer one (3.5 h) [110]
Normal neuron size in medial septum and NBM [85] Normal ChAT activity in medial septum, a trend to reduction in NBM complex [114]	Normal size or density of cholinergic boutons in the EC [85]	Barnes Mz: no deficit [119] MW Mz: no deficit of Ref Mem during Acq, but some indication of altered Ret [120]; impaired Acq but normal Ret [119]; impaired Acq and Ret [121,122,123]; RAD Mz: impaired performance [120]; impaired WM in aquatic version of the task [118, 119, 122, 124] Y-Mz: normal alternation [119, 122] Obj Recog: impaired performance [120] H-W Mz: marked deficit [116]
No data found in the literature	Amyloid deposits, NFTs and granulovacuolar degeneration [43] Age-dependent reduction of the number of neurons in the EC [125]	MW Mz: age-dependent impairment in visible platform task, impaired Acq in Ref Mem and age-dependent Ret deficit [125]
No data found in the literature	Reduced number of Reelin-expressing pyramidal cells in EC; reduced Reelin levels in Hp [129] Early inflammation in EC [130]	MW Mz: deficit (rescued by AF267B) [40, 131, 132]; females are transiently worse than males [133] Ctxt fear Cond: deficit (not sensitive to AF267B) [131, 133] T-Mz : WM deficit [134, 135]

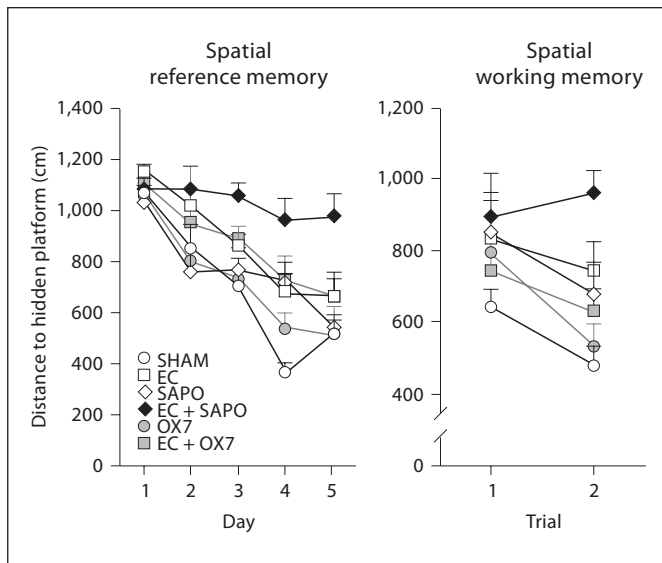


Fig. 1. Spatial reference memory and working memory performance in the Morris water maze in which the rat swims to the location of an escape platform hidden just beneath the opaque water surface. Performance is expressed as the mean distance (\pm SEM) to find the hidden platform in rats subjected to sham-operations (SHAM), neurotoxic entorhinal cortex lesions (EC) or intracerebral injections of 192 IgG-saporin (SAPO) or OX7-saporin (OX7). EC + SAPO and EC + OX7 rats sustained combined lesions. Intracerebral 192 IgG-saporin severely depletes the CBF neurons, but can also influence the integrity of Purkinje cells in the cerebellum, as the latter also bear the target receptors of 192 IgG-saporin. OX7-saporin injections provide a selective control for the potential effects of cerebellar damage. For the reference memory task, rats were given 4 consecutive trials from different start points on each day and allowed to find the platform positioned always in the same location; reduction of the distance traveled demonstrates learning. Note the absence of improvement in EC + SAPO rats. Such deficits failed to appear when the platform was visible (not shown). For the working memory test, the rats were given 2 consecutive trials (with different starting places) on each day, but the platform location was changed from day to day. This figure has been adapted from Traissard et al. [151].

Recent evidence suggests a more crucial role for the dorso-lateral band of the entorhinal cortex, at least in spatial memory processes, but rats with such lesions are still able to learn a new spatial location in a water-maze task and their primary deficit concerns the failure to retrieve a location that had been acquired prior to lesion surgery [148].

This brief summary on the contribution of lesion approaches [for further details, see 15, 16, 149] leads to the conclusion that neurodegeneration in the transentorhinal region and isolated cholinergic depletion of the hip-

pocampus (and/or cortex) are similarly insufficient to cause major memory deficits [16, 150]. Although entorhinal cortex degeneration begins well before severe episodic memory loss or frank dementia become obvious, it is expected that substantial loss in this region would have a significant influence on memory. It remains, however, highly plausible that it is a combination of severe neurodegenerative changes in both the entorhinal cortex and the CBF that constitutes a central issue for episodic memory loss in AD.

Evidence pertinent to this question has recently been published by Traissard et al. [151] in a study in which adult male rats were subjected to selective immunotoxic lesions of basal forebrain cholinergic neurons and fibre-sparing lesions of the entorhinal cortex, either separately or in combination. CBF lesions were made by intracerebroventricular injections of the low affinity nerve growth factor receptor-specific cholinergic immunotoxin 192 IgG-saporin [152, 153], while entorhinal cortex lesions were produced by multiple intraparenchymal injections of small amounts of N-methyl-D-aspartate. As illustrated in figure 1, rats with selective cholinergic damage alone showed little deficit on two widely used spatial memory tasks in the water maze, which tax reference and working memory, respectively, while those with entorhinal cortex lesions alone also showed only minor deficits. But there was a striking contrast in the rats that received the combination of 192 IgG-saporin and entorhinal cortex lesions as these rats showed a dramatic impairment on both spatial memory tasks and little evidence of being able to learn at all. These findings suggest that selective cholinergic lesions may severely tip the balance against an already failing medial temporal lobe memory system. Recent functional imaging studies suggest that many limbic and cortical brain regions in addition to the medial temporal lobe are associated with severe memory decline in dementia and its early progression [e.g. 36, 154, 155]. Nonetheless, we suggest that an improved understanding is required on the importance of the concurrent changes to these two key regions and their relationship to the dramatic memory decline observed in dementia. A greater and more specific focus on the combined, rather than isolated, loss of these two critical regions in clinical cases may therefore provide an improved approach to identify at risk cases, to understand the progressive decline of episodic memory and perhaps to encourage better treatments for the key problem of the cortical and sub-cortical disconnection of the hippocampal system in dementia.

Transgenic and Lesion Models Are Complementary: Let's Combine Them!

Transgenic models, especially the use of multiple transgenic mouse lines, have been valuable in studying the progression and interactions of amyloid plaques and NFTs. However, as outlined above, the reported cognitive deficits, CBF dysfunction and degenerative changes in the entorhinal cortex still fail to reach the severity of the neuropathological and cognitive alterations found in dementia. Conversely, the recent demonstration of the dramatic impact of combined CBF and entorhinal cortex lesions on cognitive abilities brings together two key pieces of the dementia process and points to the value of paying greater attention to the combined changes to these two regions, rather than to either in isolation. However, this new model does not of course mimic the presence of amyloid plaques and NFTs. Single lesions of the CBF fail to induce amyloid plaques in rats, even after a prolonged postsurgical delay [156], but some vascular amyloid deposits have been reported in rabbits [157]. Evidently, transgenic and lesion approaches have generated models which appear complementary. Transgenic mice bearing amyloid plaques and NFTs, but only mild cognitive deficits and modest CBF and entorhinal cortex alterations on one hand, and lesioned rats reproducing CBF and entorhinal cortex degeneration and severe memory deficits, but no plaques or NFTs on the other hand. Therefore, we propose that the two approaches be combined by making lesions in both the CBF and the entorhinal cortex in transgenic mice known to robustly exhibit amyloid plaques and NFTs. The resulting model would exhibit dramatic cognitive deficits, histopathological hallmarks and degeneration of two key regions of the disease, in other words, it would show more complete AD pathology than is currently available. Furthermore, we might also predict that the double lesions will not only have an additive effect on the transgenic phenotype, they could also worsen the amyloid and/or tangle burdens. Indeed, there are some indications that lesions of the CBF or the entorhinal cortex influence APP and tau metabolism in their target regions as reported in rabbits and rats [e.g. 157, 158]. Therefore, one might suggest that applying the double lesion to transgenic mice might amplify the amyloid and tangle pathologies. Recent work has suggested a new significance for cholinergic depletion and dementia progression in terms of both tau hyperphosphorylation and the production of A β ; the latter products may in turn disrupt acetylcholine synthesis and cholinergic neurotransmission by altering axon terminals and synaptic integrity

[15, 127]. Therefore, the proposed lesion plus transgenic model may also help to elucidate how cholinergic dysfunction and entorhinal cortex degeneration interact with the histopathology of the disease. In addition, the extent of the lesions as well as the timing of both entorhinal and CBF lesions could be easily controlled and a wide range of transgenic mouse models of AD are now available. Thus, this transgenic plus lesion model offers enough flexibility to study behaviorally relevant interactions between the expression of one or more transgenes and the time course of the impact of more or less extensive lesions, both in terms of neuropathology (e.g. enhanced amyloid deposits, increased NFTs, exacerbation of the lesion extent) and cognitive consequences (e.g. potentiation of deficits). Evidence on the influence of basal forebrain or parahippocampal lesions in robust transgenic models is also highly relevant to the evaluation of different therapeutic agents in these genetically compromised animals. For example, the proposed model might be particularly relevant to test new therapeutic strategies, and probably multiple therapies, targeting amyloid plaques and/or NFTs, as well as the symptoms or the progress of two of the key neurodegenerations found in dementia.

One caveat at this point in time that stands against the idea of developing the transgenic plus lesion model is that transgenic and lesion models have been developed in different species, respectively mice and rats. Thus far, there is only one exception in which AD-related genetic manipulations have been performed in the rat [159], whereas the majority of lesion studies have been performed using rats. This difference raises the question of whether results from lesion studies in rats can be generalized to mice, but this seems highly likely as it is already accepted that information from rat studies are informative as to the basic neurobiology of learning and memory, including that found in humans. Moreover, it is feasible to perform selective CBF lesions and entorhinal cortex lesions in mice. Concerning the entorhinal cortex, such lesions have been conducted in mice for some time [e.g. 160]. And there now exists a selective cholinergic immunotoxin claimed to be an equivalent to 192 IgG-saporin which is used for rats, namely mu p75-saporin. Although the older version of this murine immunotoxin had some severe drawbacks [161], an improved version of mu p75-saporin is now available (see <http://www.atsbio.com/catalog/catalog-frame.html>). Our first experiment with this improved murine cholinotoxin found that it is able to induce both selective and extensive damage to CBF neurons (medial septum, diagonal band of Broca and nucleus basalis mag-

nocellularis) and to produce behavioral effects comparable to those described in rats with 192 IgG-saporin lesions [162]. Thus, this murine cholinotoxin may be used in transgenic models of AD to induce selective cholinergic lesions at different developmental time points.

It is also encouraging that the idea of combining lesions with a transgenic approach has already begun. In one study, Heneka et al. [163] showed that DSP-4 lesions of the noradrenergic neurons of the locus coeruleus greatly augmented the development of cortical amyloid pathology in APP23 mice and also exacerbated the cognitive deficits displayed in episodic-like memory tasks. The authors interpreted these findings in relation with the consequences of the lesions on the regulation of intracerebral inflammatory process. More relevant to the emphasis of the current review, Chauhan [164] has found substantially greater impairments after selective mu p75-saporin CBF lesions in Tg CRND8 mice, together with increased tau phosphorylation and tangle-like inclusions. These initial observations support the idea of critical interactions between the presence of localized degeneration or injury and the expression of the transgene(s). It seems highly likely, then, that lesions of the CBF and the entorhinal cortex will produce larger cognitive deficits in

transgenic mouse models than in unlesioned transgenic mice. The developmental timing of the lesion intervention in the transgenic mice is likely to be critical, as there may be very different answers that may vary as a function of the specific issue under question. For example, the double lesion could be made before the onset of plaques or NFTs to examine if they accelerate the expression of the transgene. Alternatively, the lesion could be performed only once the plaque or NFT burden is already high (more advanced age) to investigate whether the presence of the latter exacerbates existing memory deficits or induces new ones. In line with the progression of dementia pathology, the lesions could be made in series, starting with the entorhinal cortex and adding the cholinergic one only later.

Acknowledgements

The authors acknowledge funding by the CNRS and the ULP. J.C.D.-A. has been supported during his stay in Strasbourg as an invited professor by ULP. The authors would also like to thank the Fédération pour la Recherche sur le Cerveau for providing research funds.

References

- Alzheimer A: Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Zschr Psychiatr Psychisch Gerichtl Mediz* 1907;64:146–148.
- Hardy J: The relationship between amyloid and tau. *J Mol Neurosci* 2003;20:203–206.
- Monaco S, Zanusso G, Mazzucco S, Rizzuto N: Cerebral amyloidosis: molecular pathways and therapeutic challenges. *Curr Med Chem* 2006;13:1903–1913.
- Fleischman DA, Gabrieli J: Long-term memory in Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol* 1999;9:240–244.
- Tiraboschi P, Hansen LA, Thal LJ, Corey-Bloom J: The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD. *Neurology* 2004;62:1984–1989.
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R: Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 1991;30:572–580.
- Bowen DM, Smith CB, White P, Davison AN: Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain* 1976;99:459–496.
- Davies P, Maloney AJ: Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 1976;2:1403.
- Perry EK, Perry RH, Blessed G, Tomlinson BE: Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1978;4:273–277.
- Baskin DS, Browning JL, Pirozzolo FJ, Korpelaar S, Baskin JA, Appel SH: Brain choline acetyltransferase and mental function in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 1999;56:1121–1123.
- Frolich L: The cholinergic pathology in Alzheimer's disease – discrepancies between clinical experience and pathophysiological findings. *J Neural Transm* 2002;109:1003–1013.
- Minger SL, Esiri MM, McDonald B, Keene J, Carter J, Hope T, Francis PT: Cholinergic deficits contribute to behavioral disturbance in patients with dementia. *Neurology* 2000;55:1460–1467.
- Pappas BA, Bayley PJ, Bui BK, Hansen LA, Thal LJ: Choline acetyltransferase activity and cognitive domain scores of Alzheimer's patients. *Neurobiol Aging* 2000;21:11–17.
- Terry AV Jr, Buccafusco JJ: The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;306:821–827.
- Mesulam M: The cholinergic lesion of Alzheimer's disease: pivotal factor or side show? *Learn Mem* 2004;11:43–49.
- Parent MB, Baxter MG: Septohippocampal acetylcholine: involved in but not necessary for learning and memory? *Learn Mem* 2004;11:9–20.
- Bartus RT, Dean RL III, Beer B, Lippa AS: The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 1982;217:408–414.
- Knopman DS, Boeve BF, Petersen RC: Essentials of the proper diagnoses of mild cognitive impairment, dementia, and major subtypes of dementia. *Mayo Clin Proc* 2003;78:1290–1308.
- Kaufer DI: Pharmacologic therapy of dementia with Lewy bodies. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2002;15:224–232.
- Lleo A, Greenberg SM, Growdon JH: Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Annu Rev Med* 2006;57:513–533.

- 21 Courtney C, Farrell D, Gray R, Hills R, Lynch L, Sellwood E, Edwards S, Hardyman W, Rafferty J, Crome P, Lendon C, Shaw H, Bentham P: Long-term donepezil treatment in 565 patients with Alzheimer's disease (AD2000): randomised double-blind trial. *Lancet* 2004;363:2105–2115.
- 22 Doody RS, Stevens JC, Beck C, Dubinsky RM, Kaye JA, Gwyther L, Mohs RC, Thal LJ, Whitehouse PJ, DeKosky ST, Cummings JL: Practice parameter: management of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2001;56:1154–1166.
- 23 Davis KL, Mohs RC, Marin D, Purohit DP, Perl DP, Lantz M, Austin G, Haroutunian V: Cholinergic markers in elderly patients with early signs of Alzheimer disease. *JAMA* 1999;281:1401–1406.
- 24 Hardy J, Duff K, Hardy KG, Perez-Tur J, Hutton M: Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. *Nat Neurosci* 1998;1:355–358.
- 25 Van Dam D, D'Hooge R, Staufenbiel M, Van Ginneken C, Van Meir F, De Deyn PP: Age-dependent cognitive decline in the APP23 model precedes amyloid deposition. *Eur J Neurosci* 2003;17:388–396.
- 26 DeKosky ST, Ikonomic MD, Styren SD, Beckett L, Wisniewski S, Bennett DA, Cochran EJ, Kordower JH, Mufson EJ: Upregulation of choline acetyltransferase activity in hippocampus and frontal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment. *Ann Neurol* 2002;51:145–155.
- 27 Braak H, Braak E: Entorhinal-hippocampal interaction in mnestic disorders. *Hippocampus* 1993;3:239–246.
- 28 Apostolova LG, Dutton RA, Dinov ID, Hayashi KM, Toga AW, Cummings JL, Thompson PM: Conversion of mild cognitive impairment to Alzheimer disease predicted by hippocampal atrophy maps. *Arch Neurol* 2006;63:693–699.
- 29 Bell-McGinty S, Lopez OL, Meltzer CC, Scanlon JM, Whyte EM, Dekosky ST, Becker JT: Differential cortical atrophy in subgroups of mild cognitive impairment. *Arch Neurol* 2005;62:1393–1397.
- 30 Hirao K, Ohnishi T, Matsuda H, Nemoto K, Hirata Y, Yamashita F, Asada T, Iwamoto T: Functional interactions between entorhinal cortex and posterior cingulate cortex at the very early stage of Alzheimer's disease using brain perfusion single-photon emission computed tomography. *Nucl Med Commun* 2006;27:151–156.
- 31 Masdeu JC, Zubieta JL, Arbizu J: Neuroimaging as a marker of the onset and progression of Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 2005;236:55–64.
- 32 Rodrigue KM, Raz N: Shrinkage of the entorhinal cortex over five years predicts memory performance in healthy adults. *J Neurosci* 2004;24:956–963.
- 33 Stoub TR, Bulgakova M, Leurgans S, Bennett DA, Fleischman D, Turner DA, deToledo-Morrell L: MRI predictors of risk of incident Alzheimer disease: a longitudinal study. *Neurology* 2005;64:1520–1524.
- 34 Whitwell JL, Przybelski SA, Weigand SD, Knopman DS, Boeve BF, Petersen RC, Jack CR Jr: 3D maps from multiple MRI illustrate changing atrophy patterns as subjects progress from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Brain* 2007;130:1777–1786.
- 35 Stoub TR, deToledo-Morrell L, Stebbins GT, Leurgans S, Bennett DA, Shah RC: Hippocampal disconnection contributes to memory dysfunction in individuals at risk for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:10041–10045.
- 36 Nestor PJ, Fryer TD, Hodges JR: Declarative memory impairments in Alzheimer's disease and semantic dementia. *Neuroimage* 2006;30:1010–1020.
- 37 LaFerla FM, Oddo S: Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med* 2005;11:170–176.
- 38 McGowan E, Eriksen J, Hutton M: A decade of modeling Alzheimer's disease in transgenic mice. *Trends Genet* 2006;22:281–289.
- 39 Spires TL, Hyman BT: Transgenic models of Alzheimer's disease: learning from animals. *NeuroRx* 2005;2:423–437.
- 40 Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM: Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* 2005;45:675–688.
- 41 Dodart JC, Mathis C, Bales KR, Paul SM: Does my mouse have Alzheimer's disease? *Genes Brain Behav* 2002;1:142–155.
- 42 Hsia AY, Masliah E, McConlogue L, Yu GQ, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Malenka RC, Nicoll RA, Mucke L: Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:3228–3233.
- 43 Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, Eckman C, Hardy J, Hutton M, McGowan E: Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 2001;293:1487–1491.
- 44 Ohno M, Sametsky EA, Younkin LH, Oakley H, Younkin SG, Citron M, Vassar R, Disterhoft JF: BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron* 2004;41:27–33.
- 45 German DC, Eisch AJ: Mouse models of Alzheimer's disease: insight into treatment. *Rev Neurosci* 2004;15:353–369.
- 46 Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Burki K, Frey P, Paganetti PA, Waridel C, Calhoun ME, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M, Sommer B: Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:13287–13292.
- 47 Phinney AL, Deller T, Stalder M, Calhoun ME, Frotscher M, Sommer B, Staufenbiel M, Jucker M: Cerebral amyloid induces aberrant axonal sprouting and ectopic terminal formation in amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci* 1999;19:8552–8559.
- 48 Roder S, Danover L, Pozza MF, Lingenhoehl K, Wiederhold KH, Olpe HR: Electrophysiological studies on the hippocampus and prefrontal cortex assessing the effects of amyloidosis in amyloid precursor protein 23 transgenic mice. *Neuroscience* 2003;120:705–720.
- 49 Boncristiano S, Calhoun ME, Howard V, Bondolfi L, Kaeser SA, Wiederhold KH, Staufenbiel M, Jucker M: Neocortical synaptic bouton number is maintained despite robust amyloid deposition in APP23 transgenic mice. *Neurobiol Aging* 2005;26:607–613.
- 50 Boncristiano S, Calhoun ME, Kelly PH, Pfeifer M, Bondolfi L, Stalder M, Phinney AL, Abramowski D, Sturchler-Pierrat C, Enz A, Sommer B, Staufenbiel M, Jucker M: Cholinergic changes in the APP23 transgenic mouse model of cerebral amyloidosis. *J Neurosci* 2002;22:3234–3243.
- 51 Van Dam D, Marescau B, Engelborghs S, Cremers T, Mulder J, Staufenbiel M, De Deyn PP: Analysis of cholinergic markers, biogenic amines, and amino acids in the CNS of two APP overexpression mouse models. *Neurochem Int* 2005;46:409–422.
- 52 Bondolfi L, Calhoun M, Ermini F, Kuhn HG, Wiederhold KH, Walker L, Staufenbiel M, Jucker M: Amyloid-associated neuron loss and gliogenesis in the neocortex of amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci* 2002;22:515–522.
- 53 Calhoun ME, Wiederhold KH, Abramowski D, Phinney AL, Probst A, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Sommer B, Jucker M: Neuron loss in APP transgenic mice. *Nature* 1998;395:755–756.
- 54 Kelly PH, Bondolfi L, Hunziker D, Schlecht HP, Carver K, Maguire E, Abramowski D, Wiederhold KH, Sturchler-Pierrat C, Jucker M, Bergmann R, Staufenbiel M, Sommer B: Progressive age-related impairment of cognitive behavior in APP23 transgenic mice. *Neurobiol Aging* 2003;24:365–378.
- 55 Van Dam D, D'Hooge R, Staufenbiel M, Van Ginneken C, Van Meir F, De Deyn PP: Age-dependent cognitive decline in the APP23 model precedes amyloid deposition. *Eur J Neurosci* 2003;17:388–396.

- 56 Van Dam D, Abramowski D, Staufenbiel M, De Deyn PP: Symptomatic effect of donepezil, rivastigmine, galantamine and memantine on cognitive deficits in the APP23 model. *Psychopharmacology (Berl)* 2005;180:177-190.
- 57 Vloeberghs E, Van Dam D, D'Hooge R, Staufenbiel M, De Deyn PP: APP23 mice display working memory impairment in the plus-shaped water maze. *Neurosci Lett* 2006;407:6-10.
- 58 Hellweg R, Lohmann P, Huber R, Kuhl A, Rippe MW: Spatial navigation in complex and radial mazes in APP23 animals and neurotrophin signaling as a biological marker of early impairment. *Learn Mem* 2006;13:63-71.
- 59 Prut L, Abramowski D, Krucker T, Levy CL, Roberts AJ, Staufenbiel M, Wiessner C: Aged APP23 mice show a delay in switching to the use of a strategy in the Barnes maze. *Behav Brain Res* 2007;179:107-110.
- 60 Hartman RE, Izumi Y, Bales KR, Paul SM, Wozniak DF, Holtzman DM: Treatment with an amyloid-beta antibody ameliorates plaque load, learning deficits, and hippocampal long-term potentiation in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2005;25:6213-6220.
- 61 Irizarry MC, Soriano F, Mcnamara M, Page KJ, Schenk D, Games D, Hyman BT: Abeta deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse. *J Neurosci* 1997;17:7053-7059.
- 62 Masliah E, Sisk A, Mallory M, Games D: Neurofibrillary pathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60:357-368.
- 63 Reilly JF, Games D, Rydel RE, Freedman S, Schenk D, Young WG, Morrison JH, Bloom FE: Amyloid deposition in the hippocampus and entorhinal cortex: quantitative analysis of a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:4837-4842.
- 64 Dodart JC, Meziane H, Mathis C, Bales KR, Paul SM, Ungerer A: Behavioral disturbances in transgenic mice overexpressing the V717F beta-amyloid precursor protein. *Behav Neurosci* 1999;113:982-990.
- 65 Dodart JC, Mathis C, Saura J, Bales KR, Paul SM, Ungerer A: Neuroanatomical abnormalities in behaviorally characterized APP(V717F) transgenic mice. *Neurobiol Dis* 2000;7:71-85.
- 66 Gonzalez-Lima F, Berndt JD, Valla JE, Games D, Reiman EM: Reduced corpus callosum, fornix and hippocampus in PDAPP transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroreport* 2001;12:2375-2379.
- 67 Valla J, Schneider LE, Gonzalez-Lima F, Reiman EM: Nonprogressive transgene-related callosal and hippocampal changes in PDAPP mice. *Neuroreport* 2006;17:829-832.
- 68 Redwine JM, Kosofsky B, Jacobs RE, Games D, Reilly JF, Morrison JH, Young WG, Bloom FE: Dentate gyrus volume is reduced before onset of plaque formation in PDAPP mice: a magnetic resonance microscopy and stereologic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:1381-1386.
- 69 Weiss C, Venkatasubramanian PN, Aguado AS, Power JM, Tom BC, Li L, Chen KS, Distlerhoft JF, Wyrwicz AM: Impaired eyeblink conditioning and decreased hippocampal volume in PDAPP V717F mice. *Neurobiol Dis* 2002;11:425-433.
- 70 Lanz TA, Carter DB, Merchant KM: Dendritic spine loss in the hippocampus of young PDAPP and Tg2576 mice and its prevention by the ApoE2 genotype. *Neurobiol Dis* 2003;13:246-253.
- 71 German DC, Nelson O, Liang F, Liang CL, Games D: The PDAPP mouse model of Alzheimer's disease: locus coeruleus neuronal shrinkage. *J Comp Neurol* 2005;492:469-476.
- 72 Donovan MH, Yazdani U, Norris RD, Games D, German DC, Eisch AJ: Decreased adult hippocampal neurogenesis in the PDAPP mouse model of Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* 2006;495:70-83.
- 73 German DC, Yazdani U, Speciale SG, Pasbakhsh P, Games D, Liang CL: Cholinergic neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* 2003;462:371-381.
- 74 Bales KR, Tzavara ET, Wu S, Wade MR, Bymaster FP, Paul SM, Nomikos GG: Cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer disease is reversed by an anti-A beta antibody. *J Clin Invest* 2006;116:825-832.
- 75 Su Y, Ni B: Selective deposition of amyloid-beta protein in the entorhinal-dentate projection of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 1998;53:177-186.
- 76 Dodart JC, Bales KR, Gannon KS, Greene SJ, DeMattos RB, Mathis C, DeLong CA, Wu S, Wu X, Holtzman DM, Paul SM: Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model. *Nat Neurosci* 2002;5:452-457.
- 77 Chen G, Chen KS, Knox J, Inglis J, Bernard A, Martin SJ, Justice A, McConlogue L, Games D, Freedman SB, Morris RG: A learning deficit related to age and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 2000;408:975-979.
- 78 Brody DL, Holtzman DM: Morris water maze search strategy analysis in PDAPP mice before and after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol* 2006;197:330-340.
- 79 Huitron-Resendiz S, Sanchez-Alavez M, Gallegos R, Berg G, Crawford E, Giacchino JL, Games D, Henriksen SJ, Criado JR: Age-independent and age-related deficits in visuospatial learning, sleep-wake states, thermoregulation and motor activity in PDAPP mice. *Brain Res* 2002;928:126-137.
- 80 Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH: A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 2006;440:352-357.
- 81 Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G: Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 1996;274:99-102.
- 82 Tomidokoro Y, Harigaya Y, Matsubara E, Ikeda M, Kawarabayashi T, Shiro T, Ishiguro K, Okamoto K, Younkin SG, Shoji M: Brain Abeta amyloidosis in APPsw mice induces accumulation of presenilin-1 and tau. *J Pathol* 2001;194:500-506.
- 83 Dong H, Martin MV, Chambers S, Csernansky JG: Spatial relationship between synapse loss and beta-amyloid deposition in Tg2576 mice. *J Comp Neurol* 2007;500:311-321.
- 84 Hu L, Wong TP, Cote SL, Bell KF, Cuello AC: The impact of Abeta-plaques on cortical cholinergic and non-cholinergic presynaptic boutons in Alzheimer's disease-like transgenic mice. *Neuroscience* 2003;121:421-432.
- 85 Wong TP, Debeer T, Duff K, Cuello AC: Reorganization of cholinergic terminals in the cerebral cortex and hippocampus in transgenic mice carrying mutated presenilin-1 and amyloid precursor protein transgenes. *J Neurosci* 1999;19:2706-2716.
- 86 Wenk GL, McGann-Gramling K, Hauss-Wegrzyniak B: The presence of the APP(swe) mutation in mice does not increase the vulnerability of cholinergic basal forebrain neurons to neuroinflammation. *Neuroscience* 2004;125:769-776.
- 87 Jacobsen JS, Wu CC, Redwine JM, Comery TA, Arias R, Bowlby M, Martone R, Morrison JH, Pangalos MN, Reinhart PH, Bloom FE: Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:5161-5166.
- 88 Gau JT, Steinhilb ML, Kao TC, D'Amato CJ, Gaut JR, Frey KA, Turner RS: Stable beta-secretase activity and presynaptic cholinergic markers during progressive central nervous system amyloidogenesis in Tg2576 mice. *Am J Pathol* 2002;160:731-738.
- 89 Apelt J, Kumar A, Schliebs R: Impairment of cholinergic neurotransmission in adult and aged transgenic Tg2576 mouse brain expressing the Swedish mutation of human beta-amyloid precursor protein. *Brain Res* 2002;953:17-30.
- 90 Klingner M, Apelt J, Kumar A, Sorger D, Sabri O, Steinbach J, Scheunemann M, Schliebs R: Alterations in cholinergic and non-cholinergic neurotransmitter receptor densities in transgenic Tg2576 mouse brain with beta-amyloid plaque pathology. *Int J Dev Neurosci* 2003;21:357-369.
- 91 Luth HJ, Apelt J, Ihunwo AO, Arendt T, Schliebs R: Degeneration of beta-amyloid-associated cholinergic structures in transgenic APP SW mice. *Brain Res* 2003;977:16-22.

- 92 Zhang B, Veasey SC, Wood MA, Leng LZ, Kaminski C, Leight S, Abel T, Lee VM, Trojanowski JQ: Impaired rapid eye movement sleep in the Tg2576 APP murine model of Alzheimer's disease with injury to pedunculo-pontine cholinergic neurons. *Am J Pathol* 2005;167:1361-1369.
- 93 Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, Kotilinek L, Kawarabayashi T, Younkin LH, Carlson GA, Younkin SG, Ashe KH: The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2002;22:1858-1867.
- 94 Arendash GW, Lewis J, Leighty RE, McGowan E, Cracchiolo JR, Hutton M, Garcia MF: Multi-metric behavioral comparison of APPsw and P301L models for Alzheimer's disease: linkage of poorer cognitive performance to tau pathology in forebrain. *Brain Res* 2004;1012:29-41.
- 95 Zhuo JM, Prescott SL, Murray ME, Zhang HY, Baxter MG, Nicolle MM: Early discrimination reversal learning impairment and preserved spatial learning in a longitudinal study of Tg2576 APPsw mice. *Neurobiol Aging* 2007;28:1248-1257.
- 96 King DL, Arendash GW, Crawford F, Sterk T, Menendez J, Mullan MJ: Progressive and gender-dependent cognitive impairment in the APP(SW) transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 1999;103:145-162.
- 97 Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, DiCarlo G, Wilcock D, Connor K, Hatcher J, Hope C, Gordon M, Arendash GW: A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 2000;408:982-985.
- 98 Ognibene E, Middei S, Daniele S, Adriani W, Ghirardi O, Caprioli A, Laviola G: Aspects of spatial memory and behavioral disinhibition in Tg2576 transgenic mice as a model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 2005;156:225-232.
- 99 Hale G, Good M: Impaired visuospatial recognition memory but normal object novelty detection and relative familiarity judgments in adult mice expressing the APPsw Alzheimer's disease mutation. *Behav Neurosci* 2005;119:884-891.
- 100 Barnes P, Good M: Impaired Pavlovian cued fear conditioning in Tg2576 mice expressing a human mutant amyloid precursor protein gene. *Behav Brain Res* 2005;157:107-117.
- 101 Gotz J, Chen F, Van Dorpe J, Nitsch RM: Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science* 2001a;293:1491-1495.
- 102 Ishihara T, Zhang B, Higuchi M, Yoshiyama Y, Trojanowski JQ, Lee VM: Age-dependent induction of congophilic neurofibrillary tau inclusions in tau transgenic mice. *Am J Pathol* 2001;158:555-562.
- 103 Murakami T, Paitel E, Kawarabayashi T, Ikeda M, Chishti MA, Janus C, Matsubara E, Sasaki A, Kawarai T, Phinney AL, Horigaya Y, Horne P, Egashira N, Mishima K, Hanna A, Yang J, Iwasaki K, Takahashi M, Fujiwara M, Ishiguro K, Bergeron C, Carlson GA, Abe K, Westaway D, George-Hyslop P, Shoji M: Cortical neuronal and glial pathology in TgTauP301L transgenic mice: neuronal degeneration, memory disturbance, and phenotypic variation. *Am J Pathol* 2006;169:1365-1375.
- 104 Pennanen L, Welzl H, D'Adamo P, Nitsch RM, Gotz J: Accelerated extinction of conditioned taste aversion in P301L tau transgenic mice. *Neurobiol Dis* 2004;15:500-509.
- 105 Gotz J, Chen F, Barmettler R, Nitsch RM: Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau. *J Biol Chem* 2001b;276:529-534.
- 106 Ramsden M, Kotilinek L, Forster C, Paulson J, McGowan E, SantaCruz K, Guimaraes A, Yue M, Lewis J, Carlson G, Hutton M, Ashe KH: Age-dependent neurofibrillary tangle formation, neuron loss, and memory impairment in a mouse model of human tauopathy (P301L). *J Neurosci* 2005;25:10637-10647.
- 107 Lin WL, Lewis J, Yen SH, Hutton M, Dickson DW: Filamentous tau in oligodendrocytes and astrocytes of transgenic mice expressing the human tau isoform with the P301L mutation. *Am J Pathol* 2003;162:213-218.
- 108 Berger Z, Roder H, Hanna A, Carlson A, Rangachari V, Yue M, Wszolek Z, Ashe K, Knight J, Dickson D, Andorfer C, Rosenberg TL, Lewis J, Hutton M, Janus C: Accumulation of pathological tau species and memory loss in a conditional model of tauopathy. *J Neurosci* 2007;27:3650-3662.
- 109 Pennanen L, Wolfer DP, Nitsch RM, Gotz J: Impaired spatial reference memory and increased exploratory behavior in P301L tau transgenic mice. *Genes Brain Behav* 2006;5:369-379.
- 110 Asuni AA, Boutajangout A, Quartermain D, Sigurdsson EM: Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements. *J Neurosci* 2007;27:9115-9129.
- 111 McGowan E, Sanders S, Iwatsubo T, Takeuchi A, Saido T, Zehr C, Yu X, Uljon S, Wang R, Mann D, Dickson D, Duff K: Amyloid phenotype characterization of transgenic mice overexpressing both mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin 1 transgenes. *Neurobiol Dis* 1999;6:231-244.
- 112 Takeuchi A, Irizarry MC, Duff K, Saido TC, Hsiao AK, Hasegawa M, Mann DM, Hyman BT, Iwatsubo T: Age-related amyloid beta deposition in transgenic mice overexpressing both Alzheimer mutant presenilin 1 and amyloid beta precursor protein Swedish mutant is not associated with global neuronal loss. *Am J Pathol* 2000;157:331-339.
- 113 Urbanc B, Cruz L, Le R, Sanders J, Ashe KH, Duff K, Stanley HE, Irizarry MC, Hyman BT: Neurotoxic effects of thioflavin S-positive amyloid deposits in transgenic mice and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:13990-13995.
- 114 Hernandez D, Sugaya K, Qu T, McGowan E, Duff K, McKinney M: Survival and plasticity of basal forebrain cholinergic systems in mice transgenic for presenilin-1 and amyloid precursor protein mutant genes. *Neuroreport* 2001;12:1377-1384.
- 115 Dickey CA, Loring JF, Montgomery J, Gordon MN, Eastman PS, Morgan D: Selectively reduced expression of synaptic plasticity-related genes in amyloid precursor protein + presenilin-1 transgenic mice. *J Neurosci* 2003;23:5219-5226.
- 116 Sadowski M, Pankiewicz J, Scholtzova H, Ji Y, Quartermain D, Jensen CH, Duff K, Nixon RA, Gruen RJ, Wisniewski T: Amyloid-beta deposition is associated with decreased hippocampal glucose metabolism and spatial memory impairment in APP/PS1 mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63:418-428.
- 117 Gureviciene I, Ikonen S, Gurevicius K, Sarkaki A, van Groen T, Pussinen R, Ylinen A, Tanila H: Normal induction but accelerated decay of LTP in APP + PS1 transgenic mice. *Neurobiol Dis* 2004;15:188-195.
- 118 Trinchese F, Liu S, Battaglia F, Walter S, Mathews PM, Arancio O: Progressive age-related development of Alzheimer-like pathology in APP/PS1 mice. *Ann Neurol* 2004;55:801-814.
- 119 Arendash GW, King DL, Gordon MN, Morgan D, Hatcher JM, Hope CE, Diamond DM: Progressive, age-related behavioral impairments in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin-1 transgenes. *Brain Res* 2001;891:42-53.
- 120 Todd RJ, Volmar CH, Dwivedi S, Town T, Crescentini R, Crawford F, Tan J, Mullan M: Behavioral effects of CD40-CD40L pathway disruption in aged PSAPP mice. *Brain Res* 2004;1015:161-168.
- 121 Puolivali J, Wang J, Heikkinen T, Heikkila M, Tapiola T, van Groen T, Tanila H: Hippocampal A beta 42 levels correlate with spatial memory deficit in APP and PS1 double transgenic mice. *Neurobiol Dis* 2002;9:339-347.
- 122 Jensen MT, Mottin MD, Cracchiolo JR, Leighty RE, Arendash GW: Lifelong immunization with human beta-amyloid (1-42) protects Alzheimer's transgenic mice against cognitive impairment throughout aging. *Neuroscience* 2005;130:667-684.
- 123 Liu L, Tapiola T, Herukka SK, Heikkila M, Tanila H: Abeta levels in serum, CSF and brain, and cognitive deficits in APP + PS1 transgenic mice. *Neuroreport* 2003;14:163-166.

- 124 Gordon MN, King DL, Diamond DM, Jantzen PT, Boyett KV, Hope CE, Hatcher JM, DiCarlo G, Gottschall WP, Morgan D, Arndash GW: Correlation between cognitive deficits and Abeta deposits in transgenic APP+PS1 mice. *Neurobiol Aging* 2001;22:377-385.
- 125 Ribe EM, Perez M, Puig B, Gich I, Lim F, Cuadrado M, Sesma T, Catena S, Sanchez B, Nieto M, Gomez-Ramos P, Moran MA, Cabodevilla F, Samaranch L, Ortiz L, Perez A, Ferrer I, Avila J, Gomez-Isla T: Accelerated amyloid deposition, neurofibrillary degeneration and neuronal loss in double mutant APP/tau transgenic mice. *Neurobiol Dis* 2005;20:814-822.
- 126 Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM: Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2003a;24:1063-1070.
- 127 Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM: Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 2003b;39:409-421.
- 128 Oddo S, Caccamo A, Tran L, Lambert MP, Glabe CG, Klein WL, LaFerla FM: Temporal profile of amyloid-beta (Abeta) oligomerization in an in vivo model of Alzheimer disease. A link between Abeta and tau pathology. *J Biol Chem* 2006;281:1599-1604.
- 129 Chin J, Massaro CM, Palop JJ, Thwin MT, Yu GQ, Bien-Ly N, Bender A, Mucke L: Reelin depletion in the entorhinal cortex of human amyloid precursor protein transgenic mice and humans with Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2007;27:2727-2733.
- 130 Janelins MC, Mastrangelo MA, Oddo S, LaFerla FM, Federoff HJ, Bowers WJ: Early correlation of microglial activation with enhanced tumor necrosis factor-alpha and monocyte chemoattractant protein-1 expression specifically within the entorhinal cortex of triple transgenic Alzheimer's disease mice. *J Neuroinflammation* 2005;2:23.
- 131 Caccamo A, Oddo S, Billings LM, Green KN, Martinez-Coria H, Fisher A, LaFerla FM: M1 receptors play a central role in modulating AD-like pathology in transgenic mice. *Neuron* 2006;49:671-682.
- 132 Billings LM, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM: Learning decreases A beta*56 and tau pathology and ameliorates behavioral decline in 3xTg-AD mice. *J Neurosci* 2007;27:751-761.
- 133 Clinton LK, Billings LM, Green KN, Caccamo A, Ngo J, Oddo S, McGaugh JL, LaFerla FM: Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. *Neurobiol Dis* 2007;28:76-82.
- 134 Oddo S, Vasilevko V, Caccamo A, Kitazawa M, Cribbs DH, LaFerla FM: Reduction of soluble Abeta and tau, but not soluble Abeta alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles. *J Biol Chem* 2006;281:39413-39423.
- 135 Caccamo A, Oddo S, Tran LX, LaFerla FM: Lithium reduces tau phosphorylation but not A beta or working memory deficits in a transgenic model with both plaques and tangles. *Am J Pathol* 2007;170:1669-1675.
- 136 Chen G, Chen KS, Knox J, Inglis J, Bernard A, Martin SJ, Justice A, McConlogue L, Games D, Freedman SB, Morris RG: A learning deficit related to age and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 2000;408:975-979.
- 137 Ashe KH: Learning and memory in transgenic mice modeling Alzheimer's disease. *Learn Mem* 2001;8:301-308.
- 138 Savonenko A, Xu GM, Melnikova T, Morton JL, Gonzales V, Wong MP, Price DL, Tang F, Markowska AL, Borchelt DR: Episodic-like memory deficits in the APPsw/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease: relationships to beta-amyloid deposition and neurotransmitter abnormalities. *Neurobiol Dis* 2005;18:602-617.
- 139 Aggleton JP, Pearce JM: Neural systems underlying episodic memory: insights from animal research. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001;356:1467-1482.
- 140 Hernandez D, Sugaya K, Qu T, McGowan E, Duff K, McKinney M: Survival and plasticity of basal forebrain cholinergic systems in mice transgenic for presenilin-1 and amyloid precursor protein mutant genes. *Neuroreport* 2001;12:1377-1384.
- 141 Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P, Wright K, Saad I, Mueller R, Morgan D, Sanders S, Zehr C, O'Campo K, Hardy J, Prada CM, Eckman C, Younkin S, Hsiao K, Duff K: Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med* 1998;4:97-100.
- 142 Bronfman FC, Moechars D, Van Leuven F: Acetylcholinesterase-positive fiber deafferentation and cell shrinkage in the septohippocampal pathway of aged amyloid precursor protein London mutant transgenic mice. *Neurobiol Dis* 2000;7:152-168.
- 143 Dodart JC, Mathis C, Bales KR, Paul SM, Ungerer A: Early regional cerebral glucose hypometabolism in transgenic mice overexpressing the V717F beta-amyloid precursor protein. *Neurosci Lett* 1999;277:49-52.
- 144 Descarries L, Aznavour N, Hamel E: The acetylcholine innervation of cerebral cortex: new data on its normal development and its fate in the hAPP(SW,IND) mouse model of Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2005;112:149-162.
- 145 Sarter M, Bruno JP, Givens B: Attentional functions of cortical cholinergic inputs: what does it mean for learning and memory? *Neurobiol Learn Mem* 2003;80:245-256.
- 146 Wenk GL: The nucleus basalis magnocellularis cholinergic system: one hundred years of progress. *Neurobiol Learn Memory* 1997;67:85-95.
- 147 Lehmann O, Grottick AJ, Cassel JC, Higgins GA: A double dissociation between serial reaction time and radial maze performance in rats subjected to 192 IgG-saporin lesions of the nucleus basalis and/or the septal region. *Eur J Neurosci* 2003;18:651-666.
- 148 Steffenach HA, Witter M, Moser MB, Moser EI: Spatial memory in the rat requires the dorsolateral band of the entorhinal cortex. *Neuron* 2005;45:301-313.
- 149 Aggleton J: Identifying cortical inputs to the rat hippocampus that subserve allocentric spatial processes: a simple problem with a complex answer. *Hippocampus* 2000;10:466-474.
- 150 Tiraboschi P, Hansen LA, Alford M, Sabagh MN, Schoos B, Masliah E, Thal LJ, Corey-Bloom J: Cholinergic dysfunction in diseases with Lewy bodies. *Neurology* 2000;54:407-411.
- 151 Traissard N, Herbeaux K, Cosquer B, Jeltsch H, Ferry B, Galani R, Pernon A, Majchrzak M, Cassel JC: Combined damage to entorhinal cortex and cholinergic basal forebrain neurons, two early neurodegenerative features accompanying Alzheimer's disease: effects on locomotor activity and memory functions in rats. *Neuropsychopharmacology* 2007;32:851-871.
- 152 Baxter MG: Effects of selective immunotoxic lesions on learning and memory. *Meth Mol Biol* 2001;166:249-265.
- 153 Wrenn CC, Wiley RG: The behavioral functions of the cholinergic basal forebrain: lessons from 192 igg-saporin. *Int J Dev Neurosci* 1998;16:595-602.
- 154 Buckner RL, Snyder AZ, Shannon BJ, LaRossa G, Sachs R, Fotenos AF, Sheline YI, Klunk WE, Mathis CA, Morris JC, Mintun MA: Molecular, structural, and functional characterization of Alzheimer's disease: evidence for a relationship between default activity, amyloid, and memory. *J Neurosci* 2005;25:7709-7717.
- 155 Celone KA, Calhoun VD, Dickerson BC, Atri A, Chua EF, Miller SL, DePeau K, Rentz DM, Selkoe DJ, Blacker D, Albert MS, Sperling RA: Alterations in memory networks in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: an independent component analysis. *J Neurosci* 2006;26:10222-10231.
- 156 Thal JJ, Mandel RJ, Terry RD, Buzsaki, Gage FH: Nucleus basalis lesions fail to induce senile plaques in the rat. *Exp Neurol* 1990;108:88-90.

- 157 Ramirez MJ, Heslop KE, Francis PT, Rattray M: Expression of amyloid precursor protein, tau and presenilin RNAs in rat hippocampus following deafferentation lesions. *Brain Res* 2001;907:222–232.
- 158 Beach TG, Potter PE, Kuo YM, Emmerling MR, Durham RA, Webster SD, Walker DG, Sue LI, Scott S, Layne KJ, Roher AE: Cholinergic deafferentation of the rabbit cortex: a new animal model of Abeta deposition. *Neurosci Lett* 2000;283:9–12.
- 159 Folkesson R, Malkiewicz K, Kloskowska E, Nilsson T, Popova E, Bogdanovic N, Ganten U, Ganten D, Bader M, Winblad B, Benedikz E: A transgenic rat expressing human APP with the Swedish Alzheimer's disease mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;358:777–782.
- 160 Cho YH, Jaffard R: Spatial location learning in mice with ibotenate lesions of entorhinal cortex or subiculum. *Neurobiol Learn Mem* 1995;64:285–290.
- 161 Berger-Sweeney J, Stearns NA, Murg SL, Floerke-Nashner LR, Lappi DA, Baxter MG: Selective immunolesions of cholinergic neurons in mice: effects on neuroanatomy, neurochemistry, and behavior. *J Neurosci* 2001;21:8164–8173.
- 162 Moreau PH, Cosquer B, Jeltsch H, Cassel JC, Mathis C: Neuroanatomical and behavioral effects of a novel version of the cholinergic immunotoxin mu p75-saporin in mice. *Hippocampus*, in press.
- 163 Heneka MT, Ramanathan M, Jacobs AH, Dumitrescu-Ozimek L, Bilkei-Gorzo A, Debeir T, Sastre M, Galldiks N, Zimmer A, Hoehn M, Heiss WD, Klockgether T, Staufenbiel M: Locus ceruleus degeneration promotes Alzheimer pathogenesis in amyloid precursor protein 23 transgenic mice. *J Neurosci* 2006;26:1343–1354.
- 164 Chauhan NB: Cholinergic immunolesioning produced tangle-like inclusions in TgCRND8 Brain. *Abstr Soc Neurosci* 2006; 271.8/KK9.

Résumé

La maladie d'Alzheimer (MA) est une affection neurodégénérative caractérisée par une altération progressive des fonctions cognitives dont l'évolution mène irrémédiablement à un état de démence. La forme sporadique de la MA représente 90 % des cas de MA dont le principal facteur de risque est la présence de l'allèle $\epsilon 4$ codant pour la protéine ApoE4. Les déficits cognitifs, comme la désorientation spatiale, ont été mis en relation avec une atrophie précoce du cortex entorhinal (CE). Par ailleurs, des études cliniques et histopathologiques montrent un rôle des neurones cholinergiques de la base du cerveau antérieur (NCB) dans l'évolution des troubles cognitifs de la MA. Traissard et collaborateurs (2007) ont démontré que des lésions conjointes du CE et des NCB chez le Rat, mais pas chaque lésion séparément, induisent des déficits de mémoire spatiale dont la sévérité et la nature rappellent ceux observés à un stade avancé de la maladie.

Mon travail s'est ainsi focalisé sur la lésion de l'une, l'autre ou les deux structures clés observées dans la MA chez des souris mâles jeunes non-transgéniques C57BL/6J et chez des souris femelles âgées double transgéniques hAPP/hApoE, ainsi que sur l'évaluation de leurs déficits cognitifs et non cognitifs.

Les résultats obtenus montrent que la lésion combinée du CE et des NCB perturbe massivement les performances de mémoire spatiale dans des tâches de navigation chez les souris C57BL/6J, alors que chaque lésion seule n'induit que des déficits modérés. Par ailleurs, la lésion des NCB uniquement suffit pour induire des déficits importants de reconnaissance d'objet chez ces souris. L'effet délétère marqué de la lésion combinée du CE et des NCB sur la mémoire spatiale est retrouvé chez les souris hAPP/hApoE3. Alors que la lésion des NCB suffit à provoquer une perturbation massive des performances d'apprentissage et de mémoire spatiale chez les souris hAPP/hApoE4. D'une façon générale, les résultats de cette dernière étude suggèrent que la présence d'ApoE4 augmente la sensibilité des souris aux atteintes du cerveau et affecte les phénomènes de plasticité cérébrale et de compensation suite à ces atteintes. Notre modèle de lésion combinée est un bon outil d'étude des bases neurobiologiques de l'évolution des déficits cognitifs dans la MA.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by a progressive alteration of cognitive functions which invariably leads to a state of dementia. The sporadic form of AD concerns 90% of the patients and its major risk factor is the $\epsilon 4$ allele coding for the protein ApoE4. Cognitive deficits, such as spatial disorientation, have been related to the early atrophy of the entorhinal cortex (EC). Other clinical and histological studies show the role of the basal forebrain cholinergic neurones (BFCNs) in the evolution of cognitive disorders in AD. Traissard and collaborators (2007) showed that the combined lesion of the EC and the BFCNs, but not each lesion separately, induces spatial memory deficits which resembles those observed at an advanced stage of the disease according to their nature and severity.

My work focused on damaging one or both of these two structures playing a key role in AD in young C57BL/6J non transgenic males and old double transgenic hAPP/hApoE females and evaluates their cognitive and non cognitive deficits.

The results show that the combined EC and BFCN lesion affect dramatically spatial memory performances in navigation tasks in C57BL/6J mice, whereas each lesion alone induces only moderate deficits. In addition, the BFCN lesion alone is sufficient to induce massive deficits of object recognition in mice. The profound deleterious effect of the combined lesion of the EC and the BFCN is reproduced in the hAPP/hApoE3 mice. However, the BFCN alone is sufficient to induce the massive deficits in spatial learning and memory performances in hAPP/hApoE4 mice. More generally, the results of this last study suggest that the presence of ApoE4 increases the sensitivity of the mice to brain damages and affects cerebral plasticity and compensation phenomena following these damages. Our model of combined lesion appears as an interesting tool to study the neurobiological basis of cognitive deficit evolution in AD.