

UNIVERSITE DE STRASBOURG

THESE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Strasbourg
Spécialité Neurosciences

Présentée Par

Nour YASSINE

**Lésions sélectives de deux populations de neurones affectées dans
la maladie d'Alzheimer: impact sur les performances cognitives et
l'histopathologie des souris tg2576**

Soutenue publiquement le 15 novembre 2011

Membres du jury

Pr. Rémi GERVAIS

Pr. Catherine STRAZIELLE

Dr. Daniel BERACOCHEA

Dr. Abdel-Mouctalib OUAGAZZAL

Pr. Jean-Christophe CASSEL

Dr. Chantal MATHIS

Président du jury

Rapporteur externe

Rapporteur externe

Examineur interne

Co-directeur de thèse

Co-directrice de thèse

Merci...

Bien plus que le point final du manuscrit scientifique, cet exercice de page de remerciements constitue, en effet, l'opportunité de m'accorder une réflexion sur une période de trois ans de ma vie, très importante, très riche en émotion et en évènements.

Mes premiers remerciements vont tout naturellement au docteur Chantal Mathis, ma directrice de thèse, qui a su me laisser la liberté nécessaire à l'accomplissement de mes travaux, tout en gardant un œil critique et avisé. Je la remercie également pour sa gentillesse, pour tous les moments où elle a su m'écouter, me réconforter et me conseiller, à toutes ces aides morales qu'elle a pu m'accorder, à tous ces moments humains qui m'ont aidé, aussi bien dans le travail que dans la vie.

Je remercie du fond du cœur la personne sans laquelle la réalisation de ce travail aurait été impossible, le professeur Jean-Christophe Cassel, mon co-directeur de thèse. Je le remercie d'avoir accepté de m'encadrer bien qu'ayant déjà plein de choses sur les épaules. Il a toujours montré de l'intérêt pour mes travaux et répondu quotidiennement à mes sollicitations. Après avoir fait une thèse avec vous, j'ai acquis une grande autonomie qui me permet d'affronter l'avenir sans aucune crainte.

Je remercie le doyen Christian Kelche, directeur du laboratoire d'imagerie et de neurosciences cognitives, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je suis très reconnaissant au Professeur Catherine Strazielle, au Professeur Rémi Gervais, au Docteur Daniel Beracochea et au Docteur Abdel-Moultalib Ouagazzal, de m'avoir fait l'honneur d'être le jury de cette thèse, j'éprouve un profond respect pour votre travail et votre parcours. Je vous remercie de m'avoir donné la chance d'être interrogé par vous.

Un très grand merci à nos collaborateurs A. Marti et C. Dorner-Ciossek (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co, Allemagne) qui nous ont apporté de nombreux conseils scientifiques et techniques et surtout, toutes les cohortes de souris tg2576 qui m'ont permis de réaliser ce travail.

Un grand merci à Brigitte Cosquer, Karine Geiger et Anaïs Gillet pour toute leur aide technique. Merci pour tout.

Je remercie aussi ceux qui ont contribué à ma formation pour m'avoir fait part de leur expérience et de leurs critiques constructives : les docteurs Nathalie Niederhoffer, Anne Pereira de Vasconcelos et Sarah Schimchowitsch.

Je tiens également à remercier le docteur Anne Laure Boutillier et Romain Neidl, pour m'avoir aidé à mettre au point le génotypage rd.

Merci à tous les membres du laboratoire, Monique, Alexandra, Pierre-Henri, Jean-Baptiste, Jean-Bastien, Christophe, Romain, Hayat, Sarah P, Rodrigue, Mohamed, Marc-Antoine, Catherine, Olivier, Daniel, George, Philippe, Bernadette, Joëlle, Lucas, Christine, Hélène, Patrick, Elise, Christophe, Sami et Elodie ; pour leur bonne humeur, leur gentillesse et leur sympathie.

Merci pour tous mes chers compatriotes de Strasbourg, grâce à vous, le Liban me paraissait plus proche et l'éloignement moins dur.

Merci à mes parents, merci pour votre amour et votre présence toujours à mes côtés, merci d'avoir toujours cru en moi et en mes choix. Merci de m'avoir encouragé sans cesse, de m'avoir appris à me battre et à réussir, merci d'avoir toujours eu confiance en moi.

Merci à mon frère Adel, à ma sœur Sarah et à mon grand amour Mira, pour votre amour sans réserve et votre soutien sans pareil.

Sommaire

INTRODUCTION

1. La maladie d'Alzheimer	1
1.1. Introduction à la maladie, rappel historique	1
1.2. Prévalence, incidence et charge financière	2
1.3. Les troubles neuropsychologiques	3
1.3.a. Les troubles de la mémoire.....	4
1.3.b. Les troubles du comportement	6
1.3.c. Les troubles des fonctions instrumentales	7
1.4. Les formes de MA	8
1.5. Les causes de la MA	9
1.5.a. Le gène de l'APP	9
1.5.b. Les gènes des présénilines	9
1.5.c. Le gène de l'apolipoprotéine E.....	9
1.6. Les lésions neuropathologiques de la MA	10
1.6.a. Les dépôts amyloïdes	10
1.6.a.i. Biochimie de dépôts amyloïdes	12
1.6.b. La dégénérescence neurofibrillaire	12
1.6.c. La protéine APP : rôle, métabolisme et dérivées	14
1.6.c.i. La voie non amyloïdogène.....	15
1.6.c.ii La voie amyloïdogène	17
1.6.c.ii.1. L'activité β -sécrétase	18
1.6.c.ii.2. L'activité γ -sécrétase	19
1.6.d. La théorie de la cascade amyloïde	19
1.7. Le peptide A β : Monomères, oligomères et plaques, fonctions et neurotoxicité	21
2. La neuroanatomie de la MA	22
2.1. L'anatomie de la formation hippocampique	23

2.1.a. L'hippocampe.....	23
2.1.b Le cortex entorhinal.....	25
2.1.c. Les connexions intrinsèques à la formation hippocampique : le circuit trisynaptique	27
2.1.d Les connexions extrinsèques à la formation hippocampique	29
2.1.e La formation hippocampique et la MA	30
2.2. Les systèmes cholinergiques centraux.....	31
2.2.a L'acétylcholine, biosynthèse et dégradation	31
2.2.b. Les voies cholinergiques centrales.....	33
2.2.c Le système cholinergique septo-hippocampique	35
2.2.d. Le système cholinergique et la maladie d'Alzheimer	37
3. Les modèles animaux de la MA	39
4. Hypotheses et objectifs de la thèse.....	43

Matériels et Méthodes

1. Sujets d'expériences.....	46
2. Interventions chirurgicales	47
2.1. Anesthésie et préparation	47
2.2. Lésion du CE	47
2.3. Lésion des NCB.....	49
3. Test comportementaux	50
3.1. Test d'activité locomotrice.....	50
3.1.a Dispositif.....	50
3.1.b. Protocole.....	51
3.2. Test de reconnaissance spatiale et de reconnaissance d'objet.....	52
3.2.a. Dispositif.....	52
3.2.b. Protocole.....	53
3.3. Test de la piscine de Morris	54
3.3.a. Dispositif.....	54
3.3.b. Protocoles	56
3.4. Labyrinthe de Barnes	58

3.4.a Dispositif.....	59
3.4.b. Protocole de mémoire de référence.....	59
3.5. Test du labyrinthe en Y	61
3.6. Test de discrimination olfactive	63
3.7 Test de l'évitement passif	64
4. Histologie	65
4.1. Euthanasie et préparation des tissus.....	65
4.2. Coloration au violet de crésyl	66
4.3. Enzymohistochimie de l'AChE.....	67
4.4. Marquage immunohistochimique : anti-ChAT et anti-A β (BAM-10)	67
4.4.a Comptage des neurones dans le SM et le NBM.....	68
4.4.b. Comptage des dépôts amyloïdes (diffus)	68
4.6. Coloration à la thioflavine S	69
4.6.a. Comptage des plaques séniles	69
5. Géotypage de la mutation <i>rd</i>.....	70
5.1. Principe de la PCR	70
5.2. Protocole	70
6. Analyses statistiques	71

Contribution expérimentale: chapitre 1

1. Introduction	72
2. Résultats	76
1. Actographie.....	76
2. Tests d'exploration d'objets.....	78
2.1. Reconnaissance spatiale.....	78
2.2 Reconnaissance d'objet.....	79
3. Tâche de mémoire spatiale dans le labyrinthe de Barnes	80
3.1. Erreurs de mémoire de référence	80
3.2. Latence d'entrée dans le trou cible	82
3.3. Tests de rétention	84
4. Test de la piscine de Morris	86

4.1. Distance parcourue.....	86
4.2. Latence d'accès à la plate-forme.....	88
4.3. Test de rétention (probe).....	89
4.4 Test de plate-forme visible.....	90
5. Test d'alternance dans le labyrinthe en Y.....	91
3. Discussion du chapitre.....	92

Contribution expérimentale: chapitre 2

1. Introduction	98
2. Résultats.....	101
1. Actographie.....	101
2. Test de labyrinthe en Y.....	104
3. Tests d'exploration d'objets.....	105
3.1. Reconnaissance spatiale	105
3.2 Reconnaissance d'objet	106
4. Tâche de mémoire spatiale dans le labyrinthe de Barnes.....	107
4.1. Erreurs de mémoire de référence.....	107
4.2. Latence d'entrée dans le trou-cible	109
4.3. Test de rétention.....	111
4.4. Analyse des stratégies.....	113
5. Tâche de discrimination olfactive	117
6. Tâche d'évitement passif	118
3. Discussion du chapitre.....	119

Contribution expérimentale: chapitre 3

1. Introduction.....	127
2. Analyse comportementale	132
1. Test de labyrinthe de Barnes (1).....	132
1.1. Erreurs de mémoires de référence.....	132
1.2. Latence d'entrée dans le trou-cible	133

1.3. Test de rétention.....	135
1.4. Analyse des stratégies.....	136
2. Test de labyrinthe de Barnes (2).....	140
2.1. Erreurs de mémoires de référence.....	141
2.2. Latence d'entrée dans le trou-cible.....	142
2.3. Test de rétention.....	143
2.4. Analyse des stratégies.....	144
3. Analyse histologique.....	147
1. Lésion du cortex entorhinal.....	147
2. Lésions des NCB.....	150
3. Mesure de l'activité de l'AChE par la mesure de la densité optique.....	152
4. Comptage des dépôts amyloïdes.....	153
4.1. Comptage des dépôts diffus.....	153
4.2. Comptage des plaques amyloïdes.....	155
5. Génotypage de la mutation <i>rd</i>	157
4. Discussion du Chapitre.....	159
Conclusions et perspectives.....	170
Bibliographie.....	174

1. La maladie d'Alzheimer

1.1. Introduction à la maladie, rappel historique

Au début du XXe siècle, l'état de démence du sujet âgé était considéré par la plupart des psychiatres comme habituel et lié à un vieillissement normal. Les travaux de l'école de Munich, dans l'équipe d'E. Kraepelin, un psychiatre allemand qui croyait à l'intérêt de l'étude histologique du cerveau dans les maladies mentales, ont conduit à mieux comprendre ces maladies. Plusieurs médecins rejoignent alors ce groupe de recherche, dont Aloïs Alzheimer, qui s'était initié à l'étude microscopique du cerveau.

C'est en 1906, lors de la 37e réunion des psychiatres allemands à Tübingen, qu'Aloïs Alzheimer décrit une femme de 51 ans (Auguste D.) souffrant d'une perte progressive de ses capacités de compréhension et de mémoire, d'une désorientation et d'hallucinations (Alzheimer et coll., 1907; Maurer et coll., 1997). Grâce à l'autopsie et à des techniques de coloration avec l'aniline et l'imprégnation argentique, l'examen au microscope du cerveau de la patiente a révélé dans le cortex cérébral, des lésions jusque-là inconnues et caractérisées par des amas anormaux de fibrilles dans les neurones: les dégénérescences neurofibrillaires (DNF). En 1910, l'appellation « maladie d'Alzheimer» (MA) est employée pour la première fois pour caractériser cette démence neurodégénérative du sujet âgé. Plus tard, en 1927, Divry démontre que le rouge Congo peut colorer les plaques cérébrales de la MA comme d'autres substances amyloïdes. Il leur donne alors le nom de plaques amyloïdes (Divry, 1927).

Les connaissances sur cette maladie ont continué à évoluer vers la fin du XXe siècle avec la caractérisation du peptide amyloïde (A β), principal constituant des plaques amyloïdes, et de la protéine tau, principal constituant des DNF. La MA est considérée comme une affection dégénérative du cerveau par opposition aux autres causes de démences (vasculaire, toxique

ou carentielle). Cette démence, dont l'étiologie n'est pas encore bien connue, est associée à deux types de lésions histologiques caractéristiques dont la présence est indispensable au diagnostic *post-mortem*: les plaques amyloïdes (pathologie A β) et les DNF (pathologie tau). Si ces lésions peuvent se développer assez tôt dans la vie, la maladie ne s'exprime habituellement que tardivement. Sur le plan clinique, elle associe des troubles prédominants de la mémoire, ainsi que d'autres troubles cognitifs et comportementaux ayant un retentissement sur la vie quotidienne des patients.

1.2. Prévalence, incidence et charge financière

Parmi toutes les maladies neurodégénératives, la MA est la démence sénile la plus répandue dans le monde. La deuxième étiologie est la démence vasculaire et les autres causes moins fréquentes sont la démence fronto-temporale et la démence à corps de Lewy.

D'après l'association France Alzheimer, la MA affecterait plus de 25 millions de personnes dans le monde, dont la moitié dans les pays occidentaux à cause du vieillissement de la population. En France, il a été estimé que le nombre de patients atteints de la MA ou de maladies apparentées est de 860 000 personnes. Selon l'étude PAQUID (Personnes Agées Quid), les femmes sont plus touchées que les hommes puisque, au delà de 75 ans, les proportions sont de 13,2 % pour les hommes et de 20,5 % pour les femmes. Au-delà de 85 ans, le pourcentage des personnes atteintes de la MA s'accroît de manière exponentielle dans une proportion de 25 %.

Sur le plan économique, d'après "The Global Economic Impact of Dementia" publié le 21 septembre 2010 par l'association "Alzheimer's Disease International - ADI", les coûts mondiaux annuels de la démence sont estimés à 604 milliards de dollars (464 milliards d'euros), ce qui équivaut à 1 % du produit intérieur brut mondial, ou à la richesse de la dix-huitième économie du monde. Les pays développés représentent 70 % de ces coûts. Les coûts

médicaux directs représentent 16 % des coûts totaux, les coûts non médicaux directs (professionnels du secteur social et hébergement) 42 % des coûts totaux, et les coûts de l'aide informelle (aide non rémunérée apportée par les familles et leur entourage) également 42 %. Les coûts sociétaux de la démence varient, selon les systèmes de protection sociale, de 868 \$ (661 €) par personne et par an dans les pays pauvres à 32 865 \$ (25 017 €) par personne et par an dans les pays riches (données recueillies sur le site de l'Association France Alzheimer : www.francealzheimer.org, sur le site de la fondation Médéric Alzheimer : www.fondation-mederic-alzheimer.org et sur le site de l'association "Alzheimer's Disease International" www.alz.co.uk).

Cela fait 100 ans que la MA a été décrite, et malgré un siècle d'investigation et de recherche intense dans divers domaines, les questions cruciales sur sa cause restent sans réponse et il n'y a pas de traitement curatif. L'ensemble des chiffres rapportés ci-dessus permettent donc de comprendre les efforts nationaux et internationaux mis en œuvre ces dernières années pour favoriser la recherche sur la MA.

1.3. Les troubles neuropsychologiques

Les troubles cognitifs liés à la MA s'aggravent au cours du temps jusqu'à ce que le patient sombre dans un état de démence profonde. Progressivement, le patient sera totalement incapable de pratiquer des tâches quotidiennes (s'habiller, se laver...) en raison de la perte de ses fonctions cognitives. Même si la MA est avant tout une maladie de la mémoire, elle est également associée à des troubles du comportement qui sont souvent mis au second plan.

1.3.a. Les troubles de la mémoire

Les troubles cognitifs des patients se développent de façon hétérogène, ce qui les rend difficiles à identifier. Les résultats d'études, réalisés dans le but de rechercher des « marqueurs cognitifs » précoces de la maladie, indiquent de manière convergente que certaines fonctions sont atteintes avant les autres, en particulier les fonctions mnésiques.

Au stade débutant de l'affection, on observe des troubles de la mémoire épisodique, puis une désorientation spatio-temporelle marquée (Backman et coll., 2004 ; Sarazin et Dubois, 2005).

La mémoire épisodique est un système de mémoire qui permet d'enregistrer et conserver des informations événementielles dans leur contexte temporel et spatial (Tulving, 1995).

L'atteinte de ce système de mémoire rend compte des difficultés des patients à former de nouveaux souvenirs.

Les patients atteints de la MA présentent des déficiences de performance qui reflètent des troubles spécifiques à une ou plusieurs étapes des processus mnésiques, à savoir l'encodage, le stockage ou le rappel des informations. Selon certains auteurs, il semblerait que le déficit de la mémoire épisodique provienne plus d'une atteinte des capacités d'acquisition que de celles de stockage de l'information (Laurent et coll., 1998). En revanche, l'incapacité des patients à rappeler les mêmes items au cours d'essais successifs incite d'autres auteurs à suggérer que le déficit des patients ne se situe pas uniquement au niveau de l'acquisition, mais aussi au niveau du rappel (Tounsi et coll., 1999).

La mémoire de travail semble être légèrement déficitaire en début de la MA. C'est une mémoire à court terme qui permet de retenir une information utile pendant une courte durée afin de permettre son traitement et l'élaboration de nouvelles actions. Les patients éprouvent des difficultés dans de multiples situations de la vie quotidienne ou lors de tests impliquant la réalisation simultanée de plusieurs tâches, par exemple, se rappeler d'un numéro de téléphone et le composer, parler et marcher (Camicioli et coll., 1997). Selon Baddeley (2000), les

déficits de la mémoire de travail sont dus à une atteinte de l'administrateur central, un élément fonctionnel de cette mémoire qui est nécessaire pour le traitement de nouvelles informations.

La mémoire spatiale est également touchée en phase précoce de la MA et chez des patients MCI (patients qui présentent des déficits dans les formes de mémoire les plus touchées au début de la MA et qui ont un grand risque d'*évoluer vers* une MA). Ces patients rencontrent beaucoup de difficultés dans les activités qui nécessitent l'orientation spatiale (Hort et coll., 2006). Ce type de mémoire est subdivisé en deux systèmes de navigation dans l'espace :

- un système de cartes qui codent les emplacements de l'environnement (*local system*), c'est la « carte cognitive » de Tolman. Cette carte fait référence à une représentation de l'espace extra-personnel (espace allocentrique) en faisant appel aux caractéristiques spatiales reliant des repères.
- Un système de routes (*taxon system*) qui code les réponses motrices en termes d'orientation dans l'espace et qui fait référence à un point de vue de l'espace environnant à partir du corps de l'observateur (espace égocentrique) comme repère.

L'hippocampe est la structure principalement impliquée dans le système de cartes. Il offre une grande flexibilité comportementale et participe spécifiquement aux processus de consolidation de l'information, c'est-à-dire l'ensemble des processus neurobiologiques qui conduisent à une conservation durable de l'information. Le système de routes implique d'autres structures, notamment le striatum et montre peu de flexibilité (O'Keefe et Nadel, 1978).

Différents tests ont été utilisés pour mettre en évidence un déficit de la mémoire spatiale chez l'Homme. Par exemple la simulation de la navigation spatiale virtuelle sur ordinateur, qui est un analogue de la tâche de piscine de Morris utilisée chez les rongeurs, permet d'étudier les stratégies de navigation spatiale chez les patients Alzheimer (Sahakian et coll., 1988 ; Astur

et coll., 1998). Ces études ont montré que les patients MCI présentent déjà un déficit de mémoire spatiale, notamment au niveau de la navigation allocentrique, tandis que les patients Alzheimer montrent un déficit à tous niveaux dans la mémoire spatiale (égocentrique et allocentrique ; Hort et coll., 2007).

Les atteintes d'autres types de mémoire, telles que la mémoire sémantique (évaluée par le biais d'épreuves de dénomination d'objets ou d'images, de fluidité verbale, mémoires des mots, des idées) et la mémoire procédurale (acquisition implicite et expression d'habilités), sont généralement plus tardives que les troubles de mémoire épisodique et spatiale. L'ensemble de ces troubles de la mémoire se développe d'une manière progressive en fonction de l'âge, fait partie des plaintes de l'entourage, perturbe très tôt la vie quotidienne des patients et conduit à une démence profonde au stade avancé de la MA.

1.3.b. Les troubles du comportement

Ils peuvent apparaître dès les premiers stades de la MA et sont variables selon le patient et son environnement. Ils se manifestent par des troubles affectifs, émotionnels, psychotiques et comportementaux (agitation, agressivité, stéréotypies). Des troubles des fonctions instinctuelles (sommeil, appétit, sexualité) et des troubles du sommeil peuvent également se manifester. Le patient peut devenir anxieux et la conscience de ces troubles l'entraîne généralement vers une dépression. Selon l'Inventaire Neuropsychiatrique (NPI), les troubles du comportement sont classés en 10 catégories : idées délirantes, hallucinations, agitation/agressivité, dépression/dysphorie, anxiété, exaltation de l'humeur/euphorie, apathie/indifférence, désinhibition, irritabilité/instabilité de l'humeur, comportement moteur aberrant. A travers cette liste, on comprend que ces troubles s'ajoutant aux troubles de la mémoire, aggravent sérieusement l'état des malades qui en sont atteints.

1.3.c. Les troubles des fonctions instrumentales

Le syndrome aphaso-apraxo-agnosique est souvent considéré comme une caractéristique de la MA. L'aphasie comprend tous les troubles du langage, à la fois les capacités de compréhension et de production. Au cours de la MA, ces troubles sont les plus fréquents après les troubles mnésiques.

Dans un premier temps, le langage devient imprécis. La production orale est spontanée, mais le patient manque de mots. Avec le temps, les fonctions de compréhension orale, de lecture et d'écriture se dégradent également. La personne n'arrive plus à suivre des conversations et la compréhension d'ordres simples en est même affectée. Finalement, le patient va perdre complètement la capacité de parler et de comprendre le langage verbal, pour s'enfermer dans un mutisme complet (Lücker et coll., 2003).

L'apraxie se traduit par une difficulté à effectuer des gestes concrets (comme la manipulation d'objets). Elle est due à une lésion du système nerveux consécutive à une atteinte des lobes pariétaux. Les patients souffrant d'apraxie ne présentent pas d'atteinte des fonctions motrices, ni des fonctions sensitives. Les gestes acquis vont être peu à peu oubliés. La personne est d'abord moins habile, puis ne parvient plus à exécuter des gestes élaborés, comme l'écriture, ou des tâches ménagères, puis, à un stade avancé, elle ne peut plus produire les gestes les plus simples, comme, par exemple, mâcher des aliments (Fourchey, 2008).

L'agnosie se manifeste en général par un trouble de la reconnaissance. Chez les sujets sains, le cerveau reçoit des informations sur un objet par exemple, et doit être capable de l'identifier : ce qu'il est et à quoi il sert. Par contre, un sujet atteint de la MA, est incapable de faire le lien avec ce qu'est cet objet.

1.4. Les formes de MA

La forme sporadique : il s'agit de la forme la plus courante de la maladie. Cette forme est plutôt tardive (au-delà de 65 ans). Elle représente entre 90 et 95 % des cas de la MA. Les personnes qui en sont atteintes peuvent avoir ou non une histoire familiale de cette maladie. L'âge est le principal facteur de risque avec une incidence qui double par tranche d'âge de 5 ans au-delà de 65 ans. L'allèle $\epsilon 4$ de l'apolipoprotéine E (apoE), surreprésenté chez les sujets malades, est un facteur génétique de susceptibilité majeur. Il existe d'autres facteurs qui semblent jouer un rôle dans l'apparition de la maladie. Les facteurs vasculaires comme l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie, les accidents vasculaires cérébraux et le diabète sont tous associés à un risque accru de démence. Le sexe constitue également un facteur de risque puisque les femmes sont plus souvent touchées que les hommes. Cette sensibilité a été attribuée à la diminution de l'œstrogène après la ménopause. Cependant, il existe aussi une autre hypothèse : cette augmentation de prévalence liée au sexe pourrait tout simplement provenir de l'âge, puisque les femmes ont une espérance de vie plus longue que les hommes. Il semble aussi que les facteurs nutritionnels jouent un rôle dans la MA, comme les carences nutritionnelles en vitamines C et D, et en Oméga 3.

La forme familiale : c'est la forme héréditaire de la maladie. Cette forme est plutôt précoce (<60 ans), voire très précoce (<40 ans). Elle représente entre 5 et 10 % des cas de la MA. Dans certaine famille, la maladie est transmise par le biais d'une mutation autosomique dominante. Les gènes mutés connus pour cette forme de la MA sont le gène du précurseur du peptide amyloïde (APP pour *amyloid precursor protein*) et les gènes des présénilines 1 et 2 (PS1 et PS2).

1.5. Les causes de la MA

1.5.a. Le gène de l'APP

L'APP est une glycoprotéine ubiquitaire codée par un gène situé sur le bras long du chromosome 21 chez l'Homme. La mutation de ce gène au niveau de la région A β est parfois responsable d'une forme autosomique dominante de la MA. Les sujets porteurs de cette mutation développeront inexorablement la maladie. Son évolution sera relativement classique pour la plupart des mutations.

1.5.b. Les gènes des présénilines

Les gènes des présénilines 1 et 2 (PS1 et PS2) se trouvent sur les chromosomes 14 et 1, respectivement. Les mutations intervenant sur le gène de la préséniline 1 (PS1) sont les plus fréquentes (près d'un tiers des formes familiales) et aboutissent généralement à un début précoce de la maladie (il a été rapporté des cas débutant à l'âge 30 ans). L'évolution est rapide et peut comporter des myoclonies et des crises d'épilepsie. Les mutations du gène de la préséniline 2 (PS2) sont plus rares.

1.5.c. Le gène de l'apolipoprotéine E

Le gène de l'Apo E est situé sur le chromosome 19 et peut exister sous 3 formes principales d'allèles : ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4. Ces trois gènes codent pour les 3 isoformes de l'ApoE : apoE2, apoE3 et apoE4. L'Apo E est une glycoprotéine de 34,2 kDa et est principalement produite par le foie. Plusieurs études ont montré que l'Apo E4 est un des principaux facteurs de risque favorisant l'apparition de la forme sporadique de la maladie en favorisant les dépôts amyloïdes

(Hannequin et coll., 1998). En revanche, l'Apo E2 semble avoir un effet protecteur contre la MA.

1.6. Les lésions neuropathologiques de la MA

Comme décrit auparavant, on observe dans la MA plusieurs types de lésions: dont les plus connues sont les **plaques séniles ou amyloïdes (figure 1)** extracellulaires et les **dégénérescences neurofibrillaires (DNF ; figure 2)** intra-neurales. Ces deux lésions interviennent dans le développement de la MA et provoqueraient la dégénérescence des cellules nerveuses. La **perte neuronale** se déroule en phase très précoce de la MA. Au cours de l'évolution de la MA, celle-ci touche de plus en plus de structures du cerveau. Le cortex entorhinal et l'hippocampe sont parmi les premières structures touchées. La cause de la perte neuronale reste controversée. Des auteurs ont émis l'hypothèse qu'elle est liée aux DNF, mais d'autres auteurs considèrent que la perte neuronale pourrait être induite par la neurotoxicité de l'A β via un processus apoptotique (Cras et coll., 1995 ; Lassmann et coll., 1995 ; Duyckaerts et coll., 2009). Il existe également deux autres types de lésion caractéristique : **une inflammation et une plasticité synaptique anormale**. L'inflammation associée aux dépôts amyloïdes est caractérisée par l'activation de cellules microgliales, d'astrocytes, de certains composants de la cascade du complément ainsi que de cytokines pro-inflammatoires. La plasticité anormale est due au processus régénératif qui se met en place après la perte neuronale et qui est caractérisée par ce que l'on appelle le phénomène de bourgeonnement (sprouting) neuronal (Teter et Ashford., 2002).

Seules les plaques amyloïdes et les DNF seront détaillées dans les deux paragraphes suivants.

1.6.a. Les dépôts amyloïdes

Les dépôts amyloïdes sont des formations sphériques extracellulaires de 10 à 200 μ m de diamètre. Ils ont été identifiés pour la première fois par la méthode de révélation à l'argent de

Bielschowsky (Castellani et coll., 2008). Plusieurs types de dépôts amyloïdes ont été décrits : les dépôts diffus, les dépôts plus denses ou dépôts primitifs (focaux), les plaques matures ou séniles et les plaques neuritiques.

Les dépôts diffus ont un aspect chevelu, volumineux et sont morphologiquement mal délimités. Ce type de dépôt est très peu congophile.

Les dépôts primitifs présentent un centre amorphe irrégulier arrondi et légèrement congophile. Une zone peu colorable l'entoure. L'ensemble est bordé par quelques cellules microgliales et des astrocytes. Les dépôts diffus et les dépôts primitifs sont identifiés dans les tissus cérébraux par des anticorps anti-A β à l'aide de la technique d'immunohistochimie (IHC) (Duyckaerts et coll., 2009).

Les plaques séniles présentent un cœur dense, constitué par une agrégation d'A β avec une conformation en feuillets β particulièrement insolubles. Ces lésions sont entourées de prolongements neuronaux en dégénérescence ainsi que de cellules microgliales et de macrophages activés, caractéristiques d'une inflammation. Ce type de dépôt est révélé par le rouge congo ou la thioflavine-S.

Les plaques neuritiques sont formées d'un dépôt central de peptide A β sous forme fibrillaire ou agrégée, entouré d'une couronne de neurites dystrophiques chargés en protéine tau. Ces plaques neuritiques sont révélées par des anticorps anti-tau à l'aide de la technique d'IHC.

Chez de nombreux patients atteints de la MA, un autre type de dépôt amyloïde a été identifié : l'amyloïdose vasculaire. Celle-ci atteint les artères corticales de petit calibre, c'est-à-dire dont le diamètre ne dépasse pas 50 à 150 μm (Castellani et coll., 2004).

1.6.a.i. Biochimie de dépôts amyloïdes

Le constituant principal des dépôts est l'A β (4kDa), un peptide de 38 à 42 acides aminés. Il existe donc plusieurs A β qui se distinguent par leur extrémité carboxyterminale (A β 1-39, A β 1-40, A β 1-42 et A β 1-43). Les peptides les plus représentés sont l'A β 1-40 et l'A β 1-42 (Glenner et Wong, 1984).

Le cœur amyloïde des dépôts est constitué principalement d'A β 1-42, c'est le fragment d'A β qui est le moins soluble et qui s'agrège le plus facilement (Jarrett et coll., 1993). Outre ce peptide, les plaques séniles contiennent également des ions métalliques comme le zinc et le cuivre (Dong et coll., 2003). Plusieurs protéines de la matrice extracellulaire ont aussi été identifiées comme le thrombospondine, des protéoglycannes (Buée et coll., 1992 ; Snow et coll., 1989), des composants du complément, des composants de la lame basale, de la lactoferrine, de l'ApoE ou encore de l' α 1-antichymotrypsine qui semble jouer un rôle dans l'hyperphosphorylation de protéine tau (Abraham et coll., 1988).

1.6.b. La dégénérescence neurofibrillaire

La DNF désigne l'accumulation intracellulaire anormale d'un matériel fibrillaire principalement constitué de protéine tau. Le cytoplasme neuronal contient 3 types de neurofibrilles : les microtubules, constitués de tubuline, les neurofilaments et les microfilaments. Des études avec des anticorps anti-tau ont démontré que la cause de la DNF est une hyper-phosphorylation anormale de la protéine tau. C'est une protéine qui appartient à la famille des *MAP* (microtubule-associated *protein*), dont le rôle principal est de stabiliser les microtubules et de maintenir le transport axonal indispensable à la vie du neurone (Grundke-Iqbal et coll., 1986 ; Braak et coll., 1994). Tau est une protéine comprenant entre

352 et 441 acides aminés (de masse 55 à 62 kDa). Elle existe sous six isoformes produites à partir d'un gène unique situé sur le chromosome 17. Ces protéines comportent des régions répétitives du côté C-terminal qui permettent la liaison aux microtubules. En effet, le rôle des protéines tau est de réguler l'assemblage des sous-unités de tubuline en microtubules. En conditions pathologiques, l'hyper-phosphorylation de la protéine tau induit son détachement des microtubules et favorise son accumulation sous forme de paires des filaments en hélice (PHF, pour *paired helical filament*). De plus, la protéine hyper-phosphorylée libérée montre une solubilité nettement plus faible. Elle est aussi plus sensible aux modifications chimiques induites par le stress oxydant et subit des changements conformationnels suite à ces oxydations.

La DNF n'est pas spécifique à la MA, elle a été identifiée dans les démences fronto-temporales et dans la maladie de Parkinson (Poorkaj et coll., 1998 ; Spillantini et coll., 1998).

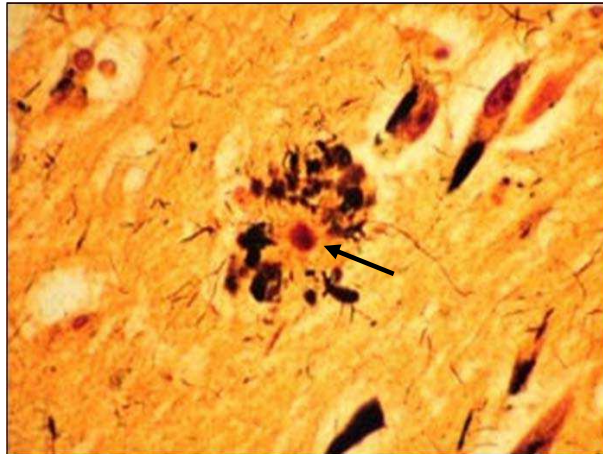


Figure 1. Une photographie d'une plaque sénile révélée par un anticorps dirigé contre l'Aβ. La flèche indique le cœur amyloïde de la plaque sénile.



Figure 2. Une photographie de la dégénérescence neurofibrillaire révélée par un anticorps dirigé contre la protéine tau montrant la lésion intracellulaire constituée par l'appariement en hélices de filaments protéiques.

1.6.c. La protéine APP : rôle, métabolisme et dérivées

L'APP est une protéine exprimée de façon ubiquitaire. Un épissage alternatif du gène de l'APP produit plusieurs isoformes de l'APP dont les principales sont les APP695, APP751 et APP770, qui contiennent respectivement 695, 751 et 770 acides aminés (Zhang et coll., 2011). Les APP751 et APP770 sont présents dans tous les tissus et sont caractérisés par la présence d'une séquence de 56 acides aminés appelée domaine KPI (Kunitz-like protease inhibitor) dans la région extracellulaire. Il semble que le domaine KPI joue un rôle dans la régulation du clivage de la forme sécrétée de l'APP (APPs ; Caswell et coll., 1999).

L'APP695 ne contient pas de domaine KPI et son expression est essentiellement neuronale (Rohan da Silva, 1997 ; Kang et Muller-Hill, 1990). L'APP est une protéine qui appartient à une famille contenant les protéines APLP1 et APLP2 (APP like protein 1 et 2) chez les mammifères (Coulson et coll., 2000). Toute cette famille de protéine regroupe des protéines transmembranaires de type I. Le rôle exact de l'APP n'est pas encore déterminé. Cette protéine semble être impliquée dans de nombreux processus cellulaires, dont le transport axonal, la synaptogenèse, la transduction du signal, le métabolisme du calcium et l'adhésion cellulaire (Zheng et Koo, 2006).

Le métabolisme de l'APP est déterminant dans l'étiologie de la MA. En effet, cette protéine transmembranaire de type I peut subir plusieurs clivages par trois enzymes protéolytiques différentes ; α -sécrétase, β -sécrétase et γ -sécrétase. Le métabolisme de cette protéine transmembranaire fait intervenir deux voies principales : une voie majoritaire considérée comme bénéfique car elle ne produit pas d'A β , et une voie minoritaire, amyloïdogène. Cette dernière, bien qu'elle conduise à la production d'A β , est une voie de maturation physiologique. Le clivage excessif et anormal de l'APP pourrait être dû soit à une mutation du gène codant, soit à la présence d'un inhibiteur de protéase KPI qui pourrait empêcher l'action de l' α -sécrétase (protéase assurant le clivage non pathologique de l'APP) laissant ainsi le champ libre aux activités β -sécrétase et γ -sécrétase produisant le fragment A β (Delacourte, 2000).

1.6.c.i. La voie non amyloïdogène

Comme évoqué ci-dessus, le clivage de l'APP par une activité α -sécrétase (figure 3) au milieu de la séquence de l'A β , en position 16 (Lys 16-Leu17), prévient la formation de l'A β (Haass et coll., 1995). D'une manière générale, la voie de clivage non amyloïdogène de l'APP est prédominante dans de nombreux types cellulaires. L'activité α -sécrétase a été attribuée à une famille de métalloprotéase de la famille des désintégrines, ADAM 9, 10, 17, et 19

(Fahrenholz et coll., 2000 ; Tanabe et coll., 2006). Cette voie de maturation intervient soit au niveau de la membrane plasmique (De Strooper et Annaert 2000), soit au niveau de l'appareil de Golgi (Lammich et coll., 1999). Le clivage au niveau du site α de l'APP est notamment régulé par la protéine kinase C (Skovronsky et coll., 2000) et des agonistes muscariniques (Alfa-Cissé et coll., 2007; Caccamo et coll., 2006).

Sous l'effet de ce clivage, un large domaine extracellulaire soluble est libéré : l' α -APPs aux propriétés neurotrophiques, neuroprotectrices et promnésiantes (Mattson et coll., 1997, Bour et coll., 2004). C'est la raison pour laquelle la voie non amyloïdogène est considérée comme plutôt bénéfique. Il résulte également de cette coupure l'apparition d'un fragment carboxyterminal transmembranaire appelé C83, qui pourra ensuite être le substrat de l'activité γ -sécrétase et qui contient 83 acides aminés. Ce second clivage engendre un petit peptide, nommé P3 qui n'a pas de rôle biologique déterminé.

L' α -APPs est produit au niveau de la membrane plasmique et pendant le trafic intracellulaire de l'APP. En effet, les activités α -sécrétase sont localisées précisément à la face trans de l'appareil de Golgi et dans le feuillet externe de la membrane plasmique (Kuentzel et coll., 1993).

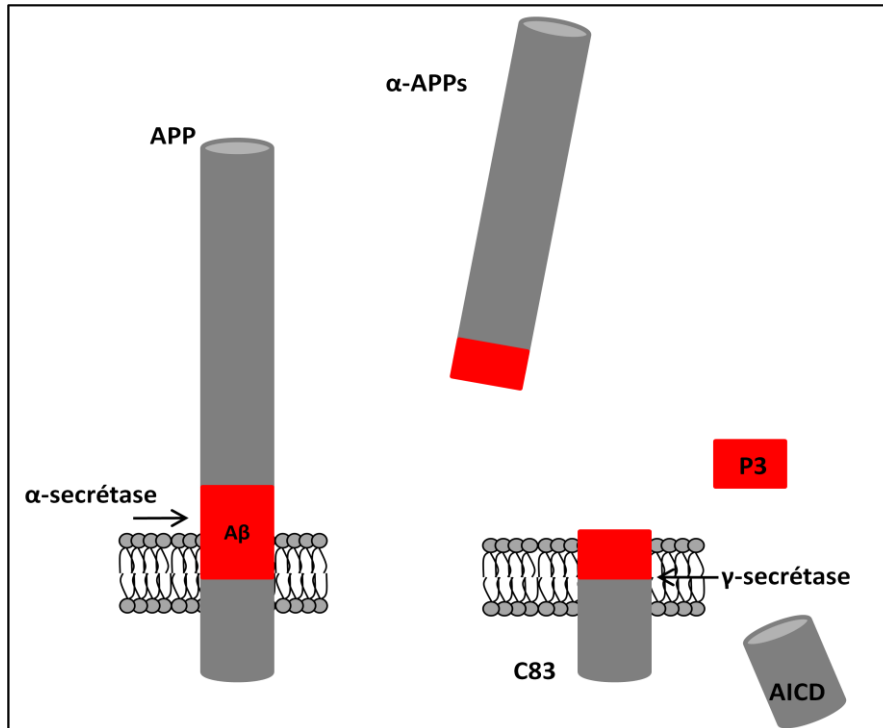


Figure 3. Représentation schématique de la voie de clivage non amyloïdogène de l'APP par l'activité α -sécrétase libérant le fragment soluble α -APPs et le fragment transmembranaire C83. Ce dernier est ensuite clivé par l'activité γ -sécrétase produisant le fragment P3 et le fragment cytosolique AICD. Les flèches indiquent les sites de clivage des enzymes impliquées dans la voie non-amyloïdogène.

1.6.c.ii La voie amyloïdogène

Parallèlement à la voie non-amyloïdogène, l'APP peut subir une voie de maturation qui peut devenir physiopathologique : la voie amyloïdogène (Figure 4). Il s'agit d'un clivage alternatif de l'APP par les activités β - et γ -sécrétase. Cette voie engendre l'A β sous sa forme à 40 acides aminés (A β -40). Mais 5 à 15% de la quantité totale de peptide amyloïde produit l'est sous la forme d'un peptide contenant deux acides aminés supplémentaires (A β 42). Les peptides A β 40 et A β 42 ne se différencient que par deux acides aminés qui ont pourtant la capacité de favoriser les capacités d'agrégation et de neurotoxicité de ce peptide.

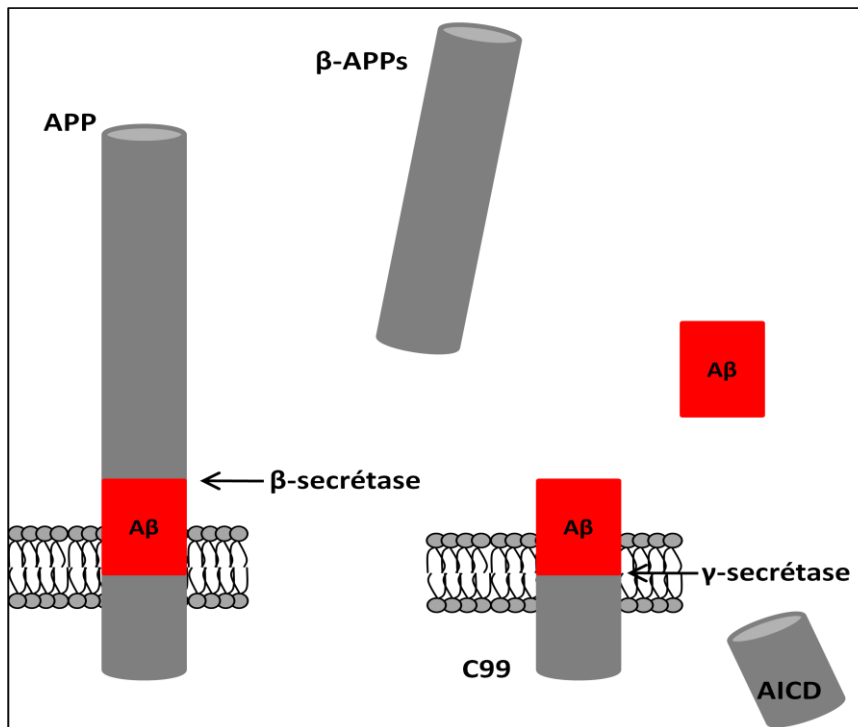


Figure 4. Représentation schématique de la voie amyloïdogène de l'APP. L'activité β -sécrétase libère le fragment soluble β -APPs et le fragment transmembranaire C99. Ensuite, l'activité γ -sécrétase va cliver ce dernier et produire ainsi le peptide amyloïde A β ainsi le peptide intracellulaire AICD. Les flèches indiquent les sites de clivage des enzymes impliquées dans la voie amyloïdogène.

1.6.c.ii.1. L'activité β -sécrétase

La première étape de génération de l'A β est le clivage de l'APP par la β -sécrétase. L'enzyme responsable de ce clivage est une aspartyl-protéase ancrée à la membrane, nommée BACE1 (pour β -site APP cleaving enzyme), ou encore Asp2, Memapsine2 (Sinha et coll., 1999 ; Vassar et coll., 1999). Cette activité protéolytique génère un domaine extracellulaire soluble plus petit que l' α -APPs, le β -APPs, qui possède des effets physiologiques similaires à ceux de l' α -APPs (Furukawa et coll., 1996) et un fragment de 99 acides aminés (C99 ou CTF99) qui reste intégré dans la bicouche lipidique où il subira un clivage intramembranaire par l'activité

γ -sécrétase ce qui libère l'A β . BACE1 peut aussi cliver à une position plus proche de l'extrémité C-terminal ce qui libère C89 (ou A β 11-40 après l'action de la γ -sécrétase).

1.6.c.ii.2. L'activité γ -sécrétase

L'activité γ -sécrétase se situe dans le domaine transmembranaire de l'APP. Si elle agit après l' α -sécrétase, elle libère le fragment non amyloïdogénique P3 par coupure du fragment C83. Si son substrat est le fragment C99, elle clive la partie carboxyterminale de l'A β et produit l'A β 1-40 ou l'A β 1-42. Dans les deux cas le clivage de l'APP engendre le peptide AICD (*APP Intracellular Domain*) qui peut subir un deuxième clivage au site "ε" de l'APP ce qui libère l'AICD50 (Chow et coll., 2010). L'activité γ -sécrétase est portée par un complexe protéique composé d'au moins quatre protéines: PS1 et 2 (les présénilines), Nct (la nicastrine), Aph-1 (anterior pharynx-defective 1) et Pen (*presenilin enhancer protein* ; Wolfe, 2008).

Il semble que le rôle des présénilines PS1 et 2 est majeur dans le phénomène de régulation de l'activité du complexe γ -sécrétase, puisque près de 80 mutations différentes de la PS1 sont responsables de la majorité des formes familiales de la MA et que toutes ou presque, ont pour effet d'augmenter la sécrétion de la forme la plus pathogène du peptide, l'A β 1-42 (Murayama et coll., 1999).

1.6.d. La théorie de la cascade amyloïde

La théorie de la cascade amyloïde, développée au départ par Hardy et Higgins (1992), décrit une cascade d'événements qui débutent avec une dérégulation de la production de l'A β , suivie de son agrégation, laquelle conduirait à la pathologie (Figure 5). Selon cette hypothèse, l'A β s'accumule dans la région extracellulaire en formant les plaques amyloïdes et serait responsable de la modification de la concentration de calcium intracellulaire entraînant la

mort cellulaire ainsi que de l'hyper-phosphorylation de tau et, par voie de conséquence, de la formation des dégénérescences neurofibrillaires. Depuis le clonage des gènes de PS1 et PS2, et la découverte de leur action sur la production d'A β , cette hypothèse a évolué et un nombre croissant d'éléments implique le fait que les mutations des gènes de l'APP et de PS1-2 sont responsables de la production de l'A β 1-42 qui déclenche la cascade (Hardy et Selkoe, 2002). On s'accorde généralement sur le fait que le peptide A β sous forme d'oligomère ou sous forme insoluble est le facteur étiologique central de la MA.

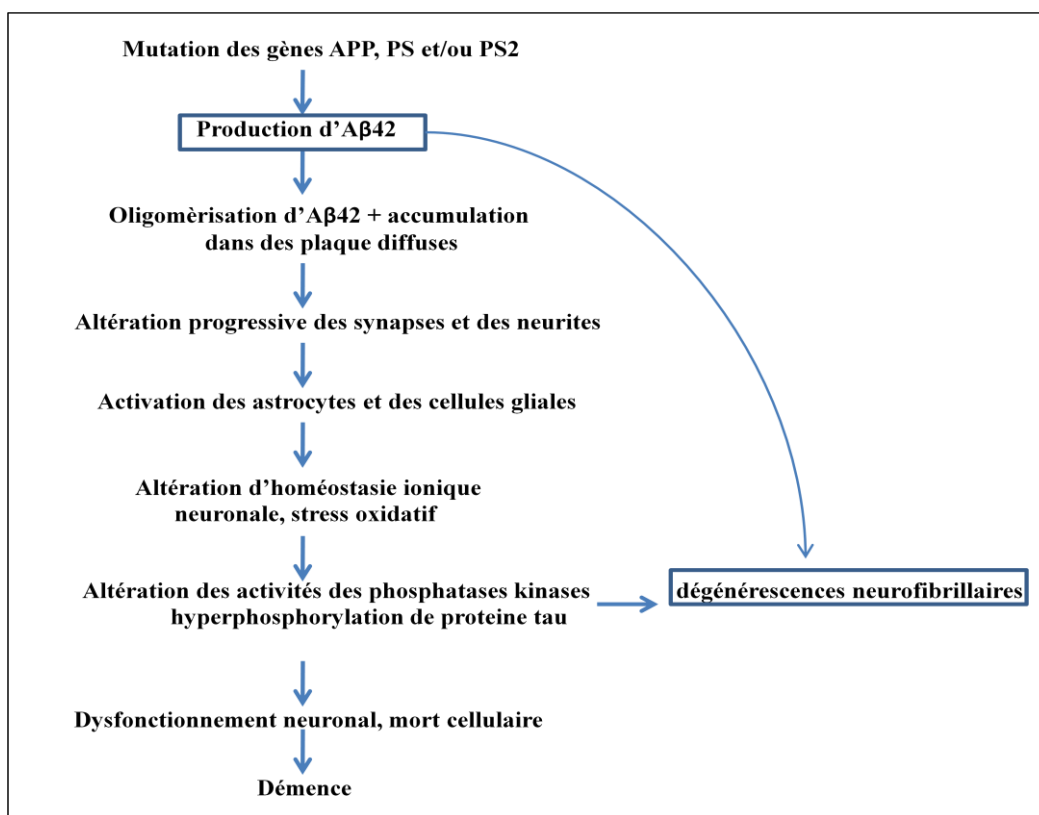


Figure 5. Hypothèse de la cascade amyloïde d'Hardy et Higgins. La surproduction de l'A β conduit, d'une part, à une accumulation extracellulaire suivie d'agrégation et de formation des plaques séniles, et d'autre part, à une modification de la concentration de calcium intracellulaire entraînant la mort cellulaire ainsi que l'hyper-phosphorylation de Tau et par voie de conséquence, la formation des dégénérescences neurofibrillaires.

1.7. Le peptide A β : Monomères, oligomères et plaques, fonctions et neurotoxicité

La présence de l'A β dans le sang et le liquide céphalorachidien de sujets sains, ainsi que dans le milieu de culture de cellules cérébrales humaines, semble être physiologique (Simons et coll., 1996). Dans la MA, la formation des plaques séniles est progressive. Les A β monomériques vont d'abord s'assembler en oligomères, puis ceux-ci vont s'associer en protofibrilles, qui, devenues fibrilles, formeront les plaques. Les dépôts diffus ont été identifiés chez des sujets sains, ce qui peut indiquer qu'ils ne sont pas forcément toxiques (Delaère et coll., 1990 ; Dickson et coll., 1992). Cependant, on trouve dans les régions cérébrales des patients atteints de MA des plaques diffuses et des plaques séniles. Les formes monomériques de l'A β exercent deux effets différents sur les neurones de l'hippocampe en culture : à forte concentration, l'A β est neurotoxique, alors qu'à de faibles concentrations le peptide possède des propriétés neurotrophiques (Yankner et coll., 1990).

L'hypothèse actuellement dominante est que la forme oligomérique soluble altère la transmission synaptique et induit une mort neuronale en déclenchant un stress oxydatif et la formation de radicaux libres (Selkoe, 2000 ; Harris et coll., 1995; Chow et coll., 2010). L'incubation d'un extrait d'A β du cortex cérébral de patient Alzheimer avec une culture cellulaire hippocampique inhibe la transmission synaptique des neurones glutamatergiques: cet effet est dû à l'A β sous forme de dimère (Shankar et coll., 2008). Par ailleurs, des études récentes montrent que le déficit mnésique chez les souris transgéniques pour des gènes mutés humains de l'APP est corrélé avec les concentrations cérébrales d'A β sous forme dodécamérique (56 KDA), et que son introduction dans le cerveau d'un rat jeune induit un déficit de mémoire (Lesné et coll., 2006 ; Barghorn et coll., 2005).

Il est intéressant de noter que des études ont récemment postulé le fait que les plaques séniles pourraient jouer un rôle de mécanisme de « détoxification », en séquestrant les formes les plus dangereuses que sont les oligomères et les protofibrilles (Minniti et coll., 2009)

2. La neuroanatomie de la MA

Pendant plusieurs dizaines d'années, l'altération du système cholinergique était considérée comme le premier signe de la MA. Bartus était le premier à proposer l'hypothèse cholinergique pour expliquer le dysfonctionnement cognitif lié à l'âge. Il basait cette proposition sur la corrélation entre la dégénérescence des neurones cholinergiques de la base du cerveau antérieur (NCB) et les déficits de mémoire observés dans la MA (Bartus et coll., 1982 ; Bartus 2000). Cette hypothèse a été soutenue par de nombreuses études expérimentales sur des animaux âgés (Fischer et coll., 1989). En revanche, d'autres auteurs ont émis l'hypothèse que l'atteinte précoce du cortex entorhinal (CE) est le premier signe dans la MA. Puis, les marqueurs neuropathologiques de la maladie vont se propager vers l'hippocampe via le CE, et, en phase avancée de la maladie, des changements anatomiques touchent quasiment toutes les structures du cerveau (Braak et Braak, 1991 ; Van Hoesen et coll., 1990). Le fait que les patients MCI ne présentent pas de diminution des marqueurs cholinergiques dans le cortex rend cette dernière hypothèse la plus proche de la réalité (Davis et coll., 1999 ; Dekosky et coll., 2002).

Dans les paragraphes suivants, je fais une description anatomique des deux principales structures touchées dans la MA : la formation hippocampique et les systèmes cholinergiques centraux.

2.1. L'anatomie de la formation hippocampique

La formation hippocampique est un amas de structures laminées chez les vertébrés et fait partie du système limbique. Elle joue un rôle crucial dans la mémoire épisodique et la mémoire spatiale. La forme contournée de cette structure rappelle celle d'un hippocampe (cheval de mer), d'où son nom. La formation hippocampique comprend cinq structures : l'hippocampe proprement dit, le subiculum, le présubiculum, le parasubiculum (les trois dernières constituant le complexe subiculaire) et le CE (Amaral et Witter, 1989).

2.1.a. L'hippocampe

L'hippocampe est une structure télencéphalique bilatérale, logée dans chaque hémisphère cérébral sous les portions temporales et postérieures du néocortex (figure 6). Il est constitué de deux parties qui s'interpénètrent comme deux U emboîtés : La corne d'Ammon et le gyrus denté, qui sont des structures allocorticales.

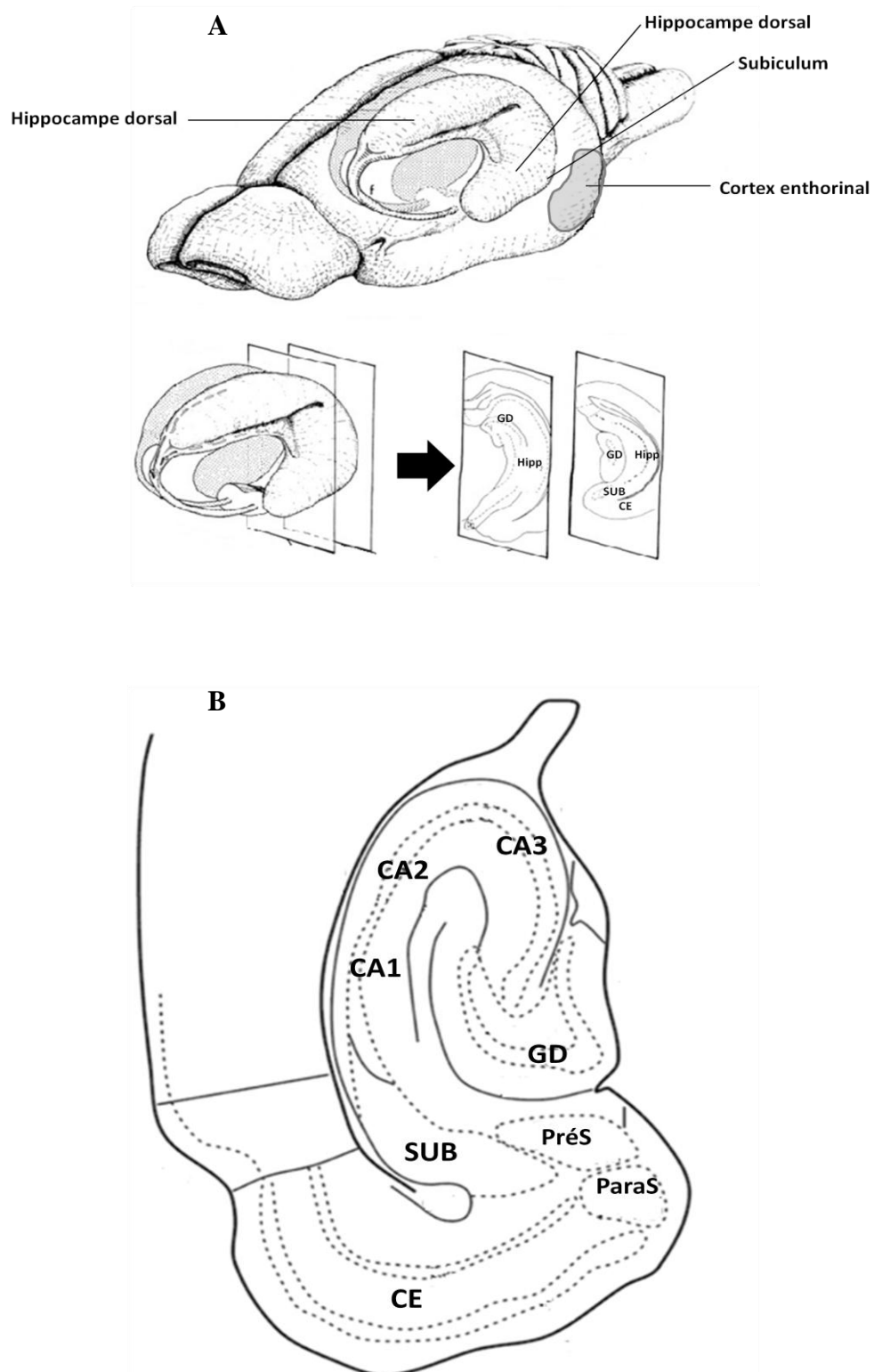


Figure 6. La formation hippocampique. (A) Représentation schématique du positionnement de la formation hippocampique dans le cerveau des rongeurs (en haut). Schémas représentant différents plans de coupe frontaux Hipp (en bas). (B) Représentation schématique d'une coupe horizontale de cerveau indiquant la localisation des structures de la formation hippocampique. CA : champs ammonique ; GD : gyrus denté ; SUB : subiculum ; CE : cortex entorhinal ; Prés : présubiculum, ParaS : parasubiculum. (D'après Amaral et Witter).

La corne d'Ammon (l'hippocampe proprement dit) est constituée d'une épaisse couche de cellules pyramidales glutamatergiques prise en sandwich entre la couche polymorphe plus superficielle et la couche moléculaire plus profonde. La corne d'Ammon a été divisée en trois aires appelées champs ammoniques CA1, CA2 et CA3. Cependant, l'existence d'un champ CA4 reste controversée. Les dendrites basaux sont situés dans une lame appelée *stratum oriens*. Des dendrites apicaux passent d'abord dans une couche superficielle (*stratum radiatum*), puis s'étendent dans une couche plus profonde (*stratum lacunosum moleculare*). Les cellules pyramidales envoient des axones appelés « collatérales de Schaffer » qui se projettent de CA3 vers CA1.

Le gyrus denté se compose de trois couches. La principale couche de cellules est médiane et se compose de cellules granulaires qui séparent une lame interne (polymorphe) d'une lame externe (moléculaire). La couche moléculaire comporte essentiellement les dendrites apicaux des cellules granulaires et leurs afférences. La couche interne, aussi appelée hile, est constituée d'une couche polymorphe et d'une couche infragranulaire. Elle comporte également les segments initiaux des axones des cellules granulaires (fibres moussues) convergeant vers le hile pour se déployer ensuite vers l'aire CA3 de la corne d'Ammon.

Le subiculum est un allocortex composé de trois couches de cellules, d'où émergent les efférents majeurs de la formation hippocampique.

2.1.b Le cortex entorhinal

Le CE est considéré comme l'une des structures les plus importantes dans la formation hippocampique en raison de ses nombreuses connexions avec l'ensemble de la formation hippocampique. De nombreuses études ont détaillé la projection des voies perforantes vers le gyrus denté et l'hippocampe (Van Hoesen et Pandya, 1975 ; Witter et Groenewegen, 1984 ; Witter et coll., 1989). De plus, le CE joue, avec l'hippocampe, un rôle important dans les processus d'apprentissage et de mémoire (Hardman et coll., 1997 ; Pouzet et coll., 1999).

Enfin, l'intérêt pour cette structure s'est aussi accrue en raison de son rôle majeur et précoce dans la MA.

Le CE a été divisé en six couches (Ramon y Cajal, 1911; Van Groen, 2001) : quatre couches cellulaires (les couches II, III, V et VI) et deux couches plexiformes (couches I et IV). La couche I est la couche moléculaire et contient des fibres transversales. La couche II contient des cellules étoilées de taille moyenne ou grande qui tendent à se regrouper en îlots. La couche III contient essentiellement des cellules pyramidales. La couche IV est une région « pauvre » en cellules, appelée *lamina dissecans*. La couche V contient des cellules pyramidales et la couche VI contient une population hétérogène de cellules. Cependant, les parties rostrale et médiane présentent une organisation moins développée que les parties caudale et latérale. Selon le critère cytoarchitectomique de Brodman (1909), le CE est divisé en deux parties : le CE latéral et le CE médian. Le CE latéral est caractérisé par une zone riche en neurones entre les couches II et III, alors que, cette zone n'est pas distinguable dans le CE médian. En plus, les neurones de la couche II du CE médian sont plus grands que les neurones de la couche II du CE latéral.

2.1.b.i La voie entorhino-hippocampique

Le CE assure la majeure partie des projections vers l'hippocampe via la voie perforante. Celle-ci est constituée principalement par des axones de neurones glutamatergiques des couches II et III du CE. De nombreuses études démontrent que les fibres de la voie perforante innervant le gyrus denté sont issues de la couche II du CE chez la Souris (Van Groen et coll., 2003) et chez le Rat (Deller et coll., 1996). Ces faisceaux entrent dans la substance blanche sous-jacente au cortex et traversent la couche de cellules pyramidales du subiculum, puis la fissure hippocampique pour arriver finalement au gyrus denté. Au niveau de ce dernier, les fibres se terminent dans les deux-tiers externes de la couche moléculaire, mais il y a des petites projections qui se terminent en dehors de cette zone, au dessous de la couche

granulaire. En dehors du gyrus denté, la voie perforante innerve également le CA1 et le CA3 : les fibres sont issues de la couche III du CE, et se terminent dans le *stratum-lacunosum-moleculare* (Stanfield et coll., 1979). Contrairement au Rat, la couche II du CE n'innerve pas le CA3 chez la Souris. Des afférences provenant de la couche III du CE innervent également le subiculum (Van Groen et coll., 2003).

2.1.c. Les connexions intrinsèques à la formation hippocampique : le circuit trisynaptique

La connectivité intrinsèque de l'hippocampe (figure 7 ; 8) fut initialement décrite par Ramón Y Cajal en 1911. En plus des projections de la voie perforante décrite ci-dessus, la couche de cellules granulaires du gyrus denté reçoit des afférences intrinsèques des cellules du hile et des cellules de la couche moléculaire. Des cellules granulaires partent les fibres moussues qui se dirigent essentiellement vers le *stratum lucidum* du CA3, pour interagir avec des cellules pyramidales. Le CA3 projette à son tour sur les cellules pyramidales du CA1 via les collatérales de Schaffer. Les axones des cellules pyramidales de CA3 distribuent de nombreuses collatérales sur l'ensemble des champs ammoniques, mais jamais sur le complexe subiculaire ou le CE. Des connexions locales sont régulées par de nombreux interneurons, auxquelles s'ajoutent des connexions CA3-CA3 via des fibres récurrentes. Les projections du champ CA2 sont semblables en de nombreux points aux projections du champ CA3. Le CA1 envoie également des projections vers la couche de cellules pyramidales et peu sur la couche moléculaire du subiculum, qui innerve à son tour le reste du complexe subiculaire.

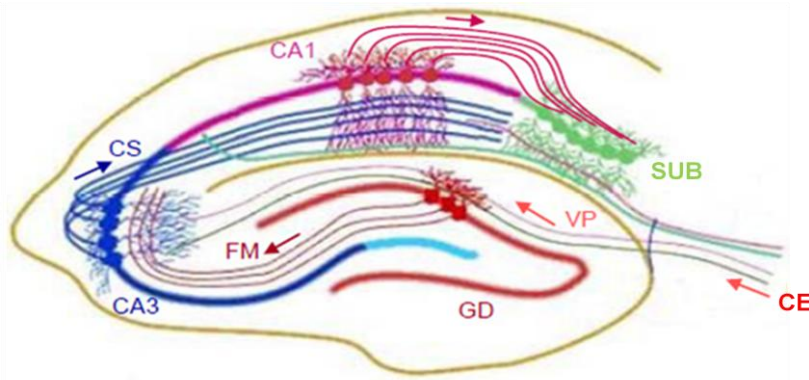


Figure 7. Représentation schématique des connexions intrahippocampiques du circuit trisynaptique : La voie d'entrée principale de la formation hippocampique est le cortex entorhinal (CE) via la voie perforante (VP) qui projette vers les cellules granulaires du gyrus denté (GD), qui à son tour, via les fibres moussues (FM), projette sur la couche pyramidale de CA3. Les neurones pyramidaux du CA3 projettent vers les cellules pyramidales du CA1, via les collatérales de Schaffer (CS). Le CA1 projette à son tour vers le subiculum. (Schéma d'après « medical research council », site web : <http://www.bristol.ac.uk/synaptic/>)

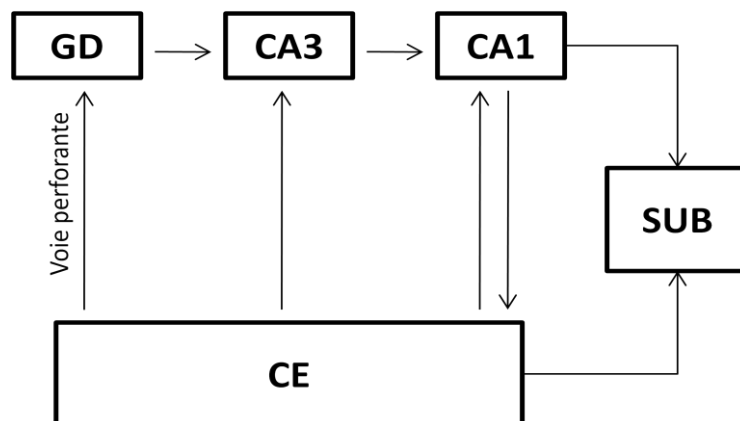


Figure 8. Représentation schématique simplifiée des différentes connexions intrinsèques de la formation hippocampique qui montre le rôle central joué par le CE dans la connectique de la formation hippocampique. GD : gyrus denté ; SUB : subiculum ; CE : cortex entorhinal ; CA1, CA2 et CA3 : champs ammoniques

2.1.d Les connections extrinsèques à la formation hippocampique

La grande majorité des afférences corticales passe par le CE qui reçoit lui-même des projections des cortex périrhinal, piriforme, insulaire, rétrospécial, préfrontal, ainsi que du bulbe olfactif. Les afférences corticales peuvent se diviser en deux groupes. Le premier groupe se termine dans les couches I et II, d'où partent des afférences vers les autres structures de la formation hippocampique. Ce premier groupe d'afférences provient du bulbe olfactif, du cortex piriforme et du cortex périrhinal. Le deuxième groupe d'afférences se termine dans les couches IV et VI, et provient de différentes aires corticales comme le cortex limbique, paralimbique, insulaire et rétrospécial, qui innervent l'ensemble de la formation hippocampique. Le gyrus denté et le CA3 reçoivent des projections issues du septum médian (SM) et de la bande diagonale de Broca qui se terminent dans la couche polymorphe. Cette voie septo-hippocampique est majoritairement cholinergique, mais présente également des projections GABAergiques. Il existe également des projections noradrénergiques provenant du locus coeruleus, sérotoninergiques provenant des noyaux du raphé et dopaminergiques provenant de l'aire tegmentale ventrale qui innervent l'ensemble de la formation hippocampique. Le CA1 reçoit moins d'afférences du septum que le CA3 et le gyrus denté. Cependant, le CA1 est également innervé par des afférences du complexe amygdalien et du thalamus antérieur. Le subiculum est l'une des principales voies de sortie de la formation hippocampique vers les régions corticales et sous-corticales. Les projections corticales se font vers les cortex préfrontal médian, prélimbique et infralimbique, et vers les cortex cingulaire, rétrospécial et périrhinal, Les projections sous-corticales se font vers le SM, les noyaux mammillaires, le noyau accumbens et la partie adjacente du tubercule olfactif ainsi que vers l'amygdale, l'hypothalamus et le thalamus. Le CA1 innerve le SM et la bande diagonale de Broca (BDB), l'amygdale, le noyau accumbens, l'hypothalamus, le bulbe olfactif ainsi que les régions corticales.

2.1.e La formation hippocampique et la MA

Récemment, de nombreuses études ont montré que la dégénérescence du CE et non pas celle des NCB est le premier signe de la MA (Palmer, 2002 ; DeKosky et coll., 2002). Elle est aussi soupçonnée d'être la première cause des troubles de la mémoire épisodique et de la mémoire spatiale chez les patients Alzheimer (Du et coll., 2001 ; 2003 ; Rodrigue et Raz, 2004). Par ailleurs, l'analyse *post-mortem* montre que les patients MCI ont une diminution de 32 % du nombre de neurones global au niveau du CE. Cependant, les couches II et IV sont les plus touchées par la perte de neurones (-60 % et -40 % respectivement par rapport aux témoins). Cette perte devient plus marquée chez les patients Alzheimer. Ils ont une diminution de 90 % des neurones dans la couche II, et de 70 % dans la couche IV (Gomez-Isla et coll., 1996). Suite au développement de la technique d'IRM (imagerie par résonance magnétique), des études ont montré qu'au niveau du CE, en terme de volume, il y a une diminution de 16 % chez les MCI et de 36 à 40 % chez les patients Alzheimer (Pennanen et coll., 2004 ; Juottonen et coll., 1998). L'hippocampe est également touché par la perte neuronale en phase précoce de la maladie : les patients MCI présentent une diminution de 8 % et les patients Alzheimer présentent une diminution de 37 % du volume de l'hippocampe (Laakso et coll., 1995 ; Pennanen et coll., 2004). Le CA1 et le gyrus denté sont les régions les plus touchées par la perte neuronale dans l'hippocampe.

En conclusion, le CE est la première structure touchée dans la MA, ensuite, à une phase plus avancée, la dégénérescence progressive des NCB devient évidente. Cassel et ses collaborateurs (2008) ont posé l'hypothèse d'une synergie délétère de ces deux lésions de la MA. Cette synergie pourrait jouer un rôle important dans le passage d'un stade présymptomatique (atteinte du CE) vers un stade d'amnésie déclarée (atteinte conjointe du CE et NCB).

2.2. Les systèmes cholinergiques centraux

2.2.a L'acétylcholine, biosynthèse et dégradation

Historiquement, l'acétylcholine (ACh) est la première substance dont le rôle de neurotransmetteur ait été démontré. Dès le début du siècle, de nombreuses études rapportent que les esters de la choline ont des effets physiologiques sur certaines préparations animales. Un peu plus tard, ce neurotransmetteur a été découvert par Otto Loewi en 1921, qui a montré que la stimulation du nerf vague induit la libération d'un neurotransmetteur chimique responsable de l'inhibition des battements cardiaques. La substance a été identifiée en 1926. C'était l'ACh. La découverte des récepteurs à l'ACh et des enzymes de synthèse et de dégradation de l'ACh a permis de localiser la distribution, ainsi que de définir le rôle de ce transmetteur. L'ACh est impliquée à différents niveaux du système nerveux périphérique, en particulier à la jonction neuromusculaire, au niveau du muscle lisse, au niveau du myocarde ainsi que des synapses ganglionnaires du système nerveux autonome.

Alors que la découverte de l'ACh est relativement ancienne, la cartographie précise des systèmes cholinergiques centraux est plus récente. Une première cartographie a pu être établie à partir de la détection cytochimique de l'acétylcholinestérase (AChE, une enzyme de dégradation de l'ACh) avec la publication de la méthode Koelle-Friedenwald en 1949 permettant la visualisation de cette enzyme. Cependant, l'apparition des premiers anticorps monoclonaux dirigés contre l'enzyme de synthèse de l'ACh (la choline acétyltransférase : ChAT) permet le marquage spécifique des neurones cholinergiques au début des années 1980. Enfin plus récemment, la détection immunohistochimique du transporteur vésiculaire de l'ACh a été développée (*VACHT* ; Arvidsson et coll., 1997). Ces différentes techniques ont permis d'établir une cartographie de la localisation des neurones cholinergiques cérébraux.

La biosynthèse de l'ACh a lieu dans le cytoplasme de l'élément présynaptique à partir de deux précurseurs, l'acétyl-Coenzyme A, issu du cycle de Krebs, de la dégradation du glucose en pyruvate et de la choline ou de la lécithine provenant de l'alimentation, et de l'hydrolyse de certains phospholipides membranaires, grâce à l'action de la ChAT (figure 9). La choline est captée par les terminaisons axoniques cholinergiques par un mécanisme de transport actif à haute affinité (*HACU-high affinity choline uptake*). Celui-ci est saturable, dépend du sodium, peut être bloqué de manière spécifique par l'hémicholinium et est localisé spécifiquement sur les terminaisons cholinergiques.

La réaction de synthèse de l'ACh est catalysée par la choline acétyltransférase (ChAT) qui est synthétisée dans le corps cellulaire des neurones cholinergiques et transportée jusqu'aux terminaisons axonales par le transport antérograde. La synthèse de l'ACh est contrôlée par la disponibilité des substrats : la choline et l'acétylCoA. Ainsi, la recapture de la choline est une étape clef dans la synthèse de l'acétylcholine, qui est synthétisée et transportée activement dans les vésicules synaptiques où elle est stockée.

Une fois libérée dans la fente synaptique, l'ACh se lie à un récepteur membranaire, puis est hydrolysée par l'AChE en choline et acide acétique. Environ 50 % de la choline ainsi libérée est ensuite recaptée par la terminaison présynaptique ou sera réutilisée pour la synthèse d'ACh.

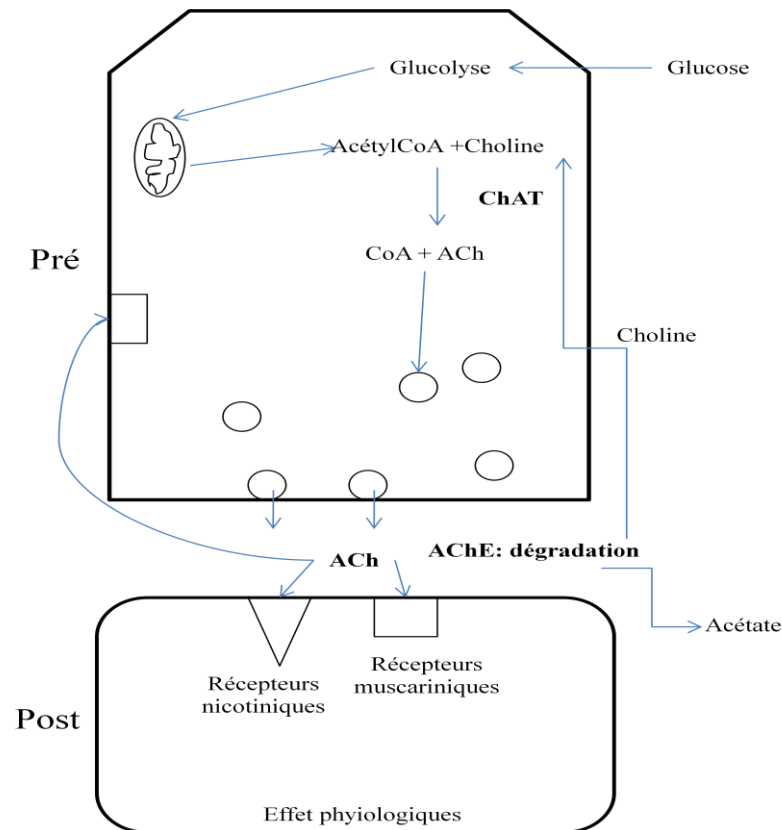


Figure 9. Représentation schématique d'une synapse cholinergique. L'acétylcholine (ACh) est synthétisée dans l'élément présynaptique (pré) grâce à l'action de la choline acétyltransférase (ChAT). Ensuite, l'ACh agit sur les récepteurs pré- ou postsynaptique puis est hydrolysée par l'acétylcholinestérase (AChE) en acide acétique et choline.

2.2.b. Les voies cholinergiques centrales

La topographie des systèmes cholinergiques centraux présente de nombreuses analogies entre les rongeurs et l'Homme (Mesulam et coll., 1983; Nagai et coll., 1983), c'est pourquoi je ne ferai aucune distinction inter-espèce dans la partie suivante.

Classiquement, les systèmes cholinergiques centraux se répartissent en trois catégories :

- **Les motoneurones cholinergiques de la moelle**, avec leur collatérale bien identifiée vers l'interneurone dit de Renshaw.
- **Les interneurones**, dont les projections sont locales, par exemple : dans le striatum, le cortex, et certaines régions de l'hippocampe.
- **Les neurones à projections diffuses :**

Selon la classification de Mesulam et ses collaborateurs (1983), on distingue six groupes cholinergiques (Ch1 à Ch6). Les groupements Ch1, Ch2, Ch3, Ch4, qui constituent ce qu'on appelle les noyaux cholinergiques de la base du cerveau antérieur (NCB). Les neurones du SM (Ch1) et du bras vertical de la BDB (vBDB ; Ch2) innervent l'hippocampe en empruntant la voie septo-hippocampique. Ces neurones cholinergiques projettent vers les neurones pyramidaux des différents champs ammoniques, ainsi que vers les cellules granulaires du gyrus denté et certains neurones GABAergiques hippocampiques (Frotscher, 1989; Dougherty et Milner, 1999). Le groupe Ch3, situé au niveau de la composante horizontale de la BDB (hBDB) est la source majeure de l'innervation cholinergique des régions impliquées dans les fonctions olfactives. Le groupe Ch4 comprend le noyau préoptique magnocellulaire, la substance innominée et le noyau basal magnocellulaire (NBM ; ou noyau basal de Meynert chez l'Homme). C'est la principale source d'innervation cholinergique pour l'amygdale et les aires néocorticales. Les groupes Ch5 et Ch6 sont situés dans le tronc cérébral (noyaux pédonculopontique, cunéiforme, parabrachial et tegmento-pontique dorsolatéral) ; ils innervent majoritairement les structures hypothalamiques et thalamiques. Ces dernières reçoivent aussi une innervation en provenance du NBM. Actuellement, on distingue encore un groupe Ch7 (l'habénula médiane) qui se projette sur le noyau interpédonculaire et le groupe Ch8 (noyau parabigémial), qui innerve le colliculus supérieur.

Cependant, il existe aussi des neurones GABAergiques en proportion variable dans ces noyaux cholinergiques (rapport de 1/3 entre neurones GABAergique et cholinergiques dans le SM, vBDB et le NBM), et des neurones glutamatergiques projettent vers l'hippocampe ont été décrits dans le septum du Rat et de la souris (Zaborszky et coll., 1999).

2.2.c Le système cholinergique septo-hippocampique

Le système septo-hippocampique est l'un des systèmes cholinergiques centraux les plus étudiés, à cause de son rôle majeur dans les processus de mémorisation et du fait de son altération dans la MA (Collerton, 1986).

Les structures d'origine de ces voies sont donc le SM et le vBDB (Amaral et kurz, 1985 ; Peterson, 1994, Cassel et coll., 1997). Comme indiqué ci-dessus, les voies septo-hippocampiques ne sont pas constituées uniquement de projections cholinergiques, ces voies comprennent des neurones GABAergiques, issues du SM/vBDB, noradrénergiques du locus coeruleus, sérotoninergiques des noyaux du raphé, et aussi peptidergiques (Gage et coll., 1983 ; Palkovits, 1984).

On différencie généralement les **voies septo-hippocampiques dorsales** des **voies septo-hippocampiques ventrales**.

Dans les voies septo-hippocampiques dorsales, on distingue deux voies différentes, l'une a un cheminement supracalleux, alors que la seconde chemine au-dessous du corps calleux.

La voie supracalleuse chemine surtout horizontalement et dans un sens rostro-caudal. Elle innerve principalement l'hippocampe dorsal et représente environ 50 % de l'innervation sérotoninergique, 45 % de l'innervation noradrénergique et 30 % de l'innervation cholinergique hippocampique (Gage et coll., 1983a, 1983b).

La voie infracalleuse chemine dans le fornix dorsal, la fimbria et les colonnes fornicales selon un axe rostro-caudal. Elle représente 30 % de l'innervation sérotoninergique, 15 % de l'innervation noradrénergique et 55 % de l'innervation cholinergique hippocampique, quel que soit le niveau septo-hippocampique considéré.

La voie septo-hippocampique est constituée d'axones originaires de la BDB. Elle innerve principalement l'hippocampe ventral et représente 20 % de l'innervation sérotoninergique, 40 % de l'innervation noradrénergique et 15 % de l'innervation cholinergique hippocampique.

A son tour, l'hippocampe envoie des projections qui vont se regrouper dans le fornix dorsal et la fimbria pour aboutir dans le septum. Ces fibres sont issues du gyrus denté ainsi que les aires CA1 et CA3. Certaines de ces fibres empruntent alors le fornix pré-commissural et se projettent au niveau des SM et SL (septum latéral), de la BDB et du noyau accumbens. Les autres, après avoir emprunté le fornix post-commissural se projettent soit au niveau du thalamus, soit au niveau des corps mammillaires et du mésencéphale. Le SM et le vBDB reçoivent également des afférences cholinergiques du noyau pédonculopontin dorsolatéral et de la hBDB, de l'habénula médiane, du noyau hypothalamique supramammillaire et de l'amygdale, des afférences dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale, sérotoninergiques des noyaux du raphé médian et dorsal et noradrénergiques du locus coeruleus (Woolf, 1991). La figure 10 résume les principales voies de projections de SM/vBDB et ses efférences.

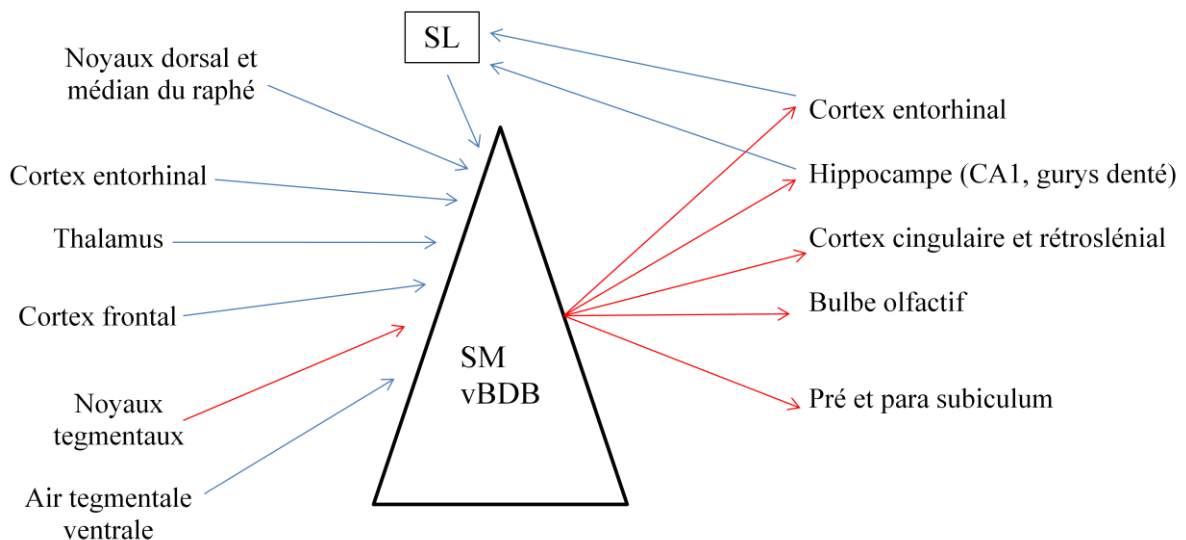


Figure 10. Représentation schématique des principales afférences et efférences du septum (SM) et du bras vertical de la bande diagonale de Broca (vBDB). Les projections cholinergiques sont représentées par les flèches rouges, et les projections non cholinergiques par des flèches bleues. (SL : septum latéral).

2.2.d. Le système cholinergique et la maladie d'Alzheimer

L'altération du système cholinergique central constitue une des principales voies impliquées dans la physiopathologie des troubles cognitifs et non cognitifs de la MA (Bartus et coll., 1982 ; Hardy et coll., 1985). L'hypothèse cholinergique de la MA résulte de l'observation dans le cerveau des sujets âgés et des patients atteints de la MA de l'existence d'une diminution de l'ACh corrélée avec des troubles cognitifs (Francis et coll., 1999). Cependant, l'atteinte du système cholinergique ne semble pas être la première cause de ces troubles puisque des études ont montré qu'au stade précoce, les patients MCI ne présentent qu'une modeste hyperactivité de la ChAT dans l'hippocampe et le cortex frontal (DeKosky et coll., 2002).

Les stades cliniques de la MA, donc plus avancés, sont caractérisés par une diminution de l'activité de la ChAT dans le cerveau des patients, notamment dans l'hippocampe, le cortex et l'amygdale (Perry et coll., 1977 ; White et coll., 1977) . Celle-ci résulte de la dégénérescence des neurones cholinergiques au niveau des NCB dans le NBM-Ch4 (Henke et Lang, 1983 ; Bird et coll., 1983).

Les cibles réceptorielles de l'ACh subissent également des modifications. Les récepteurs muscariniques (M2) sont les plus touchés au niveau cortical et hippocamique, en termes d'expression, alors que d'autres récepteurs (M1 et M3) sont relativement peu touchés. Leur couplage transductionnel est cependant altéré à plusieurs niveaux de la cascade intracellulaire (couplage et fonctionnement des protéines G, activité de la PKC ; Ferrari-DiLeo et Flynn, 1993). L'expression des récepteurs nicotiques est également diminuée dans la MA, en particulier au niveau des isoformes α -4 (Court et coll., 2001 ; Nordberg, 2001) et α -7 (Hernandez et coll., 2010). On note aussi des réductions significatives d'ACh (Richter et coll., 1980, Atack et coll., 1983), de l'HACU (Rylett et coll., 1983) et de la synthèse de l'ACh (Sims et coll., 1980).

De nombreuses études ont démontré qu'il existe une relation entre l'A β et le dysfonctionnement du système cholinergique chez les patients atteints de la MA (Auld et coll., 2002). Il existe également une corrélation négative entre le niveau de la ChAT et le nombre et la densité des plaques amyloïdes, ainsi qu'entre le niveau de la ChAT et la densité des DNF dans certaines régions du cerveau des patients (Wilcock et coll., 1982 ; Mountjoy et coll., 1984 ; Zubenko et coll., 1986).

L'A β régule négativement la synthèse de l'ACh au niveau des cellules hippocampiques *in vitro*, ce qui suggère une relation entre la perturbation du système cholinergique et la charge amyloïde (Kar et coll., 1996 ; Vaucher et coll., 2001). L'A β semble capable d'inhiber l'HACU au niveau hippocampique et cortical (Kar et coll., 1996, 1998). Il a été également montré que l'A β sous forme d'oligomères inhibe la plasticité au niveau de l'hippocampe par un mécanisme impliquant les récepteurs nicotiques (Itoh et coll., 1999 ; Walsh et coll., 2002).

L'AChE est également présente dans les dépôts amyloïdes et semble jouer un rôle important au niveau du métabolisme de l'APP dans la pathogénie de la maladie (Gomez-Ramos et coll., 1992). En effet, il a été démontré que l'AChE induit l'agrégation de l'A β sous forme fibrillaire (Inestrosa et coll., 1996) et qu'elle est capable de changer la conformation α -hélicoïdale de l'A β (peu amyloïdogène) en feuillet β qui est hautement amyloïdogène (Alvarez et coll., 1995). L'AChE sous sa forme tétramérique (G4-enzymatiquement active) est globalement diminuée dans les tissus cérébraux des patients atteints de la MA (Atack et coll., 1983; Fishman et coll., 1986), ce qui explique une augmentation dans le *ratio* G4/G1 (Talesa et coll., 2001). Cependant, seule la forme monomérique G1 est observée dans les dépôts amyloïdes (Arendt et coll., 1992).

3. Les modèles animaux de la MA

A ce jour, il n'existe pas de modèle animal capable d'exprimer tout à la fois les caractéristiques cognitives, comportementales, biochimiques et histopathologiques qui sont observées chez les patients atteints de la MA. Cependant, différentes approches expérimentales ont été utilisées pour reproduire chez l'animal un ou plusieurs aspects caractérisant la MA, aux niveaux cognitifs et physiopathologique, notamment des approches pharmacologiques et génétiques.

L'observation d'une atteinte marquée du système cholinergique, notamment au niveau des NCB a conduit de nombreux auteurs à étudier les effets des lésions du SM et/ou du NBM chez les rongeurs. Plusieurs types de traitements ont été utilisés pour induire des lésions du système cholinergique comme l'électrocoagulation, l'injection cérébrale de neurotoxines et la section de la voie fimbria/fornix (Yamada et Nabeshima, 2000). De plus, l'injection en continu intracérébroventriculaire (I.C.V.) d'acide quinolinique a aussi été développée pour reproduire l'évolution lente des maladies neurodégénératives, y compris de la MA. Même si ces traitements entraînaient effectivement de profonds troubles de la mémoire, ceux-ci ne pouvaient être attribués uniquement aux atteintes du système cholinergique, puisque ces approches affectaient aussi d'autres systèmes de neurotransmission (glutamatergique, GABAergique, etc). Elles manquaient donc crucialement de spécificité.

En 1991, une nouvelle approche a été développée pour léser sélectivement les neurones cholinergiques du Rat à l'aide d'injections intracérébrales d'une immunotoxine formée d'un anticorps 192-IgG, couplé à une cytotoxine, la saporine, qui est une toxine ribosomale extraite de la plante *saponaria officinalis* (Wiley, 1992). Ce traitement induisait une destruction des neurones cholinergiques et une altération de la voie cholinergique septo-hippocampique. Par contre, sur le plan comportemental, l'effet de ce traitement reste toujours controversé : certaines études ont montré qu'il induisait un modeste déficit de la mémoire

spatiale chez le Rat, notamment dans la piscine de Morris (Waite et coll., 1995 ; Pang et coll., 2001), alors que d'autres études n'ont mis en évidence aucun déficit à la suite de ce traitement (Baxter et coll., 1995 ; 1996). Une autre immunotoxine à base de saporine a été récemment utilisée chez la souris, la mu p75-saporine. Ces études ont montré que ce traitement induisait un déficit de la mémoire spatiale relativement modéré dans la piscine de Morris et le labyrinthe de Barnes (Berger-Sweeney et coll., 2001 ; Moreau et coll., 2008).

Bien que ces modèles expérimentaux aient permis d'induire un modeste déficit de mémoire, ils ne reproduisent en aucun cas les troubles mnésiques, et encore moins les autres troubles comportementaux et lésions histopathologiques (formation des plaques séniles, DNF) observés dans la MA.

Le développement des techniques de transgénèse, ainsi que la découverte de protéines impliquées dans la MA, ont permis de créer des souris transgéniques développant de nombreuses lésions caractéristiques de la maladie. Pour avoir un modèle animal qui exprime les caractéristiques physiopathologiques de la MA, de nombreux types de souris transgéniques ont été créés, notamment des souris exprimant le gène humain de l'APP, des souris exprimant le fragment C-terminal de l'APP humain (Sato et coll., 1997) ou des souris exprimant un des gènes mutés de l'APP induisant une forme familiale de la MA (Games et coll., 1995 ; Hsiao et coll., 1995 ; 1996).

Le premier modèle animal développant certains aspects de la pathologie sont les souris PDAPP exprimant une forme mutée (V717F) de l'APP humain couplé au promoteur de PDGF (*platelet-derived growth factor* ; Games et coll., (1995). Les souris PDAPP présentent des dépôts diffus, des plaques séniles, des pertes synaptiques et une activation des astrocytes. Malheureusement, les souris PDAPP développent un déficit de mémoire âge-indépendant dans un test de mémoire et un déficit âge-dépendant dans d'autres tests, tel que le test de reconnaissance d'objet. Le déficit âge-indépendant est probablement dû à une anomalie du

développement du cerveau consécutif à une surexpression de protéine APP (Dodart et coll., 2002 ; Cassel et coll., 2008). En effet, ces souris, même jeunes, présentent une diminution du volume de l'hippocampe et de la voie fimbria-fornix.

A la même époque, une autre souris transgénique, la tg2576, a été développée par Hsiao et coll., (1995, 1996). Cette souris exprime une double mutation (K670N/M671L, sous le contrôle du promoteur PrP du hamster) identifiée chez une famille suédoise de patients qui expriment une forme familiale de la MA. Cette lignée est constituée d'un fond génétique hybride B6.SJL. A partir de l'âge de 6 mois, la souris tg2576 présente une augmentation de l'A β soluble, et à partir de l'âge de 10-11 mois des dépôts amyloïdes sont évidents dans le cortex frontal, temporal, et le CE, ainsi que dans l'hippocampe et le présubiculum. Cette souris présente également une activation des cellules microgliales et astrocytaires liée à la formation des plaques séniles. En revanche, les tg2576 n'ont pas de perte neuronale, ni de réduction de volume de l'hippocampe. Au niveau comportemental, la souris tg2576 montre un déficit de mémoire âge-dépendant dans plusieurs tâches, mais celui-ci reste relativement modestes notamment dans les tâches de mémoire spatiale (Cassel et coll., 2008 pour une revue).

Désormais, il existe de nombreux autres modèles de souris transgéniques APP, dont la souris APP23 exprimant la même mutation suédoise que la tg2576, mais sous le contrôle transcriptionnel de l'élément promoteur Thy-1 (Sturchler-pierrat et coll., 1997). La particularité de cette souris est qu'elle développe exclusivement des plaques séniles congophiliques accompagnées de fibres cholinergiques dystrophiques. Alors que les souris PDAPP et tg2576 ne présentent qu'une réduction du nombre d'épines dendritiques dans le CA1 (Lanz et coll., 2003), la souris APP23 présente une diminution du nombre de cellules pyramidales de CA1 (Calhoun et coll., 1998). Au niveau comportemental, la souris APP23 montre aussi un déficit de mémoire âge-dépendant.

Pour mettre en évidence l'effet de la mutation de la PS1, des souris transgéniques pour le gène normal ou muté (A246E) de cette protéine ont été développées par Qian et ses collaborateurs (1998). Ces souris montrent une augmentation de la production d'A β -42 (Nakano et coll., 1999). Par contre, elles ne développent pas de dépôts amyloïdes (Borchelt et coll., 1996) et présentent un modeste déficit de mémoire par comparaison aux souris tg2576. Toutefois, la souris double mutée APP-PS1 (APP^{swe}/PS1-A246E) développe des dépôts amyloïdes à un âge beaucoup plus précoce que la souris APP^{swe} (Borchelt et coll., 1997). Ces souris présentent une corrélation positive entre les concentrations cérébrales de l'A β -42 et les déficits cognitifs (Holcomb et coll., 1998 ; Arendash et coll., 2001). Les souris transgéniques APP et PS1 développent des dépôts amyloïdes, mais pas de DNF. L'absence de DNF dans toutes les souris transgéniques APP a conduit à la création des souris transgéniques tau (P301L). Celles-ci développent des DNF dans le néocortex et l'hippocampe, et elles montrent un déficit cognitif accompagné d'une perte neuronale à partir de l'âge de 4 mois (Götz et coll., 2001). Elles ne présentent pas de dépôts amyloïdes. De plus, consécutivement au développement de DNF dans la moelle épinière, cette lignée présente des déficits moteurs entre 6 et 8 mois (Lewis et coll., 2000 ; Allen et coll., 2002).

La souris double-transgénique (mutation P301L pour tau ; mutation suédoise pour l'APP) est la première souris qui présente les deux lésions de la MA. Cette lignée développe des dépôts amyloïdes extracellulaires et des DNF en quantité plus importante que les souris P301L, mais elle présente les mêmes déficits moteurs que les souris P301L ce qui pose un sérieux problème pour les tests comportementaux (Lewis et coll., 2001).

La souris triple-transgénique (APP-PS1-tau) présente également les 2 lésions de la MA. Cette lignée développe des dépôts amyloïdes à un stade précoce dans le néocortex, puis dans l'hippocampe. Ensuite, des DNF sont mises en évidence dans l'hippocampe juste après l'apparition des premières plaques amyloïdes. Ces souris triple-transgéniques montrent un

déficit au niveau de la plasticité synaptique dans l'hippocampe (Oddo et coll., 2003a, 2003b) et un déficit de mémoire à partir de 4 mois (Clinton et coll., 2007).

En conclusion, aucun des modèles de souris transgéniques que j'ai cité ci-dessus et ceux référencés dans une vaste littérature ne reproduit le tableau clinique et neuropathologique de la MA. Bien que certains d'entre eux possèdent les mêmes lésions neuropathologiques de la maladie, il y a d'autres caractéristiques de la maladie qui ne sont pas exprimées, par exemple, aucun modèle ne présente à la fois une perte neuronale au niveau du CE et au niveau de NCB de façon comparable à celle observée dans le cas de la MA. D'autre part, même à un stade de pathologie amyloïde très avancé, la plupart de ces souris présente des déficits de mémoire relativement modérés, notamment en ce qui concerne la mémoire spatiale. Ceci pourrait être lié à l'absence de perte neuronale conjointe du CE et des NCB.

4. Hypothèses et objectifs de la thèse

Comme je l'ai évoqué précédemment, l'atteinte précoce du CE est considérée comme le premier signe neuropathologique dans la MA, et on lui attribue la responsabilité du déficit de la mémoire spatiale et épisodique chez les patients Alzheimer (Rodrigue et Raz, 2004). Par ailleurs, la dégénérescence des neurones cholinergiques au niveau des NCB est évidente à une phase plus avancée de la MA. Cependant, les lésions que l'on relève dans ces structures, l'une indépendamment de l'autre, n'entraînent que des déficits modérés au niveau de la mémoire spatiale (Coutureau et Di Scala, 2009 ; Parent et Baxter, 2004).

Notre équipe a récemment démontré que des lésions conjointes du CE et des NCB chez le Rat, et non chaque lésion séparément, induisaient des déficits de mémoire spatiale dont la sévérité et la nature rappellent celles présentées en phase avancée de la MA (Traissard et coll., 2007). Nous avons donc posé **l'hypothèse d'une synergie délétère de ces deux lésions typiques de la MA** qui pourrait jouer un rôle important dans le passage d'un stade

présymptomatique (atteinte du CE) vers un stade d'amnésie déclarée, caractérisé notamment par une désorientation marquée de la cognition spatiale (**atteinte conjointe du CE et des NCB ; Cassel et coll., 2008**). Les souris transgéniques pour les gènes humains mutés de l'APP sont les modèles animaux les plus utilisés actuellement. Ces lignées de souris développent des plaques amyloïdes, mais elles ne présentent au mieux qu'une perte modérée de neurones dans le CE et aucune dans les NCB, ce qui peut expliquer qu'elles ne présentent que des déficits cognitifs modestes, même avec une pathologie amyloïde très sévère.

L'objectif de ce travail de thèse a donc été de combiner l'approche lésionnelle et l'approche transgénique pour étudier l'impact des pertes neuronales sur les performances de mémoires et le développement de la pathologie amyloïde de souris possédant un gène muté de l'APP. La lésion du CE, à elle seule, pourrait induire des modifications intéressantes du métabolisme de l'APP et des dépôts amyloïdes, en particulier au niveau de l'hippocampe. Par ailleurs, la lésion des NCB pourrait induire une aggravation de la pathologie Alzheimer comme le suggère un résumé de congrès (Chauhan, Neurosci Soc Abst 271.88/KK9, 2006). Dans le cadre d'une collaboration avec A. Marti et C. Dorner-Ciossek (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co, Allemagne), nous avons eu accès à plusieurs cohortes de souris transgéniques APP tg2576. J'ai donc comparé les effets des lésions du CE, des NCB et des deux structures chez les souris tg2576 pour modéliser des phases critiques de l'évolution de la MA.

Dans une première partie, j'ai réalisé le phénotypage des souris témoins *wild type* (wt) âgées de 11, 17 et 21 mois qui constitue le fond génétique des souris Tg2576.

La deuxième partie de mon travail a été consacrée à l'évaluation des performances des souris tg2576 et de leurs wt dans différents tests de mémoire (piscine de Morris, labyrinthe de Barnes, labyrinthe en Y, reconnaissance spatiale, reconnaissance d'objet et reconnaissance

olfactive). Ces souris ont été génotypées pour le gène *rd* (*retinal degeneration*), car cette lignée possède une mutation de dégénérescence rétinienne qui induit une cécité.

Dans la troisième partie, j'ai effectué des lésions combinées du CE et des NCB. Les lésions du CE par la neurotoxine N-méthyl-D-aspartate et de NCB par l'immunotoxine mu p-75 saporine ont été mises au point chez des tg2576 afin de tester l'efficacité des doses et d'ajuster les coordonnées stéréotaxiques. Ensuite, des souris tg2576 et leurs témoins wt de 8 mois portant une lésion du CE, des NCB ou la double lésion ont été testées dans le labyrinthe de Barnes 1 mois et 4 mois après l'opération.

1. Sujets d'expériences

Les expériences présentées dans ce travail ont été réalisées sur des souris transgéniques femelles tg2576 et leurs témoins wt de même fratrie qui nous ont été fournies par nos collaborateurs, A. Marti et C. Dorner-Ciossek (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co, Allemagne). Dans les travaux présentés dans les trois chapitres suivants, j'ai utilisé: (i) des souris wt de 3 âges différents : 11, 17 et 21 mois pour un phénotypage du fond génétique des souris tg2576, (ii) des souris tg2576 et leurs wt de 8 et 16 mois pour le phénotypage des souris tg2576 et (iii) des souris tg2576 et leurs wt de 8 mois pour l'étude de l'impact des lésions du CE et/ou des NCB sur leurs performances de mémoire et leur neuropathologie. A leur arrivée au laboratoire, les souris sont placées individuellement dans des cages Makrolon (22x20x14 cm) dans une animalerie éclairée selon un cycle 12h-12h (période éclairée : 8h-20h) et maintenue à une température de $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Elles y disposent d'une feuille de papier absorbant pour faire un nid, ainsi que de nourriture et d'eau *ad libitum*. Chaque animal est régulièrement pesé et manipulé pour se familiariser avec l'expérimentateur. Tous les protocoles impliquant les animaux et leur entretien sont menés en conformité avec les directives nationales (N° 8748 du 19 octobre 1987, ministère de l'agriculture) et internationales (NIH publication, n082-23 version 85). Chaque expérimentateur titulaire possède une autorisation d'expérimenter individuelle délivrée par le ministère de l'agriculture (N° autorisation JC Cassel : 67-215, C Mathis : 67-292, N. Yassine : formation validée, demande d'autorisation en cours).

2. Interventions chirurgicales

2.1. Anesthésie et préparation

Les souris sont pesées, puis anesthésiées par une injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (Ceva santé animal ; 0.70 mg/kg) pour les opérations de lésion du CE et d'un mélange de xylazine (10 mg/kg, Rompun 2%, Bayer Pharma) et de kétamine (100 mg/kg, Imalgène 500, Merial) pour la lésion des NCB. Les animaux sont ensuite placés dans un cadre stéréotaxique et leurs yeux recouverts d'une goutte de Lacrygel (Europhtha). Le mélange xylazine/kétamine ne provoque pas de problèmes d'encombrements respiratoires parfois observés avec le pentobarbital sodique, mais on ne peut utiliser cet anesthésique pour les lésions du CE avec le N-méthyl-D-aspartate (NMDA) car la kétamine agit comme un antagoniste non-compétitif du récepteur NMDA et cela risquerait donc d'interférer avec les propriétés neurotoxiques du NMDA.

2.2. Lésion du CE

L'utilisation du NMDA pour effectuer les lésions du CE a été préférée à celle d'autres techniques de lésion (électrolytique ou par aspiration) parce que cette technique permet une lésion plus sélective de cette structure, puisque les fibres en passage ne sont pas affectées par l'excitotoxicité. Le NMDA possède des propriétés neuroexcitatrices, car il agit sur les récepteurs glutamatergiques en provoquant une forte dépolarisation de la membrane qui entraîne à son tour la destruction de la cellule portant ces récepteurs. Les lésions excitotoxiques bilatérales du CE ont été réalisées avec une technique d'injections multiples (3 injections/coté) d'une solution de NMDA dilué dans du PBS à 80mM. Cette solution est administrée à l'aide d'une micropipette de verre, permettant un bon suivi de la progression de

l'injection de la solution. La micropipette est reliée à un cathéter en polyéthylène, lui-même relié à une microseringue (Hamilton) de 10 μL . Les injections sont réalisées à l'aide d'une micropompe au rythme de 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Tout d'abord, la souris anesthésiée est fixée sur l'appareil stéréotaxique et la barre de maintien des incisives est placée de manière à obtenir une horizontalité entre les points de référence lambda et bregma (technique du « *flat skull* »). La température corporelle des souris est enregistrée et maintenue à 35 °C tout au long de l'opération grâce à un tapis chauffant thermostaté équipé d'une sonde rectale. Après incision longitudinale du scalp, on perfore la boîte crânienne à l'aide d'une fraise dentaire. A chaque point d'injection, sous loupe binoculaire, la dure-mère est percée préalablement à la pénétration de la micropipette afin d'éviter l'obstruction de celle-ci ou la compression des tissus sous-jacents lors de la descente de cet instrument. Quatre trous sont effectués (2 de chaque côté) aux coordonnées suivantes (par rapport au site *bregma*):

- Site 1, AP (antéropostérieur)= -4,1 mm, ML (médiolatéral)= $\pm 4,2$ mm, injection d'un volume de 0,08 μL .
- Site 2a, AP = -4,7 mm, ML= $\pm 3,6$ mm, injection d'un volume de 0,1 μL , puis le site 2b avec injection d'un volume de 0,05 μL effectuée 0,5mm plus haut.
- La profondeur des sites d'injection 1 et 2a est définie à 0,5 mm au-dessus de la boîte crânienne : la micropipette est descendue jusqu'à faire contact avec l'os, puis remontée de 0,5 mm.

La micropipette est laissée en place pendant 5 min avant d'être retirée pour éviter une aspiration du NMDA lors de son retrait. Pour les souris témoins, on procède à une descente de micropipette sans injection. Les souris sont ensuite suturées, et sont identifiées grâce à

l'implantation sous-cutanée d'un transpondeur (*Résaumatique*®, BERNAY, France). A l'issue de l'opération, les souris sont placées dans une cage propre avec un papier absorbant et la cage est placée sur une plaque chauffante jusqu'à leur réveil.

2.3. Lésion des NCB

J'ai réalisé des lésions bilatérales des NCB avec la mu p75-saporine (ATS, San Diego, USA) qui est l'immunotoxine cholinergique adaptée à la souris. Comme chez le Rat, la mu p75-saporine est composée d'un anticorps dirigé contre le récepteur p75 du facteur de croissance *nerve growth factor* (NGF) murin et de la saporine, qui est une protéine inactivant les ribosomes et extraite de la plante *saponaria officinalis*. La fixation de la mu p75-saporine sur les cellules porteuses du récepteur p75 conduit à l'internalisation du complexe et à la mort cellulaire suite à l'action de la saporine sur les ribosomes.

Comme précédemment, après incision longitudinale du scalp, on perfore la boîte crânienne à l'aide d'une fraise dentaire. Une solution de 0.3µg/µL de mu p75-saporine (diluée dans du PBS) est injectée par voie intracérébroventriculaire (i.c.v.) bilatérale (0,5µl par coté) à travers une canule d'injection (0.28 mm de diamètre externe, 0.18 mm de diamètre interne, 20 mm de long) reliée à un cathéter en polyéthylène, lui-même relié à une microseringue (Hamilton) de 2 µL. Les coordonnées de l'injection se situent aux points suivants : AP=-0.4 mm, ML=±0.8 mm et DV (dorsoventral)= 2 mm par rapport au point de référence *bregma*. Les injections sont réalisées manuellement sur une durée de 45 s. La canule d'injection est laissée en place pendant 5 min, puis remontée d'un palier de 0.5 mm pendant quelques dizaines de secondes afin d'éviter tout reflux de l'immunotoxine lors de la remontée finale de la canule. Toutes les souris témoins reçoivent une injection de 0,5 µL de PBS par côté dans les mêmes conditions que pour la solution de mu p75-saporine. Les souris sont ensuite suturées et

replacées dans une cage avec un nid en papier absorbant propre. Leur cage est maintenue au chaud jusqu'à leur réveil.

3. Test comportementaux

3.1. Test d'activité locomotrice

L'intérêt de prendre en compte l'activité locomotrice des souris provient du fait que la résolution de la plupart des tâches comportementales implique un déplacement de celles-ci dans une enceinte. L'environnement nouveau peut induire un comportement d'exploration pour l'animal. Celui-ci se traduit par une augmentation de l'activité locomotrice, suivie d'une diminution progressive liée à la familiarisation de l'animal avec son environnement.

3.1.a Dispositif

L'enregistrement se fait dans une salle dédiée à ce test. Les souris sont placées individuellement dans une grande cage d'élevage (42 x 26 x 15 cm). Chaque cage est traversée par deux faisceaux infrarouges aboutissant à deux cellules photoélectriques (A et B) placées à 4,5 cm au-dessus du plancher de la cage et séparées de 28 cm (Figure 11). L'activité locomotrice d'une souris est évaluée par le comptage du nombre de passage d'une extrémité à l'autre de la cage. La coupure successive des faisceaux de lumière infrarouge (A puis B ou B puis A) est enregistrée par un ordinateur qui comptabilise ainsi le nombre de passages longitudinaux.

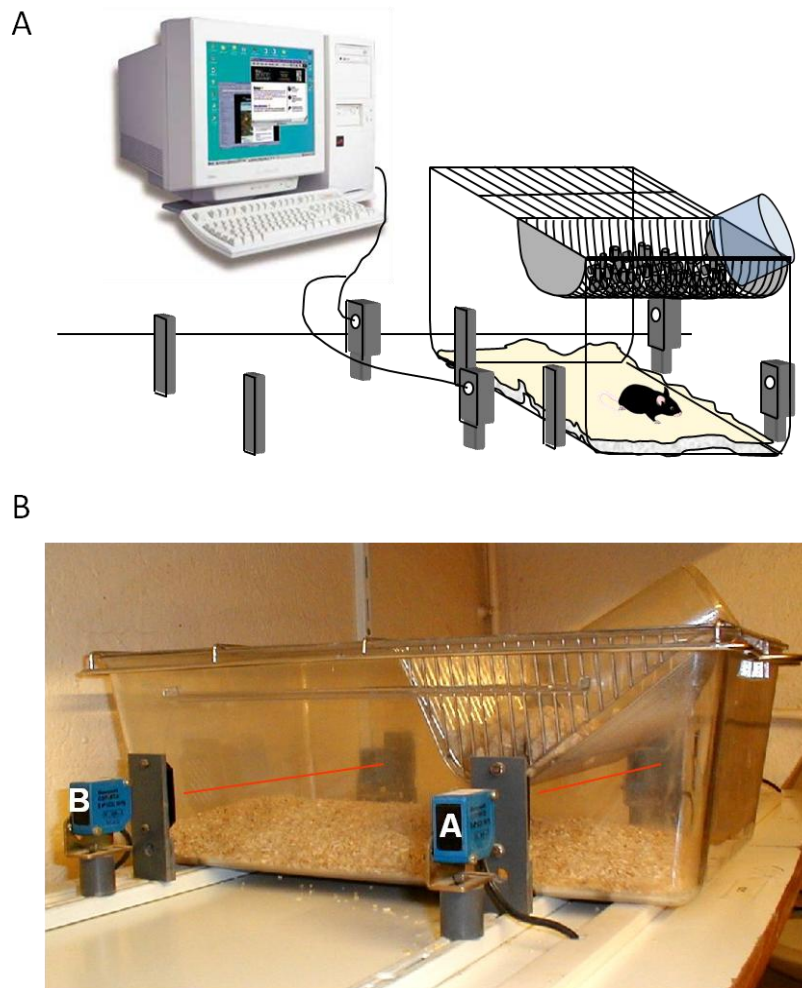


Figure 11. Dispositif expérimental de l'actographie. A: représentation schématique. B: photographie.

3.1.b. Protocole

Les données de l'actographie sont analysées en deux étapes. Une phase d'habituation de trois heures après l'introduction dans la nouvelle pièce d'expérience (familiarisation de l'animal à un nouvel environnement). Les 21 h suivantes sont analysées séparément et correspondent à l'activité locomotrice de base de l'animal pendant une phase diurne (les cinq premières heures ainsi que les quatre dernières) et une phase nocturne (phase de 12 heures).

3.2. Test de reconnaissance spatiale et de reconnaissance d'objet

Ce test se repose sur la tendance naturelle des souris à explorer les nouveaux objets ou ceux qui ont changé de place dans un environnement qu'elles connaissent et dont elles auront préalablement explorés les objets. En effet, le test de reconnaissance spatiale est couramment utilisé chez les rongeurs pour évaluer une forme de mémoire spatiale (association objet-position). Le test de reconnaissance d'objet permet de vérifier que la souris est capable de discriminer les différents objets ; il a pour but de quantifier les réactions comportementales des rongeurs suite à l'introduction d'un nouvel objet dans un environnement familier.

3.2.a. Dispositif

Le dispositif consiste en un champ ouvert (*open field*) en plexiglas, formé d'un plancher horizontal carré translucide de 52 cm de côté et de parois verticales noires d'une hauteur de 40 cm (figure 12A). Une carte plastifiée de format A4 présentant des bandes verticales noires sur fond blanc est fixée à l'une des parois de l'enceinte. La présence fixe de cette carte au cours de toutes les séances du test apporte aux animaux un indice d'orientation dans l'enceinte. L'expérimentateur effectue ses observations à partir du reflet du fond de l'enceinte sur les parois. J'ai utilisé 8 objets (2x2 pour les séances d'habituation, 3 pour le test de reconnaissance spatiale, et 1 de plus pour le test de reconnaissance d'objet) qui diffèrent par la taille (10 à 17 cm d'hauteur), la couleur et la composition (plastique, métal et verre ; Figure 12B).

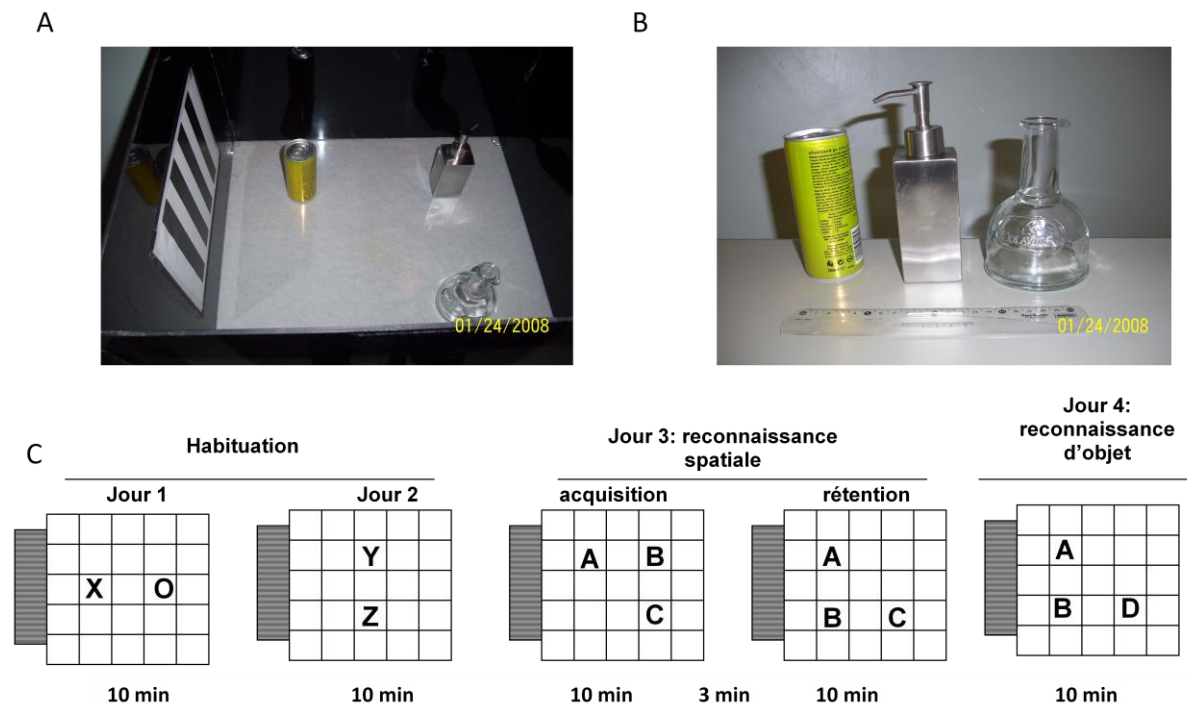


Figure 12. Dispositif expérimental du test de reconnaissance. A: L'enceinte de test montrant les objets et la carte plastifiée. B: Détail des objets utilisés pour la tâche de reconnaissance spatiale. C: Déroulement des tâches de reconnaissance.

3.2.b. Protocole

Le test se déroule en trois étapes : deux séances d'habituation, une séance de reconnaissance spatiale, et une séance de reconnaissance d'objet (figure 12C).

Les animaux sont soumis à 2 jours d'**habituation**. Durant cette phase, les souris sont familiarisées au champ ouvert et à la présence de différents objets dans différentes dispositions durant une séance de 10 minutes par jour.

Le troisième jour, le test de **reconnaissance spatiale** se déroule en 2 séances de 10 minutes chacune. Pendant la première séance, dite d'acquisition, la souris explore librement pendant 10 mn une configuration de trois objets. Elle est ensuite retirée du dispositif et placée pendant 3-4 mn dans sa cage d'élevage. Pendant ce temps le champ ouvert et les objets sont nettoyés à l'alcool (70%) afin d'éliminer les traces olfactives, et l'un des objets est changé de place

(l'objet déplacé). Ensuite, la souris est remise dans le dispositif pour une séance de 10 min de reconnaissance durant laquelle elle explore librement les objets. Durant la séance d'acquisition et la séance de reconnaissance spatiale, on quantifie le temps d'exploration de chaque objet.

Le quatrième jour, le test de reconnaissance d'objet se déroule dans le même champ ouvert, et dure 10 minutes avec deux objets utilisés au jour 3 et un nouvel objet qui remplace un des trois objets utilisés la veille (un des objets non déplacés). Comme précédemment, on quantifie le temps d'exploration de chaque objet.

3.3. Test de la piscine de Morris

Conçu et mis au point par R.M.G Morris (1983), ce test est devenu rapidement un test de référence dans les études visant à évaluer les capacités d'apprentissage et de mémoire spatiale chez les rongeurs. Dans les différents types de protocoles utilisés, le principe de base est que l'animal doit apprendre à s'échapper de l'eau d'un bassin (situation aversive) en atteignant le plus rapidement possible une plate-forme. Dans certains protocoles, la plateforme est légèrement immergée dans l'eau et les seuls repères que l'animal peut utiliser pour trouver la plateforme sont les indices distaux disposés à l'extérieur du bassin. Dans d'autres protocoles, la plate-forme dépasse légèrement de la surface de l'eau ce qui la rend visuellement accessible aux animaux et ne nécessite pas de navigation spatiale pour s'y réfugier.

3.3.a. Dispositif

Le dispositif expérimental de notre test de la piscine de Morris est constitué d'une enceinte circulaire de 140 cm de diamètre et de 40 cm de hauteur, posée sur un socle s'élevant à 58 cm du sol et remplie à moitié (20 cm) par de l'eau (figure 13). La température relativement basse de l'eau (20°C) confère à ce test un caractère aversif pour la souris. La piscine est

virtuellement divisée en quatre quadrants par quatre points cardinaux arbitraires (Nord, Sud, Est, Ouest). Une plate-forme mesurant 10 cm de diamètre est constituée d'un bocal entièrement en verre transparent et de section hexagonale. Le bocal n'est pas visible une fois dans l'eau. Le bassin est placé dans une salle d'expérimentation comportant divers repères visuels et auditifs distaux et fixes (bureau, chauffe-eau, cages, affiches, ordinateur, radio...), susceptibles de permettre à l'animal de repérer l'emplacement de la plate-forme lorsqu'elle est invisible. Dans cette tâche, l'animal cherche à trouver refuge sur la plate-forme le plus rapidement possible.

Le trajet effectué par l'animal dans la piscine est filmé à l'aide d'une caméra vidéo qui transmet l'image à un moniteur relié à un ordinateur et à un magnétoscope. Ce dernier permet de sauvegarder les données de l'expérience sur bande vidéo. L'ordinateur est équipé d'un système d'analyse de trajectoire (*Ethovision video tracking system*, version 2.3, Noldus Information Technology, Wageningen, Pays-Bas) qui permet d'obtenir, entre autres variables, la latence que met l'animal à rejoindre la plate-forme et la distance parcourue au cours du trajet.

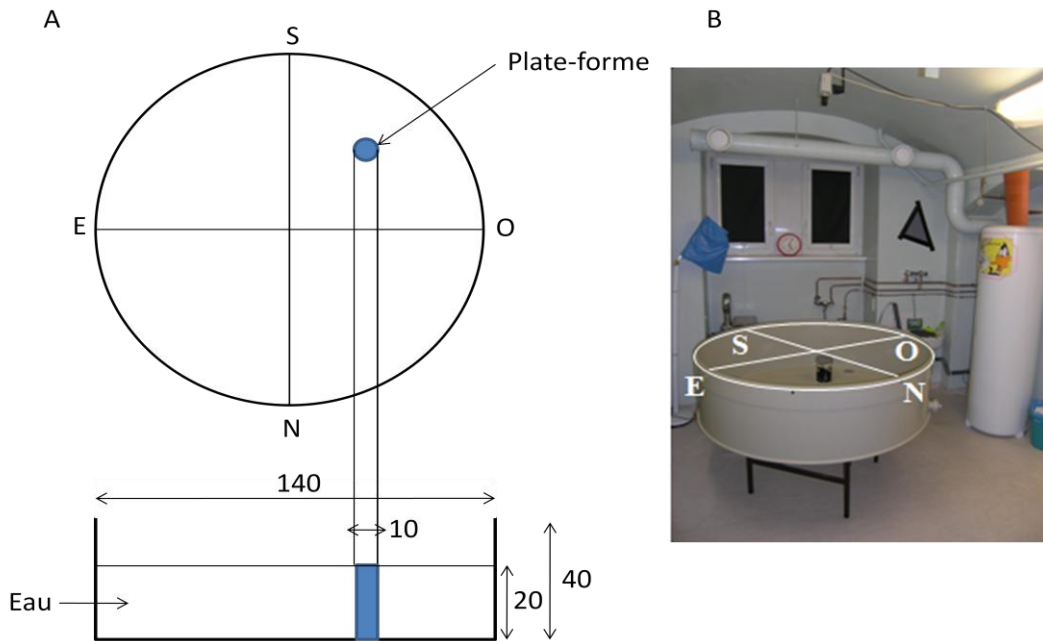


Figure 13. A : Représentation schématique de la piscine de Morris avec les divisions virtuelles des quatre quadrants. B : Photographie de la piscine (N : Nord, S : Sud, E : EST, O : Ouest).

3.3.b. Protocoles

Avant le début du protocole de mémoire de référence, chaque souris est familiarisée au dispositif de test. Le protocole est réalisé en plusieurs étapes. La première étape correspond à une séance d'habituation d'une minute, la souris est déposée au centre du bassin contenant seulement 3,5 cm d'eau. La souris peut ainsi nager, mais aussi toucher le fond du bassin avec sa queue et/ou ses pattes postérieures. Comme une petite plate-forme (le couvercle du bocal utilisé comme plate-forme) émergée est visible (1 cm au-dessus du niveau de l'eau) et située à quelques centimètres du bord du bassin, la souris peut la rencontrer et se hisser dessus. Si la souris n'y parvient pas avant 1 min, elle y est doucement amenée et laissée dessus pendant 10 sec, puis ramenée dans sa cage sur une grille de transport. Le lendemain, les souris sont encore une fois déposées au centre du bassin rempli (niveau d'eau à 20 cm du haut de la paroi) et sans plateforme. L'animal peut alors nager pendant 2 min afin qu'il s'habitue à la

nage dans ces conditions. Cet essai de « nage libre » vise à vérifier que toutes les souris sont capables de nager pendant au moins 2 min sans fatigue excessive.

Le protocole de **mémoire de référence** consiste, pour l'animal, à localiser la plate-forme immergée, donc invisible. La position de la plate-forme reste inchangée (ici dans le quadrant Sud-Ouest) au cours de 6 jours consécutifs. Chaque jour, la souris apprend à rejoindre la plate-forme au cours de 4 essais consécutifs en partant d'un des 4 points de départ assignés de manière quasi-aléatoire. A chaque essai, l'animal est déposé dans l'eau depuis un point de départ déterminé qui varie d'essai en essai (la séquence des différents points de lâcher variant également d'un jour à l'autre). L'essai se termine lorsque la souris a atteint la plate-forme, ou bien lorsque 60 sec se sont écoulées. Si la souris ne trouve pas la plate-forme durant les 60 sec de l'essai, elle est guidée par l'expérimentateur jusqu'à la plate-forme. Une fois l'animal sur la plate-forme, il y est laissé pendant 10 sec avant que l'expérimentateur ne lui présente une grille métallique de transport. La souris grimpe alors sur la grille et est ramenée jusqu'à sa cage. Les principales variables relevées sont la latence d'atteinte de la plate-forme (maximum : 60 sec) et la distance parcourue au cours du trajet.

Vingt-quatre heures après le dernier essai du protocole de mémoire de référence, la plate-forme est retirée du bassin et les souris sont soumises à un **test de rétention** de 60 sec durant lequel on mesurera principalement le temps passé dans les 4 quadrants, dont celui qui contenait la plate-forme au cours des essais précédents.

Vingt-quatre heures après le dernier essai du protocole de test de rétention. Cette expérience s'est poursuivie, pendant 3 jours consécutifs, par une séance quotidienne de 4 essais où la plateforme est placée dans le quadrant opposé de l'ancien quadrant cible (inversion de consigne - *reversal*). Ce protocole permet d'évaluer la capacité des souris à réapprendre un nouvel emplacement de la plate-forme.

Remarque : dans le travail que je présente, vingt-quatre heures après le dernier essai du protocole de *reversal*, les souris ont été soumises, pendant 3 jours consécutifs, à des séances d'extinction à raison d'une séance d'extinction par jour. Ce protocole permettrait d'évaluer la persistance des souris à chercher la plate-forme absente. Les données obtenues dans ce protocole ne seront pas présentées, car les souris n'ont pas appris la tâche de mémoire de référence pour les raisons que je décrirai ultérieurement.

L'épreuve de la **plate-forme visible** est réalisée le dernier jour. Cette tâche de discrimination visuelle a pour but de vérifier l'absence de biais sensorimoteurs ou visuels. Elle consiste en 4 essais, durant lesquels la plate-forme est rendue visible (1 cm au-dessus de la surface de l'eau). Les positions de la plate-forme et les points de lâcher diffèrent lors des 4 essais successifs, mais la distance entre un point de lâcher et l'emplacement de la plate-forme est identique d'un essai à l'autre. Les variables retenues sont les mêmes que lors du protocole de mémoire de référence.

3.4. Labyrinthe de Barnes

Le test du labyrinthe de Barnes a initialement été développé par C. Barnes (1979) pour évaluer les performances d'apprentissage et de mémoire spatiale chez le Rat âgé. Ce test est plus adapté à la souris que la piscine de Morris, car la souris, contrairement au rat, a une tendance à éviter le milieu aquatique dans son environnement naturel. Le principe de ce test est de retrouver l'emplacement d'un trou menant à un refuge. En effet, la souris présente une tendance naturelle à éviter les environnements découverts (la plateforme du test) en trouvant refuge dans son nid (la cage d'élevage). Au fur et à mesure de l'entraînement, la souris va progressivement apprendre à localiser le trou menant à sa cage en se basant sur des indices distaux disponibles dans la pièce (armoire, meubles, formes sur les murs, radio...).

3.4.a Dispositif

Le dispositif consiste en une plateforme circulaire (100 cm de diamètre) munie de 12 trous de 4 cm de diamètre situés sur sa circonférence à 9 cm du bord (figure 14). La plateforme est surélevée à 65 cm du sol et posée sur un tabouret à siège rotatif, permettant de la tourner aisément. Un tube en plastique flexible reliera l'un des trous de la plateforme à la cage de l'animal (figure 14). Pour chaque souris, une seule position dans l'espace est associée au trou-cible menant à la cage via le tube flexible.

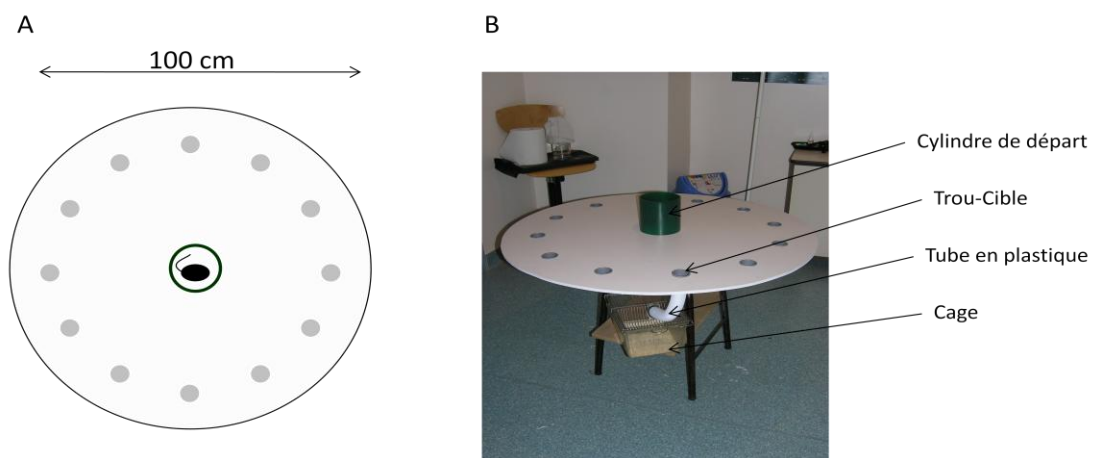


Figure 14. Dispositif expérimental du test du labyrinthe de Barnes. A: Représentation schématique. B : Photographie.

3.4.b. Protocole de mémoire de référence

Durant les trois premiers jours, les souris sont entraînées à passer de la main de l'expérimentateur à leur cage en passant par un tube qui est identique à celui qui sera ultérieurement connecté à l'un des trous de la plateforme. Cette familiarisation se déroule au rythme de 3 essais par jour. Dans ce test, j'ai utilisé pour chaque expérience/chapitre un protocole différent :

- Expérience 1: phénotypage des wt: les souris reçoivent 2 jours d'acquisition (J1 et J2), au rythme de 6 essais pour chaque souris le premier jour (J1), et de 3 essais pour

chaque souris le second jour d'acquisition (J2). Ensuite, pendant 4 jours consécutifs (J3-J6), les souris ont une séance quotidienne de 4 essais/jour où la position du trou cible est changée (placé à l'opposé du trou cible utilisé lors des deux premiers jours de l'acquisition – l'épreuve du *reversal*). Deux tests de rétention (*probe*) sont réalisés afin d'évaluer les performances de mémoire spatiale : un test est réalisé en J2 avant la dernière séance d'acquisition (*probe 1*). Un autre (*probe 2*) est réalisé en J18, c'est-à-dire 11 jours après la fin du *reversal*.

- Expérience 2 : phénotypage des tg2576: Le protocole comporte 2 jours d'acquisition (J1 et J3) à raison de 6 essais pour chaque souris le premier jour (J1), de 3 essais le second jour d'acquisition (J3) et 4 jours consécutifs de *reversal* (J4-J7). Deux tests de rétention sont réalisés : un test est réalisé en J4 avant la séance de *reversal* (*probe 1*) et un autre (*probe 2*) est réalisé en J14, c'est-à-dire 7 jours après la fin du *reversal*. Ajouter un jour d'acquisition avant de faire le premier *probe* a permis d'améliorer les performances de rétention des souris wt au vu des résultats de la première expérience. La réduction du délai de rétention pour le *probe 2* de 11 jours à 7 jours a permis de rendre cette tâche plus facile pour les souris tg2576. Ces changements ont eu pour but d'obtenir des déficits reproductibles chez les souris tg2576.
- Expérience 3 : les souris subissent 5 jours d'acquisition, à raison de 4 essais/jour. Le test de rétention est réalisé 2 jours (72 heures) après la dernière séance d'apprentissage. En effet, d'après les résultats acquis avant cette expérience, les performances de rétention mnésique des tg2576 sont déjà affectées après un délai de 2-3 jours.

Les souris passent par série de 4. A chaque essai, un cylindre est posé au milieu du labyrinthe et la souris y est déposée, puis libérée au bout de 5 s en démarrant le chronométrage. La souris dispose de 3 min maximum pour atteindre le trou cible par l'expérimentateur. Si elle

ne le trouve pas, elle est gentiment guidée jusqu'à celui-ci. Entre chaque essai, on essuie la plateforme avec un chiffon imbibé d'alcool à 70 % et la planche est tournée selon un protocole prédéfini afin que le même trou ne soit jamais deux fois à l'emplacement du trou-cible (pour éviter un indiçage olfactif). Pour chaque essai, on mesure les latences de visite et d'entrée dans le trou-cible (4 pattes dans le trou) ainsi que l'ordre de visite de tous les trous avant d'atteindre le trou-cible. Au cours des probes, la souris explore librement pendant 2 minutes sans qu'aucun trou ne soit relié à sa cage. On comptabilise le nombre, la latence, ainsi que la distribution spatiale des visites pour chaque souris. Un indice d'exploration des trous est alors calculé : Nombre de visite au trou cible / Nombre de visites totales. Les stratégies utilisées par les souris pour trouver le trou sont classées selon trois catégories (adapté par Harrison et ses collaborateurs, 2007) : (1) Stratégie spatiale si la souris va directement au trou-cible ou le trou adjacent au trou-cible. (2) stratégie sérielle si la souris visite trou après trou. (3) Stratégie aléatoire, si la souris n'adopte pas l'une ou l'autre stratégie décrite précédemment.

3.5. Test du labyrinthe en Y

Il s'agit d'un test permettant d'évaluer la tendance naturelle d'une souris à alterner son choix après avoir exploré une branche d'un labyrinthe. En effet, dans la majorité des cas, elle va spontanément explorer les autres branches qui lui sont inconnues. Le labyrinthe en Y est composé de trois allées identiques disposées selon les médianes d'un triangle équilatéral. Ces allées ont une longueur de 13 cm, une largeur de 4.5 cm et une hauteur de 5.5 cm. Ce labyrinthe dispose d'un couvercle transparent (figure 15). Le plancher est constitué de barres métalliques de 2 mm de diamètre régulièrement espacées de 0,5 cm. Ce test d'alternance est couramment utilisé pour évaluer la mémoire de travail chez les rongeurs. Il est souvent appelé test d'« alternance spontanée » en raison de l'absence d'un renforçateur, alimentaire

par exemple. Il a été décrit que l'alternance spontanée chez les rongeurs dépend de l'hippocampe. En effet, les animaux qui ont subi des lésions de l'hippocampe présentent de mauvaises performances dans ce test (Lalonde, 2002). Dans notre procédure, la souris est placée dans l'une des trois branches du labyrinthe, la tête dirigée vers le point d'intersection des 3 branches, puis elle est laissée 5 minutes en libre exploration. On considère qu'elle a pénétré dans une branche si ses 4 pattes sont dedans. On comptabilise l'ordre des visites, dont on extrait le nombre total de visites comme indice d'activité générale, ainsi que la distribution des visites dans les trois branches. Les données présentées résultent d'une analyse de cette distribution pour compter les alternances et s'expriment en pourcentage d'alternance. Celui-ci est calculé selon la formule: $[\text{Nombre d'alternance} / (\text{Nombre de visites} - 2)] \times 100$ (voir l'exemple de comptage d'alternance et de pourcentage dans la figure 15).

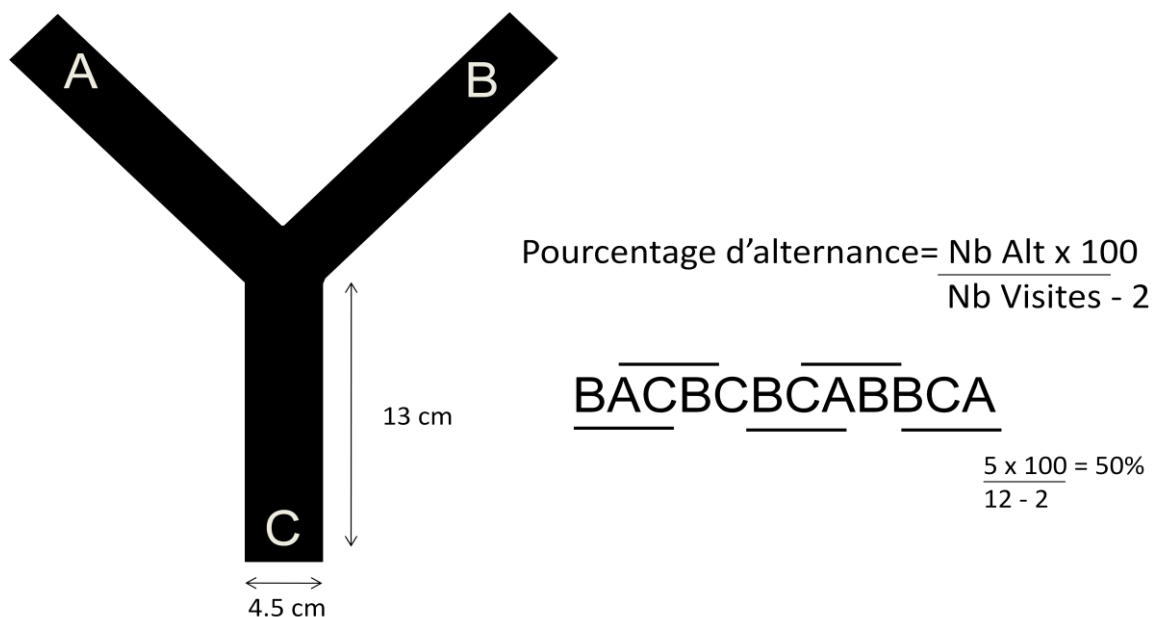


Figure 15. Dispositif expérimental du test du labyrinthe en Y avec la formule adaptée pour calculer le pourcentage d'alternance et un exemple de comptage d'alternance.

3.6. Test de discrimination olfactive

Ce protocole est adapté de la publication de Schellinck et ses collaborateurs (2001). La souris va apprendre à associer une odeur à la présence d'un renforçateur alimentaire et une autre odeur à l'absence de renforçateur alimentaire (pâtes au blé dur, 17.3 ± 0.3 mg par pâte, Alphabet®. GRAND'MERE, Marlenheim). Le test se déroule en une phase d'acquisition et une phase de rétention espacées de 7 jours. Cinq jours avant chaque phase, les souris sont mises en restriction alimentaire pour abaisser leur poids initial de -10 et -15% et le maintenir à ce niveau pour toute la durée de l'apprentissage. Ce poids est maintenu avec des rations alimentaires définies (0.5-2 g) selon le besoin, et le poids de la souris est vérifié quotidiennement. Ces rations sont constituées à partir de nourriture habituelle. Avant d'entamer la phase d'acquisition du test, les souris reçoivent également quotidiennement des pâtes présentées dans des pots en verre (\emptyset : 6 cm ; hauteur, 5 cm). Durant la phase de 3 jours d'acquisition, au rythme de 4 essais par jour, les animaux apprennent à associer l'odeur renforcée à la présence des pâtes. L'odeur *Phényl-acetate* (Aldrich chemicals, France) rappelant une odeur de rose, est renforcée pour une moitié des animaux, tandis que l'odeur de *linalool* (Aldrich chemicals, France) rappelant une odeur de citron, est renforcée pour le reste des animaux. Les pâtes sont disposées sur une boîte de Pétri (\emptyset : 5 cm ; hauteur, 2 cm) percée de petits trous et contenant un papier filtre (Whatman no. 3 ; \emptyset : 4,5 cm). Sur le papier filtre sont déposées 200 μ L de solution odorante. Le tout est placé au fond d'un pot en verre (décrit ci-dessus) et entièrement recouvert de sciure sur toute la hauteur du pot. Chaque jour d'acquisition, la souris effectue 2 essais avec l'odeur renforcée et 2 essais avec l'odeur non renforcée (5 minutes par essais). L'ordre des essais renforcés (R) et non-renforcés (R) varie d'un jour à l'autre. Le premier jour, l'ordre est RNRN, le second jour il devient NNRR, et le troisième jour, c'est NRNR. Six jours après l'acquisition, les animaux passent un test de rétention. Ce test se déroule en une séance de 2 minutes pendant laquelle la souris a accès

simultanément à deux pots dépourvus de pâtes. Un des pots contient l'odeur précédemment renforcée, et l'autre, l'odeur précédemment non-renforcée. On utilise un appareil de test néotique transparent (45 x 30 x 20 cm) divisé en deux fois 3 séries de compartiments interconnectés et d'égale surface (gauche, centre, droite). On garde la même lumière dans la pièce, le même bruit de fond, mais on déplace le lieu du test dans la partie opposée de la pièce. Dans un premier temps, on met la souris pendant 2 min dans le compartiment central du triple compartiment coté mur et l'on mesure le temps passé par la souris dans le compartiment droit et celui passé dans le compartiment gauche. Ceci permet de vérifier qu'il n'y a pas de préférence pour un coté. On remet la souris dans sa cage. On prépare les 2 pots (chacun contenant une odeur mais dépourvu du renforçateur) que l'on place comme indiqué, un dans chaque compartiment extrême du triple compartiment coté expérimentateur. Environ 3-4 min après avoir sorti la souris du dispositif, on la remet dans le compartiment central du triple compartiment coté expérimentateur pour 5 min. Mais on ne mesure que sur 2 min le temps que la souris creuse dans chacun des deux pots (2 chronos). Le comportement de fouille est défini par le fait que la souris déplace la sciure (on exclue le temps passé à renifler et à marcher sur la surface de la sciure).

3.7 Test de l'évitement passif

Le test de l'évitement passif a été largement utilisé pour évaluer l'apprentissage et la mémoire chez les rongeurs. L'appareil de test est constitué de deux compartiments (figure 16): un compartiment blanc et éclairé (23 cm de long, 8 cm de large et 14 cm de haut), ainsi qu'un compartiment noir et non éclairé (18 cm de long, 8 cm de large et 14 cm de haut), séparé du compartiment blanc par une porte à guillotine.

Le test se déroule en 2 phases : une phase d'acquisition et une phase de rétention. Pendant la phase d'acquisition, la souris est placée dans le compartiment éclairé pendant 20 sec, puis la porte à guillotine est ouverte. Dès l'ouverture de la porte, on mesure le temps que met l'animal pour entrer dans le compartiment sombre. Lorsque l'animal a les quatre pattes dans le compartiment sombre, la porte à guillotine est refermée et la souris subit immédiatement deux chocs électriques au niveau des pattes (0.3 mA en courant alternatif, deux secondes) à 5 sec d'intervalle. Après 15 sec passées dans ce compartiment sombre, la souris est retirée du dispositif et retourne dans sa cage.

Vingt-quatre heures plus tard, l'animal est remplacé dans le dispositif pour une séance de rétention. La souris est déposée dans le compartiment éclairé et la porte à guillotine est ouverte au bout de 20 s. On enregistre la latence d'entrée dans le compartiment sombre.

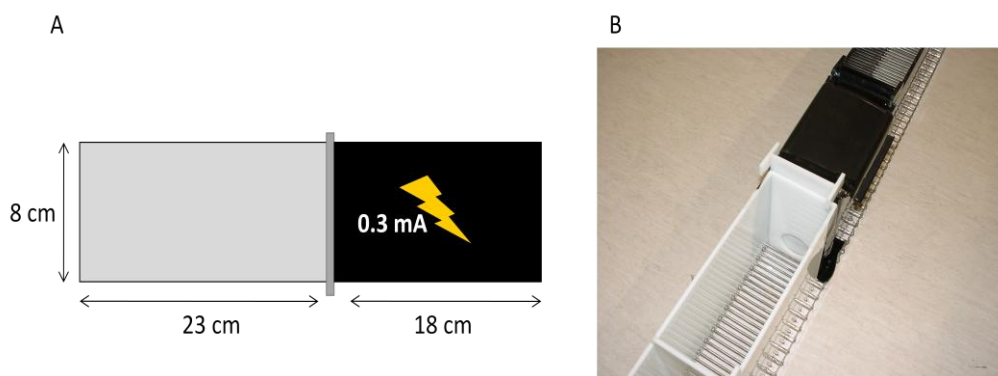


Figure 16. Dispositif expérimental du test de l'évitement passif. A : représentation schématique. B : photographie

4. Histologie

4.1. Euthanasie et préparation des tissus

A la fin des tests comportementaux, les souris sont sacrifiées par l'injection d'une dose létale de pentobarbital sodique (100mg/kg) par voie intrapéritonéale. Afin de fixer les tissus

cérébraux, on réalise une perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde à 4 % (tampon phosphate 0.1 M, pH 7.4, 4°C) pendant 7 min. Après la perfusion, le cerveau de la souris est prélevé, puis post-fixé dans une solution identique de paraformaldéhyde pendant 4 h, avant d'être cyoprotégé en le plaçant pendant 48 h dans une solution de D-saccharose à 20 % (dans un tampon phosphate, 0.1 M, pH 7.4, 4°C). Par la suite, les cerveaux sont congelés dans une solution d'isopentane refroidie avec de la carboglace à -40°C, puis ils sont conservés dans un congélateur à 80 °C.

Des coupes frontales de 40 µm d'épaisseur sont effectuées du cortex préfrontal jusqu'à la fin du CE à l'aide d'un microtome placé dans un cryostat à -20°C. Les coupes destinées aux colorations au violet de crésyl, à la thioflavine-S et à l'enzymohistochimie de l'AChE sont montées sur lames gélatinées. Les coupes destinées aux immunohistochimies de la ChAT et avec du BAM-10 sont mises dans des puits contenant une solution de cryoprotection et conservées à -20°C.

4.2. Coloration au violet de crésyl

Le violet de crésyl colore essentiellement les composés acides des cellules (les protéines acides des ribosomes et le noyau). Cette coloration est réalisée principalement dans le but de vérifier l'étendue des lésions du CE et la spécificité de celles-ci. Après trois bains de rinçage à l'eau distillée, les coupes sont plongées dans un bain de violet de crésyl chauffé à 50 °C. Les coupes sont rincées dans l'eau distillée, suivie d'une différenciation dans une solution d'alcool-acide, puis d'une déshydratation par des bains d'alcool de concentration croissante. Les lames sont ensuite montées sous lamelle dans un milieu d'inclusion (Eukitt) avant observation au microscope optique afin de déterminer la localisation et l'étendue des lésions. Cette analyse histologique permet d'éliminer les souris présentant une lésion insuffisante du

CE ou une lésion trop étendue endommageant d'autres structures ou encore une lésion mal localisée.

4.3. Enzymohistochimie de l'AChE

L'AChE est l'enzyme de dégradation de l'ACh. La révélation de son activité sur des coupes de cerveau est réalisée principalement afin de marquer les terminaisons cholinergiques. La révélation se déroule en deux étapes. Les coupes sont tout d'abord rincées à l'eau distillée, puis incubées pendant 15 à 18 h dans une solution mère composée de glycine, de sulfate de cuivre et d'acétate de sodium qui constitue un substrat pour l'AChE. Au cours de la deuxième phase, les coupes sont plongées dans une solution de sulfure de sodium (8 mM) pour révéler en brun le produit de la réaction, avant d'être rincées, déshydratées dans des bains d'alcool de concentration croissante, et montées sous lamelle dans de l'Eukitt. Puis, on fait une mesure de la densité optique (DO). La DO est mesurée à l'aide d'un système d'analyse d'image assisté par ordinateur (SAMBA Technologies, France). Elle est mesurée sur des images digitalisées, en délimitant la structure étudiée. La mesure du bruit de fond de la lame est directement soustraite de l'image à analyser. Puis, sur chaque coupe, la mesure de la DO de la partie centrale du corps calleux, une région cérébrale dépourvue de fibres AChE-positives, est soustraite des mesures effectuées sur les structures cérébrales d'intérêt.

4.4. Marquage immunohistochimique : anti-ChAT et anti-A β (BAM-10)

Le marquage de la ChAT, enzyme de synthèse de l'ACh, est utilisé pour visualiser les neurones cholinergiques dans les structures de la BCA (SM, BDB, NBM). Le marquage BAM-10 servira à visualiser les dépôts diffus dans les différentes structures cérébrales.

Les coupes recueillies dans des puits sont rincées 3 fois pendant 10 min dans du PBS (0.1M, pH 7.4) avant d'être incubées pendant 1h dans du sérum d'âne à 5 % (BioWest, Nuaille, pH 7.4) avec du PBS contenant 0,5 % de triton X-100. Les coupes sont ensuite transférées dans

la solution contenant l'anticorps primaire, un anticorps polyclonal de chèvre dirigé contre la ChAT (1:500 ; Chemicon international, AB1778, Temecula, CA) ou un anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'A β humaine, le BAM-10 (1:1000 ; Sigma-Aldrich ; A3981 ; L'Isle D'Abeau Chesnes ; France). Les coupes sont ensuite incubées durant 18h, rincées 3 fois dans du PBS, puis incubées pendant 1h dans une solution d'anticorps biotinylé d'âne anti-chèvre (1 :500 ; Chemicon International, AP180B, Temecula, CA). Après 3 rinçages successifs des coupes dans du PBS, elles sont incubées pendant 45 min dans une solution contenant le complexe avidine-biotine-péroxydase (Vectastain Elite ABC ; Vector Laboratories International, Burlingame, USA). Les coupes sont par la suite rincées deux fois dans du PBS, puis une fois dans une solution contenant 0,6 % de tampon TRIS (PH 7,6). Elles sont enfin exposées à un mélange de DAB et d'H₂O₂ (Peroxidase Substrate Kit DAB, Vector laboratories, Burlingame, CA) jusqu'à obtenir un bon rapport marquage/bruit de fond. La réaction est stoppée par deux rinçages au PBS. Les coupes sont montées sur des lames gélatinées et mises à l'étuve (37°C). Finalement, on les monte sous lamelle dans un milieu d'inclusion (Eukitt).

4.4.a Comptage des neurones dans le SM et le NBM

Le comptage des neurones cholinergiques au niveau du SM et du NBM a été effectué aux coordonnées Bregma +1,0 \pm 0,3 mm pour le SM, et Bregma -6,0 \pm 0,3 mm pour le NBM (adapté de Moreau et coll., 2008). Le comptage des neurones a été réalisé sur 2 à 3 coupes frontales à l'aide du logiciel ImageJ (NIH), après quoi les valeurs ont été moyennées.

4.4.b. Comptage des dépôts amyloïdes (diffus)

Parce que les dépôts diffus présentent une délimitation assez irrégulière et une grande variabilité en taille, on a choisi de déterminer la surface occupée par les dépôts par rapport à

la surface totale de la structure étudiée (souvent qualifié de charge amyloïde ou *amyloid burden*). L'analyseur d'image (Mercator ; Explora Nova, France) nous permet de déterminer la surface occupée par les dépôts, ainsi que leur nombre, et la taille de la structure en terme de surface (μm). La détermination du pourcentage a été réalisée sur 3 à 4 coupes frontales pour chaque structure, après quoi les valeurs ont été moyennées.

4.6. Coloration à la thioflavine S

La thioflavine S est un fluorochrome qui possède la propriété de se lier à des structures β -plissées, telles que des dépôts amyloïdes, et de lui conférer une fluorescence par microscopie en lumière ultra-violette. Dans les conditions présentes, le marquage est spécifique pour les dépôts amyloïdes de type plaque sénile. Les lames sont d'abord rincées une fois dans l'eau distillée avant d'être baignées dans une solution de thioflavine S 1% (Sigma-Aldrich ; T1892 ; L'Isle D'Abeau Chesnes ; France) pendant 8 min à température ambiante. Les coupes sont ensuite rincées dans l'eau distillée, puis elles sont plongées dans de l'alcool à 80%. Après plusieurs lavages successifs dans l'eau, les lames sont montées sous lamelle dans un milieu de montage Vectashield Hard Set (Vector laboratories, Burlingame, CA).

4.6.a. Comptage des plaques séniles

Le comptage des plaques séniles a été réalisé sur 3 à 4 coupes frontales pour chaque structure, après quoi les valeurs ont été moyennées. On a utilisé le logiciel ImageJ (NIH) pour le comptage des plaques séniles.

5. Génotypage de la mutation *rd*

5.1. Principe de la PCR

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est une méthode qui permet de sélectionner un fragment d'ADN à partir d'un génome complexe et de réaliser une amplification enzymatique *in vitro* de celui-ci.

Il s'agit d'une technique d'amplification d'un segment d'ADN compris entre 2 régions de séquences connues. Cette technique utilise une des propriétés des ADN polymérases qui est de ne pouvoir synthétiser le brin complémentaire d'une séquence qu'à partir d'un couple d'amorce correspondant à une séquence d'oligonucléotides.

Un cycle de PCR est composé de trois étapes : une séparation des brins d'ADN, une hybridation des amorces et enfin une élongation par une ADN polymérase. La répétition des cycles aboutit à une amplification exponentielle de la séquence cible.

5.2. Protocole

Dans notre expérience, nous avons utilisé deux paires d'amorces : RD3/RD4 pour amplifier la forme mutée de l'allèle (Pdeb), et RD3/RD6 pour amplifier la forme sauvage de l'allèle (RD3: 5'-TGACAATTACTCCTTTTCCCTCAGTCTG-3' ;RD4: 5'-GTAAACAGCAAG AGGCTTTATTGGGAAC-3';RD6 :5'-TACCCACCCTTCCTAATTTTTCTCAGCC-3' (Giménez et Montliu, 2001). La préparation de l'ADN est réalisée par l'incubation pendant 12 heures à 55°C de la queue d'une souris dans une solution du directPCR (101-T, Euromedex, France) contenant de la protéinase K (09-0911, Euromedex, France) diluée à 0.5 µg/µl dans un tube Eppendorf. Ensuite, avant le test, les tubes sont incubés à 85°C pendant 85 minutes pour désactiver la protéinase K, puis les tubes sont vortexés et centrifugés. Dans un microtube de PCR on place :

5 µl de Taq polymérase (Taq Master-Jena Bioscience)

1 µl de produit de PCR

1 µl d'amorce (RD3/RD4 ou RD3/RD6)

17 µl eau distillé (qsp 25 µl)

Le mélange est mis dans un thermocycleur Biorad programmé en fonction des amorces :

- dénaturation (94°C, 30 secondes)
 - hybridation (65°C, 30 secondes)
 - élongation (72°C, 2 minutes)
- } 45 cycles

Ensuite, on fait migrer l'ADN amplifié sur un gel d'agarose contenant le bromure d'éthidium (BET-intercalant) plongé dans un tampon et soumis à un champ électrique (100V). Après migration, le gel est placé dans un appareil (Biorad-EZ system) qui envoie un rayonnement ultra-violet qui rend l'ADN fluorescent.

6. Analyses statistiques

L'ensemble des données a été traité à l'aide d'une analyse de la variance (ANOVA) à un ou plusieurs facteurs, ou d'une ANOVA à mesures répétées en fonction du plan expérimental. L'Anova est suivie par un test de comparaisons multiples (Newman-Keuls). Les données obtenues dans le test de rétention de la piscine de Morris ont été analysées à l'aide d'un test (t) de Student.

Chapitre 1 : Phénotypage des souris *wilt type* (WT)

1. Introduction

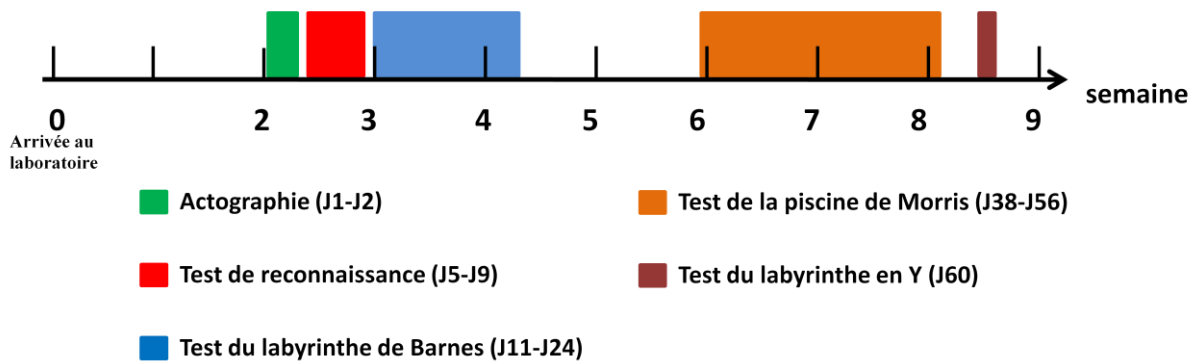
Cette partie de mon travail de thèse a eu pour but d'étudier les performances des souris wt de fond génétique B6;SJL, soit le même fond que celui de la souris transgénique tg2576, dans une batterie de tests de mémoires. Le but était de sélectionner les tests les plus reproductibles pour, dans une autre expérience, mettre en évidence les déficits de mémoire des souris tg2576 (chapitre 2). Dans ce but, nous avons intégré dans la batterie de tests un certain nombre de tâches dans lesquelles les souris tg 2576 ont été décrites comme déficitaires. Les premiers tests utilisés dans l'article princeps de Hsiao et collaborateurs (1996) sont la tâche de navigation spatiale dans la piscine et la tâche d'alternance spontanée dans le labyrinthe en Y. Des déficits de mémoire spatiale ont également été décrits dans la tâche de navigation spatiale dans le labyrinthe de Barnes (King et coll., 1999 ; Pompl et coll., 1999 ; Arendash et King, 2002). Néanmoins, les résultats obtenus dans ces trois tests ne sont pas toujours cohérents d'un laboratoire à un autre, voire au sein d'une même étude (Holcomb et coll., 1999; King et coll., 1999; Arendash et King, 2002; Deacon et coll., 2008; Stewart et coll., 2011). En revanche, plusieurs laboratoires ont montré de façon beaucoup plus reproductible une perturbation de la détection d'une nouveauté spatiale et une préservation de la reconnaissance d'objet dans un paradigme d'exploration d'objets (Ognibene et coll., 2005; Hale et Good, 2005; Good et coll., 2007). Nous avons donc sélectionné ces quatre tests dans notre batterie de phénotypage des souris wt. Nous avons ajouté une séance d'actographie, car une hyperactivité locomotrice a souvent été décrite chez les souris tg2576 (Ognibene et coll., 2005; Gil-Bea et coll., 2007).

Par ailleurs, cette lignée possède une mutation de dégénérescence rétinienne (*rd*) qui induit une cécité. La dégénérescence rétinienne est due à une mutation autosomique récessive sur le

gène codant pour la sous unité β de la PDE-GMPc (phosphodiesterase-adénosine monophosphate cyclique) dépendante. Cette mutation induit une augmentation anormale du GMPc, qui inhibe la cascade de la phototransduction. Toutes les cellules à bâtonnet dégénèrent rapidement chez les souris, alors que les cellules à cône dégénèrent plus lentement et, à l'âge de 18 mois, il ne reste plus que 5 % de la population initiale (Pittler et Baehr, 1991 ; Ogilvie et coll., 2002). Le problème de reproductibilité de la mise en évidence de déficits mnésiques dans certaines tâches pourrait être lié à la présence de cette mutation dans le fond génétique B6;SJL des souris tg2576. En effet, les souris consanguines homozygotes pour la mutation *rd*, telles que la lignée SJL, ont de très mauvaises performances dans des tests d'acuité visuelle et ne montrent aucun signe d'apprentissage dans la tâche de mémoire spatiale dans la piscine de Morris (Wong et Brown, 2006 ; Brown et Wong, 2007). De plus, Garcia et ses collaborateurs (2003) ont montré que les souris tg2576 et leur wt homozygotes pour *rd* ne parviennent pas à améliorer leur performances dans cette tâche et sont même déficitaires dans la version de la tâche où la plateforme est pourtant visible. Lorsque nous avons commencé le phénotypage des souris wt, nous n'avions pas connaissance de ce problème de cécité dans la lignée tg 2576. C'est pourquoi nous avons intégré les tâches de piscine dans notre batterie de test. Comme les performances de nos souris wt étaient particulièrement mauvaises, nous avons recherché la cause possible de ce déficit dans la littérature consacrée à cette lignée. C'est l'article de Garcia et ses collaborateurs (2003) qui nous a convaincu qu'une partie de la population était vraisemblablement homozygote pour *rd*, donc aveugle, et qu'il fallait procéder au génotypage de nos cohortes pour cette mutation. Ce génotypage a été réalisé par nos collaborateurs, A. Marti et C. Dorner-Ciossek (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co, Allemagne). Les données ont donc été ré-analysées *a posteriori* en fonction du résultat de ce génotypage en différenciant les souris voyantes et les souris mal-voyantes ou aveugles. Dans ce travail, je représente les souris

homozygotes pour la mutation *rd* par (*rd/rd*) et les souris hétérozygotes ou sauvages par (+/+, +/*rd*). Nous avons choisi de faire ce phénotypage sur des souris femelles pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la pathologie Alzheimer est plus précoce et marquée chez les femelles de cette lignée. De plus, nous espérions pouvoir les garder groupées pour éviter l'isolement social dès que les protocoles expérimentaux le permettraient. Certains travaux suggéraient que le regroupement serait plus facile chez les femelles que chez les mâles de lignée SJL, car ces derniers sont très agressifs (Page et Glenner, 1972). Malheureusement, nous avons constaté que les femelles étaient malgré tout plus agressives que la normale (expérience personnelle sur d'autres lignées) et nous les avons rapidement séparées (quelques jours après l'arrivée des premières wt et dès l'arrivée pour les cohortes suivantes). Les trois âges des cohortes de wt testées dans ce travail ont été sélectionnés sur la base du décours temporel de la pathologie amyloïde, dont on sait que les premiers signes apparaissent vers 9 mois chez les souris tg2576. A 11 mois, les souris tg2576 présentent un développement modéré des plaques, voire encore sporadique. A 17 mois, ces plaques sont nombreuses, alors qu'à 21 mois la charge amyloïde est très sévère. Les résultats de ce phénotypage des souris wt pouvait encore moduler notre choix sur les périodes de tests comportementaux des cohortes de tg2576 suivantes, déjà réservées pour leur phénotypage auprès de nos collaborateurs (Boehringer Ingelheim, Allemagne).

Trois cohortes de souris femelles wt âgées de 11, 17 et 21 mois (âge au premier test) ont été testées selon le protocole expérimental décrit schématiquement ci-dessous :



Le génotypage a montré que la grande majorité des souris étaient homozygotes pour la mutation *rd* (*rd/rd*). Le tableau ci-dessous représente l'effectif des souris dans chaque test, avec le nombre de souris qui ne sont pas affectées par la mutation. Comme nous avons une très grosse majorité de souris mal-voyantes (parfois une par groupe d'âge), nous n'avons pas pu analyser le facteur Age et le facteur *rd* dans la même analyse. Nous avons opté pour une autre stratégie qui est d'analyser d'abord le facteur Age, puis le facteur *rd* séparément sur l'ensemble de la population à la condition qu'il n'y ait pas d'effet significatif de l'âge.

Génotype	Age (mois)	Actographie	RS/RO	Barnes	Piscine de Morris	Y-maze
wt	11	10 (1)	12 (2)	9 (2)	9 (1)	11 (2)
	17	9 (3)	10 (3)	9 (3)	7 (2)	10 (3)
	21	9 (1)	10 (1)	10 (1)	7 (1)	10 (1)

Tableau1. Tableau représentant les effectifs des wt dans chacun des tests avec le nombre de souris voyantes, donc sauvages ou hétérozygotes pour la mutation *rd* (+/, +/*rd*), entre parenthèse. La variation du nombre de souris dans les tests est due à l'élimination des souris qui ne pouvaient pas réaliser la tâche : dans l'actographie, les souris qui font des stéréotypies sont éliminées (3), dans le Barnes les souris qui sautent de la plateforme sont éliminées (3), dans la Piscine, celles qui n'arrivent pas à nager sont éliminées (8).

2. Résultats

1. Actographie

1.1. Habituation

Effet de l'âge. Les souris montrent une habituation au nouveau contexte sur les trois premières heures de la séance d'actographie (Figure 17A). En effet, on observe une diminution progressive de l'activité locomotrice en fonction du temps (Effet Heure : $F_{2,27}=20,20$, $P < 0,001$). Il n'y avait pas d'effet de l'âge sur l'évolution de l'activité (Heure x Age : $F_{4,54}=0,79$, $P=0,53$).

Effet de *rd*. Puisqu'il n'y a pas d'effet de l'âge, les trois groupes ont été regroupés pour évaluer l'effet de la mutation *rd*. Les souris (*rd/rd*) et les souris voyantes ont une activité locomotrice similaire durant les trois heures d'habituation (figure 17B). Il n'y avait pas d'effet de la mutation *rd* sur cette phase d'habituation (Effet *rd* : $F_{1,24}=0.0003$, $P = 0,95$; Heure x *rd* : $F_{2,48}=0,007$, $P=0,99$).

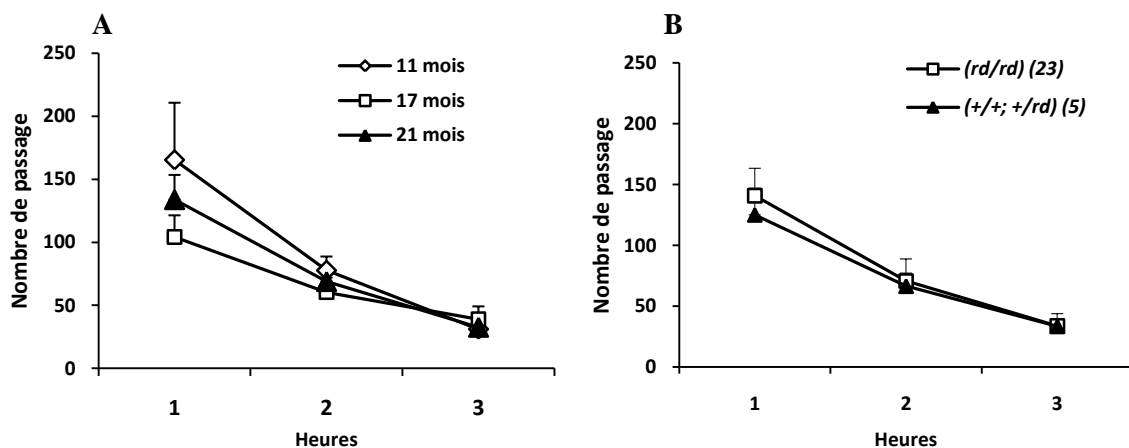


Figure 17. Activité locomotrice chez les souris wt durant les trois heures d'habituation de la séance d'actographie. Les graphiques représentent les moyennes du nombre de passages d'un bout à l'autre de la cage (+ erreur type) en fonction de l'âge (A) et du génotype *rd* (B). Les effectifs pour les génotypes (*rd/rd*) et (+/+ ; +/*rd*) sont indiqués entre parenthèses.

1.2. Activité locomotrice de base

Effet de l'âge. Sur les 21 dernières heures de la séance d'actographie, l'activité locomotrice des trois groupes de souris évolue de façon comparable selon un cycle nyctéméral classique avec une activité plus importante pendant la phase nocturne. J'ai donc représenté l'activité locomotrice moyenne pendant les périodes diurne et nocturne du nyctémère pour simplifier la présentation et l'analyse des données.

Il y a une forte variation d'activité locomotrice pour l'ensemble des souris entre les deux périodes (figure 18A). L'activité des souris en période nocturne est significativement plus importante que leur activité en période diurne (Effet Période : $F_{1,25}=34,55$, $P < 0,001$). Le groupe de 17 mois semble plus actif, notamment pendant la période nocturne, mais il n'y a pas d'effet global de l'âge (effet Age : $F_{2,25}=0,42$, $P=0,7$), ni d'interaction entre le facteur Période et le facteur Age ($F_{2,25}=1,3$, $P=0,29$).

Effet *rd*. Puisque il n'y a pas d'effet de l'âge, les 3 groupes ont été regroupés pour évaluer l'effet de la mutation *rd* sur l'activité locomotrice de base. Les souris mal-voyantes semblent être plus actives que les souris voyantes pendant la période nocturne, mais cet effet est loin d'atteindre le seuil de significativité (Figure 18B).

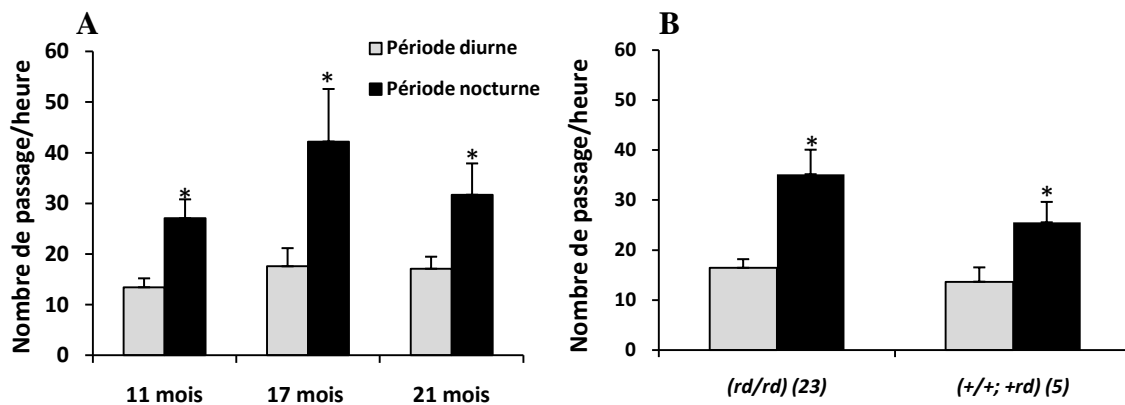


Figure 18. Activité locomotrice de base au cours des dernières 21 h de la séance d'actographie chez les souris wt. Les graphiques représentent les moyennes (\pm Erreur type) du nombre de passages en périodes diurne et nocturne obtenues par les différents groupes d'âge (A) et en fonction de la mutation *rd* (B). Les effectifs pour les génotypes (*rd/rd*) et (*+/+ ; +/rd*) sont indiqués entre parenthèses. (* : $P \leq 0,05$, significativement différent de la phase diurne).

2. Tests d'exploration d'objets

2.1. Reconnaissance spatiale

Effet de l'âge. Au cours de la séance d'acquisition de la configuration spatiale, les souris explorent autant l'objet qui sera déplacé que les objets qui ne le seront pas. Il n'y a donc pas de biais de préférence spontanée (Effet Objet : $F_{1,29}=1,20$, $P=0,30$). La quantité globale d'exploration ne diffère pas significativement entre les 3 groupes d'âge (Effet Age : $F_{2,29}=0,34$, $P=0,34$).

Au cours des 10 minutes de la séance de rétention (figure 19), l'ensemble des souris explore plus l'objet déplacé que les deux objets non déplacés (effet Objet : $F_{1,29}=61,4$, $P < 0,001$, figure 19A). Il n'y a pas d'effet de l'âge, ni aucune interaction entre les performances de détection de nouveauté spatiale et l'âge (Age x Objet : $F_{2,29}=1,09$, $P=0,34$).

Effet *rd*. Puisqu'il n'y a pas d'effet de l'âge, les trois groupes ont été regroupés pour évaluer l'effet de la mutation *rd* sur la performance des souris dans cette tâche. A notre grand étonnement, tous les groupes montrent une bonne performance dans ce test, quel que soit le

statut de la mutation (figure 19B). En effet, il n'y a pas d'effet de la mutation *rd* sur l'ensemble des explorations et sur les performances de détection de la nouveauté spatiale (effet *rd* : $F_{1,26}=0,07$, $P=0,93$; Objet x *rd* : $F_{1,26}=0,05$, $P=0,94$).

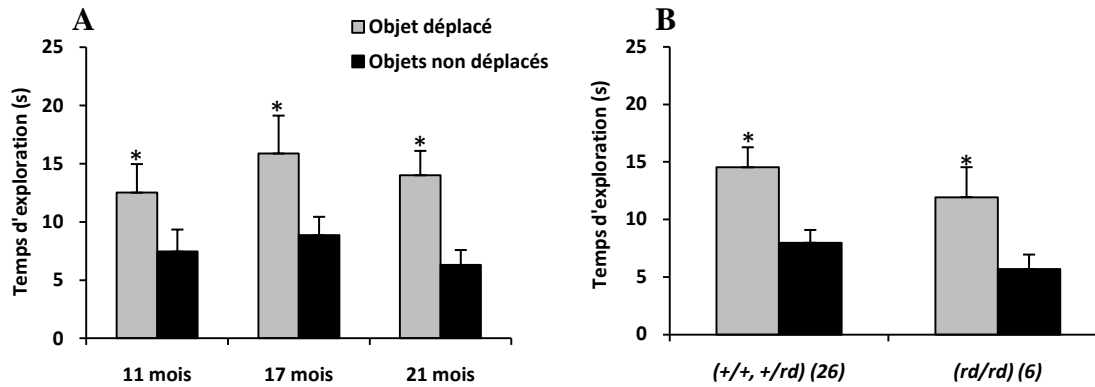


Figure 19. Performances de détection de la nouveauté spatiale chez les souris wt. Les graphiques représentent les moyennes (+ erreur type) des durées d'exploration en secondes pour les différents groupes d'âge (A), et en fonction de la mutation *rd*. Les effectifs pour les génotypes (*rd/rd*) et (+/+ ; +/*rd*) sont indiqués entre parenthèses. (* : $P \leq 0,05$, significativement différent des objets non déplacés).

2.2 Reconnaissance d'objet

Effet de l'âge. Au cours de ce test, globalement, tous les groupes ont de bonnes performances de reconnaissance d'objet. En effet, l'ensemble des souris explore plus le nouvel objet que les deux objets familiers (effet Objet : $F_{1,30}=23,1$, $P < 0,001$; Figure 20A). Il n'y a pas d'effet de l'âge, ni d'interaction entre les performances de reconnaissance et l'âge (Age x Object : $F_{1,26}=0,14$, $P=0,86$).

Effet *rd*. Puisqu'il n'y a pas d'effet de l'âge, les trois groupes ont été regroupés pour analyser l'impact de la mutation *rd* sur les performances de reconnaissance d'objet. Une fois de plus, la performance n'est pas affectée significativement par la mutation *rd* (effet *rd* ($F_{1,26}=0,3$, $P=0,5$; *rd* x Object : $F_{1,26}=0,14$, $P=0,8$; figure 20B).

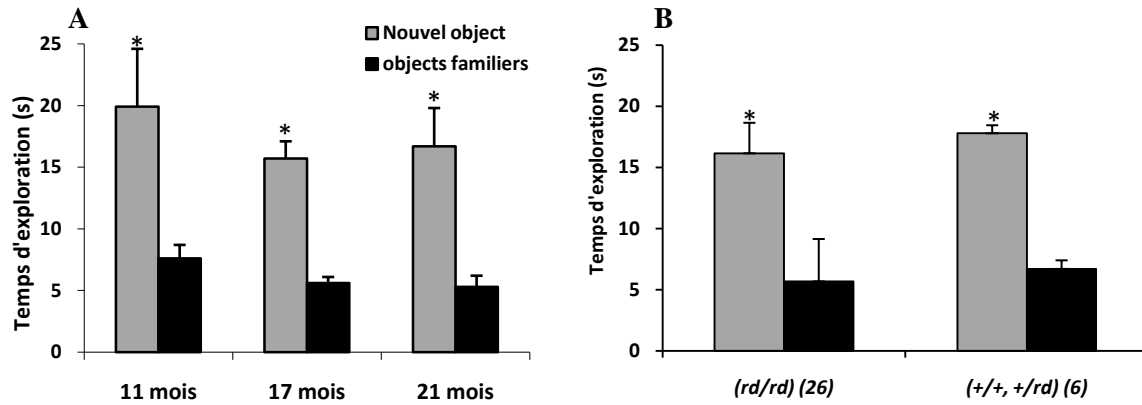


Figure 20. Performances de reconnaissance d'objet chez les souris wt. Les graphiques représentent les moyennes (\pm erreur type) des durées d'exploration en secondes dans les différents groupes d'âge (A) et en fonction de la mutation *rd* (B). Les effectifs pour les génotypes (*rd/rd*) et (*+/+ ; +/rd*) sont indiqués entre parenthèses. (* : $P \leq 0,05$, significativement différent de l'objet non déplacés).

3. Tâche de mémoire spatiale dans le labyrinthe de Barnes

3.1. Erreurs de mémoire de référence

Effet de l'âge.

Acquisition : Une "erreur de mémoire de référence" est définie comme la visite d'un trou qui n'est pas le trou-cible. Nous avons analysé les données en termes de nombre de trou incorrects visités au cours de la tâche. Au premier jour d'acquisition, tous les groupes semblent apprendre la tâche, car leur nombre d'erreurs diminue au cours de 6 essais (effet Essai : $F_{5,125}=20,5$, $p<0,001$). Il n'y a pas d'effet global de l'âge (effet Age : $F_{2,22}=1,9$, $P=0,2$), ni d'influence de l'âge sur les performances d'acquisition pendant ce premier jour (Essai x Age : $F_{10,125}=0,67$, $p=0,74$).

En comparant la moyenne des performances du jour 1 à celle du jour 2, les souris ont amélioré significativement leurs performances (effet Jour : $F_{1,22}=35,1$, $P=0,001$). Celles-ci ne sont globalement pas affectées par l'âge (Effet Age : $F_{2,22}=1,6$, $P=0,23$) et les 3 groupes d'âge

montrent une évolution des performances similaires sur les deux premiers jours d'acquisition (Jour X Age : $F_{2,25}=0,88$, $P=0,88$; figure 21A).

Inversion de consigne (*reversal*) : le trou qui mène à la cage est positionné à l'opposé du trou initial. Ce changement perturbe les performances des souris entre le jour 2 et le jour 3 (Effet Jour : $F_{1,25}=12,4$, $P=0,002$). Il n'y a aucun effet de l'âge sur l'ensemble des performances et, même si le groupe de 11 mois semble plus affecté que les autres groupes par le *reversal*, il n'y a aucune interaction significative avec le facteur âge (effet Age : $F_{2,25}=0,89$, $P=0,42$; Age X Jour : $F_{2,25}=0,59$, $P=0,96$). Au cours des 4 jours d'entraînement (J3 à J6) sur la nouvelle position du trou cible, les souris des trois groupes d'âge améliorent très nettement leurs performances jusqu'à atteindre un bon niveau de 2-3 erreurs de mémoire de référence (effet Jour : $F_{3,75}=7,34$, $P < 0,001$). Aucun effet de l'âge et aucune interaction avec ce facteur n'est observé dans cette phase du test (effet Age : $F_{2,25}=0,4$, $P=0,7$; Age X Jour : $F_{6,75}=1,74$, $P=0,12$).

Effet de *rd* : Puisqu'il n'y a pas d'effet de l'âge, les trois groupes ont été regroupés pour évaluer l'effet de la mutation *rd* sur le nombre d'erreurs de mémoire de référence.

Acquisition. Au cours du premier jour, il n'y a pas de différence de performance sur les 6 essais entre les souris (*rd/rd*) et les souris voyantes (Essai X *rd* : $F_{5,130}=0,71$, $P=0,41$). Au cours des deux premiers jours d'acquisition les souris (*rd/rd*) et les souris voyantes montrent une performance moyenne similaire (figure 21B), il n'y a pas d'effet de la mutation *rd* et aucune interaction avec ce facteur (effet *rd* : $F_{1,26}=0,71$, $P=0,4$; *rd* X Jour : $F_{1,26}=0,5$, $P=0,5$).

Reversal : Entre le jour 2 et le jour 3, l'effet de *reversal* semble un peu plus marqué chez les souris (*rd/rd*) sans que cette différence ne soit significative (effet *rd* : $F_{1,26}=0,24$, $P=0,11$; *rd* X Jour : $F_{1,26}=1,5$, $P=0,2$). Au cours de quatre jours de *reversal*, l'évolution des performances

des souris (*rd/rd*) en termes d'erreurs est comparable à celle des souris voyantes (effet *rd* : $F_{1,26}=2$, $P=0,17$, *rd* X Jour : $F_{3,78}=3,4$, $P=0,64$).

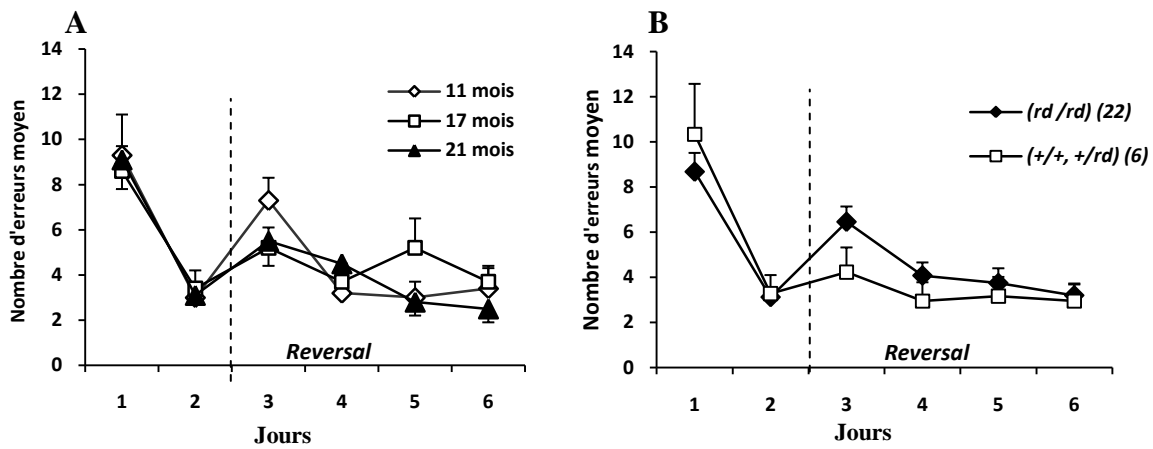


Figure 21. Performances de mémoire de référence des wt au cours de l'acquisition et du *reversal* dans le labyrinthe de Barnes. Les graphiques représentent les moyennes (+ erreurs type) des nombres d'erreurs de mémoire de référence en fonction des jours pour les trois groupes d'âge (A) et en fonction de la mutation *rd* (B). Les effectifs pour les génotypes (*rd/rd*) et (+/+ ; +/*rd*) sont indiqués entre parenthèses.

3.2. Latence d'entrée dans le trou cible

D'une façon générale, les effets de l'âge et de la mutation *rd* sur les données obtenues en termes de latence sont comparables à ceux que l'on a pu observer ci-dessus sur les données obtenues en termes d'erreurs. Néanmoins, nous tenons à montrer l'ensemble des données (latences et erreurs) car l'absence d'effet de la mutation *rd* dans cette tâche de mémoire spatiale est très surprenante.

Effet de l'âge.

Acquisition : Pendant le premier jour d'acquisition, les groupes améliorent leurs performances en terme de latence d'entrée dans le trou cible au cours de 6 essais (Effet Essai : $F_{5,125}=23,1$, $P < 0,001$). Il n'y a pas d'effet de l'âge ou d'interaction avec ce facteur (figure 22A).

En comparant la moyenne des performances du jour 1 à celle du jour 2, nous montrons que les souris ont amélioré significativement leurs performances (effet Jour : $F_{1,25}=8,32$, $P=0,007$), et ceci sans effet significatif de l'âge et sans interaction avec ce facteur (effet Age : $F_{2,25}=0,9$, $P=0,4$; Essai x Age : $F_{2,25}=0,6$, $P=0,6$).

Reversal: Globalement, le changement de la position du trou cible ne perturbe pas les performances des souris entre le jour 2 et le jour 3 (effet Jour : $F_{1,25}=1,1$, $P=0,32$; Figure 22B). Le groupe de 11 mois est le seul groupe dont la performance semble affectée par le *reversal*, mais aucun effet de l'âge ni aucune interaction avec ce facteur ne ressortent des analyses (Age x Jour : $F_{10,125}=1,12$, $P=0,34$).

Au cours des 4 jours d'entraînement (J3 à J6) sur la nouvelle position du trou cible, les souris des trois groupes d'âge améliorent très nettement leurs performances en termes de latence d'entrée dans le trou-cible (Jour : $F_{3,75}=6,8$, $P < 0,001$; Voir figure 22A). Aucun effet de l'âge et aucune interaction avec ce facteur ne sont observés dans cette phase du test (Age : $F_{2,25}=1,3$, $P=0,3$; Age X Jour : $F_{6,75}=1,74$, $P=0,64$).

Effet *rd*. Puisqu'il n'y a aucun effet de l'âge, les 3 groupes ont été regroupés pour évaluer l'effet de la mutation *rd*.

Acquisition : au cours du premier jour, il n'y a pas de différence de performances sur les 6 essais entre les souris (*rd/rd*) et les souris voyantes (Essai X *rd* : $F_{5,130}=0,48$, $P=0,78$). Au jour 2, les souris (*rd/rd*) semblent mettre plus de temps que les souris voyantes pour entrer dans le trou-cible, mais cet effet n'est pas significatif (effet *rd* : $F_{1,25}=0,17$, $P=0,7$; *Rd* X Jour : $F_{1,25}=1,1$; $P=0,3$, figure 22B).

Reversal : entre les jours 2 et 3, les souris (*rd/rd*) et les souris voyantes ne sont pas affectées par le *reversal* ($F_{1,26}=2$, $P=0,2$). Néanmoins, il y a une petite tendance non significative pour un effet modeste de la mutation *rd* sur l'ensemble des deux jours (effet *rd* : $F_{1,26}=2,6$, $P=0,1$).

Au cours des 4 jours d'entraînement (J3 à J6) sur la nouvelle position du trou-cible, les souris (*rd/rd*) sont à peu près aussi rapides que les souris voyantes pour atteindre le trou cible (Jour X *rd* : $F_{3,75}=0,6$, $P=0,61$).

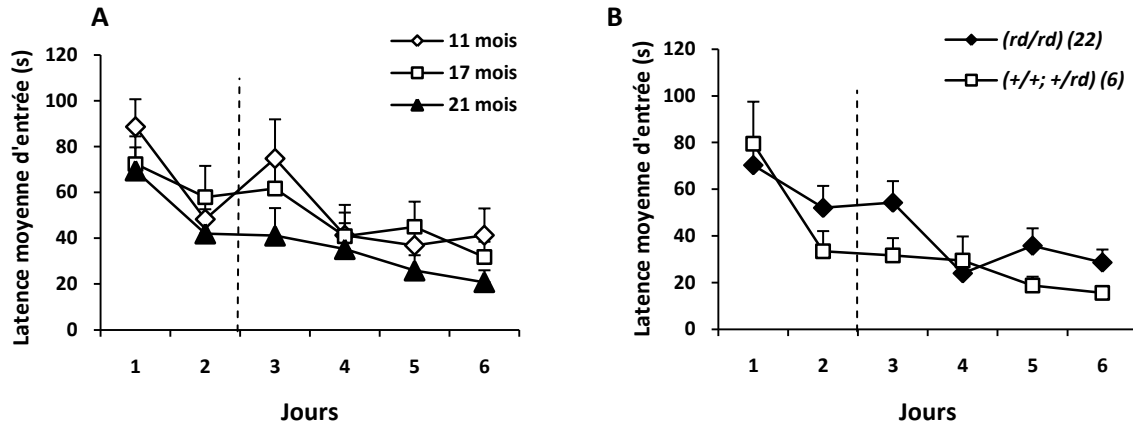


Figure 22. Temps mis pour réussir la tâche chez les wt au cours de l'acquisition et du *reversal* dans le labyrinthe de Barnes. Les graphiques représentent les moyennes (+ erreurs type) de latence d'entrée dans le trou cible pour les trois groupes d'âge (A) et (B) en fonction de la mutation *rd* (B). Les effectifs pour les génotypes (*rd/rd*) et (*+/+ ; +/rd*) sont indiqués entre parenthèses.

3.3. Tests de rétention

Le premier test de rétention (*probe 1*) a lieu au jour 2, avant les trois essais d'acquisition. Parce que le nombre de visites totale diffère entre les groupes dans les deux *probes* (5.7 ± 0.8 pour le groupe de 11 mois, 6.9 ± 0.6 pour le groupe de 17 mois, et 8.4 ± 0.9 pour le groupe de 21 mois dans le *probe 1* ; 9.2 ± 1.3 pour le groupe de 11 mois, 8.3 ± 0.6 pour le groupe de 17 mois, et 11.2 ± 1.2 pour le groupe de 21 mois dans le *probe 2*), j'ai choisi d'analyser les données en fonction d'indice des visites.

Effet de l'âge. La figure 23 présente pour chaque groupe l'indice moyen de visites aux trous cible, opposé et de part et d'autre à 90° au cours du *probe 1*. Globalement, les souris présentent une modeste préférence non significative pour le trou cible (effet Trou : $F_{3,75}=1.67$,

$P=0,18$; figure 23A). Il n'y a pas d'effet de l'âge, ni d'interaction avec ce facteur (effet Age : $F_{1,25}=1,3$, $P=0,3$; Age X trou : $F_{6,75}=0,8$, $P=0,57$).

Effet de *rd*. Comme il n'y a pas d'effet de l'âge, les 3 groupes ont été regroupés pour évaluer l'effet de la mutation *rd* sur la performance des souris. Les souris voyantes semblent montrer une préférence plus marquée pour le trou cible que les souris (*rd/rd*) (figure 23B). Néanmoins, il n'y a pas d'effet significatif de la mutation *rd* sur les performances globale de visites aux quatre trous et sur leur préférence pour le trou cible (effet *rd* : $F_{1,26}=0,3$, $P=0,55$; *rd* X Trou : $F_{3,78}=0,46$, $P=0,70$).

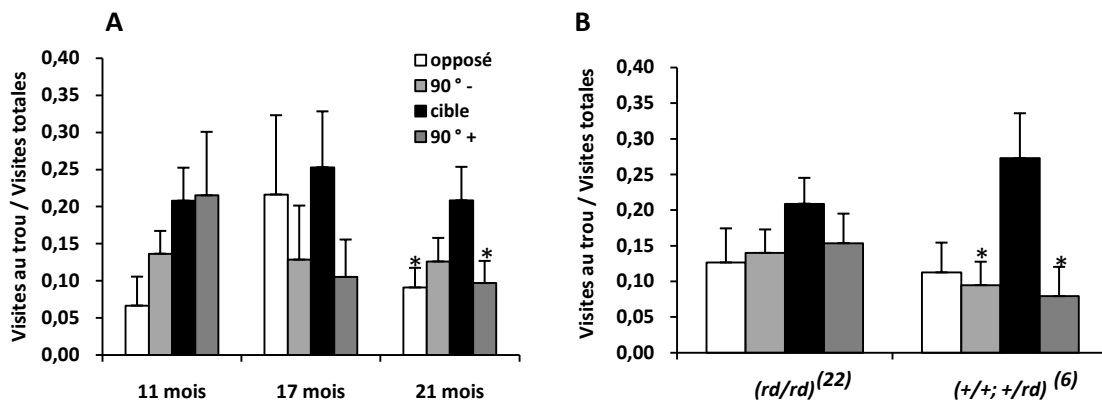


Figure 23. Performance de rétention des wt dans le probe 1 de la tâche du labyrinthe de Barnes 24h après le 1^{er} jour d'acquisition. Les graphiques représentent l'indice des visites (+ erreur type) aux trous cible, opposé et à 90° de part et d'autre en fonction de l'âge (A) et en fonction de la mutation *rd* (B). Les effectifs pour les génotypes (*rd/rd*) et (+/+ ; +/*rd*) sont indiqués entre parenthèses. (* : $P \leq 0,05$, significativement différent du trou-cible)

Le deuxième test de rétention (*probe2* ; figure 24) a lieu 11 jours après la fin du *reversal*.

Effet de l'âge. Les souris présentent globalement une préférence marquée pour le trou cible au cours du probe 2 (effet Trou : $F_{3,66}=8,58$, $P < 0,001$). Les 3 groupes d'âge montrent une bonne performance dans ce deuxième probe (Age X trou : $F_{6,75}=0,92$, $P=0,5$; figure 24A).

Effet de *rd*. Les trois groupes d'âge ont été regroupés pour évaluer l'effet de la mutation *rd* sur la performance des souris (Figure 24B). A notre grand étonnement, les souris voyantes et les souris (*rd/rd*) montrent une bonne performance dans le deuxième probe. Il n'y avait pas d'effet significatif de la mutation *rd* sur la préférence pour le trou cible (*rd* X Trou : $F_{3,78}=0,46$, $P=0,70$).

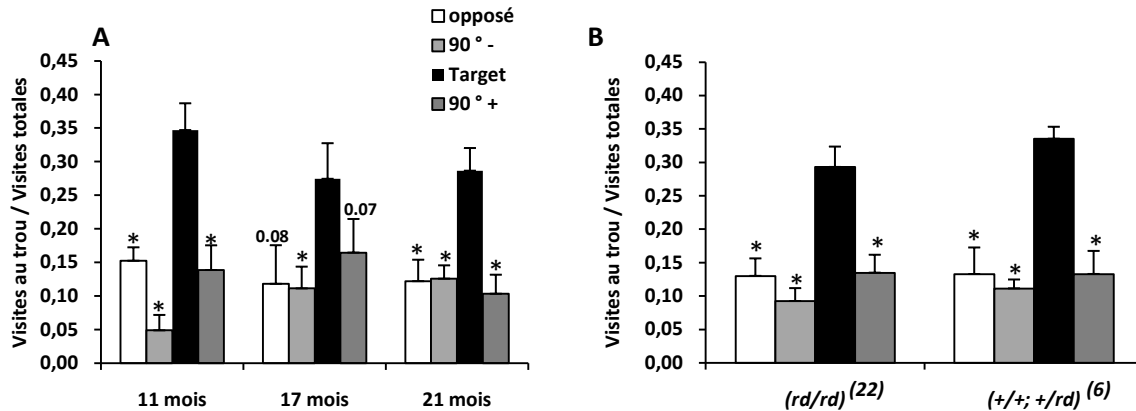


Figure 24. Performances en rétention des wt dans le probe 2 de la tâche du labyrinthe de Barnes (16 jours après le *reversal*). Les graphiques représentent l'indice des visites (+erreur type) au trou cible, et aux trous soit opposé soit à 90° de part et d'autre en fonction de l'âge (A) et en fonction de la mutation *rd* (B). Les effectifs pour les génotypes (*rd/rd*) et (+/+ ; +/rd) sont indiqués entre parenthèses. (* : $P \leq 0,05$, significativement différent du trou-cible)

4. Test de la piscine de Morris

4.1. Distance parcourue

Effet de l'âge.

Acquisition : les souris améliorent leurs performances pendant les 6 jours d'entraînement (effet Jour : $F_{5,100}=7,1$, $P < 0,001$; Figure 25A), sans effet significatif de l'âge (Jour X Age : $F_{10,100}=1,3$, $P=0,24$). Cependant, on n'observe pas d'amélioration notable de performance

malgré l'entraînement quotidien. Globalement, les distances parcourues par les souris restent élevées tout au long du test.

Reversal: Au jour 7, la plate-forme est placée dans le quadrant opposé de l'ancien quadrant cible dans le but d'évaluer la capacité des souris à réapprendre un nouvel emplacement de la plate-forme. Il n'y a pas d'effet de ce changement de localisation de la plateforme entre le jour 6 et le jour 7 chez les 3 groupes d'âges (Effet Jour : $F_{1,20}=0,02$, $P=0,88$; Age X Jour : $F_{2,20}=0,11$, $P=0,89$; Figure 25A). Au cours de ces 3 jours de *reversal*, les souris améliorent significativement leurs performances (Effet Jour : $F_{2,40}=4,8$, $P=0,01$). Cet effet est essentiellement dû à une progression un peu plus marquée des performances du groupe de 11 mois, mais cet effet n'atteint pas tout à fait la significativité (Age X Jour : $F_{4,40}=2,49$, $P=0,057$).

Effet de *rd*. Parmi les 23 souris, il y en a seulement quatre (deux de 17 mois, une de 11 mois et 1 de 21 mois) qui sont hétérozygotes (+/*rd*) ou sauvages (+/+) pour la mutation *rd*. Pendant la phase d'acquisition, ces quatre souris voyantes montrent une très bonne performance, alors que les souris homozygotes (*rd/rd*) n'apprennent pas la tâche (Figure 25B). Il y a un effet global de la mutation *rd* (Effet *rd* : $F_{1,21}=7,7$, $P=0,01$), cependant, l'interaction Jour X *rd* ($F_{5,105}=6,5$, $P=0,1$) n'atteint pas la significativité, probablement parce que ces données ont été obtenues sur très peu d'animaux voyants (4). Au cours des trois jours de *reversal*, il y a également un effet de la mutation *rd* (Effet *rd* : $F_{1,21}=7,22$, $P=0,013$), mais l'interaction Jour X *rd* ($F_{2,42}=0,6$, $P=0,5$) n'atteint pas la significativité.

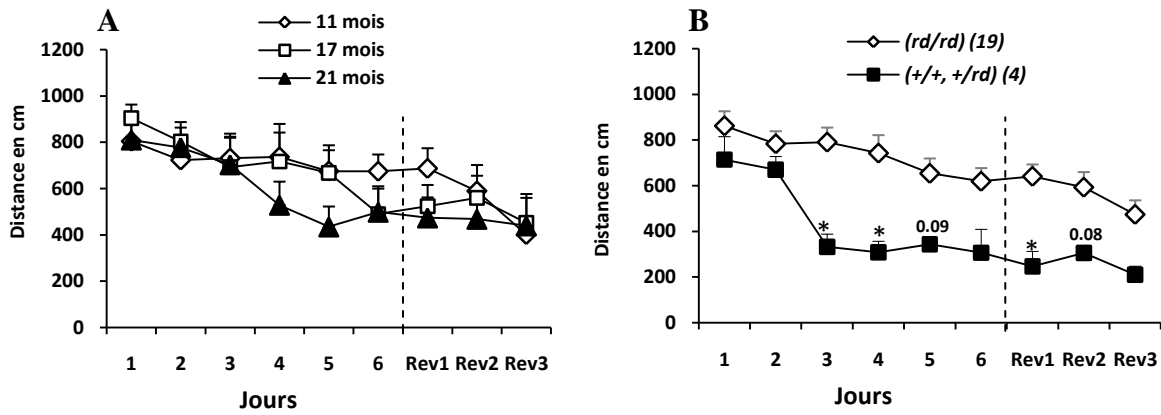


Figure 25. Distance parcourue par les wt pour atteindre la plate-forme au cours de l'acquisition et du *reversal* dans la tâche de la piscine. Les graphiques représentent les moyennes (+ erreurs type) de distance parcourue par essai durant les 6 jours d'acquisition et les 3 jours de *reversal* en fonction de l'âge (A) et en fonction de la mutation *rd* (B). Les effectifs pour les génotypes (*rd/rd*) et (*+/+ ;+/rd*) sont indiqués entre parenthèses (* : $P \leq 0,05$, significativement différent du groupe *rd/rd*)

4.2. Latence d'accès à la plate-forme

Effet de l'âge.

Acquisition : l'analyse de la latence nécessaire pour atteindre la plate-forme montre des résultats similaires à ceux obtenus pour les distances parcourues (figure 26). Au cours des six jours d'acquisition, les souris améliorent leurs performances (effet Jour : $F_{5,100}=3,7$, $P = 0,003$), sans effet significatif de l'âge (effet Age : $F_{2,20}=0,81$, $P=0,45$; Jour X Age : $F_{10,100}=0,83$, $P=0,58$; Figure 26A). Cependant, au sixième jour d'acquisition, il y a des souris qui nagent encore plus de 45 secondes pour retrouver la plate-forme (5/9 pour le groupe de 11 mois, 4/7 pour le groupe de 17 mois et 2/7 pour le groupe de 21 mois).

Reversal: entre le jour 6 et le jour 7, il n'y a pas d'effet du changement de position de la plate-forme sur les trois groupes d'âge (effet Jour : $F_{1,20}=0,4$, $P=0,52$; Age X Jour : $F_{2,20}=0,04$, $P=0,95$; Voir figure 26A). Au cours des trois jours de *reversal*, les souris améliorent légèrement leurs performances (effet Jour : $F_{2,40}=3,2$, $P=0,05$). Il n'y a pas d'effet de l'âge sur les performances (effet Age : $F_{2,20}=0,92$, $P=0,42$; Jour X Age : $F_{4,40}=0,26$, $P=0,89$).

Effet de *rd*. Les trois groupes d'âge ont été regroupés pour évaluer l'effet de la mutation *rd* sur la performance des souris (Figure 26B).

Acquisition : lors de la phase d'acquisition, il y a un effet significatif de la mutation *rd* sur les jours d'entraînement : les souris voyantes montrent une très bonne performance, alors que les souris homozygotes (*rd/rd*) n'améliorent pas leur performance (*rd* X Jour : $F_{5,100}=2,3$, $P=0,04$). Au cours des trois jours de *reversal*, il y a également un effet global de la mutation *rd* sur le niveau de performance (Effet *rd* : $F_{1,21}= 10,9$, $P=0,003$).

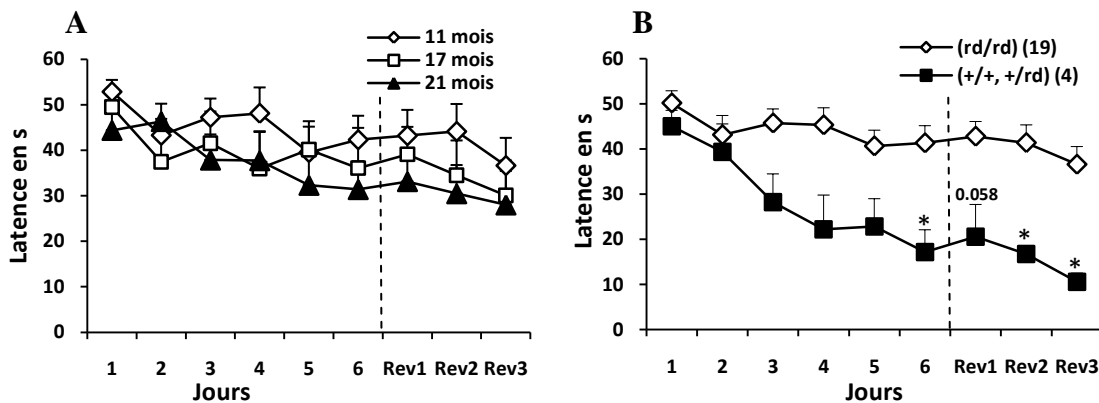


Figure 26. Latence d'accès à la plate-forme chez les souris wt au cours de l'acquisition et du *reversal* dans la piscine. Les graphiques représentent les moyennes (+ erreurs type) du temps passé à chercher la plate-forme par essai durant les 6 jours d'acquisition et les 3 jours de *reversal* en fonction de l'âge (A) et en fonction de la mutation *rd* (B). Les effectifs pour les génotypes (*rd/rd*) et (*+/+ ; +/rd*) sont indiqués entre parenthèses. (* : $P \leq 0,05$, significativement différent de (*rd/rd*)).

4.3. Test de rétention (*probe*)

Le test de rétention est réalisé le septième jour juste avant le *reversal*. La plate-forme est retirée de la piscine et les déplacements de chaque souris sont suivis pendant 60 s. Le but est d'évaluer leur capacité à se rappeler la localisation de la plate-forme dans le quadrant cible SO.

Effet de l'âge. Pour chacun des groupes, les souris montrent une modeste préférence pour le quadrant cible (figure 27A), mais les valeurs pour chacun des groupes ne diffèrent pas de la valeur de 15 s qui correspond à une répartition de la recherche au hasard.

Effet de *rd*. Les trois groupes d'âge ont été regroupés pour évaluer l'effet de la mutation *rd*. Les souris (*rd/rd*) montrent une mauvaise performance dans ce test de rétention contrairement aux souris voyantes qui ont un biais marqué pour le quadrant cible (Figure 27B).

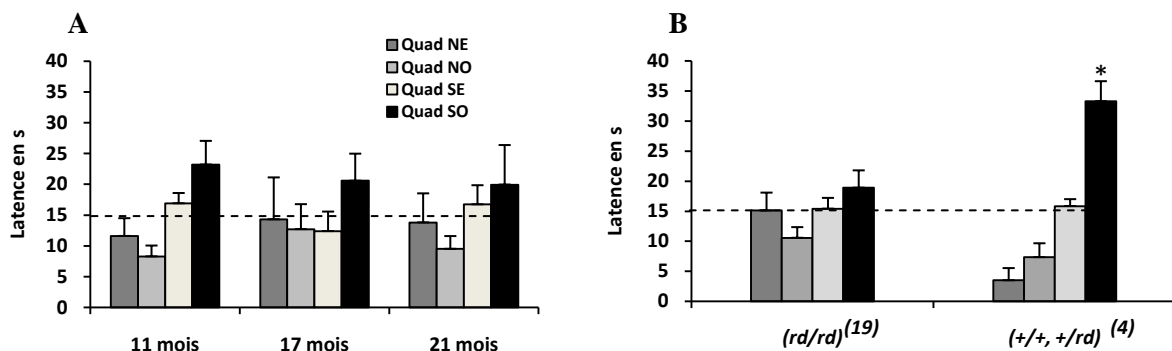


Figure 27. Performances des souris wt dans le test de rétention de la piscine au jour 7. Les graphiques représentent (+ erreurs type) le temps moyen passé dans chaque quadrant (Quad dans la figure) de la piscine en fonction de l'âge (A) et en fonction de la mutation *rd* (B). Le quadrant cible est le quadrant SO. Les effectifs pour les génotypes (*rd/rd*) et (*+/+ ; +/rd*) sont indiqués entre parenthèses. (* : $P < 0,05$, significativement différent du hasard (15 s)).

4.4 Test de plate-forme visible

Le test de plate-forme visible, qui a lieu le 13^{ème} jour, est généralement effectué dans le but de vérifier l'absence de biais dans les performances, biais qui pourrait être dûs notamment, à un déficit visuel ou à un manque de motivation.

Effet de l'âge. Globalement, les performances des trois groupes restent relativement stables au cours des 4 essais (figure 28A). Les souris n'ont pas réussi à améliorer significativement leurs performances et celles-ci restent à un niveau anormalement faible par rapport à ce que nous obtenons habituellement dans l'équipe (Effet essai : $F_{3,60}=1,28$, $P=0,28$). Il n'y avait pas

d'effet significatif de l'âge sur ces performances (effet Age : $F_{2,20}=1,1$, $P=0,34$; Age X Essai : $F_{6,60}=0,5$, $P=0,81$).

Effet de *rd*. Puisqu'il n'y a pas d'effet de l'âge, les trois groupes ont été regroupés pour évaluer l'effet de la mutation *rd* (figure 28B). Les distances parcourues par les souris (*rd/rd*) sont très élevées en comparaison avec les souris voyantes et elles n'évoluent dans aucun des groupes (Effet *Rd* : $F_{1,21}=3,74$, $P=0,06$, Essai X *rd* : $F_{3,63}=0,01$, $P=0,99$).

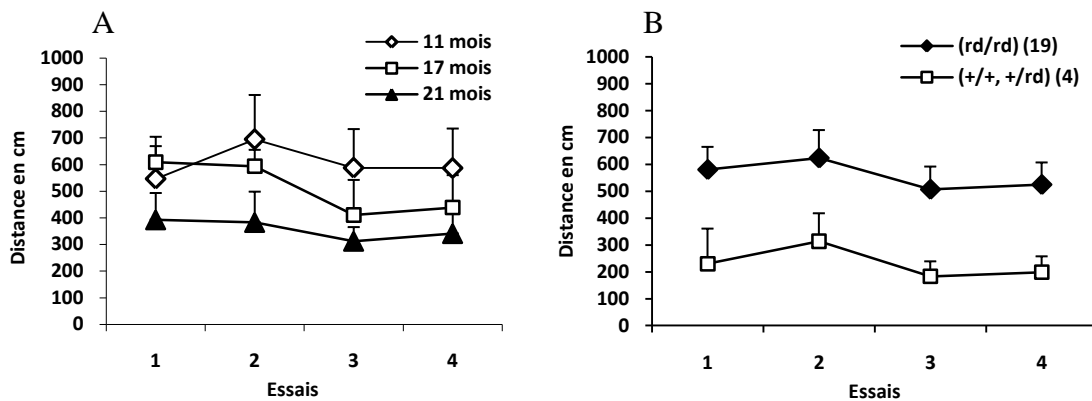


Figure 28. Performances des souris wt dans le test de la plate-forme visible. Les graphiques représentent les moyennes (+ erreurs type) des distances parcourues pour atteindre la plate-forme durant les 4 essais en fonction de l'âge (A) et en fonction de la mutation *rd* (B). Les effectifs pour les génotypes (*rd/rd*) et (*+/+ ; +/rd*) sont indiqués entre parenthèses.

5. Test d'alternance dans le labyrinthe en Y

Les trois groupes de souris présentent un nombre comparable d'entrées dans les branches (11 mois: $25,8 \pm 3,9$; 17 mois: $22,4 \pm 3,6$; 21 mois: $20,0 \pm 3,6$; effet Age : $F_{2,28}=0,61$, $P=0,54$; figure 29). Le pourcentage d'alternance diminue en fonction de l'âge ($F_{2,25}=4,4$, $p=0,02$). Comme il y a un effet de l'âge, on ne peut pas regrouper les trois groupes pour évaluer l'effet de la mutation *rd*.

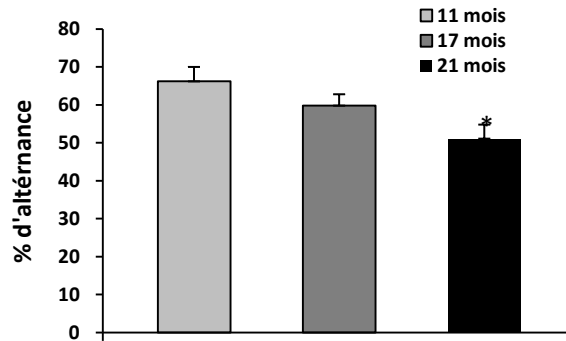


Figure 29. Performances d'alternance des souris wt dans le labyrinthe en Y. Les graphiques représentent la moyenne (\pm erreurs type) d'alternance en fonction de l'âge (* significativement différent du groupe de 11 mois).

3. Discussion du chapitre

Dans cette première partie de mon travail de thèse, j'ai mis en œuvre les protocoles d'une série de tests comportementaux que j'envisageais d'utiliser chez les souris tg2576 dans l'étape suivante de ma démarche expérimentale (chapitre 2).

En analysant de façon détaillée l'ensemble des résultats collectés, on peut tout d'abord retenir que l'âge ne semble quasiment pas avoir d'impact sur les performances, exception faite d'une tendance dans le test d'alternance dans le labyrinthe en Y. Par ailleurs, d'une manière surprenante, ce n'est que dans la piscine de Morris que j'ai pu mettre en évidence l'effet de la mutation *rd* (cécité ou vue gravement altérée) sur les performances des souris wt. La discussion de ce chapitre se focalisera donc sur l'effet de la mutation *rd*. Dans le chapitre 2, par contre, une discussion détaillée portera sur le phénotypage des souris tg2576 comparativement à celui de leurs témoins wt.

Les données du test de la piscine de Morris suggèrent que la mutation *rd* affecte les performances des souris dans cette tâche de navigation spatiale à caractère aversif, un résultat qui confirme l'étude réalisée par Garcia et ses collaborateurs (2003) sur la même lignée de

souris. Par contre, cette mutation *rd* n'a pas d'effet marqué sur les performances dans le labyrinthe de Barnes, dans la reconnaissance spatiale/d'objet, dans le labyrinthe en Y, qui tous les trois reposent sur un déplacement organisé dans un environnement spatial, pas plus d'ailleurs que sur l'activité locomotrice. Nous avons donc posé l'hypothèse de l'effet synergique du stress et de la mutation *rd* sur la performance des souris dans cette tâche. Alors que dans le test de labyrinthe de Barnes - dont le principe est le même que celui du test de la piscine de Morris avec un changement majeur, cependant: la souris n'a pas à nager pour atteindre le trou-cible - les souris mal-voyantes sont aussi performantes que les souris voyantes. Cependant, dans ce test, j'ai pu mettre en évidence une amélioration des performances au cours d'essais successifs, ce qui traduit un apprentissage malgré la mutation *rd*, et cet apprentissage a eu lieu même en nettoyant la plate-forme avec de l'alcool et en tournant la plate-forme à l'issue de chaque essai. Ce nettoyage et cette rotation du dispositif permettent de brouiller tout indice olfactif susceptible de persister d'un essai à l'autre ou d'une souris à la suivante. On note aussi que les souris mal-voyantes sont légèrement affectées dans le test du *reversal*, mais seulement dans la phase initiale du ré-apprentissage, puisqu'elles parviennent rapidement à réapprendre le nouvel emplacement du trou cible.

Contrairement au Rat, l'eau n'appartient pas à l'écosystème naturel de la Souris. C'est pour cette raison que l'on considère que la piscine de Morris est un test stressant pour la Souris, stress qui peut avoir un impact plus marqué chez la Souris que chez le Rat. En effet, il existe une différence de performances entre la souris et le Rat dans la piscine de Morris, les premières étant moins performantes que les seconds, alors qu'une telle différence n'apparaît pas dans un autre test de navigation spatiale comme celui du labyrinthe radial dans sa version classique, c'est-à-dire sans eau (Whishaw et Tomie, 1996). En effet, plusieurs auteurs ont posé l'hypothèse de l'effet du stress induit par l'eau sur les performances de la Souris. Harrison et ses collaborateurs (2009) ont détecté une augmentation exponentielle du niveau

de corticostérone (indicateur de stress) chez les souris testées dans la piscine en comparant ces niveaux avec ceux relevés chez des souris testées dans le labyrinthe de Barnes ou des souris n'ayant subi aucun test comportemental. Ce genre d'observation va dans le sens de notre hypothèse sur l'effet synergique du stress et de la mutation *rd*.

Mais le stress n'est pas le seul facteur à contribuer à la différence entre les performances des souris mal-voyantes aux deux tests. En effet, on peut supposer que du fait de la cécité, d'autres modalités sensorielles soient surexprimées pour compenser la perte visuelle (Buhot et coll., 2001), et que les souris aveugles aient la possibilité d'appréhender les tâches spatiales en se basant sur des capacités olfactives ou/et auditives supérieures à la normale. Il n'est pas exclu que, dans la piscine de Morris, la compensation olfactive de la cécité soit moins efficace que dans un test réalisé sur le dur. Plusieurs études ont aussi montré que l'audition permettait de compenser l'absence de vision, notamment chez l'humain, et ceci reste vrai pour des animaux frappés d'une perte congénitale de la vision (Lewald et coll., 2002 ; Warren et coll., 2002 ; Dale et coll., 1986). Watanabe et Yoshida (2007) ont montré que les souris testées en salle noire dans une version sèche de la piscine de Morris, et dont la navigation devait se baser sur des sons émis par des haut-parleurs fixés en dehors de la plateforme, parvenaient facilement à résoudre la tâche. De la même façon, on notera que la différence entre les performances de rats aveugles par rapport à des rats voyants est beaucoup moins marquée dans le test de Barnes que dans celui de la piscine de Morris (Spencer et coll., 1995). Il est intéressant de souligner ici que chez l'homme aussi, les personnes ayant une perte congénitale de la vision ont une capacité plus marquée que des personnes ayant perdu la vue après plusieurs années de vie normale à naviguer dans l'espace en se basant complètement sur l'audition (Després et coll., 2004). De plus, les sujets aveugles depuis la naissance, durant une activité impliquant une navigation spatiale, présentent une activité normale dans

l'hippocampe et le cortex visuel, les deux structures impliquées dans la navigation spatiale (Kupers et coll., 2010).

Les animaux en général, et les rongeurs en particulier, utilisent également ce qu'on appelle un processus d'intégration du chemin (en anglais : *path integration*). A l'aide de ce processus, l'animal forme des relations entre ses mouvements (temps parcouru, vitesse de déplacement, orientation, mouvement) pour mémoriser le chemin qu'il a parcouru (Whishaw et Gorny, 1996). Sautter et ses collaborateurs (2008) ont montré que les rats testés dans la piscine de Morris sous lumière stroboscopique ont besoin de plus de temps que les rats testés sous lumière normale pour atteindre la plate-forme, indiquant qu'une vision stroboscopique a un impact négatif sur les performances de navigation en piscine. Par contre, la lumière stroboscopique n'a aucun effet sur les performances des rats dans un test qui, par certains aspects, ressemble au test du labyrinthe de Barnes. L'hypothèse que les souris mal-voyantes pourraient être incapables d'utiliser l'intégration du chemin dans la piscine de Morris, alors que dans le test de Barnes, moins stressant, ce processus pourrait s'opérer normalement semble aussi acceptable. Enfin, Kimshi et Terkel (2001) ont posé l'hypothèse que les rongeurs peuvent utiliser également le champ magnétique terrestre pour guider leurs déplacements. Mais l'utilisation de cet indice devrait être aussi pertinent dans la piscine que dans le labyrinthe de Barnes, et ne peut pas expliquer la différence de performance entre les souris voyantes et mal-voyantes.

Dans le test de reconnaissance de la modification de la disposition des objets, les souris voyantes et les souris mal-voyantes ont des performances comparables qui indiquent bien que les deux groupes sont capables de détecter le changement de configuration spatiale des objets présents au sein de l'*open field*. Ces résultats suggèrent que même les souris ayant perdu la vue conservent une capacité à développer une carte cognitive de leur environnement fondée

sur d'autres modalités sensorielles que la vision. Il a été montré que les rats aveugles depuis la naissance et laissés en libre déplacement dans une enceinte présentent des cellules de lieu au champ d'activité stable, qui ne diffèrent pas de celles des rats voyants. Cette caractéristique se fonde le plus probablement sur une appréhension olfactive de l'environnement (Save et coll., 1998).

En tenant compte du fait que les objets et l'*open field* sont nettoyés à l'alcool après chaque passage d'une souris, on ne peut exclure que l'odeur de l'expérimentateur, qui se tient à proximité de l'*open field*, pourrait également jouer un rôle dans ce test. De plus, les souris sont en contact direct avec les objets, ce qui permet une exploration 'tactile' qui peut compenser également le rôle de la vision dans ce test.

Dans le test d'activité locomotrice, les souris mal-voyantes (notamment pendant la phase nocturne) sont légèrement plus actives que les souris voyantes. Ces résultats montrent que les souris mal-voyantes sont sensibles au changement du cycle circadien. En effet, les études réalisées sur des souris qui ont une perte congénitale de la vision (comme c'est le cas des nôtres), ont conduit de nombreux chercheurs à poser l'hypothèse de l'existence des photorécepteurs non-visuels dans les rétines, récepteurs qui peuvent réguler une adaptation du comportement au rythme circadien (Foster et coll., 1991 ; André et coll., 1998 ; Czeisler et coll., 1995 ; Provencio et Foster, 1995). Cependant, on peut aussi faire l'hypothèse que les bruits et les mouvements d'odeurs liés aux variations nycthémerales de l'activité des souris voyantes aient entraîné celles des non voyantes.

Le seul test dans lequel j'ai mis en évidence un effet de l'âge est celui de l'alternance spontanée dans le labyrinthe en Y. Je n'ai cependant pas pu regrouper les données indépendamment de l'âge des souris pour évaluer l'effet de la mutation *rd* dans ce test (j'ai analysé l'effet de la mutation *rd* dans le chapitre 2, à cause de l'absence de l'effet de l'âge).

Les tests d'alternance spontanée et d'évitement dans les labyrinthes en Y et en T ne montrent aucune différence entre les souris voyantes et les souris non voyantes, ce qui suggère que la mémoire de travail n'est pas altérée chez les souris mal-voyantes (Dyer et coll., 1975 ; Buhot et coll., 2001). Par contre, celles ayant subi une lésion de l'hippocampe présentent un déficit dans les tests d'alternance spontanée, ce qui confirme les études montrant une activité normale de l'hippocampe chez les souris/rats aveugles (Farr et coll., 2002).

L'objectif initial de ce travail était de développer et tester des protocoles qui seraient capables de mettre en évidence un déficit robuste et reproductible de mémoire chez des souris *tg2576* et dans lequel les souris *wt* seraient performantes. On a donc posé l'hypothèse que si les souris *wt* montraient un bon niveau de performances dans un des tests réalisés, on aurait là des conditions adéquates à la mise en évidence d'éventuels déficits chez des souris *tg2576*. Après l'analyse des données et en tenant compte de l'effet de la mutation *rd*, le test de la piscine de Morris ne semble pas adapté du fait que les souris *tg2576* ne sont pas génotypées avant leur arrivée au laboratoire. Les tests retenus pour la suite de l'étude sont donc ceux dans lesquels l'effet de la mutation *rd* est absent/minimal, à savoir le test du labyrinthe de Barnes (mais avec quelques adaptations du protocole d'acquisition et du test de rétention ; voir Méthodes). Le protocole de reconnaissance spatiale/d'objet est, lui aussi, conservé, mais sans y apporter le moindre changement, et il en va de même pour les tests du labyrinthe en Y et de l'activité locomotrice.

Chapitre 2 : Phénotypage des souris tg2576 et leurs wt

1. Introduction

La souris tg2576 présente un déficit de mémoire dépendant de l'âge dans de nombreuses tâches de mémoire spatiale comme de mémoire non-spatiale. Je rappelle que dès la première publication incluant un phénotypage comportemental, il a été décrit que cette lignée présente un déficit de mémoire spatiale dans la tâche de la piscine de Morris, et ce vers l'âge de 9-10 mois (Hsiao et coll., 1996, Reed et coll., 2010). Il a également été montré que la souris tg2576 est déficitaire dans les tests d'alternance spontanée dans le labyrinthe en Y, mais aussi dans le labyrinthe en T (Chapmann et coll., 1999; Middei et coll., 2004; Bothe et coll., 2005). Je rappelle de plus, que la mise en évidence de déficits dans ces tâches n'a pas toujours été reproduite d'un laboratoire à un autre, et que les données comportementales manquent parfois de cohérence au sein de la même étude. Par exemple, les jeunes tg2576 peuvent présenter un déficit, alors qu'à un âge plus avancé, ce déficit n'apparaît plus (King et coll., 1999). Récemment, des études très cohérentes dans leurs résultats ont montré que la souris tg2576 est déficitaire dans la détection d'un changement de la configuration spatiale de plusieurs objets (Hale et coll., 2005; Good et coll., 2007). Par ailleurs, la Souris tg2576 ne présente pas seulement des déficits dans des tâches de mémoire spatiale, mais aussi dans des tâches impliquant d'autres types de mémoires, telles que la mémoire contextuelle (Bothe et coll., 2005) et la mémoire olfactive (Wesson et coll., 2010).

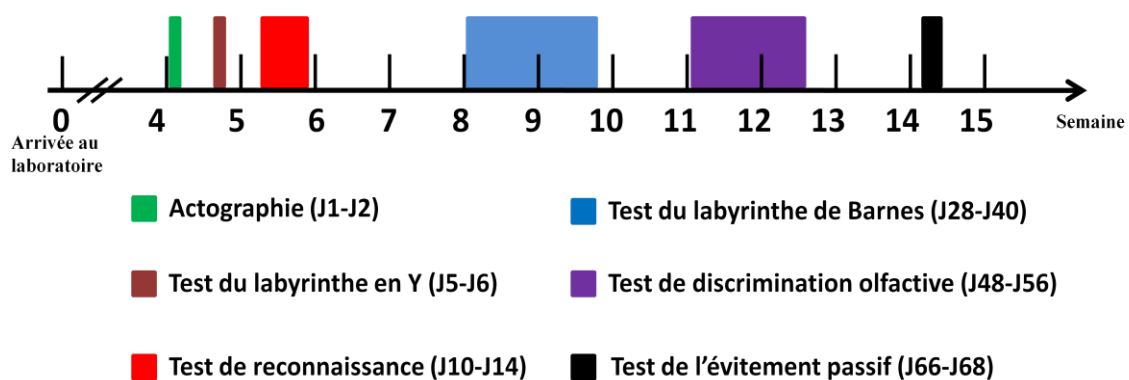
Je rappelle enfin que le but de notre démarche était de sélectionner des tests montrant un déficit mnésique reproductible chez la Souris tg2576 et ceci indépendamment de la présence de la mutation *rd*. En effet, les cohortes dont nous disposions n'étaient pas sélectionnées sur la base de cette mutation, donc il était indispensable de pouvoir mettre en évidence un déficit dans une population mixte de souris voyantes et mal-voyantes, et donc dont la nature ne serait

pas influencée par la mutation. De plus, nos collaborateurs (Boehringer Ingelheim, Allemagne) ne pouvaient réaliser le génotypage pour la mutation *rd* que postérieurement à notre travail de phénotypage. En effet, le prélèvement d'un échantillon de queue ou d'oreille peu de temps avant la période des tests comportementaux risquait d'induire un stress et donc, d'affecter les performances de nos souris. Nous ne voulions pas prendre un tel risque et avons de ce fait privilégié la mise en place d'un travail de préparation en amont du phénotypage des souris tg2576.

Le travail présenté dans le chapitre précédant montre que la tâche de mémoire dans la piscine de Morris n'est pas du tout adaptée à une telle population à cause de l'impact de la mutation *rd*, sous forme homozygote, sur les performances de cette tâche. Nous avons donc éliminé cette tâche de notre batterie de test pour les souris tg2576. En revanche, comme les souris tg2576 présentent des déficits de mémoire olfactive (Guérin et coll., 2009 ; Young et coll, 2009), nous avons remplacé cette tâche par une épreuve de discrimination olfactive simple adaptée à partir de la tâche mise au point par Schellinck et ses collaborateurs (2001). Ce choix nous semblait particulièrement judicieux, et ce à plus d'un titre : 1) ce test ne devrait pas être affecté négativement par un problème de vision, 2) des déficits dans les tâches de mémoire olfactive ont été décrits chez les souris tg2576, et 3) les patients Alzheimer présentent des troubles dans des tests de discrimination olfactive (Moberg et coll., 1987). Sur ce dernier point, il faut néanmoins noter que le déficit olfactif ne serait pas nécessairement de type mnésique, mais pourrait être lié à une anosmie précoce (Kesslak et coll., 1988 ; Hawkes, 2003 ; Bahar-Fuchs A. et coll, 2010). De plus, nous avons modifié la tâche de mémoire spatiale du labyrinthe de Barnes de façon à obtenir de meilleures performances de rétention des wt par l'ajout d'un jour d'acquisition avant la réalisation du premier *probe* (avant d'entamer le *reversal*) et en raccourcissant le délai de rétention de 11 à 7 jours pour celle du deuxième *probe*. En effet, meilleures sont les performances des souris wt témoins, meilleures

sont les chances de mettre en évidence un déficit très profond chez les souris tg2576. Un déficit de grande amplitude est absolument nécessaire à la mise en évidence ultérieure d'une gradation des effets de la double lésion et des lésions du CE et des NCB chez les souris wt d'une part, et chez les souris tg2576 d'autre part. Enfin, nous avons ajouté une tâche en toute fin de phénotypage pour évaluer les performances d'évitement passif des souris tg2576 dans notre laboratoire, et ce bien que les quelques travaux ayant cherché à objectiver les performances de cette lignée eussent montré qu'elles ne présentaient pas de déficits dans cette tâche (Arendash et King, 2002).

Des souris femelles tg2576 et leurs wt âgées de 8 et 16 mois (âge au premier test) ont été testées dans des tâches de mémoire selon le protocole expérimental décrit ci-dessous :



Chez les souris tg2576 et les souris wt, il y avait un grand nombre de souris homozygotes (*rd/rd*). Le tableau ci-dessous représente l'effectif des souris dans chaque test, avec le nombre de souris non affectées par la mutation.

génotype	Age (mois)	Actographie	Y	RS/RO	Barnes	Dis. olfactive	Passif
Tg	8	12 (3)	15 (5)	14 (5)	10 (4)	12 (4)	12 (4)
	16	15 (1)	12 (1)	16 (1)	15 (1)	10 (1)	10 (1)
Wt	8	12 (4)	12 (5)	13 (5)	14 (5)	11 (5)	11 (5)
	16	13 (7)	15 (7)	15 (7)	13 (7)	13 (3)	13 (3)

Tableau 2 : Tableau représentant les effectifs des souris tg2576 et leurs wt dans chacun des tests avec le nombre des souris voyantes, sauvages ou hétérozygote pour la mutation *rd* (+/+, +/-) entre parenthèse.

2. Résultats

1. Actographie

Dans cette expérience, plusieurs souris présentent une très grande variabilité dans l'activité, souvent associée à une stéréotypie circulaire. Toutes les souris qui ont présenté un tel comportement et dont le nombre de passage dépasse 1000 par heure ont été éliminées de l'analyse, leurs scores étant de toute évidence aberrants (1 wt de 8 mois, 2 wt de 16 mois et 1 tg2576 de 8 mois).

Dans cette expérience, certaines souris semblent s'habituer plus lentement au nouveau contexte que dans le travail précédent (voir analyse *rd* à venir). Dans ces conditions, il est difficile de vérifier si leur activité a évolué selon un cycle nyctéméral classique au cours des heures suivantes. Je présente donc les résultats sur une phase de 6 heures d'habituation et sur une phase de 18 heures d'activité locomotrice de base (6 heures d'activité diurne et 12 heures d'activité nocturne).

1.1. Habituation

La période d'habituation sur six heures est illustrée dans la figure 30. Les souris tg2576 et les souris wt montrent une habituation progressive à leur environnement au cours des 6 premières heures. En effet, on observe une diminution progressive de l'activité locomotrice

en fonction de l'heure (effet Heure : $F_{5,240}=10,38$, $P < 0,001$), sans effet significatif de l'âge, du génotype, ou de l'interaction entre ces facteurs.

En raison du faible effectif (4) et de la grande variabilité interindividuelle observée chez le groupe de souris tg2576 voyantes (+/+, +/rd), je ne présente que les données rd des souris wt dans ce test.

Puisqu'il n'y a pas d'effet significatif de l'âge, que ce soit sur l'ensemble des groupes ou sur les wt seules, les deux groupes d'âge des souris wt ont été regroupés pour évaluer l'effet de la mutation rd sur l'habituation des souris au nouveau contexte. Comme illustré dans la figure 30B, les souris (rd/rd) semblent plus actives que les souris voyantes, mais cette différence n'atteint pas la significativité (effet rd : $F_{1,23}=1,1$, $P=0,31$). Par contre, l'évolution de leur performance n'est pas la même au cours des six heures de la phase d'habituation (l'interaction Heure X Rd est significative : $F_{5,115}=4,6$, $P < 0,001$). En fait, le retard d'habituation sur l'activité locomotrice est essentiellement dû aux souris rd/rd qui ont un niveau d'activité très élevé, alors que les souris voyantes ont un niveau d'activité plus faible dès le départ et qui diminue en trois heures environ.

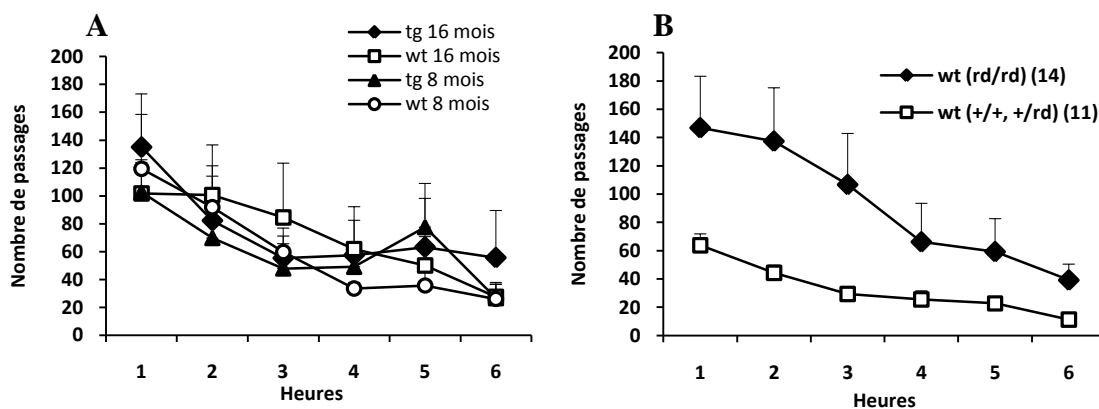


Figure 30. Activité locomotrice pendant la phase d'habituation de la séance d'actographie. Les graphiques représentent les moyennes (\pm Erreur type) du nombre de passages effectués durant les six heures d'habituation (de 11h à 17h) en fonction de l'âge chez les tg2576 et les wt (A) et en fonction de la mutation rd chez les wt (B). Les effectifs des souris wt (rd/rd) et (+/+ ;+/rd) sont indiqués entre parenthèses.

1.2. Activité locomotrice de base

L'activité locomotrice de base sur 18 heures est illustrée dans la figure 31. Les souris tg2576 sont plus actives que les souris wt de façon générale (Effet Génotype : $F_{4,48}=4,4$, $P=0,04$; Figure 30A). Néanmoins, l'évolution de l'activité locomotrice au cours du temps est comparable pour les deux génotypes (Heure X génotype : $F_{17,816}=0,98$; $P=0,41$). Il n'y a pas d'effet significatif de l'âge que ce soit globalement ou sur l'évolution de l'activité en fonction du temps (Effet Age : $F_{1,48}=0,01$, $P=0,98$; Heure X Age : $F_{17,817}=1,3$, $P=0,17$).

Comme il n'y a pas d'effet de l'âge, les deux groupes de souris wt ont été regroupés pour évaluer l'effet de la mutation *rd* sur l'activité locomotrice de base (figure 30B). Durant la phase de 18 heures, les souris (*rd/rd*) sont encore légèrement plus actives que les souris voyantes ($F_{1,23}=3,5$, $P=0,048$). La fluctuation de leur activité est cependant très semblable au cours des 18 heures ($F_{17,391}=0,7$, $P=0,8$).

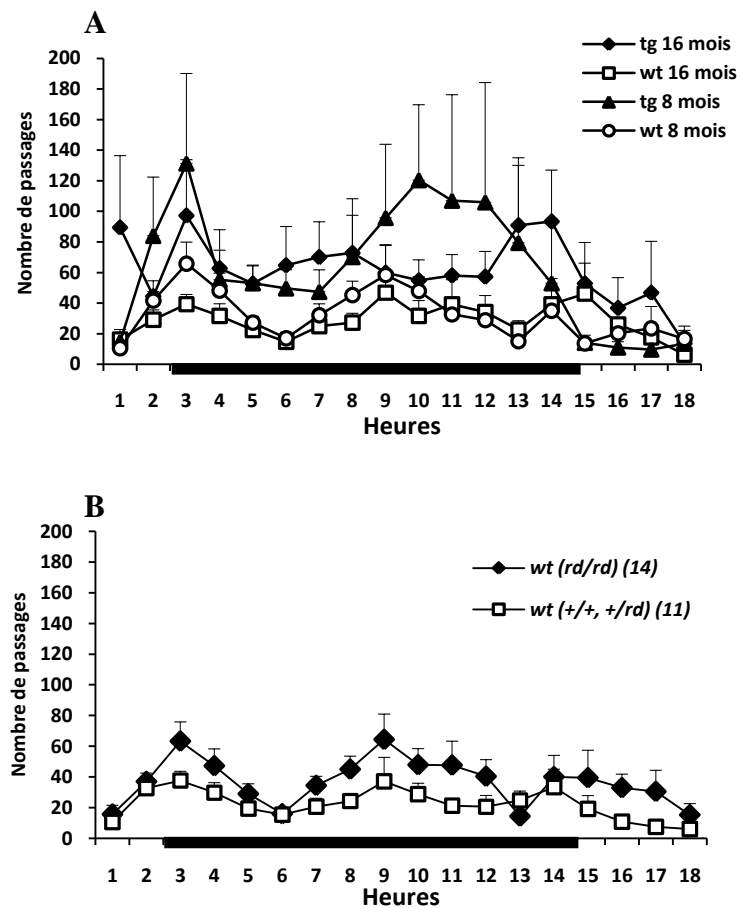


Figure 31. Activité locomotrice de base pendant la phase de 18 heures de la séance d'actographie. Les graphiques représentent les moyennes (\pm Erreur type) du nombre de passages effectués sur les 18 heures d'activité locomotrice de base (de 18h à 11h) en fonction de l'âge chez les tg2576 et les wt (A) et en fonction de la mutation *rd* chez les wt (B). Les effectifs des souris wt (*rd/rd*) et (+/+ ; +/*rd*) sont indiqués entre parenthèses. La barre noire symbolise la période nocturne de la séance.

2. Test du labyrinthe en Y

Tous les groupes présentent un niveau de performances correct à ce test (figure 32A). Il n'y a pas d'effet significatif du génotype ($F_{1,50}=0,5$, $P=0,48$), de l'âge ($F_{1,50}=0,5$; $P=0,48$), ou de l'interaction entre ces facteurs (Age X Génotype : $F_{1,50}=1,46$, $P=0,23$). Le nombre total de visites dans les branches du labyrinthe est similaire dans tous les groupes, sans effet du génotype ($F_{1,50}=1,88$, $P=0,17$), de l'âge ($F_{1,50}=0,83$, $P=0,36$), ou de l'interaction entre ces deux facteurs ($F_{1,50}=0,6$, $P=0,41$).

Comme il n'y a pas d'effet de l'âge, les groupes d'âge ont été regroupés et analysés en fonction de la mutation *rd* (figure 32B). Il n'y a pas d'effet de la mutation *rd* ni en termes de pourcentage d'alternance ($F_{1,50}=0,21$, $P=0,64$) ni en termes de nombre total de visites ($F_{1,50}=0,68$, $P=0,42$).

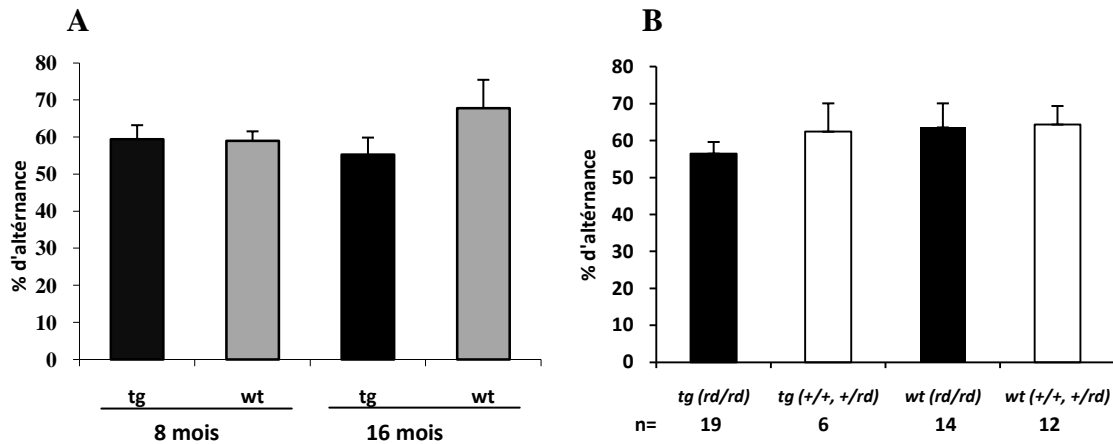


Figure 32. Performance d'alternance des souris tg2576 et des wt dans le labyrinthe en Y. Les graphiques représentent la moyenne (\pm erreurs type) des pourcentages d'alternance en fonction l'âge (A), et en fonction de la mutation *rd* (B). Les effectifs des souris (*rd/rd*) et (*+/+ ; +/rd*) sont indiqués entre parenthèses.

3. Tests d'exploration d'objets

3.1. Reconnaissance spatiale

Au cours de la séance d'acquisition de la configuration spatiale, les souris explorent autant l'objet qui sera déplacé que ceux qui ne le seront pas, ce qui indique qu'il n'existe pas, a priori, de biais de préférence spontanée (effet Objet : $F_{1,54}=1,5$, $P=0,2$). Au cours des 10 min de la séance de rétention, globalement, les souris explorent davantage l'objet déplacé que les deux objets non déplacés (effet Objet : $F_{1,54}=30,74$, $P < 0,001$). Cet effet est dû à un niveau de performances élevées chez les souris wt. En effet, les souris tg2576 ne présentent pas de préférence pour l'objet déplacé, ce qui explique l'interaction significative entre les facteurs Objet et Génotype ($F_{1,54}=27,57$, $P < 0,001$). Il n'y a pas d'effet significatif de l'âge sur les

performances de reconnaissance de l'ensemble des souris ou même en fonction du génotype (Objet X Age ; $F_{1,54}=0,05$, $P=0,82$, Objet X Age X génotype : $F_{1,54}=0,3$, $P=0,6$).

Les groupes d'âge ont donc été regroupés et analysés en fonction de la mutation *rd* (figure 33B). Globalement, cette mutation n'affecte pas la performance de reconnaissance des souris dans ce test, même lorsqu'on tient compte du génotype (Rd X Objet : $F_{1,53}=0,03$, $P=0,85$; Rd X Génotype X Objet : $F_{1,53}=0,003$, $P=0,95$). En d'autres termes, les souris wt présentent une préférence pour l'objet déplacé, mais pas les souris tg2576 quel que soit leur statut par rapport à la mutation *rd*.

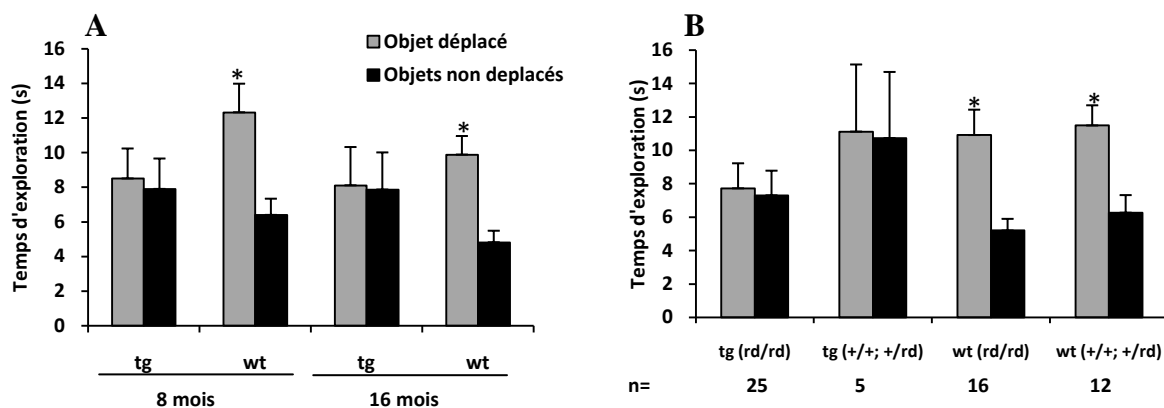


Figure 33 : Performances de reconnaissance spatiale chez les souris tg2576 et les wt. Les graphiques représentent les moyennes (\pm erreur type) des temps d'exploration pour chaque catégorie d'objets (déplacés ou non) en fonction de l'âge (A), et en fonction de la mutation *rd*. Les effectifs des souris (*rd/rd*) et (+/+ ; +/rd) sont indiqués entre parenthèses. (* : $P < 0,05$, significativement différent de la catégorie des objets non déplacés).

3.2 Reconnaissance d'objet

Au cours de ce test, globalement, les souris présentent un bon niveau de performances (figure 34). L'ensemble des souris explore plus le nouvel objet que les deux objets avec lesquels elles sont familiarisées (Effet Objet : $F_{1,54}=37,8$, $P < 0,001$; figure 34A). Les performances ne sont pas affectées par le génotype ou par l'âge (Génotype X Objet : $F_{1,54}=0,03$, $P=0,86$; Age X Objet : $F_{1,54}=0,9$, $P=0,4$). Il n'y a pas d'interaction significative entre ces trois

facteurs. L'absence de significativité pour les performances du groupe wt de 8 mois est très étonnante. Elle est vraisemblablement due à une fluctuation d'échantillonnage au cours des expériences puisqu'elle n'a jamais été confirmée par la suite dans plus de 5 expériences sur les souris wt. Nous ne reviendrons plus sur ce point dans la discussion.

Les groupes d'âge ont donc été regroupés et analysés en fonction de la mutation *rd* (figure 34B). Les souris *tg2576* et les wt explorent beaucoup plus le nouvel objet que les deux autres objets, quel que soit le statut de la mutation *rd* ($Rd \times \text{Objet} : F_{1,54}=0,001, P=0,97$).

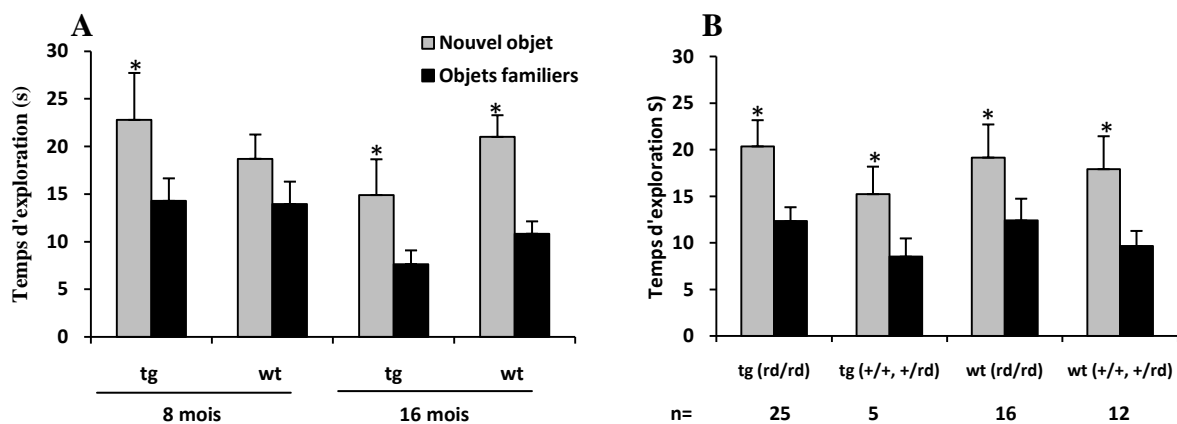


Figure 34 : Performances au test de reconnaissance spatiale chez les souris *tg2576* et les wt. Les graphiques représentent les moyennes (\pm erreur type) des temps d'exploration des différentes catégories d'objets (nouveau ou familiers) en fonction de l'âge (A) et en fonction de la mutation *rd* (B). Les effectifs des souris (*rd/rd*) et (*+/+ ; +/rd*) sont indiqués entre parenthèses. (* : $P < 0,05$, significativement différent des anciens objets).

4. Tâche de mémoire spatiale dans le labyrinthe de Barnes

4.1. Erreurs de mémoire de référence

Effet de l'âge.

Acquisition : Au premier jour d'acquisition, tous les groupes semblent apprendre la tâche. En effet, l'ensemble des souris améliore leurs performances au cours des 6 essais (effet Essai ; $F_{5,235}=7,03, p < 0,001$), sans qu'il n'y ait d'effet significatif du génotype, de l'âge ou de

l'interaction entre ces facteurs (Génotype X Essai : $F_{5,235}=1,8$, $P=0,11$; Essai X Age : $F_{5,235}=1,8$, $P=0,11$). Les performances sur les 6 jours d'entraînement sont illustrées pour chaque groupe dans la figure 35A. Contrairement au protocole utilisé dans l'étude ayant fait l'objet du premier chapitre, le 2^{ème} jour d'acquisition a lieu au jour 3, ce qui permet de tester deux groupes presque en parallèle. Entre le jour 1 et le jour 3 de l'acquisition, les souris améliorent significativement leurs performances (effet Jour : $F_{1,14}=11,48$, $P=0,001$), avec un modeste effet, mais non significatif, du génotype (Effet Génotype : $F_{1,47}=3$, $P=0,08$) et qui pourrait s'expliquer par une perturbation des performances des tg2576 au cours des deux premiers jours d'acquisition.

Reversal : Dans cette phase de la tâche, le trou qui mène à la cage est positionné à l'opposé du trou initial. Le changement de la position du trou-cible tend à perturber les performances des souris entre le jour 3 et le jour 4 (Effet jour : $F_{1,47}=2,9$, $P=0,09$; figure 35A). Comme le montre la figure 35, les souris de 16 mois, quel que soit leur génotype, semblent les plus touchées par le *reversal*. Cependant, il n'y a pas d'effet significatif, ni du génotype, ni de l'âge, ni d'ailleurs de l'interaction entre ces deux facteurs (Génotype X Jour : $F_{1,47}=1,1$, $P=0,3$; Age X Jour ; $F_{1,47}=0,9$, $P=0,35$). Globalement, sur les 4 jours de *reversal*, les souris améliorent significativement leurs performances (effet Jour : $F_{3,141}=11,3$, $P < 0,001$). Pourtant, les souris tg2576 font plus d'erreurs que les souris wt avant de trouver le trou-cible et n'améliorent pas autant leurs performances au cours de cette phase de *reversal* (Effet génotype : $F_{1,47}=12,37$, $P < 0,001$; Génotype x Jour : $F_{3,141}=2,3$, $P=0,07$). Néanmoins, il n'y a, ni un effet de l'âge, ni aucune interaction avec l'âge.

Effet de *rd* : Je ne présente l'effet *rd* que chez les souris wt, car chez les souris tg2576, il existe un effet de l'âge sur une autre variable caractérisant les performances d'apprentissage de la tâche (au niveau de latence d'entrée dans le trou-cible ; voir paragraphe 4.2).

Globalement, la mutation *rd* n'affecte pas les performances chez les souris dans les différentes phases du test : au cours des 6 essais du premier jour (*Rd* X Essai : $F_{5,120}=0,42$, $P=0,83$), entre le jour 1 et le jour 2 d'acquisition (*Rd* X jour : $F_{1,24} < 0,001$, $P=0,99$), entre le jour 3 et le jour 4 (effet du *reversal* : *Rd* X Jour : $F_{1,24}=0,02$, $P=0,88$) et au cours des 4 jours de *reversal* (Jour X *Rd* : $F_{3,72}=0,2$, $P=0,86$).

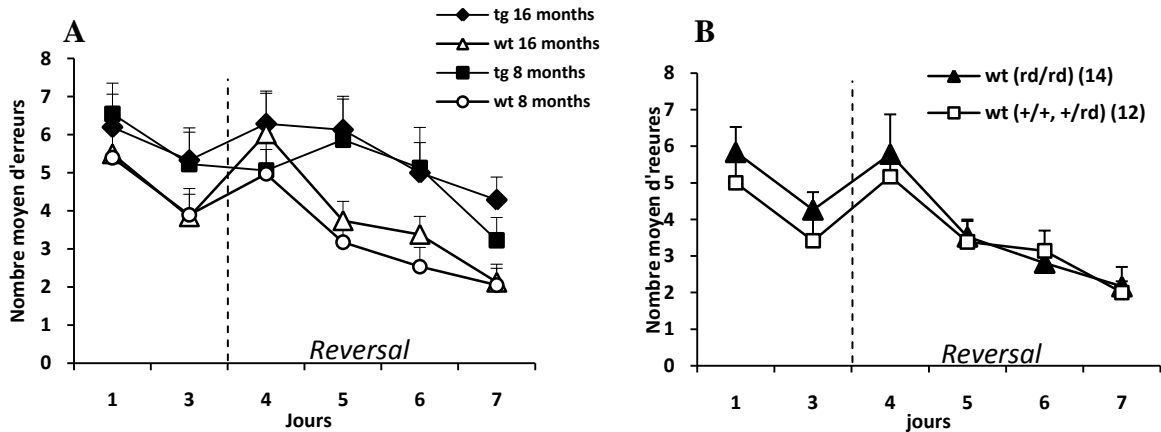


Figure 35. Performances d'apprentissage en nombre d'erreurs dans la tâche du labyrinthe de Barnes. Les graphiques représentent les moyennes (+erreurs type) du nombre d'erreurs de mémoire de référence des différents groupes de génotype en fonction l'âge (A) et des wt en fonction de la mutation *rd*. Les effectifs des souris (*rd/rd*) et (+/+ ; +/rd) sont indiqués entre parenthèses.

4.2. Latence d'entrée dans le trou-cible

Effet de l'âge.

Acquisition : au cours des six essais du premier jour, tous les groupes semblent apprendre la tâche, car ils améliorent significativement leurs performances (effet Essai : $F_{5,235}=34,6$, $P < 0,0001$). Il n'y a cependant pas d'effet du génotype, de l'âge, ou de l'interaction entre ces facteurs (Essai X Génotype : $F_{5,235}=0,64$, $P=0,66$; Essai X Age : $F_{5,235}=0,9$, $P=0,48$). Au cours des deux jours d'acquisition (jour 1 et jour 3), l'ensemble des groupes améliorent significativement leurs performances (effet Jour : $F_{1,47}=50,5$, $P < 0,001$; figure 36A). Cependant, on relève un effet global de l'âge (Effet Age : $F_{1,47}=7,84$, $P=0,007$), qui est dû essentiellement aux très mauvaises performances des souris tg2576 de 16 mois lors du

deuxième jour (Génotype X Jour : $F_{1,47}=11,5$, $P=0,001$). Néanmoins, il n'y a pas d'interaction Age X Jour ($F_{1,47}=2,81$, $P=0,47$).

Reversal : entre les jours 3 et 4, les performances des souris sont touchées par le *reversal* (effet Jour : $F_{1,47}=10,29$, $P=0,002$). En effet, le temps de latence pour trouver la cible augmente chez les souris de 16 mois, qu'elles soient tg2576 ou wt (Effet Age : $F_{1,47}=17,1$, $P < 0,001$). Par ailleurs, le ralentissement marqué des souris tg2576 de 16 mois explique l'effet global significatif du génotype ainsi que son interaction avec le facteur Âge (effet génotype : $F_{1,47}=8,4$, $P=0,004$, Age X Génotype : $F_{1,47}=4,0$, $P=0,05$).

Durant les 4 jours de *reversal*, les souris améliorent significativement leurs performances (Effet Jour : $F_{3,141}=29,6$, $P < 0,001$), avec un effet global du génotype ($F_{1,47}=14,9$, $P < 0,001$), de l'âge ($F_{1,47}=17,9$, $P < 0,001$) et une interaction Génotype X Âge ($F_{1,47}=4,47$, $P=0,039$). En effet, les souris tg2576 de 16 mois présentent encore des latences élevées pour atteindre le trou-cible.

Effet de *rd* : Je ne présente l'analyse de l'effet de la mutation *rd* que chez les souris wt (figure 36B), car chez les souris tg2576, il existe un effet de l'âge au niveau des latences d'entrée dans le trou-cible. Durant les 2 jours d'acquisition, il n'y a pas d'effet de la mutation *rd* (Effet *rd* : $F_{1,22}=1,7$, $P=0,20$; Jour X *rd* : $F_{1,22}=0,6$, $P=0,04$). Entre les jours 3 et 4, les souris (*rd/rd*) semblent plus affectées par le *reversal*, mais aucun effet significatif de *rd* ne ressort des analyses statistiques (Effet *rd* : $F_{1,22}=2,77$, $P=0,1$, Jour X *Rd* : $F_{1,22}=1,1$, $P=0,3$). Au cours des 4 jours de *reversal*, les souris voyantes sont à peine plus rapides que les souris (*rd/rd*) pour atteindre le trou-cible (Effet *Rd* : $F_{1,22}=3,49$, $P=0,07$, Jour X *Rd* ; $F_{3,66}=1,3$, $P=0,28$).

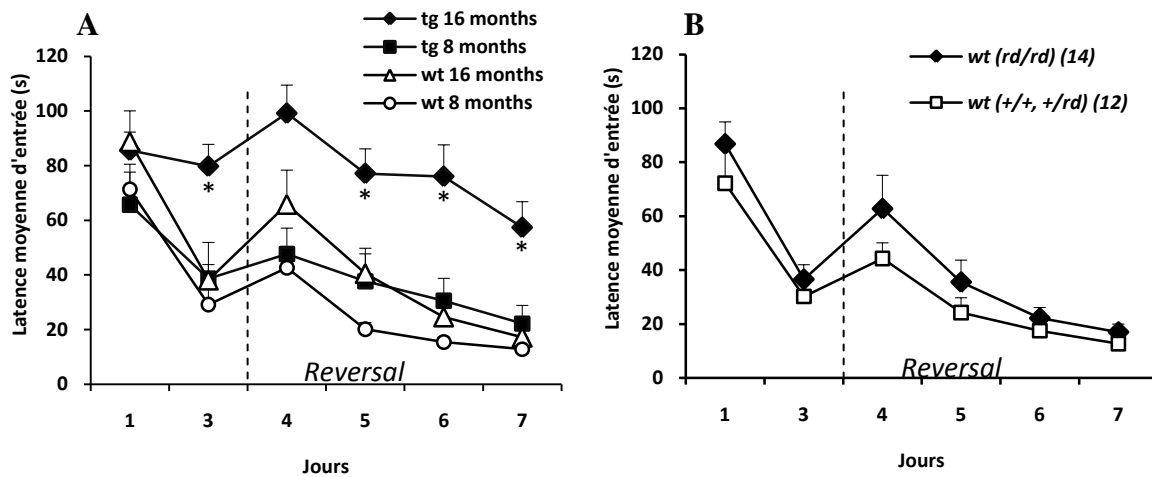


Figure 36 : Latence d'entrée dans le trou-cible dans la tâche du labyrinthe de Barnes. Les graphiques représentent les moyennes (+ erreurs type) des latences d'entrée dans le trou-cible des différents groupes de génotype en fonction de l'âge (A), et en fonction de la mutation *rd* pour les souris wt. Les effectifs des souris (*rd/rd*) et (+/+ ; +/rd) sont indiqués entre parenthèses. (* : $P < 0,05$, significativement différent des autres groupes)

4.3. Test de rétention

Effet de l'âge.

Le premier test de rétention (*probe 1*) a lieu au jour 4 juste avant de lancer le protocole de *reversal*. Globalement, les souris âgées (16 mois) font moins de visites aux trous que les souris de 8 mois (effet Age : $F_{1,41}=5,77$, $P=0,02$), je présente donc les résultats en termes d'indice de visite (rapport entre les visites au trou d'intérêt sur le nombre total de visites ; figure 37). Globalement, les souris présentent une préférence pour le trou-cible (effet Trou : $F_{3,114}=9,7$, $P < 0,001$). Cet effet est dû aux bonnes performances des souris wt des différents âges. En revanche, les souris tg2576 ne montrent aucune préférence pour le trou-cible (Génotype X Trou : $F_{3,114}=3,3$, $P=0,02$). Sur les performances en terme d'index, il n'y a pas d'effet de l'âge, ni d'interaction avec ce facteur.

Puisqu'il n'y a pas d'effet de l'âge, les données de *probe 1* ont été analysées en fonction de la mutation *rd* chez les souris tg2576 et les souris wt. Globalement, la mutation *rd* n'a pas

affecté les performances de rétention après les deux jours d'acquisition (effet *Rd* : $F_{1,37}=1,07$, $P=0,3$: *Rd* X Trou : $F_{3,111}=1,55$, $P=0,21$). En effet, même si on analyse les données de chaque génotype à part, on retrouve l'absence d'effet de la mutation *rd* sur les performances des souris dans le test de rétention. Les souris wt présentent une préférence pour le trou-cible quel que soit le statut *rd* (Trou X *Rd* : $F_{3,60}=0,39$, $P=0,75$). De même, les souris tg2576 présentent une mauvaise performance dans le *probe 1* indépendamment de la mutation *rd* (Trou X *Rd* : $F_{3,57}=1,47$; $P=0,23$).

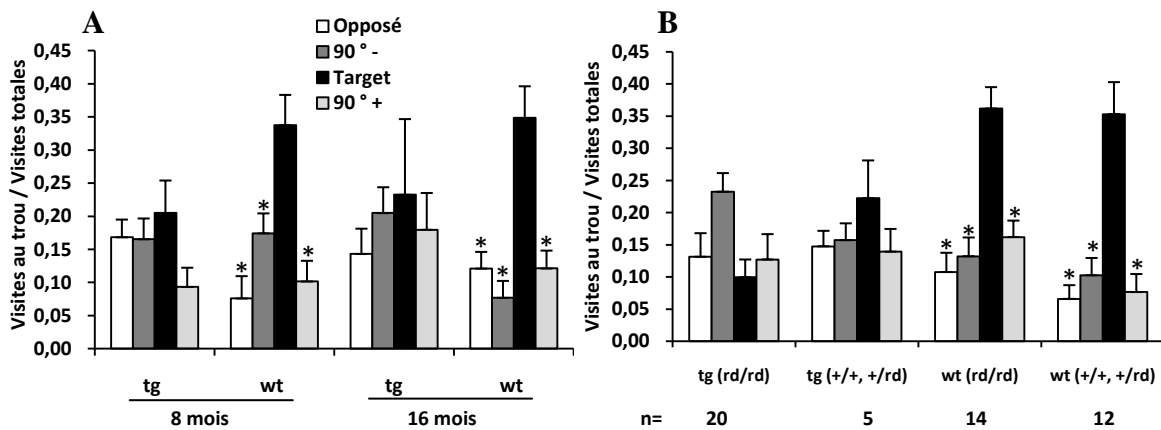


Figure 37. Performances de rétention au *probe 1* de la tâche du labyrinthe de Barnes (24 h après la phase d'acquisition). Les graphiques représentent l'indice des visites (+ erreur type) aux trous des différents groupes de génotype en fonction de l'âge (A) et en fonction de la mutation *rd* (B). Les effectifs *n* des souris (*rd/rd*) et (*+/+ ; +/rd*) de chaque groupe sont indiqués sous l'abscisse du graphe B. (* : $P \leq 0,05$, significativement différent du trou-cible).

Dans le deuxième test de rétention (*probe2*), qui a lieu 11 jours après la fin du *reversal* (figure 38), les souris ont globalement une préférence pour le trou-cible (Effet Trou : $F_{3,120}=5,7$, $P=0,001$). Cet effet est dû aux bonnes performances des souris wt de 8 mois qui sont les seules à présenter un biais pour le trou-cible (Trou X Age : $F_{3,120}=2,7$, $P=0,05$). En effet, les souris wt de 16 mois et les souris tg2576 de 8 et 16 mois ne montrent aucune préférence. Il y a un effet significatif du génotype dans le *probe 2* (Génotype $F_{3,120}=6,8$, $P <$

0,001). Dans ce test de rétention, on ne peut pas regrouper les différents groupes d'âge pour analyser l'effet de la mutation rd puisqu'il y a un effet significatif de l'âge.

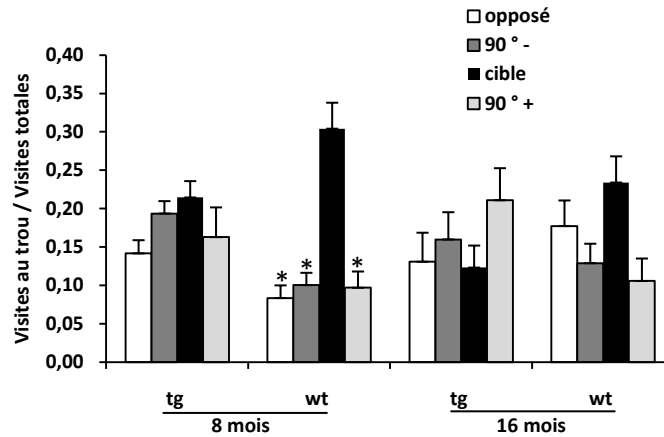


Figure 38. Performances de rétention dans le *probe 2* de la tâche du labyrinthe de Barnes (11 jours après le *reversal*). Les graphiques représentent l'indice des visites (+erreur type) aux trous pour les différents groupes de génotype en fonction l'âge. (* : $P < 0,05$, significativement différent du trou-cible).

4.4. Analyse des stratégies

Les souris peuvent utiliser différentes stratégies de recherche pour trouver le trou-cible. On différencie classiquement la stratégie de recherche spatiale, de celle de recherche sérielle ou encore d'une recherche à première vue plus aléatoire et moins efficace. Une souris qui s'oriente par rapport aux indices distaux de la pièce d'expérience utilisera plutôt une stratégie de type spatiale (déplacement direct vers la cible ou un trou immédiatement adjacent avant d'y arriver). Dans la recherche sérielle, les souris se contentent de visiter de façon systématique les trous, l'un après l'autre, en longeant le pourtour du labyrinthe dans le sens des aiguilles d'une montre ou dans le sens inverse, jusqu'à parvenir au trou-cible. On peut penser que cette stratégie a pu être adoptée par les souris mal-voyantes pour trouver efficacement la cible dans cette tâche.

Durant les deux jours d'acquisition, globalement, les souris augmentent significativement leur recours à une stratégie spatiale (Effet Jour : $F_{1,47}=14,8$, $P < 0,001$; figure 39). Néanmoins, les souris tg2576 de 16 mois n'ont pas montré une telle augmentation. On note un effet global du génotype (Effet génotype : $F_{1,47}=11,1$, $P=0,001$) et une tendance à une interaction significative entre les facteurs Jour, Génotype et Age ($F_{1,47}=3,28$, $P=0,07$), qui est vraisemblablement due à un mauvais niveau de performances de la part des souris tg2576 âgées.

Entre le jour 3 et le jour 4, les souris âgées, wt et tg2576, sont les plus touchées par le *reversal*, alors que les souris jeunes ne sont que légèrement perturbées par le changement de position de la cible (Effet Age : $F_{1,47}=10,9$, $P=0,001$, Jour X Age : $F_{1,47}=3,57$, $P=0,06$). Il y a encore un effet du génotype sur cette phase de transition, qui est toujours dû au mauvais niveau de performances chez les souris tg2576 âgées (Effet génotype : $F_{1,47}=11,1$, $P=0,001$; Jour X Génotype : $F_{1,47}=3,2$, $P=0,07$). Durant les quatre jours de *reversal*, les quatre groupes utilisent de plus en plus la stratégie spatiale (Effet Jour : $F_{5,141}=14,1$, $P < 0,001$), mais on note que les souris tg2576 l'utilisent moins que les souris wt (effet Génotype : $F_{1,47}=26,86$, $P < 0,001$). En effet, elles dépassent à peine 60% d'utilisation de ce type de stratégie à la fin du *reversal*, alors que les souris wt finissent cette acquisition à 90 %. On observe aussi un effet globalement significatif de l'âge (Effet Age : $F_{1,47}=7,65$, $P < 0,008$), les souris âgées mettant plus de temps que les souris de 8 mois pour recourir à une stratégie spatiale (Jour X Age : $F_{3,141}=2,5$, $P=0,05$). En ce qui concerne le pourcentage d'utilisation de la stratégie sérielle, il n'y a que le groupe de souris tg2576 âgées de 16 mois qui utilise cette stratégie plus fréquemment lors du deuxième jour par rapport au premier (J1 : 17 ± 3 % ; J2 : 23 ± 6 %), Il n'y a pas d'effet de génotype ni de l'âge sur l'utilisation de la stratégie sérielle sur les deux jours d'acquisition (Génotype X Jour : $F_{1,47}=0,41$, $P=0,5$; Age X Jour : $F_{1,47}=1,23$, $P=0,26$). Dans la phase de *reversal*, les souris tg2576 semblent utiliser la stratégie sérielle plus que les

souris wt, sur les quatre jours de *reversal*, il y a un effet de génotype (Effet génotype ; $F_{1,47}=5,5$, $P=0,02$, Génotype X Jour : $F_{3,141}=2,6$, $P=0,05$). Il est intéressant de noter qu'au quatrième jour de *reversal*, les souris tg2576 utilisent toujours la stratégie sérielle plus fréquemment que les wt (wt ; 8 mois ; 10.1 ± 4.2 % ; 16 mois : 5.3 ± 3.3 / tg2576 ; 8 mois ; 33.3 ± 8.2 % ; 16 mois : 22.5 ± 7.4).

Si on analyse chaque génotype à part, chez les souris tg2576, il y a un effet de l'âge sur les 2 jours de l'acquisition (Jour X Age : $F_{1,23}=6$, $P=0,02$), et un effet global de l'âge dans le *reversal* (Effet Age : $F_{1,23}=4.4$, $P=0.04$). Par contre, chez les souris wt, on ne relève aucun effet significatif de l'âge dans les 2 phases du test (Acquisition, Jour X Age : $F_{1,24}=0,009$, $P=0,93$; *Reversal*, Effet Age : $F_{1,24}=3,1$, $P=0,09$; Jour X Age : $F_{3,73}=1,8$, $P=0,3$). Donc, les deux groupes d'âge de souris wt ont été regroupés et analysés pour la mutation *rd* (figure 39B). A notre grand étonnement, durant les deux jours d'acquisition, il n'y a aucun effet significatif de la mutation *rd* (Jour X Age : $F_{1,24}=0,1$, $P=0,69$), et il en va de même pour les quatre jours de *reversal*. On ne constate pas non plus d'effet significatif de la mutation *rd* sur l'utilisation d'une stratégie spatiale (Jour X *rd* : $F_{3,72}=0,34$, $P=0,8$).

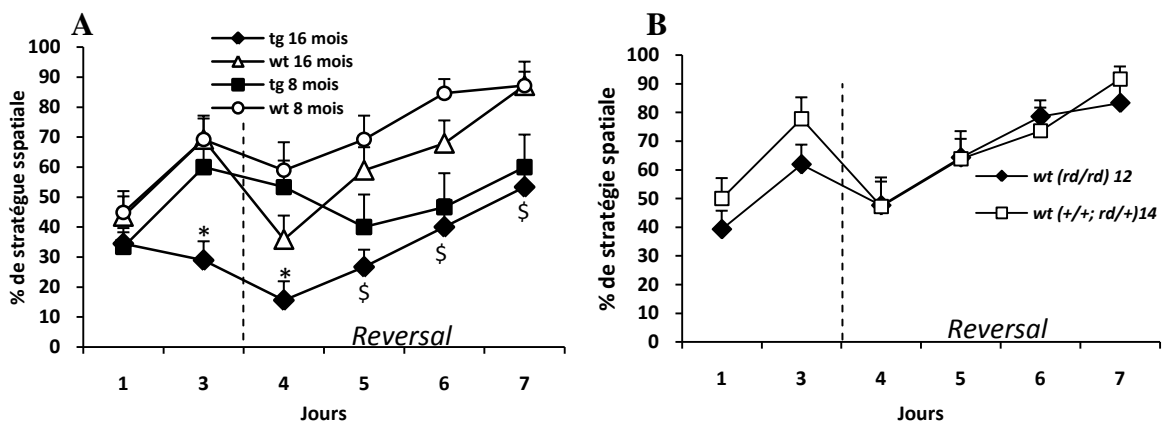


Figure 39. Utilisation (en %) de la stratégie spatiale dans la tâche du labyrinthe de Barnes pour trouver le trou-cible. Les graphiques représentent les moyennes (\pm erreurs type) du pourcentage d'essais caractérisés par l'utilisation d'une stratégie spatiale pour les différents groupes de génotype en fonction l'âge (A) et en fonction de la mutation *rd* pour les souris wt (B). Les effectifs des souris wt (*rd/rd*) et (+/+; +/rd) de chaque groupe sont indiqués dans la légende du graphe B. (* significativement différent des autres groupes, \$ significativement différent des wt).

Dans le premier test de rétention (*probe 1* ; figure 40A), les souris wt montrent une forte préférence pour la stratégie spatiale (77 % pour le groupe de 8 mois ; 69 % pour le groupe de 16 mois). En revanche, les souris tg2576 ne présentent qu'un faible pourcentage d'utilisation de la stratégie spatiale (26 % pour le groupe de 8 mois ; 20 % pour le groupe de 16 mois) ; on relève un effet significatif du génotype sur l'utilisation de la stratégie spatiale ($F_{1,47}=10,1$, $P=0,002$) par rapport aux stratégies sérielle et aléatoire. Il n'y a pas d'effet significatif de l'âge sur la répartition des stratégies. On constate cependant un effet du génotype sur l'utilisation de la stratégie sérielle (Effet génotype ($F_{1,47}=3.6$, $P=0.06$)).

Les données ont donc été analysées en fonction de la mutation *rd* (figure 40B). Chez les souris wt, on relève une incidence de 83 % en ce qui concerne la stratégie spatiale chez les souris (*rd/rd*), et 65 % chez les souris voyantes.

Dans le 2^{ème} probe, il n'y a que les souris wt de 8 mois qui présentent un pourcentage élevé d'utilisation de la stratégie spatiale (70%), alors que tous les autres groupes ont un pourcentage qui atteint au mieux 50 %. Il n'y a pas d'effet significatif de la mutation *rd* sur l'utilisation de la stratégie spatiale ($F_{1,24}=1,1$, $P=0,29$)

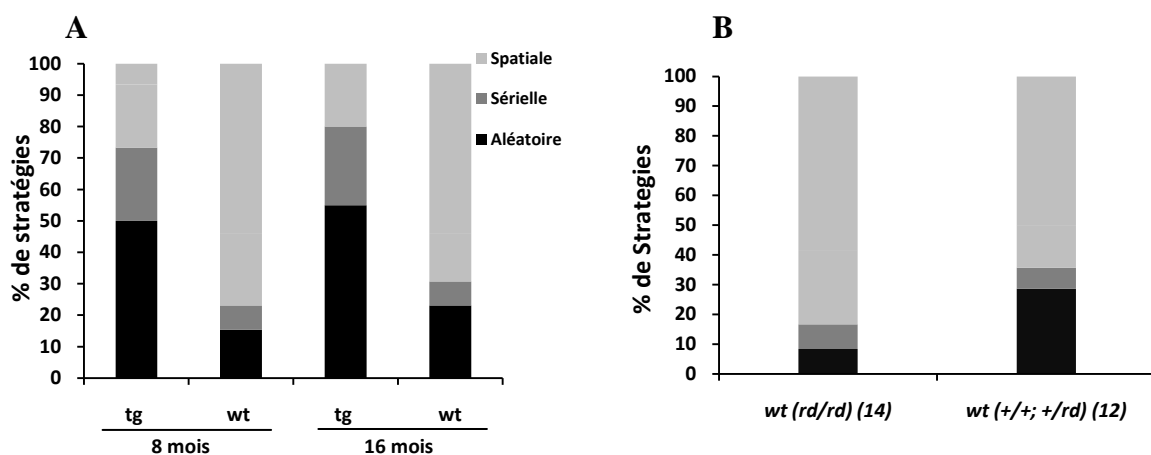


Figure 40. Stratégies utilisées par les souris pour retrouver le trou-cible durant le *probe 1* de la tâche du labyrinthe de Barnes. Les graphiques représentent les moyennes des pourcentages d'essai correspondant à chaque stratégie (spatiale, sérielle ou aléatoire) dans les différents groupes de génotype en fonction l'âge (A), et en fonction de la mutation *rd* pour les souris wt (B). Les effectifs des souris (*rd/rd*) et (+/+ ; +/-rd) sont indiqués entre parenthèses.

5. Tâche de discrimination olfactive

Dans cette tâche, on analyse les temps de fouille dans la sciure dans le pot dont l'odeur est associée à la présence de pâtes et celui dont l'odeur ne l'est pas. Tous les groupes montrent un bon niveau de performance (figure 41). En effet, l'ensemble des souris préfèrent fouiller dans le pot dont l'odeur a été associée aux pâtes au cours de la phase d'apprentissage (Effet Odeur : $F_{1,44}=87,5$, $P < 0,001$). Il n'y a pas d'effet significatif de l'âge, du génotype, ou de l'interaction entre ces facteurs.

Les différents groupes d'âge ont été regroupés et analysés en fonction de la mutation *rd* (figure 41B). L'ensemble des groupes présente un bon niveau de performance, et ce indépendamment du statut de la mutation *rd* (Effet *Rd* : $F_{1,46}=0,9$, $P=0,33$; Odeur X *Rd* : $F_{1,46}=0,06$, $P=0,8$).

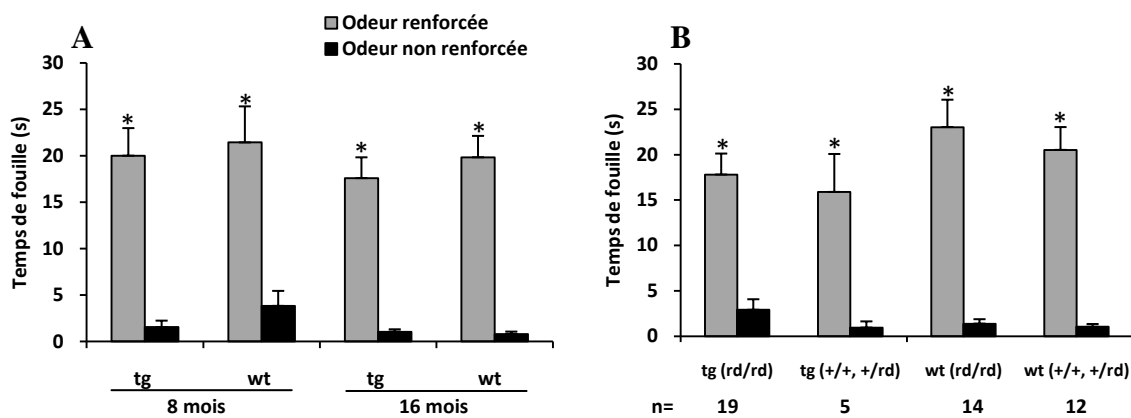


Figure 41. Performances des souris *tg2576* et *wt* dans le test de discrimination olfactive. Les graphiques représentent les moyennes (+ erreur type) de temps de fouille dans chaque pot associé ou non à une odeur renforcée dans les différents groupes de génotype en fonction l'âge (A) et en fonction de la mutation *rd*. Les effectifs *n* des souris (*rd/rd*) et (*+/+ ; +/rd*) de chaque groupe sont indiqués sous le graphique B. (* : $P \leq 0,05$, significativement différent de l'autre odeur).

6. Tâche d'évitement passif

Lors de la séance d'acquisition, les souris des quatre groupes sont rapidement entrées dans le compartiment sombre. Lors de la séance de rétention, 24 h plus tard, l'ensemble des souris présente une bonne performance (figure 42A). En effet, les différents groupes augmentent significativement leur latence d'entrée dans le compartiment sombre (Effet Séance : $F_{1,46}=57,5$, $P < 0,001$). Il n'y a pas d'effet de l'âge, du génotype, ou de l'interaction entre ces deux facteurs (Séance X génotype : $F_{1,46}=0,6$, $P=0,42$; Séance X Age : $F_{1,46}=0,5$, $P=0,5$).

Les différents groupes d'âge ont été regroupés et analysés en fonction de la mutation *rd* (figure 42B). Mais cette mutation n'a pas d'effet sur la performance des souris dans cette tâche (Effet *Rd* : $F_{1,46}=0,3$, $P=0,6$; Séance X *Rd* : $F_{1,46}=0,1$, $P=0,76$; pas d'interaction Génotype X *Rd*).

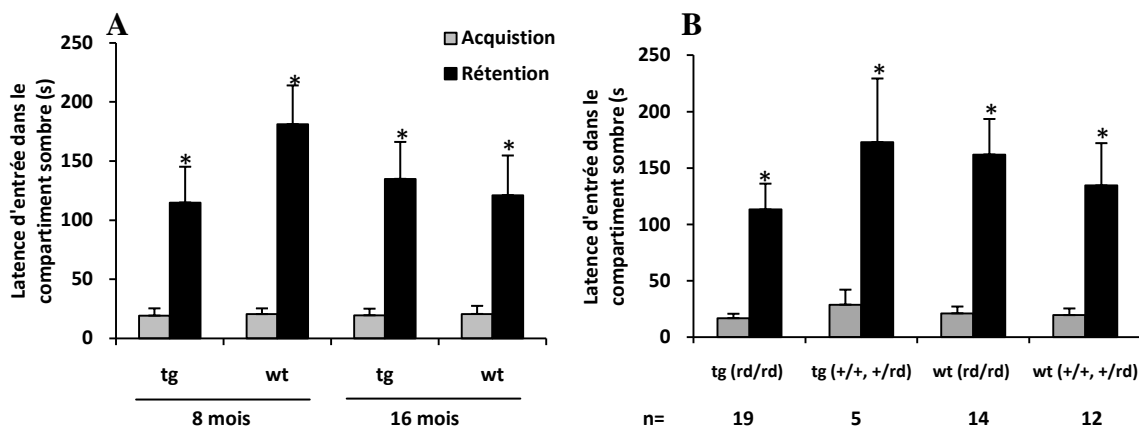


Figure 42. Performances au cours des séances d'acquisition et de rétention dans la tâche d'évitement passif. Les graphiques représentent la moyenne (+ erreurs type) des latences d'entrée dans le compartiment sombre des différents groupes de génotype en fonction l'âge (A) et en fonction de la mutation *rd*. Les effectifs (n) des souris (*rd/rd*) et (*+/+ ; +/rd*) de chaque groupe sont indiqués sous le graphe B. (* : $P \leq 0,05$, significativement différent des performances d'acquisition).

3. Discussion du chapitre

Le but du travail présenté dans ce chapitre était : (1) de montrer un éventuel déficit mnésique qui serait indépendant de la mutation *rd* chez les souris tg2576, (2) de sélectionner le ou les tests susceptibles de mettre en évidence une éventuelle interaction entre des lésions cholinergiques et des lésions du cortex entorhinal chez les souris tg2576 et leurs wt (chapitre 3).

Mes résultats me conduisent à conclure à l'existence d'un déficit robuste de la mémoire spatiale dans le test du labyrinthe de Barnes chez les souris tg2576, ainsi que dans le test de reconnaissance de la nouveauté spatiale. Je relève également une augmentation de l'activité locomotrice chez les souris tg2576 âgées de 8 et 16 mois. Par contre, celles-ci ne montrent aucun déficit dans le test de reconnaissance d'objet, le test de labyrinthe en Y, le test de discrimination olfactive et le test d'évitement passif.

Test d'activité locomotrice

Les données recueillies dans le test de l'actographie montrent que les souris tg2576 présentent une habituation au nouveau contexte comparable à celle relevée chez les souris wt. Cependant, les souris tg2576 sont plus actives que les wt, mais l'évolution de l'activité locomotrice au cours du temps est similaire. Des résultats comparables ont été obtenus dans d'autres études sur les mêmes types de souris (Gil-Béa et coll., 2007 ; Gorman et coll., 2010 ; Ognibene et coll., 2004). L'augmentation de l'activité locomotrice peut être due à plusieurs causes. Il a été montré que les récepteurs muscariniques M1 jouent un rôle critique dans le contrôle de l'activité locomotrice (Miyakawa et coll., 2001). Or, les souris tg2576 présentent une diminution du nombre de récepteurs muscariniques de type M1 dans les aires corticales et dans l'hippocampe à partir de 8 mois d'âge (Apelt et coll., 2002). On peut noter au

passage, même si c'est une digression ici, que les patients Alzheimer présentent une perturbation de couplage des récepteurs M1 aux protéines G (Tsang et coll., 2006).

D'autre part, l'anxiété ne semble pas jouer un rôle dans l'activité locomotrice chez les souris tg2576, Gil-Béa et ses collaborateurs (2007) ayant rapporté que le niveau de corticostérone dans l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien, qui intervient dans la modulation de l'anxiété, de la dépression, de la désinhibition et de l'humeur (Arborelius et coll., 1999 ; Kloet et coll., 2005), est similaire à celle des souris wt. Qui plus est, les études réalisées sur les souris tg2576 dans le labyrinthe en croix surélevé montrent une tendance à la désinhibition chez les souris tg2576, mais qui pourrait être un simple biais à rattacher à une activité locomotrice augmentée. Enfin, on ne peut exclure que l'augmentation progressive du taux d'A β , que ce soit sous forme de plaques ou sous forme soluble, pourrait jouer un rôle dans l'accroissement de l'activité locomotrice.

Les données de l'actographie sont également analysées en fonction de la mutation *rd*. Je n'ai malheureusement pas pu faire cette étude sur les souris tg2576 à cause de nombre insuffisant de souris mal-voyantes (4) et d'une variabilité interindividuelle importante au niveau des scores de ces souris. Les souris wt mal-voyantes montrent une très légère hyperactivité par rapport aux souris voyantes. Cependant, les souris mal-voyantes ont mis plus de temps à s'habituer au nouveau contexte. Ces résultats ne sont pas en accord avec ce que j'ai obtenu dans le chapitre 1. Il est intéressant de noter qu'un grand nombre de souris tg2576 et wt ont montré un comportement stéréotypé, alors que d'autres souris n'ont tout simplement pas bougé. Pour ces raisons, il semblait préférable de ne pas tester les souris de ce fond génétique (C57;SjL) dans le test de d'activité locomotrice.

Test de reconnaissance d'objets et de leur configuration spatiale

Dans la tâche de reconnaissance spatiale, les souris tg2576 n'ont pas détecté le changement de configuration spatiale des objets. Cependant, les souris wt ont montré une sensibilité à ce changement. Celle-ci se manifeste par une exploration accrue de l'objet qui est changé de place. Alors que dans la tâche de reconnaissance d'objet, les souris tg2576 et les souris wt ne montrent aucun déficit dans la détection du nouvel objet, ce qui indique que le processus impliqué dans la reconnaissance d'objet *per se* est intact chez les souris tg2576. Ceci avait déjà été montré chez les tg2576 (Hale et Good, 2005 ; Good et coll., 2007 ; Ognibene et coll., 2005). L'ensemble des résultats obtenus dans les deux tâches pourrait donc indiquer que le déficit de reconnaissance de la nouveauté spatiale chez les souris tg2576 n'est pas la conséquence d'un effet du transgène sur la perception des objets ou d'une perturbation de l'encodage relative aux objets, responsable de la généralisation entre les objets (Tippett et coll., 2003). Les souris wt sont capables de former une mémoire intégrée des propriétés spatio-temporelles des objets dans leur environnement, alors que les souris tg2576 sont incapables de former ce genre de mémoire, que l'on peut, par certains aspects, rapprocher d'une mémoire épisodique (*episodic-like memory* - Good et coll., 2007). Les patients Alzheimer sont également déficitaires dans les tests qui nécessitent de mémoriser la place des objets (Lee et coll., 2003 ; Swainson et coll., 2001). En effet, il a été suggéré que ce type de test permet de détecter les stades précliniques de la MA (Blackwell et coll., 2004). Cependant, il est intéressant de noter que la mémoire de reconnaissance est touchée en phase précoce dans la MA (Fleischman et coll., 2005 ; Camus et coll., 2003), mais ce n'est pas le cas avec les souris tg2576. Il a été montré que les rats ayant subi une lésion hippocampique sont incapables de former une mémoire intégrée des propriétés spatio-temporelles des objets (Clayton et coll., 2001 ; Morris, 2001), ce qui suggère que l'hippocampe joue un rôle critique

dans ce processus, et pourrait être l'une des régions cérébrales dont le fonctionnement est altéré chez nos tg2576.

Dans ce test aussi, les souris tg2576 mal-voyantes montrent les mêmes performances que les souris voyantes. En effet, l'effet de la mutation *rd* est similaire chez les souris wt et les souris tg2576 dans le test de reconnaissance spatiale et le test de reconnaissance d'objet. Nous avons donc posé l'hypothèse de la capacité des souris wt mal-voyantes de développer une représentation spatiale de leur environnement en se basant sur des processus non-visuels, et que l'A β empêche cette capacité chez les souris tg2576 mal-voyantes.

Test du labyrinthe de Barnes

Dans le test du labyrinthe de Barnes, j'ai mis en évidence un déficit chez les souris tg2576 de 16 mois en termes de latence d'entrée dans le trou-cible, alors que les souris tg2576 de 8 mois et les souris wt de 16 mois montrent une modeste différence en comparaison avec les souris wt de 8 mois sans effet marqué de *reversal*. En termes d'erreurs de mémoire de référence et dans le *probe 1*, les souris tg2576 des deux âges sont déficitaires par rapport aux deux autres groupes. Dans le *probe 2*, seules les souris wt de 8 mois ont montré une préférence pour le trou-cible. En termes de fréquence d'utilisation de la stratégie spatiale, les souris tg2576 des deux âges tardent davantage à utiliser ce type de stratégie par rapport aux souris wt au cours de la phase d'acquisition. Cependant, dans le *probe*, les souris wt sont les seules à utiliser préférentiellement la stratégie spatiale. L'ensemble de ces données, montre que les souris tg2576, notamment celles de 16 mois, sont les plus touchées par le déficit de la mémoire spatiale, alors que les souris tg2576 de 8 mois présentent un déficit modéré de la mémoire spatiale, qui ne s'est révélé que lors du test de rétention.

Beaucoup d'études comportementales ont été réalisées sur les souris tg2576 et leurs témoins wt. Cependant, comme cela est le cas pour d'autres tests, l'existence ou non d'un déficit chez les souris tg2576 est aussi controversée dans le test du labyrinthe de Barnes, parfois même au

sein d'un même laboratoire. Des études ont montré que cette lignée présente un déficit à 3 mois d'âge, alors que d'autres études n'ont pas retrouvé de déficit, même à 19 mois d'âge (King et coll., 1999 ; Pompl et coll., 1999 ; King et Arendash 2002). Par ailleurs, il a été montré que les souris APP23 âgées de 12 mois nécessitent un entraînement plus long avant d'utiliser une stratégie spatiale pour appréhender le test du labyrinthe de Barnes, ce qui est en accord avec mes propres résultats sur un autre modèle de souris APP (Prut et coll., 2007). Le déficit dans ce test, comme c'est d'ailleurs le cas dans bon nombre de tests évaluant la mémoire dite de référence, est très probablement dû à un dysfonctionnement hippocampique (Bizon et coll., 2007). D'après O'keefe et Nadel (1978), l'hippocampe permet à l'animal de traiter les informations spatiales propres à son environnement, à organiser celles-ci sous forme d'une carte cognitive, à la mémorisation et à la mise à jour de celle à laquelle il contribue (Tolman, 1948). Des études ont fini par donner une assise solide à ce point de vue, notamment celle de Morris (1983) qui a mis en évidence un déficit de la mémoire de référence chez des rats ayant subi une lésion de l'hippocampe.

En ce qui concerne l'effet *rd*, mes résultats confirment très largement ceux que j'ai obtenus dans les études présentées au chapitre 1 de ma thèse, à savoir que chez les souris wt, cette mutation n'a pas d'effet dans un certain nombre de tests.

Test d'alternance dans le labyrinthe en Y

Dans le test du labyrinthe en Y, qui est un test de la mémoire de travail basé sur le déplacement égocentré des animaux, l'ensemble des groupes a présenté un pourcentage d'alternance supérieur au hasard. Ce test est fréquemment utilisé pour mettre en évidence un déficit dépendant de l'âge des souris tg2576, et ce à partir de 6 mois d'âge (Hisao et coll., 1996 ; Mouri et coll., 2007). En revanche, quelques études n'ont pas réussi à mettre en évidence un déficit d'alternance chez cette lignée, même à 15 mois (Fonseca et coll., 2009).

Dans ce test comme dans le test de Barnes et le test de reconnaissance spatiale, l'hippocampe joue un rôle dans la réalisation de cette tâche. Des études ont montré que les lésions de l'hippocampe chez le Rat et la Souris diminuaient la capacité d'alternance (Douglas, 1989 ; Conrad et coll., 1996). Il est intéressant de noter que l'effet *rd* est absent dans ce test aussi, test dans lequel le niveau de stress est probablement très faible comparativement à ce qui se passe dans un test comme la piscine de Morris.

Dans le test d'évitement passif, l'ensemble des données indiquent que tous les groupes ont montré de bonnes performances d'acquisition et une bonne rétention. Ces résultats confirment d'autres études réalisées sur les souris *tg2576* et leurs témoins *wt* entre les âges de 4 et 14 mois (McArthur et coll., 1999). On peut souligner au passage que ce test ne semble pas des plus adéquats pour tester le déficit de la mémoire contextuelle déjà décrit sur les *tg2576* (Bothe et coll., 2005). King et Arendash (2002) ont montré que ces souris présentaient une résistance à l'entrée dans le compartiment noir, et ce dans les deux étapes du test (acquisition et rétention). Il est intéressant aussi de noter que les souris PDAPP ne présentent pas de déficit dans ce test (Malherbe et coll., 1996).

Encore une fois, il n'y a pas effet de la mutation *rd* sur la performance des souris dans ce test.

Test de discrimination olfactive

Dans le test de discrimination olfactive, les *tg2576* n'ont présenté aucun déficit. Cependant, de nombreuses études ont mis en évidence un déficit dans la mémoire olfactive chez les souris *tg2576*, et ce dès l'âge de 3 mois (Young et coll., 2009 ; Wesson et coll., 2010). Il faut souligner toutefois que notre test, qui est adapté à partir de celui décrit par Schellink et ses collaborateurs (2001), semble être très facile pour les souris. Dans les autres tests qui ont pu

mettre en évidence un déficit de mémoire olfactive dans cette lignée, les souris sont exposées à un minimum de 7 odeurs, contre 2 seulement dans le nôtre. De plus, il a été montré que, macrosmates, les rongeurs possèdent une capacité exceptionnelle à mémoriser et discriminer les odeurs (Dudchenko et coll., 2000). Le mécanisme d'olfaction dépend de trois circuits : le bulbe olfactif, l'hippocampe et le cortex piriforme (Wachowiak et Shipley, 2006 ; Wilson et Stevenson, 2006). Comme je l'ai déjà évoqué, le déficit chez les patients Alzheimer ne serait pas nécessairement de type mnésique, mais pourrait très bien être lié à une anosmie précoce, et il pourrait en aller de même pour les souris tg2576, notamment parce que le déficit au test de mémoire olfactive est évident dès l'âge de 4 mois, c'est-à-dire bien avant l'apparition de l'A β soluble.

Conclusions

Dans le cas de la MA, il existe une perte neuronale affectant particulièrement le CE et le système cholinergique au niveau des NCB (Cassel et coll., 2007; Gomez-Isla et coll., 1996), qui contribue avec l'A β - sous forme soluble ou sous forme de dépôts - aux troubles cognitifs et la perte de mémoire chez les patients Alzheimer. Cependant, bien que la souris tg2576 développe des dépôts amyloïdes, de telles modifications ne sont pas retrouvées (Irizarry et coll., 1997). Le mécanisme de la perte mnésique et celui de son apparente sélectivité par rapport aux différents types de mémoire chez les souris tg2576 est encore mal compris. Il a été soupçonné pendant plusieurs années que l'accumulation des dépôts amyloïdes est corrélée avec l'amplitude du déficit cognitif dans le cas de la MA (Hsiao et coll., 1996). Cependant, l'A β est présent également dans le cerveau sous la forme de monomères, dimères et oligomères (Morris et coll., 2006). Plus tard, plusieurs auteurs ont émis l'hypothèse que l'accumulation des dépôts amyloïdes n'est pas forcément corrélée avec la sévérité des troubles cognitifs, ni chez les patients Alzheimer, ni chez les souris transgéniques (Nagy et coll., 1995 ; Holcomb et coll., 1998 ; Dodart et coll., 1999 ; Westerman et coll., 2002). Des

études ont montré récemment que la forme oligomérique de l'A β , et non les dépôts amyloïdes eux-mêmes, est responsable des déficits cognitifs et que sa présence semble corrélée au degré de déficit cognitif dans la MA (Ashe, 2005 ; Klein et coll., 2001 ; Hardy et Selkoe, 2002). Finalement, il a été montré que l'A β , sous sa forme oligomérique (dodécamère) appelée A β *56 joue un rôle critique au niveau de la perte de mémoire et du déficit de mémoire. En effet, l'instillation A β *56 en I.C.V induit un déficit de mémoire de référence chez des rats dépourvus de toute pathologie avant l'instillation (Lesné et coll., 2006).

Comme je l'ai déjà évoqué, la souris tg2576 ne présentent que des déficits cognitifs modestes dans des tâches de navigation spatiale même avec une histopathologie amyloïde très sévère (Bizon et coll., 2007). De ce fait, les lésions combinées du CE et des NCB pourront modéliser des phases encore plus avancées de la MA, au plan histopathologique et au plan comportemental, et leurs effets pourront être évalués sur les performances de navigation spatiale dans le test du labyrinthe de Barnes.

Chapitre III. Lésions combinées du CE et des NCB chez la souris tg2576 : effets comportementaux et histopathologiques.

1. Introduction

Plusieurs études ont été réalisées sur les rongeurs pour modéliser les phases avancées de la MA. Tous les essais de lésions de chacune des deux structures majeures impliquées dans la MA (le CE et les NCB), l'une indépendamment de l'autre, n'ont, en général, entraîné que des déficits assez modestes en ce qui concerne la mémoire spatiale chez les rongeurs (Parent et Baxter, 2004; Coutureau et Di Scala, 2009; Cassel et coll., 2008). Notre équipe était la première à avoir eu l'idée de combiner les deux formes de dégénérescences neuronales de la maladie chez le Rat en utilisant une approche lésionnelle (Traissard et coll., 2007). Dans cette étude, les lésions du CE ont été réalisées à l'aide de la neurotoxine NMDA, et les lésions des NCB à l'aide de l'immunotoxine 192 IgG-saporine (version Rat de la mu p75-saporine chez la Souris). Ces lésions ont été pratiquées sur l'une ou l'autre des deux structures (CE ou SAP) ou bien en combinaison (CE+SAP), puis les différents groupes de lésions ont été testés dans des tâches de mémoire spatiale. L'évaluation des fonctions mnésiques a été menée à l'aide du test de la piscine de Morris, de celui du labyrinthe radial et de celui du labyrinthe de Hebb-williams. Toutes les souris ont également été testées dans un test d'activité locomotrice et dans le test de franchissement de la barre.

La lésion seule du CE a induit un déficit modéré d'acquisition et de rétention dans la piscine de Morris, mais le déficit était plus marqué sur l'acquisition de la composante de mémoire de référence dans la tâche du labyrinthe radial et dans celle du labyrinthe de Hebb-williams. Dans les trois tâches, les variables objectivant une forme de mémoire de travail (erreurs répétitives et version mémoire de travail de la piscine) étaient modérément affectées par cette lésion. Par ailleurs, les rats SAP ne présentaient pas de déficits, et disons tout de suite que

ceux-ci étaient modestes, que dans le test de rétention (*probe*) réalisé à un délai de 24 h dans la piscine de Morris et en termes de mémoire de référence dans le labyrinthe radial. Cependant, et cette observation était le point le plus intéressant de l'étude, les rats CE+SAP ont présenté des déficits massifs au niveau de la mémoire spatiale dans la piscine de Morris (performances de mémoire de référence et au test de rétention), dans le labyrinthe de Hebb-williams et dans le test du labyrinthe radial, et ce aussi bien en termes de mémoire de référence que de mémoire de travail. Les rats doublement lésés présentaient également une hyperactivité locomotrice, alors que chacune des lésions seules n'induisait qu'une faible augmentation du niveau d'activité (Traissard et coll., 2007). Sur la base de l'aggravation massive des déficits lorsque les deux lésions sont combinées, Traissard et ses collègues (2007) ont proposé que la double lésion pourrait modéliser une phase relativement avancée de la démence dans la MA. Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, aucun des modèles de souris transgénique utilisé à ce jour pour modéliser la MA ne présentent à la fois une perte neuronale dans le CE et dans les NCB. L'étude qui suit combine l'approche lésionnelle et l'approche transgénique pour étudier l'impact des pertes neuronales sur les performances de mémoires et le développement de la pathologie amyloïde chez la souris tg2576.

La lésion du CE à elle seule pourrait induire des modifications de la pathologie comme cela a été montré chez les souris APP/PS1, en particulier au niveau de l'hippocampe (Van Groen et coll., 2004). En effet, dans l'hippocampe de ces souris, on observe une réduction des dépôts amyloïdes diffus, sans affecter le nombre de plaques dans les aires de projections du cortex entorhinal. Ce travail montre que la perte des afférences entorhinales joue probablement un rôle important dans la pathologie amyloïde au niveau de l'hippocampe dans la MA. Par ailleurs, plusieurs études sur des modèles animaux ou chez l'Homme suggèrent que la déafférentation cholinergique progressive observée dans la MA pourrait jouer un rôle

important dans le développement de la pathologie amyloïde (Auld et coll., 2002 ; Beach et coll., 2008 ; Chauhan et coll., 2006 ; mais voir Geula et coll., 1998). La lésion des NCB pourrait donc également induire des changements de la pathologie amyloïde au niveau des sites de projection de ces noyaux, l'hippocampe et le cortex en particulier, ainsi que des déficits mnésiques des souris tg2576. Inversement, de fortes concentrations d'A β semblent augmenter la vulnérabilité des neurones cholinergiques par un mécanisme d'excitotoxicité (Harkany et coll., 2000). Nous pourrions donc aussi observer une plus grande vulnérabilité des NCB des souris tg2576 à la mu p75-saporine. La vérification de l'une ou l'autre de ces interactions entre neurodégénérescence des NCB et protéine A β éclairerait une seconde étape de l'évolution de la maladie menant à une atteinte plus marquée de l'hippocampe et plus généralisée des aires corticales associée, à une aggravation de la pathologie amyloïde. Afin d'analyser l'impact des lésions sur le développement des dépôts amyloïdes, nous avons choisi d'opérer les souris à l'âge de 8 mois, soit juste avant l'apparition des tous premiers dépôts. Pour adapter le modèle de double lésion aux souris tg2576, j'ai d'abord déterminé la dose de NMDA permettant de réaliser des lésions marquées du CE sur des souris wt. Ensuite, il s'est agi de tester l'efficacité de l'immunotoxine mu p75-saporine et d'ajuster les coordonnées stéréotaxiques pour l'injection intracérébroventriculaire à cette lignée de souris par rapport à celles utilisées chez les souris C57BL/6J (Moreau et coll., 2008). Des essais de concentration de 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ à 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ont été testés. Malheureusement, on s'est aperçu que la mu P75-saporine provoquait des crises épileptiques chez les souris tg2576, et que ces crises s'accompagnaient d'une forte mortalité. Pour éviter la perte des animaux, l'ensemble des souris a été traité avec du diazépam (4 mg/kg, dilué dans l'eau distillée contenant du tween pour augmenter la solubilité du composé) pendant les deux semaines qui ont suivi l'injection de mu p75-saporine. Le diazépam est une benzodiazépine qui possède des propriétés anxiolytiques et anticonvulsivantes. Ce traitement nous a permis de retrouver un taux de

survie acceptable pour réaliser cette expérience (20/26 pour les tg2576 SAP ; 23/30 pour les tg2576 CE+SAP). Pour la suite, nous avons attendu 1 mois avant de commencer les tests comportementaux afin de réduire au maximum toute interaction du traitement chronique au diazepam avec les performances cognitives des souris. Idéalement, nous aurions préféré ajouter un groupe non traité au diazepam pour les tg2576 et pour les wt, afin d'évaluer l'impact à long terme de ce traitement, mais nous ne disposions pas d'un nombre suffisant de souris ayant atteint l'âge de 8 mois au moment de réaliser cette expérience.

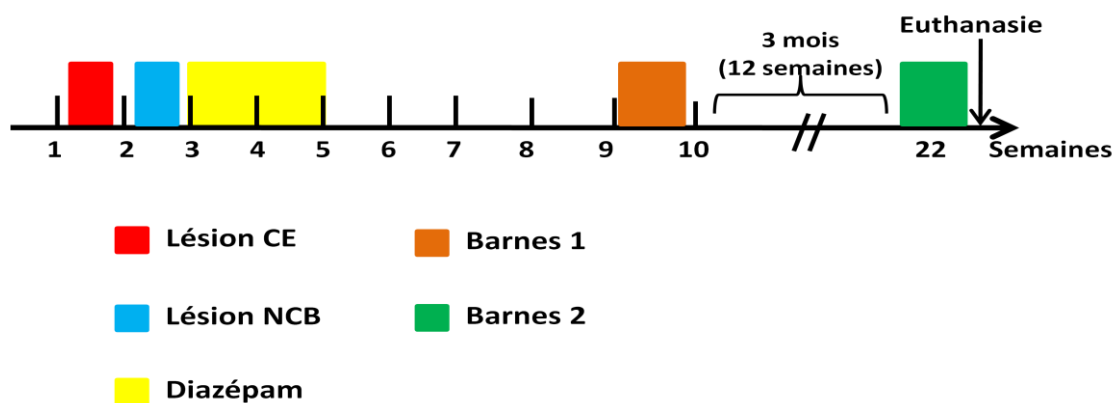
Nous avons choisi d'éprouver les effets de chaque type de lésion dans le test du labyrinthe de Barnes, plutôt que dans le test de reconnaissance spatiale (bien que j'ai montré que les deux tâches sont adaptées pour la mise en évidence d'un déficit marqué). Ce choix est à rattacher à plusieurs raisons : (1) les souris tg2576 étant déficitaires dans le test de reconnaissance spatiale dès l'âge de 8 mois, on ne pourrait que plus difficilement évaluer l'impact des lésions sur leurs performances, (2) comme je l'ai déjà évoqué, je ne pouvais pas tester les souris dans la piscine de Morris à cause de la mutation *rd*, et je ne connaissais pas à l'avance le génotype *rd* puisqu'il a été réalisé après l'euthanasie. (3) une étude menée juste avant ce travail dans notre équipe a montré que la tâche de mémoire spatiale dans le labyrinthe de Barnes (et dans la piscine, mais voir point 2 ci-dessus) sont particulièrement sensibles aux effets de la double lésion chez la souris C57BL/6 (Moreau et coll., en préparation).

Les souris ont donc été testées dans le labyrinthe de Barnes (Barnes 1), 6 semaines après les lésions (pour négliger, ou au moins minimiser tout impact du diazepam sur les performances des souris). Ensuite, les souris ont été retestées dans le labyrinthe de Barnes (Barnes 2), mais 4 mois après les lésions pour étudier l'évolution de l'impact des lésions sur chaque génotype d'un point de vue comportemental. Les souris ont été euthanasiées juste après le second test de Barnes pour analyser les effets des lésions sur la pathologie amyloïde. A ce moment-là, les souris étaient âgées de 13 mois et la pathologie amyloïde devait être en cours de

développement, quoique modérée, chez les *tg2576*, ce qui augmentait théoriquement les chances de mettre en évidence les effets d'une interaction entre l'expression du génotype et la présence d'une des lésions.

Cette expérience a été réalisée sur trois groupes de souris *tg2576* ou *wt*, âgées de 8 mois, selon le protocole expérimental décrit ci-dessous (l'expérience Barnes 2 a été réalisée sur les groupes 2 et 3 seulement). Je représente les souris témoins par (SHAM), les souris porteuses d'une lésion du CE par (CE), les souris porteuses d'une lésion des NCB par (SAP) et les souris doublement lésées par (CE+SAP).

Les souris ont été génotypées pour la mutation *rd* après l'euthanasie. Les souris qui portent des lésions aspécifiques et les souris non lésées ont été éliminées (cf. résultats de ce chapitre). L'effectif des souris analysées dans le test du labyrinthe de Barnes 1 sera (entre parenthèse le nombre des souris mal voyante *rd/rd*) : [wt : 13 SHAM (2), 13 CE (2), 13 SAP (2), 13 CE+SAP (1)] ; [*tg* : 14 SHAM (2), 14 CE (1), 13 SAP (0), 15 CE+SAP (1)].



2. Analyse comportementale

1. Test du labyrinthe de Barnes (1)

1.1. Erreurs de mémoires de référence

La figure 43 (A et B) présente pour chaque génotype le nombre moyen d'erreurs de mémoire de référence en fonction des traitements. Globalement, l'ensemble des souris améliore significativement leurs performances ($F_{4,436}=51,7$, $P < 0,001$). Les souris wt font moins d'erreurs que les souris tg2576 avant d'entrer dans le trou-cible (Effet génotype: $F_{1,109}=9,2$, $P=0,003$; Génotype X Jour: $F_{4,440}=1,7$, $P=0,1$). Toutes lésions affectent les performances et leur évolution en fonction des jours (Effet Lésion: $F_{1,109}=30,14$, $P < 0,001$; Lésion x Jour: $F_{12,436}=5,1$, $P < 0,001$). Par contre, l'effet des lésions est globalement similaire chez les souris tg2576 et les souris wt (pas d'interaction Génotype X Lésion, ni d'interaction Jour X Génotype X Lésion). Les souris SHAM des deux génotypes ont de bonnes performances dans cette tâche, car elles montrent une amélioration significative de la performance dès le deuxième jour de l'acquisition. En revanche, les souris EC et les souris SAP font plus d'erreurs que les souris SHAM, mais elles arrivent à améliorer leurs performances sur les cinq jours d'acquisition ($P < 0,05$ entre le jour 1 et le jour 5; NK). Par contre, les souris tg 2576 doublement lésées (CE+SAP) n'améliorent pas significativement leurs performances entre le jour 1 et le jour 5 ($P=0,99$), alors que les souris wt doublement lésées (CE+SAP) y parviennent tout de même ($P=0,05$).

Remarque: Les résultats statistiques ne changent pas en éliminant les souris *rd/rd*.

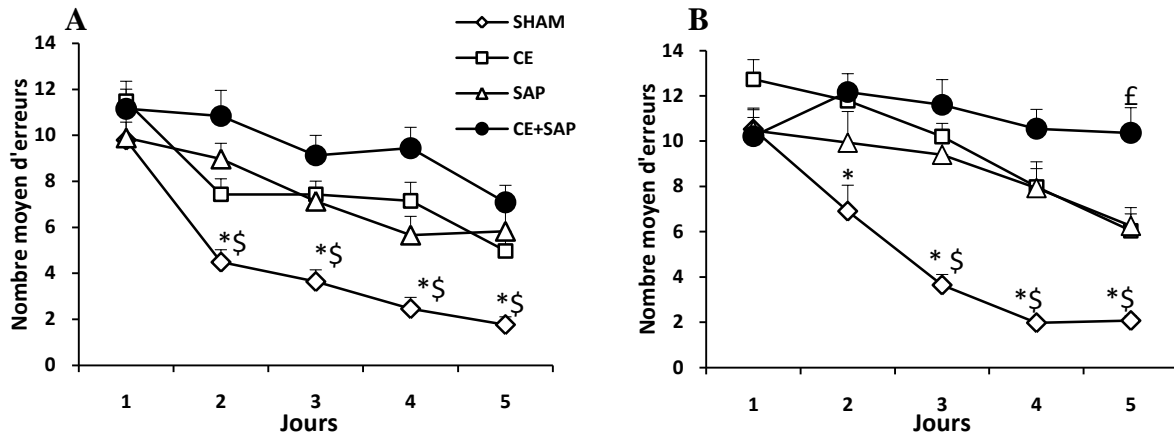


Figure 43. Performances de mémoire de référence au cours de l'acquisition de l'épreuve du labyrinthe de Barnes 1. Les graphiques représentent les moyennes (+ erreur-type) du nombre d'erreurs de mémoire de référence pour les souris WT (A) et les souris tg2576 (B) en fonction des lésions. Que ce soit pour les souris wt ou les souris tg2576, les groupes CE+SAP sont toujours différents du groupe SHAM pour les jours 2 à 5. (*, significativement différent de CE seulement, \$ significativement différent de SAP seulement, £ significativement différent de tous les autres groupes lésés avec $P < 0,05$)

1.2. Latence d'entrée dans le trou-cible

L'analyse du temps nécessaire pour entrer dans le trou-cible montre des résultats similaires à ceux obtenus pour les erreurs de mémoires de référence (Figure 44; A et B).

Globalement, l'ensemble des groupes améliore significativement leurs performances (Effet Jour: $F_{4,416}=190,2$, $P < 0,001$). On observe que les souris wt sont plus rapides que les souris tg2576 pour atteindre le trou-cible, il y a d'ailleurs un modeste effet global du génotype (Effet génotype: $F_{1,108}=3,2$, $P=0,06$). Par contre, sur les 5 jours d'acquisition et en dépit des lésions, les souris wt améliorent d'une manière plus rapide leurs performances par rapport aux souris tg2576 (Génotype X Jour: $F_{4,432}=3,4$, $P=0,009$).

Les lésions perturbent les performances des souris dans ce test, il y a un effet des lésions au niveau de la latence d'entrée dans le trou-cible (Effet Lésion: $F_{3,108}=59,2$, $P < 0,001$; Lésion X Jour: $F_{4,43}=16,8$, $P < 0,001$). L'effet des lésions est globalement comparable sur les deux génotypes (pas d'interaction Jour X Génotype X Lésion). Au regard de l'allure des courbes,

on observe que les effets pour les souris CE et SAP des deux génotypes semblent plutôt liés à un retard d'apprentissage. Les souris wt (CE) et (SAP) améliorent significativement leurs performances dès le 2ème jour d'acquisition (J1 vs J2; $P < 0,05$), alors que les souris tg (CE et SAP) n'améliorent leurs performances qu'au 3ème jour de l'acquisition (J1 vs J3; $P < 0,05$). Enfin, les souris doubles lésées, spécialement les tg2576, n'améliorent que très légèrement leurs performances (J1 vs J5 ; $P < 0,05$ pour chaque génotype). De plus, leurs performances diffèrent à la fois des groupes de lésion simple et des groupes SHAM, quel que soit le génotype.

Remarque: Les résultats statistiques ne changent pas en éliminant les souris *rd/rd*.

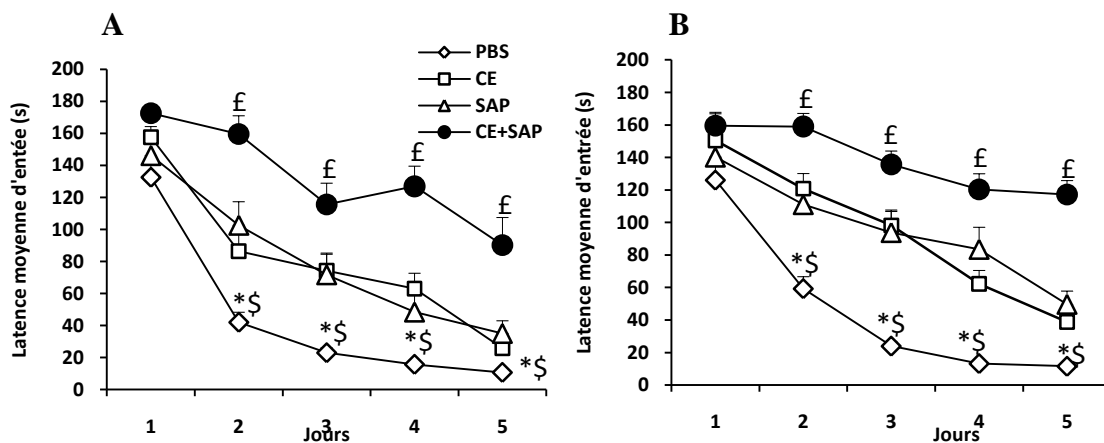


Figure 44. Temps mis pour réussir la tâche chez les souris wt et tg2576 au cours de l'acquisition du Barnes 1. Les graphiques représentent les moyennes (+ erreur type) des latences d'entrée dans le trou-cible pour les souris wt (A) et les souris tg2576 (B) en fonction des lésions. Que ce soit pour les souris wt ou les souris tg2576, les groupes CE+SAP sont toujours différents du groupe SHAM pour les jours 2 à 5. (* significativement différent de CE ; \$ significativement différent de SAP, £ significativement différent des autres groupe lésés, $P < 0.05$)

1.3. Test de rétention

Le test de rétention a lieu 3 jours (72 heures) après le dernier jour d'acquisition. Le nombre de visites totales diffère entre les groupes de lésion (effet Lésion : $F_{3,103}=11,3$; $P < 0.001$), donc j'ai analysé et présenté les résultats en fonction de l'index de visites (Figure 45 ; A et B). Globalement, les souris montrent une préférence pour le trou-cible (Effet Trou: $F_{3,309}=29,6$, $P < 0,001$). Il y a un effet significatif des lésions (Trou X Lésion= $F_{14,309}$, $P < 0.001$). En effet, les souris SHAM des deux génotypes montrent une très bonne performance dans ce test de rétention. Les souris wt (CE) et (SAP) montrent également une préférence pour le trou-cible, mais elle est moins marquée que celle des souris SHAM. Par contre, les souris tg2576 (CE) et (SAP) ne montrent plus de préférence claire pour le trou-cible, ce qui pourrait expliquer l'interaction presque significative des facteurs Trou X Génotype X Lésion ($F_{9,309}=1,6$, $P=0,09$). Enfin, les souris CE+SAP des deux génotypes montrent une très mauvaise performance dans ce test, car elles ne présentent plus aucune préférence pour le trou-cible.

Remarque: Les résultats statistiques ne changent pas en éliminant les souris *rd/rd*.

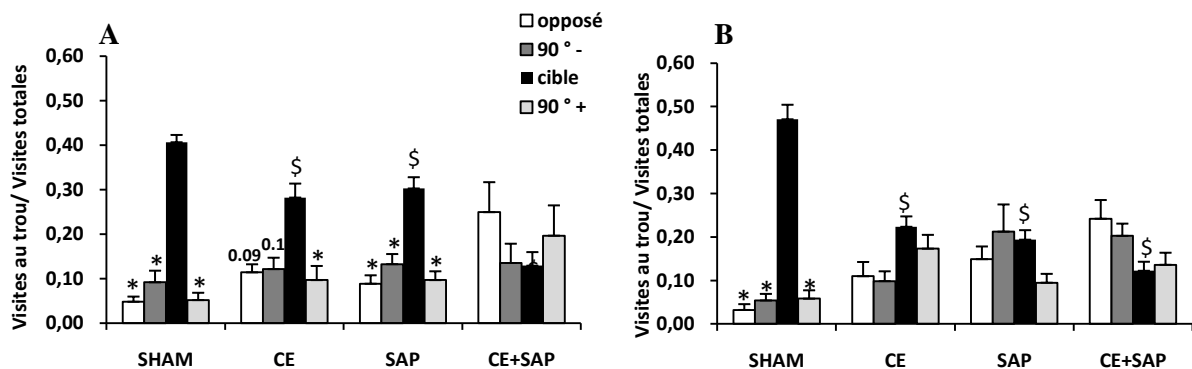


Figure 45. Performances de rétention dans le probe du Barnes 1. Les graphiques représentent l'indice des visites (\pm erreur type) aux trous pour les souris wt (A) et les souris tg2576 (B) en fonction des lésions. (*, significativement différent du trou-cible, \$ significativement différent de SHAM, $P < 0,05$).

1.4. Analyse des stratégies

Acquisition : J'ai analysé les différentes stratégies de recherche utilisées par les souris pour trouver le trou-cible (recherche spatiale, recherche sérielle et recherche aléatoire).

Globalement, l'incidence de la stratégie spatiale augmente significativement dans l'ensemble des groupes (effet Jour : $F_{4,412}=49,2$, $P < 0,001$; figure 46, A et B), même si les wt l'utilisent généralement plus fréquemment que les souris tg2576 (Effet génotype : $F_{1,103}=6,8$, $P=0,01$; Jour X génotype ($F_{4,412}=2,1$, $P=0,08$). Les lésions affectent l'utilisation de la stratégie spatiale au cours de l'apprentissage (Effet Lésion : $F_{3,103}=50,1$, $P < 0,001$; Jour X Lésion : $F_{12,342}=44,4$, $P < 0,001$), mais cet effet semble être le même pour les deux génotypes (pas d'interaction Génotype X Jour X Lésion). Les souris SHAM des deux génotypes développent une préférence pour la stratégie spatiale. En effet, au 5^{ème} jour d'acquisition, les souris wt et tg2576 atteignent un niveau d'utilisation de la stratégie spatiale comparable (wt SHAM : 79.3 ± 6 % ; tg SHAM : 74.2 ± 7 %). Les groupes de souris wt (CE) et (SAP) présentent une performance comparable dans l'utilisation de la mémoire spatiale : ils parviennent tout deux à augmenter modérément, mais significativement leur utilisation de la stratégie spatiale entre le jour 1 et le jour 5 (J1 vs J5, $P < 0,05$ pour chaque lésion). En revanche, les souris tg (CE) et (SAP) n'augmentent que légèrement le pourcentage entre le jour 1 et le jour 5 sans atteindre la significativité. Enfin, quel que soit le génotype, les souris doublement lésées (CE+SAP) ne parviennent pratiquement pas à mettre en place la stratégie spatiale (J1 vs J5, $P > 0,05$ pour chaque génotype).

Lorsque les souris lésées montrent un déficit de mise en place d'une stratégie spatiale, quelle autre stratégie mettent-elles en place pour éventuellement améliorer leur performance ? La stratégie sérielle (visiter les trous l'un après l'autre le long du bord jusqu'à trouver la cible) permet à la souris d'atteindre ce but, c'est pourquoi j'ai analysé spécifiquement cette stratégie. Il y a effectivement un effet des lésions sur l'utilisation de la stratégie sérielle

(Effet Lésion: $F_{3,99}=3,8$, $P=0,001$; Jour X Lésion: $F_{12,396}=2,4$, $P=0,005$). Par contre, l'impact des lésions sur l'utilisation de cette stratégie est globalement la même pour les deux génotypes (aucun effet Génotype, ni aucune interaction avec ce facteur). Comme on peut s'y attendre, les souris SHAM des deux génotypes utilisent de moins en moins cette stratégie au cours de l'apprentissage et paraissent privilégier la stratégie spatiale décrite ci-dessus (au 5^{ème} jour d'acquisition; wt: 15 ± 4.5 %, tg2576: 24 ± 7.8 %). Par contre, dans tous les autres groupes, on note un fort pourcentage d'utilisation de la stratégie sérielle, qui atteint un maximum au 5^{ème} jour d'acquisition ([WT; CE: 51 ± 8.9 %, SAP: 33.4 ± 9.2 %, CE+SAP: 32 ± 7 %], [tg; CE: 42 ± 6.1 %, SAP: 48.8 ± 7.1 %, CE+SAP: 36.2 ± 7 %]).

Remarque: Les résultats des analyses statistiques ne changent pas en éliminant les souris *rd/rd*.

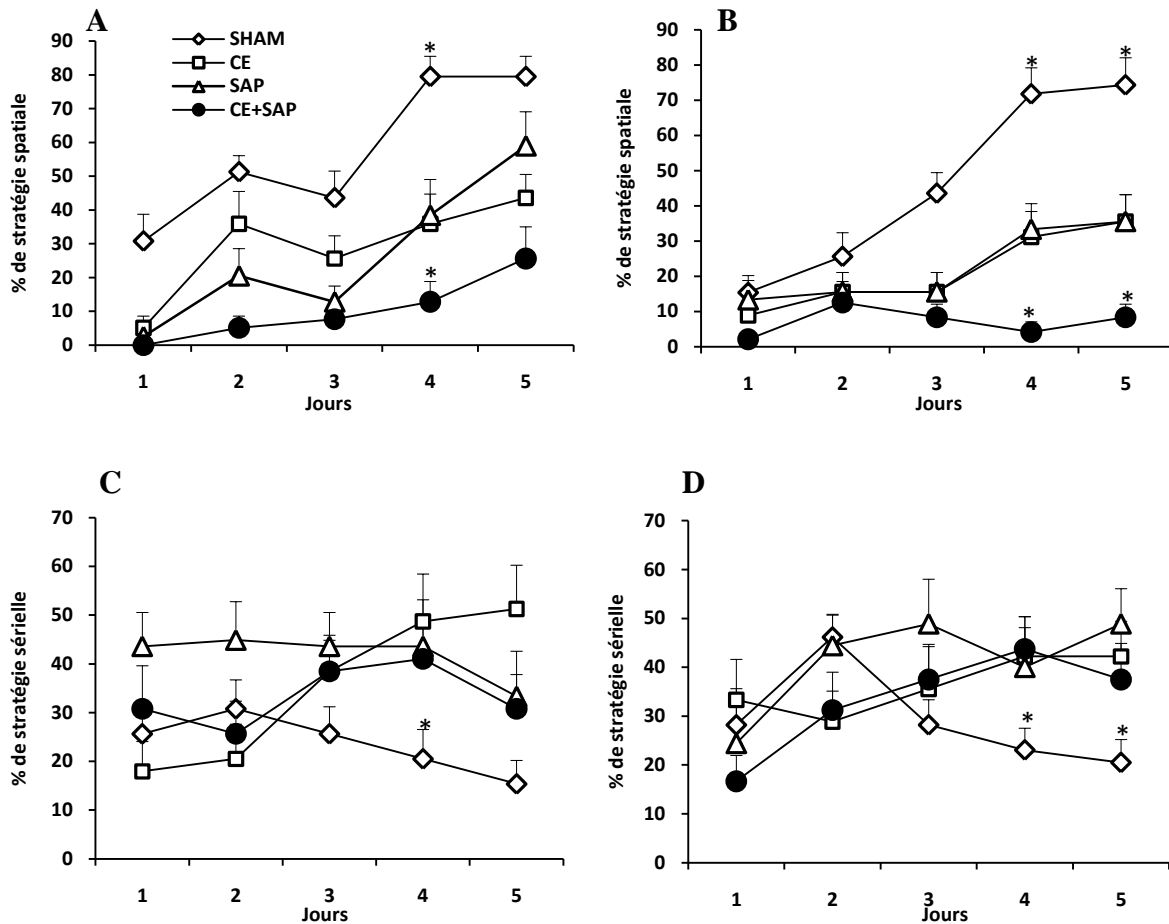


Figure 46. Pourcentage d'utilisation de la stratégie spatiale (A, B) et de la stratégie sérielle (C, D) pour retrouver le trou-cible dans le Barnes 1. Les graphiques représentent les moyennes (+ erreur type) du pourcentage d'essais utilisant la stratégie spatiale pour les souris wt (A) et les souris tg2576 (B), et les moyennes (+ erreur type) du pourcentage d'essais utilisant la stratégie sérielle pour les souris wt (C) et les souris tg2576 (D) en fonction des lésions, (* significativement différent des autres groupes, $P \leq 0.05$).

Probe : pendant le test de rétention (figure 47), les lésions affectent massivement l'utilisation de la stratégie spatiale dans le test de rétention, indépendamment du génotype (Effet Lésion : $F_{3,98}=10,8$, $P < 0,001$; pas d'interaction avec le facteur Génotype). Les souris SHAM des deux génotypes utilisent de préférence la stratégie spatiale pour aboutir à la première visite du trou-cible, et la répartition des préférences de stratégie est comparable entre les souris SHAM wt et tg2576. Les souris wt CE et SAP montrent une répartition des pourcentages de stratégie comparable pour les deux types de lésion simple. Les souris tg CE et SAP montrent

également une répartition des stratégies comparable, mais elles utilisent moins la stratégie spatiale que les souris wt ayant subi les mêmes lésions, sans que cette différence n'atteigne pour autant la significativité. Enfin, les souris tg doublement lésées (CE+SAP) de deux génotypes ont une répartition comparable des stratégies et utilisent très peu la stratégie spatiale comme en fin d'apprentissage. Elles utilisent aussi bien la stratégie aléatoire que la stratégie sérielle pour les souris tg2576 doublement lésées, et un peu plus préférentiellement la stratégie aléatoire pour les wt doublement lésées. Les lésions affectent massivement l'utilisation de la stratégie spatiale dans le test de rétention (Effet Lésion : $F_{3,98}=10,8$, $P < 0,001$).

Remarque: Les analyses statistiques ne changent pas en éliminant les souris *rd/rd*.

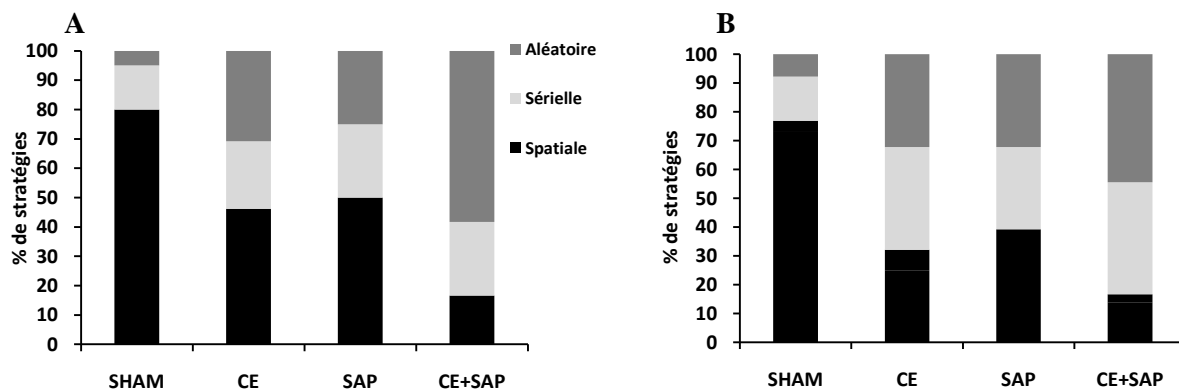


Figure 47. Pourcentage des stratégies utilisées pour trouver le trou-cible pendant le *probe* du Barnes 1. Les graphiques représentent les moyennes des pourcentages de chaque stratégie (aléatoire, sérielle ou spatiale) pour les souris wt (A) et les souris tg2576 (B) en fonction des lésions.

2. Test du labyrinthe de Barnes (2)

Le 2^{ème} test du labyrinthe de Barnes a lieu quatre mois après les lésions (soit après un délai de trois mois entre le Barnes 1 et le Barnes 2), lorsque les souris sont âgées de 13 mois. On a gardé le même protocole expérimental que celui utilisé pour le Barnes 1, mais le test s'est déroulé dans une autre salle de test, donc dans un autre environnement spatial.

Avant d'analyser les données de Barnes (2), je présente d'abord les résultats d'une analyse globale regroupant les données des souris qui ont effectué la séance 1 et la séance 2 pour détecter une évolution des effets à long terme (4 mois) des lésions chez les souris wt et chez les souris tg2576.

En terme de nombres d'erreurs pour atteindre le trou-cible, on observe un effet significatif du délai de 3 mois entre les séances du Barnes (1) et du Barnes (2) (Effet Séance : $F_{1,161}=8,9$, $P=0,003$; Séance X Jour : $F_{4,644}=3,6$, $P=0,006$). Cet effet était prévisible puisqu'il y a un effet de « réapprentissage » d'une tâche déjà maîtrisée par le passé et qui, malgré la différence d'environnement, facilite l'acquisition du Barnes 2 chez l'ensemble des animaux. Par contre, il n'y a pas d'interaction significative entre le facteur Séance et les facteurs Génotype ou Lésion, ce qui suggère que l'effet des lésions est stable d'une séance à l'autre au sein de chaque génotype.

En terme de latence d'entrée dans le trou-cible, il y a également un effet du réapprentissage sur les performances globales des souris (Effet Séance : $F_{1,159}=37,7$, $P < 0,001$; Jour X Séance: $F_{4,636}=8.5$, $P < 0.0014$). Néanmoins et cette fois, on relève une interaction significative entre les facteurs Jour X Séance X Lésion ($F_{12,636}=3,6$, $P < 0,001$), interaction qui s'explique par le fait que même certaines souris lésées améliorent leurs performances entre la séance 1 et la séance 2, comme nous le reverrons plus loin.

En revanche, il n'y a pas d'effet significatif du délai sur le *probe*. Ce résultat suggère que le probe est très spécifique de l'environnement testé et que le niveau de performance dans ce test n'est pas affecté par un réapprentissage.

Le test du labyrinthe de Barnes 2 a été réalisé sur les groupes 2 et 3. L'effectif des souris analysées dans le test du labyrinthe de Barnes 1 sera comme suit (entre parenthèse le nombre de souris mal voyantes *rd/rd*) : [wt : 6 SHAM (0), 9 CE (1), 6 SAP (1), 6 CE+SAP (1)] ; [tg : 7 SHAM (1), 8 CE (1), 9 SAP (0), 11 CE+SAP (1)].

2.1. Erreurs de mémoires de référence

Globalement, les souris améliorent significativement leurs performances au cours des cinq jours d'acquisition (Effet Jour: $F_{4,204}=20,7$, $P < 0,001$; Figure 48, A et B). Il y a un effet global du génotype (Effet Génotype: $F_{1,51}=9,2$, $P=0,003$), qui est vraisemblablement lié à de meilleures performances globale des souris wt. Il y a également un effet des lésions sur l'évolution des performances (Effet Lésion: $F_{3,51}=11,7$, $P < 0,001$; Jour X Traitement : $F_{12,204}=1.9$, $P=0.04$).

Chez les souris wt (figure 48A), les souris CE et les souris SAP ont des performances relativement similaires à celles des souris SHAM. Le léger déficit non significatif des souris lésées est probablement atténué par les bonnes performances de réapprentissage de la tâche. Par contre, si on compare les souris doublement lésées (CE+SAP) et les souris SHAM, on observe que les souris doublement lésées maintiennent un nombre très élevé d'erreurs, même sur les derniers jours d'acquisition de la tâche.

Chez les souris tg2576, au regard des courbes d'acquisition (figure 48B), on observe une mauvaise performance moyenne des souris SAP, avec un déficit particulièrement évident aux jours 3 et 4 de l'acquisition. Leurs performances sont aussi dégradées que celles des souris doublement lésées (CE+SAP), mais elles parviennent à les améliorer au tout dernier jour d'apprentissage. Par contre, de façon surprenante, les souris CE ont des performances aussi

bonnes que les souris SHAM. Enfin, les souris doublement lésées (CE+SAP) ne montrent aucune amélioration sur les cinq jours d'acquisition, alors que les trois autres groupes parviennent à des niveaux de performances ne différant pas les uns des autres lors du 5^{ème} jour d'acquisition. En résumé, tous les groupes améliorent leurs performances entre le jour 1 et le jour 5 sauf les souris CE+SAP.

Remarque: Les résultats des analyses statistiques ne changent pas en éliminant les souris rd/rd.

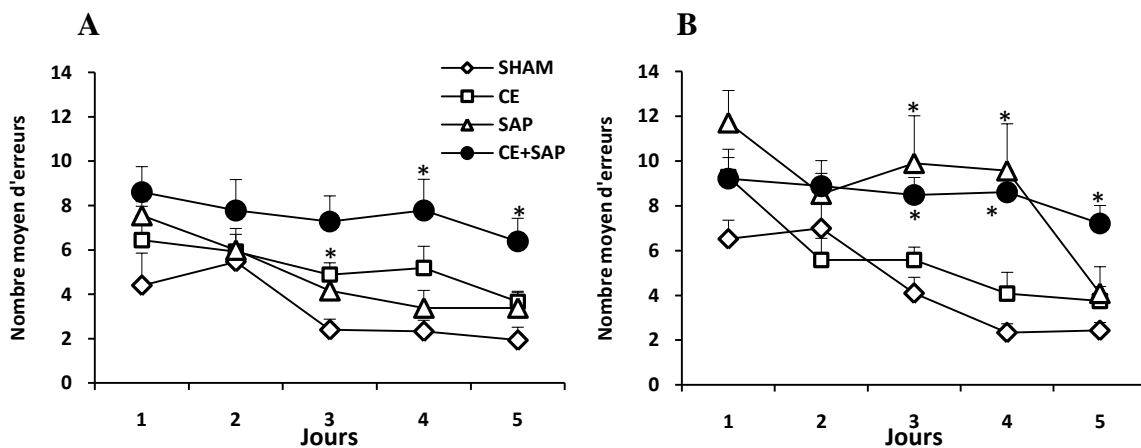


Figure 48. Performances d'acquisition dans le Barnes 2. Les graphiques représentent les moyennes (+ erreur type) des nombres d'erreurs de mémoire de référence pour les souris WT (A) et les souris tg2576 (B) en fonction des lésions. (* significativement différent de SHAM, $P \leq 0.05$).

2.2. Latence d'entrée dans le trou-cible

Globalement, l'ensemble des souris améliore significativement leurs performances sur les 5 jours d'acquisition, et ceci indépendamment du génotype (Effet Jour : $F_{4,204}=54,3$, $P=0,003$, Figure 49, A et B ; pas d'effet Génotype ou d'interaction Jour X génotype). Par contre, les lésions affectent les performances et leur évolution (Effet Lésion : $F_{3,51}=12,7$, $P < 0,001$; Jour X Lésion : $F_{12,204}=2,1$, $P=0,01$). Sur les performances de latence, cet effet semble essentiellement dû à la mauvaise performance des souris tg 2576 CE+SAP, alors que le groupe des wt CE+SAP exhibe des performances qui ne sont que modérément affectées

(différence significative sur les jours 1, 2, et 4 seulement) et que les autres groupes de lésion présentent une évolution de leurs performances relativement comparable à celle des témoins (Jour X génotype X Traitement ($F_{12,204}=1.9$, $P=0.03$).

Il est à noter que les différents groupes ne présentent pas le même niveau de performances en début de tâche, ce qui reflète probablement un effet des lésions sur la rétention à très long terme du principe même de la tâche (J1 : séance X traitement : $F_{3,161}=4,1$, $P=0,008$).

Remarque: Les analyses statistiques ne changent pas en éliminant les souris *rd/rd*.

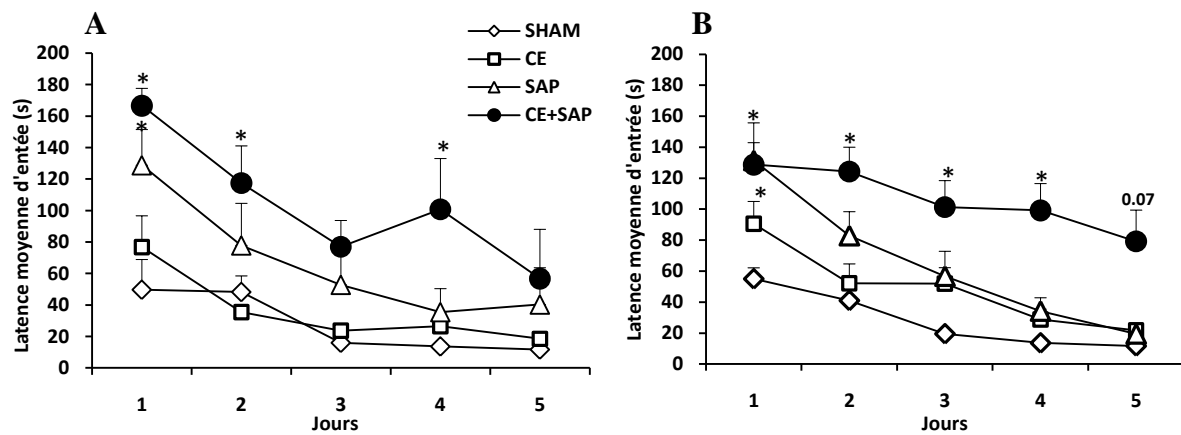


Figure 49. Temps mis pour réussir la tâche au cours de l'acquisition du Barnes 2. Les graphiques représentent les moyennes (+ erreurs type) des latences d'entrée dans le trou-cible pour les souris wt (A) et les souris *tg2576* (B) en fonction des lésions. (* significativement différent de SHAM, $P < 0.05$).

2.3. Test de rétention

Dans le test de rétention qui a lieu 3 jours (72 heures) après le dernier jour d'acquisition (figure 50), l'ensemble des souris montre une préférence pour le trou-cible (effet Trou : $F_{3,153}=16,1$, $P < 0,001$). Il n'y a aucun effet du génotype sur ces performances. Par contre, l'effet des lésions est présent comme dans les autres étapes du test (Trou X Lésion : $F_{9,153}=5,9$, $P < 0,001$).

Les souris wt SHAM, CE et SAP montrent une préférence pour le trou-cible, mais à des niveaux de performance différents, alors que les souris CE+SAP ne montrent aucune préférence pour le trou-cible.

Chez les souris tg2576, il n'y a que les SHAM qui montrent une claire préférence pour le trou-cible, alors que les souris CE montrent une préférence modeste pour le trou-cible. Par contre, les souris SAP et CE+SAP ne montrent aucune préférence pour le trou-cible.

Remarque: Les résultats des analyses statistiques ne changent pas en éliminant les souris *rd/rd*.

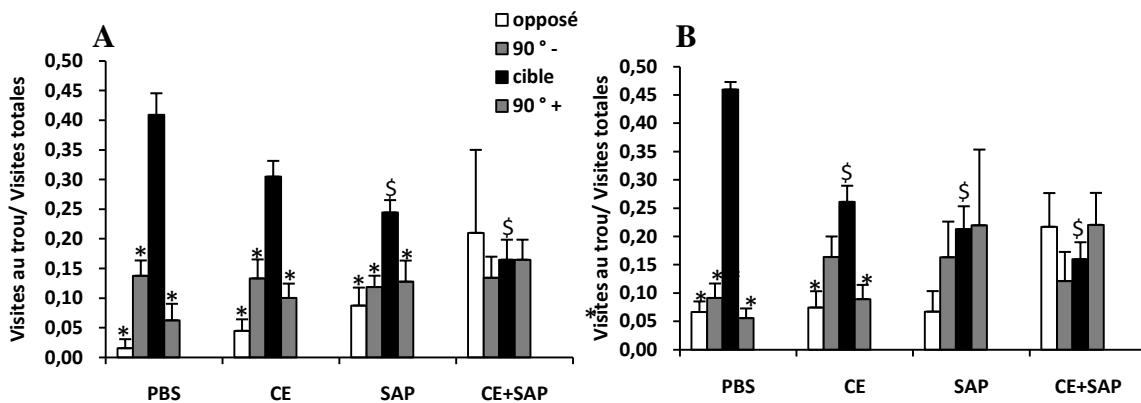


Figure 50. Performances de rétention du Barnes 2. Les graphiques représentent l'indice des visites (+ erreur type) aux trous pour les souris wt (A) et les souris tg2576 (B) en fonction des lésions. (* significativement différent du trou-cible, \$ significativement différent de SHAM $P < 0,05$).

2.4. Analyse des stratégies

Acquisition : Globalement, l'incidence de la stratégie spatiale augmente significativement au cours des cinq jours d'acquisition (Effet Jour : $F_{4,196}=19,6$, $P < 0,001$, Figure 51, A et B). Il n'y a pas d'effet du génotype sur ces performances. Cependant, l'effet des lésions est très marqué sur l'utilisation de la stratégie spatiale (Effet Lésion : $F_{3,49}=13,4$, $P < 0,001$; Jour X Lésion : $F_{12,169}=2,7$; $P=0,002$). Les souris SHAM des deux génotypes atteignent un pourcentage satisfaisant d'utilisation de la stratégie spatiale au 5^{ème} jour ($80 \pm 8,1$ % pour les

wt ; 85 ± 6.7 % pour les tg2576). Au regard de l'allure des courbes, on observe que les souris CE et SAP des deux génotypes mettent plus de temps pour utiliser préférentiellement cette stratégie que les souris SHAM. Par contre, les souris doublement lésées CE+SAP, quel qu'en soit le génotype, ne montrent aucune préférence pour utiliser la stratégie spatiale tout au long de l'acquisition.

En termes d'utilisation de la stratégie sérielle pour atteindre le trou-cible, il est intéressant de noter que les souris SAP des deux génotypes l'utilisent davantage que celles des autres groupes (au 5^{ème} jour ; wt : 55 ± 11.1 %, tg2576: 50 ± 7.45). Par contre, les souris SHAM des deux génotypes présentent un pourcentage d'utilisation très bas de la stratégie sérielle (< 10 % pour chaque génotype au jour 5), alors que, dans les autres groupes, les pourcentages d'utilisation de la stratégie sérielle varient entre 33 et 55 %. Il n'y a aucun effet significatif du génotype, des lésions, et aucune interaction significative entre ces facteurs.

Remarque: Les résultats des analyses statistiques ne changent pas en éliminant les souris *rd/rd*.

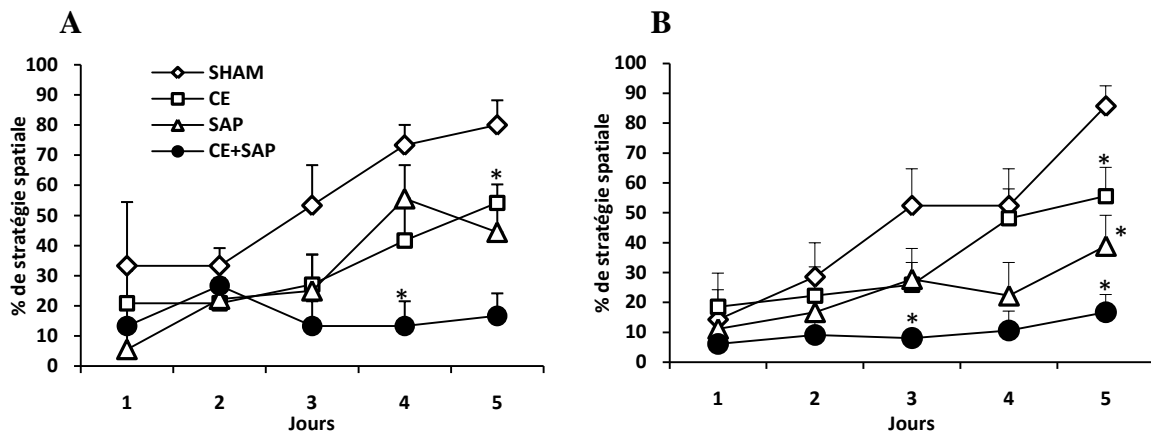


Figure 51. préférence pour la stratégie spatiale pour atteindre le trou-cible dans le Barnes2. Les graphiques représentent les moyennes (+ erreur type) des pourcentages d'essais utilisant la stratégie spatiale pour les souris wt (A) et les souris tg2576 (B) en fonction des lésions. (* significativement différent des SHAM ; $P \leq 0.05$).

Probe : Il y a un effet des lésions sur l'utilisation de la stratégie spatiale pour atteindre le trou-cible (Effet Lésion : $F_{3,52}=8,9$, $P < 0,002$, Figure 52, A et B), mais il n'y a pas d'effet du génotype. En effet, les souris SHAM des deux génotypes utilisent de préférence la stratégie spatiale. On observe aussi que les souris CE des deux génotypes utilisent aussi de préférence la stratégie spatiale, mais moins que les SHAM. Par contre, les souris SAP et CE+SAP des deux génotypes utilisent très peu la stratégie spatiale. Au contraire, elles utilisent préférentiellement la stratégie sérielle, ce qui explique l'effet significatif des lésions sur l'utilisation de la stratégie sérielle (Effet Lésion : $F_{3,52}=2,9$, $P=0,03$).

Remarque: Les résultats des analyses statistiques ne changent pas en éliminant les souris *rd/rd*.

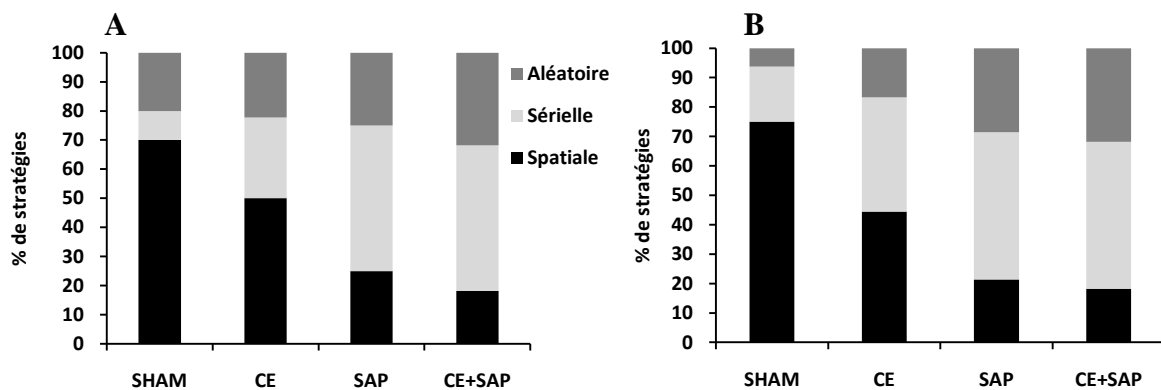


Figure 52. Pourcentage des stratégies utilisées pour trouver le trou-cible pendant le *probe* du Barnes 2. Les graphiques représentent les moyennes des pourcentages de chaque stratégie (aléatoire, sérielle et spatiale) pour les souris wt (A) et les souris *tg2576* (B) en fonction des lésions.

3. Analyse histologique

1. Lésion du cortex entorhinal

L'analyse des coupes frontales des cerveaux des souris (colorées au violet de crésyl) a permis de délimiter l'étendue des lésions du CE. Toutes les souris dont l'étendue des lésions ne répondait pas aux critères suivants sont exclues de l'analyse statistique des performances comportementales :

- Les lésions doivent être bilatérales et d'étendue similaire dans chaque hémisphère.
- Les lésions doivent être sélectives, les structures voisines ne doivent pas être fortement endommagées (voir détails ci-dessous pour de petites atteintes : - 10% de la surface des structures).

La lésion du CE s'étend généralement entre -4.04 mm et -5.20 mm dans la partie ventrale par rapport au plan de *Bregma* (d'après l'atlas de Paxinos et Franklin, 2004 ; voir figures 53 et 54). Chez les souris lésées, il y a un faible pourcentage de souris chez qui une partie du cortex périrhinal est endommagée par la lésion du CE (7/32 chez les tg2576 ; 4/26 chez les wt). Il y a également très peu de lésions qui touchent le subiculum (4/32 chez les tg2576, 4/26 chez les wt), et/ou qui touchent également une faible partie de la couche moléculaire de l'hippocampe ventral (2/32, 4/26 chez les wt). Ces souris sont incluses dans l'analyse des données comportementales, puisqu'elles présentent des performances qui sont semblables à celles des souris dont la lésion est plus proprement focalisée sur le CE.

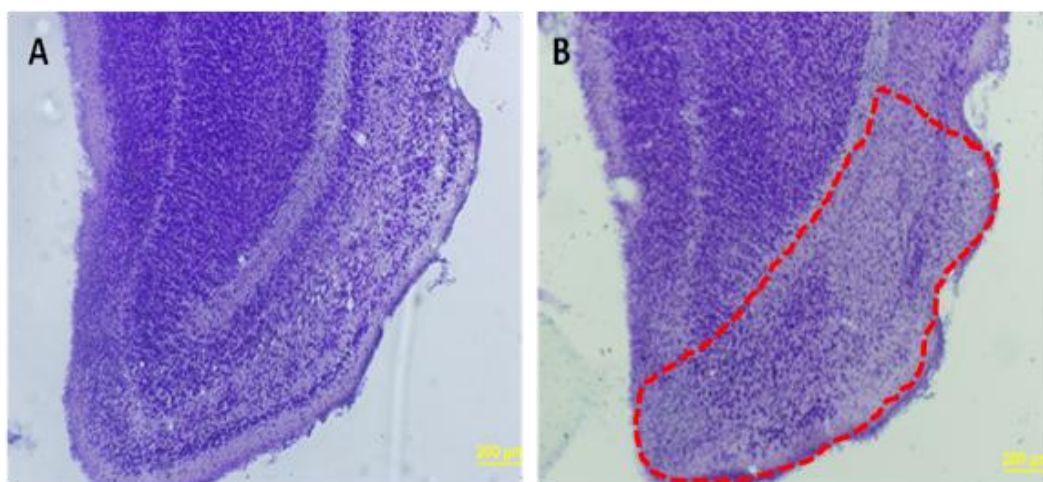


Figure 53 : Photographie du CE gauche coloré au violet de crésyl, A : souris témoin ; B: souris lésées. Le contour de la lésion du CE est délimité par une ligne en pointillés.

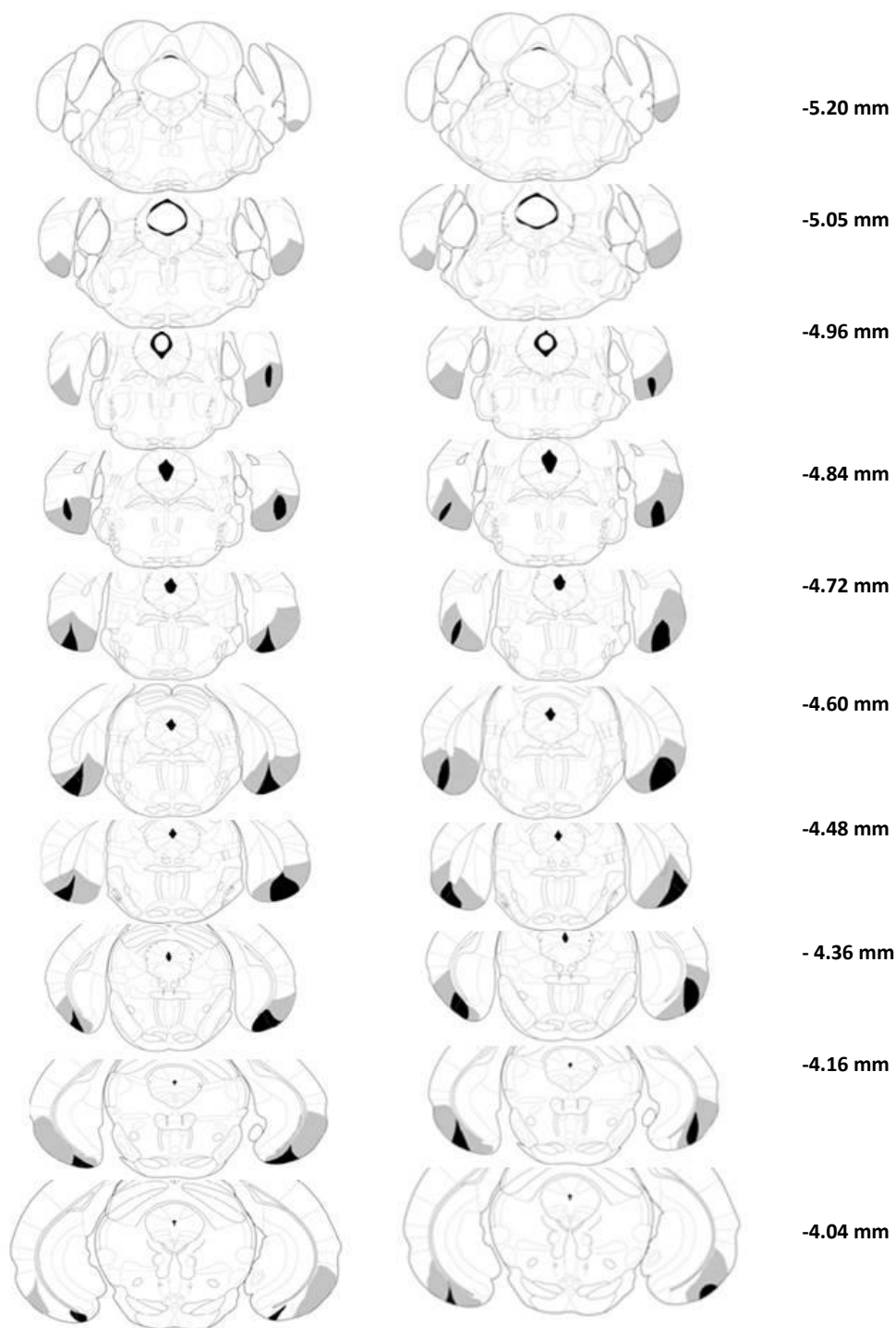


Figure 54 : Représentation schématique de l'étendue des lésions du CE. À gauche pour les souris wt, et à droite pour les souris tg2576. Aire colorée en noir : étendue minimale ; aire colorée en gris : étendue maximale.

2. lésions des NCB

Le nombre de neurones immunoréactifs pour la ChAT est déterminé sur des coupes frontales du SM et du NBM (figure 55). Au niveau du SM (figure 56 A, B), les souris SAP et CE+SAP ont une diminution des neurones cholinergiques de 72% chez les tg2576, et 79% chez les wt (par comparaison avec les souris SHAM), il n'y a pas de différence significative entre les souris SAP et les souris CE+SAP, quel que soit le génotype considéré (figure 56A). Il y a un effet significatif des lésions ($F_{3,74}=110,9$, $P < 0,001$). Par contre, il n'y a pas d'effet significatif du génotype. On observe également une diminution du nombre de neurones cholinergiques au niveau du NBM. Il y a une diminution de 57 % chez les souris tg2576 et de 52 % chez les souris wt. Il n'y a pas de différence significative entre les souris SAP et les souris CE+SAP, quel que soit le génotype. Il y a un effet significatif des lésions ($F_{3,74}=62,3$, $P < 0,001$), par contre, il n'y a pas d'effet du génotype.

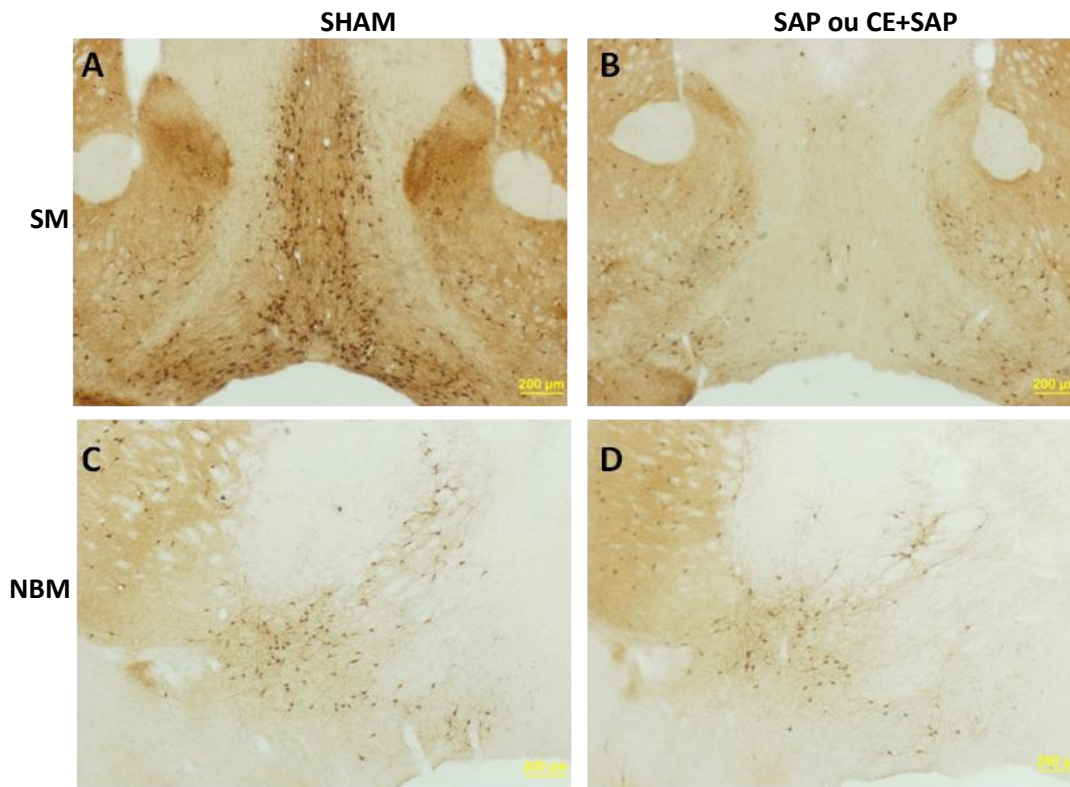


Figure 55 : Photographie de l'immunomarquage des neurones ChAT positifs au niveau du SM (A : SHAM, B : SAP ou CE+SAP), et au niveau du NBM (C : SHAM, D : SAP ou CE+SAP).

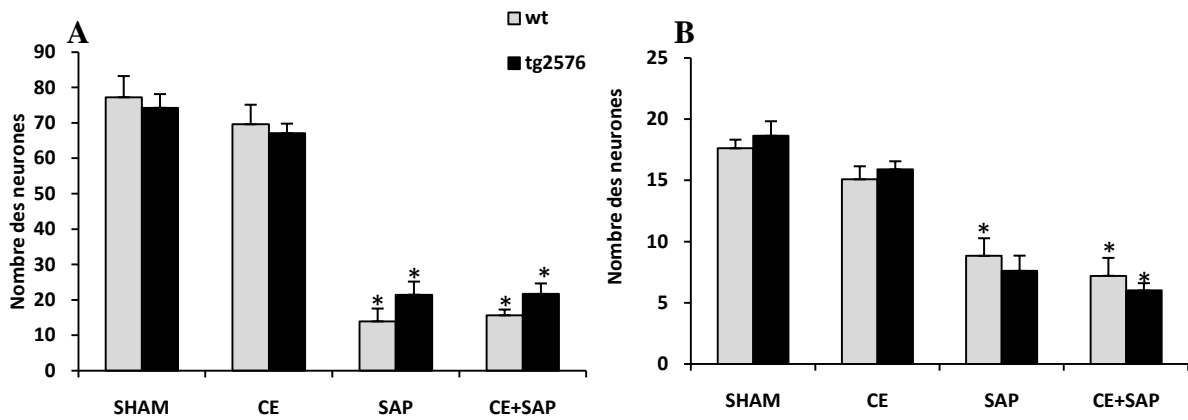


Figure 56. Quantification des neurones ChAT positifs sur des coupes frontales au niveau de SM (A), et au niveau de NBM (B). (*, significativement différent de SHAM et de CE, P < 0,05)

3. Mesure de l'activité de l'AChE par la mesure de la densité optique

L'activité de l'AChE reflète le degré de l'innervation cholinergique issue des NCB (SM et NBM) qui projettent vers l'hippocampe et vers les régions corticales. Au niveau de ces aires de projection, la densité optique mesurée est directement proportionnelle à l'activité de l'AChE, elle-même proportionnelle au degré d'innervation cholinergique.

Comme illustré dans le tableau 4, la quantification de l'activité de l'AChE par la mesure de la densité optique montre une diminution du marquage dans l'hippocampe et la région corticale chez les souris SAP et des souris CE+SAP des deux génotypes. L'analyse statistique (ANOVA) des valeurs de la densité optique chez les différents groupes de lésions montrent un effet significatif des lésions (effet Lésion : $F_{3,64}=3.66$, $P=0,01$). Cet effet est dû à la diminution significative de la densité optique chez les souris SAP et CE+SAP comparativement aux deux autres groupes. Cependant, il n'y a pas de différence de valeurs de la densité optique entre les deux génotypes (Effet génotype : $F_{1,64}=4,68$, $P=0,71$).

Structure	SHAM (tg)	SHAM (wt)	CE (tg)	CE (wt)	SAP (tg)	SAP (wt)	CE+SAP (tg)	CE+SAP (wt)
Hippocampe dorsal	6,61 ± 0,5	5,6 ± 0,6	6,7 ± 0,4	7,8 ± 0,6	1,5 ± 0,2*	1,6 ± 0,4*	1,6 ± 0,3*	1,3 ± 0,3*
Hippocampe ventral	6,0 ± 0,5	5,8 ± 0,5	6,2 ± 0,5	6,3 ± 0,4	2,8 ± 0,4	3,8 ± 0,7	2,9 ± 0,5	3,9 ± 0,5
Cortex entorhinal	6,7 ± 1,2	7,1 ± 0,5	6,3 ± 1,0	9,0 ± 1,2	5,1 ± 1,2	5,2 ± 0,8	5,3 ± 1,5	5,4 ± 0,6
Cortex retrosplénial	2,70 ± 0,44	3,2 ± 0,5	3,9 ± 0,67	3,4 ± 0,5	0,5 ± 0,2*	1,3 ± 0,4*	0,9 ± 0,1*	0,9 ± 0,3*
Cortex somatosensoriel	3,84 ± 0,43	3,4 ± 0,44	4,2 ± 0,7	4,2 ± 0,4	0,8 ± 0,2*	0,7 ± 0,2*	1,5 ± 0,2*	1,1 ± 0,1*
Cortex piriforme	4,33 ± 0,7	4,0 ± 0,8	3,9 ± 0,6	3,2 ± 0,7	2,7 ± 0,6	2,7 ± 0,2	5,5 ± 1,2	4,0 ± 0,9
Cortex Perirhinal	3,9 ± 0,6	4,2 ± 0,7	6,3 ± 0,8	6,5 ± 0,7	2,7 ± 0,9	2,7 ± 0,9	5,5 ± 1,0	5,2 ± 0,7
Cortex visuel	4,0 ± 0,5	3,7 ± 0,6	3,9 ± 0,6	3,9 ± 0,6	1,0 ± 0,2*	1,1 ± 0,3*	1,5 ± 0,2*	1,4 ± 0,2*
Cortex auditif	4,7 ± 0,6	4,3 ± 0,5	5,3 ± 0,5	6,1 ± 0,4	2,6 ± 0,7	2,1 ± 0,4	6,1 ± 0,9	5,8 ± 0,6

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des valeurs de la densité optique du marquage de l'activité AChE au niveau de l'hippocampe et du cortex chez les souris wt et les souris tg2576. (*significativement différent de SHAM du même génotype).

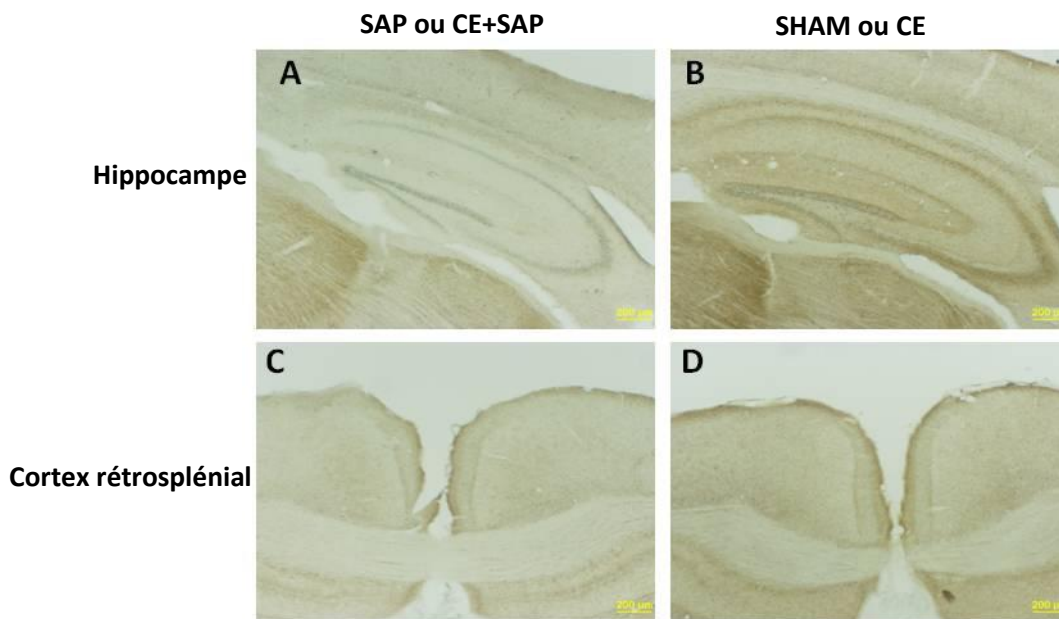


Figure 57 : Marquage histologique de l'activité de l'AChE sur des coupes frontales d'hippocampe dorsal (A, B) et sur le cortex rétrospécial chez des souris lésées (A, C) et des souris témoins (B, D).

4. Comptage des dépôts amyloïdes

4.1. Comptage des dépôts diffus

Le BAM-10 est un anticorps anti-A β dirigé contre la partie N-terminale de l'A β (A β 1-12). Il est utilisé classiquement pour la quantification des dépôts amyloïdes. Il marque à la fois les dépôts diffus et les plaques amyloïdes.

Parce que les dépôts diffus présentent une délimitation assez irrégulière et une grande variabilité en taille, on a choisi de déterminer la surface occupée par les dépôts par rapport à la surface totale de la structure étudiée (mesure souvent qualifiée de charge amyloïde ou *amyloid burden*).

Avant de présenter les résultats de comptage, il est intéressant de noter qu'il y a une petite quantité de dépôts diffus dans les différentes structures cérébrales chez les souris de 12 mois

(figure 58). Chez certaines souris (lésées surtout), il n'y a aucun dépôt amyloïde dans l'hippocampe, ce qui entraîne une grande variabilité interindividuelle dans les mesures. J'ai réalisé le comptage dans la formation hippocampique (gyrus denté, CA1, CA3 et subiculum) à cause de ses nombreuses connections avec le CE et les NCB, et dans le cortex rétrospécial parce que la lésion des NCB induisait une forte diminution de l'innervation cholinergique à ce niveau.

Comme illustré dans le tableau 5, la quantification des dépôts amyloïdes de type diffus marqués par le BAM-10 souligne une diminution de la charge amyloïde chez les souris lésées au niveau de l'aire CA1 et du gyrus denté ($P \leq 0,05$ par comparaison avec SHAM). Par contre, il n'y a aucun effet des lésions sur la charge amyloïde au niveau de l'aire CA3. Cependant, les lésions CE et CE+SAP diminuent la charge amyloïde au niveau du subiculum, sans que cette différence n'atteigne la significativité (par comparaison aux SHAM). Par ailleurs, on note une diminution de la charge au niveau du cortex rétrospécial chez les groupes dont les NCB sont lésés, mais cet effet n'est pas significatif par comparaison avec les souris SHAM. Il est intéressant de noter qu'au niveau du septum médian, il n'y a pas de dépôts amyloïdes, et ce quel que soit le groupe de tg2576. Il faut noter que les valeurs de charge amyloïde sont faibles, ce qui est lié à l'âge de nos souris tg2576 (12 mois) et cette faiblesse explique aussi la grande variabilité interindividuelle de la charge amyloïde. Nous espérons une pathologie amyloïde un peu plus développée d'après les données bibliographiques qui indiquaient un début des dépôts à 8 mois. La figure 57 illustre l'augmentation massive de la charge amyloïde quelques mois plus tard.

En résumé, la lésion du CE induit une baisse de la charge amyloïde dans certaines régions de la formation hippocampique, alors que les lésions des NCB induisent une baisse dans le cortex rétrospécial.

Structure	SHAM	ce	SAP	CE+SAP
CA1	2,8 ± 1,3	0,32 ± 0,1	0,34 ± 0,07	0,33 ± 0,07
DG	3,8 ± 1,0	0,65 ± 0,2*	0,41 ± 0,09*	0,50 ± 0,1*
CA3	0,15 ± 0,05	0,34 ± 0,1	0,24 ± 0,07	0,15 ± 0,03
Subiculum	4,4 ± 1,3	2,1 ± 1,0	4,0 ± 1,9	2,9 ± 1,6
Cortex retrosplénial	1,3 ± 0,43	1,4 ± 0,37	0,24 ± 0,09	0,28 ± 0,05

Tableau 5. Tableau récapitulatif des valeurs de la charge amyloïde (*amyloid burden*) dans l'hippocampe, le subiculum, et le cortex retrosplénial en fonction des différentes lésions chez les souris tg2576. (*significativement différent de SHAM).

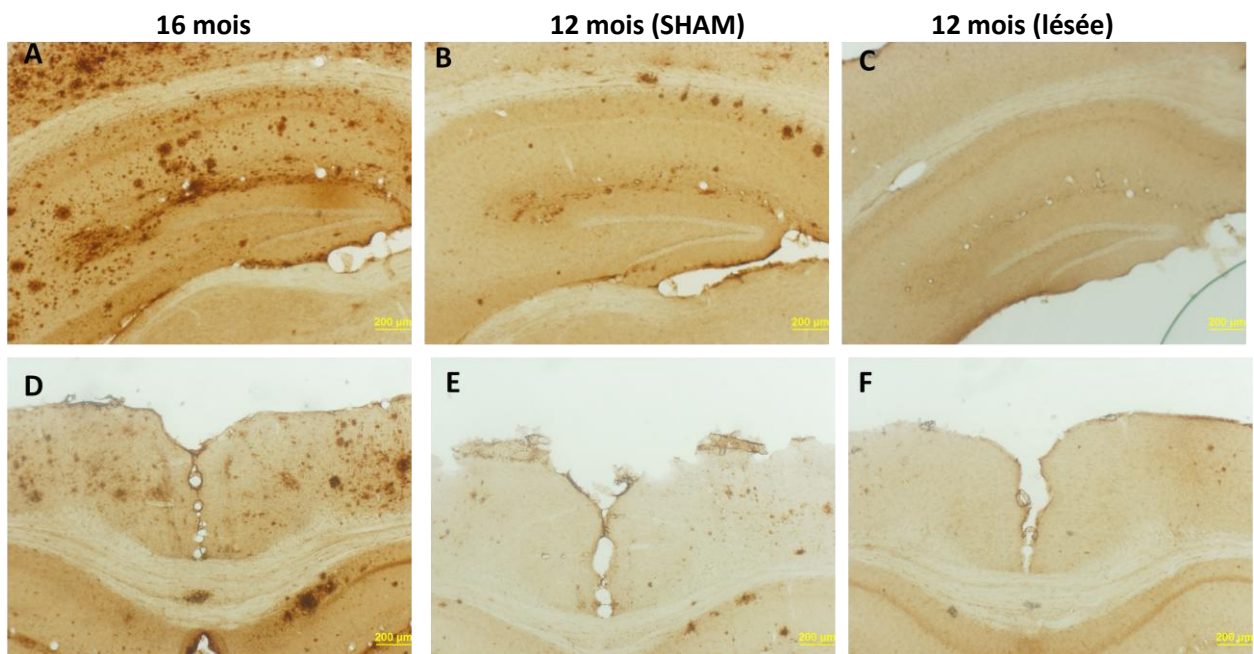


Figure 58. Photographies de l'immunomarquage de la pathologie amyloïdes dans les champs amoniques et le gyrus denté (A, B, et C), et dans le cortex retrosplénial (D, E, F), montrant la différence de quantité de la charge amyloïde entre une souris de 16 mois (A, D), une souris SHAM de 12 mois (B, E), et une souris lésée (SAP) de 12 mois.

4.2. Comptage des plaques amyloïdes

Les plaques peuvent être visualisées grâce à une coloration spéciale, la thioflavine-S par une fluorescence verte en lumière ultra-violette. Les plaques amyloïdes sont caractérisées par un

contour régulier et ne présentent pas une large variabilité en taille, j'ai donc choisi de faire un comptage classique du nombre de plaques. De plus, parce que les plaques ne sont pas présentes en grande quantité (figure 59), je présente les résultats dans l'hippocampe entier (CA1 + CA3 + gyrus denté).

Globalement, il n'y a pas d'effet des lésions sur le nombre des plaques séniles ($F_{3,24}=5.6$, $P=0,15$). Comme illustré dans le tableau 6, il n'y a pas d'effet significatif des lésions sur le nombre de plaques dans le subiculum. Cependant, il y a diminution du nombre de plaques dans le cortex rétrospécial chez les souris SAP et CE+SAP, mais statistiquement il ne s'agit que d'une tendance. Par ailleurs, les lésions induisent une diminution remarquable au niveau de l'hippocampe, mais aucune des diminutions ne ressort significativement en comparaison avec le groupe SHAM. La figure 59 illustre la différence de marquage des plaques entre nos souris de 12 mois et des souris de 19 mois. Il est clair que, à l'âge choisi dans cette étude, il y a très peu de plaques ce qui a contribué à augmenter la variabilité interindividuelle sur les comptages et à l'absence d'effet significatif décrit ci-dessus.

En résumé, bien qu'aucun effet ne soit significatif, les deux types de lésion diminuent le nombre de plaques dans l'hippocampe et la double lésion semble le diminuer de façon un peu plus marquée.

Structures	SHAM	CE	SAP	CE+SAP
Hippocampe	3.0 ± 0.8	1.8 ± 0.4	1.4 ± 0.3	0.9 ± 0.2
Subiculum	2.6 ± 0.6	2.1 ± 0.4	2.6 ± 0.5	1.7 ± 0.5
cortex rétrospécial	1.6 ± 0.3	1.4 ± 0.1	1.0 ± 0.3	0.9 ± 0.1

Tableau 6. *Tableau récapitulatif* des valeurs de comptage des plaques séniles dans l'hippocampe, le subiculum et le cortex rétrospécial en fonction des différentes lésions chez les souris tg2576.

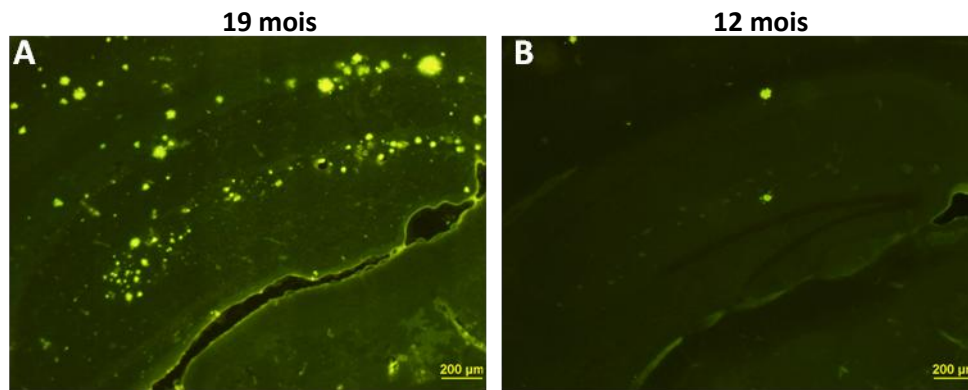


Figure 59. Photographie du marquage des plaques avec la thioflavine-S sur des coupes frontales observées sous microscopie à fluorescence pour une souris de 19 mois (A) et pour une souris de 12 mois illustrant la différence du nombre de plaques à 12 mois et à 19 mois.

5. Génotypage de la mutation *rd*

Le génotypage est réalisé à l'aide de technique de PCR (*polymerase chain reaction*). Elle consiste en une migration de l'ADN amplifié sur un gel d'agarose plongé dans un tampon et soumis à un champ électrique. La mutation de l'allèle *pdeb^{rd1}* cause chez les rongeurs une dégénérescence rétinienne (Doolittle et coll., 1996). La paire des amorces (RD3/RD6) amplifie la forme sauvage non mutée de l'allèle (0.4 kb), alors que la paire des amorces (RD3/RD4) amplifie la forme mutée de l'allèle (0.55 kb).

La figure 60 montre ce que j'ai obtenu sur une partie des souris après génotypage de la mutation *rd*. Globalement, sur un ensemble de 93 souris, il n'y a que 12 souris qui soient homozygotes pour la mutation *rd*.

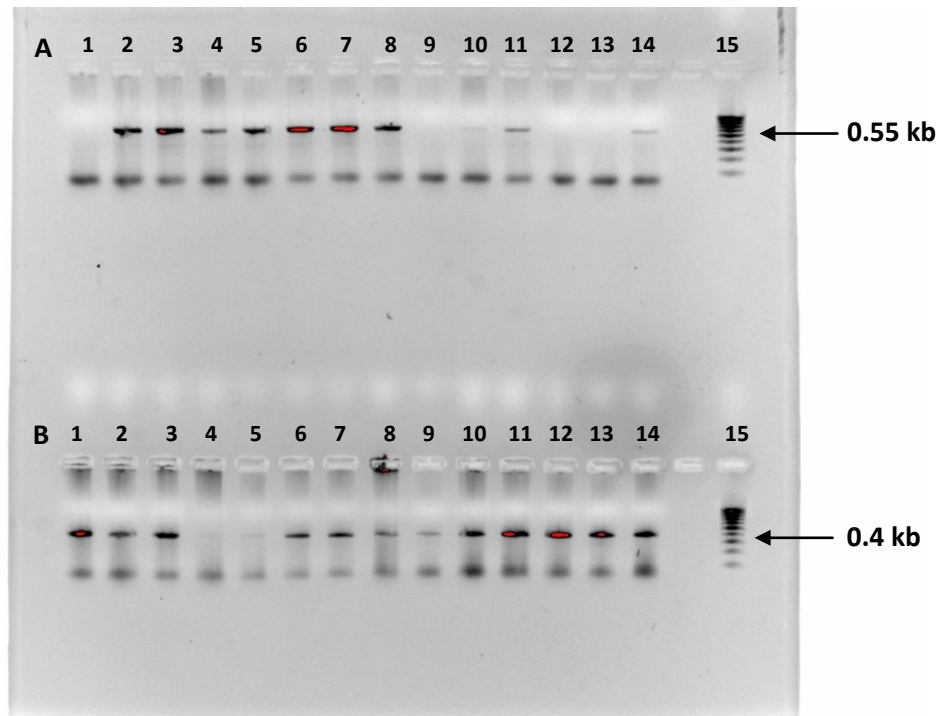


Figure 60. Photographie du gel montrant les produits de PCR avec les amorces RD3/RD4 (A), et les amorces RD3/RD6 (B). Le produit de PCR dans les puits 1 (A1, B1) est amplifié par les amorces RD3/RD6 (B1) et non pas avec RD3/RD4 (A1), donc la souris porte la forme sauvage de l'allèle. Par contre, le produit de PCR dans les puits 4 (A4, B4) est amplifié par les amorces RD3/RD4 (A4) et non pas avec les amorces RD3/RD6 (B4), donc la souris est homozygote pour la forme mutée de l'allèle. Le produit PCR dans le puits 2 est amplifié par les 2 types d'amorce, donc la souris est hétérozygote pour la mutation *rd*

4. Discussion du Chapitre

Lorsque les souris opérées sont testées à un délai post-lésionnel de 6 semaines, on constate que la lésion du CE induit un déficit modéré en termes de mémoire de référence. Les souris tg2576 et wt au CE endommagé parviennent à améliorer leurs performances au cours de la phase d'acquisition, mais au test de rétention, les souris tg2576 CE ne montrent aucune préférence pour le trou cible, contrairement au souris wt. De la même façon, les souris tg2576 et wt ayant subi une lésion des neurones cholinergiques dans la région septale et dans le NBM présentent un profil de déficit très semblable à celui observé chez les souris CE. En effet, les souris tg2576 sont partiellement affectées par cette lésion cholinergique de la même manière que les souris wt au cours de l'acquisition, mais elles présentent de très mauvaises performances de rétention comparativement aux souris wt. En ce qui concerne les souris tg2576 et wt doublement lésées, le déficit est plus marqué pour les deux génotypes, puisque celles-ci n'améliorent que très légèrement leurs performances au cours de la phase d'acquisition et qu'elles ne présentent pas le moindre signe comportemental de rappel de la position du trou cible lors du test de rétention. De façon générale, ces résultats confirment, chez la Souris tg2576 et wt, les observations rapportées dans l'étude de Traissard et collaborateurs (2007) en montrant un effet modeste des lésions du CE ou des NCB réalisées séparément, contre un effet massif lorsque ces lésions sont combinées sur les performances de rats testés dans la piscine de Morris (délai de 4 semaines entre les opérations et le test) ou dans d'autres tests d'apprentissage et de mémoire à caractère spatial. En ce qui concerne spécifiquement les souris tg2576, on note cependant une sensibilité plus marquée aux effets des lésions du CE et des NCB séparément sur les performances de rétention comparativement aux témoins wt.

Après un délai postopératoire de quatre mois, on constate de bonnes performances de réapprentissage chez les souris SHAM, qu'elles soient tg2576 ou wt. Toutefois, les performances sont un peu moins bonnes chez les souris CE (tg2576 et wt) et SAP (wt) pendant les premiers jours de réapprentissage et on observe un déficit très marqué chez les CE+SAP des deux génotypes et chez les tg2576 SAP au cours de l'acquisition. Par ailleurs, l'effet des lésions est sensiblement le même chez les souris wt et les souris tg2576 sur les performances de rétention, excepté un effet plus marqué de la lésion cholinergique chez les tg2576. En ce qui concerne spécifiquement les souris tg2576, on relève donc une aggravation de l'effet de la lésion des NCB sur l'acquisition et une disparition de l'effet de la lésion du CE sur les performances de rétention, tandis que la double lésion provoque toujours des déficits aussi prononcés que ceux observés au délai postopératoire de 6 semaines. Ces données suggèrent une augmentation de l'impact des lésions cholinergiques et une diminution de l'impact des lésions du CE sur les processus mnésiques 4 mois après l'opération, juste avant l'euthanasie des animaux.

L'examen histologique des coupes de cerveau montre que la double lésion, mais aussi chaque lésion isolée diminuent de façon très marquée la charge amyloïde (dépôts diffus) au niveau du gyrus denté, et de façon non significative dans l'aire CA1 de l'hippocampe. De plus, la lésion du CE, combinée ou non à la lésion SAP, tend à réduire l'ampleur de ces dépôts dans le subiculum. Quant à la lésion SAP, combinée ou non à celle du CE, on constate qu'elle diminue le niveau de dépôts dans le cortex rétrosplénial. Enfin, dans l'hippocampe, le nombre de plaques est réduit chez les souris lésées. On peut d'ores et déjà conclure à ce stade de la discussion que l'aggravation des effets des lésions chez les souris tg2576 par rapport aux souris wt ne peut pas être liée à une augmentation des dépôts amyloïdes diffus consécutive à l'une ou l'autre lésion. C'est pourtant ce à quoi nous pouvions nous attendre d'après les données décrites dans un travail présenté lors d'un congrès (Chauhan et coll., 2006), où la

lésion cholinergique induite par la mu p75-saporine provoquait une aggravation des déficits mnésiques et de la pathologie amyloïde chez une autre lignée de souris APP, la souris TgCRND8. A vrai dire, on pourrait même aboutir à la conclusion inverse à partir de nos données, c'est-à-dire que l'aggravation des déficits est plutôt associée à la diminution de la charge amyloïde notamment au niveau de l'hippocampe. En ce qui concerne les plaques, il est évident que nos souris n'ont pas présenté assez de dépôts Thio-S positifs pour attribuer l'aggravation de déficits à une quelconque modification du nombre de plaques. Il n'en reste pas moins que nous observons une baisse du nombre de ces plaques cohérente avec les effets des différentes lésions sur les dépôts diffus. Il semblerait donc que si l'augmentation des taux d'A β liés à l'expression du transgène joue un rôle dans l'aggravation des déficits des souris tg2576, ce n'est pas à travers les formes en dépôts, qu'ils soient diffus ou en plaques.

Effet de la lésion CE

L'atteinte du CE chez les patients Alzheimer est évidente à un stade très précoce de la maladie, puisqu'on relève une perte neuronale dans la couche II du CE à un stade préclinique de la maladie (Rodrigue et Raz, 2004 ; Gómez-isla et coll., 1996).

Dans mon étude, on observe un effet lésionnel massif du NMDA sur la couche II au niveau du CE latéral et du CE médian. Les deux lignées ont une sensibilité comparable aux lésions excitotoxiques du CE, ce qui indique que les quelques dépôts amyloïdes déjà présents chez les souris tg2576 au niveau du CE à 9 mois n'interagissent pas avec l'efficacité de l'immunotoxine. Le CE est une source importante d'innervation de l'hippocampe. Une atteinte du CE se traduit par un déficit de la mémoire spatiale du fait d'une atteinte des nombreuses projections vers l'hippocampe (Léonard et coll., 1995 ; Witter et Amaral, 2004 ; Zola-Morgan et coll., 1994). En plus, une lésion du CE entraîne une diminution du nombre de cellules de lieu détectées dans le cerveau du Rat (Miller et Best, 1980).

Il est intéressant de noter que dans la littérature scientifique, l'effet de lésions excitotoxiques du CE dans un test de mémoire spatiale tel que le labyrinthe de Barnes n'a jamais été étudié chez la Souris. On sait cependant que chez cette espèce, la lésion du CE avec de l'iboténate induit un ralentissement d'apprentissage dans le labyrinthe radial (Cho et Jaffard, 1994, 1995 ; Cho et coll., 1993) et un modeste déficit dans la piscine de Morris (Hardman et coll., 1994).

En observant de façon détaillée l'ensemble des données, on constate que les souris CE présentent un léger déficit de la mémoire de référence. En fait, au cours de la phase d'acquisition, elles ont présenté une amélioration significative de leurs performances, au point qu'au cinquième jour leurs scores étaient comparables à ceux des souris SHAM. Dans le *probe*, toutefois, si les souris WT ont montré un bon niveau de performances, les tg2576 n'ont montré aucune préférence pour le trou cible, ce qui suggère un effet synergique entre les taux d'A β et la lésion du CE, ou une perturbation de la plasticité synaptique suite à l'action de l'A β , un phénomène déjà décrit chez les tg2576 (Jung et coll., 2011). Ces résultats confirment ce qui est déjà décrit de l'effet modéré de la lésion au NMDA du CE sur la mémoire spatiale chez le Rat (Aggleton et coll., 2000 ; Pouzet et coll., 1999 ; Traissard et coll., 2007).

Il est intéressant de noter que les souris CE des deux génotypes utilisent préférentiellement une stratégie sérielle plutôt qu'une stratégie spatiale, ce qui indique un déficit au niveau de la mémoire spatiale allocentrique. En effet, suite à une lésion hippocampique, les rongeurs peuvent compenser le dysfonctionnement hippocampique par le développement de stratégies alternatives dépendant d'autres structures comme, par exemple, le striatum (Pouzet et coll., 1999 ; Abrahams et coll., 1997 ; McDonald et coll., 1993). De plus, il a été montré que le CE contribuait au bon fonctionnement de la mémoire allocentrique (Hölscher et Schmidt, 1993).

Dans la deuxième séance de test, celle réalisée après un délai postlésionnel de 4 mois, les souris CE ont présenté des performances améliorées comparativement à celles relevées lors du premier test, et ce dans les deux génotypes. Ces résultats indiquent une récupération à long terme des capacités d'apprentissage et de mémoire consécutivement à cette lésion. Des études relativement anciennes ont montré le même effet de récupération chez le Rat dans un test d'évitement actif en labyrinthe en Y comme en T (Loesche et coll., 1977 ; Ramirez et coll., 1988). On peut cependant noter que Hardman et ses collaborateurs (1997) ont montré que les souris ayant subi une lésion électrolytique unilatérale du CE, mais non celles chez qui le CE a été lésé bilatéralement, présentent une récupération de leurs performances d'apprentissage dans la tâche de la piscine de Morris. Si on raisonne en termes de déficits de mémoire spatiale, les conclusions de Hardmann et ses collaborateurs ne sont pas corroborées par mes résultats, qui montrent que 4 mois après des lésions bilatérales du CE, une récupération est possible, que le génotype des souris soit tg2576 ou wt. Une telle différence peut s'expliquer par des délais postlésionnels différents, mais le plus probablement par la nature des lésions, puisque les lésions au NMDA laissent les fibres en passage dans la structure endommagée intactes, ce qui n'est pas le cas des lésions électrolytiques.

Au niveau histopathologique, la lésion du CE a induit, au niveau de l'hippocampe, une diminution des dépôts amyloïdes de type diffus ainsi que des plaques amyloïdes. Ces résultats confirment l'étude de Van Groen et ses collaborateurs (2003), qui ont effectivement démontré une diminution des dépôts diffus mais pas d'effet sur le nombre de plaques amyloïdes après une lésion à l'iboténate du CE latéral chez des souris double mutantes APP/PS1. Cette différence d'effet sur les plaques peut être due à : (1) un délai post-lésionnel plus court (1 mois pour Van Groen et ses collaborateurs ; 4 mois dans mon étude), (2) des différences dans l'étendue des lésions du CE (lésion de CE latéral dans l'étude de Van Groen

et ses collaborateurs contre des lésions du CE latéral et médian dans l'étude rapportée dans ce chapitre).

Il a été suggéré que la propagation de la pathologie amyloïde est due aux projections entre les différentes structures cérébrales (Saper et coll., 1987 ; Hardey, 1992). Par ailleurs, il a été montré que l'APP et l'A β pourraient être transportées par les neurones (Koo et coll., 1990), et que chez les souris PDAPP les dépôts amyloïdes dans l'hippocampe sont localisés au niveau des terminaisons des voies perforantes (Chen et coll., 1998 ; Lazarov et coll., 2002). Toutes ces données nous conduisent à formuler l'hypothèse suivante: si l'A β , ou son précurseur l'APP, est transportée du CE vers l'hippocampe via les voies perforantes, il est possible que la lésion du CE ait réduit les dépôts amyloïdes en atténuant l'efficacité de ce transport du fait de la destruction d'une partie des faisceaux perforants.

Effet de la lésion SAP

Comme je l'ai déjà indiqué, l'injection de l'immunotoxine mu P75-saporine a induit une forte mortalité chez les souris tg2576. Cette mortalité était toujours associée à l'apparition postchirurgicale de crises d'épilepsie, ce qui pourrait suggérer un rôle du système cholinergique dans l'épilepsie, par exemple à la suite d'une diminution d'innervation cholinergique au niveau de structures comme l'hippocampe, le cortex rétrosplénial ou le cortex somatosensoriel. Par ailleurs, il a été montré que l'A β induisait une activité épileptique accompagnée d'un dysfonctionnement du système GABAergique chez les souris TgCRND8 (Jolas et coll., 2002 ; Palop et coll., 2009). Il est à noter que nous avons observé plusieurs fois des crises d'épilepsie spontanées chez des souris tg2576 intactes (non traitées, non lésées) à l'occasion de notre présence dans l'animalerie dédiée à cette lignée au laboratoire. Ces observations nous amènent à suggérer la possibilité d'un effet synergique de l'A β et de la

diminution d'innervation cholinergique dans l'induction des crises épileptiques chez les souris tg2576.

Cette étude avait pour but de provoquer une perte neuronale neurochimiquement sélective au niveau des NCB, car ce type de perte a déjà été décrit chez les patients Alzheimer (Bowen et coll., 1976 ; Whitehouse et coll., 1982). L'injection I.C.V. de l'immunotoxine mu p75-saporine a induit une diminution importante des marqueurs cholinergiques au niveau du SM/BDB et du NBM, mais aussi dans les zones de projection de ces noyaux. On note que les souris tg2576 traitées avec la mu p75-saporine ont présenté une perte de neurones des NCB dont l'ampleur était comparable à celle relevée chez les souris wt, ce qui suggère que les tg2576 ne sont pas plus sensibles aux effets de l'immunotoxine. Comme la perte des neurones cholinergiques au niveau des NCB est corrélée avec la gravité de la démence chez les patients Alzheimer (Wilcock et coll., 1982 ; DeKosky et coll., 1992), il est tentant d'établir un lien entre les déficits mnésiques relevés chez nos souris SAP et l'atteinte cholinergique provoquée par l'immunotoxine.

En observant de façon détaillée l'ensemble des données, les souris SAP des deux génotypes (tg2576 et wt) présentent une performance similaire dans le premier test de Barnes (6 semaines après l'opération) : on constate un déficit de retard à l'apprentissage au cours de l'acquisition, mais surtout on note que si les souris SAP WT ont retenu l'emplacement du trou-cible, les souris transgéniques tg2576 SAP ne se rappellent pas cet emplacement lors du test de rétention. Ces résultats sont en accord avec les deux seules études ayant été faites à ce jour à partir de lésions immunotoxiques chez la souris. En effet, à la suite d'une perte d'une partie des neurones cholinergiques au niveau du SM et du NBM, les souris présentent un déficit de la mémoire de référence dans la piscine de Morris et dans le labyrinthe de Barnes, ce qui confirme des données obtenues chez le Rat dans la piscine de Morris (Moreau et coll., 2008 ; Berger-Sweeny, 2001, Traissard et coll., 2007 ; Dornan et coll., 1997). Toutefois, chez

des souris wt, le déficit reste assez modeste, une constatation également faite chez le Rat et qui a conduit Parent et Baxter (2004) à suggérer que la voie septo-hippocampique pourrait bien ne jouer qu'un rôle assez mineur dans les fonctions de l'apprentissage. Par ailleurs, il est intéressant de noter que dans le test de rétention, qui a lieu deux jours après la fin de la phase d'acquisition, les souris tg2576 SAP ne montrent pas de préférence pour le trou-cible, contrairement aux souris wt SAP. Nous sommes donc tentés de poser l'hypothèse d'un effet de l'A β soluble sous forme d'oligomère (forme d'A β qui est augmentée à partir de 6 mois) comme facteur d'aggravation du déficit de mémoire induit par la lésion SAP.

Il a été suggéré que le déficit de la mémoire suite à la lésion des NCB est dû à une perturbation des processus attentionnels (McGaughy et coll., 1996 ; Baxter et coll., 1995 ; Shen et coll., 1996). De plus, Ikonen et ses collaborateurs (2002) ont mis en évidence qu'une lésion sélective des neurones du SM empêche la réorganisation (*remapping*) au sein de champs d'activité des cellules du lieu en fonction du changement dans l'environnement. Cette étude suggère que le système septo-hippocampique est impliqué dans la mémoire à court terme, ainsi que dans la régulation des représentations spatiales. Le système septo-hippocampique semble également jouer un rôle dans la sélection de la stratégie développée pour effectuer la tâche de navigation. En effet, il a été démontré que la capacité d'utilisation de la stratégie allocentrique par les rats dépend du bon fonctionnement de ce système (Janis et coll., 1994), ce qui pourrait expliquer l'incapacité des souris SAP et CE+SAP à utiliser de préférence la stratégie spatiale.

L'analyse des données du second test du labyrinthe de Barnes, test effectué 4 mois après la lésion, montre que les effets de la lésion des NCB n'évoluent pas de la même façon entre les tg2576 et les wt. Au second délai, les souris tg2576 SAP sont déficitaires dans l'acquisition et dans le test de rétention, alors que les souris wt SAP présentent de bonnes performances aussi bien en termes d'acquisition que de rétention. De plus, la courbe d'acquisition des souris

tg2576 SAP a quasiment la même allure que celle caractérisant l'acquisition des souris tg2576 CE+SAP, notamment en termes d'erreurs de la mémoire de référence, ce qui nous conduit à poser l'hypothèse d'une synergie délétère entre l'augmentation des taux d'A β cérébraux -notamment au niveau de CE- et la lésion des NCB, ce qui pourrait conduire à un dysfonctionnement conjoint des NCB et du CE, mais aussi vraisemblablement d'autres structures impliquées dans les processus mnésiques.

Sur le plan histopathologique, les lésions SAP et CE+SAP ont induit une diminution des dépôts amyloïdes de type diffus dans la région CA1 et dans le gyrus denté de l'hippocampe, de même que dans le cortex rétrosplénial. Ces lésions ont également provoqué une diminution des plaques amyloïdes au niveau de l'hippocampe. De tels résultats sont assez surprenants, comme évoqué plus haut, car la seule étude parue au sujet des effets d'une lésion des NCB par la mu p75-saporine chez une souris tgAPP (tgCRND8) évoque une aggravation de la pathologie amyloïde (Chauhan et coll., 2006). De plus, la lésion des NCB chez le lapin induit quelques dépôts amyloïdes vasculaires (Ramirez et coll., 2001). Cependant, comme dans notre étude la diminution des dépôts amyloïdes apparaît au niveau de l'hippocampe et du cortex rétrosplénial, nous avons proposé l'hypothèse d'une corrélation négative entre la quantité des dépôts et le niveau d'innervation cholinergique de ces structures. Pour confirmer cette hypothèse, des analyses de comptage complémentaires des dépôts amyloïdes dans les structures corticales ayant également fait l'objet d'une dénervation cholinergique (le cortex somatosensoriel et le cortex visuel) seront effectuées après la thèse. Et il serait au demeurant intéressant de procéder à une évaluation de l'ampleur des dépôts dans une région où l'innervation cholinergique est restée relativement intacte. Au sujet de cette relation entre dénervation et dépôts amyloïdes, on peut aussi noter que Liu et ses collaborateurs (2002) ont montré que la lésion de la fimbria et du fornix chez la souris APP-PS1, lésion qui conduit à une importante dénervation cholinergique, entre autre, n'affecte pas le niveau des dépôts

amyloïdes dans l'hippocampe, et ce à différents délais post-chirurgicaux. Quant à la lésion du NBM chez la souris APP23, ont peut évoquer le fait qu'elle induit apparemment une diminution de l'A β , mais uniquement au niveau du cortex frontal (Boncristiano et coll., 2002). Enfin, la lésion du SM effectuée chez le Rat à l'aide de l'immunotoxine 192-IgG saporine, est suivie d'une diminution de l'ARNm de l'A β dans l'hippocampe, et ce après seulement une semaine de délai post-lésionnel (Ramirez et coll., 2001). L'ensemble de ces données semblent en contradiction avec des observations effectuées sur des cerveaux de patients Alzheimer. En effet, l'étude *post-mortem* montre une corrélation négative entre l'activité de la ChAT et la densité des plaques séniles chez les patients Alzheimer (Perry et coll., 1981 ; Mountjoy et coll., 1984). En d'autres termes, la diminution des marqueurs cholinergiques est associée à une augmentation de la densité des plaques séniles dans la MA, alors que mes résultats indiquent une diminution des dépôts diffus suite à la lésion des NCB.

En conclusion, l'ensemble de mes résultats montre que la dénervation de l'hippocampe n'induit pas une aggravation de la pathologie amyloïde chez la souris tg2576, et remet en cause l'hypothèse évoquée dans une revue de question par Cassel et ses collaborateurs (2008).

Effet de la double lésion CE+SAP

La double lésion induit un déficit légèrement plus marqué chez les souris tg2576 que chez les wt pendant la phase d'acquisition du premier test de Barnes. Néanmoins, globalement et quel que soit le génotype, la double lésion perturbe d'une manière massive les performances des souris au cours de l'acquisition comme lors du test de rétention dans le test du labyrinthe de Barnes, et ce au délai post-lésionnel de 6 semaines, comme à celui de 4 mois. Cette observation est d'autant plus intéressante que chacune des lésions réalisées séparément l'une

de l'autre n'entraîne qu'un déficit d'amplitude relativement modeste, que ce soit pendant l'acquisition ou au moment du test de rétention.

Mes résultats de double lésion semblent donc être comparables à ceux obtenus dans une étude réalisée au sein de notre laboratoire chez des souris C57BL/6J, de même que chez le Rat (Moreau et coll., 2011; en préparation ; Traissard et coll, 2007). L'ensemble des données du labyrinthe de Barnes suggère donc que les souris doublement lésées ont un problème d'encodage et de récupération des informations spatiales suite à la destruction partielle des innervations cholinergiques de l'hippocampe, du manteau cortical et de l'innervation essentiellement glutamatergique en provenance du CE. En effet, d'une part, il est intéressant de noter que des connexions septo-enthorinales sont impliquées dans la mémoire de travail et dans l'apprentissage spatial (Mizumori et coll., 1992 ; Degroot et Parent 2000). D'autre part, au niveau cortical, on peut notamment proposer une implication dans ce déficit de la diminution massive de l'innervation cholinergique du cortex rétrosplénial (d'après le marquage de l'activité AChE) qui, lui aussi, joue un rôle dans la mémoire spatiale (Aggleton et coll., 2000). Par ailleurs, la perturbation des voies de projections entre toutes ces structures interconnectées pourrait jouer un rôle dans le déficit massif de mémoire spatiale que nous avons observé dans cette étude.

Conclusions et perspectives

Dans un premier temps, en testant les souris tg2576 et leurs témoins wt dans les différentes tâches cognitives, j'ai montré que les souris tg2576 présentent un déficit de reconnaissance spatiale dès l'âge de 8 mois. J'ai également montré que les souris tg2576 âgées de 16 mois sont perturbées au niveau de leurs performances de mémoire spatiale. Par ailleurs, nous nous sommes heurtés à un problème de biais méthodologique en ce qui concerne le test de la piscine de Morris, puisque les souris présentant un problème d'apprentissage au vu des performances, étaient porteuses de la mutation *rd*, et donc frappées de cécité. Notre objectif était donc de trouver des tests adéquats pour tester les souris tg2576 et leurs wt sans que cette mutation ne biaise les performances. J'ai trouvé que seuls deux tests, le test du labyrinthe de Barnes et le test de reconnaissance spatiale, permettent la mise en évidence d'un réel déficit de mémoire spatiale chez les souris tg2576, soit un déficit indépendant de cette mutation. Ce travail confirme les études montrant un déficit des souris tg2576 dans la détection d'un changement spatial dans une configuration d'objets (Hale et Good, 2005 ; Good et coll., 2007). Par contre, les performances des souris tg2576 dans le test de labyrinthe de Barnes relèvent d'un sujet controversé (Stewart et coll., 2001). Néanmoins, au cours du phénotypage comportemental de cette lignée, nous avons développé un protocole qui semble bien adapté pour montrer un déficit modéré, mais reproductible, des performances d'acquisition et de *reversal*, ainsi qu'une perturbation marquée des performances de rétention à long terme dans cette tâche de mémoire spatiale chez les souris tg2576 âgées (16 mois et plus).

L'objectif ultime de cette thèse était de combiner l'approche lésionnelle, réalisée initialement par Traissard et ses collaborateurs (2007) sur des rats, et l'approche transgénique avec la souris tg2576, une lignée qui développe des dépôts amyloïdes entre 6 et 9 mois, et chez laquelle on trouve des plaques amyloïdes/séniles à partir de l'âge de 10 mois (Kawarabayashi

et coll., 2001). En effet, cette approche lésionnelle avait pour but d'étudier l'impact de lésions limitées aux neurones du CE et aux neurones cholinergiques des NCB, et donc à deux populations de cellules touchées dans la MA, sur la pathologie amyloïde et l'évolution des déficits mnésiques dans une tâche de navigation spatiale.

Mes travaux ont tout d'abord mis en évidence un effet délétère massif de la double lésion sur la mémoire spatiale des souris tg2576, et il en allait de même chez leurs témoins wt, contrairement à ce que j'ai observé chez des souris ayant subi chaque lésion séparément l'une de l'autre. Ce résultat confirme notre hypothèse d'effet synergique de la double lésion de façon générale pour modéliser des phases encore plus avancées de la maladie. C'est d'ailleurs vraisemblablement à cause de ces effets particulièrement marqués (effet plafond) que nous n'avons pas pu mettre en évidence de façon indubitable une sensibilité particulière des tg2576 à cette double lésion.

Par contre, nous avons montré que l'effet des lésions simples du CE et des NCB évoluent avec le temps : celui de la lésion du CE s'atténue chez les deux génotypes, alors que celui de la lésion des NBC s'aggrave chez les souris tg2576. L'aggravation des déficits chez les souris tg2576 SAP pourrait être due soit à un effet synergique avec l'accumulation d'A β (sous forme soluble), soit à une perturbation de certains processus de plasticité synaptique à long terme, tel que le bourgeonnement cholinergique au niveau du gyrus denté, un processus déjà décrit chez la souris tg2576 (Chapman et coll., 1999). De même, la récupération à long terme des capacités d'apprentissage altérées par la lésion du CE pourrait être liée à des phénomènes de compensation neuronale, notamment au niveau entorhinal ou hippocampique. En effet, cette lésion induit notamment des phénomènes de bourgeonnement des afférences commissurales/associatives, notamment celles issues des cellules moussues glutamatergiques du hile du gyrus denté, chez la Souris (Del Turco et coll., 2003). Il est intéressant de noter ici

que, quels que soient les mécanismes impliqués dans cette compensation, ceux-ci sont préservés chez les souris tg2576. Réaliser une étude histologique spécifique sur le développement de phénomènes de bourgeonnement serait donc une des perspectives intéressantes à l'issue de ce travail afin de déterminer si ces phénomènes pourraient constituer les bases neuroanatomiques de l'aggravation des déficits mnésiques induits par la lésion des NCB chez les souris tg2576 et de la récupération fonctionnelle des capacités d'apprentissage altérées par la lésion du CE chez les deux génotypes.

Au niveau histopathologique, les lésions du CE induisent une atténuation des dépôts diffus au niveau de l'hippocampe, ce qui confirme l'étude de Van Groen et de ses collaborateurs, qui ont montré le même effet de la lésion du CE sur la diminution de la quantité des dépôts diffus dans l'hippocampe. Par ailleurs, de façon surprenante, la lésion des NCB a également induit une diminution des dépôts amyloïdes dans l'hippocampe et dans le cortex rétrosplénial, ce qui nuance les résultats obtenus par Chauhan et ses collaborateurs (2006). En effet, ces derniers ont montré une aggravation concomitante de la pathologie amyloïde et des déficits mnésiques suite à la lésion immunotoxique des NCB, mais c'était chez d'autres souris transgéniques APP. De façon générale, dans notre travail, les déficits sont plutôt associés à une réduction des dépôts amyloïdes (diffus ou en plaques). Ceci suggère que c'est plutôt les formes solubles d'A β qui seraient impliquées dans l'aggravation des déficits mnésiques consécutifs aux lésions.

Il serait donc particulièrement intéressant de doser l'A β cérébrale dans différentes structures, dont l'hippocampe, et de mettre en relation ces dosages avec les performances comportementales des souris. Notons à cet égard que nous pourrions affiner cette étude en analysant différentes formes d'A β , de type 1-42 et 1-40, humaine ou murine, car chacune de ces formes pourrait être impliquée de façon différente dans les conséquences histologiques et comportementales des lésions.

De plus, il est clair qu'à l'âge de 12 mois, le développement de la pathologie amyloïde (notamment au niveau des plaques amyloïdes) est encore en phase préliminaire. En effet, nos données sur la charge amyloïde et les comptages de plaques montrent sans équivoque qu'il serait nécessaire de laisser s'écouler plus de temps entre les opérations et l'euthanasie (8 mois au lieu de 4 mois par exemple, et donc d'utiliser des souris âgées de 16 mois au moment de l'euthanasie) pour confirmer l'effet « protecteur » des lésions sur ces aspects de la pathologie amyloïde et les mettre en relation avec l'évolution à plus long terme des performances mnésiques. Enfin, faute de temps, nous n'avons pas pu rechercher de dépôts de tau hyperphosphorylée, voire des DNF, qui pourraient non seulement être induits par la double lésion ou celle des NCB, mais aussi expliquer l'aggravation des déficits de mémoire spatiale chez les souris tg2576 et/ou wt.

Bibliographie

-A-

- Abraham CR, Selkoe DJ, Potter H. Immunochemical identification of the serine protease inhibitor alpha 1-antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Cell*. 1988 Feb 26;52(4):487-501
- Abrahams S, Pickering A, Polkey C E, Morris R G. Spatial memory deficits in patients with unilateral damage to the right hippocampal formation. *Neuropsychologia* 1997; (35): 11-24.
- Aggleton J P, Vann S D, Oswald C J P, Good M. Identifying cortical inputs to the rat hippocampus that subservise allocentric spatial processes: A simple problem with a complex answer. *Hippocampus* 2000; (10): 466-474.
- Allen B, Ingram E, Takao M, Smith M J, Jakes R, Virdee K, Yoshida H, Holzer M, Craxton M, Emson P C, Atzori C, Migheli A, Crowther R A, Ghetti B, Spillantini M G, Goedert M. Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *Journal of Neuroscience* 2002; (22): 9340-9351.
- Alvarez A, Bronfman F, Perez C A, Vicente M, Garrido J, Inestrosa N C. Acetylcholinesterase, a senile plaque component, affects the fibrillogenesis of amyloid-beta-peptides. *Neuroscience Letters* 1995; (201): 49-52.
- Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Uber eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde". *Clin Anat*. 1995;8(6):429-31.
- Amaral D G, Kurz J. An Analysis of the Origins of the Cholinergic and Noncholinergic Septal Projections to the Hippocampal-Formation of the Rat. *Journal of Comparative Neurology* 1985; (240): 37-59.
- Amaral D G, Witter M P. The 3-Dimensional Organization of the Hippocampal-Formation - A Review of Anatomical Data. *Neuroscience* 1989; (31): 571-591.
- Andre J T, Owens R L, Owens D A. Dark focus values measured by retinoscopy: A clinical chart review. *Optometry and Vision Science* 1998; (75): 903-908.
- Arborelius L, Owens M J, Plotsky P M, Nemeroff C B. The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *Journal of Endocrinology* 1999; (160): 1-12.
- Arendash G W, King D L, Gordon M N, Morgan D, Hatcher J M, Hope C E, Diamond D M. Progressive, age-related behavioral impairments in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin-1 transgenes. *Brain Research* 2001; (891): 42-53.
- Arendt T, Bruckner M K, Lange M, Bigl V. Changes in Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase in Alzheimers-Disease Resemble Embryonic-Development - A Study of Molecular-Forms. *Neurochemistry International* 1992; (21): 381-396.
- Arvidsson U, Riedl M, Elde R, Meister B. Vesicular acetylcholine transporter (VACHT) protein: a novel and unique marker for cholinergic neurons in the central and peripheral nervous systems. *J Comp Neurol*. 1997 Feb 24;378(4):454-67.

Ashe K H. Mechanisms of memory loss in A beta and tau mouse models. *Biochemical Society Transactions* 2005; (33): 591-594.

Association France Alzheimer. *Le Livre vert de la maladie d'Alzheimer : état des lieux et perspectives.* 2006 : 7-13

Astur R S, Ortiz M L, Sutherland R J. A characterization of performance by men and women in a virtual Morris water task: A large and reliable sex difference. *Behavioural Brain Research* 1998; (93): 185-190.

Atack J R, Perry E K, Bonham J R, Perry R H, Tomlinson B E, Blessed G, Fairbairn A. Molecular-Forms of Acetylcholinesterase in Senile Dementia of Alzheimer Type - Selective Loss of the Intermediate (10S) Form. *Neuroscience Letters* 1983; (40): 199-204.

Auld D S, Kornecook T J, Bastianetto S, Quirion R. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Progress in Neurobiology* 2002; (68): 209-245.

Auld D S, Kornecook T J, Bastianetto S, Quirion R. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Progress in Neurobiology* 2002; (68): 209-245.

-B-

Barnes CA. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol.* 1979 Feb;93(1):74-104.

Backman L, Wahlin A, Small B J, Herlitz A, Winblad B, Fratiglioni L. Cognitive functioning in aging and dementia: The Kungsholmen Project. *Aging Neuropsychology and Cognition* 2004; (11): 212-244.

Baddeley A D. Working memory: Some recent developments. *International Journal of Psychology* 2000; (35): 203.

Baehr W, Champagne M S, Lee A K, Pittler S J. Complete Cdna Sequences of Mouse Rod Photoreceptor Cgmp Phosphodiesterase Alpha-Subunit and Beta-Subunit, and Identification of Beta'-Subunit, A Putative Beta-Subunit Isozyme Produced by Alternative Splicing of the Beta-Subunit Gene. *Febs Letters* 1991; (278): 107-114.

Bahar-Fuchs A, Chetelat G, Villemagne V L, Moss S, Pike K, Masters C L, Rowe C, Savage G. Olfactory Deficits and Amyloid-beta Burden in Alzheimer's Disease, Mild Cognitive Impairment, and Healthy Aging: A PiB PET Study. *Journal of Alzheimers Disease* 2010; (22): 1081-1087.

Barghorn S, Nimmrich V, Striebinger A, Krantz C, Keller P, Janson B, Bahr M, Schmidt M, Bitner R S, Harlan J, Barlow E, Ebert U, Hillen H. Globular amyloid beta-peptide(1-42) oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 2005; (95): 834-847.

Bartus R T, Dean R L, Beer B, Lippa A S. The Cholinergic Hypothesis of Geriatric Memory Dysfunction. *Science* 1982; (217): 408-417.

Bartus R T. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: Lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Experimental Neurology* 2000; (163): 495-529.

- Baxter M G, Bucci D J, Sobel T J, Williams M J, Gorman L K, Gallagher M. Intact spatial learning following lesions of basal forebrain cholinergic neurons. *Neuroreport* 1996; (7): 1417-1420.
- Baxter M G, Bucci D J, Wiley R G, Gorman L K, Gallagher M. Selective Immunotoxic Lesions of Basal Forebrain Cholinergic Cells - Effects on Learning and Memory in Rats. *Behavioral Neuroscience* 1995; (109): 714-722.
- Beach T G. Physiologic origins of age-related beta-amyloid deposition. *Neurodegenerative Diseases* 2008; (5): 143-145.
- Berger-Sweeney J, Stearns N A, Murg S L, Floerke-Nashner L R, Lappi D A, Baxter M G. Selective immunolesions of cholinergic neurons in mice: Effects on neuroanatomy, neurochemistry, and behavior. *Journal of Neuroscience* 2001; (21): 8164-8173.
- Bird TD, Stranahan S, Sumi SM, Raskind M. Alzheimer's disease: choline acetyltransferase activity in brain tissue from clinical and pathological subgroups. *Ann Neurol.* 1983 Sep;14(3):284-93.
- Bizon J, Prescott S, Nicolle M M. Intact spatial learning in adult Tg2576 mice. *Neurobiology of Aging* 2007; (28): 440-446.
- Blackwell A D, Sahakian B J, Vesey R, Semple J M, Robbins T W, Hodges J R. Detecting dementia: Novel neuropsychological markers of preclinical Alzheimer's disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 2004; (17): 42-48.
- Boncristiano S, Calhoun M E, Kelly P H, Pfeifer M, Bondolfi L, Stadler M, Phinney A L, Abramowski D, Sturchler-Pierrat C, Enz A, Sommer B, Staufenbiel M, Jucker M. Cholinergic changes in the APP23 transgenic mouse model of cerebral amyloidosis. *Journal of Neuroscience* 2002; (22): 3234-3243.
- Borchelt D R, Ratovitski T, vanLare J, Lee M K, Gonzales V, Jenkins N A, Copeland N G, Price D L, Sisodia S S. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* 1997; (19): 939-945.
- 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. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate A beta 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 1996; (17): 1005-1013.
- Bothe G W M, Bolivar V J, Vedder M J, Geistfeld J G. Behavioral differences among fourteen inbred mouse strains commonly used as disease models. *Comparative Medicine* 2005; (55): 326-334.
- Bour A, Little S, Dodart J C, Kelche C, Mathis C. A secreted form of the beta-amyloid precursor protein (sAPP(695)) improves spatial recognition memory in OF1 mice. *Neurobiology of Learning and Memory* 2004; (81): 27-38.
- Braak H, Braak E, Strothjohann M. Abnormally Phosphorylated Tau-Protein Related to the Formation of Neurofibrillary Tangles and Neuropil Threads in the Cerebral-Cortex of Sheep and Goat. *Neuroscience Letters* 1994; (171): 1-4.
- Braak H, Braak E. Neuropathological Staging of Alzheimer-Related Changes. *Acta Neuropathologica* 1991; (82): 239-259.
- Brown R E, Wong A A. The influence of visual ability on learning and memory performance in 13 strains of mice. *Learning & Memory* 2007; (14): 134-144.

Buée L, Hof PR, Roberts DD, Delacourte A, Morrison JH, Fillit HM. Immunohistochemical identification of thrombospondin in normal human brain and in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 1992 Oct;141(4):783-8.

Buhot M C, Dubayle D, Malleret G, Javerzat S, Segu L. Exploration, anxiety, and spatial memory in transgenic anophthalmic mice. *Behavioral Neuroscience* 2001; (115): 455-467.

-C-

Caccamo A, Oddo S, Billings L M, Green K N, Martinez-Coria H, Fisher A, LaFerla F M. M1 receptors play a central role in modulating AD-like pathology in transgenic mice. *Neuron* 2006; (49): 671-682.

Calhoun M E, Wiederhold K H, Abramowski D, Phinney A L, Probst A, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Sommer B, Jucker M. Neuron loss in APP transgenic mice. *Nature* 1998; (395): 755-756.

Camicioli R, Howieson D, Lehman S, Kaye J. Talking while walking: The effect of a dual task in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 1997; (48): 955-958.

Camus J F, Nicolas S, Wenisch E, Morrone I, Blanchard F, Bakchine S. Implicit memory for words presented in short texts is preserved in Alzheimer's disease. *Psychological Medicine* 2003; (33): 169-174.

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? *Neurodegenerative Diseases* 2008; (5): 304-317.

Castellani R J, Honda K, Zhu X W, Cash A D, Nunomura A, Perry G, Smith M A. Contribution of redox-active iron and copper to oxidative damage in Alzheimer disease. *Ageing Research Reviews* 2004; (3): 319-326.

Castellani R J, Lee H G, Zhu X W, Perry G, Smith M A. Alzheimer disease pathology as a host response. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 2008; (67): 523-531.

Caswell M D, San Mok S, Henry A, Cappai R, Klug G, Beyreuther K, Masters C L, Small D H. The amyloid beta-protein precursor of Alzheimer's disease is degraded extracellularly by a Kunitz protease inhibitor domain-sensitive trypsin-like serine protease in cultures of chick sympathetic neurons. *European Journal of Biochemistry* 1999; (266): 509-516.

Chapman P F, White G L, Jones M W, Cooper-Blacketer D, Marshall V J, Irizarry M, Younkin L, Good M A, Bliss T V P, Hyman B T, Younkin S G, Hsiao K K. Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nature Neuroscience* 1999; (2): 271-276.

Chauhan N B, Sandoval J S, Chauhan B C. Cholinergic immunolesioning produced tangle-like inclusions in TgCRND8 brain. *Journal of Neurochemistry* 2006; (96): 26.

Chen K S, Masliah E, Grajeda H, Guido T, Huang J P, Khan K, Motter R, Soriano F, Games D. Neurodegenerative Alzheimer-like pathology in PDAPP 717V -> F transgenic mice. *Neuronal Degeneration and Regeneration: from Basic Mechanisms to Prospects for Therapy* 1998; (117): 327-334.

- Cho Y H, Jaffard R. The Entorhinal Cortex and A Delayed Non-Matching-To-Place Task in Mice - Emphasis on Preoperative Training and Presentation Procedure. *European Journal of Neuroscience* 1994; (6): 1265-1274.
- Chow S K, Yu D, MacDonald C L, Buibas M, Silva G A. Amyloid beta-peptide directly induces spontaneous calcium transients, delayed intercellular calcium waves and gliosis in rat cortical astrocytes. *Asn Neuro* 2010; (2).
- Chow V W, Mattson M P, Wong P C, Gleichmann M. An Overview of APP Processing Enzymes and Products. *Neuromolecular Medicine* 2010; (12): 1-12.
- Cisse M A, Sunyach C, Slack B E, Fisher A, Vincent B, Checler F. M-1 and M-3 muscarinic receptors control physiological processing of cellular prion by modulating ADAM17 phosphorylation and activity. *Journal of Neuroscience* 2007; (27): 4083-4092.
- Clayton N S, Griffiths D P, Emery N J, Dickinson A. Elements of episodic-like memory in animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 2001; (356): 1483-1491.
- Clinton L K, Billings L M, Green K N, Caccamo A, Ngo J, Oddo S, McGaugh J L, LaFerla F M. Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. *Neurobiology of Disease* 2007; (28): 76-82.
- Collerton D. Cholinergic Function and Intellectual Decline in Alzheimers-Disease. *Neuroscience* 1986; (19): 1-28.
- Conrad C D, Galea L A M, Kuroda Y, Mcewen B S. Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine pretreatment. *Behavioral Neuroscience* 1996; (110): 1321-1334.
- Coulson E J, Paliga K, Beyreuther K, Masters C L. What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. *Neurochemistry International* 2000; (36): 175-184.
- Court J, Martin-Ruiz C, Piggott M, Spurden D, Griffiths M, Perry E. Nicotinic receptor abnormalities in Alzheimer's disease. *Biological Psychiatry* 2001; (49): 175-184.
- Coutureau E, Di Scala G. Entorhinal cortex and cognition. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2009; (33): 753-761.
- Cras P, Smith M A, Richey P L, Siedlak S L, Mulvihill P, Perry G. Extracellular Neurofibrillary Tangles Reflect Neuronal Loss and Provide Further Evidence of Extensive Protein Cross-Linking in Alzheimer-Disease. *Acta Neuropathologica* 1995; (89): 291-295.
- Czeisler C A, Shanahan T L, Klerman E B, Martens H, Brotman D J, Emens J S, Klein T, Rizzo J F. Suppression of Melatonin Secretion in Some Blind Patients by Exposure to Bright Light. *New England Journal of Medicine* 1995; (332): 6-11.

-D-

- Dale R H I, Innis N K. Interactions Between Response Stereotypy and Memory Strategies on the 8-Arm Radial Maze. *Behavioural Brain Research* 1986; (19): 17-25.

- Davis K L, Mohs R C, Marin D, Purohit D P, Perl D P, Lantz M, Austin G, Haroutunian V. Cholinergic markers in elderly patients with early signs of Alzheimer disease. *Jama-Journal of the American Medical Association* 1999; (281): 1401-1406.
- de Kloet E R, Joels M, Holsboer F. Stress and the brain: From adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience* 2005; (6): 463-475.
- De Strooper B, Annaert W. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *Journal of Cell Science* 2000; (113): 1857-1870.
- Deacon R M J, Cholerton L L, Talbot K, Nair-Roberts R G, Sanderson D J, Romberg C, Koros E, Bornemann K D, Rawlins J N P. Age-dependent and -independent behavioral deficits in Tg2576 mice. *Behavioural Brain Research* 2008; (189): 126-138.
- Degroot A, Parent M B. Increasing acetylcholine levels in the hippocampus or entorhinal cortex reverses the impairing effects of septal GABA receptor activation on spontaneous alternation. *Learning & Memory* 2000; (7): 293-302.
- Dekosky S T, Harbaugh R E, Schmitt F A, Bakay R A E, Chui H C, Knopman D S, Reeder T M, Shetter A G, Senter H J, Markesbery W R, Carter P, Frey J L, Schwartz A, Shetter A G, Allen C D, Bohi L, Casey R, Culver C M, Harbaugh R E, Reeder T M, Bakay R A E, Freides D, Karp H R, Mirra S S, Dekosky S T, Markesbery W R, Schmitt F A, Deinard S, Erickson D, Fuhrman M, Knopman D S, Dekosky S T, Bardolph E, Chui H C, Giannotta S, Smith B, Teng E, Williams B, Klauscher L, Kortyna R, Senter H J, Vega A. Cortical Biopsy in Alzheimers-Disease - Diagnostic-Accuracy and Neurochemical, Neuropathological, and Cognitive Correlations. *Annals of Neurology* 1992; (32): 625-632.
- DeKosky S T, Ikonovic M D, Bennett D A, Cochran E J, Mufson E J. Cholinergic plasticity in hippocampus of elderly subjects with mild cognitive impairment. *Neurobiology of Aging* 2002; (23): S371.
- Delacourte A. Natural and molecular history of Alzheimer's disease. *Annales de Biologie Clinique* 2000; (58): 350-355.
- Delaere P, Duyckaerts C, Masters C, Beyreuther K, Piette F, Hauw J J. Large Amounts of Neocortical Beta-A4 Deposits Without Neuritic Plaques Nor Tangles in A Psychometrically Assessed, Nondemented Person. *Neuroscience Letters* 1990; (116): 87-93.
- Deller T, Nitsch R, Frotscher M. Heterogeneity of the commissural projection to the rat dentate gyrus: A Phaseolus vulgaris leucoagglutinin tracing study. *Neuroscience* 1996; (75): 111-121.
- Del Turco D, Woods AG, Gebhardt C, Phinney AL, Jucker M, Frotscher M, Deller T. Comparison of commissural sprouting in the mouse and rat fascia dentata after entorhinal cortex lesion. *Hippocampus*. 2003;13(6):685-99.
- Despres O, Candas V, Dufour A. The extent of visual deficit and auditory spatial compensation: evidence from self-positioning from auditory cues. *Cognitive Brain Research* 2005; (23): 444-447.
- Dickson D W, Crystal H A, Mattiace L A, Masur D M, Blau A D, Davies P, Yen S H, Aronson M K. Identification of Normal and Pathological Aging in Prospectively Studied Nondemented Elderly Humans. *Neurobiology of Aging* 1992; (13): 179-189.
- Divry P. Etude histo-chimique des plaques seniles. *J Belg Neurol Psychiatr*. 1927;27:643-57

- Dodart J C, Mathis C, Bales K R, Paul S M. Does my mouse have Alzheimer's disease? *Genes Brain and Behavior* 2002; (1): 142-155.
- Dodart J C, Meziane H, Mathis C, Bales K R, Paul S M, Ungerer A. Behavioral disturbances in transgenic mice overexpressing the V717F beta-amyloid precursor protein. *Behavioral Neuroscience* 1999; (113): 982-990.
- Dong J, Atwood C S, Anderson V E, Siedlak S L, Smith M A, Perry G, Carey P R. Metal binding and oxidation of amyloid-beta within isolated senile plaque cores: Raman microscopic evidence. *Biochemistry* 2003; (42): 2768-2773.
- Dornan W A, McCampbell A R, Tinkler G P, Hickman L J, Bannon A W, Decker M W, Gunther K L. 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. *Behavioural Brain Research* 1997; (86): 181-189.
- Dougherty K D, Milner T A. Cholinergic septal afferent terminals preferentially contact neuropeptide Y-containing interneurons compared to parvalbumin-containing interneurons in the rat dentate gyrus. *Journal of Neuroscience* 1999; (19): 10140-10152.
- Du A T, Schuff N, Amend D, Laakso M P, Hsu Y Y, Jagust W J, Yaffe K, Kramer J H, Reed B, Norman D, Chui H C, Weiner M W. Magnetic resonance imaging of the entorhinal cortex and hippocampus in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* 2001; (71): 441-447.
- 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, Weiner M W. Atrophy rates of entorhinal cortex in AD and normal aging. *Neurology* 2003; (60): 481-486.
- Duyckaerts C, Delatour B, Potier M C. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathologica* 2009; (118): 5-36.
- Dyer R S, Weldon D A. Blindness-Induced Hyperactivity in Several Strains of Mice. *Physiology & Behavior* 1975; (15): 439-441.

-F-

- Fahrenholz F, Gilbert S, Kojro E, Lammich S, Postina R. alpha-secretase activity of the disintegrin metalloprotease ADAM 10 - Influences of domain structure. *Molecular Basis of Dementia* 2000; (920): 215-222.
- Farr S A, Banks W A, La Scola M E, Morley J E. Blind mice are not impaired in T-maze footshock avoidance acquisition and retention. *Physiology & Behavior* 2002; (76): 531-538.
- Ferrari-dileo G, Flynn D D. Diminished Muscarinic Receptor-Stimulated [H-3] Pip2 Hydrolysis in Alzheimers-Disease. *Life Sciences* 1993; (53): L439-L444.
- Fischer W, Gage F H, Bjorklund A. Degenerative Changes in Forebrain Cholinergic Nuclei Correlate with Cognitive Impairments in Aged Rats. *European Journal of Neuroscience* 1989; (1): 34-45.
- Fishman E B, Siek G C, Maccallum R D, Bird E D, Volicer L, Marquis J K. Distribution of the Molecular-Forms of Acetylcholinesterase in Human-Brain - Alterations in Dementia of the Alzheimer Type. *Annals of Neurology* 1986; (19): 246-252.

- Fleischman D A, Wilson R S, Gabrieli J D E, Schneider J A, Bienias J L, Bennett D A. Implicit memory and Alzheimer's disease neuropathology. *Brain* 2005; (128): 2006-2015.
- Fonseca M I, Ager R R, Chu S H, Yazan O, Sanderson S D, LaFerla F M, Taylor S M, Woodruff T M, Tenner A J. Treatment with a C5aR Antagonist Decreases Pathology and Enhances Behavioral Performance in Murine Models of Alzheimer's Disease. *Journal of Immunology* 2009; (183): 1375-1383.
- Foster R G, Provencio I, Hudson D, Fiske S, Degrip W, Menaker M. Circadian Photoreception in the Retinally Degenerate Mouse (Rd/Rd). *Journal of Comparative Physiology A-Sensory Neural and Behavioral Physiology* 1991; (169): 39-50.
- Foster R G, Provencio I, Hudson D, Fiske S, Degrip W, Menaker M. Circadian Photoreception in the Retinally Degenerate Mouse (Rd/Rd). *Journal of Comparative Physiology A-Sensory Neural and Behavioral Physiology* 1991; (169): 39-50.
Ref ID: 29
- Fourchey Marlène. Psychologie. Maladie d'Alzheimer. 2008. [consulté le 12 décembre 2009].
<http://psychologie-m-fouchey.psyblogs.net/?post//La-Maladie-dAlzheimer>
- Francis P T, Palmer A M, Snape M, Wilcock G K. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* 1999; (66): 137-147.
- Frotscher M. Mossy Fiber Synapses on Glutamate Decarboxylase-Immunoreactive Neurons - Evidence for Feedforward Inhibition in the Ca3 Region of the Hippocampus. *Experimental Brain Research* 1989; (75): 441-445.
- Furukawa K, Sopher B L, Rydel R E, Begley J G, Pham D G, Martin G M, Fox M, Mattson M P. Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *Journal of Neurochemistry* 1996; (67): 1882-1896.

-G-

- Gage F H, Bjorklund A, Stenevi U. Local-Regulation of Compensatory Noradrenergic Hyperactivity in the Partially Denervated Hippocampus. *Nature* 1983; (303): 819-821.
- Gage F H, Bjorklund A, Stenevi U. Reinnervation of the Partially Deafferented Hippocampus by Compensatory Collateral Sprouting from Spared Cholinergic and Noradrenergic Afferents. *Brain Research* 1983; (268): 27-37.
- Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, Guido T, Hagopian S, Johnsonwood K, Khan K, Lee M, Leibowitz P, Lieberburg I, Little S, Masliah E, Mcconlogue L, Montoyazavala M, Mucke L, Paganini L, Penniman E, Power M,
- Garcia MF, Gordon MN, Hutton M, Lewis J, McGowan E, Dickey CA, Morgan D, Arendash GW. The retinal degeneration (rd) gene seriously impairs spatial cognitive performance in normal and Alzheimer's transgenic mice. *Neuroreport*. 2004 Jan 19;15(1):73-7.
- Geula C, Mesulam M M, Saroff D M, Wu C K. Relationship between plaques, tangles, and loss of cortical cholinergic fibers in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 1998; (57): 63-75.

- Gil-Bea F J, Aisa B, Schliebs R, Ramirez M J. Increase of locomotor activity underlying the behavioral disinhibition in Tg2576 mice. *Behavioral Neuroscience* 2007; (121): 340-344.
- Gimenez E, Montoliu L. A simple polymerase chain reaction assay for genotyping the retinal degeneration mutation (Pdeb(rd1)) in FVB/N-derived transgenic mice. *Laboratory Animals* 2001; (35): 153-156.
- Gómez-Isla T, Price JL, McKeel DW Jr, Morris JC, Growdon JH, Hyman BT. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 1996 Jul 15;16(14):4491-500.
- Gomezramos P, Mufson E J, Moran M A. Ultrastructural-Localization of Acetylcholinesterase in Neurofibrillary Tangles, Neuropil Threads and Senile Plaques in Aged and Alzheimer Brain. *Brain Research* 1992; (569): 229-237.
- Good M A, Hale G, Staal V. Impaired "episodic-like" object memory in adult APP(swe) transgenic mice. *Behavioral Neuroscience* 2007; (121): 443-448.
- Gorman M R, Yellon S. Lifespan Daily Locomotor Activity Rhythms in A Mouse Model of Amyloid-Induced Neuropathology. *Chronobiology International* 2010; (27): 1159-1177.
- Gotz J, Chen F, Barmettler R, Nitsch R M. Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau. *Journal of Biological Chemistry* 2001; (276): 529-534.
- Grundke-Iqbal I, Vorbrodt AW, Iqbal K, Tung YC, Wang GP, Wisniewski HM. Microtubule-associated polypeptides tau are altered in Alzheimer paired helical filaments. *Brain Res.* 1988 Aug;464(1):43-52.
- Guerin D, Sacquet J, Mandairon N, Jourdan F, Didier A. Early locus coeruleus degeneration and olfactory dysfunctions in Tg2576 mice. *Neurobiology of Aging* 2009; (30): 272-283.

-H-

- Haass C, Lemere C A, Capell A, Citron M, Seubert P, Schenk D, Lannfelt L, Selkoe D J. The Swedish Mutation Causes Early-Onset Alzheimers-Disease by Beta-Secretase Cleavage Within the Secretory Pathway. *Nature Medicine* 1995; (1): 1291-1296.
- Hale G, Good M. Impaired visuospatial recognition memory but normal object novelty detection and relative familiarity judgments in adult mice expressing the APP^{swe} Alzheimer's disease mutation. *Behavioral Neuroscience* 2005; (119): 884-891.
- Hannequin D, Champion D, Dumanchin C, Martinez M, Agid Y, Clerget-Darpoux F, Frebourg T, Brice A. Genetics of Alzheimer's disease. *Revue Neurologique* 1998; (154): S65-S74.
- Hardman R, Evans D J, Fellows L, Hayes B, Rupniak H T, Barnes J C, Higgins G A. Evidence for recovery of spatial learning following entorhinal cortex lesions in mice. *Brain Research* 1997; (758): 187-200.
- Hardy J A, Higgins G A. Alzheimers-Disease - the Amyloid Cascade Hypothesis. *Science* 1992; (256): 184-185.
- Hardy J, Adolfsson R, Alafuzoff I, Bucht G, Marcusson J, Nyberg P, Per Dahl E, Wester P, Winblad B. Transmitter Deficits in Alzheimers-Disease. *Neurochemistry International* 1985; (7): 545-563.

- Hardy J, Selkoe D J. Medicine - The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002; (297): 353-356.
- Harkany T, Abraham I, Timmerman W, Laskay G, Toth B, Sasvari M, Konya C, Sebens J B, Korf J, Nyakas C, Zarandi M, Soos K, Penke B, Luiten P G M. beta-Amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamate-triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis. *European Journal of Neuroscience* 2000; (12): 2735-2745.
- Harris M E, Hensley K, Butterfield D A, Leedle R A, Carney J M. Direct Evidence of Oxidative Injury Produced by the Alzheimers Beta-Amyloid Peptide (1-40) in Cultured Hippocampal-Neurons. *Experimental Neurology* 1995; (131): 193-202.
- Harrison F E, Hosseini A H, McDonald M P. Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behavioural Brain Research* 2009; (198): 247-251.
- Hawkes C. Olfaction in neurodegenerative disorder. *Movement Disorders* 2003; (18): 364-372.
- Henke H, Lang W. Cholinergic Enzymes in Neocortex, Hippocampus and Basal Forebrain of Non-Neurological and Senile Dementia of Alzheimer-Type Patients. *Brain Research* 1983; (267):
- Hernandez C M, Kaye R, Zheng H, Sweatt J D, Dineley K T. Loss of alpha 7 Nicotinic Receptors Enhances beta-Amyloid Oligomer Accumulation, Exacerbating Early-Stage Cognitive Decline and Septohippocampal Pathology in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience* 2010; (30): 2442-2453.
- Holcomb L A, Gordon M N, Jantzen P, Hsiao K, Duff K, Morgan D. Behavioral changes in transgenic mice expressing both amyloid precursor protein and presenilin-1 mutations: Lack of association with amyloid deposits. *Behavior Genetics* 1999; (29): 177-185.
- Holcomb L, Gordon M N, 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 C M, 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. *Nature Medicine* 1998; (4): 97-100.
- Holscher C, Schmidt W J. Quinolinic Acid Lesion of the Rat Entorhinal Cortex Pars Medialis Produces Selective Amnesia in Allocentric Working-Memory (Wm), But Not in Egocentric Wm. *Behavioural Brain Research* 1994; (63): 187-194.
- Hort J, Laczó J, Vyhnaček M, Bojar M, Bures J, Vlček K. Spatial navigation deficit in amnesic mild cognitive impairment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; (104): 4042-4047.
- Hort J. Charles Bonnet syndrome as the first sign of Alzheimer's disease. *Ceska A Slovenska Neurologie A Neurochirurgie* 2006; (69): 141-143.
- Hsiao K K, Borchelt D R, Olson K, Johannsdottir R, Kitt C, Yunis W, Xu S, Eckman C, Younkin S, Price D, Iadecola C, Clark H B, Carlson G. Age-Related Cns Disorder and Early Death in Transgenic Fvb/N Mice Overexpressing Alzheimer Amyloid Precursor Proteins. *Neuron* 1995; (15): 1203-1218.
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F S, Cole G. Correlative memory deficits, A beta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 1996; (274): 99-102.

-I-

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

Inestrosa N C, Alvarez A, Perez C A, Moreno R D, Vicente M, Linker C, Casanueva O I, Soto C, Garrido J. Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: Possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron* 1996; (16): 881-891.

Irizarry M C, McNamara M, Fedorchak K, Hsiao K, Hyman B T. APP(Sw) transgenic mice develop age-related A beta deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. *Journal of Neuro pathology and Experimental Neurology* 1997; (56): 965-973

Itoh A, Akaike T, Sokabe M, Nitta A, Iida R, Olariu A, Yamada K, Nabeshima T. Impairments of long-term potentiation in hippocampal slices of beta-amyloid-infused rats. *European Journal of Pharmacology* 1999; (382): 167-175.

-J-

Janis L S, Bishop T W, Dunbar G L. Medial Septal-Lesions in Rats Produce Permanent Deficits for Strategy Selection in A Spatial Memory Task. *Behavioral Neuroscience* 1994; (108): 892-898.

Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr. The carboxy terminus of the betaamyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry*. 1993 May 11;32(18):4693-7.

Jolas T, Zhang X S, Zhang Q, Wong G, Del Vecchio R, Gold L, Priestley T. Long-term potentiation is increased in the CA1 area of the hippocampus of APP(swe/ind) CRND8 mice. *Neurobiology of Disease* 2002; (11): 394-409.

Jung J H, An K, Kwon O B, Kim H S, Kim J H. Pathway-specific alteration of synaptic plasticity in Tg2576 mice. *Molecules and Cells* 2011; (32): 197-201.

Juottonen K, Laakso M P, Insausti R, Lehtovirta M, Pitkanen A, Partanen K, Soininen H. Volumes of the entorhinal and perirhinal cortices in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 1998; (19): 15-22.

-K-

Kang J, Müller-Hill B. Differential splicing of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor RNA in rat tissues: PreA4(695) mRNA is predominantly produced in rat and human brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990 Feb 14;166(3):1192-200.

Kar S, Issa A M, Seto D, Auld D S, Collier B, Quirion R. Amyloid beta-peptide inhibits high-affinity choline uptake and acetylcholine release in rat hippocampal slices. *Journal of Neurochemistry* 1998; (70): 2179-2187.

Kar S, Seto D, Gaudreau P, Quirion R. beta-Amyloid-related peptides inhibit potassium-evoked acetylcholine release from rat hippocampal slices. *Journal of Neuroscience* 1996; (16): 1034-1040.

- Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, Shoji M, Ashe KH, Younkin SG. Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2001 Jan 15;21(2):372-81
- Kesslak J P, Cotman C W, Chui H C, Vandennoort S, Fang H, Pfeffer R, Lynch G. Olfactory Tests As Possible Probes for Detecting and Monitoring Alzheimers-Disease. *Neurobiology of Aging* 1988; (9): 399-403.
- Kimchi T, Terkel J. Spatial learning and memory in the blind mole-rat in comparison with the laboratory rat and Levant vole. *Animal Behaviour* 2001; (61): 171-180.
- King D L, Arendash G W, Crawford F, Sterk T, Menendez J, Mullan M J. Progressive and gender-dependent cognitive impairment in the APP(SW) transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research* 1999; (103): 145-162.
- King D L, Arendash G W. Maintained synaptophysin immunoreactivity in Tg2576 transgenic mice during aging: correlations with cognitive impairment. *Brain Research* 2002; (926): 58-68.
- Klein W L, Krafft G A, Finch C E. Targeting small A beta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends in Neurosciences* 2001; (24): 219-224.
- Koo E H, Sisodia S S, Archer D R, Martin L J, Weidemann A, Beyreuther K, Fischer P, Masters C L, Price D L. Precursor of Amyloid Protein in Alzheimer-Disease Undergoes Fast Anterograde Axonal-Transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990; (87): 1561-1565.
- Kuentzel S L, Ali S M, Altman R A, Greenberg B D, Raub T J. The Alzheimer Beta-Amyloid Protein-Precursor Protease Nexin-Ii Is Cleaved by Secretase in A Trans-Golgi Secretory Compartment in Human Neuroglioma Cells. *Biochemical Journal* 1993; (295): 367-378.
- Kupers R, Chebat D R, Madsen K H, Paulson O B, Ptito M. Neural correlates of virtual route recognition in congenital blindness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; (107): 12716-12721.
- L-
- Laakso M P, Soininen H, Partanen K, Helkala E L, Hartikainen P, Vainio P, Hallikainen M, Hanninen T, Riekkinen P J. Volumes of Hippocampus, Amygdala and Frontal Lobes in the Mri-Based Diagnosis of Early Alzheimers-Disease - Correlation with Memory Functions. *Journal of Neural Transmission-Parkinsons Disease and Dementia Section* 1995; (9): 73-86.
- Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; (96): 3922-3927.
- Lanz T A, Carter D B, Merchant K M. Dendritic spine loss in the hippocampus of young PDAPP and Tg2576 mice and its prevention by the ApoE2 genotype. *Neurobiology of Disease* 2003; (13): 246-253.
- Lassmann H, Bancher C, Breitschopf H, Wegiel J, Bobinski M, Jellinger K, Wisniewski H M. Cell-Death in Alzheimers-Disease Evaluated by Dna Fragmentation In-Situ. *Acta Neuropathologica* 1995; (89): 35-41.

- Laurent B, Thomas-Anterion C, Allegri R F. Memories and dementias. *Revue Neurologique* 1998; (154): S33-S49.
- Lazarov O, Lee M, Peterson D A, Sisodia S S. Evidence that synaptically released beta-amyloid accumulates as extracellular deposits in the hippocampus of transgenic mice. *Journal of Neuroscience* 2002; (22): 9785-9793.
- Lee A C H, Rahman S, Hodges J R, Sahakian B J, Graham K S. Associative and recognition memory for novel objects in dementia: implications for diagnosis. *European Journal of Neuroscience* 2003; (18): 1660-1670.
- Leonard B W, Amaral D G, Squire L R, Zolamorgan S. Transient Memory Impairment in Monkeys with Bilateral Lesions of the Entorhinal Cortex. *Journal of Neuroscience* 1995; (15): 5637-5659.
- Lesne S, Koh M T, Kotilinek L, Kaye R, Glabe C G, Yang A, Gallagher M, Ashe K H. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 2006; (440): 352-357.
- Lewald J. Opposing effects of head position on sound localization in blind and sighted human subjects. *European Journal of Neuroscience* 2002; (15): 1219-1224.
- Lewis J, Dickson D W, Lin W L, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen S H, 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.
- Lewis J, McGowan E, Rockwood J, Melrose H, Nacharaju P, Van Slegtenhorst M, Gwinn-Hardy K, Murphy M P, Baker M, Yu X, Duff K, Hardy J, Corral A, Lin W L, Yen S H, Dickson D W, Davies P, Hutton M. Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nature Genetics* 2000; (25): 402-405.
- Liu L, Ikonen S, Tapiola T, Tanila H, van Groen T. Fimbria-fornix lesion does not affect APP levels and amyloid deposition in the hippocampus of APP+PS1 double transgenic mice. *Experimental Neurology* 2002; (177): 565-574.
- Loesche J, Steward O. Behavioral-Correlates of Denervation and Reinnervation of Hippocampal Formation of Rat - Recovery of Alternation Performance Following Unilateral Entorhinal Cortex Lesions. *Brain Research Bulletin* 1977; (2): 31-39.
- LÜCKER L., HOVAGUIMIAN F., NAVILLE A., GROEBLI F., La maladie d'Alzheimer : parcours du combattant, *Immersion en communauté*, 2003 : 7-16
- M-
- Malherbe P, Richards J G, Martin J R, Bluethmann H, Maggio J, Huber G. Lack of beta-amyloidosis in transgenic mice expressing low levels of familial Alzheimer's disease missense mutations. *Neurobiology of Aging* 1996; (17): 205-214.
- Mattson M P. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiological Reviews* 1997; (77): 1081-1132.
- Maurer K, Volk S, Gerbaldo H, Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet* 1997; (349): 1546-1549.
- Mcdonald R J, White N M. A Triple Dissociation of Memory-Systems - Hippocampus, Amygdala, and Dorsal Striatum. *Behavioral Neuroscience* 1993; (107): 3-22.

- McGaughy J, Kaiser T, Sarter M. 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. *Behavioral Neuroscience* 1996; (110): 247-265.
- Middei S, Geracitano R, Caprioli A, Mercuri N, Ammassari-Teule M. Preserved fronto-striatal plasticity and enhanced procedural learning in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease overexpressing mutant hAPP^{swe}. *Learning & Memory* 2004; (11): 447-452.
- Miller V M, Best P J. Spatial Correlates of Hippocampal Unit-Activity Are Altered by Lesions of the Fornix and Entorhinal Cortex. *Brain Research* 1980; (194): 311-323.
- Minniti A N, Rebolledo D L, Grez P M, Fadic R, Aldunate R, Volitakis I, Cherny R A, Opazo C, Masters C, Bush A I, Inestrosa N C. Intracellular amyloid formation in muscle cells of A beta-transgenic *Caenorhabditis elegans*: determinants and physiological role in copper detoxification. *Molecular Neurodegeneration* 2009; (4).
- Miyakawa T, Yamada M, Duttaroy A, Wess J. Hyperactivity and intact hippocampus-dependent learning in mice lacking the M-1 muscarinic acetylcholine receptor. *Journal of Neuroscience* 2001; (21): 5239-5250.
- Mizumori S J Y, Ward K E, Lavoie A M. Medial Septal Modulation of Entorhinal Single Unit-Activity in Anesthetized and Freely Moving Rats. *Brain Research* 1992; (570): 188-197.
- Moberg P J, Pearlson G D, Speedie L J, Lipsey J R, Strauss M E, Folstein S E. Olfactory Recognition - Differential Impairments in Early and Late Huntingtons and Alzheimers Diseases. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology* 1987; (9): 650-664.
- Moreau P H, Cosquer B, Jeltsch 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.
- Morris R G M. Episodic-like memory in animals: psychological criteria, neural mechanisms and the value of episodic-like tasks to investigate animal models of neurodegenerative disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 2001; (356): 1453-1465.
- Morris, R. G. M. Spatial Localization Does Not Require the Presence of Local Cues. *Learning and Motivation* 1981, 12(2), 239-260.
- Mountjoy C Q, Rossor M N, Iversen L L, Roth M. Correlation of Cortical Cholinergic and Gaba Deficits with Quantitative Neuropathological Findings in Senile Dementia. *Brain* 1984; (107): 507-518.
- Mountjoy C Q, Rossor M N, Iversen L L, Roth M. Correlation of Cortical Cholinergic and Gaba Deficits with Quantitative Neuropathological Findings in Senile Dementia. *Brain* 1984; (107): 507-518.
- Mouri A, Noda Y, Hara H, Mizoguchi H, Tabira T, Nabeshima T. Oral vaccination with a viral vector containing A beta cDNA attenuates age-related A beta accumulation and memory deficits without causing inflammation in a mouse Alzheimer model. *Faseb Journal* 2007; (21): 2135-2148.
Ref ID: 48
- Murayama O, Tomita T, Nihonmatsu N, Murayama M, Sun X Y, Honda T, Iwatsubo T, Takashima A. Enhancement of amyloid beta 42 secretion by 28 different presenilin 1 mutations of familial

Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* 1999; (265): 61-63.

-N-

Nagy Z, Esiri M M, Jobst K A, Morris J H, King E M F, McDonald B, Litchfield S, Smith A, Barnetson L, Smith A D. Relative Roles of Plaques and Tangles in the Dementia of Alzheimers-Disease - Correlations Using 3 Sets of Neuropathological Criteria. *Dementia* 1995; (6): 21-31.

Nakano Y, Kondoh G, Kudo T, Imaizumi K, Kato M, Miyazaki J, Tohyama M, Takeda J, Takeda M. Accumulation of murine amyloid beta 42 in a gene-dosage-dependent manner in PS1 'knock-in' mice. *European Journal of Neuroscience* 1999; (11): 2577-2581.

Nordberg A. Nicotinic receptor abnormalities of Alzheimer's disease: Therapeutic implications. *Biological Psychiatry* 2001; (49): 200-210.

-O-

O'Keefe, J., and Nadel, L. (1978). *The Hippocampus as a Cognitive Map* (Oxford: Clarendon Press).
Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng B P, LaFerla F M. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 2003; (24): 1063-1070.

Oddo S, Caccamo A, Shepherd J D, Murphy M P, Golde T E, Kaye R, Metherate R, Mattson M P, Akbari Y, LaFerla F M. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: Intracellular A beta and synaptic dysfunction. *Neuron* 2003; (39): 409-421.

Ogilvie J M, Speck J D. Dopamine has a critical role in photoreceptor degeneration in the rd mouse. *Neurobiology of Disease* 2002; (10): 33-40.

Ognibene E, Daniele S, Adriani W, Ghirardi O, Caprioli A, Laviola G. Altered home-cage activity and behavioral disinhibition in Tg2576 transgenic mice as a model of Alzheimer's disease. *Behavioural Pharmacology* 2004; (15): A22.

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. *Behavioural Brain Research* 2005; (156): 225-232.

-P-

Page DL, Glenner GG. Social interaction and wounding in the genesis of "spontaneous" murine amyloidosis. *Am J Pathol.* 1972 Jun;67(3):555-67.

Palkovits M. Anatomical Organization and Chemical Characterization of the Hypothalamic Parvocellular Neurosecretory-System. *Journal of Anatomy* 1984; (139): 713.

Palmer A M. Pharmacotherapy for Alzheimer's disease: progress and prospects. *Trends in Pharmacological Sciences* 2002; (23): 426-433.

Palop J J, Mucke L. Epilepsy and Cognitive Impairments in Alzheimer Disease. *Archives of Neurology* 2009; (66): 435-440.

- Pang K C H, Nocera R, Secor A J, Yoder R M. GABAergic septohippocampal neurons are not necessary for spatial memory. *Hippocampus* 2001; (11): 814-827.
- Parent M B, Baxter M G. Septohippocampal acetylcholine: Involved in but not necessary for learning and memory? *Learning & Memory* 2004; (11): 9-20.
- Pennanen C, Kivipelto M, Tuomainen S, Hartikainen P, Hanninen T, Laakso M P, Hallikainen M, Vanhanen M, Nissinen A, Helkala E L, Vainio P, Vanninen R, Partanen K, Soininen H. Hippocampus and entorhinal cortex in mild cognitive impairment and early AD. *Neurobiology of Aging* 2004; (25): 303-310.
- Perry E K, Perry R H, Gibson P H, Blessed G, Tomlinson B E. Cholinergic Connection Between Normal Aging and Senile Dementia in Human Hippocampus. *Neuroscience Letters* 1977; (6): 85-89.
- Perry E K, Tomlinson B E, Blessed G, Perry R H, Cross A J, Crow T T. Noradrenergic and Cholinergic Systems in Senile Dementia of Alzheimer Type. *Lancet* 1981; (2): 149.
- Peterson G M. Sprouting of Central Noradrenergic Fibers in the Dentate Gyrus Following Combined Lesions of Its Entorhinal and Septal Afferents. *Hippocampus* 1994; (4): 635-648.
- Pompl P N, Mullan M J, Bjugstad K, Arendash G W. 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. *Journal of Neuroscience Methods* 1999; (87): 87-95.
- Poorkaj P, Bird T D, Wijsman E, Nemens E, Garruto R M, Anderson L, Andreadis A, Wiederholt W C, Raskind M, Schellenberg G D. Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Annals of Neurology* 1998; (43): 815-825.
- Pouzet B, Welzl H, Gubler M K, Broersen L, Veenman C L, Feldon J, Rawlins J N P, Yee B K. The effects of NMDA-induced retrohippocampal lesions on performance of four spatial memory tasks known to be sensitive to hippocampal damage in the rat. *European Journal of Neuroscience* 1999; (11): 123-140.
- Provencio I, Foster R G. Circadian-Rhythms in Mice Can be Regulated by Photoreceptors with Cone-Like Characteristics. *Brain Research* 1995; (694): 183-190.
- Prut L, Abramowski D, Krucker T, Levy C L, Roberts A J, Staufenbiel M, Wiessner C. Aged APP23 mice show a delay in switching to the use of a strategy in the Barnes maze. *Behavioural Brain Research* 2007; (179): 107-110.

-Q-

- Qian S, Jiang P, Guan X M, Singh G, Trumbauer M E, Yu H, Chen H Y, Van der Ploeg L H T, Zheng H. Mutant human presenilin 1 protects presenilin 1 null mouse against embryonic lethality and elevates A beta 1-42/43 expression. *Neuron* 1998; (20): 611-617.

-R-

- Ramirez J J, Labbe R, Stein D G. Recovery from Perseverative Behavior After Entorhinal Cortex Lesions in Rats. *Brain Research* 1988; (459): 153-156.

- Ramirez M J, Heslop K E, Francis P T, Rattray M. Expression of Amyloid precursor protein, tau and presenilin RNAs in rat hippocampus following deafferentation lesions. *Brain Research* 2001; (907): 222-232.
- Ramon y Cajal, S. (1911). *Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertbres*. Maloine, Paris.
- Reed M N, Liu P, Kotilinek L A, Ashe K H. Effect size of reference memory deficits in the Morris water maze in Tg2576 mice. *Behavioural Brain Research* 2010; (212): 115-120.
- Richter J A, Perry E K, Tomlinson B E. Acetylcholine and Choline Levels in Postmortem Human-Brain Tissue - Preliminary-Observations in Alzheimers-Disease. *Life Sciences* 1980; (26): 1683-1689.
- Rodrigue K M, Raz N. Shrinkage of the entorhinal cortex over five years predicts memory performance in healthy adults. *Journal of Neuroscience* 2004; (24): 956-963.
- Rohan de Silva HA, Jen A, Wickenden C, Jen LS, Wilkinson SL, Patel AJ. Cell-specific expression of beta-amyloid precursor protein isoform mRNAs and proteins in neurons and astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res*. 1997 Jul;47(1-2):147-56
- Rylett R J, Ball M J, Colhoun E H. Evidence for High-Affinity Choline Transport in Synaptosomes Prepared from Hippocampus and Neocortex of Patients with Alzheimers-Disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 1983; (42): 345.
- S-
- Sahakian B J, Morris R G, Evenden J L, Heald A, Levy R, Philpot M, Robbins T W. A Comparative-Study of Visuospatial Memory and Learning in Alzheimer-Type Dementia and Parkinsons-Disease. *Brain* 1988; (111): 695-718.
- Saper C B, Wainer B H, German D C. Axonal and Trans-Neuronal Transport in the Transmission of Neurological Disease - Potential Role in System Degenerations, Including Alzheimers-Disease. *Neuroscience* 1987; (23): 389-398.
- Sarazin M, Dubois B. [A guide to diagnosis of Alzheimer's disease]. *Rev Prat*. 2005 Nov 15;55(17):1879-90. Review
- Sarazin M, Stern Y, Berr C, Riba A, Albert M, Brandt J, Dubois B. Neuropsychological predictors of dependency in patients with Alzheimer disease. *Neurology* 2005; (64): 1027-1031.
- Sato M, Kawarabayashi T, Shoji M, Kobayashi T, Tada N, Matsubara E, Hirai S. Neurodegeneration and gliosis in transgenic mice overexpressing a carboxy-terminal fragment of Alzheimer amyloid-beta protein precursor. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 1997; (8): 296-307.
- Sautter C S, Cocchi L, Schenk F. Dynamic visual information plays a critical role for spatial navigation in water but not on solid ground. *Behavioural Brain Research* 2008; (194): 242-245.
- Save E, Cressant A, Thinus-Blanc C, Poucet B. Spatial firing of hippocampal place cells in blind rats. *Journal of Neuroscience* 1998; (18): 1818-1826.
- Save E, Cressant A, Thinus-Blanc C, Poucet B. Spatial firing of hippocampal place cells in blind rats. *Journal of Neuroscience* 1998; (18): 1818-1826.
- Schellinck H M, Forestell C A, LoLordo V M. A simple and reliable test of olfactory learning and memory in mice. *Chemical Senses* 2001; (26): 663-672.

- Schenk D, Seubert P, Snyder B, Soriano F, Tan H, Vitale J, Wadsworth S, Wolozin B, Zhao J. Alzheimer-Type Neuropathology in Transgenic Mice Overexpressing V717F Beta-Amyloid Precursor Protein. *Nature* 1995; (373): 523-527.
- Selkoe D J. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease - Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Alzheimer's Disease: A Compendium of Current Theories* 2000; (924): 17-25.
- Shankar G M, Li S M, 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, Selkoe D J. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature Medicine* 2008; (14): 837-842.
- Shen J M, Barnes C A, Wenk G L, McNaughton B L. Differential effects of selective immunotoxic lesions of medial septal cholinergic cells on spatial working and reference. *Behavioral Neuroscience* 1996; (110): 1181-1186.
- Sims N R, Bowen D M, Smith C C T, Flack R H A, Davison A N, Snowden J S, Neary D. Glucose-Metabolism and Acetylcholine Synthesis in Relation to Neuronal-Activity in Alzheimers-Disease. *Lancet* 1980; (1): 333-335.
- Sinha S, Lieberburg I. Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; (96): 11049-11053.
- Skovronsky D M, Moore D B, Milla M E, Doms R W, Lee V M Y. Protein kinase C-dependent alpha-secretase competes with beta-secretase for cleavage of amyloid-beta precursor protein in the trans-Golgi network. *Journal of Biological Chemistry* 2000; (275): 2568-2575.
- Snow A D, Kinsella M G, Prather P B, Nochlin D, Podlisny M B, Selkoe D J, Kisilevsky R, Wight T N. A Characteristic Binding-Affinity Between Heparan-Sulfate Proteoglycans and the A4 Amyloid Protein of Alzheimers-Disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 1989; (48): 352.
- Spencer R L, Osteen W K, Mcewen B S. Water Maze Performance of Aged Sprague-Dawley Rats in Relation to Retinal Morphologic Measures. *Behavioural Brain Research* 1995; (68): 139-150.
- Spillantini M G, Bird T D, Ghetti B. Frontotemporal Dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: A new group of tauopathies. *Brain Pathology* 1998; (8): 387-402.
- Stanfield B B, Caviness V S, Cowan W M. Organization of Certain Afferents to the Hippocampus and Dentate Gyrus in Normal and Reeler Mice. *Journal of Comparative Neurology* 1979; (185): 461-483.
- SturchlerPierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold K H, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Burki K, Frey P, Paganetti P A, Waridel C, Calhoun M E, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M, Sommer B. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; (94): 13287-13292.
- Swainson R, Hodges J R, Galton C J, Semple J, Michael A, Dunn B D, Iddon J L, Robbins T W, Sahakian B J. Early detection and differential diagnosis of Alzheimer's disease and depression with neuropsychological tasks. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 2001; (12): 265-280.

-T-

- Talesa V N. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mechanisms of Ageing and Development* 2001; (122): 1961-1969.
- Tanabe, C., Hotoda, N., Sasagawa, N., Sehara-Fujisawa, A., Maruyama, K., & Ishiura, S. (2006). ADAM19 is tightly associated with constitutive Alzheimer's disease APP alpha-secretase in A172 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 352, 111–117.
- Teter B, Ashford J W. Neuroplasticity in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience Research* 2002; (70): 402-437.
- Tippett L J, Blackwood K, Farah M J. Visual object and face processing in mild-to-moderate Alzheimer's disease: from segmentation to imagination. *Neuropsychologia* 2003; (41): 453-468.
- Tolman EC. Cognitive maps in rats and men. *Psychol Rev.* 1948 Jul;55(4):189-208
- Tounsi H, Deweer B, Ergis A M, Van der Linden M, Pillon B, Michon A, Dubois B. Sensitivity to semantic cuing: An index of episodic memory dysfunction in early Alzheimer disease. *Alzheimer Disease & Associated Disorders* 1999; (13): 38-46.
- Traissard N, Herbeaux K, Cosquer B, Jeltsch H, Ferry B, Galani R, Pernon A, Majchrzak M, Cassel J C. 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.
- Tsang S W, Pomakian J, Marshall G A, Vinters H V, Cumming J L, Chen C P, Wong P T H, Lai M K. Defective muscarinic M1-G-protein coupling associates with protein kinase-C activity and NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 2006; (98): 18-19.
- Tulving E, Kroll N. Novelty Assessment in the Brain and Long-Term-Memory Encoding. *Psychonomic Bulletin & Review* 1995; (2): 387-390.

-V-

- van Groen T, Miettinen P, Kadish I. The entorhinal cortex of the mouse: Organization of the projection to the hippocampal formation. *Hippocampus* 2003; (13): 133-149.
- van Groen T. Entorhinal cortex of the mouse: Cytoarchitectonical organization. *Hippocampus* 2001; (11): 397-407.
- Van Hoesen GW, Hyman BT. Hippocampal formation: anatomy and the patterns of pathology in Alzheimer's disease. *Prog Brain Res.* 1990;83:445-57.
- 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 L, Edenson S, Lile J, Jarosinski M A, Biere A L, Curran E, Burgess T, Louis J C, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M. beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 1999; (286): 735-741.
- Vaucher E, Aumont N, Pearson D, Rowe W, Poirier J, Kar S. Amyloid beta peptide levels and its effects on hippocampal acetylcholine release in aged, cognitively-impaired and -unimpaired rats. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 2001; (21): 323-329.

-W-

- Wachowiak M, Shipley M T. Coding and synaptic processing of sensory information in the glomerular layer of the olfactory bulb. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2006; (17): 411-423.
- Waite J J, Chen A D, Wardlow M L, Wiley R G, Lappi D A, Thal L J. 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* 1995; (65): 463-476.
- Walsh D M, Klyubin I, Fadeeva J V, Cullen W K, Anwyl R, Wolfe M S, Rowan M J, Selkoe D J. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 2002; (416): 535-539.
- Warren R, Molday R S. Regulation of the rod photoreceptor cyclic nucleotide-gated channel. *Photoreceptors and Calcium* 2002; (514): 205-223.
- Watanabe S, Yoshida M. Auditory cued spatial learning in mice. *Physiology & Behavior* 2007; (92): 906-910.
- Wesson D W, Levy E, Nixon R A, Wilson D A. Olfactory Dysfunction Correlates with Amyloid-beta Burden in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *Journal of Neuroscience* 2010; (30): 505-514.
- Westerman M A, Cooper-Blacketer D, Mariash A, Kotilinek L, Kawarabayashi T, Younkin L H, Carlson G A, Younkin S G, Ashe K H. The relationship between A beta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience* 2002; (22): 1858-1867.
- Whishaw I Q, Gorny B. Path integration absent in scent-tracking fimbria-fornix rats: Evidence for hippocampal involvement in "sense of direction" and "sense of distance" using self-movement cues. *Journal of Neuroscience* 1999; (19): 4662-4673.
- Whishaw I Q, Tomie J A. Of mice and mazes: Similarities between mice and rats on dry land but not water mazes. *Physiology & Behavior* 1996; (60): 1191-1197
- White P, Goodhardt M J, Keet J P, Hiley C R, Carrasco L H, Williams I E I, Bowen D M. Neocortical Cholinergic Neurons in Elderly People. *Lancet* 1977; (1): 668-671.
- Whitehouse P J, Struble R G, Clark A W, Price D L. Alzheimer-Disease - Plaques, Tangles, and the Basal Forebrain. *Annals of Neurology* 1982; (12): 494.
- Wilcock G K, Esiri M M, Bowen D M, Smith C C T. Alzheimers-Disease - Correlation of Cortical Choline-Acetyltransferase Activity with the Severity of Dementia and Histological Abnormalities. *Journal of the Neurological Sciences* 1982; (57): 407-417.
- Wiley R G. Neural Lesioning with Ribosome-Inactivating Proteins - Suicide Transport and Immunolesioning. *Trends in Neurosciences* 1992; (15): 285-290.
- Wilson D A, Stevenson R J. Olfactory perceptual learning: the critical role of memory in odor discrimination. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2003; (27): 307-328.
- Wolfe M S. gamma-secretase: Structure, function, and modulation for Alzheimer's disease. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2008; (8): 2-8.

Wong A A, Brown R E. Visual detection, pattern discrimination and visual acuity in 14 strains of mice. *Genes Brain and Behavior* 2006; (5): 389-403.

Woolf N J. Cholinergic Systems in Mammalian Brain and Spinal-Cord. *Progress in Neurobiology* 1991; (37): 475-524.

-Y-

Yamada K, Nabeshima T. Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharmacology & Therapeutics* 2000; (88): 93-113.

Yankner B A, Duffy L K, Kirschner D A. Neurotrophic and Neurotoxic Effects of Amyloid Beta-Protein - Reversal by Tachykinin Neuropeptides. *Science* 1990; (250): 279-282.

Young J W, Sharkey J, Finlayson K. Progressive impairment in olfactory working memory in a mouse model of Mild Cognitive Impairment. *Neurobiology of Aging* 2009; (30): 1430-1443.

-Z-

Zhang Q P, Yang G A, Li W X, Fan Z Q, Sun A Y, Luo J, Ke Z J. Thiamine deficiency increases beta-secretase activity and accumulation of beta-amyloid peptides. *Neurobiology of Aging* 2011; (32): 42-53.

Zheng H, Koo E H. The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Molecular Neurodegeneration* 2006; (1).

Zolamorgan S, Squire L R, Ramus S J. Severity of Memory Impairment in Monkeys As A Function of Locus and Extent of Damage Within the Medial Temporal-Lobe Memory System. *Hippocampus* 1994; (4): 483-495.

Zubenko G S, Marquis J K, Volicer L, Direnfeld L K, Langlais P J, Nixon R A. Cerebrospinal-Fluid Levels of Angiotensin-Converting Enzyme, Acetylcholinesterase, and Dopamine Metabolites in Dementia Associated with Alzheimers-Disease and Parkinsons-Disease - A Correlative Study. *Biological Psychiatry* 1986; (21): 1365-1381.

Résumé

La maladie d'Alzheimer (MA) est notamment caractérisée par des dégénérescences neurofibrillaires, mais aussi par la présence de plaques amyloïdes (formées de peptide A β) cérébrales, ainsi que par une atrophie précoce du cortex entorhinal (CE) et une perte neuronale progressive des noyaux cholinergiques de la base (NCB) du cerveau antérieur. Selon notre hypothèse, la dégénérescence conjointe de ces deux structures joue un rôle-clé dans l'évolution des déficits cognitifs qui caractérisent la MA, en particulier ceux qui touchent la mémoire spatiale. Dans ce travail, la lésion de ces deux structures a été induite chez une souris transgénique (tg2576) qui modélise certains aspects de la MA, dont les dépôts amyloïdes débutant à l'âge de 8 mois et des déficits de mémoire spatiale modérés et plus tardifs ; toutefois, ces souris ne présentent pas de perte neuronale dans le CE et les NCB. Notre but était d'étudier les interactions entre ces lésions typiques de la MA, seules ou combinées, et la pathologie amyloïde des souris tg2576, ainsi que leur impact sur les performances de mémoire spatiale. Des souris tg2576 et wt de 8 mois ayant subi une lésion excitotoxique du CE et/ou une lésion immunotoxique des NCB ont été testées dans le labyrinthe de Barnes 1,5 et 4 mois après l'intervention chirurgicale. La lésion combinée du CE et des NCB induit un déficit mnésique bien plus marqué que chaque lésion séparément, et cela est vrai pour les deux génotypes. De façon générale, les souris tg2576 présentent une plus grande sensibilité que les souris wt aux effets des trois types de lésions sur les performances de mémoire à long terme (72 h). De plus, leur sensibilité aux effets de la lésion cholinergique est exacerbée, notamment en ce qui concerne les performances d'apprentissage de la tâche au délai de 4 mois. Au niveau histopathologique, les lésions du CE et des NCB ont provoqué une diminution de la charge amyloïde respectivement dans l'hippocampe et dans les structures montrant une déafférentation cholinergique (hippocampe et cortex rétrosplénial). L'ensemble de ces résultats suggère que les dépôts amyloïdes ne sont pas impliqués dans l'aggravation des déficits mnésiques consécutifs aux lésions et montre une sensibilité exacerbée des souris tg2576 à la lésion cholinergique. Cette constatation est cohérente avec un rôle critique de l'A β soluble dans la dégénérescence cholinergique dans la MA.

Summary

Alzheimer disease (AD) is characterized by the presence of neurofibrillary tangles, but also cerebral amyloid plaques (consisting of A β peptide), as well as an early atrophy of the entorhinal cortex (EC) and progressive neuronal loss in basal forebrain cholinergic nuclei (BFCN). Our hypothesis is that the joint degeneration of these two structures plays a key role in the evolution of cognitive deficits characterizing AD, especially regarding spatial memory. In the present work, each or both lesions were induced in a transgenic mouse model of AD (tg2576) showing amyloid deposits from the age of 8 months onwards, and moderate spatial memory deficits later in life, but no neuronal loss in the EC or the BFN. Our aim was to study the interactions between these lesions typical of AD, alone or combined, and the amyloid pathology of tg2576 mice, as well as their impact on spatial memory performances. An excitotoxic lesion of the EC and/or an immunotoxic lesion of the BFCN were/was performed in 8-month old tg2576 mice and their wt littermates. The mice were tested in a Barnes maze task 1.5 or 4 months after surgery. The combined lesion induced a greater deficit than each lesion alone for both genotypes. In general, tg2576 mice showed a higher sensitivity to the effects of the three lesions on long-term memory (72 h). In addition, their sensitivity to the effects of the cholinergic lesion was exacerbated, especially on Barnes-maze acquisition performances at the 4-month delay. At the histopathological level, the lesion of the EC and the BFCN reduced the amyloid load in the hippocampus and in structures being innervated by cholinergic terminals originating in the BFCN (hippocampus and retrosplenial cortex). Taken together, our results suggest that amyloid deposits are not involved in the aggravation of memory deficits consecutive to the lesions. They also demonstrate an increased sensitivity of tg2576 mice to the cholinergic lesion, which is coherent with a critical role of the soluble forms of A β in the cholinergic degeneration in AD.