

N° d'ordre : 2522

THÈSE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I

ÉCOLE DOCTORALE : SCIENCES DU VIVANT, GEOSCIENCES, SCIENCES DE
L'ENVIRONNEMENT

par *Nicole ETCHAMENDY*

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : SCIENCES DES ALIMENTS

IMPLICATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION DES RETINOÏDES DANS LA MEMOIRE RELATIONNELLE ET SES DYSFONCTIONNEMENTS

Soutenu le : 24 JUIN 2002

Après avis de :

MM. Serge MICHEL (DR. Galderma CIRD, Sophia Antipolis).....Rapporteurs
Bruno POU CET (DR. CNRS Marseille)

Devant la commission d'examen formée de :

MM. Paul HIGUERET (PR. Université de Bordeaux I).....Président
Robert JAFFARD (PR. Université de Bordeaux I).....Directeur de thèse
Luc LETENNEUR (CR. INSERM Université de Bordeaux II).....Examineurs
Serge MICHEL (DR. Galderma CIRD, Sophia Antipolis)
Bruno POU CET (DR. CNRS Marseille)

AVANT-PROPOS

Le travail résumé dans ce mémoire a été réalisé dans le cadre d'une collaboration entre les laboratoires de Neurosciences Cognitives et de Nutrition et Signaux Cellulaires de l'Université de Bordeaux I.

Monsieur le Professeur Robert Jaffard m'a accueilli dans son laboratoire et est l'un des piliers de cette collaboration scientifique. C'est en suivant ses enseignements universitaires que sont nés mes premiers intérêts pour les Neurosciences Cognitives. Mon insertion au laboratoire m'a ensuite permis d'apprécier ses qualités scientifiques et pédagogiques, il a su très naturellement me communiquer son enthousiasme pour la recherche. La confiance qu'il m'a témoignée a très sûrement fortement motivé la réalisation de cette thèse. Pour tout cela, je tiens à lui témoigner ici toute la reconnaissance et l'admiration que j'ai pour ce qu'il fait.

Je tiens à remercier vivement le Professeur Paul Higeret, instigateur de cette collaboration, qui a su convaincre les neurobiologistes que nous sommes, pour nous faire plonger dans l'univers de la Nutrition. Il a cru très fermement et dès le début en cette collaboration, comme il croit à une nécessaire transdisciplinarité dans la Science. Je le remercie tout d'abord pour son acharnement et sa diplomatie, qualités sans lesquelles je n'aurais sûrement pas pu bénéficier de cette problématique scientifique passionnante qui fonde mon travail de thèse. Je le remercie enfin pour m'avoir fait confiance et pour m'avoir divulguer de façon très didactique le secret des rétinoïdes.

Monsieur le Dr. Bruno Poucet et le Dr. Serge Michel, respectivement spécialiste de la neurobiologie de la mémoire et des rétinoïdes, ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse en sachant dépasser la difficulté de l'interdisciplinarité que je leur proposais. Je leur en suis très reconnaissante. Les remarques qu'ils m'ont formulées témoignent de l'attention qu'ils ont accordé à ce manuscrit et m'encouragent dans mes activités futures.

Je tiens à remercier le Dr. Luc Letenneur pour avoir examiné ce travail et pour avoir su élargir le débat lors de la soutenance.

Il m'est difficile à présent d'exprimer en quelques lignes et surtout par écrit la reconnaissance que j'ai pour Aline Marighetto. Elle a été un des personnages centraux de ce travail et a entièrement pris en charge ma formation au laboratoire. J'ai pu bénéficier de toutes ses connaissances théoriques et pratiques qu'elle m'offrait sans retenue. J'ai appris avec elle et auprès d'elle à tout simplement réfléchir. Son sens aigu de l'observation, sa vivacité, son intelligence, sa rigueur me surprennent chaque jour. Les hypothèses, les procédures expérimentales et les interprétations proposées dans ce manuscrit tiennent pour beaucoup à ses qualités scientifiques. L'enthousiasme qu'elle exprime pour la recherche et qu'elle a su me faire partager ne peut être dissocié de ses qualités humaines. Elle est un personnage entier, sensible et juste. Elle a su et a bien voulu m'écouter, elle a su provoquer les échanges dans mes moments difficiles. Pour tous ces moments de Science et d'Humanité partagés, je la remercie.

Je remercie le Dr. Véronique Pallet qui a co-dirigé ces recherches dans le laboratoire dirigé par le Professeur Higeret. Pour les quelques échanges scientifiques précieux qu'elle m'a fait partager, je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance.

J'exprime toute ma reconnaissance au Dr. Valérie Enderlin qui s'est également beaucoup investie dans ce projet en prenant en charge la partie expérimentale biochimique de ces recherches.

Je remercie très chaleureusement tout le personnel technique du laboratoire de Neurosciences Cognitives pour leur sympathie et leur soutien technique.

Merci à tous mes camarades étudiant du laboratoire de Neurosciences Cognitives. J'ai une pensée pour Aurélie Célérier, ma voisine de bureau, qui rédigeait sa thèse en même temps que moi. Je me remémore nos fous rires et nos déprimés.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Ludovic Calandreau et Stéphane Valério qui m'ont soutenu dans l'élaboration de ce manuscrit. Ils n'ont jamais refusé de lire et même de relire sans cesse les écrits que je leur soumettais. Leurs remarques m'ont été très précieuses..., et leur humour aussi. Merci et bonne route...

J'ai aussi une pensée émue pour Aline Desmedt, « ma copine du labo » exilée en Israël. Nous avons vécu ensemble des moments inoubliables et son soutien. Nous t'attendons...

Je tiens enfin à exprimer toute ma reconnaissance à l'ensemble de ma famille qui a cru en moi et qui m'a laissé librement me réaliser. Je pense à mon père avec qui j'ai partagé des moments difficiles mais si enrichissants. Je salue son courage et sa foi en la Vie qui m'ont accompagné tout le long de ce travail.

Un petit clin d'œil complice à Marie Parrot, mon amie et co-locatrice. Je te remercie pour tout le soutien que tu m'as apportée jour après jour et pour avoir pris en charge, sans mot dire, toute la logistique de notre petite maison en ces périodes de rédaction.

J'ai une pensée pour Maialen Camblong, « mon oreille attentive », fidèle amie depuis des années. Tes paroles m'ont été et me sont essentielles. Milesker !!

Je remercie enfin la troupe Hiru Puntu et plus particulièrement Antton Luku, écrivain, auteur de théâtre qui a un jour un peu plus piqué mon esprit. Merci pour m'avoir laissé jouer tes textes, Antton, pour ta confiance, pour nos discussions qui m'ont faite plus mature (et surtout plus punk), pour ton intelligence et ta sensibilité.

A Txomin qui aujourd'hui me fait rire et m'emmène ailleurs...

SOMMAIRE

CHAPITRE I : INTRODUCTION ET POSITIONS THEORIQUES

PREMIERE PARTIE : LES SYSTEMES DE MEMOIRE

I_ L'EMERGENCE DE LA NOTION DE POLYMORPHISME DE LA MEMOIRE : DE L'INTUITION AUX DONNEES EMPIRIQUES	p. 15
II_ LES CONCEPTIONS MODERNES DU POLYMORPHISME DE LA MEMOIRE : LES SYSTEMES MULTIPLES DE LA MEMOIRE	
A_ L'apport de la psychologie cognitive	p. 18
B_ Le cas H.M.	p. 20
C_ Les classifications actuelles de la mémoire à long-terme	p. 21
III_ HISTORIQUE DES ETUDES SUR LA COGNITION ANIMALE	
A_ Le modèle behavioriste	p. 26
B_ L'abandon du Behaviorisme	p. 27
C_ Les travaux de Tolman : la redécouverte et la réhabilitation des représentations mentales	p. 28
D_ A la question d'une conscience animale se substitue celle des représentations mentales	p. 29
V_ LES SYSTEMES DE MEMOIRE CHEZ L'ANIMAL	
A_ Fonction de l'hippocampe : dépendance au contenu informationnel	p. 31
B_ Fonction de l'hippocampe : organisation des informations	p. 33
V_ LA NOTION DE SYSTEME DE MEMOIRE ET SES LIMITES	p. 35
VI_ HIPPOCAMPE ET REPRESENTATIONS RELATIONNELLES	
A_ Démarche scientifique	p. 39
B_ Un modèle animal pour l'étude de la mémoire déclarative et du système hippocampique : quelques précisions	p. 40
C_ Approche comportementale : une mise à l'épreuve des hypothèses	p. 41
D_ Données neurophysiologiques : les soubassements neurobiologiques	p. 43

VII_ LES MECANISMES CELLULAIRES DES PROCESSUS MNESIQUES : PROCESSUS DE PLASTICITE SYNAPTIQUE

- A_ Les postulats de base et les principes de Hebb p. 45
- B_ Le modèle de PLT p. 47
- C_ Quelles sont les propriétés de la PLT NMDA-dépendante qui en font un modèle d'étude des phénomènes de plasticité potentiellement requis dans l'apprentissage ? p. 48
- D_ Examen de l'hypothèse PLT-Mémoire p. 49

DEUXIEME PARTIE : LE CERVEAU ET LES RETINOÏDES

I_ LA VITAMINE A : QUELQUES GENERALITES

- A_ Propriétés physico-chimiques de la vitamine A et des rétinoïdes p. 57
- B_ Les protéines vectrices de la vitamine A et des rétinoïdes p. 59
- C_ Métabolisme et stockage de la vitamine A p. 60

II_ LES RETINOÏDES ET LEUR ACTION NUCLEAIRE

- A_ Le modèle hormonal p. 62
- B_ Les récepteurs nucléaires p. 62
- C_ Modèle général de fonctionnement de la voie de signalisation des rétinoïdes p. 65
- D_ Autorégulation de la voie de signalisation des rétinoïdes p. 67
- E_ Conclusion p. 68

III_ LE CERVEAU ET LES RETINOÏDES

- A_ Le cerveau adulte possède l'ensemble du dispositif biologique nécessaire au métabolisme de l'AR, à son transport et à son action nucléaire. p. 69
- B_ Les rétinoïdes agissent en interaction avec des voies hormonales impliquées dans de nombreuses fonctions supérieures du SNC. p. 72
- C_ Premières études suggérant un rôle des rétinoïdes dans des fonctions du SNC adulte. p. 72
- D_ Certains gènes, dont l'expression est contrôlée par les Rétinoïdes codent pour des protéines impliquées dans des systèmes de neurotransmission et dans la plasticité synaptique. p. 73
- E_ Conclusion p. 74

IV_ POURQUOI LE VIEILLISSEMENT EST-IL UN BON MODELE D'ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LES RETINOÏDES ET LES PROCESSUS MNESIQUES ?

- A_ Le vieillissement hormonal p. 76
- B_ Les hypothèses nutritionnelles du vieillissement p. 78
- C_ La vitamine A et le vieillissement p. 80

TROISIEME PARTIE : OBJECTIF DE NOTRE TRAVAIL

p. 83

CHAPITRE II : MODELE DE DEFICIT MNESIQUE LIE AU VIEILLISSEMENT

Résumé des travaux

p. 87

PUBLICATION 1 : "Knowing which and knowing what: a potential mouse model for age-related human declarative memory decline." publiée dans *EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE*

p. 93

CHAPITRE III : EFFETS CONTRASTES D'UNE LESION DE L'HIPPOCAMPE DANS UNE EPREUVE DE DISCRIMINATIONS D'EMPLACEMENTS

Résumé des travaux

p. 107

PUBLICATION 2 : "Hippocampal lesions and discrimination performance of mice in the radial maze: sparing or impairment depending on the representational demands of the task" publiée dans *HIPPOCAMPUS*

p. 113

CHAPITRE IV : ETUDE DES EFFETS DE L'ADMINISTRATION D'ACIDE RETINOÏQUE SUR UN MODELE DE DEFICIT MNESIQUE LIE A L'AGE

Résumé des travaux

p. 131

PUBLICATION 3 : "Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling." publiée dans *JOURNAL OF NEUROSCIENCE*

p. 135

CHAPITRE V : ETUDE DES EFFETS D'UNE PRIVATION DE VITAMINE A SUR LES FONCTIONS MNESIQUES DE L'ANIMAL ADULTE

Résumé des travaux

p. 145

PUBLICATION 4 : "Vitamin A deficiency and relational memory deficit in adult mice : relationships with changes in brain retinoid signalling." soumise à *EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE* p. 149

CHAPITRE VI : DISCUSSION GENERALE

I_ RESUME ET DISCUSSION DES RESULTATS ISSUS DE NOS EXPERIENCES

- A_ Résumé de nos principaux résultats p. 177
- B_ Un niveau optimal d'expression des récepteurs de l'AR semble être nécessaire pour un fonctionnement normal de cette voie de signalisation nucléaire et pour l'expression d'une forme de mémoire relationnelle. p. 180
- C_ Pourquoi l'hyposignalisation de la voie des rétinoïdes induite chez le jeune adulte et le déficit mnésique associé ne sont pas réversibles par l'administration d'AR ? p. 181
- D_ Réseaux de signalisation nucléaire multiples :
les rétinoïdes et les hormones thyroïdiennes p. 183
- E_ Conclusion partielle p. 185

II_ LES HYPOTHESES RELATIVES AUX RELATIONS FONCTIONNELLES ENTRE LA VOIE DE SIGNALISATION DES RETINOÏDES ET LA FONCTION MNESIQUE.

- A_ De la nature du déficit mnésique aux mécanismes cellulaires sous-jacents. p. 186
- B_ L'homéostasie calcique dans le cerveau Agé p. 188

III_ LE VIEILLISSEMENT : ORIGINE DU DEFICIT p. 195

GLOSSAIRE p. 201

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES p. 205

ANNEXE : "Further evidence for a dissociation between different forms of mnemonic expressions in a mouse model of age-related cognitive decline: effects of tacrine and S 17092, a novel prolyl endopeptidase inhibitor."

publiée dans *LEARNING AND MEMORY*. p. 225

CHAPITRE I

INTRODUCTION ET POSITIONS THEORIQUES

CHAPITRE I

INTRODUCTION ET POSITIONS THEORIQUES

*Qui reconnaît son ignorance
N'est pas un grand ignorant
Qui reconnaît son égarement
N'est pas un grand égaré !*

TCHOUNG-TSE (IV^{ème} s. av. J.-C.)

Qu'est ce que la mémoire ? Dans une revue de question intitulée "The evolution of Multiple Memory Systems" (1987), Sherry et Schacter proposent la définition suivante: "*Memory is a function that permits animals and people to acquire, retain, and retrieve many different kinds of information. It allows them to take advantage of previous experience to help solve the multitude of problems with which their environment confronts them, such as how to recognize the familiar, predict events, return to particular places, and assess the consequences of behavior.*" Cette définition de la mémoire est fonctionnelle. Elle répond à la question : A quoi sert la mémoire ? Comment s'exprime t-elle au travers de nos comportements ? Elle ne rend pas compte de ce qu'est la mémoire et finalement a peu d'utilité pour qui veut étudier la mémoire. Tenter de donner une définition de ce qu'est la mémoire revient à décrire cet objet, son fonctionnement. Une définition descriptive et complète de ce genre est très difficile et n'existe pas à ce jour. La mémoire est un objet à multiples facettes très difficilement saisissables. Tout d'abord, la mémoire est complexe car elle revêt des caractéristiques à la fois psychologiques et neurobiologiques, et la définition qu'on en donne dépend du niveau d'analyse auquel on se

place. La mémoire enfin est polymorphe car elle peut s'exprimer sous différentes formes sollicitant des systèmes neurobiologiques distincts. Sherry et Schacter eux-mêmes en 1987 complètent leur définition en mentionnant l'existence de structures neuro-cognitives dont l'activité physiologique sous-tend l'apprentissage et la mémoire. Nous ajouterons à cette première définition les exigences expérimentales et théoriques formulées par Eichenbaum (1994) : « ... la compréhension complète des systèmes multiples de mémoire exige, non seulement la confirmation de l'existence de plus d'un système, mais aussi la définition des processus psychologiques et des circuits fonctionnels qui sous-tendent chaque système identifié. En d'autres termes, le but ultime d'une approche cognitive et neuroscientifique est (...) de rendre compte des processus cognitifs qui rendent compte de chaque système en termes de voies nerveuses sous-jacentes, de schéma de codage et d'opérations de calcul. » Cette définition rend davantage compte de la complexité de notre objet d'étude qu'est la mémoire, de ses rapports avec le cerveau où elle prend naissance. Adopter une telle définition suppose tout d'abord un a priori théorique ou plutôt philosophique consistant à rejeter les positions dualistes et spiritualistes strictes encore présentes au cours du XIX^{ème} siècle. Nous nous inscrivons donc en dehors de ces postulats théoriques remettant en cause l'existence d'une quelconque incarnation de l'esprit dans notre cerveau, d'un hypothétique lien de causalité entre les productions intellectuelles et le fonctionnement du système nerveux central. L'ensemble de la communauté scientifique s'accorde d'ailleurs aujourd'hui pour reconnaître que les facultés mentales dans leur ensemble et le cerveau sont deux entités intrinsèquement liées ou plutôt constituent un tout indivisible. Cette définition de la mémoire résume les principaux objectifs des Neurosciences Cognitives : procéder à une analyse intégrée des phénomènes de la cognition. Une compréhension complète de la mémoire requiert donc plusieurs niveaux coordonnés d'analyse dont l'identification et la distinction des composantes psychologiques, la description du fonctionnement des circuits (structures et voies nerveuses) sous-jacents ou encore l'analyse des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans ces opérations. L'objectif des neurosciences cognitives ainsi résumé fait apparaître la tâche aisée, elle le serait si d'une part à chaque niveau d'organisation cérébrale, les systèmes étaient « démontables » tels des pendules d'horloger et d'autre part si les liens de causalité entre ces différents niveaux d'organisation biologique étaient univoques. En d'autres termes, il serait illusoire de penser qu'un niveau d'organisation biologique détermine celui de niveau supérieur de façon unidirectionnelle : les voies de régulation d'expression de gènes détermineraient ainsi l'organisation des signaux intracellulaires qui à leur tour définiraient le câblage et la formation d'un réseau de neurones et de structures cérébrales particulier sous-tendant ou spécifiant l'expression d'une certaine forme de mémoire. Cette forme d'organisation cérébrale est linéaire et sérielle. Nous verrons que la réalité biologique, celle de notre organisme et encore plus celle de notre cerveau est bien plus complexe. La tâche la plus ardue en Neurosciences Cognitives est donc celle, tout d'abord de décrire les systèmes mnésiques à partir des contributions des

approches psychologiques et neurobiologiques à différents niveaux d'analyse, mais surtout de montrer comment ces différents niveaux d'organisation neurobiologiques et psychologiques s'organisent (on pourrait parler de déterminisme horizontal) et se déterminent mutuellement (parlons de déterminisme vertical). Les Neurosciences Cognitives se retrouvent donc au confluent de plusieurs disciplines (psychologie cognitive, neuropsychologie, neurobiologie cellulaire et moléculaire etc..) tentant chacune à leur niveau d'étudier un niveau d'organisation cérébrale particulier. L'enjeu, nous l'avons compris, est de synthétiser l'ensemble de ces données pour reconstruire une analyse complète et intégrée des processus cognitifs. La psychologie cognitive a contribué à la caractérisation des composantes psychologiques de la mémoire et révélera l'aspect polymorphe de la mémoire. La Neuropsychologie cognitive s'inspire fortement des données de la psychologie et tâche d'établir une analyse macrostructurale des différentes formes de mémoire en tentant d'identifier les circuits cérébraux impliqués dans ces opérations. Par l'examen de patients cérébro-lésés, les neuropsychologues sont les premiers à établir des dissociations fonctionnelles et à confirmer et même à préciser les multiples facettes de la mémoire. La mémoire n'est donc pas une fonction unitaire, monolithique. De même, grâce à l'essor de la biologie moléculaire et surtout des outils technologiques, les biologistes dissèquent les événements moléculaires et identifient les propriétés fonctionnelles des neurones. Les Neurosciences Cognitives consolident les idées de la neuropsychologie et développent des méthodes expérimentales pour la démontrer. Par l'élaboration de modèles animaux, ils précisent ces dissociations et surtout leurs soubassements neurobiologiques en utilisant les outils et les connaissances de la biologie cellulaire et moléculaire.

Notre travail s'inscrit dans le cadre général des Neurosciences Cognitives. Plus précisément il aura pour but de montrer des liens fonctionnels entre la voie nucléaire de modulation génique contrôlée par les rétinoïdes et les fonctions mnésiques. L'objectif est d'examiner dans quelle mesure chez l'animal, des événements nucléaires liés aux rétinoïdes sont impliqués dans certains processus mnésiques. Il s'agit de mettre en correspondance deux niveaux d'organisation très éloignés structurellement et a priori fonctionnellement : un niveau moléculaire et un niveau psychologique. Les arguments théoriques évoqués ayant conduit à la formulation de nos hypothèses de travail s'articulent autour de deux grandes propositions :

- d'une part l'idée que cette voie de signalisation des rétinoïdes régule l'expression de gènes codant pour des protéines neuronales impliquées dans les processus de plasticité synaptique tel que le phénomène de potentialisation à long terme (PLT).

- d'autre part que ces processus de plasticité synaptique constituent les bases cellulaires de l'apprentissage et de la mémoire et peuvent être étudiés au travers du phénomène de PLT.

Formuler ces propositions suppose d'examiner puis d'accepter de nombreux postulats de base régissant aujourd'hui l'ensemble des recherches en Neurosciences Cognitives. La première

partie de notre travail examinera ces modèles théoriques et ces postulats qu'il nous semble aujourd'hui nécessaire de préciser pour adopter les précautions méthodologiques et théoriques adéquates et éviter les interprétations par la suite trop hâtives. Nous aborderons :

- **Les systèmes de mémoire chez l'homme.** Les conceptions théoriques dominantes aujourd'hui, et portant sur les composantes psychologiques et cérébrales de la mémoire humaine sont à prendre en compte pour quiconque tente d'élaborer des modèles animaux de ces fonctions mnésiques.
- Cet aperçu sur la mémoire humaine nous amènera logiquement aux tentatives de **modélisation de ces composantes psychologiques chez l'animal.** Ce paragraphe exposera les difficultés méthodologiques et les précautions théoriques que ce travail impose.
- Un troisième point permettra de faire un bilan de ces différentes classifications des systèmes de mémoire chez l'homme et chez l'animal pour en révéler les apports mais aussi les lacunes.
- Un quatrième paragraphe sera dévolu à l'exposé du modèle théorique d'Eichenbaum et nous tenterons de montrer en quoi cet auteur profite des réflexions précédentes pour proposer une théorie plus complète.
- Le troisième grand paragraphe sera utile pour présenter le modèle théorique actuel pour rendre compte des processus neuronaux et des mécanismes moléculaires associés, sous-tendant la fonction mnésique. Ce modèle cible **les phénomènes de plasticité synaptique et de PLT.** Ces postulats nous amèneront à préciser nos hypothèses de travail.

Ces paragraphes seront l'occasion de montrer en quoi et comment les différentes disciplines chacune à leur niveau identifient des propriétés constitutives de la mémoire, comment ces disciplines s'enrichissent mutuellement des concepts qu'elles véhiculent et finalement parviennent au fil des années à mieux préciser le caractère multidimensionnel de la fonction mnésique.

A la suite de ces considérations théoriques, la seconde partie de cette introduction consistera à présenter les arguments bibliographiques légitimant notre travail expérimental qui concerne l'implication potentielle de la voie de signalisation nucléaire des rétinoïdes dans les fonctions mnésiques. En résumé, l'hypothèse majeure fondant ce travail postule que les rétinoïdes (métabolite de la vitamine A) en régulant l'expression de nombreux gènes codant pour des protéines neuronales spécifiques interviendraient dans les processus neuronaux (et plus particulièrement les processus de plasticité synaptique) supposés sous-tendre l'élaboration et la conservation de représentations cérébrales mnésiques.

PREMIERE PARTIE

LES SYSTEMES DE MEMOIRE

I_ L'EMERGENCE DE LA NOTION DE POLYMORPHISME DE LA MEMOIRE : DE L'INTUITION AUX DONNEES EMPIRIQUES.

Si l'idée que la mémoire est une fonction polymorphe, est aujourd'hui étayée par de nombreuses données neurobiologiques, elle apparaît dans les réflexions philosophiques bien antérieures au développement des Neurosciences. Dans les premières théories relatives à la mémoire, aucune référence n'est faite aux mécanismes cérébraux d'une part parce qu'on ne connaissait rien du cerveau et de son fonctionnement et d'autre part parce que régnaient les doctrines spiritualistes dissociant le phénomène mental du phénomène biologique.

L'un des tous premiers penseurs ayant avancé l'idée selon laquelle l'acquisition et la récupération de différents types d'information peuvent s'établir et s'exprimer selon des règles opératoires et des mécanismes distincts est Maine de Biran en 1804 (in Schacter et Tulving, 1994). Dans son précis « De l'influence des habitudes sur la faculté de penser », il développe intuitivement l'idée selon laquelle l'apparition des habitudes par répétition s'accompagne d'une automatisation croissante de leur exécution et parallèlement d'une diminution progressive du degré de conscience de cette exécution. Ces propositions sont avant-gardistes et se retrouvent dans les conceptions actuelles sur les aspects dynamiques de la mémoire. Il définit ainsi trois types de mémoire : la mémoire mécanique, la mémoire sensitive et la mémoire représentative. La mémoire mécanique est impliquée dans l'acquisition des habitudes motrices et verbales et opère à un niveau inconscient. La mémoire sensitive s'exprimant souvent de façon inconsciente serait quant à elle dévolue à l'acquisition des sentiments, de l'affect et des images fugaces. Enfin, la mémoire représentative permet la récupération consciente d'idées et d'événements. Maine de Biran opère de façon intuitive une distinction radicale, largement encore partagée par certains de nos contemporains, entre la cognition, l'émotion et les automatismes moteurs. Les expressions comportementales relatives à ces trois registres de mémoire sont très différentes les unes des

autres. Ainsi, Maine de Biran affirme très explicitement que « la mémoire mécanique et la mémoire représentative remplissent deux fonctions essentielles mais très distinctes...et l'une de ces fonctions peut parfaitement s'exercer sans l'autre » (in Schacter et Tulving, 1994, p.18). L'idée de l'existence de plusieurs mémoires est clairement annoncée dans les écrits de Maine de Biran. Comme dans les théories les plus récentes que nous évoquerons ultérieurement, il tente une définition de ces différentes formes de mémoire avec pour critère la nature de l'information mémorisée et le degré de conscience avec lequel cet acte de mémoire s'établit et s'exprime. Finalement, sa conception se caractérise par une idée très forte selon laquelle ces différentes formes sont totalement indépendantes les unes des autres: ainsi un souvenir de la vie peut consciemment être réactivé sans aucune coloration affective, complètement dénué d'émotion. Même si certains aspects de cette conception sont aujourd'hui critiquables comme celle de l'indépendance des différentes formes de mémoire, cette position est avant-gardiste compte tenu des idées dualistes dominantes de l'époque.

Franz Joseph Gall (1835) fut le second des auteurs précurseurs des conceptions actuelles de la mémoire. Père de la phrénologie, il inspirera les théories modulaires de Fodor. Gall divisait le système mental en différents modules (in Rosenfield, 1994 ; Schacter et Tulving, 1994), ce que Fodor appellera plus tard les facultés verticales qui sont spécifiques d'un contenu ou d'un domaine et opérant donc sur un type particulier d'informations. La mémoire ne serait pas une fonction unitaire mais plutôt divisée en plusieurs composantes opérant chacune de façon indépendante sur un contenu informationnel particulier. A l'appui de cette théorie, Gall remarquera que les différences inter et intra-individuelles existant entre les différentes formes de mémoire (un individu peut avoir une très bonne mémoire des mathématiques alors que sa mémoire musicale peut être inexistante ou tout du moins appauvrie) ne peuvent s'expliquer si l'on conçoit la mémoire comme une fonction monolithique. L'idée de Gall des systèmes multiples d'aptitudes était liée à l'étude des reliefs crâniens, plus précisément les aptitudes, les caractéristiques psychologiques et les traits de caractère d'un individu étaient sous la dépendance de régions cérébrales spécialisées. Par ailleurs, le localisationisme de Gall sous-tendait bien évidemment l'idée de facultés psychologiques modulaires et indépendantes les unes des autres mais également l'idée des phénomènes de mémoire comme des processus « photocopieurs » : mémoriser signifierait établir une copie conforme de la réalité. Cette idée rejoint les conceptions actuelles de la mémoire dans l'idée que les traces mnésiques sont conservées dans des territoires spécialisés qui ont participé à l'enregistrement des différents aspects d'une expérience vécue. Les conceptions de Gall fondent les présupposés localisationnistes plus ou moins sous-jacents aux études neurobiologiques contemporaines sur la mémoire. Elles peuvent se résumer en deux points : (i) la mémoire et la faculté de reconnaître sont des fonctions localisées ayant recours à des mots, des images et des nombres stockés dans des aires cérébrales anatomiquement

délimitées (ii) la mémoire est découpée en unités anatomiques distinctes dont la spécialisation correspond à la fonction de l'aire cérébrale considérée. Cette théorie fondera les premières bases de la phrénologie, même si Gall fut remis en cause par un de ses contemporains, le célèbre Flourens, en 1840 (in Rosenfield, 1994) qui sur la base de résultats expérimentaux portant sur les cerveaux d'oiseaux pensait avoir définitivement prouvé que la mémoire comme toute autre activité ne pouvait dépendre d'aucune région cérébrale précise. Mais les écrits de Flourens trouvèrent peu d'écho dans la communauté scientifique de l'époque.

Au début du 20^{ème} siècle, on trouvera des disciples de Maine de Biran et de Gall respectivement en la personne de Henri Bergson (dans son célèbre ouvrage « Matière et mémoire » en 1911, il écrivait que « Le passé survit sous deux formes distinctes : sous la forme de mécanismes moteurs ; ensuite sous la forme de récupérations conscientes indépendantes. ») et de Spurzheim en 1834 et Ladd en 1909 (in Rosenfield, 1994).

Finalement, ces différentes conceptions d'une mémoire multiple ou polymorphe vont être confortées par des données neuropsychologiques. Le premier chercheur à avancer cette idée sur la base de données neuropsychologiques fut le médecin Paul Broca. Après l'examen du jeune patient Tan ayant perdu l'usage de la parole, il dissocia la mémoire des mots de la mémoire des procédures nécessaires pour les articuler. Il découvrit le centre anatomique spécialisé dans les procédures d'articulation des mots. Il approfondit cette idée dans le cadre du développement du langage et écrivit : « Ce perfectionnement graduel du langage articulé chez l'enfant est dû au développement d'un type de mémoire particulier, qui n'est pas une mémoire des mots mais une mémoire des mouvements nécessaires pour articuler les mots. Et cette mémoire n'est en aucun cas reliée à d'autres mémoires, ni à l'intelligence. » (in Rosenfield, 1994, p. 37). Dix ans plus tard, un allemand Wernicke décrit chez un patient aphasique, une atteinte de ce qu'il appelle le centre particulier de mémoire pour la représentation auditive des mots, centre distinct de celui décrit par Broca chez son patient Tan. Ce centre permettait le stockage des mots enregistrés. L'observation majeure est que chez un patient cérébro-lésé, une aptitude peut être atteinte alors qu'une autre est totalement préservée. Ces données furent les premières observations cliniques soutenant l'idée de systèmes de mémoire multiples et indépendants sur la base d'une localisation précise et immuable de ces différentes fonctions. Sur la base des observations cliniques de Broca et de Wernicke, Lichteim élaborait un modèle modulaire de la fonction du langage, dans lequel les différents aspects de la mémoire verbale sont traités et conservés dans différents modules cérébraux indépendants. Ce modèle est encore d'actualité dans les enseignements universitaires de Neuropsychologie Cognitive.

A la même époque, le père de la psychanalyse, Sigmund Freud avança la notion de mémoire fragmentaire et reconstruite où les souvenirs ne sont en fait que des fragments et la reconnaissance ou le rappel suppose une reconstruction de l'expérience vécue à partir de ces

fragments, modulée par les états émotionnels et affectifs. En ce sens, cette proposition théorique s'oppose aux notions précédemment mentionnées d'une mémoire « photocopieuse » et introduit l'idée fondamentale des liens émotion/cognition qui précédera de quelques décennies les découvertes des années trente sur le système limbique.

Bien que non exhaustif, cet aperçu historique permet de rendre compte des conceptions essentielles qui sont aujourd'hui à la base aujourd'hui des recherches neurobiologiques et psychologiques de la mémoire ; il souligne également la prédominance des théories localisationnistes. En ce sens, il permet d'entrevoir les limites théoriques du développement ultérieur des neurosciences cognitives.

II_ LES CONCEPTIONS MODERNES DU POLYMORPHISME DE LA MEMOIRE : LES SYSTEMES MULTIPLES DE LA MEMOIRE

La seconde moitié du XX^{ème} siècle se caractérisera par un foisonnement d'études en Neurosciences Cognitives tentant une classification des systèmes de mémoire. Ces études useront de critères de classifications distincts mais néanmoins tout aussi pertinents les uns que les autres. Avant de tenter de comprendre comment la notion de systèmes multiples est apparue et quelles sont les théories actuelles disponibles pour l'étude de la mémoire, il nous est apparu important de nous attarder en quelques lignes sur les apports d'une discipline voisine des Neurosciences, la psychologie cognitive dont les travaux sur la mémoire ont permis la naissance de concepts et de termes repris et ré-élaborés dans les conceptions théoriques propres aux Neurosciences Cognitives.

A_ L'apport de la psychologie cognitive

La plupart des modèles portant sur les fonctions mnésiques et issus de la psychologie cognitive mettent en jeu trois processus essentiels : l'encodage de l'information, sa conservation et sa récupération. Ce schéma est à la base de l'un des tout premiers modèles élaborés sur la base d'études expérimentales appropriées : le célèbre modèle d'Atkinson et Shiffrin de 1968. Ce modèle présente la mémoire subdivisée en deux sous unités caractérisées par leur capacité temporelle de stockage de l'information. Cette première dichotomie distinguait la mémoire primaire ou mémoire à court-terme et la mémoire secondaire ou mémoire à long-terme. Cette classification s'est faite sur la base, moins de la nature des informations traitées ou la nature des processus opératoires impliqués que sur la durée de stockage de l'information. Il s'agit d'un

modèle modal à fonctionnement sériel : l'information entrante transite du stock à court-terme au stock à long-terme et la récupération de l'information stockée en mémoire à long-terme suppose obligatoirement son retour vers le stock à court-terme. Ce modèle a été remis en cause par des études en neuropsychologie montrant des patients cérébro-lésés présentant une atteinte sévère de la mémoire à court-terme alors que leur mémoire à long-terme était totalement préservée. Néanmoins, ce modèle a le mérite de la simplicité, il a été à la base de bon nombre d'études expérimentales sur la mémoire humaine et a permis d'introduire les termes de mémoire à court terme et mémoire à long terme aujourd'hui utilisés en Neurosciences Cognitives.

Dans le même sillage théorique et avec une volonté de clarifier les processus opératoires mis en jeu dans la mémoire, Baddeley propose le modèle de mémoire de travail, une conception revisitée et enrichie de la notion de mémoire à court-terme d'Atkinson et Shiffrin. Baddeley (1986) tente de fractionner la mémoire à court-terme en introduisant la notion de manipulation et de traitement des informations. Baddeley définit la mémoire de travail comme le système de maintien temporaire et de manipulation des informations provenant de divers canaux sensoriels. Ce système est nécessaire à la réalisation d'activités cognitives complexes comme la compréhension, le langage ou le raisonnement. Ce modèle possède trois composantes. Celui-ci supposait l'existence d'un contrôle attentionnel, appelé administrateur central, aidé de deux systèmes esclaves actifs, la boucle phonologique ou articulatoire (qui permet le maintien de l'information verbalisable) et le calepin visuospatial (capable d'appréhender et de manipuler l'information visuospatiale). Le concept de mémoire de travail est devenu crucial dans les domaines d'étude de la mémoire humaine. Ce modèle a permis d'introduire l'idée d'un traitement actif des informations. Si Baddeley ne creuse pas directement les hypothèses neurobiologiques de la mémoire humaine (nous retiendrons de lui un illustre psychologue), il a le mérite d'en avoir exploré brillamment les composantes psychologiques. La notion de mémoire de travail va être également reprise par les neurobiologistes.

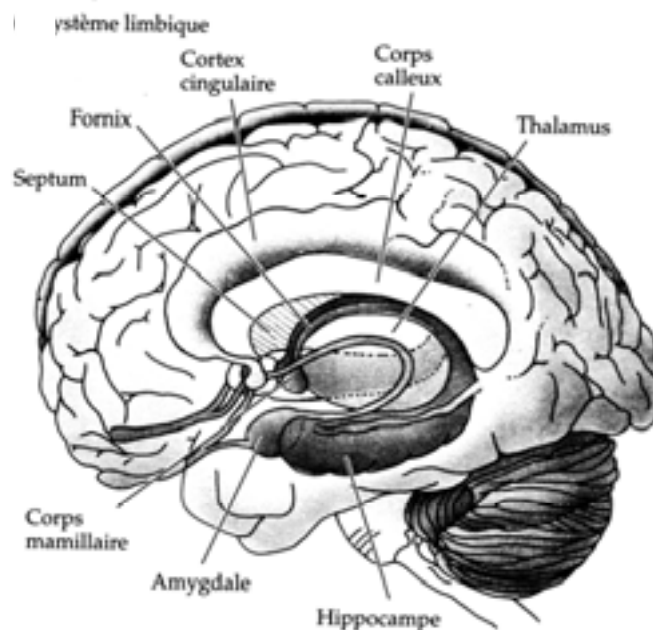
Craik et Lockhart, en 1972, à l'inverse de leurs prédécesseurs, Atkinson et Shiffrin, vont tenter de réintégrer l'activité mnésique dans le fonctionnement général de la cognition pour la faire dépendre de celui-ci. Le traitement de l'information est supposé suivre une série d'étapes depuis l'analyse sensorielle périphérique jusqu'au niveau sémantique le plus élevé. Chaque niveau de traitement laisse une « trace mnésique » dont la durée de vie s'accroît avec la profondeur de ce traitement. Ce qui est déterminant pour la rétention mnésique, c'est la qualité de l'élaboration cognitive, le niveau de traitement de l'information. Ce modèle inspirera les théories actuelles qui différencient les différentes formes de mémoire sur la base du type de traitement et d'activité cognitive qu'elles mettent en jeu.

Les notions développées dans ces modèles issus des études en psychologie cognitive alimenteront les avancées prodigieuses des études en neuropsychologie et neurosciences

cognitives. De ces interactions naissent de nouveaux modèles explicatifs de la mémoire humaine. Néanmoins les découvertes majeures à l'origine de la notion de systèmes multiples de mémoire et des théories contemporaines associées sont les dissociations observées chez des patients amnésiques porteurs de lésion bi-temporale dont le cas H.M. est une parfaite illustration.

B_ Le cas H.M.

Le point de départ de ces études sera la description du célèbre cas H.M. par Scoville et Milner en 1957. Ce patient âgé de 23 ans, d'intelligence normale (QI estimé à 100) a dû subir une ablation totale et bilatérale des parties antérieures des lobes temporaux médians afin de faire disparaître de graves crises d'épilepsie. L'évaluation neuropsychologique de ce patient a fait apparaître l'existence d'importants déficits dans la réalisation de certaines activités cognitives alors que d'autres aspects de ses aptitudes étaient totalement préservés. H.M. présentait une perte massive dans la capacité à former de nouveaux souvenirs (on parle d'amnésie antérograde). L'examen a fait également apparaître une amnésie rétrograde modérée portant sur une fenêtre temporelle de un à quatre ans avant l'opération chirurgicale. Ses capacités sociales et verbales étaient largement préservées et aucune modification de l'état émotionnel n'était notée. Ses capacités perceptives, sa mémoire à court-terme (empan mnésique) et sa mémoire de travail étaient également intactes. H.M. était également capable d'acquérir et de retenir certains types d'informations dans des conditions adaptées de présentation et de récupération et notamment lorsque l'apprentissage est implicite. L'examen radiologique par imagerie à résonance magnétique a permis de délimiter les zones cérébrales supprimées par l'opération chirurgicale : l'amygdale, le cortex entorhinal-parahippocampique et l'hippocampe antérieur. H.M. a été défini comme un patient souffrant d'un syndrome d'amnésie limbique se caractérisant essentiellement par une perte sélective d'un système mnésique permettant un accès conscient, explicite aux souvenirs. La description du cas H.M. a été fondamentale pour comprendre que des lésions du système limbique (cf. schéma, p. 21) pouvait altérer la capacité à former de façon consciente de nouveaux souvenirs alors que d'autres facultés mentales dont les capacités perceptives et certains processus de mémoire implicite étaient totalement épargnées. Ces observations ont mené à l'idée qu'il existe plusieurs formes de mémoire supportées par des systèmes cérébraux différents. Cette idée fonde la notion de systèmes de mémoire multiples telle qu'elle est aujourd'hui envisagée en Neurosciences Cognitives. Cette étude a été le point de départ à de nombreux travaux qui mèneront à des classifications des systèmes de mémoire visant à préciser la nature des opérations psychologiques impliquées et la circuiterie cérébrale sous-jacente.



Légende : Le système limbique est composé de l'hippocampe, du thalamus, du cortex cingulaire, du fornix, du bulbe olfactif, de l'amygdale, et des corps mamillaires.

C_ Les classifications actuelles de la mémoire à long terme

Ainsi, dans les années 80, l'idée de systèmes multiples de mémoire est devenue un véritable objet d'étude. Les recherches en neuropsychologie ont confirmé les interprétations issues des observations cliniques du cas H.M. en montrant de façon surprenante que des patients sévèrement amnésiques conservent des capacités d'apprentissage et de mémorisation intactes. Les expériences de Warrington et Weiskrantz (1968, 1974) ont démontré que des patients amnésiques conservent relativement bien leurs capacités à compléter des fragments de mots (ou d'images) préalablement présentés en entier, bien qu'ils soient quasiment incapables de reconnaître ces mêmes items comme appartenant à leur propre passé. L'idée que différents types de mémoire pouvaient être différentiellement sensibles à une lésion de l'hippocampe était alors admise par l'ensemble de la communauté scientifique. Par ailleurs, la seconde idée sous-jacente concernait les critères de classification des systèmes de mémoire humaine. Il apparaissait clairement que ce qui distinguait les différentes formes de mémoire était le degré de conscience avec lequel ces formes de mémoire s'exprimaient.

Dans cette perspective, Cohen et Squire (1980) opposeront la mémoire **déclarative** et la mémoire **non déclarative**. La mémoire déclarative est accessible à la conscience et on peut « déclarer » (décrire) son contenu, elle sert donc de base à la récupération consciente des faits et des événements. Cette forme de mémoire peut être évaluée dans des tâches de rappel libre (dans

lesquelles on demande explicitement au sujet de rappeler une liste de mots qu'on lui a présentée au préalable) et dans des tâches de reconnaissance. Cette mémoire déclarative ne s'exprime plus chez des patients souffrant d'amnésie bitemporale ; elle requiert donc l'intégrité des structures limbiques. A l'inverse, la mémoire non déclarative sous-tend des informations acquises lors de l'apprentissage d'habiletés (qu'elles soient motrices, perceptives ou cognitives), de la formation des habitudes, des conditionnements classiques simples (y compris certains types d'apprentissage émotionnels), d'amorçage ou de toute autre connaissance qui s'exprime au travers d'une performance plutôt que sous la forme d'une récupération consciente. Ces capacités mnésiques sont toutes intactes chez des patients par ailleurs sévèrement amnésiques. Si la mémoire déclarative renvoie à un système cérébral précis et semble être bien défini, la mémoire non déclarative comprend plusieurs fonctions mnésiques disparates essentiellement reliées entre elles par leur relative « indépendance » vis à vis des structures du lobe temporal médian.

D'autres auteurs proposeront simultanément des dichotomies comparables, Schacter (1987 ; 1992) distinguera la mémoire **explicite** de la mémoire **implicite** que l'on a tendance à assimiler respectivement à la mémoire déclarative et non déclarative. Cette distinction est descriptive et sépare davantage deux moyens d'expression d'une expérience antérieure, elle ne renvoie pas forcément à l'existence de deux systèmes sous-jacents et n'implique pas nécessairement leur existence. La mémoire explicite se réfère à la récupération intentionnelle d'une expérience antérieure en faisant directement référence à cette expérience lors de la situation test. Au contraire, la mémoire implicite ne suppose aucune récupération volontaire de l'expérience passée. Dans les épreuves implicites de mémoire, comme l'identification perceptive de mots présentés brièvement ou le complètement de souche ou de fragments de mots, aucune référence n'est faite à l'épisode précédent d'apprentissage, et les sujets font ce qu'on leur demande du mieux qu'ils peuvent. On infère l'existence d'une mémoire à partir des modifications de performance, généralement appelés effets d'amorçage résultant d'une rencontre antérieure avec l'information traitée. Ces concepts connaîtront un développement important dans les domaines d'investigation sur la mémoire.

Ces classifications des systèmes de mémoire ont été établies sur la base d'exams neuropsychologiques de patients cérébro-lésés et proposent des critères de distinction basés sur la nature des processus opératoires et des circuits cérébraux sous-jacents. Si ces théories ont amorcé un renouveau dans les systèmes de pensée scientifique, les concepts et modèles développés représentent des versions améliorées et formalisées de notions déjà abordées et proposées au début des années 50-70 par Reiff et Scheerer (1959), Schacter (1947), Bruner (1969) ou encore bien plus tôt en 1911 par le philosophe H. Bergson (in Schacter and Tulving, 1994). Ces distinctions mémoire déclarative *vs* mémoire non déclarative ou mémoire explicite *vs* implicite inspireront fortement la construction de théories relatives à la mémoire animale. Malgré

son intérêt, ce modèle reste trop général pour rendre compte de la complexité de la mémoire du passé lointain chez l'homme et de ses perturbations lors de différentes situations pathologiques.

Tulving en 1972, proposera un modèle dissociant au sein de la mémoire à long terme deux systèmes de mémoire sur la base de la nature des informations manipulées et générées. Il différenciera la mémoire sémantique de la mémoire épisodique. La mémoire épisodique concerne les souvenirs autobiographiques, elle nous permet de rappeler explicitement les événements personnels qui caractérisent spécifiquement notre vie. En mémoire épisodique, les informations rappelées sont vécues comme un souvenir, pour cela elles doivent se situer dans un contexte temporel et spatial particulier avec une référence personnelle au sujet participant à l'épisode. En d'autres termes, une particularité fondamentale de ce type d'information est sa forte indexation spatiale, temporelle et émotionnelle. La mémoire sémantique contient quant à elle les connaissances factuelles et conceptuelles ; il s'agit d'un vaste réseau d'associations et de concepts qui sous-tend la connaissance générale du monde. Les informations acquises et constituant la mémoire sémantique sont utilisées au quotidien (pour taper ces phrases sur l'ordinateur, j'utilise des règles grammaticales et un vocabulaire). La théorie de la mémoire déclarative développée par Squire intégrera ces deux systèmes dans la mémoire déclarative dépendante de l'intégrité de la formation hippocampique. Cette théorie concordait avec bon nombre d'études montrant que les patients porteurs de lésion du système limbique étaient généralement incapables de construire de nouveaux souvenirs autobiographiques (atteinte de la mémoire épisodique) mais également inaptes à acquérir de nouvelles connaissances (atteinte de la mémoire sémantique). Néanmoins, ces prédictions ont été démenties par l'existence de trois cas de patients porteurs d'une lésion limitée à l'hippocampe et présentant une atteinte sélective de la mémoire épisodique alors que leur capacité à apprendre de nouveaux faits est largement préservée (Vargha-Khadem *et al.* 1997). Ces dernières observations validaient davantage le modèle SPI (*Serial Parallel Independent*) proposé par Tulving en 1993, pour rendre compte des relations entre ces deux systèmes de mémoire sémantique et épisodique. Dans ce modèle, l'encodage de l'information dans le système épisodique dépend de façon critique du système sémantique alors que ce dernier peut opérer sans le premier (Tulving et Markowitsch, 1997). Tulving prédit ainsi que selon l'atteinte du système limbique, on peut observer soit une atteinte sélective de la mémoire épisodique (c'est le cas dans l'étude de Vargha-Khadem) soit une altération généralisée des deux systèmes épisodiques et sémantique. Ce modèle peut être à son tour invalidé par la description de certains cas cliniques souffrant d'une démence sémantique résultant d'une atrophie sélective du lobe temporal externe. Cette maladie dégénérative se manifeste essentiellement par un trouble de la mémoire sémantique (voir Piolino *et al.*, *Pour la Recherche*, p.124). Ces exemples et contre-exemples soulignent l'extrême difficulté pour rendre compte des différents systèmes de mémoire existant, de leur organisation

fonctionnelle et structurale tout en permettant d'expliquer l'ensemble des observations neuropsychologiques.

Nous retiendrons, pour terminer ce paragraphe relatif aux différentes classifications de la mémoire humaine, le tableau dressé par Schacter et Tulving (voir p. 25 ; 1994) qui tentent d'unifier les classifications déjà existantes. Ce modèle inclut les deux systèmes de mémoire épisodique et sémantique et intègre deux nouveaux systèmes (la mémoire procédurale et le système de représentation perceptive) qui vont être brièvement détaillé ci-après.

La mémoire procédurale est un terme également utilisé pour désigner la mémoire non déclarative. Cette assimilation n'est pas fautive puisque cette forme de mémoire s'exprime de façon non consciente et non déclarée. Néanmoins, cette définition est exclusive puisqu'il existe d'autres formes de mémoire (e.g. la mémoire sémantique) pouvant s'exprimer également de façon non déclarative et inconsciente. Selon une définition de Hirsch en 1974, la mémoire procédurale peut être considérée comme un système de « performance en direct ». Elle est impliquée dans l'apprentissage de nombreux types d'habiletés et d'algorithmes comportementaux et cognitifs ; elle opère à un niveau automatique plutôt que consciemment contrôlé ; ses sorties sont sensori-motrices plutôt que cognitives ; elle peut s'exprimer de façon normale sans requérir à l'intégrité des structures hippocampiques. Finalement, une propriété qui la différencie de la mémoire épisodique est qu'elle est progressive, cumulative et s'applique aux aspects invariants des informations et de l'environnement en général. Cette forme de mémoire est relativement difficile à définir, elle est souvent décrite par l'énumération des caractéristiques qu'elle ne possède pas, et qui sont précisément celles de la mémoire déclarative. L'existence de ce système est étayée par la convergence de dissociations observées chez différents patients amnésiques.

Le système PRS ou de représentation perceptive est un terme créé par Schacter (1994) pour désigner les processus mis en œuvre dans les effets d'amorçage. L'amorçage direct ou amorçage par répétition reflète le phénomène de facilitation de l'identification perceptive à partir d'indices réduits renvoyant à un stimulus préalablement rencontré (e.g. tâche de complèment de fragment de mots avec consigne implicite). C'est la forme de mémoire implicite la plus étudiée. Ce système fonctionne indépendamment du système mnésique épisodique ou déclaratif. Le PRS renvoie à une classe de sous-systèmes qui traitent et représentent l'information relative à la forme et à la structure, mais non à la signification ou à d'autres propriétés associatives des mots ou des objets. Ce système se divise en plusieurs sous-systèmes se distinguant sur la base de la nature des informations perceptives qu'ils manipulent [visuelle, auditive ou structurale (forme globale)] et sont évaluées par des tâches adaptées (e.g. respectivement : tâche d'identification perceptive des mots, tests implicites auditifs évaluant les effets d'amorçage, situation d'appariement de différentes vues d'objets évaluant également les effets d'amorçage). Ce système est préservé chez les patients amnésiques et dépend de mécanismes corticaux et, plus généralement, d'un système

neurocognitif différant sur le plan fonctionnel et neurobiologique de ceux sollicités tant dans la récupération explicite que dans les apprentissages procéduraux.

Systèmes principaux d'apprentissage et de mémoire chez l'homme			
Système	Autres termes	Sous systèmes	Récupération
Procédural	Non déclaratif	Habilités motrices Habilités cognitives Conditionnement simple Apprentissage associatif imple	<i>Implicite</i>
PRS	Non déclaratif	Forme visuelle des mots Forme auditive des mots Descriptions structurales	<i>Implicite</i>
Sémantique	Générique Factuelle Connaissance	Spatial Relationnel	<i>Implicite</i>
Primaire	De travail	Visuel Auditif	<i>Explicite</i>
Episodique	Personnelle Autobiographique Mémoire des événements		<i>Explicite</i>

L'ensemble de ces théories a été pour l'essentiel construit sur la base d'observations neuropsychologiques de patients cérébro-lésés. Ces sujets présentaient des lésions cérébrales plus ou moins bien délimitées et parallèlement des déficits spécifiques de certaines formes d'expression mnésique. L'élaboration de tâches comportementales appropriées a permis de mettre en évidence des dissociations entre plusieurs formes de mémoire. L'idée fondamentale qui a pu donc être dégagée est qu'une expérience donnée présente différents aspects pouvant être mémorisés et ultérieurement exprimés de diverses manières et surtout en mobilisant des structures neuro-cognitives différentes. Cette idée a permis de mettre en évidence l'existence de systèmes de mémoires multiples.

Ainsi énoncé, ces théories tentent de spécifier au mieux les caractéristiques psychologiques des systèmes proposés et des règles opératoires qui les définissent, et l'identification des structures cérébrales qui les sous-tendent. Aujourd'hui, les techniques d'imagerie cérébrale permettent avec de plus en plus de précision d'observer les configurations d'activité cérébrale associés aux états cognitifs.

L'expérimentation animale permet l'investigation des bases neurobiologiques de la mémoire à des niveaux d'analyse (cellulaire et moléculaire) inaccessibles à l'expérimentation humaine. Elle permet également de neutraliser et/ou contrôler de nombreux facteurs (histoire du sujet, variabilité du patrimoine génétique) susceptibles d'influencer les performances du sujet et donc de parasiter l'analyse expérimentale de la mémoire chez l'Homme.

Pour l'essentiel, les travaux menés chez l'animal tenteront de modéliser le syndrome amnésique d'origine bi-temporale qui se caractérise par une altération de la mémoire déclarative et une préservation de la mémoire non déclarative. Les chapitres suivants traiteront des problèmes méthodologiques et théoriques liés à la modélisation chez l'animal des fonctions mnésiques humaines ; ils feront l'objet d'un exposé succinct de quelques unes des théories proposées dans le domaine de la cognition animale.

III_ HISTORIQUE DES ETUDES SUR LA COGNITION ANIMALE

L'élaboration de modèles animaux est apparue incontournable pour les scientifiques désireux de percer le mystère des composantes neurobiologiques des processus mnésiques. Dès lors, la question qui se pose est de connaître le degré d'adéquation entre la mémoire humaine et la mémoire animale. Dans quelle mesure peut-on modéliser chez l'animal les processus mnésiques humains ? Cette interrogation est indissociable de la question plus épineuse de l'existence de représentations mentales chez l'animal.

A_ Le modèle behavioriste

Les premières études expérimentales portant sur l'apprentissage chez l'animal s'inscrivaient dans la fameuse école de psychologie appelée le Behaviorisme. Les Behavioristes (Watson, Skinner) soutenaient que le comportement peut être étudié avec la même précision que celle des sciences physiques à condition de ne considérer que ses aspects observables et mesurables. Le comportement d'un sujet (humain ou animal) est alors étudié à partir d'une analyse des caractéristiques d'entrée et de sortie sans se préoccuper des variables qui correspondent à des

états internes (comme la représentation, l'intentionnalité) décrits en terme psychologiques et donc inobservables. C'est pourquoi le système est considéré comme « une boîte noire ». Les behavioristes fondent toute explication de l'apprentissage et de la mémoire sur la base d'associations stimulus-réponse (S-R). Tout apprentissage peut être décomposé en une série d'association S-R. La formation d'une association S-R n'est possible que si un renforcement positif est associé au stimulus. Il s'agit de la loi de l'effet (Thorndike), second principe constituant la théorie behavioriste.

Ces considérations théoriques ont permis de faire de la psychologie une discipline scientifique dotée d'une méthode expérimentale et de légitimer l'utilisation de modèles animaux pour l'étude du comportement humain. Ceci a pu être possible car la question fondamentale de la représentation mentale chez l'être vivant homme ou animal s'est trouvée évincée car complètement dénuée d'intérêt et inappropriée dans ce cadre théorique précis.

B_ L'abandon du Behaviorisme

Le modèle S-R et la loi de l'effet sont apparus rapidement limités pour expliquer des comportements « spontanés », ne pouvant être expliqués par des événements antécédents observables. Delacour (1998) formule un exemple simple en montrant qu'une relation S-R peut varier sans qu'aucune donnée observable puisse expliquer cette variation : « c'est l'exemple trivial d'un chat qui mis en présence, dans les mêmes conditions, de la même nourriture tantôt la dévorera avec avidité, tantôt s'en détournera. ». Cette variation du comportement vis à vis de la nourriture est manifestement relié à un état interne, l'état de faim. Cet état interne qui module la réponse constitue une variable intermédiaire dans le schéma S-R.

Parallèlement à ces premières critiques, s'est érigé un courant de pensée qui donnera naissance à la psychologie cognitive. Ce courant de pensée s'inspire profondément des postulats théoriques véhiculés par la *Gestalt Theory* de l'entre deux guerres. A l'inverse des Behavioristes, ces nouveaux psychologues pensaient que notre connaissance du monde est basée sur la capacité de l'individu à percevoir le monde, et la perception est alors considérée comme un processus constructif dépendant tout autant des stimuli externes que des capacités de traitement de l'individu. Autrement dit, c'est l'individu qui organise et structure le monde. Cette nouvelle psychologie cognitive tente d'analyser la manière dont une information sensorielle se transforme en un *percept*, donc un état mental, pour induire une action, et donc comment une information conduit à une réponse comportementale particulière. L'objectif est d'énoncer des lois de fonctionnement du système cognitif mettant en correspondance des propriétés ou des relations de l'environnement avec des états de conscience. En re-dirigeant l'attention sur les opérations mentales, les psychologues se sont concentrés sur la notion de traitement de l'information

incluant les opérations agissant au niveau même des récepteurs sensoriels jusqu'à celles nécessaires à l'utilisation de ces informations dans la mémoire et dans l'action.

C_ Les travaux de Tolman : la redécouverte et la réhabilitation des représentations mentales

Si dans le domaine de la psychologie humaine, le modèle béhavioriste fut abandonné dès le début des années 60, il restera dominant dans le domaine de la psychologie animale jusqu'à la redécouverte au début des années 80 des travaux de Tolman publiés en 1948, travaux qui introduisaient la notion formelle de variable intermédiaire aux propriétés représentationnelles. Sans nier l'existence d'apprentissages reposant sur l'élaboration d'associations simples de type S-R, Tolman rapportait des études expérimentales dans lesquelles certaines formes d'apprentissage chez l'animal ne peuvent résulter d'un simple renforcement de connexions S-R.

L'exemple le plus convainquant est issu des expériences dans lesquelles il montre qu'un rat placé dans un labyrinthe dans lequel il doit apprendre un trajet précis pour atteindre un but, est capable sans apprentissage supplémentaire d'utiliser des raccourcis menant vers le même but si on lui propose simultanément différentes possibilités de trajet (voir Tolman, 1948). L'animal emprunte, sans jamais les avoir exploré auparavant, des trajets le conduisant de façon plus efficace à un même but. Tolman introduisit alors la notion de « carte cognitive » : lors de l'apprentissage s'établit une forme de carte interne de l'environnement engageant un fonctionnement cérébral complexe. Cette carte est porteuse d'informations sur les différents points de l'environnement et les différents trajets possibles dans ce milieu et finalement contribue à l'élaboration du comportement adapté à la situation. Tolman passe en revue plusieurs expériences comportementales de la littérature, dans lesquelles les différents apprentissages requièrent l'élaboration et l'utilisation d'une carte cognitive : l'apprentissage latent, les « vicarious trial error ».

Dans ces situations expérimentales, l'hypothèse de l'existence chez l'animal de représentations mentales et d'une correspondance à un fonctionnement cérébral complexe devient centrale. Cette révolution théorique constitue le point d'ancrage des études expérimentales actuelles chez l'animal, visant à analyser les processus mentaux complexes (tels que les processus de mémoire). En quittant le modèle béhavioriste, on aborde enfin les questions relatives aux représentations mentales, à la conscience des animaux.

D_ A la question d'une conscience animale se substitue celle des représentations mentales.

Eccles (1989) écrivait récemment « *Bien sûr la pensée est vécue de façon subjective et nous ne pouvons l'identifier objectivement de la même manière que nous percevons par nos sens le monde extérieur. C'est en parlant à autrui que nous confirmons sa présence et conférons à cette expérience un statut objectif.* »

Qu'en est-il de la conscience chez l'animal ? Cette question devient incontournable si l'on tente de modéliser chez l'animal des processus cognitifs complexes observés chez les humains tel que les processus de mémoire déclarative. Pour Griffin (1976), les comportements animaux dans toute leur complexité semblent avoir tant de points communs avec les conduites humaines qu'on est en droit de postuler la présence, chez l'animal, de tout vécu mental lié à ces comportements. Griffin (1976) le définit ainsi : « Tout être humain normal pense à des objets, des événements qui sont éloignés dans le temps et dans l'espace par rapport à la succession immédiate des sensations : voilà ce que j'entends par « expériences mentales » (in Eccles, 1989). La présence d'*images mentales* et leur utilisation par l'animal pour moduler son comportement fournissent à titre d'hypothèse de travail une définition pragmatique de la conscience. » Eccles (1989) souligne à son tour qu'on peut dire d'un animal qu'il est conscient s'il sait juger une situation actuelle à la lumière de ses expériences passées de façon à adopter une conduite appropriée qui soit autre qu'une réaction instinctive stéréotypée. Le problème de la conscience chez l'animal constitue comme le dira Popper une question impénétrable surtout si on l'aborde en incluant toute la dimension spirituelle à ce concept incluant la conscience de soi et celle de l'autre. De nombreux penseurs et scientifiques préféreront substituer à cette question trop anthropomorphique la question relative à l'existence de représentations mentales chez l'animal.

Jacques Vauclair (1992) donne une définition assez large de la représentation animale, c'est la capacité d'un organisme à produire une réponse en l'absence du stimulus. En d'autres termes, l'organisme est capable de se représenter une ou plusieurs propriétés d'une expérience antérieure. Cette propriété sert alors d'indice pour choisir une réponse appropriée. Dans d'autres situations, l'organisme est aussi capable de produire une réponse sur la base d'une propriété ou d'une caractéristique du contexte de stimulation et de généraliser sa réponse à un ensemble plus ou moins grands d'objets. Sur la base des études actuelles et passées, Vauclair propose quatre niveaux dans la façon dont un organisme construit et utilise des supports représentationnels.

1. Les couplages temporels et spatiaux : Il s'agit d'associations entre stimuli qui se traduisent par le fait que plusieurs événements sont dans un rapport de proximité spatiale et/ou temporelle l'un par rapport à l'autre. Les exemples cités sont les apprentissages de type pavlovien dans lesquels un événement précède un autre (le son d'une cloche précède la présentation de nourriture) et les apprentissages de type instrumental dans lesquels une

action du sujet est suivie d'une conséquence précise (l'appui sur le levier est suivie de l'obtention de nourriture).

2. Les activités de comparaisons permettent des rapports de similitude et/ou de différence. Ce type d'opération est largement utilisé dans les apprentissages discriminatifs et les tâches d'appariement.
3. La mise en œuvre de relations d'appartenance et d'ordre, ce type de relation est notamment construit dans les activités de catégorisation chez le pigeon.
4. L'application de ce qu'appelle Vauclair des équivalents d'opérateurs logiques s'établit dans des rapports entre objets ou entre congénères. C'est précisément le cas dans les activités de type inférentiel pouvant concerner les relations spatiales (« la carte cognitive » de Tolman), des propriétés physiques (la transitivité) ou des relations sociales (Cheney).

Les définitions proposées par J. Vauclair légitiment l'étude la représentation mentale chez l'animal.

IV_ LES SYSTEMES DE MEMOIRE CHEZ L'ANIMAL

Les systèmes de mémoire décrits chez l'animal peuvent être regroupés dans deux grands ensembles se distinguant par leurs bases neuroanatomiques. Le premier grand ensemble inclut les formes de mémoire mettant en jeu des circuits reliant les cortex sensoriels et le système limbique, mais aussi des interactions entre structures sous corticales et les différents cortex. Ces formes de mémoire intègrent des procédures permettant l'élaboration d'associations complexes de type stimulus – stimulus (SS), ces représentations mnésiques ont pour propriété de pouvoir être exprimées de façon flexible et adaptée dans tout contexte expérimental autre que le contexte d'apprentissage initial. L'autre grand ensemble regroupant les formes de mémoire dites hippocampe – indépendantes n'a pas de base neuroanatomique précisément délimitée, néanmoins il impliquerait la participation des cortex sensoriels, des ganglions de la base et du cortex prémoteur du lobe frontal (Meunier *et al.*, 1994 ; Petri et Mishkin, 1994). Ces formes de mémoire seraient principalement responsables de la formation d'associations simples entre stimuli sensoriels et réponses motrices, en d'autres termes de type stimulus – réponse (SR). En général, ce type d'association s'établit progressivement par essais et erreurs, donc en répétant l'exposition de l'organisme au stimulus. A l'inverse des associations complexes S-S, ces représentations sont qualifiées de rigide, car ne peuvent être restituées que dans la seule condition d'apprentissage initial.

Il semble donc qu'on puisse parvenir à définir un consensus entre les différentes théories proposées. Néanmoins cette division de la mémoire animale en deux grands systèmes s'appuie sur des critères peu précis, à savoir le degré de dépendance au système hippocampique et la nature déclarative ou non déclarative de leurs supports représentationnels. Cette classification soulève de nombreux débats notamment pour ce qui du rôle respectif des structures cérébrales dans chacun de ces systèmes.

A_ Fonction de l'hippocampe : dépendance au contenu informationnel

L'hypothèse que la formation hippocampique est exclusivement impliquée dans la mémoire spatiale a été proposée par O'Keefe et Nadel en 1978, sur la base d'études comportementales et électrophysiologiques. Cette théorie est tout d'abord basée sur l'idée que les systèmes de mémoire diffèrent en fonction de la nature des informations qu'ils traitent et non pas de la durée de stockage du système. Ils définissent le système local en opposition au système taxinomique. Le système local, dépendant de l'intégrité de l'hippocampe, serait entièrement dévolu à l'acquisition de représentations de l'espace. A l'appui de cette hypothèse, des études montrent que des rats porteurs de lésions hippocampiques sont largement déficitaires dans les apprentissages spatiaux et les épreuves d'exploration, mais ne sont pas perturbés dans des tâches dites non spatiales (Gallagher et Holland, 1992 ; Jarrard, 1993 ; Morris *et al.*, 1992 ; Sutherland *et al.* 1982). A l'échelle cellulaire et structurale, ils font largement référence à leur découverte des cellules de lieux dans l'hippocampe, spécifiques de la position de l'animal dans l'environnement ; ainsi une cellule de lieu décharge de façon sélective lorsque le rat se trouve à un endroit particulier de l'environnement qu'il est en train d'explorer (O'Keefe 1979 ; O'Keefe et Dostrovski, 1971 ; O'Keefe et Nadel, 1978). Il est ainsi admis que l'activité de ces cellules de lieu reflète la représentation des relations pertinentes entre les stimuli distants qui déterminent les dimensions spatiales de l'environnement. A l'inverse, le système taxinomique qui ne dépendrait pas de l'intégrité de l'hippocampe permettrait de classer des stimuli précis dans des catégories, cette faculté de classement catégoriel serait pilotée par les renforcements des comportements d'approche et d'évitement. La théorie de la carte spatiale développée par O'Keefe et Nadel est directement inspirée des écrits de Tolman à propos des cartes cognitives et des habitudes (Eichenbaum, 1994). Les représentations élaborées dans le système local sont très similaires aux cartes cognitives décrites par Tolman, cartes auxquelles il assignait une fonction de guide pour l'acquisition de connaissances à propos d'un environnement défini en termes de relations et d'interconnexions entre de nombreux stimuli distants. De même, les représentations catégorisées par le système taxinomique sur la base du renforcement associé sont très proches de ce que

Tolman appelait les « cathexies » signifiant des catégories d'items élaborées sur la base du renforcement leur attribuant une valence positive ou négative.

La spécificité de la formation hippocampique pour la construction d'une carte spatiale sera remise en cause par de nombreuses études comportementales. Nous citerons pour exemple les expériences d'Eichenbaum (1988, 1989) montrant que des rats porteurs d'une lésion du fornix sont largement déficitaires dans une tâche de discrimination simultanée d'odeurs. Ces données constituent la preuve expérimentale que l'hippocampe chez le rongeur n'est pas uniquement impliqué dans le traitement des informations spatiales. Par ailleurs les études de Olton et Papas (1979) ont montré que des rats lésés de façon identique étaient perturbés dans certaines versions d'une tâche spatiale (labyrinthe radial) mobilisant la mémoire de travail et en revanche présentaient des facultés d'apprentissage préservées dans une version de cette tâche sollicitant leur mémoire de référence. Ceci suggère que certaines tâches d'apprentissage portant sur des informations spatiales peuvent être résolues sans utiliser des stratégies cognitives relevant du système hippocampique. Des études électrophysiologiques visant à spécifier et caractériser le codage des neurones hippocampiques ont également montré l'existence de cellules de lieu dévolues au codage des indices spatiaux déterminant la configuration d'un environnement donné. Néanmoins, des enregistrements de l'activité unitaire neuronale hippocampique effectués chez l'animal intact engagé dans une tâche de reconnaissance d'odeurs ont montré que des cellules pyramidales du champ CA1 déchargent en liaison temporelle stricte avec tout événement comportemental significatif (Eichenbaum *et al.*, 1986 ; Eichenbaum, 1994). Par exemple, certaines de ces cellules déchargent spécifiquement quand l'animal s'approche de la zone d'échantillonnage, d'autres « répondent » sélectivement lors de l'échantillonnage d'une odeur bien précise, d'autres encore lors de l'émission de la réponse et certaines lors de l'obtention du renforcement. Ainsi, l'activité unitaire des cellules de l'hippocampe n'est pas exclusivement dévolue à l'encodage des informations spatiales.

Finalement, l'idée développée par O'Keefe et Nadel que l'hippocampe est critique pour l'encodage et la conservation d'informations spatiales recueillies dans l'environnement sous une forme proche de celle d'une carte est largement acceptée par la communauté scientifique. Ce qui en revanche constitue un point de discordance est de savoir si chez l'animal le système hippocampique est spécifiquement et exclusivement dévolu au traitement, au stockage et à l'utilisation d'informations spatiales.

B_ Fonction de l'hippocampe : organisation des informations

Un exemple : Hippocampe et Associations Configurales par Sutherland et Rudy

Nous présenterons dans ce paragraphe une série de travaux suggérant une dissociation entre des systèmes de mémoire hippocampe-dépendants et des systèmes hippocampe-indépendants, reposant sur des opérations mnésiques distinctes, engagées par chacun de ces systèmes.

Sutherland et Rudy (1989) fondent leur théorie sur le fait que les souvenirs sont stockés dans un vaste réseau associatif. A chaque événement de la vie, l'individu doit adapter son comportement, cette adaptation peut se faire grâce à la réactivation de souvenirs adéquats à partir d'indices de la situation. Néanmoins, dans certains contextes, ces indices sont aussi associés à des souvenirs non pertinents, incompatibles ou même conflictuels avec la situation présente, ces indices sont donc ambigus. L'individu doit donc se centrer sur l'ensemble (une configuration) des indices de la situation et à leur signification conjointe pour adopter une réponse adaptée et non pas sur la signification de l'indice isolé. En d'autres termes, le tout est pertinent, alors que certaines parties de ce tout prises isolément conduisent à un comportement inadapté, car préalablement associées à des situations ou réponses contraires. Sutherland et Rudy distinguent ainsi le système mnésique « fermé », imperméable à toute influence inadaptée, car il permet l'élaboration de telles associations configurales et le système mnésique « ouvert » supportant les associations élémentaires. Il existe donc des épreuves mnésiques dans lesquelles les problèmes ne sont solubles que sur la base d'associations configurales et d'autres dans lesquelles les associations élémentaires sont suffisantes. L'exemple « convaincant » qu'ils utilisent est constitué de ce qu'ils appellent le problème de la « commutation ». Dans une version pavlovienne de ce problème, on présente à un animal deux stimuli A et B alternativement dans deux contextes C1 et C2. Dans le contexte C1, A est apparié avec le stimulus inconditionnel et B ne l'est pas : C1(A+/B-), alors que dans le contexte C2, la relation est inversée : C2(B+/A-). Ces deux stimuli sont ambigus puisqu'ils conduisent à des réponses contraires en fonction du contexte au sein duquel ils sont présentés. Sutherland et Rudy estiment que l'animal doit élaborer des représentations configurales distinctes des indices A et B avec chacun des deux contextes pour pouvoir y répondre correctement. Dans chaque situation expérimentale (chaque contexte), l'animal doit utiliser un système « fermé » aux associations compétitives établies pour A et B dans l'autre contexte. A l'échelle structurale (neurobiologique), le système hippocampique serait fondamental pour l'élaboration de ces associations configurales permettant de maintenir le système mnésique « fermé », alors que les associations élémentaires seraient sous-tendues par d'autres systèmes cérébraux au sein desquels l'hippocampe ne serait pas indispensable. A l'appui de ces hypothèses sur la fonction hippocampique, les auteurs citent des travaux montrant que des rats porteurs de lésion du système hippocampique sont perturbés dans des épreuves portant sur

les problèmes de la commutation (Sutherland *et al.*, 1989), ce qui n'est pas le cas pour des animaux intacts (Rescorla *et al.*, 1985 ; Saavadra, 1975). Selon Sutherland et Rudy, « les lésions du système hippocampique ouvrent le système de mémoire : les associations qui impliquent des représentations configurales ne sont plus accessibles pour le sujet. ». Pour dissocier ces systèmes hippocampe-dépendants et hippocampe-indépendants, ils proposent tout un éventail de tâches avec *un continuum d'ambiguïté des indices de récupération* : des tâches au sein desquelles les indices de récupération ne contiennent aucun indice ambigu, donc pouvant être résolues sur la base d'associations élémentaires, et d'autres dans lesquelles les indices de récupération sont ambigus car associés à des souvenirs conflictuels et nécessitant des associations configurales. Néanmoins, bon nombre de ces tâches, qui selon ces auteurs révèlent les fonctions du système hippocampique sont apparues insensibles aux lésions de l'hippocampe. Davidson et ses collaborateurs (1993) ont montré que des lésions sélectives de l'hippocampe n'entraînent aucune perturbation dans une épreuve de discrimination de « negative patterning »¹ sollicitant des associations configurales. Dusek et Eichenbaum (1998) ont à leur tour montré chez le rat qu'une lésion du fornix n'induit aucun déficit dans une épreuve de discrimination d'odeurs selon la procédure expérimentale de « transverse patterning »².

L'échec de cette théorie des associations configurales réside comme le notera Nadel (1994) dans l'absence d'une réelle définition de ce qu'est une association élémentaire. Eichenbaum (1994) souligne que la formation d'un indice dit configural peut être interprétée comme un stimulus simple. En d'autres termes, cette fonction de « configuration de stimuli » décrite par Sutherland et Rudy n'est pas une opération mnésique particulière en tant que telle, mais seulement un mécanisme particulier qui convertit des stimuli en un composé (compound) particulier et tout aussi élémentaire puisqu'il ne peut être utilisé et n'a de sens qu'associé avec le renforcement et le contexte dans lequel il a été acquis. Ce modèle est par conséquent coûteux et peu flexible car ne prédit pas le comportement d'un organisme confronté à de nouvelles configurations d'indices.

Ces deux théories portant sur la mémoire animale que nous venons d'évoquer succinctement ne sont que des exemples de la littérature rendant compte d'une multitude de classifications. Les fondements théoriques et le raisonnement prédominant que l'on retrouve au sein de ces deux théories sont assez illustratifs et se retrouvent dans les autres classifications proposées. Comme le

¹ Negative patterning : dans cette épreuve, la signification des stimuli pertinents est dépendante de leur mode de présentation. Ainsi deux stimuli A et B sont ambigus car présentent une signification différente selon qu'ils sont présentés séparément (A+ ou B+) ou simultanément (AB-). L'animal pour résoudre ces problèmes doit utiliser une représentation configurale des éléments A, B et AB

² Transverse patterning : dans cette épreuve, la signification d'un stimulus donné dépend du stimulus avec lequel il est présenté. Dans l'expérience citée, l'animal doit apprendre les couples d'odeurs suivants (A+B-), (B+C-) et (C+D-) : ainsi B est associé à un renforcement positif uniquement s'il est présenté avec A et non avec C. Ce stimulus B est ambigu car associé à deux souvenirs conflictuels.

laisse entrevoir nos deux illustrations, l'objectif est de proposer des dichotomies centrées sur l'hippocampe (dépendance *vs.* indépendance) et donc la tendance est de définir les systèmes de mémoire sur une base anatomique. Ainsi, pour exemple, la mémoire déclarative devient exclusivement définie en termes de vulnérabilité aux atteintes hippocampique. De ce fait, toute performance comportementale sensible à une lésion de l'hippocampe modélise la mémoire déclarative avec pour preuve un critère strictement neurobiologique. Ce type de raisonnement est largement responsable de la multiplication des théories relatives aux systèmes de mémoire chez l'animal et de l'absence de consensus et d'unité conceptuelle qui en découle. Néanmoins nous assistons depuis quelques années à un regain d'intérêt pour une tentative d'analyse psychologique et structurale des processus mnésiques. L'objectif est de définir les opérations et les règles de « calcul », spécifiant une forme de mémoire et pouvant être modélisées chez l'animal. En d'autres termes, l'objectif est de créer des épreuves comportementales dans laquelle les problèmes posés ne peuvent être résolus que par l'utilisation de stratégies mobilisant les processus cognitifs que l'on désire modéliser et que l'on pense être caractéristiques et spécifiques d'une forme de mémoire. Alors, la dichotomie est basée sur une dimension psychologique et la technique lésionnelle ne devient ensuite qu'un outil de démonstration. Cette approche a largement participé à recentrer le débat non seulement sur la nature des différences existant entre les différents systèmes de mémoire mais aussi sur une tentative d'ébauche d'un cadre théorique plus construit et heuristique. Cette démarche va davantage être visible dans les propositions théoriques d'Eichenbaum que nous développerons plus tard.

V_ LA NOTION DE SYSTEME DE MEMOIRE ET SES LIMITES.

Comme nous venons de le voir, les classifications des différents systèmes de mémoire prolifèrent tant dans la littérature relative à la mémoire humaine que dans le domaine de l'expérimentation animale et ne présentent pas de réel recoupement. Tenter une systématisation de ces connaissances pour parvenir à une homogénéisation des propositions théoriques en vue d'établir une théorie unifiée est très difficile et semble découler en partie d'une absence de définition précise et commune de la notion de systèmes de mémoire. Ceci a mené les psychologues et neurobiologistes à recentrer le débat et tenter de donner une réponse à la question : Comment définir un système de Mémoire ?

Schacter et Tulving (1994) dans « Memory Systems » tentent de répondre à cette question. La première définition qu'ils donnent est la suivante : le terme de Système de Mémoire fait référence à une interaction entre les mécanismes d'acquisition, de rétention et de récupération,

interaction caractérisée par des règles et des principes opératoires. L'idée est que deux ou plusieurs systèmes de mémoire sont caractérisés par des règles opératoires fondamentalement distinctes (Sherry and Schacter, 1987). Ils incluent également la description des structures et configurations cérébrales comme faisant partie des éléments de définition d'un système de mémoire. De façon plus détaillée, ils proposent trois critères larges permettant l'identification de différents systèmes de mémoire : les opérations d'inclusion, les propriétés et les relations et enfin les convergences de dissociation.

- Les opérations d'inclusions par classes :

« Un système mnésique intact nous permet de réaliser un très grand nombre de tâches dans une classe ou une catégorie particulière, indépendamment du contenu informatif précis de ces tâches » (Schacter et Tulving, 1994). Ainsi, un système opère par inclusion dans une classe, en ce sens qu'il peut traiter toute entrée ou toute information relevant de la catégorie pour laquelle il est spécialisé. Existe une spécificité neurobiologique du système considéré ; plus précisément les composantes cérébrales d'un système sont cruciales et constituent un des critères d'identification. Ces considérations nous conduisent tout droit à la nécessité d'établir des dissociations fonctionnelles. En d'autres termes stipuler l'existence d'une catégorie ou d'une classe entière d'opérations, doit nécessairement s'accompagner de l'idée de sélectivité : lorsque des fonctions mnésiques précises, sous la dépendance d'un système de mémoire, sont affectées par une modification particulière de l'état cérébral, les fonctions non mnésiques, et les fonctions mnésiques sous la dépendance d'autres systèmes de mémoire, ne doivent pas être affectées de la même manière. Si ce critère de spécificité sélective est absent, aucune inférence quant à l'identification d'un système mnésique n'est possible.

- Propriétés et relations

Décrire un système de mémoire implique d'en énumérer les propriétés. Les propriétés d'un système incluent les règles opératoires, le ou les types d'informations traitées, les substrats neuronaux. Cette « fiche technique » doit également comprendre les fonctions adaptatives spécifiques du système. En d'autres termes, si ce système X existe au sein d'une espèce donnée c'est parce qu'il remplit une ou des fonctions écologiques qu'aucun autre système existant ne peut remplir. Sherry et Schacter (1987) utilisent à ce sujet le terme d'incompatibilité fonctionnelle. Postuler l'existence d'un nouveau système de mémoire consiste tout d'abord à se demander si ce nouveau système a des fonctions incompatibles avec celles d'autres systèmes, ce qui justifierait de son existence. Cette dernière préoccupation permet par la même occasion de clarifier nettement la nature des relations qu'un système peut entretenir avec les autres. Comme le soulignent Schacter et Tulving (1994), l'énumération de ces propriétés reste à ce jour une entreprise difficile et souvent basée sur des spéculations intuitives.

- Convergence des dissociations.

La dernière condition nécessaire pour postuler l'existence d'un système de mémoire relève de la pluralité des résultats expérimentaux pouvant justifier de ce postulat. On postule donc l'existence d'un système de mémoire, non pas sur l'observation d'une seule dissociation expérimentale, mais plutôt sur une convergence de dissociations observées dans des tâches différentes, avec différentes populations et parfois même sur des espèces différentes.

Les critères d'identification d'un système de mémoire proposés par Schacter et Tulving les conduisent assez facilement à distinguer les notions de système et de sous-système de mémoire. Plusieurs sous-systèmes appartenant au même super système partagent effectivement les mêmes règles opératoires caractéristiques du super système mais se différencient quant à la nature des informations qu'ils traitent et la localisation cérébrale qu'ils occupent dans la circuiterie neuronale identifiée comme sous tendant le super système.

Ces définitions proposées par Schacter et Tulving présentent l'avantage de pouvoir être opérationnalisés et de rendre compte d'un ensemble de résultats expérimentaux sans aboutir à une multitude de classifications. Systématiser les fonctions mnésiques revient à proposer de nouvelles catégories descriptives pour « capturer » une architecture structurale ou fonctionnelle de l'esprit ou du cerveau qui permette d'organiser de façon sensée le plus de données possibles et de prédire des résultats nouveaux (Johnson et Chalfonte, 1994, p. 334). Le concept de systèmes de mémoire permet d'instrumentaliser la réalité psychobiologique pour proposer des hypothèses opérationnelles. Cet effort dans la redéfinition du concept de mémoire et des exigences théoriques et expérimentales qu'il impose sera perceptible dans la démarche d'Eichenbaum (que nous exposerons ultérieurement) soucieux d'établir des propositions théoriques rendant compte au maximum des résultats expérimentaux à ce jour disponibles.

Les limites de la notion de systèmes mnésiques

Comme nous venons de le voir, une grande majorité des théories à ce jour proposées sont fondées sur l'idée implicite que la mémoire peut être divisée en plusieurs systèmes psychologiques sous-tendus par différents substrats neuronaux qui contribuent à la performance de façon indépendante (Kim et Baxter, 2001). En d'autres termes, le présupposé sous-jacent est que les informations sont stockées dans différents systèmes neurocognitifs indépendant les uns des autres. Ces *a priori* sont d'ailleurs perceptibles dans les définitions sur les systèmes de mémoire proposées par Schacter et Tulving et, en ce sens, en limitent leur portée.

Partant de là, l'approche la plus utilisée est l'approche lésionnelle et de façon quelque peu restrictive, la tendance générale établit une dichotomie entre les systèmes de mémoire

hippocampe-dépendant (c'est à dire perturbés après lésion du système hippocampique) des systèmes de mémoire hippocampe-indépendant (préservés après une telle lésion) (Jaffard et Meunier, 1993). Adopter le présupposé théorique de l'indépendance des systèmes neurocognitifs légitime finalement l'étude expérimentale des systèmes de mémoire pris individuellement (Kim et Baxter, 2001).

Pourtant à ce jour de nombreuses données de la littérature rendent compte d'interactions entre les systèmes de mémoire et ces interactions peuvent être de différentes nature selon la situation expérimentale considérée. Jaffard et Meunier dans leur revue de question sur le rôle de l'hippocampe (1993) apportent de nombreux arguments. Ils évoquent tout particulièrement des études démontrant une facilitation dans une épreuve comportementale donnée après lésion de l'hippocampe. Pour exemple, citons les expériences menées par Eichenbaum et ses collaborateurs (1988, 1989). Ils démontrent les effets bidirectionnels d'une lésion du fornix sur les capacités du rat à discriminer des odeurs. Plus précisément, ces études montrent qu'un dysfonctionnement de la formation hippocampique induit un déficit dans la version simultanée de la tâche (choisir entre deux odeurs) mais facilite l'apprentissage de la version successive dite go/nogo (répondre à une odeur puis répondre à une autre odeur). Ces données montrent certes que l'intégrité de la formation hippocampique est indispensable pour résoudre les problèmes posés dans la version simultanée de la tâche mais surtout ils semblent indiquer que dans la version go/nogo, la formation hippocampique entre en compétition avec le système neurocognitif dit « essentiel » pour ce type d'apprentissage. Les expériences visant à évaluer les effets d'une lésion de l'hippocampe sur le conditionnement pavlovien de la membrane nictitante illustrent parfaitement les interactions entre systèmes cérébraux dits hippocampe dépendant et hippocampe indépendant. Selon le niveau d'entraînement et le délai temporel entre le stimulus conditionnel et le stimulus inconditionnel, une lésion de l'hippocampe induit soit une facilitation, soit un déficit ou n'a pas d'effet dans l'acquisition de la réponse conditionnée. En d'autres termes, selon la demande cognitive de la tâche, l'hippocampe agirait de façon antagoniste ou à l'inverse en synergie avec le système cérébelleux identifié comme essentiel pour l'apprentissage du conditionnement pavlovien.

Pour appuyer ces conclusions, Jaffard fait référence à des travaux révélant des modifications neurochimiques et biophysiques, des synapses hippocampiques induites par l'apprentissage de ce conditionnement et ceci quelque soit la version de l'épreuve. Dans l'ensemble ces données suggèrent que l'hippocampe (mais peut être ceci est valable pour d'autres structures cérébrales) module de façon active (positivement ou négativement) un système de mémoire dit hippocampe indépendant. Plus généralement ces données suggèrent l'existence d'interactions dynamiques de nature compétitive ou à l'inverse synergique entre systèmes cérébraux de mémoire et montrent au minimum qu'il ne peut exister une réelle indépendance entre les systèmes neurocognitifs.

Ces trente dernières années, les investigations scientifiques dans le domaine de la neurobiologie de la mémoire étaient fondées sur l'idée d'une indépendance des systèmes neurocognitifs. Ces travaux ont été très utiles pour identifier les substrats anatomiques, physiologiques et moléculaires de la mémoire mais les modèles modulaires proposés apparaissent aujourd'hui limités pour rendre compte des aspects dynamiques et interactifs des systèmes de mémoire. L'idée de systèmes de mémoire en interaction ne fait qu'émerger aujourd'hui malgré les propositions théoriques de Jaffard et Meunier en 1993 et les premiers arguments expérimentaux datant des années 80, si bien que les études visant à préciser ces interactions ne sont encore que marginales et aucun cadre théorique global et complet pouvant rendre compte de ces conceptions dynamiques des systèmes cérébraux ne peut être aujourd'hui proposé.

Si le modèle d'Eichenbaum que nous allons exposer à présent ne rend pas compte de ces interactions entre systèmes cérébraux de mémoire, il retiendra plus particulièrement notre attention dans la mesure où il satisfait les critères énoncés par Schacter et Tulving et permet de rendre compte d'une bonne partie des résultats expérimentaux à ce jour disponibles.

VI_ HIPPOCAMPE ET REPRESENTATIONS RELATIONNELLES

A_ Démarche scientifique

Howard Eichenbaum, dans bon nombre de ses publications, ne manque pas de déclarer en premier lieu ses intentions, préoccupations et valeurs scientifiques. Eichenbaum s'inspire de la littérature relative à la mémoire humaine montrant qu'une forme de mémoire dite déclarative est sévèrement altérée chez des patients souffrant d'une amnésie bi-temporale alors que la mémoire dite procédurale demeure intacte. Le but de son travail est de reproduire cette dissociation chez l'animal. L'objectif initial qu'il se fixe est de transposer un système mnésique particulier (la mémoire déclarative) vers un système cérébral (l'hippocampe). Son analyse va des opérations psychologiques vers leur incarnation dans le ou les substrats neurobiologiques et non l'inverse à savoir se demander ce que « fait » une structure donnée.

En effet, l'une des stratégies expérimentales dominantes consiste à définir la mémoire déclarative en termes de vulnérabilité aux atteintes hippocampiques. De ce fait toute épreuve comportementale dans laquelle les performances sont sensibles à une lésion de l'hippocampe permettrait de modéliser la mémoire déclarative, ce qui n'est pas le cas (Chun et Phelps, 1999).

Eichenbaum s'interroge tout d'abord sur l'existence d'une forme de mémoire déclarative chez l'animal, puis essaie de déterminer si cette forme de mémoire est sous-tendue par le système

hippocampique. La richesse de ses travaux réside dans son perpétuel souci de construire un réel modèle animal d'étude de la mémoire déclarative et du système hippocampique. Eichenbaum va donc s'appuyer dans un premier temps sur les analyses de Cohen quant aux propriétés constitutives de la mémoire déclarative décrite chez l'homme, pour en extraire les opérations élémentaires et fondamentales pouvant être étudiées chez l'animal. Ces propositions théoriques seront alors confrontés aux données de la littérature déjà existante relative à la fonction hippocampique chez l'animal. Elles permettront ainsi de vérifier dans quelle mesure ces caractéristiques psychologiques ainsi formalisées peuvent expliquer les résultats obtenus, issus de nombreuses études lésionnelles portant sur une diversité de tâches comportementales. Cette stratégie expérimentale a le mérite de tenter la construction d'un cadre théorique commun à toutes les études menées chez l'animal et de combler le gouffre existant entre les nombreuses interprétations sur la fonction hippocampique dans la mémoire animale. C'est enfin une démonstration d'une continuité entre les fonctions de hippocampe chez l'homme et chez l'animal. Cette analyse indique quels aspects de la mémoire déclarative chez l'homme peuvent être modélisés chez l'animal et fournit ainsi la base à de nombreuses études neurobiologiques des circuits qui sous-tendent ce type d'opérations mnésiques.

B_ Un modèle animal pour l'étude de la mémoire déclarative et du système hippocampique : quelques précisions

Eichenbaum (1992) établira son modèle sur la base de la définition des mémoires déclarative et procédurale formulées par Cohen et Squire (1980). La mémoire déclarative peut être définie en termes d'enregistrement des faits de la vie quotidienne qui sont accessibles à la récupération consciente et donnent généralement lieu à une expression verbale ou comportementale. La mémoire procédurale est l'acquisition non consciente d'une réponse et/ou d'une adaptation comportementale qui peuvent être révélées seulement au moyen de mesures implicites de la performance. Ces définitions apparaissent peu constructives pour qui veut étudier ces formes de mémoire chez l'animal. L'obstacle majeur et incontournable est qu'il est évident que les animaux, à la différence des hommes, ne peuvent exprimer leurs souvenirs par des déclarations verbales. Il nous est par ailleurs très difficile d'enregistrer une récupération consciente de souvenirs chez l'animal. Cohen en 1984 va compléter ses définitions par des aspects très utiles pouvant différencier la mémoire déclarative et la mémoire procédurale. Il suggère que « un code déclaratif offre la capacité de *comparer* et d'*opposer* l'information en provenance de différents processus ou de différents systèmes de traitement ; et il donne la capacité de faire des *inférences* à propos de faits déduits de sources de traitement différentes ou de faire des généralisations entre ces faits. A l'inverse, les apprentissages procéduraux reflètent l'acquisition d'habiletés précises, d'adaptations

comportementales ». Eichenbaum retiendra ces propriétés opératoires distinctives de ces deux formes de mémoire pour les généraliser à toute étude portant sur la mémoire animale et plus précisément sur la fonction hippocampique et proposer les mécanismes de représentation sous-tendant la mémoire déclarative.

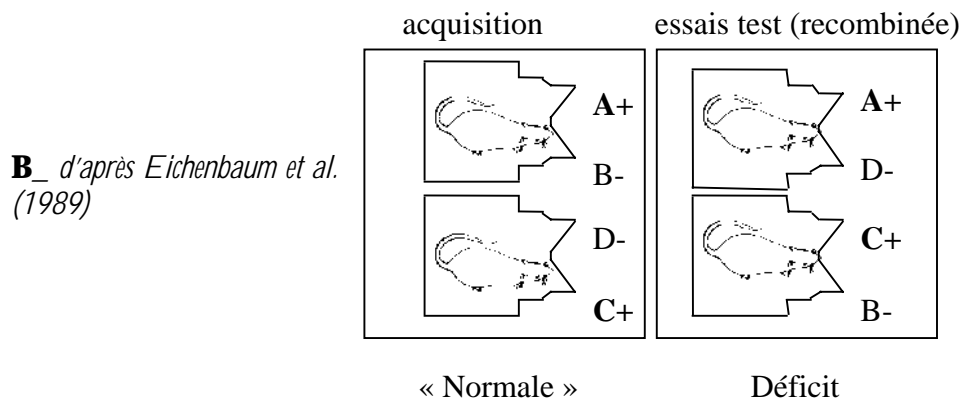
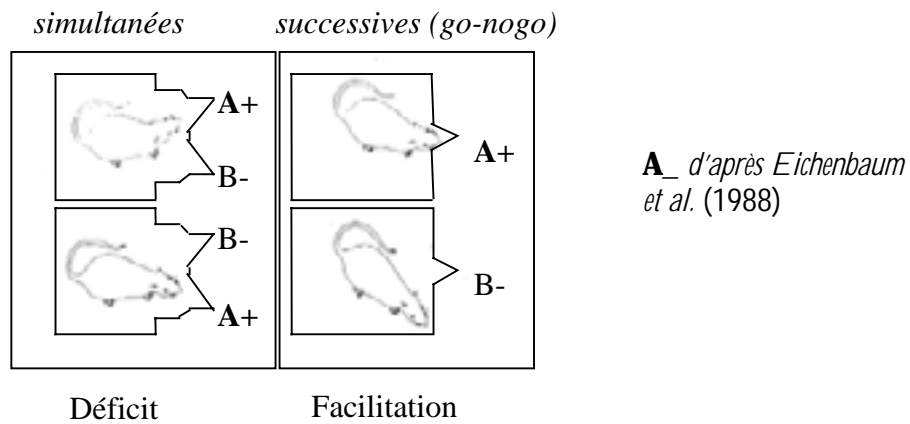
Les processus de mémoire déclarative permettent de comparer et d'opposer les items en mémoire, tandis que la connaissance procédurale ne se résume qu'à une facilitation de routines et ne nécessite pas de tels processus. La mémoire déclarative se caractérise par une flexibilité d'utilisation de ses représentations (capacité d'inférence) dans des situations nouvelles, la mémoire procédurale n'est qu'à la base d'une modification de performance ne pouvant s'exprimer de façon adaptée que dans la situation initiale d'apprentissage.

Les capacités de comparaison et de contraste reposeraient sur l'existence de *représentations relationnelles* élaborées en partie grâce aux propriétés associatives des synapses hippocampiques. En d'autres termes, chaque indice de l'environnement (quelque soit la modalité sensorielle concernée) serait encodé au sein d'un réseau relationnel ; ce qui serait encodé n'est pas uniquement l'information en tant que telle mais également l'ensemble des relations qu'elle entretient avec d'autres informations acquises simultanément ou antérieurement. La combinaison des représentations relationnelles rendue possible par les opérations de comparaison et d'opposition permet la réactivation simultanée d'informations qui n'ont pas été acquises dans le même contexte d'apprentissage et à des temps différents. Cette récupération s'effectue de façon pertinente et adaptée à la situation auquel l'organisme est confronté. Cette capacité souligne la propriété fondamentale de la mémoire déclarative, sa flexibilité d'utilisation. A l'inverse la connaissance procédurale reposerait sur la formation de *représentations individuelles*, isolées en ce sens qu'elles sont seulement encodées dans les modules cérébraux en œuvre lors des traitements perceptifs ou moteurs au cours de l'apprentissage. Ces représentations individuelles sont non flexibles et ne peuvent être réactivées que par les modules cérébraux d'origine et uniquement dans le cadre d'une gamme restreinte de stimuli et des situations dans lesquelles l'apprentissage a pris place. Ces mécanismes de base sont globaux vis à vis des types de matériel encodés par le système hippocampique.

C_ Approche comportementale : une mise à l'épreuve de ses hypothèses

Dans le but de mettre à l'épreuve ses hypothèses, l'équipe d'Eichenbaum (1988, 1989) évalue chez le rat les effets d'une lésion bilatérale du fornix (faisceau de fibres assurant les connexions entre l'hippocampe et les structures sous-corticales) dans différentes variantes d'un paradigme de discrimination d'odeurs au sein desquelles les problèmes posés peuvent être résolus soit sur la base d'associations simples de type S-R ou à l'inverse nécessitent l'utilisation de processus de

contraste, de comparaison et d'inférence, donc l'élaboration de représentations relationnelles. Le principe de ces épreuves est de manipuler les demandes de comparaison et d'opposition entre les mêmes indices olfactifs.



Comme le représente la figure A (Eichenbaum *et al.*, 1988), dans la version de discrimination simultanée dans laquelle deux odeurs (l'une est toujours associée à un renforcement et l'autre ne l'est jamais) sont présentées en même temps, les rats avec lésion du fornix sont durablement déficitaires, alors qu'ils sont facilités dans la version de discrimination successive (ces mêmes odeurs sont présentées séparément d'un essai à l'autre). Dans une variante plus complexe de ce même paradigme (cf., figure B, Eichenbaum *et al.*, 1989), ces mêmes auteurs ont montré que certains de ces animaux porteurs d'une lésion du fornix parvenaient avec beaucoup d'entraînement à apprendre des discriminations simultanées (exemple : A+B- et C+D-) mais étaient incapables de répondre à ces stimuli lorsqu'on leur proposait de nouvelles paires constituées pourtant d'un élément familier renforcé issu d'une paire initialement apprise et d'un élément familier non renforcé d'une autre paire acquise (exemple : B-C+). Ces résultats dans leur ensemble montrent chez le rat que l'intégrité de la formation hippocampique lui est indispensable pour encoder toutes les odeurs, lors de chaque essai et d'un à l'autre, en utilisant un schéma d'organisation (représentations relationnelles) qui permette des comparaisons et des oppositions entre odeurs dont il n'a pas eu l'expérience simultanément. Ces représentations relationnelles

permettent à l'animal d'utiliser les informations apprises initialement dans de nouvelles situations (propriété de flexibilité). A l'inverse, les systèmes de représentations individuelles disponibles malgré la lésion hippocampique sont suffisants pour sous-tendre la reconnaissance d'éléments séparés.

Ces différentes propriétés de représentations relationnelles vont être réexaminées au travers de la littérature déjà existante sur la mémoire humaine et animale, proposant des concepts sans recoupement apparent. Eichenbaum pourtant, dégage une trame commune dans ces propositions. L'encodage des indices spatiaux (O'Keefe et Nadel, 1978 ; O'Keefe, 1991), la formation d'associations configurales (Sutherland et Rudy, 1989), l'élaboration de relations temporelles entre indices séquentiels caractéristique des processus de mémoire de travail défini par Olton (1979) sont des fonctions hippocampiques proposées par de nombreux auteurs. Selon Eichenbaum (1992), ces différents processus impliquant le système hippocampique ont pour point commun de mettre en œuvre des opérations de comparaison et d'opposition d'items en mémoire.

D_ Données neurophysiologiques : les soubassements neurobiologiques

Au vu de ces données, la question qui se pose est de savoir quelles sont les propriétés intrinsèques de l'hippocampe qui font que cette structure cérébrale est particulièrement adaptée à l'élaboration de ces représentations relationnelles. Tout d'abord, l'hippocampe est anatomiquement un lieu de convergence de plusieurs faisceaux de fibres en provenance des cortex cérébraux associatifs intégrant les informations relatives aux différentes modalités sensorielles. Ensuite, l'hippocampe possède des synapses dotées des propriétés associatives (McNaughton *et al.*, 1978) requises pour l'implémentation des représentations relationnelles. Plus précisément, ces différentes caractéristiques de la formation hippocampique permettraient d'associer les informations entre elles, qu'elles soient issues d'une même ou de plusieurs modalités sensorielles, pour les intégrer au sein d'un réseau informatif relationnel (Wallenstein *et al.*, 1998). Des études électrophysiologiques d'enregistrement de l'activité unitaire de neurones hippocampiques (Eichenbaum *et al.*, 1986 ; Wiener *et al.*, 1989) ont montré la présence de cellules qui déchargeaient sélectivement lors de la conjonction ou la combinaison d'odeurs multiples présentées, soit dans des configurations spatiales différentes, soit en séquences temporelles. Dans le paradigme de discrimination successive entre odeurs, Eichenbaum et ses collaborateurs (1986) ont pu observer que des cellules hippocampiques présentait une activité qui dépendait des relations entre indices disponibles lors de l'essai en cours et ceux acquis dans le passé. Des études menées chez des rats engagés dans une tâche spatiale ont montré que certaines cellules hippocampiques déchargeaient sélectivement à des emplacements précis de l'animal dans l'arène,

mais surtout ces patterns de décharge étaient également déterminés par d'autres variables spatiales (Wiener *et al.*, 1989) (vitesse, angle de rotation, direction de l'animal) associées aux activités intentionnelles de l'animal. Pour preuve, l'activité de ces cellules n'est pas modifiée par un appauvrissement en indices de l'environnement (O'Keefe et Conway, 1978), mais est davantage lié à des indicateurs comportementaux du jugement que l'animal a sur sa propre localisation dans l'espace (O'Keefe et Speakman, 1987).

L'ensemble de ces observations suggère que les neurones hippocampiques ont pour propriété commune d'encoder les relations significatives entre indices qu'ils soient spatiaux, temporels ou visuels pourvu que ces relations soient susceptibles d'amener l'animal à émettre une réponse adaptée dans la tâche qui se déroule (Eichenbaum, 1994). Selon Eichenbaum, ces propriétés fonctionnelles de l'hippocampe confirment chacune des prédictions de l'hypothèse de la mémoire déclarative : les propriétés de codage des neurones hippocampiques permettraient de comparer et opposer des informations entre elles pour élaborer les représentations relationnelles utilisables ultérieurement de façon flexible.

Pour plusieurs raisons que nous allons expliciter, le modèle théorique élaboré par l'équipe d'Eichenbaum pour rendre compte de la fonction hippocampique dans l'apprentissage est intéressant à bien des égards.

- Cette théorie a été construite dans un réel souci de modéliser la mémoire déclarative humaine. Ce n'est qu'après avoir dégagé les propriétés essentielles de la mémoire déclarative que ces auteurs les ont opérationnalisées pour pouvoir les étudier chez l'animal. Ce travail théorique a abouti à une définition opérationnelle de la mémoire déclarative : système mnésique permettant de comparer, d'opposer les informations dans un espace mnésique afin d'élaborer des représentations relationnelles de l'ensemble de ces informations pour pouvoir les utiliser de façon flexible dans de nouvelles situations.
- Les dissociations comportementales observées (i.e., dépendance ou non vis à vis de l'intégrité fonctionnelle de l'hippocampe) dans les études visant à mettre à l'épreuve ce modèle sont cohérentes avec les prédictions énoncées. De même, les études électrophysiologiques rendant compte des propriétés fonctionnelles des neurones hippocampiques satisfont aux hypothèses formulées suggérant un rôle de ces cellules dans l'encodage des relations pertinentes entre les informations.
- Les prédictions de ce modèle permettent également de rendre compte de données comportementales menées dans le cadre d'autres théories relatives à la fonction de l'hippocampe dans l'apprentissage. Ce modèle permet de dégager des propositions communes quant au rôle de l'hippocampe dans la fonction mnésique pouvant satisfaire les

théories déjà existantes sur le sujet (mémoire spatiale, mémoire de travail, associations configurales...).

Pour toutes les raisons que nous avons détaillées, ce modèle apparaît l'un des plus puissants pour modéliser chez l'animal les composantes déclaratives de la fonction mnésique et c'est celui que nous utiliserons dans notre travail pour étudier les fonctions mnésiques chez l'animal.

Cette théorie prédit que l'élaboration et l'utilisation des représentations relationnelles repose sur la capacité des neurones hippocampiques à renforcer leurs connections synaptiques. Ces processus neuronaux de plasticité synaptique seraient sous-tendus par des mécanismes cellulaires et moléculaires analogues à ceux mis en évidence dans le phénomène artificiel de PLT. Adopter ce postulat suppose d'examiner au préalable les arguments théoriques et expérimentaux justifiant l'utilisation du modèle de la PLT dans l'étude des processus de plasticité synaptique et des fonctions mnésiques.

VII_ LES MECANISMES CELLULAIRES DES PROCESSUS MNESIQUES : PROCESSUS DE PLASTICITE SYNAPTIQUE ET PLT

A_ Les postulats de base et les principes de Hebb

Notre cerveau est constitué de plusieurs millions de neurones et l'ensemble des activités cognitives qu'il accomplit émerge de l'activité de différents réseaux de neurones.

Hebb en 1949 proposera une théorie qui contribuera largement à notre compréhension sur la façon dont ces réseaux de neurones contribuent à la formation et à la conservation de représentations mnésiques. Cette théorie suppose que (i) la représentation mnésique est élaborée et conservée au sein d'une assemblée cellulaire sélectionnée lors de la perception d'un événement (ii) cette assemblée cellulaire a une activité réverbérante se traduisant par des modifications durables de l'efficacité synaptique et peut expliquer le maintien temporaire de la représentation dans la mémoire active (MCT) (iii) Ce phénomène permet à ce réseau d'être ultérieurement sélectivement réactivé sous la même forme que lors de l'événement perceptif. Hebb formalise cette idée en proposant une synapse dont les propriétés permettraient à un réseau de neurones de construire et de conserver une information tel qu'il l'énonce dans ses postulats.

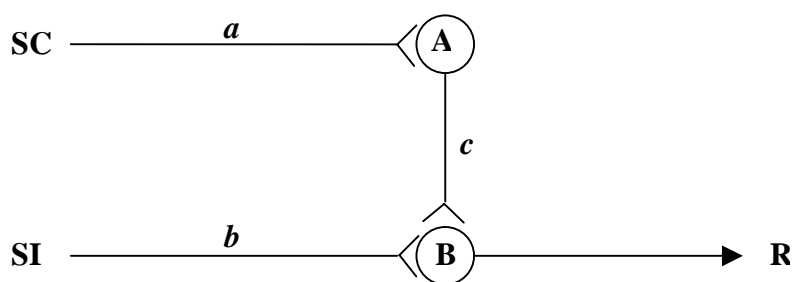
Premier principe de Hebb :

« Quand l'axone d'une cellule *A* peut du fait de sa proximité, exciter une cellule *B* et contribuer ainsi, de façon répétée et persistante à son activation, des processus de croissance ou des changements métaboliques se mettent en place dans l'une des cellules ou dans les deux, et

vont accroître, de façon durable la capacité de *A* à faire décharger *B*. » Ainsi, lorsqu'un troisième neurone *C* déclenche l'activité de *B* de manière inconditionnelle, ce phénomène va induire une décharge synchrone entre *A* et *B*. Cette covariation entre l'activité de *A* et celle de *B* permet l'augmentation de l'efficacité synaptique entre *A* et *B*

Second principe de Hebb :

Ce phénomène de co-variation positive d'activité entre deux neurones peut être transposé entre deux assemblées cellulaires. Lorsque deux réseaux neuronaux sont activés au même moment, ils tendent à s'associer si bien que l'activité de l'un facilite celle de l'autre. Ces propriétés synaptiques seraient « une base possible des mécanismes d'association, en principe une association sensori-sensorielle » (Hebb, 1949). Ces synapses hebbiennes seraient le substrat d'apprentissages associatifs produits par l'existence de relation de dépendance entre au moins deux classes d'événements : entre deux stimuli ou entre un comportement et un événement consécutif (Delacour, 1984, p.218).



Légende : Analogue de conditionnement classique fondé sur une « synapse de Hebb ».

L'application la plus heuristique de ce modèle synaptique est l'explication de la formation d'une nouvelle synapse fonctionnelle (Delacour, 1984). Imaginons que les deux neurones *A* et *B* soient connectés par une synapse *c* inefficace, c'est à dire que la décharge de *A* ne crée au niveau de *B* qu'un potentiel post synaptique infraliminaire. Existe une afférence *a* sur le neurone *A* qui est capable de faire décharger *A* mais pas *B*, existe une afférence *b* sur le neurone *B* capable de faire décharger *B* mais pas *A*. Si les deux afférences *a* et *b* font décharger simultanément et respectivement les neurones *A* et *B* de façon répétée, la connexion *c* entre *A* et *B* peut devenir fonctionnelle si bien que l'afférence *a* sur *A* peut faire décharger *A* mais aussi *B*. Ce modèle est un analogue du conditionnement classique où la stimulation de *a* est l'équivalent du stimulus conditionnel et celle de *b* celui du stimulus inconditionnel.

La question qui se pose est de savoir comment étudier cette forme de plasticité synaptique.

B_ Le modèle de PLT

En 1973, Bliss et Lomo mettaient en évidence pour la première fois une augmentation durable de la neurotransmission des synapses hippocampiques. Plus précisément, ils observaient qu'un court train de stimulation électrique à haute fréquence (« stimulation tétanique ») de la voie perforante, qui projette du cortex enthorinal vers le gyrus dentelé de la région hippocampique, produit une augmentation rapide et durable de l'amplitude des potentiels post-synaptiques (au niveau extracellulaire) enregistrés dans le gyrus dentelé et une diminution du seuil d'induction du potentiel d'action. Ce phénomène qualifié de *potentialisation à long-terme ou PLT* observé dans la formation hippocampique a été une découverte fondamentale car il s'agissait de la première forme de plasticité synaptique mise en évidence chez le mammifère. Bliss et Lomo montrent ainsi que les synapses hippocampiques présentent des propriétés similaires à celles de la synapse fonctionnelle décrite par Hebb. Ces premières études vont stimuler tout un ensemble de recherche portant sur les propriétés et les mécanismes mis en jeu dans la PLT, mais aussi son rôle physiologique dans les processus d'apprentissage.

La caractéristique la plus notable de la PLT est sa durée, on considère qu'il y a potentialisation à long terme lorsque le phénomène perdure au-delà de 30 minutes. Les études menées chez les mammifères ont montré l'existence de PLT pouvant durer des heures, des jours, voire plusieurs mois. Plusieurs formes de PLT existent, celle la mieux caractérisée et la plus étudiée pour son rôle dans l'apprentissage est la PLT NMDA dépendante. La description la plus conventionnelle qui en est faite est la suivante : une stimulation à haute fréquence d'une voie afférente glutamatergique va induire une dépolarisation de la cellule post-synaptique par activation des récepteurs AMPA, cette dépolarisation initiale associée à la fixation du glutamate sur les récepteurs-canaux NMDA vont induire une ouverture des canaux et une entrée de Ca^{2+} dans le neurone post-synaptique ; cette augmentation de Ca^{2+} intracellulaire va entraîner l'activation de diverses molécules de signalisation incluant les kinases responsables de changements durables au niveau post-synaptique (ex : augmentation du nombre de récepteurs NMDA et de leur sensibilité) et/ou pré-synaptique (ex : augmentation de la libération de neurotransmetteurs), ces altérations vont conduire à une facilitation de la transmission synaptique.

La PLT va être étudiée comme modèle des processus de plasticité synaptique potentiellement associés à l'apprentissage associatif. De nouvelles interrogations vont alors émerger au sein des Neurosciences Cognitives. La PLT est une forme de plasticité synaptique totalement artificielle, dans quelle mesure présenterait-elle des propriétés communes avec les phénomènes de plasticité synaptique supposés sous-tendre la formation et la conservation des informations en mémoire ?

C_ Quelles sont les propriétés de la PLT NMDA-dépendante qui en font un modèle d'étude des phénomènes de plasticité potentiellement requis dans l'apprentissage ?

Tout d'abord la PLT satisfait aux critères énoncés par Hebb : la PLT correspond parfaitement aux mécanismes de base de la synapse hebbienne dans la mesure où elle reflète l'activité coïncidente de deux neurones et un phénomène de facilitation dans la capacité qu'a un neurone à faire décharger l'autre. Lynch et Granger (1994) proposent une liste de propriétés communes entre un système mnésique et le phénomène de PLT.

- La PLT peut être associative. Cette propriété est mise en évidence par le fait qu'une voie « faiblement active » ne peut être potentialisée que si, et seulement si, une autre voie « dite forte » convergeant sur la même région dendritique est activée en même temps.
- C'est un processus synaptique défini par ses propriétés de coopérativité puisqu'elle ne peut être induite que si un nombre suffisant de neurones sont activés simultanément. En ces termes elle peut constituer le mécanisme cellulaire dont émergent les apprentissages associatifs.
- La PLT est spécifique des synapses sollicitées par la stimulation, dans la mesure où son induction, dans une série de contacts qu'a une cellule, ne perturbe pas d'autres contacts ; les études théoriques indiquent qu'une telle propriété peut mener à une très grande capacité, caractéristique commune à un système mnésique.
- La PLT, tout comme la capacité d'encodage d'une information nouvelle par un système mnésique, s'établit en quelques secondes.
- La PLT est un phénomène électrophysiologique qui persiste sans modification majeure pendant des semaines, on retrouve dans un système mnésique cette capacité à former des encodages persistants.
- Comme la mémoire, la PLT a une phase de consolidation vulnérable d'au moins plusieurs minutes.
- Finalement, l'argument le plus persuasif est que la PLT est un phénomène qui peut s'engendrer naturellement et dans des situations physiologiques dans la mesure où il peut être induit de façon optimale par une stimulation comparable au rythme thêta enregistré dans le cerveau de mammifères (Larson and Lynch, 1988).
- A un niveau d'analyse plus mécanistique, de nouvelles propriétés communes émergent. La PLT est dépendante des récepteurs NMDA et ces récepteurs sont très exprimés au niveau de la formation hippocampique. Par ailleurs, de nombreuses études électrophysiologiques ont montré l'existence de plusieurs formes de PLT très robustes

au niveau des synapses hippocampiques, or la formation hippocampique est connue pour être indispensable dans les apprentissages associatifs.

Comme nous l'avons décrit, le phénomène de PLT NMDA-dépendante partage des propriétés communes avec les capacités d'apprentissage et satisfait aux critères de la synapse hebbienne, on peut donc raisonnablement accepter le postulat que la synapse hebbienne constitue le substrat des apprentissages associatifs.

En d'autres termes nous pouvons dégager deux postulats généraux et majeurs :

1. des modifications durables d'efficacité synaptique sont induites dans des synapses appropriées lors de la formation d'une représentation mnésique et seraient nécessaires et suffisantes pour la conservation de cette représentation mnésique (Martin *et al.*, 2000).
2. Ces modifications d'efficacité synaptique liées à l'apprentissage seraient sous-tendues par des mécanismes moléculaires similaires à ceux mis en jeu dans le phénomène de PLT.

Plusieurs formes de PLT ont été découvertes dans le cerveau : dans l'hippocampe (Bliss et Lomo, 1973), mais aussi au niveau cortical (Artola and Singer, 1987), ou encore dans l'amygdale (Clugnet et LeDoux, 1990). Nous aborderons ici, exclusivement et brièvement la PLT hippocampique pour examiner son rôle potentiel dans les mécanismes physiologiques sous-tendant certaines formes de mémoire. Le sujet est vaste et un certain niveau d'expertise en électrophysiologie semble nécessaire pour juger du bien fondé méthodologique et théorique des études portant sur ces questions. Notre compétence en la matière n'étant que très limitée, nous nous contenterons de mentionner certaines études électrophysiologiques, pharmacologiques et comportementales mis en œuvre pour préciser ce rôle ou tout du moins pour tenter de le valider. La revue de Martin et collaborateurs (2000) rend compte de façon complète et détaillée de l'ensemble de ces travaux.

D_ Examen de l'hypothèse PLT-Mémoire

1°/ Premier postulat : données expérimentales relatives aux modifications d'efficacité synaptique lié à l'apprentissage.

Le postulat de base est que l'apprentissage induirait des modifications d'efficacité synaptique reposant sur des mécanismes similaires à ceux qui sous-tendent la PLT. Des études électrophysiologiques visant à tester ces hypothèses ont montré l'existence de modifications des potentiels évoqués, des potentiels d'action globaux et/ou des potentiels d'action unitaires dans l'hippocampe (gyrus denté) d'animaux soumis à des épreuves d'apprentissage associatif (Sharp *et al.*, 1989 ; Vanderwolf et Cain, 1994). Il semblerait que certaines formes d'apprentissage associatif pourraient induire des modifications électrophysiologiques de type PLT, d'où l'appellation de

PLT-like. Il s'est par la suite avéré que ces modifications étaient aspécifiques car pouvaient être également induites par l'activité locomotrice (Vanderwolf et Cain, 1994). D'autres expériences ont permis de dissocier des altérations des potentiels évoqués, induites d'une part par des activités ne relevant pas directement des processus d'apprentissage et d'autre part par les processus cognitifs à part entière, sollicités dans une épreuve d'exploration (Green *et al.*, 1990). Ces changements durables de l'excitabilité synaptique induits par l'activité exploratoire a été nommée STEM : Short-Term Exploratory Modulation. Ce phénomène peut demeurer stable encore 2 à 3 jours après l'apprentissage. Néanmoins à nouveau, cette facilitation synaptique n'est pas spécifique ; elle résulterait d'une augmentation de la température cérébrale de l'animal (Moser *et al.*, 1993) et non de l'acquisition des connaissances acquises.

Une étude menée au laboratoire amène des arguments définitivement convaincants face à cette critique. Ces travaux (Jaffard *et al.*, 1996) montrent une modification durable post-apprentissage de l'excitabilité de la voie hippocampo-septale différentielle selon le type de tâche à laquelle la souris est soumise dans le labyrinthe radial. Les animaux soumis à une épreuve évaluant la mémoire de référence présentaient une augmentation durable de l'excitabilité hippocampo-septale, forme de potentialisation se mettant en place progressivement au cours de l'apprentissage et positivement corrélé aux performances mnésiques dans les essais test. Les souris soumises quant à elles à une épreuve de mémoire de travail présentaient une diminution durable de l'excitabilité de cette voie, une forme de dépression à long terme. Cette étude montre que les modifications durables de l'excitabilité de la voie hippocampo-septale sont liées à l'apprentissage et plus précisément aux demandes cognitives de ces épreuves et donc ne peuvent être expliquées par d'autres facteurs tels que la température cérébrale.

Dans l'ensemble, ces données montrent que l'apprentissage peut dans certaines conditions des modifications persistantes de l'excitabilité de certaines synapses hippocampiques. Ces phénomènes mis en évidence, la question qui s'impose est la suivante. Quelle est « la signification fonctionnelle » de cette facilitation synaptique induite par l'apprentissage ?

Il apparaît peu probable que cette forme de PLT « naturelle » constitue au niveau cellulaire le mécanisme de codage de l'information. Certains auteurs ont suggéré que ces formes de plasticité spécifiques de la formation et de la conservation d'une information étaient très difficiles à détecter si l'on adopte la théorie des matrices associatives proposée par Marr (1971) qui considère que l'apprentissage induit des changements synaptiques très restreints au sein de populations de neurones (synapses) plus ou moins distribués. Il serait très difficile de les enregistrer par des techniques électrophysiologiques manquant de précision, comme celle d'enregistrement extracellulaire. Par conséquent, les PLT-like enregistrées lors des différents apprentissages associatifs ne refléteraient pas la construction de représentations internes à proprement parler. Jaffard en 1995 qualifie ces modifications d'efficacité synaptique lié à l'apprentissage de

potentialisation « non informationnelle » ou « modulatrice » qui se développe de façon massive, dans (ou entre) des structures qui ne sont pas forcément des supports neuroanatomiques de l'information stockée. Cette PLT modulatrice interviendrait dans l'organisation temporaire du « système de mémoire » le plus adapté à une situation expérimentale donnée (Jaffard, 1995). L'expérience mentionnée plus haut (Jaffard *et al.*, 1996) illustre parfaitement ces propositions théoriques.

La seconde question est de savoir si la plasticité synaptique induite par l'apprentissage est sous-tendue par les mêmes mécanismes moléculaires que ceux qui sous-tendent la PLT. A ce jour, les mécanismes moléculaires sous-tendant cette forme de plasticité synaptique apprentissage-dépendante sont inconnus.

2°/ Approche indirecte : Si la PLT constitue le mécanisme cellulaire de l'apprentissage, alors un facteur X perturbant les mécanismes de la PLT devrait avoir une incidence sur les performances mnésiques.

Expériences de saturation des synapses hippocampiques

Une façon d'aborder le problème des relations PLT/processus mnésiques est de procéder à des saturations des synapses considérées et d'en observer les effets sur l'apprentissage. Si l'élaboration et la conservation des informations par un organisme, soumis à une situation expérimentale donnée, est sous-tendue par des mécanismes cellulaires comparables à ceux de la PLT, alors la saturation de ces mécanismes cellulaires (par induction d'une PLT après stimulation à haute fréquence) devrait perturber ces opérations.

Adoptant ces hypothèses, Berger (1984), sur la base d'études préalables montrant l'existence de modifications de l'activité des cellules pyramidales corrélées à l'acquisition progressive d'un conditionnement classique de la membrane nictitante, va évaluer les effets d'une PLT induite dans l'hippocampe sur l'acquisition de ce conditionnement. Ainsi, une PLT induite unilatéralement dans la voie perforante va ultérieurement faciliter le conditionnement de la membrane nictitante chez le lapin. Parallèlement de nombreuses études montrent que ce conditionnement ne requiert pas la totalité de l'hippocampe. Ces observations peuvent être expliquées par les propositions théoriques de Jaffard et Meunier (1993 ; voir section plus haut « les limites de la notion de systèmes mnésiques ») sur la fonction hippocampique dans le conditionnement classique, à savoir que la saturation des synapses hippocampiques aurait pour effet de neutraliser le fonctionnement du système hippocampique qui, chez l'individu normal placé dans la même situation expérimentale interagirait de façon négative avec le système cérébelleux supportant les processus d'association élémentaire requis dans le conditionnement classique. En d'autres termes, les modifications de la plasticité hippocampique s'établissant potentiellement au cours du conditionnement classique de la membrane nictitante serait dévolue

à la sélection de configurations cérébrales adéquates à ce type d'apprentissage (inhibition du système hippocampique parasite et activation du système cérébelleux).

Parallèlement, des études ont évalué les effets d'une saturation des synapses hippocampiques sur l'acquisition d'apprentissages dépendant de l'intégrité fonctionnelle de l'hippocampe. McNaughton et ses collaborateurs (1986) ont montré qu'une PLT saturante induite de façon bilatérale sur les projections de la voie perforante entraîne un déficit dans une tâche d'apprentissage spatial, que cette PLT soit administrée avant ou juste après l'apprentissage. Ces effets délétères de la PLT saturante sur l'apprentissage spatial vont être observés également dans la piscine de Morris par Castro *et al.* (1989). Néanmoins, les expériences ultérieures (Cain *et al.* 1993 ; Jeffrey et Morris, 1993) ne reproduiront pas les effets observés précédemment et rejetteront les conclusions de Castro et collaborateurs (1989). Selon Carol Barnes (1995), l'inconstance des données résulte du fait que les PLT provoquées ne saturent pas forcément tout le système cérébral ciblé, si bien que certaines synapses sont encore fonctionnelles et peuvent suffire pour supporter un apprentissage. L'équipe de Moser en 1998, utilisera des rats porteurs d'une lésion unilatérale de l'hippocampe et pratiquera la PLT saturante sur l'autre hippocampe intact, il s'assurera de l'efficacité de la saturation en vérifiant après apprentissage l'absence de PLT sur les synapses ciblées en utilisant une électrode et un site de stimulation différents de ceux utilisés pour induire la PLT saturante. Il a ainsi été montré que parmi les rats ayant reçu des stimulations hippocampiques à haute fréquence, seuls ceux dont les synapses ciblées sont dans leur totalité saturées présentent un déficit d'apprentissage dans la version spatiale de la piscine de Morris. Ces travaux ont conduits les auteurs à la conclusion qu'il existerait au sein de la formation hippocampique des synapses aux propriétés associatives similaires dont les modifications d'activité persistantes permettraient la construction et la conservation d'une carte cognitive spatiale et ces phénomènes de plasticité seraient sous-tendus par les mêmes mécanismes que la PLT. Finalement, cette interprétation s'est trouvée définitivement ébranlée par une étude réalisée par Otnaess et collaborateurs, en 1999. Plus précisément, cette étude montre que les effets délétères de la PLT saturante sur l'apprentissage spatial disparaissent si les animaux ont été initialement soumis à un pré-apprentissage spatial dans une piscine de Morris différente que celle utilisée lors du test.

Les données issues de ces études de saturation ne permettent pas à ce jour de fournir les preuves expérimentales irréfutables montrant que les apprentissages dits hippocampe-dépendants sont sous-tendus par des mécanismes synaptiques identiques à ceux de la PLT NMDA-dépendante, ou plus précisément, que ces mécanismes sous tendraient les opérations de stockage et de conservation des informations spatiales.

Etudes corrélatives : performances mnésiques et PLT, les études sur le vieillissement.

Des travaux menés par l'équipe de Barnes (1979) et McNaughton (1985) ont montré que le vieillissement est associé à un déficit de maintien de la PLT et ce déficit est significativement corrélé avec l'atteinte mnésique dans des tâches évaluant la mémoire spatiale. De nombreuses études confirmeront par la suite ces résultats. Ces études, comme l'indique Martin et collaborateurs (2000), sont corrélatives, et en cela ne nous fournissent aucune information quant aux liens pouvant exister entre ces déficits, mnésique d'une part et synaptique (PLT) d'autre part. Elles apportent cependant un élément d'information encourageant et cohérent avec l'hypothèse d'un rôle de la PLT dans certaines formes de mémoire impliquant la formation hippocampique.

Les données pharmacologiques : les antagonistes NMDA

Des études pharmacologiques ont tenté, à leur tour, de montrer une similitude entre les mécanismes cellulaires qui sous-tendent, d'une part la PLT et d'autre part l'apprentissage. L'objectif est de prouver que ces deux phénomènes dépendaient des mêmes mécanismes moléculaires. La plupart des études ont pour cela montré que l'administration intra-hippocampique d'antagonistes des récepteurs NMDA (dont l'AP5) même à des doses nanomolaires s'accompagne de déficits mnésiques dans des épreuves qualifiées d'hippocampe-dépendantes (Morris *et al.*, 1986 ; pour revue voir Danysz *et al.*, 1995). Le degré d'atteinte mnésique est dose dépendante et est observé dans une gamme de concentration de drogue analogue à celle utilisée pour observer un blocage de la PLT *in vivo* et *in vitro* (Davis *et al.*, 1992). De même, des molécules dont l'administration facilite la PLT, améliorent également certains apprentissages (Lynch *et al.*, 1998). Ces résultats dans leur ensemble sont à considérer avec beaucoup de prudence. Tout d'abord, ces études ne démontrent en aucun cas une relation directe entre les mécanismes neurobiologiques sous-tendant l'apprentissage et la PLT, les interprétations qui en sont données sont inférentielles : ces drogues peuvent agir sur des processus neuronaux autre que ceux de type PLT et qui peuvent être responsables des effets comportementaux observés.

Le point de discordance actuel porte sur la spécificité cognitive de ces altérations comportementales induites par l'administration d'antagonistes NMDA. La critique majeure serait que les effets induits par ces drogues concerneraient davantage les fonctions sensori-motrices. Une étude (Cain *et al.*, 1996) montre que le déficit d'apprentissage dans la piscine de Morris, après administration d'AP5 est corrélée (donc consécutive à) avec le degré d'atteinte de la fonction sensori-motrice. Cette interprétation est cohérente avec une expérience menée par cette même équipe (Saucier et Cain, 1995) montrant que le déficit d'apprentissage spatial normalement induit

par l'administration d'AP5 disparaît si les rats ont été initialement familiarisés aux procédures générales de l'épreuve par un préapprentissage dans sa version non-spatiale (plate-forme visible).

A l'inverse, l'équipe de Morris montre que l'AP5 n'induit effectivement pas de déficit dans cet apprentissage lorsque les rats sont auparavant entraînés dans une piscine même lorsqu'elle est située dans un environnement différent, néanmoins le déficit est observé si le pré-entraînement est non spatial, c'est à dire dans une piscine située dans un lieu différent mais sans indices spatiaux (Bannerman *et al.*, 1995). Selon ces auteurs, le blocage des RNMDA permettrait de dissocier deux composantes cognitives : le déficit observé concernerait le développement de la stratégie cognitive nécessaire à l'élaboration de la carte spatiale plus que la constitution de la carte en elle-même.

L'étude des effets comportementaux des antagonistes des RNMDA n'est encore que partielle et nécessite de nombreuses vérifications avant d'amener de solides interprétations. La tâche n'est pas facile et est directement liée à toutes les difficultés d'interprétations des déficits comportementaux observés. Les épreuves d'apprentissage spatial en piscine de Morris sont d'une extrême complexité car ils sollicitent différentes composantes cognitives, selon les protocoles utilisés, l'épreuve peut révéler davantage tel ou tel processus mnésique (Martin *et al.*, 2000).

Nous mentionnerons pour terminer cette section, les études menées sur les cellules de lieu. Des études émergent aujourd'hui pour montrer que l'administration d'antagonistes NMDA affectent l'activité des cellules de lieu. Kentros et collaborateurs en 1998 montrent que l'administration d'antagoniste NMDA ne modifie pas « l'acquisition » des cellules de lieu, mais ces patterns de décharge spécifique liés à la position de l'animal dans l'espace sont instables au cours du temps ; cette drogue affecterait la stabilité temporelle de l'activité position-dépendante des cellules de lieux. Une étude plus récente apporte des résultats cohérents avec cette première observation (Ekstrom *et al.*, 2001). Ces travaux suggèrent que la stabilité à long terme de l'activité hippocampique des cellules dépendraient de processus neuronaux NMDA-dépendants communs à l'apprentissage spatial et à la PLT.

Conclusion : Les postulats initiaux supposaient que (i) des modifications durables d'efficacité synaptique sont induites dans des synapses appropriées lors de la formation d'une représentation mnésique et seraient nécessaires et suffisantes pour la conservation de cette représentation mnésique (ii) ces processus de plasticité seraient analogues à ceux mis en évidence au travers du modèle de PLT NMDA-dépendante. Face à ces hypothèses, aucune des études que nous avons rapportées, ni prises isolément, ni collectivement n'apportent de démonstrations irréfutables et définitives. Néanmoins dans l'ensemble, les résultats observés restent cohérents avec ces postulats de base ou, tout du moins n'apportent pas d'arguments permettant définitivement de les rejeter. L'utilisation du modèle de la PLT est par ailleurs partagée par une bonne majorité des

neurobiologistes se préoccupant des bases cellulaires de l'apprentissage et de la mémoire. Ce modèle présente certes de nombreuses limites : le phénomène est artificiel, les connaissances, portant sur ses composantes et les mécanismes moléculaires associés, sont issues d'études *in vitro*, sa signification physiologique n'a jamais été réellement prouvée. Néanmoins, ce modèle apparaît encore puissant pour formaliser et expliciter des hypothèses relatives aux processus neuronaux et aux mécanismes moléculaires associés, sous-jacents à l'apprentissage et à la fonction mnésique. Et dans l'état actuel de nos connaissances sur la neurobiologie de la mémoire et des outils d'investigation mis à notre disposition, sa valeur heuristique l'emporte sur ses limites.

DEUXIEME PARTIE

LE CERVEAU ET LES RETINOÏDES

La notion de vitamine A est connue depuis fort longtemps : dès l'antiquité, les déficits d'adaptation visuelle au crépuscule étaient guéris par l'application sur l'œil de jus de foie. L'évolution des connaissances sur la vitamine A a conduit aujourd'hui à l'idée que ce micronutriment est fondamental pour les grandes fonctions physiologiques de l'organisme humain. Notons quelques grandes dates. En 1913, Mac Collum identifia dans l'huile de foie de morue et dans le beurre une fraction liposoluble qu'il dénomma : facteur A. Il établit la relation entre la xérophtalmie et la carence en cette vitamine. Wald en 1968, précise le rôle du rétinol et de son dérivé le rétinol dans la chaîne métabolique qui aboutit à la vision. Finalement, la découverte majeure réside dans l'identification des récepteurs nucléaires aux métabolites de la vitamine A (les rétinoïdes) par les équipes de Chambon (Petkovich *et al.*, 1987) et d'Evans (Giguère *et al.*, 1987). Cette découverte, de même que la synthèse artificielle d'agents chimiques aux propriétés analogues aux rétinoïdes permettra de franchir un pas important dans la connaissance des mécanismes d'action nucléaire de la vitamine A et de ses vertus thérapeutiques. Ce travail représente une nouvelle étape dans l'élucidation d'une énigme, celle des rétinoïdes et plus précisément de leurs rôles physiologiques dans le cerveau adulte.

I_ LA VITAMINE A : QUELQUES GENERALITES

A_ Propriétés physico-chimiques de la vitamine A et des rétinoïdes

Le terme de « vitamine A » est un terme générique désignant l'ensemble des composés structurellement apparentés à l'activité biologique vitaminique A. A l'origine des travaux, le terme de rétinoïdes regroupait les composés naturels suivant: le rétinol, le rétinol et leurs dérivés acides (tout-*trans*, et 13-*cis* rétinoïque). Puis de nouveaux métabolites ont été découverts dont l'acide 9-*cis* rétinoïque (Levin *et al.*, 1992), l'acide 3,4-didéhydrorétinoïque (Thaller et Eichelle,

1990) et le 14-hydroxy-rétro-rétinol (Buck *et al.*, 1991). Parallèlement, des rétinoïdes de synthèse ont été développés. Sporn et Roberts en 1985 propose une nouvelle définition fonctionnelle des rétinoïdes : « Un rétinoïde peut être défini comme une substance qui peut induire des réponses biologiques spécifiques en se liant puis en activant un ou plusieurs récepteurs spécifiques, dont le programme pour la réponse biologique de la cellule cible est constitué plus par le récepteur au rétinoïde que le ligand lui-même. » Les rétinoïdes regroupent donc le rétinol et ses dérivés et les substances de synthèse agonistes des récepteurs.

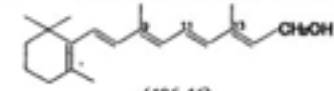
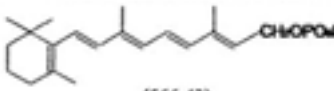
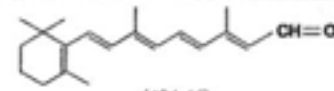
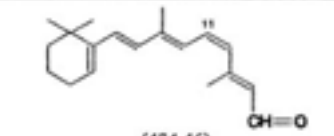
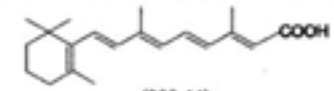
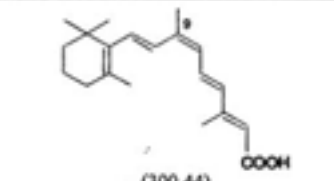
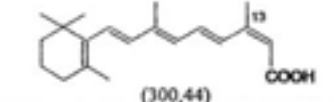
Nom	Formule (Masse Moléculaire)
tout <i>trans</i> -rétinol	 (486,46)
Phosphate de rétinyle	 (566,43)
<i>Trans</i> -rétinal	 (484,46)
11- <i>cis</i> -rétinal	 (484,46)
Acide tout <i>trans</i> -rétinoïque	 (300,44)
Acide 9- <i>cis</i> -rétinoïque	 (300,44)
Acide 13- <i>cis</i> -rétinoïque	 (300,44)

Tableau récapitulatif des différents métabolites de la vitamine A

La vitamine A est composée de quatre structures isoprénoïdes qui déterminent sa liposolubilité. Ainsi le rétinol, soluble dans tous les solvants organiques, est insoluble dans l'eau et les milieux hydrophiles. La fonction alcool primaire permet par oxydation enzymatique l'obtention de deux composés biologiquement actifs : le rétinal et l'acide rétinoïque (AR). L'estérification de cette fonction alcool par des acides gras à longue chaîne permet également l'obtention des esters de rétinyle (c'est sous cette forme qu'est apportée la vitamine A d'origine animale). La présence de doubles chaînes latérales permettent une isomérisation *cis-trans* qui

donne aux molécules obtenues une spécificité d'action, ainsi le rétinol 11-*cis* est la molécule-clé du processus de vision.

L'apport en vitamine A dans l'organisme est réalisé sous deux formes : les esters de rétinyle et les provitamines A. Les esters de rétinyle surtout présents sous forme de palmitate se rencontrent préférentiellement dans les aliments d'origine animale : les huiles de foie de poisson (morue, flétan etc...) et les foies d'animaux en sont très riches, on en trouve notablement dans les produits laitiers et le jaune d'œuf. Les provitamines A sont essentiellement fournies par les végétaux : fruits, légumes verts et carottes. Parmi les très nombreux caroténoïdes, seule une cinquantaine ont une activité provitaminique, le plus connu est le β -carotène.

B_ Les Protéines vectrices de la vitamine A et des rétinoïdes

Dans l'organisme, le rétinol et/ou ses dérivés sont transportés et véhiculés tant au niveau plasmatique que cellulaire vers les sites cibles, par des protéines vectrices qui les protègent des milieux hydrophiles et préservent les membranes cellulaires de la toxicité de la vitamine A (Blomhoff, 1994). Certaines de ces protéines servent également de support pour le métabolisme oxydatif.

La *protéine porteuse plasmatique ou RBP* est synthétisée essentiellement par le foie, mais aussi par le rein et de nombreux autres tissus. Elle possède un site de liaison au rétinol et assure à l'état normal le transport de 95 % du rétinol plasmatique.

Les protéines cellulaires sont quant à elles synthétisées par les cellules utilisatrices de la vitamine A. La *CRBP ou « cellular retinol binding protein »* existent sous deux formes. La CRBPI a une expression ubiquitaire (foie, cerveau, rein, poumons...), elle possède un site de liaison au rétinol et est impliquée dans le stockage et l'oxydation du rétinol en AR via le rétinol (Ong *et al.*, 1982 ; Carson *et al.*, 1984 ; Posch *et al.*, 1991, 1992). A l'inverse, la CRBPII est exclusivement exprimée dans la partie basale et apicale des cellules intestinales. Cette dernière est impliquée dans la régulation de l'absorption intestinale (Crow & Ong ; 1985). La *CRABP ou « cellular retinoic acid binding protein »* lie l'AR. La CRABPI fixe avec la même affinité l'AR tout-*trans* et l'AR 13-*cis* ; elle serait impliquée dans la régulation de la disponibilité de l'AR pour ses récepteurs nucléaires, notamment en empêchant l'accès de cet acide au noyau (Boylan & Gudas, 1991) ou au contraire en assurant son transport (Takase *et al.*, 1986 ; Gustafson *et al.*, 1996). La CRABPII lie exclusivement la forme tout-*trans* et serait quant à elle impliquée dans le catabolisme de l'AR (Fiorella & Napoli, 1991). Ces protéines présentent un degré important de conservation au travers de l'échelle phylogénétique et sont considérées aujourd'hui comme les supports de conversion de l'AR tout-*trans* en d'autres dérivés acides.

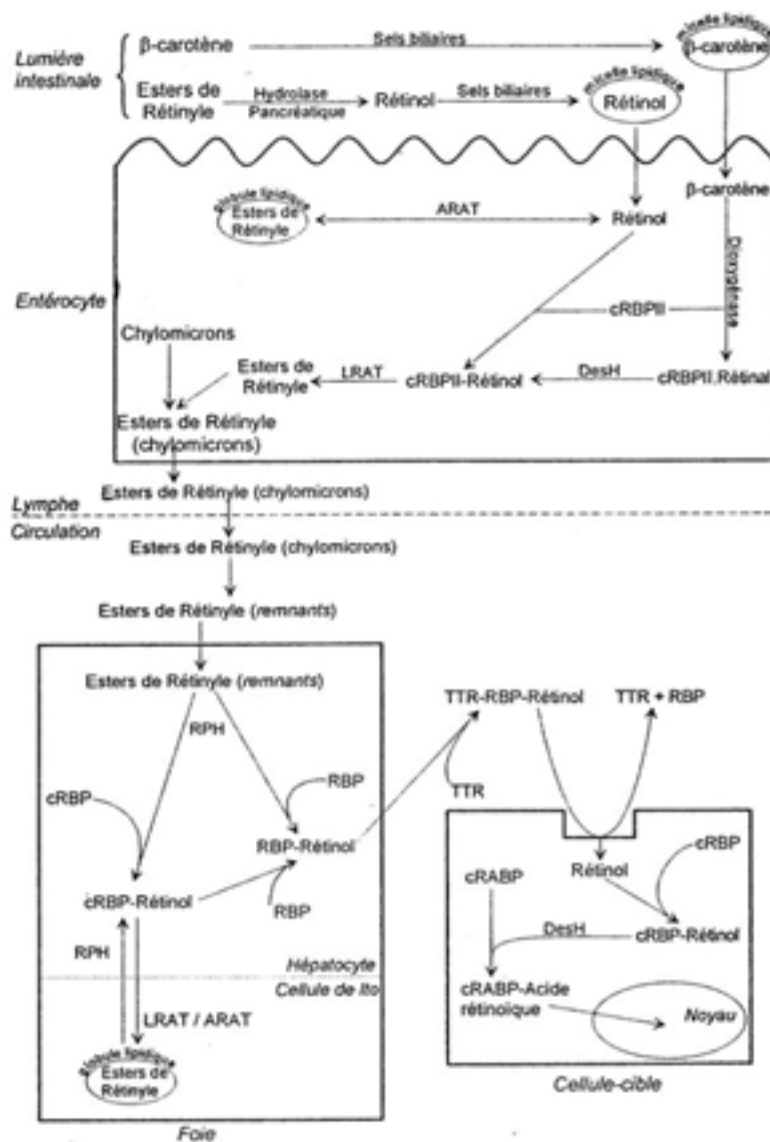
C_ Métabolisme et stockage de la vitamine A

La vitamine A absorbée au niveau de l'intestin proximal, va suivre deux circuits d'utilisation en fonction des besoins physiologiques : soit elle est captée par les cellules hépatiques pour être stockée, soit elle est directement utilisée dans divers tissus (cf. schéma, p. 61).

Le foie constitue la plaque tournante du métabolisme et du stockage de la vitamine A. Chez des sujets normaux, le foie stocke près de 90% des réserves en vitamine A de l'organisme : le rétinol pris en charge par une CRBP est stocké sous forme de rétinyl palmitate à l'intérieur des globules lipidiques des cellules de Ito. De ces réserves, le rétinol sera remobilisé selon les besoins de l'organisme (grâce à un signal, une concentration d'AR ou d'apo-RBP élevé). Il forme alors un complexe avec l'apo-RBP pour pénétrer dans la circulation sanguine. Ces voies métaboliques sont communes au foie, à l'intestin et à la glande surrénale. L'oxydation du rétinol par différentes oxydases et deshydrogénases du foie et de l'intestin, est capitale car l'AR ne peut être stocké.

Le rétinol libéré sous forme de holo-RBP sera évacuée dans la circulation sanguine en formant un complexe avec la transthyréline (TTR), qui lie par ailleurs les hormones thyroïdiennes. Au niveau des cellules cibles, ce complexe rétinol-RBP-TTR se fixe au niveau de récepteurs membranaires spécifiques. Ces récepteurs reconnaissent la RBP, le rétinol traverse la membrane cellulaire et l'apo-RBP perd alors son affinité pour la TTR et est filtré par le glomérule, dégradé et excrété au niveau du rein. Le rétinol capté par la cellule est pris en charge par un ou plusieurs transporteurs cellulaires spécifiques, les RBP cytoplasmiques (CRBP). Une fraction du rétinol va être oxydé grâce à des deshydrogénases (DesH) en rétinol puis en AR qui est ainsi transporté jusqu'à son site d'action : le noyau cellulaire. Son mode d'action sera abordé ultérieurement dans un paragraphe réservé à cet effet. L'autre fraction du rétinol (environ 80%) est recyclée pour retourner dans la circulation générale. Par ailleurs, la demi-vie relativement courte de l'holo-RBP (11-12 h.) et l'important recyclage du rétinol dans les tissus périphériques attestent de processus homéostatiques importants régulant les échanges de rétinol entre le foie, le sang et les différents tissus.

La vitamine A se retrouve dans tous les tissus. Le foie comme nous l'avons déjà mentionné est l'organe le plus riche (90%) mais on en trouve aussi de fortes concentrations dans le rein et l'épithélium pigmenté de la rétine. De plus faibles quantités sont présentes dans le pancréas, l'intestin et les organes de reproduction. Enfin, il est également présent en quantité importante dans le cerveau.



Légende : Voies d'absorption et de métabolisme de la vitamine A

II_ LES RETINOÏDES ET LEUR ACTION NUCLEAIRE

Bien que le rôle de la vitamine A soit en partie élucidé depuis déjà un demi-siècle (notamment son rôle dans la vision par le prix Nobel Wald, en 1968), que les effets physiologiques d'une hypervitaminose ou d'une carence en vitamine A soient connus, il a fallu attendre la fin des années 80 et le clonage des récepteurs nucléaires de l'AR pour débiter un vaste champ d'investigation scientifique visant à préciser les mécanismes d'action génomique de ces composés. Ces études récentes ont montré tout d'abord que le noyau cellulaire était le site d'action des rétinoïdes naturels. Excepté dans le cas de la vision, les mécanismes par lesquels les rétinoïdes exercent leur action, sont en effet génomiques. Ils présentent la formidable faculté de

réguler (positivement ou négativement) l'expression de nombreux gènes. La palette de gènes régulés par les rétinoïdes est très large, ce qui explique la variété de fonctions physiologiques dans lesquelles ils interviennent.

A_ Le modèle hormonal

L'action de l'AR par l'intermédiaire de leurs récepteurs nucléaires est comparable aux actions bien connues de nombreuses hormones telles que les hormones thyroïdiennes, les glucocorticoïdes ou les œstrogènes. A l'inverse des peptide-hormones hydrosolubles et des facteurs de croissance connus pour se fixer sur des récepteurs membranaires, les hormones liposolubles sont capables de traverser la couche lipidique des membranes cellulaires pour se fixer sur leurs récepteurs nucléaires. Le postulat majeur stipule que l'hormone induit un changement allostérique du récepteur et ce complexe est alors capable de se fixer avec une forte affinité sur des sites spécifiques du promoteur de certains gènes et en module ainsi l'activité transcriptionnelle.

Les recherches menées ces 20 dernières années ont permis d'isoler, de purifier et ainsi d'identifier ces différents types de récepteurs. Une analyse comparative de leur structure a conduit à révéler l'existence d'une même super famille de facteurs de transcription incluant les récepteurs aux hormones thyroïdiennes, aux stéroïdes, aux métabolites de la vitamine A et D. Ces récepteurs résident pour la majorité dans le noyau. La fixation du ligand sur son récepteur induit une modification de la conformation du récepteur, une possibilité de dimérisation, et une liaison à des sites spécifiques sur l'ADN.

B_ Les récepteurs nucléaires

L'étude des mécanismes d'action nucléaire des rétinoïdes a débuté dans les années 80 avec le découverte des premiers récepteurs nucléaires.

Les RAR

Il faut attendre 1987 pour que les équipes de Chambon (Petkovitch *et al.*, 1987) et d'Evans (Giguère *et al.*, 1987) découvrent conjointement le premier véritable récepteur de l'AR humain, l'hRAR α possédant un site de fixation à l'ADN et un autre de liaison au ligand. Cette protéine présente des homologies structurelle et fonctionnelle avec les autres récepteurs de la super-famille multigénique (incluant les TR, les récepteurs aux stéroïdes...). Cette première découverte fondamentale a permis par la suite l'isolement et la purification du second récepteur humain hRAR β (Brand *et al.*, 1988) présentant une affinité pour l'AR dix fois supérieure à celle de hRAR α

pour ce même acide. A l'inverse des deux premiers, le troisième récepteur de l'AR (RAR γ) a d'abord été découvert chez la souris (Zelent *et al.*, 1989), puis chez l'homme (Krust *et al.*, 1989). Ces récepteurs (tout comme les récepteurs RXR découverts ultérieurement) sont schématiquement représentés par une protéine divisée en cinq domaines A, B, C, D et E. Les domaines A et B ont une fonction transactivatrice constitutive, le domaine C est celui de liaison à l'ADN, le domaine D porte une séquence « d'adressage nucléaire », le domaine E porte le site de fixation au ligand, un site transactivateur ligand dépendant et un site de dimérisation. Ces trois récepteurs RAR présentent une forte homologie de séquence pour les domaines C et E, laissant supposer qu'ils proviennent d'un même gène RAR ancestral et qu'ils interagissent avec les mêmes structures nucléaires.

La complexité du signal rétinolique devient grandissant compte tenu de l'existence au sein de chaque RAR de plusieurs isoformes : deux isoformes clairement identifiés pour chacun des récepteurs RAR α et RAR γ et quatre pour la forme RAR β . Ces différents isoformes présentent un domaine A distinct, connu pour intervenir dans l'activité transcriptionnelle de l'holo-RAR. Des auteurs suggèrent ainsi que les différents isoformes pourraient avoir des activités transcriptionnelles distinctes et peut être spécifiques à certains gènes cibles (Mangelsdorf *et al.*, 1994). Par ailleurs, l'expression des gènes codant pour ces différents sous-types de récepteur RAR est régulée par des voies de signalisation nucléaires distinctes. Ainsi l'expression des RAR β est fortement induite par l'AR tout-*trans* (de The *et al.*, 1989 ; Redfern *et al.*, 1990), tandis que les promoteurs des gènes codant pour les RAR α et RAR γ ne sont que très peu sensibles à l'AR tout-*trans* et ne s'expriment qu'en présence de forte concentration de cet acide (Mangelsdorf *et al.*, 1994 ; Leroy *et al.*, 1991). Ces modes de régulation peuvent expliquer les différences dans les distributions tissulaires respectives de ces différents récepteurs RAR, expressions qui s'établissent différemment au cours du développement (Dollé *et al.*, 1989 ; 1990 ; Ruberte *et al.*, 1991 ; 1990). La littérature rend compte donc d'une grande diversité des récepteurs RAR, ce qui pourrait en partie expliquer la diversité des fonctions physiologiques dans lesquelles sont impliqués les rétinoïdes.

Les RXR

Cette découverte initiale des RAR pose comme postulat que la voie de signalisation des rétinoïdes s'exerce par l'intermédiaire des RAR qui régulent l'expression des gènes cibles en formant des holo-homodimères RAR-RAR se fixant sur des éléments de réponse spécifiques des promoteurs géniques. Ce postulat a été rapidement reconsidéré après la découverte d'un nouveau récepteur nucléaire similaire au RAR mais d'une séquence génomique suffisamment différente de celle du RAR pour le considérer comme un nouveau récepteur n'appartenant pas à la famille des RAR (Mangelsdorf *et al.*, 1990). Des études montrent d'ailleurs que le RAR est génomiquement

plus ressemblant au TR qu'à ce nouveau récepteur. Cette nouvelle protéine est nommée RXR (retinoid X receptor) car si elle ne présente pas une réelle affinité pour l'AR tout-*trans*, l'analyse structurale de sa séquence génomique révèle une affinité particulière pour une molécule appartenant à la famille des rétinoïdes. A partir de cette première identification du RXR α , furent caractérisés RXR β et RXR γ (Mangelsdorf *et al.*, 1992), ces trois récepteurs étant différentiellement exprimés dans les tissus adultes et embryonnaires (Dollé *et al.*, 1994 ; Mangelsdorf *et al.*, 1992). De la même façon que pour RAR, plusieurs isoformes des différents récepteurs RXR sont clonés. Ainsi chez la souris, deux formes respectives ont été clonées pour RXR β et RXR γ , à l'inverse une seule existerait pour RXR α .

Les ligands des RAR et RXR

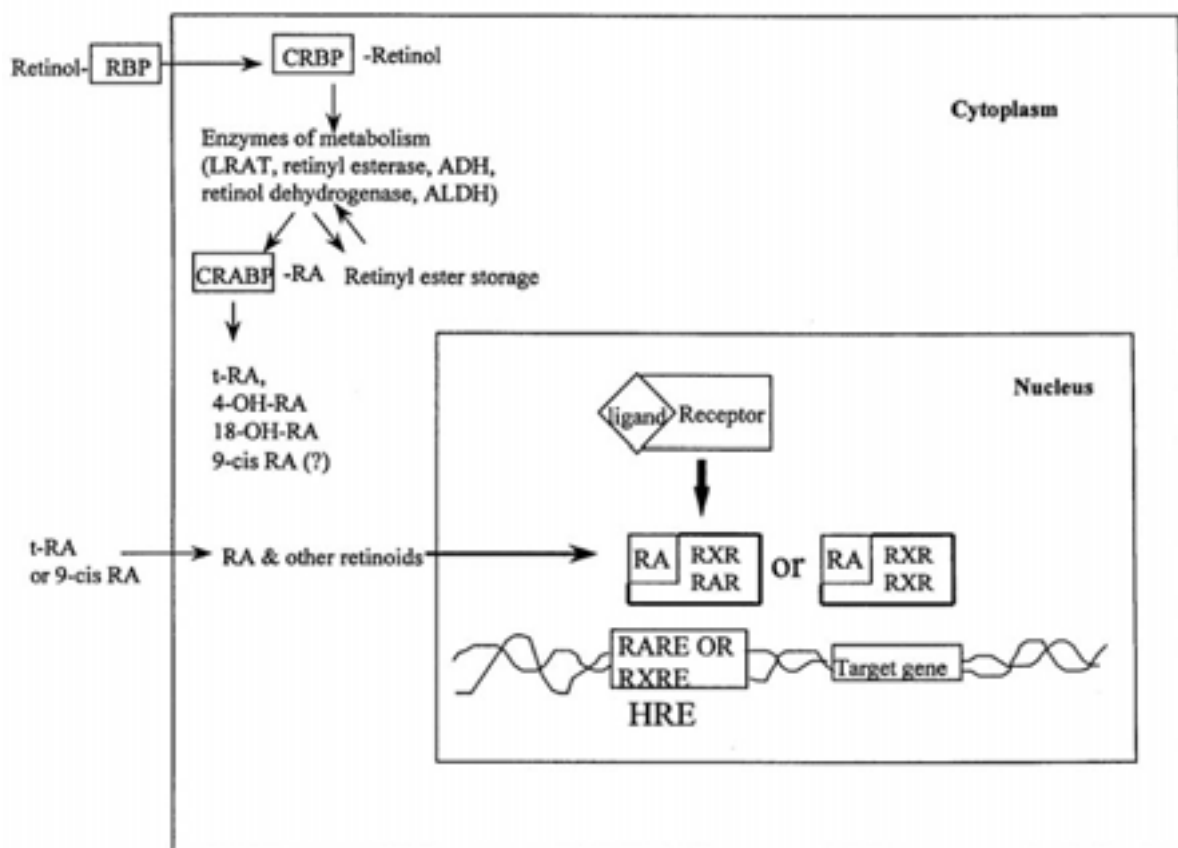
Les RAR et les RXR lient les métabolites de la vitamine A selon un même gradient d'affinité : AR tout-*trans* > rétinol > rétinyle acétate > rétinol, mais les RXR requièrent une concentration de ligand 40 fois supérieure pour parvenir au même niveau d'activation que les RAR (Mangelsdorf *et al.*, 1990). Ces observations suggèrent que les RXR possèdent un ligand privilégié, le retinoid X. C'est en 1992 qu'est identifié la forme 9-*cis* de l'AR comme ligand préférentiel des RXR α , β et γ chez la souris (Heyman *et al.*, 1992 ; Levin *et al.*, 1992). Le 9-*cis* active les RXR avec une affinité 40 fois supérieure que le tout-*trans*. Sa présence *in vivo* dans le foie et le rein à des niveaux d'expression significatifs suggère que ce métabolite est utilisé et physiologiquement fonctionnel.

La particularité du RXR est qu'il est capable de s'hétérodimériser avec d'autres récepteurs nucléaires dont le RAR, pour activer la transcription des gènes cibles (nous y reviendrons dans le paragraphe qui suit). Dans cette situation, sa capacité à lier le ligand AR 9-*cis* est largement discutée. Ainsi des études concluent que lorsqu'il forme un hétérodimère avec le RAR et que ce complexe est associé à l'ADN, le récepteur RXR est incapable de lier l'AR 9-*cis* et perd sa fonctionnalité ligand dépendante (Kurokawa *et al.*, 1994 ; Forman, 1995). En 1996, une nouvelle étude avance des arguments contraires et souligne que la capacité de RXR à lier son ligand reste optimale et n'est pas modifiée par son hétérodimérisation avec RAR, ni par l'association du complexe avec l'ADN (Kersten *et al.*, 1996).

Les données rapportées rendent compte de l'extrême complexité fonctionnelle de la voie de signalisation nucléaire des rétinoïdes. Ce signal régule positivement la transcription génique ou à l'inverse négativement. L'orientation de ces régulations dépend d'une multitude de facteurs incluant la concentration intracellulaire en ligand ou en différents récepteurs, la nature de l'élément de réponse (HRE) constitutif du gène ciblé etc... Par ailleurs, ces lois minimales régissant le signal rétinoïde sont issues pour la majorité, d'études réalisées *in vitro*. Ceci signifie que

les modèles de fonctionnement de la voie de signalisation des rétinoïdes, disponibles à ce jour, sont encore « simplistes » car ne prennent pas en compte l'ensemble des signaux physiologiques régulant l'action nucléaire des rétinoïdes. La réalité physiologique du fonctionnement de ce signal rétinoïde dans un organisme intégré demeure encore aujourd'hui un mystère. Notre objectif ne sera pas d'en disséquer les différentes composantes. Nous tenterons davantage d'exposer brièvement un modèle minimal des mécanismes d'action nucléaire des rétinoïdes, en l'intégrant dans un modèle de fonctionnement cellulaire plus général, dans le but de proposer une signification physiologique à ces événements moléculaires et nucléaires.

C_ Modèle général de fonctionnement de la voie de signalisation des rétinoïdes



Légende : Mode d'action nucléaire des rétinoïdes

L'AR peut agir d'une façon autocrine ou paracrine, soit il est amené par la circulation sanguine et pénètre directement dans la cellule, soit il est directement synthétisé dans la cellule cible à partir du rétinol ou du rétinol. L'activation métabolique permettant l'obtention de l'AR tout-*trans* est un processus à plusieurs étapes impliquant essentiellement deux enzymes deshydrogénases, une pour le rétinol (ADH ou alcool deshydrogénase) et une pour le rétinol (ALDH ou aldehyde deshydrogénase). La forme 9-*cis* AR peut être directement délivrée à la cellule, mais peut être également synthétisé dans le compartiment intracellulaire à partir de l'AR

tout-*trans*. Néanmoins cette conversion est dépendante de plusieurs facteurs dont la température mais surtout du type cellulaire. Ainsi dans une cellule la forme 9-*cis* peut s'isomériser en tout-*trans* et donc favorise davantage l'activation des RAR ; dans un autre type cellulaire, la conversion inverse est plutôt favorisée. Selon Mangelsdorf (1994), si effectivement, dans chaque type cellulaire, il existe une régulation spécifique privilégiant plutôt une concentration plus importante en AR tout-*trans* qu'en 9-*cis*, ou inversement, ceci devrait privilégier une voie de signalisation au détriment de l'autre. De ce fait, l'identification des enzymes impliquées dans l'isomérisation *cis-trans* et leur distribution cellulaire et tissulaire permettrait de dresser une cartographie des différents types de signaux. Le transport de l'AR du cytoplasme jusqu'au noyau est à ce jour inconnu. La CRABP est aujourd'hui considérée comme pouvant avoir un rôle déterminant dans ce transport.

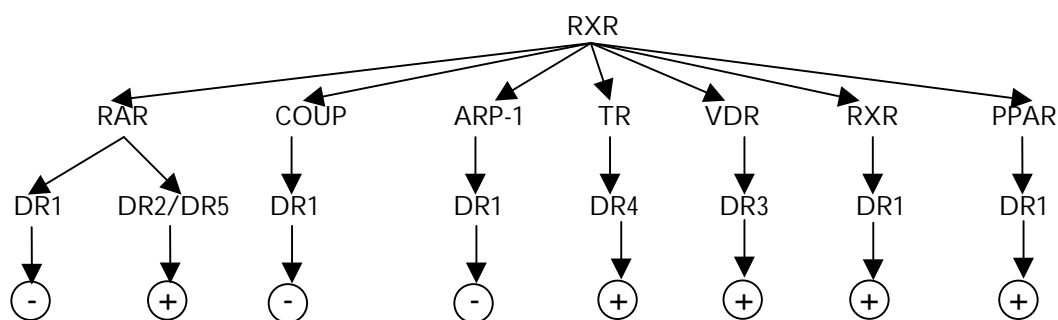
La modulation de l'expression génique se fera grâce à la formation d'homo- ou d'hétérodimères d'holo-récepteurs qui vont se fixer sur des éléments de réponse spécifiques (appelés HRE) situés sur le promoteur des gènes cibles. La complexité de ces systèmes de signaux nucléaires s'explique tout d'abord par le fait que la dimérisation ne s'effectue pas uniquement au sein même des récepteurs aux rétinoïdes (c'est à dire sous la forme RAR-RXR), mais aussi entre les différents récepteurs de la super-famille multigénique. Ainsi les récepteurs aux hormones thyroïdiennes s'hétérodimérisent avec les RXR. L'hétérodimère le plus fonctionnel dépend de l'élément de réponse du gène cible.

Les éléments de réponse

Chaque classe de récepteur agira de façon préférentielle sur un élément de réponse spécifique (HRE). Ces différents HRE présentent une homologie structurale, notamment au niveau des sites d'interactions avec les homo- et les hétérodimères. Ces HRE sont constitués de séquences répétées (Direct repeat ou DR) de 8 nucléotides PuGGTCA (dit demi site consensus) séparés par 1 à 5 nucléotides neutres (DR1-DR5). Les RARE et les RXRE (éléments de réponse respectivement aux RAR et aux RXR) les plus fonctionnels sont généralement constitués de DR1 et DR5. La complexité des réponses réside dans le fait que selon la nature des éléments de réponse, le signal peut être activateur ou à l'inverse inhibiteur. Ainsi le complexe RAR-RXR va activer la transcription en se liant à un DR5, alors que ce même complexe va inhiber l'activité transcriptionnelle en se liant à un DR1. La constitution du HRE va conditionner l'action des hétérodimères, qu'il s'agisse d'hétérodimères RAR-RXR ou RXR en combinaison avec d'autres récepteurs de la super-famille comme les PPAR, les VDR ou les TR. Le schéma ci-après (p. 67) résume ces phénomènes de régulation génique positive ou négative selon le type des HRE et la nature du complexe hétérodimérique.

RXR apparaît en effet comme étant le partenaire préférentiel et commun d'hétérodimerisation avec RAR et les autres récepteurs de la super-famille. Il serait, par ailleurs, le seul récepteur à pouvoir agir en homodimère (Mangelsdorf, 1994). Ce rôle privilégié de RXR comme partenaire d'hétérodimerisation souligne sa place fondamentale dans la voie de signalisation des rétinoïdes. Il est le récepteur le plus ancien dans l'échelle phylogénétique avec un homologue chez la drosophile dont le site d'hétérodimerisation est conservé. La forme hétérodimérique serait très ancienne et ce modèle de transcription génique avec pour élément d'hétérodimerisation invariant, le récepteur RXR refléterait l'origine évolutive de la transcription régulée par des récepteurs nucléaires ligand-dépendants.

De par ses propriétés d'hétérodimerisation, la voie de signalisation des rétinoïdes est fonctionnellement indissociable des autres modulateurs géniques dont les hormones thyroïdiennes. Ces réseaux de signalisation nucléaires s'organisent en fonction de nombreux facteurs cellulaires et selon la nature des gènes cibles.



Légende : RXR peut s'hétérodimeriser avec les différents autres récepteurs non stéroïdiens de la super-famille (TR, COUP, ARP-1, VDR ou PPAR), et selon la nature du HRE (direct repeat 1, 2, 3, 4 ou 5) va permettre ou à l'inverse inhiber la transcription.

D_ Autorégulation de la voie de signalisation des rétinoïdes

De nombreux gènes répondant aux rétinoïdes sont impliqués dans le métabolisme des lipides, des acides gras et des hydrates de carbone. Le caractère le plus surprenant de ce signal nucléaire est qu'il est capable de réguler sa propre activité : cette voie de signalisation a une fonction autorégulatrice. Les rétinoïdes contrôlent l'expression de nombreux gènes codant pour des protéines impliquées à différents niveaux (métabolisme, transport, action génétique) dans la voie de signalisation des rétinoïdes. Un tableau (p.74) rend compte d'une liste de quelques gènes régulés par les rétinoïdes. Les rétinoïdes régulent l'expression des gènes codant pour les protéines de liaison au rétinol et à l'AR (RBP : Panariello *et al.*, 1996 ; CRBP : Smith *et al.*, 1991 et Mangelsdorf *et al.*, 1991 ; CRABP : Leonard *et al.*, 1995 et Plum et Clagett-Dame, 1995), pour des

enzymes permettant le métabolisme de la vitamine A (alcool deshydrogenase : Zgombic et Duester, 1993). Cette voie de signalisation régule la disponibilité de son propre ligand. Les rétinoïdes contrôlent également l'expression des gènes codant pour les récepteurs de l'AR (RAR α : Wuarin *et al.*, 1994 ; RAR β : Yamagata *et al.*, 1994 ; RXR β : Mansgeldorf *et al.*, 1992 et RXR α : Wan *et al.*, 1994). La disponibilité en récepteurs de l'AR dans la cellule dépendrait donc du niveau d'expression de la voie de signalisation des rétinoïdes. Ce phénomène d'autorégulation est également démontré *in vivo*. Une étude de Yamagata et collaborateurs (1993) montre que des rats privés de vitamine A présentent une diminution de l'expression des récepteurs de l'AR, cette hypoexpression peut être réversible grâce à un ajout la vitamine A dans le régime alimentaire carencé. Ce phénomène a été démontré également sur d'autres modèles animaux (Enderlin *et al.*, 1997).

E_ Conclusion

Tous les différents éléments cellulaires participant au système de réponse aux rétinoïdes (récepteurs, protéines cytosoliques de liaison, enzymes métaboliques, ligands et enfin des éléments de réponse des promoteurs géniques), apparaissent comme des facteurs limitants orientant le signal généré (inhibiteur ou activateur). La plupart des études menées visant à disséquer ces événements moléculaires ont été réalisées *in vitro* et ne prennent en aucun compte la réalité physiologique d'un organisme vivant. Aujourd'hui, comprendre les dynamiques moléculaires de ces voies de signalisation se révèle être un challenge passionnant. Les études dévoilant leur signification fonctionnelle à un niveau plus intégré ont déjà montré le pouvoir physiologique étonnant des rétinoïdes. Plus précisément, la vitamine A et ses métabolites ont été essentiellement étudiés pour leur rôle fondamental dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que la vision, la reproduction, le métabolisme, la différenciation cellulaire, l'hématopoïèse, la fonction immune, le développement osseux et l'embryogenèse. Par ailleurs, leurs effets antagonistes dans les processus de prolifération cellulaire ont conduit de nombreux scientifiques à utiliser ces molécules dans des protocoles thérapeutiques pour lutter contre certaines pathologies humaines et plus particulièrement certains cancers.

Notre objectif est celui d'élucider le rôle physiologique des rétinoïdes dans le cerveau adulte et plus particulièrement dans la fonction mnésique.

III_ LE CERVEAU ET LES RETINOÏDES

L'AR est connu depuis plus d'un demi siècle pour son rôle fondamental dans le développement du système nerveux central (SNC). Dans les années 30, les premières études montrèrent chez des animaux de ferme, que des nouveau-nés de mères souffrant d'une déficience en vitamine A, présentaient des anomalies congénitales du SNC et plus particulièrement un développement anormal de la crête neurale (Maden et Zile, 1998 ; Kalterv et Warkany, 1959). Plus tard, il est apparu évident qu'un excès de vitamine A était tout aussi nocif pour l'embryon et induisait les mêmes types d'anomalies congénitales du SNC (Cohlan, 1953). Un niveau critique d'expression du signal rétinolde apparaît être fondamental pour un développement normal du SNC. Ce n'est que ces quelques dernières années que les neurobiologistes se sont intéressés aux fonctions potentielles des rétinolde dans le SNC adulte.

A_ Le Cerveau adulte possède l'ensemble du dispositif biologique nécessaire au métabolisme de l'AR, à son transport (protéines cytosoliques de liaison) et à son action nucléaire (récepteurs).

Dés 1993, il a été montré chez le lapin adulte que les cellules nerveuses sont capables d'oxyder le rétinol et le rétinolde en AR. Plus précisément, les niveaux de synthèse de l'AR mesurés dans le cervelet, le cortex et les méninges sont supérieurs à ceux mesurés dans le foie, organe connu pour présenter une capacité importante de synthèse d'AR (Dev *et al.*, 1993). Cette étude suggère que le cerveau est un organe vers lequel est transporté la vitamine A et qu'il possède toute la machinerie métabolique nécessaire pour la synthèse d'AR. La pharmacocinétique de l'AR dans le cerveau adulte a été par la suite clairement caractérisée (Le Doze *et al.*, 2000).

En 1994, Zetterström et ses collaborateurs publient une étude détaillée et complète rendant compte de la distribution des protéines cytosoliques de liaison aux rétinolde (CRABPI et CRBPI) dans le cerveau adulte. Ces protéines sont présentes au niveau des cellules gliales, endothéliales et nerveuses. Dans le neurone, leur présence est observée aussi bien au niveau du soma que dans les terminaisons dendritiques et les arborisations axonales. La CRBPI s'exprime de façon importante dans les cellules pyramidales de l'hippocampe, dans l'amygdale, la substance noire ou encore dans le striatum. La CRBPI est également présente de façon abondante dans les cellules endothéliales des capillaires sanguins et serait impliquée dans le transport du rétinol pour le passage critique de la barrière hématoencéphalique. N'apparaît aucun chevauchement des distributions cérébrales respectives de la CRBPI et de la CRABPI. Ce constat laisse supposer que

deux voies distinctes existeraient pour supporter l'action intracellulaire des rétinoïdes, l'une impliquant la CRABP et l'autre non.

En 1999, deux équipes indépendantes publient des études immunohistochimique et d'hybridation *in situ* visualisant la distribution structurale et cellulaire des différents sous-types des récepteurs de l'AR (RAR et RXR) chez le rat et chez la souris. Un tableau (voir p. 70) résume la distribution des différents récepteurs de l'AR dans le cerveau (la liste n'est pas exhaustive, pour plus d'informations, voir Krezel *et al.*, 1999). On remarquera que les patterns d'expression des récepteurs (protéines) et de leurs transcripts dans le cerveau adulte sont différents de ceux observés dans le cerveau de nouveau-né en cours de développement (Dollé *et al.*, 1994 ; Ruberte *et al.*, 1993 ; Yamagata *et al.*, 1994). Pour exemple, RAR γ est fortement exprimé au niveau de l'hippocampe et dans le striatum, alors qu'il est pratiquement absent chez le nouveau-né. De même, si RAR β est abondant dans l'hippocampe du cerveau en cours de développement, il n'a pas été mis en évidence dans cette structure chez l'animal adulte. Ces distributions différentielles pourraient témoigner de nouvelles fonctions des rétinoïdes dans le SNC adulte. Nous noterons, enfin qu'il existe un chevauchement entre les profils d'expression des récepteurs RAR et ceux des RXR, ceci témoigne du fait que les hétérodimères RAR-RXR sont les complexes les plus fonctionnels pour la régulation de l'expression génique contrôlée par les rétinoïdes.

Table 1. Distribution of retinoic acid receptor α , β and γ and retinoid X receptor α , β , and γ receptor proteins in the mouse CNS

	RAR α	RAR β	RAR γ	RXR α	RXR β	RXR γ
Telencephalon						
Main olfactory bulb						
Mitral cell layer olfactory bulb	-*	-*	++	+	-*	-
Internal plexiform layer olfactory bulb	+	-*	+	+	-*	-
Glomerular layer olfactory bulb	++	-*	+++	++	-*	-
Anterior olfactory nucleus	+	+	++	+	+	-
Olfactory tubercle						
Tenia tecta	+++	-	-	+	-*	-
Indusium griseum	+++	-	-	+	-*	-
Cortex						
Infralimbic	+	-*	+++	+	-*	-
Piriform	-	-	+++	+	-*	-
Cingulate, frontal, parietal	++(a)	-	++(b)	+(b)	++(c)	-
Entorhinal	-	-	+	+	-*	-
Perirhinal	+	-	+	+	-*	-
Hippocampus						
Field CA1	+++	-	+++	-*	++	-
Field CA2	+++	-	+++	-*	++	-
Field CA3	++	-	++	-*	+	-
Dentate gyrus	-	-	+++	+	+	-
Hilus of the dentate gyrus	-	-	+	+	-	-
Striatum						
Caudate-putamen	-*	+++	++	-*	+	+++
Accumbens nucleus core	-*	+++	++	-*	+	++
Accumbens nucleus shell	-*	+++	+	-*	+	+++
Amygdala						
Central amygdaloid nucleus	+	-	+	+	-*	-
Central amygdaloid nucleus, medial division	+	-	+	-*	-*	+
Amygdaloid basolateral nucleus	++	-	++	-*	-*	++
Amygdaloid lateral nucleus	++	-	-*	+	-*	-
Amygdaloid area, posteromed.	-	-	-*	-*	-*	++
Intercalated amygdaloid nucleus, main	-	-	-*	++	-*	-
Diencephalon						
Thalamus						
Ventral posterior thalamic nucleus	++	-	+	-*	++	-
Reticular thalamic nucleus	+	-	+	-*	+	-
Anterodorsal thalamic nucleus	++	-	+	-*	-*	-
Medial geniculate nucleus	++	-	+	-*	-*	-
Medial habenular nucleus	++	-	-	+	+	-
Hypothalamus						
Arcuate hypothalamus	-*	+++	+	-*	-*	+++
Dorsomedial hypothalamic nucleus	-*	+++	++	-*	-*	+++
Ventromedial hypothalamic nucleus	-*	-	++	-*	-*	+++
Anterior hypothalamic nucleus	-*	-	+	-*	-*	++

D'après Krezel *et al.* (1999), l'intensité du signal est visuellement estimée comme étant faible (+), intermédiaire (++) ou

fort (+++) en comparaison au signal le plus fort obtenu avec l'anticorps correspondant. Dans toutes les régions, le pourcentage de cellules immuno-positives est supérieur à 20%.

Les transcripts des récepteurs sont détectés, mais les protéines correspondantes sont peu ou pas détectables ; (a), (b) et (c) : les protéines sont présentes respectivement dans les couches 5, 2-4 et 6, et dans toutes les couches.

L'étude comparative réalisée par Zetterström et ses collaborateurs (1999) de la distribution cérébrale des récepteurs et celle des protéines cytosoliques de liaison a permis de poser des hypothèses nouvelles sur le fonctionnement des voies de signalisation des rétinoïdes. Plus précisément cette étude montre par exemple une présence des CRABPI non seulement dans le soma (et le noyau) d'une population de neurones du striatum mais aussi dans les dendrites. Parallèlement, une étude de Mc Caffery et Dräger (1994) indique l'existence d'ADH2 (alcool deshydrogenase 2, enzyme impliquée dans l'oxydation du retinol en AR) dans les terminaisons

dopaminergiques. Ces deux observations suggèrent, selon leurs auteurs, une fonction des rétinoïdes dans la communication intercellulaire. L'AR serait synthétisé dans les terminaisons dopaminergiques et serait transféré aux dendrites connectées, exprimant des CRABPI. Si cet hypothétique transfert est couplé à l'activité neuronale, l'AR constituerait une nouvelle molécule de signalisation utilisée par ces cellules pour leur communication et serait donc délivré au noyau selon une « procédure activité-dépendante ».

Les rétinoïdes sont connus pour être impliqués dans les processus de développement et de maturation des cellules nerveuses, la présence chez l'adulte de ces protéines cytosoliques de liaison et des récepteurs dans les cellules nerveuses suggère que les rétinoïdes pourraient jouer un rôle dans les processus neuronaux du SNC adulte. Krezel et collaborateurs (1999), observant une expression très marquée de ces protéines dans les cellules pyramidales de l'hippocampe ont également suggéré un rôle des rétinoïdes dans les processus de plasticité synaptique dans le SNC adulte.

B_ Les Rétinoïdes agissent en interaction avec des voies hormonales impliquées dans de nombreuses fonctions supérieures du SNC.

Les rétinoïdes agissent de la même façon et en synergie avec les hormones thyroïdiennes et les glucocorticoïdes. Ces différentes voies de signalisation interagissent pour réguler de concert l'expression des gènes. Par ailleurs ces voies hormonales sont impliquées dans différentes fonctions supérieures du SNC. Ainsi les récepteurs aux hormones thyroïdiennes, fondamentaux dans les phases de maturation du cerveau, sont également fortement exprimés dans le cerveau adulte (Puymirat *et al.*, 1991), et leurs implications notamment dans la régulation des affects sont à ce jour bien caractérisées (Esposito *et al.*, 1997 ; Whybrow, 1994). Une vaste littérature rend également compte des actions génomiques et non génomiques des glucocorticoïdes et de leurs rôles dans les processus neurobiologiques sous-tendant les fonctions cognitives. Puisque la voie des rétinoïdes semble être fonctionnelle dans le cerveau adulte et agit sur le plan moléculaire en synergie avec ces hormones, il est probable qu'elle soit impliquée dans les mêmes fonctions physiologiques du SNC adulte.

C_ Premières études suggérant un rôle des rétinoïdes dans certaines fonctions du SNC adulte.

Une des premières études visant à élucider les fonctions potentielles des rétinoïdes dans le cerveau adulte a été publiée en 1998 par l'équipe de Chambon. Ces travaux ont porté sur l'étude

des fonctions motrices et la mesure du niveau d'expression striatal des récepteurs dopaminergiques chez des souris knock-out dépourvues soit uniquement d'un gène codant pour le récepteur RAR β , RAR γ , RXR β ou RXR γ ou soit dépourvues d'une combinaison de deux de ces gènes. Le striatum est une structure cérébrale impliquée dans les fonctions motrices et exprimant de façon abondante les récepteurs à l'AR. Les récepteurs dopaminergiques sont exprimés en forte densité dans cette même structure et leurs gènes sont régulés par les rétinoïdes. Cette étude montre que ces souris knock-out (et plus particulièrement celles porteuses d'une double mutation d'un gène RAR et d'un gène RXR) présentent une diminution de l'expression des récepteurs D1 et D2 du striatum associé à un déficit des fonctions motrices. La conclusion est donc que les récepteurs de l'AR et plus particulièrement les hétérodimères RAR-RXR sont impliqués dans les fonctions motrices, via la régulation des récepteurs dopaminergiques localisés dans le striatum. Cette étude suggère pour la première fois une implication des rétinoïdes dans une fonction du cerveau adulte.

D_ Certains gènes, dont l'expression est contrôlée par les rétinoïdes codent pour des protéines impliquées dans des systèmes de neurotransmission et dans les processus de plasticité synaptique

L'examen de la liste des gènes exprimés au niveau du cerveau et régulés par les rétinoïdes doit permettre d'émettre des hypothèses quant aux rôles physiologiques de ces molécules dans le cerveau adulte. Le nombre de gènes dont l'expression est gouvernée par les rétinoïdes dépasse 200. La revue de question de Lorraine Gudas et de collaborateurs (1994) rend compte de la multiplicité de ces gènes et de leurs propriétés fonctionnelles. Quelques exemples sont rapportés dans un tableau (p. 74).

Certains de ces gènes cibles codent pour des protéines impliquées dans les systèmes de neurotransmission. Krezel et ses collaborateurs (1998) insistent sur l'influence des rétinoïdes sur la transmission dopaminergique meso-striatale. Certains de ces gènes régulés par les rétinoïdes codent également pour des protéines impliquées dans la transmission cholinergique dont le rôle dans certains processus mnésiques a été largement argumenté (Marighetto *et al.*, 1993). Il s'agit par exemple des gènes codant pour la choline acétyl transférase (participant à la synthèse d'acétylcholine), les transporteurs de l'acétylcholine. En régulant l'expression des gènes et donc en contrôlant d'une certaine manière la teneur en protéines correspondantes, les rétinoïdes participeraient au fonctionnement normal du système de neurotransmission cholinergique.

De nombreux gènes régulés par les rétinoïdes, codent pour des protéines intervenant dans les processus de plasticité synaptique supposés sous-tendre la fonction mnésique (McNaughton and Morris, 1987 et première partie de l'introduction). Les récepteurs NMDA et la

synaptophysine sont régulés par les rétinoïdes et sont respectivement impliqués dans les processus de plasticité synaptique NMDA-dépendant (Martin & Morris, 2000), et dans la libération des vésicules de neurotransmetteurs dans la fente synaptique (Greengard *et al.*, 1993). Nous retiendrons également la neurogranine qui est engagée dans les cascades intracellulaires constitutives de ces mêmes phénomènes d'efficacité synaptique et dans la régulation du calcium intracellulaire (Gerendasy et Sutcliffe, 1997) ; son rôle dans la PLT et les apprentissages spatiaux a été montré par une étude de mutagenèse dirigée (Pak *et al.*, 2000). Ces quelques exemples ont permis de poser les hypothèses relatives aux rôles potentiels des rétinoïdes, via la régulation de l'expression de gènes fondamentaux, dans la fonction mnésique et les processus de plasticité synaptique associés.

La première tentative de démonstration de ces hypothèses a été menée par l'équipe d'Evans (Chiang *et al.*, 1998). Cette étude a permis de montrer chez des souris knock-out, dépourvues des gènes codant pour les récepteurs RAR β et/ou RXR γ , l'existence concomitante d'un déficit de potentialisation et de dépression à long terme des synapses de la région CA1 de l'hippocampe et d'un déficit d'apprentissage spatial dans la piscine de Morris.

E_ Conclusion

L'examen de la bibliographie révèle tout d'abord, que le cerveau adulte dispose du système biologique de réponse aux rétinoïdes. Plus particulièrement, on localise les récepteurs de l'AR dans le noyau des cellules nerveuses et dans des structures cérébrales (dont l'hippocampe) impliquées dans les fonctions mnésiques. Par ailleurs, les rétinoïdes agissent en interaction avec des voies hormonales identifiées comme jouant des rôles prépondérants dans des fonctions cognitives supérieures. Les rétinoïdes régulent l'expression de nombreux gènes impliqués dans différents systèmes de neurotransmission et plus spécifiquement dans les processus de plasticité synaptique. Enfin, nous disposons d'une étude fonctionnelle sur des souris knock-out suggérant l'implication des rétinoïdes dans des apprentissages spatiaux et dans le phénomène de PLT.

L'ensemble de ces arguments nous permet de formuler l'hypothèse principale de notre travail :

Les rétinoïdes, en modulant l'expression de nombreux gènes codant pour des protéines neuronales impliquées dans les processus de plasticité synaptique seraient impliqués dans les fonctions mnésiques.

Sigle	dénomination	Régulation	références
RBP	Protéine de liaison au ROH	+	Panariello <i>et al.</i> , 1996
CRBPI	Protéine cytosolique de liaison au ROH de type I	+	Smith <i>et al.</i> , 1991
CRBPII	Protéine cytosolique de liaison au ROH de type II	+	Mangelsdorf <i>et al.</i> , 1991
CRABPI	Protéine cytosolique de liaison de l'AR de type I	+	Leonard <i>et al.</i> , 1995
CRABPII	Protéine cytosolique de liaison de l'AR de type II	+	Plum et Clagett-Dam, 1995
ADH	Alcool deshydrogenase	+	Zgombic et Duester, 1993
RAR α	Récepteur α de l'AR	+	Wuarin <i>et al.</i> , 1994
RAR β	Récepteur β de l'AR	+	Yamagata <i>et al.</i> , 1993
RXR α	Récepteur α du Rétinoid X	+	Wan <i>et al.</i> , 1994
RXR β	Récepteur β du Rétinoid X	+	Mangeldorf <i>et al.</i> , 1992
RXR γ	Récepteur γ du Rétinoid X	-	Wan <i>et al.</i> , 1994
TR β 2	Récepteur β 2 de la triiodothyronine	+	Jones <i>et al.</i> , 1993
GAP43	neuromodulin	+	Taneja <i>et al.</i> , 1995
CaMKII	Calmoduline kinase II	+	Chen et Kelly, 1996
ChAt	Choline acétyl transférase	+	Kobayashi <i>et al.</i> , 1994
VACHT	Transporteur de l'acétylcholine aux vésicules	+	Berse et Blusztajn, 1995
DR2	Récepteur D2 à la dopamine	+	Farroqui <i>et al.</i> , 1997
RC3	Neurogranine	+	Iñiguez <i>et al.</i> , 1994
RNMDA	Récepteur du N-méthyl-D-aspartate	+	Beczowska <i>et al.</i> , 1996
P38	Synaptophysine	+	Gaetano <i>et al.</i> , 1992
Calbindin D 28K	Protéine de liaison du calcium	+	Wang et Christakos, 1995
Canaux K+	Canaux potassiques	+	Smith-Maxwell <i>et al.</i> , 1991
NGF	Facteur de croissance nerveux	+	Wion <i>et al.</i> , 1987
Trk A	Récepteur au NGF	+	von Holst <i>et al.</i> , 1995
P75 ^{NGFR}	Récepteur du facteur de croissance nerveux	+	Scheibe et Wagner, 1992
P55 ^{TNFR}	Récepteur du facteur de nécrose tumorale	+	Chambaut-Guerin <i>et al.</i> , 1997
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone	+	Cho <i>et al.</i> , 1998
IGFII	Facteur de croissance II « insuline like »	+	Matsumoto <i>et al.</i> , 1992
APP	Protéines précurseur des amyloïdes	+	Beckman et Iverfeldt, 1997
DOR	Récepteur des opioïdes	+	Beczowska <i>et al.</i> , 1996
TrkR	Récepteur tyrosine kinase	+	Cheung <i>et al.</i> , 1996
TTG	Transglutaminase tissulaire	+	Chiocca <i>et al.</i> , 1988
Thase	Tyrosine hydroxylase	+	Cosgaya <i>et al.</i> , 1997
GH	Hormone de croissance	+	Bedo <i>et al.</i> , 1989

Tableau récapitulatif d'une liste de protéines dont les gènes sont sous contrôle des rétinoïdes (soit un RARE a été clairement identifié sur leur promoteur, soit leur expression est modulée par la présence d'AR).

Pour mettre à l'épreuve ces hypothèses, nous avons étudié les effets de manipulation du niveau d'expression de la voie de signalisation des rétinoïdes sur les fonctions mnésiques. Un des modèles animaux que nous avons utilisé, est le modèle physiopathologique du vieillissement. En résumé, le vieillissement se caractérise par une hypoexpression de la voie de signalisation des rétinoïdes.

IV_ POURQUOI LE VIEILLISSEMENT EST IL UN BON MODELE D'ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LES RETINOÏDES ET LES PROCESSUS MNESIQUES ?

L'approche du vieillissement cérébral sous l'angle d'une modification du statut vitaminique A, rejoint les hypothèses relatives aux relations entre un dysfonctionnement hormonal et le vieillissement mnésique.

A_ Le vieillissement hormonal

Faire l'hypothèse que la voie de signalisation des rétinoïdes joue un rôle dans l'apparition des troubles mnésiques au cours du vieillissement est cohérent avec le fait que ce nutriment agit en interaction avec des hormones (glucocorticoïdes et hormones thyroïdiennes, Pailler-Rodde, 1991 ; Audouin-Chevallier ; 1996) impliquées dans le vieillissement cognitif et/ou cérébral. Plus précisément, le vieillissement se caractérise par des modifications hormonales très importantes qui ont des effets délétères sur les fonctions cognitives.

Les glucocorticoïdes et le vieillissement cérébral

L'augmentation de sécrétion des glucocorticoïdes au cours du vieillissement a été mise en évidence depuis déjà de nombreuses années. La théorie des glucocorticoïdes au cours du vieillissement concerne essentiellement la structure hippocampique. Cette structure est très riche en récepteurs aux glucocorticoïdes (GR), et la densité hippocampique en ces protéines diminue avec l'âge (Landfield, 1994 ; Peiffer *et al.*, 1991). Ce phénomène s'accompagne d'une augmentation du niveau de glucocorticoïdes circulant. Ces altérations seraient liées à un dysfonctionnement de la boucle hypothalamo-hypophyso-surrénalienne autorégulatrice. Cette augmentation hippocampique de glucocorticoïdes crée un phénomène de neurotoxicité pouvant se traduire par une incapacité des neurones à capturer le glucose et par une altération de l'homéostasie intracellulaire (Landfield, 1994). Si les événements génomiques induits par les glucocorticoïdes et leurs modifications au cours du vieillissement sont peu connus, des données

indiquent chez des rats âgés, une corrélation entre l'expression génique des GR, la concentration de glucocorticoïdes et les performances en mémoire spatiale.

Les hormones thyroïdiennes et le vieillissement cérébral

Le vieillissement s'accompagne de variations très marquées du statut thyroïdien. Chez des sujets de plus de 50 ans, on observe : une diminution de la sécrétion hypophysaire de TSH (thyrotropine régulant l'activité de la thyroïde) et de la réponse de la TSH aux variations de concentrations de la TRH (thyrolibérine libéré par l'hypothalamus), une diminution de la sensibilité de la thyroïde à la boucle rétroactive négative hypophysaire, une réduction de la sécrétion de T_4 et de la disponibilité en T_4 . Une diminution faible mais existante de l'activité de la 5'desiodase assurant la conversion de la T_4 en T_3 (forme active de l'hormone thyroïdienne) a été également observée (Corrêa da Costa et Rosenthal, 1996) et conduirait à une diminution de la disponibilité et de la concentration de la T_3 sérique (Erfurth et Hagmar, 1995). Un autre aspect des modifications de la fonction thyroïdienne liées à l'âge pourrait être une sensibilité diminuée des cellules cibles aux hormones thyroïdiennes soit par suite d'une diminution du nombre ou de l'affinité des récepteurs hormonaux (De Nayer, 1991), soit suite à l'altération des réponses post-récepteur (Davis, 1979). Par ailleurs, les études épidémiologiques indiquent que les troubles thyroïdiens décrits chez les personnes âgées relèvent d'un statut d'hypothyroïdie (Finucane et Anderson, 1995). Cette forme d'hypothyroïdie liée à l'âge atteindrait 1 à 17% de la population vieillissante (Levy, 1991).

Cette modification du statut hormonal au cours du vieillissement pourrait avoir une incidence préjudiciable sur le fonctionnement du cerveau. En effet, comme nous l'avons mentionné auparavant les hormones thyroïdiennes agissent en étroite synergie avec les rétinoïdes, et donc comme pour la vitamine A un bon nombre d'arguments existent et suggèrent un rôle de ces hormones dans les fonctions cognitives. La revue de Calza et de ses collaborateurs (1997) en font un large descriptif.

Tout d'abord, les neurones et les cellules gliales du cerveau adulte possèdent toute la machinerie enzymatique (l'enzyme deiodinase de type II, Courtin *et al.*, 1986) et les systèmes de réponse (TR, Bradley *et al.*, 1992) aux hormones thyroïdiennes. En effet, tous les isoformes des TR sont exprimés dans le cerveau adulte avec une densité plus marquée dans l'hippocampe, les cortex, le striatum, le cervelet, les noyaux hypothalamiques et le bulbe olfactif (Calza *et al.*, 1997), et ces structures sont très sensibles aux variations du statut thyroïdien. Les hormones thyroïdiennes et leurs récepteurs contrôlent l'expression de nombreux gènes codant pour des protéines impliquées dans les fonctions générales de la cellule ($Na^+K^+ATPase$, Lin et Akera, 1978), pour des protéines structurales spécifiques de certains types cellulaires comme les tubulines ou pour des protéines spécifiques de certaines fonctions cellulaires comme l'hormone de

croissance (Glass et Holloway, 1990). Plus généralement, les données de la littérature révèlent une action complexe des hormones thyroïdiennes dans le cerveau adulte tout aussi bien au travers de la régulation de gènes qu'au travers d'ajustements métabolique et biochimique plus généraux dont la stabilité des ARNm, la dégradation des protéines et la balance énergétique (Ichikawa et Hashizume, 1995 ; Williams et Franklyn, 1994).

Plus spécifiquement, les hormones thyroïdiennes peuvent moduler la densité des épines dendritiques dans les cellules pyramidales du champ CA1 de l'hippocampe (Gould *et al.*, 1990). Par ailleurs des études ont montré que l'expression de gènes (facteurs de croissance et le gène précoce *c-fos*) induite par l'activité synaptique est perturbée dans l'hippocampe de rats rendus hypo- ou hyperthyroïdien (Calza *et al.*, 1996 ; Giardino *et al.*, 1995). Les hormones thyroïdiennes semblent également avoir une influence sur le système cholinergique par ailleurs altéré par les effets du vieillissement (Arendt *et al.*, 1995). Parallèlement, l'hypothyroïdie chez l'adulte est caractérisée par différents symptômes neurologiques comprenant des perturbations de l'affect et des déficits cognitifs qui ont été définis sous le terme de « démence réversible » (Loosen, 1992). C'est pourquoi un dysfonctionnement thyroïdien a été proposé comme facteur étiologique de la maladie d'Alzheimer (Bhaumik *et al.*, 1991), d'autant plus qu'une diminution des ARN codant pour les TR a été observée dans l'hippocampe de patients Alzheimer (Sutherland *et al.*, 1992).

Ces données ont conduit certains auteurs à penser que la perturbation et/ou la neurodégénérescence du système cholinergique et les déficits cognitifs qui en résultent sont des caractéristiques communes au vieillissement et à l'hypothyroïdie (Calza *et al.*, 1997) et donc que ces deux conditions physiopathologiques seraient sous-tendues par des mécanismes neurobiologiques communs. A l'appui de ces hypothèses, des travaux menés au laboratoire ont montré chez l'animal âgé (rat et souris) une diminution cérébrale et hépatique de l'expression des gènes codant pour les TR (Pallet *et al.*, 1997 ; Enderlin *et al.*, 1997).

En résumé, de nombreux arguments sont aujourd'hui disponibles, impliquant les dysfonctionnements hormonaux dans l'apparition des troubles mnésiques liés au vieillissement. Les rétinoïdes participent à ces mêmes voies de signalisation. La littérature portant sur le vieillissement cérébral rend compte déjà de dysfonctionnements neurobiologiques impliquant des vitamines.

B_ Les hypothèses nutritionnelles du vieillissement

Si on invoque aujourd'hui des facteurs nutritionnels comme participant au processus de vieillissement cérébral, c'est tout d'abord parce que de nombreuses études épidémiologiques indiquent une prévalence importante de malnutrition chez les personnes âgées touchant par

exemple plus de 50% des individus admis en institution gériatrique. Les conséquences d'une telle dénutrition s'observent sur toutes les fonctions physiologiques avec une diminution des fonctions immunitaires, des anémies carenciales, une majoration des attaques radicalaires. Ces atteintes impliquent plus ou moins directement des déficiences multiples en micronutriments et plus particulièrement des vitamines (Jeandel *et al.*, 1996). Une corrélation a par ailleurs été démontrée entre le statut nutritionnel et les fonctions cognitives des sujets âgés (Lauque, 1995).

Déficiences en micronutriments et vieillissement cérébral

Les vitamines B₆, B₁₂ et les folates sont indispensables en tant que co-facteurs du métabolisme de l'homocystéine, acide aminé soufré dont l'accumulation peut être à l'origine d'une vasculopathie. L'homocystéine est impliquée dans la méthylation de nombreux accepteurs (myéline, phospholipides membranaires, neurotransmetteurs). La déficience en ces vitamines a été suggérée comme pouvant participer à l'apparition de perte neuronale. En 1992, l'équipe de Lewitt met en évidence une corrélation entre le score au MMS et les concentrations plasmatiques de vitamines B₁₂ chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Pour ces auteurs, un mécanisme physiopathologique commun sous-tendrait la déficience en vitamine B₁₂ et la perte neuronale soit par trouble de l'absorption ou du stockage, soit par augmentation de l'utilisation ou de l'excrétion de la vitamine B₁₂.

Théorie radicalaire du vieillissement cérébral

Cette théorie postule que le vieillissement est dû, au moins en partie, aux effets délétères des radicaux libres oxydant de façon incontrôlée les composants cellulaires (acides gras, ADN, protéines). Ces oxydations provoqueraient l'altération des activités enzymatiques, des fonctions de transport, des réactions récepteur-ligand et une perte de l'asymétrie de la bicouche lipidique membranaire et donc de la fluidité membranaire. De telles modifications, en altérant les canaux ioniques et le transport de neurotransmetteurs seraient à l'origine d'un dysfonctionnement neuronal. Le cerveau, de par ses constituants (acide gras polyinsaturés, structure membranaire, neurotransmetteurs catécholaminergiques...), serait très sensible aux attaques radicalaires. La vitamine E jouerait un rôle protecteur fondamental contre ces attaques radicalaires et les oxydations qu'elles engendrent : elle s'incorpore aux membranes, les stabilise et se comporte comme donneur d'hydrogène. Le cerveau, riche en vitamine E, a les capacités de régénérer la vitamine E à partir de la vitamine C. Ainsi, ces théories dites radicalaires attribuent le vieillissement cellulaire à une déficience du cerveau en vitamine C et E.

Ces théories impliquent les vitamines B, C et E dans le vieillissement cérébral et montre l'importance des facteurs nutritionnels pour l'activité normale du cerveau. Néanmoins, ces

théories ne mentionnent pas de mécanismes génomiques dans les effets physiologiques observés, le paragraphe qui suit apporte des arguments en faveur d'une implication d'un dysfonctionnement de la voie de signalisation nucléaire contrôlée par les rétinoïdes dans le vieillissement mnésique.

C_ La vitamine A et le vieillissement

Les données générales (physiologiques) concernant les interactions vitamine A et vieillissement sont à ce jour plutôt descriptives qu'explicatives.

Généralement la littérature décrit des changements de statut vitaminique A chez de nombreuses espèces. Globalement au cours du vieillissement, le métabolisme de la vitamine A est fortement perturbé et se caractérise notamment par des concentrations élevées de vitamine A hépatique (chez l'homme : McLaren *et al.*, 1979 ; chez le rat : Periquet *et al.*, 1986 et Dawson *et al.*, 2000 ; chez la souris : Sundboom et Olson, 1984). Ce phénomène d'accumulation excessive de vitamine A sérique est cohérent avec l'observation chez le rat âgé d'une augmentation du pourcentage et de la densité des cellules de stockage hépatique de la vitamine A (Ferland *et al.*, 1992). Cette augmentation de stock hépatique provoquerait la mise en place de mécanismes physiologiques compensateurs tel qu'une augmentation du passage de la vitamine A dans la circulation lymphatique (Hollander et Dadufalza, 1990). Ceci pourrait expliquer l'augmentation du rétinol sérique observée chez les hommes âgés à la suite d'un repas (Borel *et al.*, 1998). Parallèlement, l'activité hépatique de la l'ARAT (enzyme responsable de l'estérification du rétinol en rétinyl esters, forme de la vitamine A stockée) augmente avec l'âge ; à l'inverse l'activité de l'enzyme responsable de l'hydrolyse des rétinyl esters en rétinol, l'expression de la CRBP et du cytochrome P450 diminuent (Mobarhan, 1991).

Finalement, le vieillissement s'accompagnerait d'une modification importante du métabolisme de la vitamine A aboutissant à une accumulation de vitamine A dans l'organisme. Ces observations ont amené certains auteurs à considérer le vieillissement comme un modèle d'hypervitaminose et à examiner les effets neurotoxiques associés (Suter et Vetter, 1994). En 1993, Russell et Suter estimaient par ailleurs que les recommandations faites aux personnes âgées en matière d'apport alimentaire en vitamine A étaient trop importantes et pouvaient contribuer à accroître la toxicité liée à un excès de ce nutriment.

Ces phénomènes de dérégulations métaboliques associés au vieillissement se traduiraient par une biodisponibilité cellulaire réduite des métabolites actifs de la vitamine A (Enderlin *et al.*, 1997). Ils peuvent être tout autant la cause que la résultante de dysfonctionnement concomitant des voies de signalisation des rétinoïdes. En effet, les études menées notamment au laboratoire ont montré chez des rats âgés une diminution hépatique des ARN codant pour les TR α 1, TR β 1 et RAR β .

Parallèlement une réduction de l'activité enzymatique de la transglutaminase tissulaire, dont le gène est régulé par les rétinoïdes, a été observée. L'administration d'AR (mais pas de rétinol) à ces animaux âgés induit une augmentation significative du taux des ARN mesurés (Pallet *et al.*, 1997). Si le vieillissement se caractérise par une accumulation de vitamine A dans l'organisme, cette étude révèle une hypoexpression concomitante des voies de signalisation des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes qui peut être corrigée par l'administration d'AR. Le même profil de résultats a été observé dans le cerveau adulte de souris âgées (Enderlin *et al.*, 1997) : chez la souris, le vieillissement s'accompagne d'une hypoexpression (ARN) des gènes codant pour les TR α 1 et TR β 1, les RAR β et les RXR β/γ , ainsi que d'une diminution des ARNm codant pour la tTG et la neurogranine. Cette étude confirme par ailleurs l'effet ré-inducteur de l'administration d'AR sur ces indicateurs biochimiques cérébraux.

En résumé, le vieillissement cérébral se traduit non seulement par une modification des voies de signalisation des hormones thyroïdiennes, mais également par une altération du signal nucléaire rétinoïde. Les altérations de ces signaux nucléaires modulant l'expression de nombreux gènes devraient perturber fortement la synthèse de certaines protéines et par conséquent les fonctions cellulaires dans lesquelles ces protéines sont impliquées. Des études réalisées au laboratoire de Nutrition montrent ainsi que la teneur cérébrale en neurogranine est significativement diminuée au cours du vieillissement. Comme nous l'avons déjà mentionné, la neurogranine est une protéine assurant au sein de la cellule un rôle fondamental dans les cascades moléculaires sous-tendant les phénomènes de plasticité synaptique associés à certains processus mnésiques (Pak *et al.*, 2000, Fedorov *et al.*, 1995). La littérature rend également compte d'une diminution au cours du vieillissement du niveau d'expression de gènes régulés par les rétinoïdes et codant pour des protéines impliquées dans les phénomènes de plasticité synaptique (c'est le cas des récepteurs NMDA, Beczkowska *et al.*, 1996; Younkin *et al.*, 1993), et dans la survie cellulaire (pour le NGF, Scheibe et Wagner, 1992).

L'hypothèse générale qui découle de l'ensemble de ces observations est qu'un hypofonctionnement de la voie de régulation transcriptionnelle contrôlée par les rétinoïdes générerait des modifications d'efficacité synaptique qui participeraient au déclin des capacités mnésiques observé au cours du vieillissement. Une partie de notre travail consistera à mettre à l'épreuve cette hypothèse de travail.

TROISIEME PARTIE

OBJECTIFS DE NOTRE TRAVAIL

L'objectif principal de notre travail est d'étudier l'implication potentielle de la voie de signalisation des rétinoïdes dans les fonctions mnésiques.

La première partie de ce travail consistera à valider un protocole expérimental visant à objectiver chez la souris âgée un déficit mnésique spécifique et sélectif. Cette épreuve de discriminations d'emplacements, réalisée dans un labyrinthe radial est inspirée des expériences et propositions théoriques issues de la théorie de la mémoire relationnelle et/ou déclarative. Nous tenterons de préciser en quoi les paramètres comportementaux mesurés nous permettent d'objectiver chez l'animal âgé un déficit spécifiquement cognitif dont la sélectivité pourrait modéliser l'atteinte sélective de la mémoire déclarative chez le sujet âgé.

Dans la seconde partie de notre travail, nous tenterons de conforter nos interprétations des effets du vieillissement dans notre épreuve comportementale. Plus précisément, si notre paradigme comportemental permet d'objectiver chez la souris âgée une altération sélective de la mémoire relationnelle consécutive à un dysfonctionnement hippocampique, des animaux adultes porteurs d'une lésion bilatérale de l'hippocampe devraient présenter un déficit mnésique comparable. Cette étude visera donc à étudier les effets d'une lésion de l'hippocampe sur les performances mnésiques de souris jeunes adultes dans notre épreuve comportementale.

La troisième partie de notre travail vise à mettre à l'épreuve nos hypothèses opérationnelles postulant qu'un dysfonctionnement de la voie de signalisation des rétinoïdes devrait se traduire par une altération de certaines capacités cognitives. Nous utiliserons dans un premier temps le modèle physiopathologique du vieillissement se caractérisant par une hypoexpression de ce signal nucléaire. Nous étudierons les effets d'une administration d'AR (à une dose qui rétablit à un niveau normal l'expression de la voie de signalisation des rétinoïdes) sur un modèle de déficit de PLT hippocampique lié à l'âge. Finalement nous étudierons les effets de ce même traitement sur les performances mnésiques des souris âgées dans notre épreuve comportementale.

Une dernière étude complétera cette première démonstration. En induisant une déficience en vitamine A chez l'animal adulte par privation alimentaire de ce nutriment, nous tenterons de montrer qu'une hypoactivation de la voie de signalisation des rétinoïdes induite chez l'animal normal peut se traduire par un déficit mnésique comparable à celui observé chez la souris âgée dans notre épreuve de discriminations d'emplacements.

CHAPITRE II

MODELE DE DEFICIT MNESIQUE LIE AU VIEILLISSEMENT

CHAPITRE II

MODELE DE DEFICIT MNESIQUE LIE AU VIEILLISSEMENT

Bien que la plainte mnésique soit exprimée de façon très générale dans la population vieillissante, la caractérisation des troubles mnésiques liés à l'âge ainsi que leur modélisation chez l'animal ont posé un certain nombre de problèmes.

D'une part, les effets de l'âge sur les capacités cognitives et mnésiques ne sont pas globaux, mais présentent une certaine sélectivité (Poon, 1985; Eustache *et al.*, 1995). D'autre part, ces atteintes sélectives sont difficiles à mettre en évidence dans des épreuves comportementales, du fait d'une importante hétérogénéité interindividuelle (voir dans Van Der Linden et Hupet, 1994). Enfin la nature de certains déficits observés demeure difficile à définir du fait de l'influence potentielle de nombreux facteurs non cognitifs; en effet la réactivité émotionnelle, la motivation et les capacités perceptives sont également modifiées au cours du vieillissement. Ces difficultés permettent de rendre compte du manque de prédictibilité des modèles animaux couramment utilisés pour étudier les effets de l'âge sur la fonction mnésique. Ces considérations soulignent la nécessité de développer des paradigmes expérimentaux susceptibles de révéler, chez l'animal, des altérations associées au vieillissement qui soient spécifiquement cognitives d'une part, et sélectives pour certaines capacités mnésiques d'autre part.

La mémoire peut-être évaluée de diverses façons. Néanmoins, la grande majorité des études expérimentales menées chez l'Homme a utilisé une procédure en 3 étapes comprenant, 1) une phase d'acquisition au cours de laquelle les sujets sont exposés à un ensemble d'items, tel qu'une liste de mots, 2) un intervalle de rétention de durée variable et qui peut-être, ou non, occupé par la réalisation de tâches interférentes et 3) une phase-test au cours de laquelle la mémoire des items présentés au cours de la phase 1 est mesurée. Selon que la consigne donnée au sujet dans la phase-test fait, ou ne fait pas référence à la phase d'acquisition, l'épreuve évalue des composantes respectivement explicite (ou déclarative) et implicite (non-déclarative) de la mémoire. Ainsi les sujets amnésiques sont très sévèrement déficitaires dans la récupération volontaire et consciente

des informations préalablement acquises (désigner les mot-cibles parmi d'autres qui n'étaient pas inclus dans la liste initiale), mais ils présentent des performances normales lorsque la mémoire des mêmes informations est évaluée, à leur insu, au travers d'une modification comportementale résultante de la phase d'acquisition (accélération de l'identification perceptive des mots-cibles relativement aux mots non-inclus dans la liste, par exemple). A un moindre degré, cette dissociation est également observée chez les sujets âgés. Plus précisément, ce sont les épreuves d'évaluation de la mémoire déclarative dite «stratégique» qui révèlent les effets délétères les plus significatifs et constants, du vieillissement non-pathologique (Gabrieli, 1996).

La modélisation animale des effets de l'âge sur la mémoire humaine nécessiterait donc de dissocier expérimentalement les mémoires de l'animal par la seule manipulation de «la consigne» lors du test. En d'autres termes, plutôt que d'utiliser différentes épreuves comportementales pour objectiver les effets différentiels de l'âge sur les différentes formes de mémoire (approche classiquement utilisée), il s'agirait de développer des paradigmes comportementaux en plusieurs étapes (comme décrit ci-dessus) qui permettraient, dans la phase-test de la mémoire, d'«interroger l'animal» de diverses façons sur une série d'informations acquises dans une phase initiale.

L'une des façons de modéliser la mémoire déclarative chez l'animal est d'en opérationnaliser les caractéristiques non verbales. En s'inspirant des définitions opérationnelles formulées par Cohen (1984) (voir introduction première partie-VI), Eichenbaum et ses collaborateurs (1992) vont élaborer des protocoles expérimentaux et montrer qu'une lésion hippocampique chez le rat a des effets contrastés lors de l'acquisition de discriminations entre 2 odeurs (le rat doit répondre à celle qui est toujours associée au renforcement positif et éviter de répondre à l'autre odeur), selon que les odeurs sont présentées simultanément ou bien successivement (deux à la fois vs une par essai). En outre, après avoir acquis deux discriminations simultanées (A+ vs B- et C+ vs D-), les rats lésés sont incapables, contrairement aux animaux de contrôle, de discriminer deux odeurs familières présentées dans un nouvel appariement (A+ vs D- ou C+ vs B-). Ces résultats suggèrent que la seule manipulation du mode de présentation des informations (simultané vs successif, ou bien en arrangement nouveau vs familier) permet de solliciter des processus cognitifs différents, ne mobilisant pas l'hippocampe de la même façon.

Sur la base de ces observations, nous avons réalisé dans un labyrinthe radial à 8 bras, deux expériences indépendantes visant à évaluer les effets du vieillissement sur la fonction mnésique grâce à deux protocoles comportementaux différents. Ces deux épreuves comportent chacune deux étapes. Le but de la première étape est de faire apprendre à l'animal la valence respective (présence (+) ou non (-) d'un renforcement alimentaire) de 6 bras (3 bras + et 3 bras -). Cet objectif atteint, la deuxième étape consiste à modifier le mode de présentation de ces informations.

Dans le premier protocole comportemental, les 6 bras sont tout d'abord présentés par paire invariante (un bras de chaque paire est toujours appâté, l'autre ne l'est jamais) jusqu'à ce que l'animal discrimine les bras appâtés des bras non appâtés (en choisissant significativement plus souvent les premiers que les seconds). Les animaux qui réussissent cet apprentissage sont ensuite soumis à des essais-tests au cours desquels les bras qui étaient jusqu'alors présentés par paires invariantes vont conserver leur valence et vont être présentés soit un par un (discrimination successive) soit recombinaisonnés en une nouvelle paire (i.e. formée d'un bras + et d'un bras - issus de deux paires initiales).

Le principe de la seconde épreuve est d'abord (stade 1) de permettre à l'animal d'acquérir une connaissance séparée des informations (position de la nourriture dans le labyrinthe). Pour cela les 6 bras sont présentés successivement (un par un) à l'animal jusqu'à ce qu'il discrimine les bras appâtés des bras non appâtés. Ce niveau de discrimination est atteint lorsque le temps de décision pour s'engager dans les bras non appâtés est supérieur à celui mesuré pour s'engager dans les bras appâtés. L'animal est ensuite soumis à des tests (stade 2) dans lesquels il doit répondre par un choix à différentes situations combinant les informations initiales. Les bras précédemment présentés séparément conservent leur valence mais sont alors présentés simultanément (par paire incluant un bras + et un bras -).

PRINCIPAUX RESULTATS

Première expérience :

Dans la phase d'acquisition de l'épreuve, la majorité des animaux âgés (2/3) échouent dans l'apprentissage des discriminations simultanées d'emplacement. Néanmoins ceux qui parviennent à apprendre à discriminer le bras appâté de chacune des 3 paires, présentent une courbe d'acquisition et des performances en fin d'apprentissage comparables à leurs congénères jeunes adultes.

Les animaux âgés ayant réussi avec succès la phase initiale d'apprentissage, s'avèrent ultérieurement incapables, contrairement aux adultes, de choisir correctement le bras appâté lorsqu'ils sont confrontés dans la phase test à une paire nouvelle recombinaisonnée (i.e. c'est à dire composée de deux bras issus de deux paires familières). Par contre, ces mêmes animaux montrent, par le temps qu'ils mettent pour entrer dans chacun des bras, qu'ils discriminent les bras appâtés de ceux qui ne le sont pas, lorsque ceux-ci sont présentés l'un après l'autre lors de cette même seconde phase. En d'autres termes, dans ces situations test, les animaux âgés échouent de façon dramatique lorsqu'il s'agit de répondre à de nouvelles combinaisons d'informations familières alors qu'ils présentent des réponses comparables à leurs congénères adultes lors des présentations séparées des items familiers.

Seconde expérience :

Nos résultats montrent très clairement que, les souris âgées témoignent d'une acquisition normale de la connaissance séparée des bras du labyrinthe. Au cours de cette phase d'acquisition, aucune différence n'est observée entre les animaux jeunes adultes et âgés qui ne se distinguent, ni par leur vitesse d'acquisition, ni par le rapport de discrimination atteint à la fin de ce stade.

Lors de la phase test, dans laquelle les bras sont présentés simultanément par paire, les animaux âgés, contrairement aux jeunes adultes répondent au hasard. Ils s'avèrent incapables de choisir, entre deux bras familiers, celui qui contient la nourriture et se comportent comme s'ils n'avaient aucune expérience préalable des informations.

Dans l'ensemble, les résultats issus de ces deux expériences montrent que seules les performances en situation de choix (discriminations simultanées par paire) sont affectées par le vieillissement, mais qu'y compris dans la situation où l'animal a d'abord eu l'expérience de choix sur des paires (phase d'acquisition de la première expérience), il reste capable dans la phase test de discriminer correctement les deux bras présentés séparément.

Ces premières données sont confortées par des analyses supplémentaires relatives aux latences de parcours dans les bras (temps mis par l'animal entre le moment où il s'est engagé dans le bras, jusqu'à l'atteinte de la mangeoire). L'animal témoigne de ces capacités discriminatives lorsque ses latences de parcours dans les bras appâtés sont inférieures à celle dans les bras non appâtés. En usant de ce paramètre comportemental, les résultats montrent de la même façon, dans les deux expériences, que le vieillissement n'altère pas significativement les performances en discriminations successives (aussi bien en phase d'acquisition qu'en phase test) , mais détériorent les performances évaluées dans les discriminations simultanées par paire.

Ces observations nous conduisent à penser que choisir entre deux informations familières présentées selon un nouvel arrangement et répondre à chacune d'entre elles présentée séparément ne mobilisent pas les mêmes processus cognitifs, ces derniers étant différemment sensibles aux effets de l'âge. Ces données sont cohérentes avec les résultats obtenus chez le rat porteur d'une lésion du fornix soumis à aux épreuves de discriminations d'odeurs (Eichenbaum *et al.*, 1988 ; 1989).

Dans le cadre théorique développé par Eichenbaum et ses collaborateurs (1996), la résolution des problèmes posés dans une épreuve de discrimination simultanée (et dans toute épreuve évaluant la flexibilité d'utilisation des informations mémorisées) reposerait sur la capacité à comparer et opposer (se représenter) les conséquences de chacune des deux alternatives possibles. Ces opérations seraient dépendantes de la formation de représentations relationnelles des items

mémorisés. Seules ces représentations permettraient une comparaison et une opposition entre des items acquis séparément et donc une utilisation flexible des acquis. Leur élaboration serait donc indispensable aux propriétés fondamentales de la mémoire déclarative humaine et nécessiterait l'intégrité de la formation hippocampique.

La sélectivité du déficit observé chez nos animaux âgés pourrait être liée à l'altération des processus de formation de représentations relationnelles des informations acquises, représentations relationnelles qui sous-tendraient la mémoire déclarative. Les épreuves que nous avons mises au point ont donc permis de dissocier deux formes de mémoire différenciellement altérées par le vieillissement, en manipulant la façon dont on présente les informations précédemment acquises. Ces modèles permettent ainsi d'objectiver un déficit spécifiquement cognitif dont la sélectivité pourrait modéliser l'atteinte sélective de la composante déclarative de la mémoire chez le sujet âgé humain.

Nous utiliserons le protocole expérimental de la seconde expérience (phase d'acquisition/discriminations successives et phase test/discriminations simultanées) pour tester les hypothèses relatives à l'implication de la voie de signalisation des rétinoïdes dans la fonction mnésique. L'autre modèle comportemental présente quelques limites d'application expérimentales liées au fait que plus de la moitié des animaux âgés échouent dès l'apprentissage initial.

Au préalable, nous avons tenu à préciser nos interprétations relatives à la nature du déficit lié à l'âge objectivé dans cette épreuve comportementale. Pour cela, nous avons étudié les effets des lésions hippocampiques sur ce type de tâche.

Knowing which and knowing what: a potential mouse model for age-related human declarative memory decline

Aline Marighetto, Nicole Etchamendy, Khalid Touzani, Cedric Cortes Torrea, Benjamin K. Yee,¹
John Nicholas P. Rawlins² and Robert Jaffard

CNRS, UMR-5807, Lab. Neurosciences Comportementales & Cognitives, Avenue des Facultés, 33405 Talence Cedex, France

¹Department of Anatomy, Faculty of Medicine, The University of Hong Kong, 5 Sassoon Road, Pokfulam, Hong Kong, China

²Department of Experimental Psychology, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3UD, UK

Keywords: ageing, radial maze, relational processing, simultaneous discrimination, successive discrimination

Abstract

The present study was built on the original report of Eichenbaum *et al.* [Eichenbaum, H., Fagan, A., Mathews, P. & Cohen, N.J. (1988), *Behav. Neurosci.*, **102**, 3531–3542] on the contrasting effects of fornix lesion in different versions of an odour-guided discrimination task in rats, and attempted to extend this into a mouse model for the preferential loss of declarative memory seen in human senescence. Each of the two experiments reported here consisted of a two-stage paradigm, with an initial learning phase followed by a test phase. The information acquired in the first stage was identical in both experiments, i.e. the valence or reward contingency associated with six (three positive and three negative) arms of a radial maze. The only parameter which was varied between Experiment A and B, and also between the two successive stages within each experiment, was the way of presenting the arms to the mice, i.e. either in pairs (simultaneous discriminations) or one at a time (successive go: no-go discrimination). Performance in the first stage demonstrated that our aged mice were impaired in learning concurrent simultaneous discriminations but not successive go/no-go discrimination, thereby resembling that reported in rats with hippocampal damage. Most importantly, our present set of data supports the conclusion that two forms of memory expression for the same piece of acquired experience can be assessed in the same subjects by manipulating the way of presenting two arms that were previously experienced separately. These two forms of memory expressions are differentially affected in aged mice, thereby demonstrating the highly selective and specific deleterious effect of ageing.

Introduction

Mnemonic decline associated with normal ageing is of increasing concern in developed countries as the life expectancy continues to improve. Although the magnitude and specificity of this decline may vary amongst individuals, memory loss is one common sign of progressive cognitive weakening in non-demented elderly, and its presence in patients with Alzheimer's disease often emerges in the early stages of the disease (Crook *et al.*, 1986; Craik & Jennings, 1992). This is why the possible development of pharmacological interventions (e.g. 'cognitive enhancers') that offer to arrest or even to alleviate such mnemonic decline has come under intense investigation. The development of animal models of age-related decline in human cognitive functions represents a critical step in any such attempt. As noted by Olton *et al.* (1992), the best strategy to optimize the development of satisfying models is to design behavioural tasks that focus on specific cognitive processes. The present study represents an attempt in this direction.

First, we considered the question regarding the nature of the cognitive decline in non-demented aged individuals. The neuropsychological profile of such cognitive decline is rather broad, but aspects of mnemonic deficits could be delineated with respect to two proposed neural circuitries (cf. Gallagher & Rapp, 1997). Firstly, the

contrast between the poor performance on standard declarative memory tasks, and the sparing of remote and immediate memory appears to parallel the general features associated with medial temporal lobe amnesia (Craik & Jennings, 1992). Secondly, many of the most prominent and consistent signs of age-related cognitive decline are indicative of a reduction in the information processing capacities attributed to the prefrontal cortex (for a review, see Rapp & Heindel, 1994; Shimamura, 1994). The present study was aimed at investigating declarative memory capacities in aged mice.

Declarative memory is originally defined in humans as the memory of facts and events that is subjected to verbal reflection or other explicit means of expression. This contrasts with procedural memory, which is defined as the non-conscious acquisition of a bias or adaptation that can be revealed by implicit measures of performance (Cohen & Squire, 1980; Graf & Schacter, 1985; Squire, 1992). Furthermore, there is a general consensus that human declarative memory requires the integrity of the hippocampal formation and neighbouring medial temporal lobe structures (Squire & Zola, 1998; but also see Tulving & Markowitsch, 1998; Mishkin *et al.*, 1998). This has led some to equate declarative memory to medial temporal lobe-dependent memory and the attempts to construct animal models of declarative memory loss using lesions targeted at these structures. An alternative approach of modelling declarative memory in non-human species is to capture and operationalize the defining psychological characteristics of declarative memory for testing in animals, which does not require verbal declaration from the subjects.

Correspondence: Dr A. Marighetto, as above.
E-mail: a.marighetto@neurocog.u-bordeaux.fr

Received 28 January 1999, revised 16 April 1999, accepted 28 April 1999

Cohen (1984) has identified two distinct 'non-verbal' characteristics for declarative memory that have been instrumental in the efforts by Eichenbaum and colleagues (Eichenbaum, 1992) in developing behavioural tests designed to assess declarative memory in rodents. Firstly, declarative memory is distinguished by its role in comparing and contrasting items in memory, whereas non-declarative (procedural) memory involves facilitating particular routines for which no such comparisons are executed. Secondly, declarative memory is distinguished by its capacity to support inferential use of memories in novel situations. The presently reported experiments are based on the earliest paradigms devised by Eichenbaum's team to investigate these two typical characteristics of declarative memory in normal and hippocampal rats.

Namely, these authors (Eichenbaum *et al.*, 1988, 1989) observed that hippocampal damage preferentially impairs performance in those task variants that emphasize comparison of items (as in simultaneous discrimination in which the subject was presented with two odours at a time and required to choose the positive one; e.g. A+ and B-, C+ and D-, etc), while sparing performance in those variants that encourage separate representations for individual items (as in successive go/no-go discrimination in which the subject was presented with one odour at a time and required to respond to each odour in turn; A+, B-, etc). Furthermore, even for those hippocampotomized rats that were able to normally acquire the simultaneous discrimination tasks, a significant deficit could still be revealed in the flexible use of acquired memories when they were challenged with a rearrangement of familiar items (recombination: A+ and D-, B- and C+, etc), as they failed to show a preference for the positive odour whereas control rats did. The authors interpret this set of results as support for their assertion that declarative memory is supported by a relational representation of past experiences. In their view, such a representation is a result of the hippocampal-dependent processing of comparisons among items experienced, thus allowing flexible access to memories.

Recently, more specific behavioural paradigms, e.g. tests of transitive inferences, have been developed to assess relational memory in animals (Bunsey & Eichenbaum, 1996; Dusek & Eichenbaum, 1997). One such attempt by Rapp *et al.* (1996) provided evidence for the suggestion that the representational abilities supposed to be fundamental to declarative memory might be altered in aged monkeys. One major disadvantage of these paradigms, however, is that the procedure involved requires extensive periods of training, thus hindering their utilization in routine investigations. The present study included two task designs for a more rapid assessment of declarative memory in mice.

The tasks consisted of unambiguous discriminations between pairs of arms in a radial maze, the individuals of each pair being presented simultaneously or successively. Although these tasks can theoretically be solved on the basis of elemental associations, the highly specific hippocampal deficit demonstrated by Eichenbaum *et al.* (1988, 1989) suggests that different cognitive processes could be selectively engaged or disengaged simply depending on how the discriminanda are presented. This implies that manipulations of this kind could enable the selective assessment of declarative or procedural memory using a within-subjects design. Using this strategy, we presented two experiments designed to evaluate whether aged mice would exhibit a preferential impairment in declarative/relational memory.

This work was previously published in an abstract form (Marighetto *et al.*, 1997) (Society for Neuroscience Meeting, New Orleans, 1997).

Methods

Subjects

Subjects were naive mice of the C57/bl6 Jico inbred strain obtained from IFFA Credo (Lyon, France). They were either 21–23 months old (aged group) or 4–5 months old (adult group). Upon arrival they were caged in groups and housed in a climatized animal-keeping room, maintained under a 12:12 light:dark cycle and *ad lib* food and water. After 4–6 weeks, the animals were caged singly. A fortnight later, food deprivation was introduced progressively, and each animal was eventually given a fixed amount of laboratory food chow per day with their body weight maintained at a stable level, ~90% of the free feeding weight.

Experiments were performed in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

Apparatus

The apparatus was a fully automated, elevated, eight-arm radial maze. Its dimension and construction have been fully described before (Marighetto *et al.*, 1993). The movement of each door, located at the entrance to each arm, was controlled by a computer programme which also tracked continuously the position of the subject within the maze. This enabled a real-time control of the accessibility to the maze arm(s) according to a predetermined test schedule.

Behavioural procedure

Shaping

Prior to training on the discrimination task, the animals were habituated to the apparatus over a period of 2 days. On each of these days, individual subjects were allowed to move freely in the maze until all the food (pellets) from each of the eight pre-baited arms was collected.

Discrimination tasks

Each subject was separately assigned six adjacent arms. Out of these, three served as positive (baited) arms, and the remaining three served as negative (not baited) arms. The relative locations of these arms were such that these six arms could be grouped into three pairs of arms with opposing valence (pairs A, B and C, Fig. 1). In addition, it was ensured that if the positive arms of pairs A and B were on the left (or right), the positive arm of pair C had to be on the right (or left).

The design of Experiments A and B is summarized in Fig. 1.

Experiment A

Stage 1. The six arms were grouped into three pairs. In each trial, the subject was confronted with access to two adjacent arms with opposing valence (either of pairs A, B and C). A choice was considered to be made when the subject had reached the food well of an arm; this also triggered the closure of the door to the alternative arm. The trial was finished as soon as the subject returned to the central platform. The subject was then confined to the central platform for 5 s before the next discrimination trial began: this constituted the inter-trial interval. Each daily session consisted of 20 consecutive trials comprising alternate presentations of pairs A, B and C according to a pseudo-random sequence.

Choice accuracy was measured by percentage correct. A mouse was considered to reach criterion performance when its overall choice

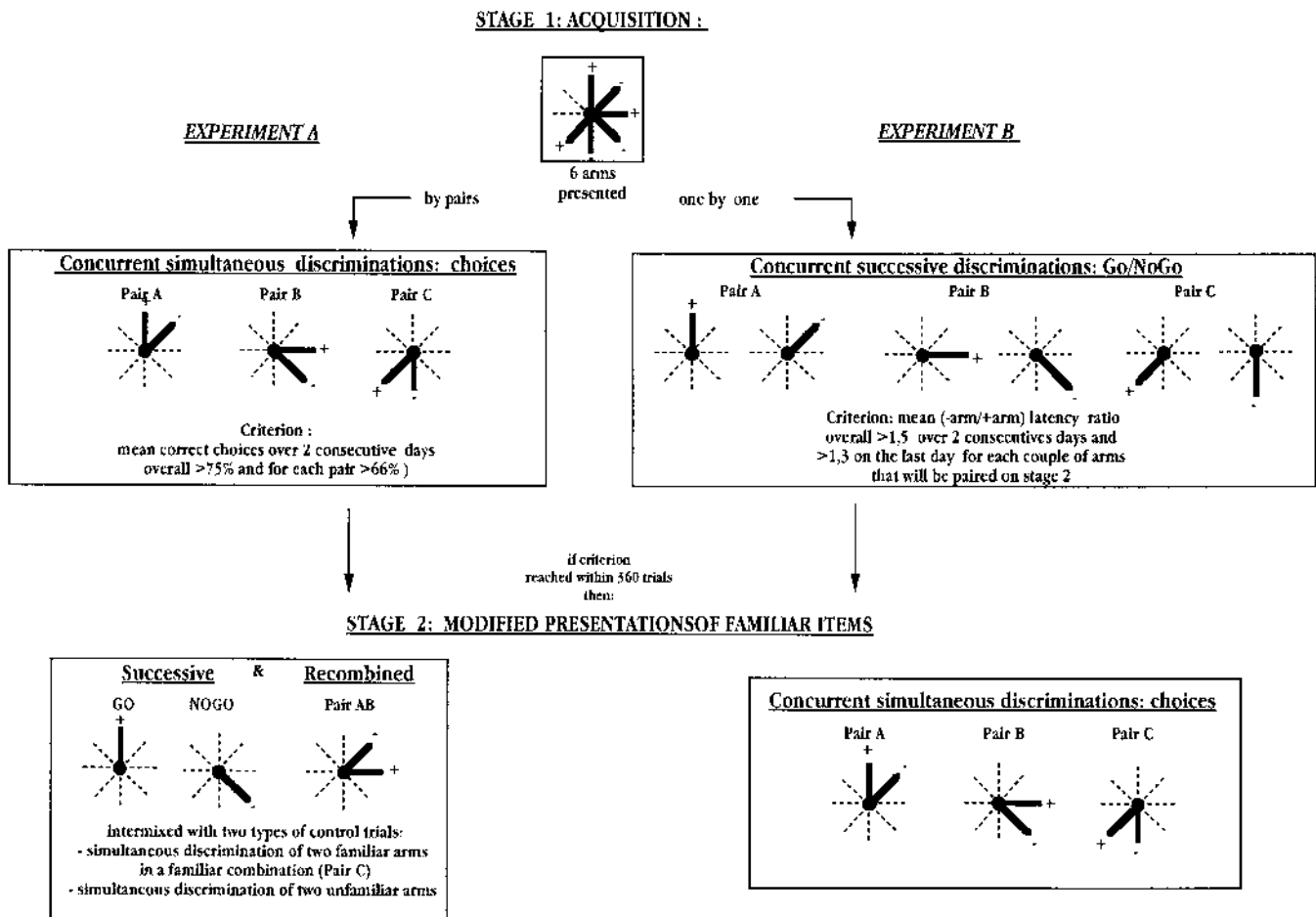


FIG. 1. Designs of Experiment A (on the left) and Experiment B (on the right).

accuracy was at or above 75% over two consecutive sessions given that performance in each of the three discrimination problems was at least 66% correct. The second stage of training commenced on the following day when a mouse had attained criterion performance.

Out of the 19 adult mice and 17 aged mice employed in this stage of training, all adults successfully reached criterion performance, but only six aged mice (i.e. 35.3%) were able to do so within the 16 sessions allowed. The aged mice that failed to reach criterion performance were dropped from further testing.

Stage 2. This lasted for four consecutive days. The discrimination problems presented in stage 2 were between the same discriminanda as in stage 1: the reward contingency of the discriminanda remained unchanged, but their presentation was modified. There were four types of trials. In the critical test trials, two choice arms of opposing reward valence, each taken from a different discrimination problem featured in stage 1, were presented either one at a time or simultaneously as members of a novel pairing. These corresponded to a successive go–no-go discrimination and a ‘recombined’ two-choice discrimination, respectively. These critical test trials were intermixed with two other types of (control) trials. These were: a simultaneous discrimination pair that had previously been presented in stage 1 (i.e. the ‘familiar’ two-choice discrimination, pair C); and a simultaneous discrimination problem between two adjacent arms

where neither had been featured in stage 1 (i.e. a ‘novel’ two-choice discrimination).

Choice accuracy in simultaneous discrimination was again measured by percentage correct. An equivalent measure was not possible for successive discrimination trials, and discriminative performance was indexed by the ratio between the median latency to enter negative (non-rewarded) and positive (rewarded) arms. This ratio contrasts the readiness of a subject to enter negative arms relative to positive ones. A ratio of unity indicates chance performance or no preference. When this ratio is well above unity, it indicates that the subject is more ready to enter the positive arms and/or more reluctant to enter the negative ones. In such trials, the door of the chosen arm remained open for a maximum of 60 s. If the animals failed to enter within this period of time, the trial was ended, and a latency of 60 s was recorded.

Experiment B

Stage 1. In this stage, the six arms were always presented one at a time using a go–no-go discrimination procedure (Fig. 1). In each trial, the door to only one arm (which could be a positive or negative one) was open, and remained so for a duration of 120 s; this was later reduced to 20 s as training progressed. If the subjects failed to enter the arm in this period, the door was closed and the trial ended. Each daily session consisted of 24 trials with four presentations of each of

the six arms according to a pseudo-randomized sequence. As described above, choice accuracy in such go-no-go discrimination trials was indexed by a ratio between the median latency to enter negative arms and positive arms.

Eight naive adult and eight naive aged mice were trained until they reached criterion performance when stage 2 would follow the next day. A mouse was considered to have attained criterion performance when its overall discriminative ratio was >1.5 for two consecutive sessions, and provided that the discriminative ratio of each of the three adjacent pairs (A, B and C) was >1.3 on the last day of stage 1 training. All subjects attained criterion performance.

Stage 2. Again, in the second stage of this experiment, the presentation of the discriminanda was modified. It lasted for 2 days. The six arms were now grouped into, and presented as, three adjacent pairs (A, B and C). Each session comprised 20 trials of these simultaneous two-choice discriminations, designed exactly as in stage 1 of Experiment A. Accuracy was measured by percentage correct.

Supplementary analysis

Further behavioural analysis of the animal's performance at each stage of both experiments (A and B) was conducted using a measure which could be obtained in both successive and simultaneous discrimination trials. This was the run time, defined as the time taken to traverse from the entrance to the food well of a chosen arm. Performance was indexed by the (differential) run time in positive (rewarded) arms and in the negative arms (non-rewarded). Additional analyses based on this measure complemented the analyses on choice accuracy in two ways. (i) This measure allowed a more direct comparison of performances on simultaneous and successive discriminations, because it was derived from the same approach response. (ii) This measure enables us to evaluate the animals' behaviour after the initiation of an approach response. In contrast, both percentage correct (in simultaneous discrimination) and ratio of entry latency (in successive discriminations) corresponded more closely to what took place (overtly or covertly) prior to the initiation of the approach response.

Results

Main analysis: accuracy as measured by percentage correct (simultaneous discrimination) or latency ratio (successive discrimination)

Experiment A

Stage 1. All 19 adult mice acquired the three pairs of simultaneous discrimination (mean number of trials to criterion: 192), but only 35.3% (six out of 17) of aged mice managed to reach the criterion performance with a mean number of trials to criterion of 240. Aged mice that succeeded in reaching the original criterion ($n=6$) will be referred to as 'unimpaired aged', whereas those which failed to reach this criterion ($n=11$) will be referred to as 'impaired aged'. Analysis on the number of trials needed to achieve the criterion did not yield significant difference between the adult and 'unimpaired aged' groups (one-factor ANOVA: $F < 1$).

Performance in terms of percentage correct over the last six sessions prior to attainment of criterion for the adult group and the 'unimpaired' subset of the aged mice was illustrated in Fig. 2. It included the acquisition curve for the 'impaired' members of the aged group over the last six sessions of stage 1. The performance within this range was submitted to a 2×6 ANOVA with the between-subjects factor age (adults versus aged) and the within-subjects factor

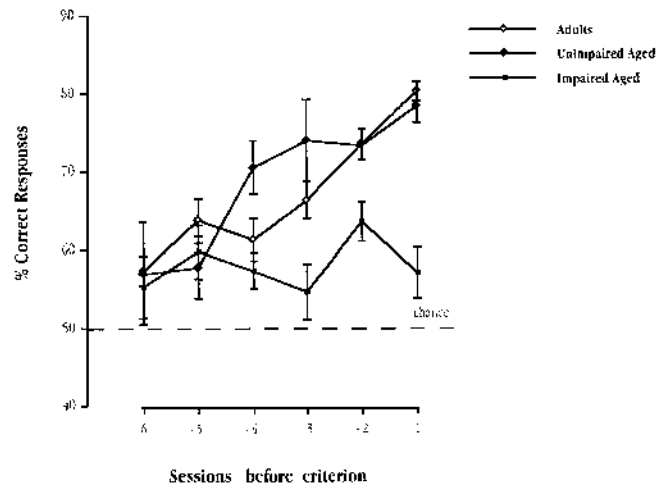


FIG. 2. Percentage of correct responses (choice of the positive arm) in each of the three groups of mice. Adult ($n=19$), aged unimpaired ($n=6$) and aged impaired ($n=11$), over the last six sessions prior to the attainment of criterion performance in stage 1 of Experiment A (three-pair concurrent simultaneous discriminations).

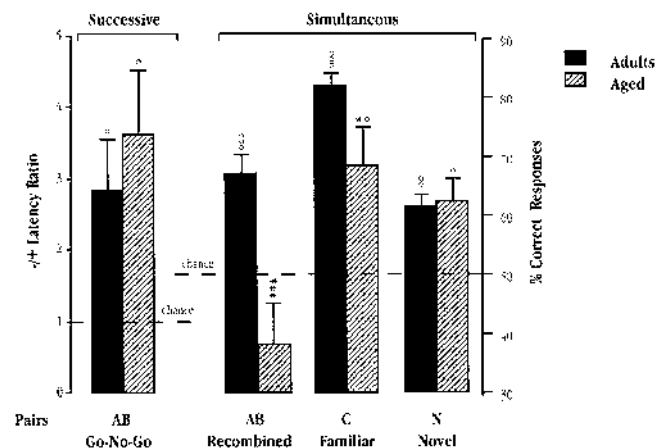


FIG. 3. Comparisons of the performances of aged ($n=6$) and adult ($n=19$) mice in the different conditions of testing in stage 2 of Experiment A (four sessions). At that stage the aged group comprised only those aged mice which had reached the predetermined criterion of accuracy at the end of stage 1 (therefore referred to as unimpaired aged group in the results). There were two critical test conditions: two arms (one positive, one negative) which were featured in different pairs in stage 1 (pairs A and B) were presented simultaneously in recombined trials or successively in go-no-go trials. These critical test trials were intermixed with two types of control trials: a simultaneous discrimination that had previously been presented in stage 1, i.e. the 'familiar' pair C and a simultaneous discrimination between two adjacent arms that had not been featured in stage 1, i.e. the 'novel' pair. Choice accuracy for each group was expressed as mean percentage correct for simultaneous discrimination, as the mean ratio between the median latency to enter negative against positive arms for successive go-no-go discrimination. * $P < 0.05$ versus adults; *** $P < 0.001$ versus adults; $^{\circ}P < 0.05$ versus chance; $^{\circ\circ}P < 0.01$ versus chance; $^{\circ\circ\circ}P < 0.001$ versus chance.

sessions. It revealed a significant effect of age ($F_{1,34}=7.53$, $P=0.01$) and its interaction with sessions ($F_{5,170}=2.81$, $P < 0.05$).

A second analysis was carried out with a different between-subjects factor, group, with three levels (adults, unimpaired aged and impaired aged), and the same within-subjects factor, session. This again revealed significant effect of group as well as its interaction with session. Further restricted analyses revealed that these

significant effects were solely attributed to the inferior performance of the impaired aged group, because only exclusion of this group would eliminate the statistical significance of the main effect of group and its associated interaction terms (adults versus unimpaired aged: group $F < 1$, sessions $P < 0.001$, group \times session, $P > 0.10$; an ANOVA without the unimpaired aged group: adults versus impaired aged: group $P < 0.001$, group \times session $P = 0.001$; an ANOVA without the adult group: unimpaired aged versus impaired aged: group $P < 0.001$, group \times session $P < 0.05$).

Stage 2. There were two critical test conditions in this stage (see Procedure above). They are the 'recombined' trials and the comparison of the readiness to enter the same two arms when they were presented one at a time in a successive go-no-go manner. As illustrated in Fig. 3, the performance of the aged mice was strikingly different between these two discriminative test conditions: they were severely impaired in the 'recombined' trials ($P < 0.001$) relative to controls, while performing close to control level in the go-no-go trials ($F < 1$). Indeed, their performance in the 'recombined' trials was not different from chance level.

In one of the control conditions (condition N in Fig. 3, also see Procedure) when the mice were required to learn a simultaneous discrimination between two novel arms not featured in stage 1, the aged mice performed as well as controls ($F < 1$). In the other control condition (condition C in Fig. 3) which featured a simultaneous discrimination pair previously featured in stage 1, the aged group was slightly but significantly impaired relative to adult controls ($P < 0.05$). However, the aged mice were still clearly performing at well above chance level ($P < 0.05$).

Performance (percentage correct) over the three test conditions of simultaneous discrimination was subjected to an ANOVA with the between-subjects factor age, and the within-subjects factors conditions and sessions. This yielded significant effects of age ($F_{1,23} = 14.40$; $P < 0.001$), conditions ($F_{2,46} = 23.40$; $P < 0.001$) and their interaction ($F_{2,46} = 10.63$; $P < 0.001$). No other effect attained statistical significance. Interestingly, although the aged group was slightly but significantly impaired in the control condition C, this impairment was actually magnified by the difficulty of the recombined condition AB, as indicated by a significant age-condition interaction ($F_{1,23} = 6$; $P < 0.05$) using a two-way ANOVA restricted to these two conditions C and AB. A separate ANOVA (with the same between-subjects factor and one within-subjects factor: reinforcement, i.e. whether a given arm was positive or negative) was used to analyse the median latency in the go-no-go discrimination (condition AB: go-no-go in Fig. 3). This revealed significant overall discrimination between the two arms (reinforcement: $F_{1,23} = 9.07$; $P < 0.01$). Neither the main effect of age nor its interaction with reinforcement attained statistical significance (both $F_s < 1$).

Experiment B

Stage 1. It took an average of 163 trials for the adult controls and 195 trials for the aged mice to reach the criterion level of performance. There was no significant group difference on this measure of performance ($F < 1$). Figure 4 depicts the mean median latency to enter the positive and negative arms over the last six sessions of training prior to reaching criterion. For both groups, the latency to enter between positive and negative arms continued to diverge as training progressed.

The latency measure was also subjected to an ANOVA with the between-subjects factor: age; and within-subjects factors: reinforcement and sessions. This yielded a significant effect of age ($F_{1,14} = 5.47$, $P < 0.05$), as the aged group took longer to enter an

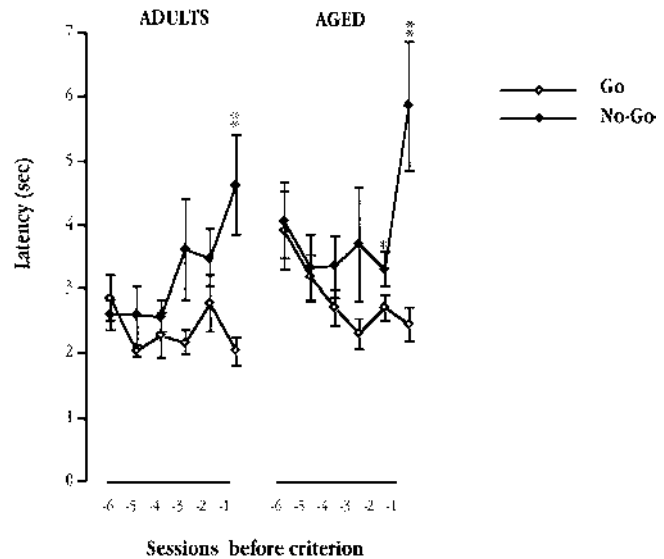


FIG. 4. Evolution of the mean median latency to enter the positive and negative arms over the last six sessions of training prior to reaching criterion in stage 1 of Experiment B (concurrent successive discriminations) for the adult ($n = 8$) and aged ($n = 8$) groups of mice. * $P < 0.05$ versus Go; ** $P < 0.01$ versus Go.

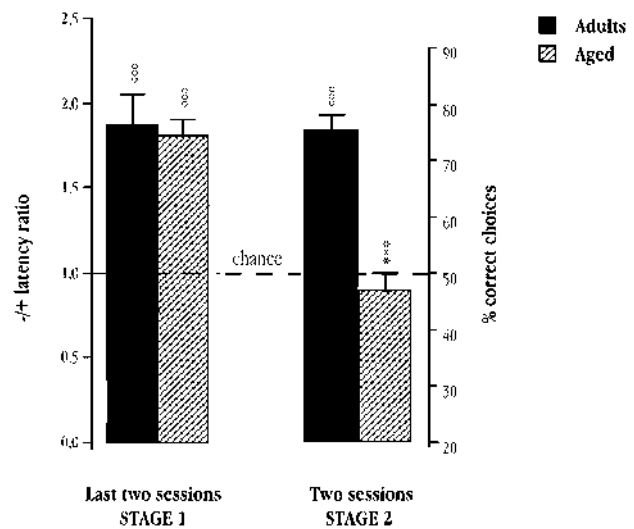


FIG. 5. Comparisons of aged ($n = 8$) and adult ($n = 8$) mice in Experiment B. On the left, the overall performance on successive discrimination (over the last two daily sessions of stage 1) was expressed as the mean ratio of median entry latency of negative against positive arms. On the right, the overall performance on the three-pair simultaneous discrimination (over the two daily sessions of stage 2) was expressed as mean percentage correct. *** $P < 0.001$ versus adults; °°° $P < 0.001$ versus chance.

arm in general regardless of its reward valence. The main effects of reinforcement ($F_{1,14} = 45.75$; $P < 0.001$) and its interaction with sessions ($F_{5,70} = 6.88$; $P < 0.001$) were also significant. There was no evidence for any significant interaction between age and reinforcement ($F < 1$), suggesting that both groups showed similar discrimination between the positive and negative arms.

Stage 2. The mice were confronted with three simultaneous discriminations composed of the six arms presented individually to them in the previous stage. This led to a pronounced impairment in

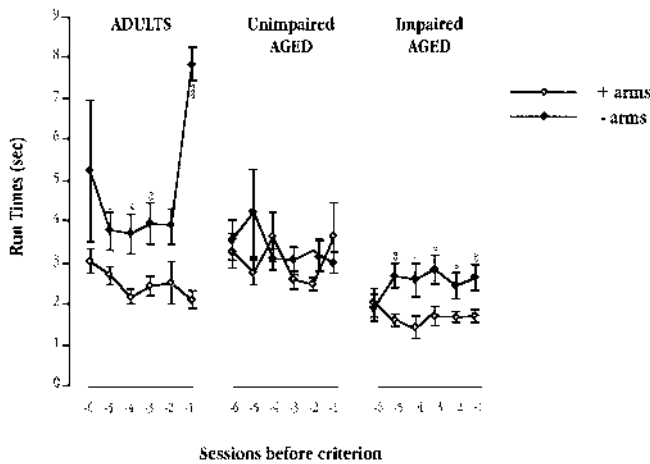


FIG. 6. Evolution of the mean run time in positive (correct choice) and negative (incorrect choice) arms over the last six sessions of training in stage 1 of Experiment A (three-pair concurrent simultaneous discriminations) for each of the three groups of mice: adults ($n=19$), aged unimpaired ($n=6$, subjects which had reached the criterion of choice accuracy at the end of stage 1) and aged impaired ($n=11$, subjects which did not reach the predetermined criterion of choice accuracy at the end of stage 1). The mean percentage of correct choices for each group in each of these six final sessions was depicted in Fig. 2. $^{\circ}P<0.05$ versus + arms; $^{\circ\circ}P<0.01$ versus + arms; $^{\circ\circ\circ}P<0.001$ versus + arms.

the aged group. Unlike adults, they failed to choose correctly between the arms with opposite valence. Figure 5 contrasts this specific age-related deficit with normal performance in successive discriminations (left panel) and close to chance level performance in simultaneous discriminations of the same set of arms (right panel).

An ANOVA of the percentage correct scores (with the between-subjects factor age and within-subjects factor sessions) revealed a significant effect of age ($F_{1,14}=43.74$, $P<0.001$) with no other effects attaining statistical significance.

Supplementary analysis: accuracy as reflected in run speed

We contrasted the run time (defined as the time taken to traverse from the entrance to the food well of an arm) between positive (a correct choice) and negative arms (of an incorrect choice).

Experiment A

Stage 1. Figure 6 illustrates the mean run time in the positive and negative arms across the final six daily sessions prior to attainment of criterion performance at the first stage of Experiment A. Three separate groups were depicted: adults, aged ‘unimpaired’ consisting of those aged mice that had reached criterion performance, and aged ‘impaired’ comprising the aged mice that failed to attain criterion performance. A differential run speed between positive and negative arms can be readily seen in the adult group. Surprisingly, this was absent in the aged ‘unimpaired’ group, yet it was readily discernible in the aged ‘impaired’ group.

Run speed over the last six sessions of stage 1 was subjected to an ANOVA with the between-subjects factor age and the within-subjects factors: reinforcement (whether the arm was positive or negative) and session. This yielded a significant effect of reinforcement ($F_{1,34}=17.09$; $P<0.001$). The effect of age and its interaction with reinforcement were also close to statistical significance ($P=0.054$ and 0.055 , respectively). Further restricted analyses indicated that a significant effect of reinforcement was present in both the adult ($P<0.01$) and ‘impaired’ aged group ($P<0.01$) but not in the

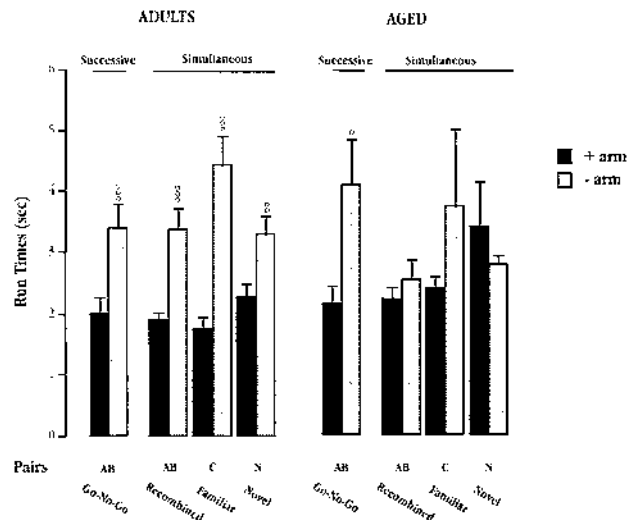


FIG. 7. Mean run time in positive and negative arm for each condition of testing (the two critical test conditions: go–no-go versus recombined trials and the two control conditions: familiar pair C and novel pair) in the second stage of Experiment A (four sessions), for the adults ($n=19$, on the left side) and aged ($n=6$, subjects who had reached the criterion of accuracy at the end of stage 1, on the right side) groups. $^{\circ}P<0.05$ versus + arm; $^{\circ\circ}P<0.01$ versus + arm; $^{\circ\circ\circ}P<0.001$ versus + arm.

‘unimpaired’ aged group ($F<1$), supporting the conclusion that this interaction was mainly due to the ‘unimpaired’ aged subjects. However, the conclusion that the ‘unimpaired aged’ subgroup failed to display a discriminative pattern in run speed must be taken with caution in view of the sample size of this group ($n=6$) and the number of available trials for each type of response (specifically, the number of available data on incorrect choices was much lower than that of the ‘impaired aged’ subgroup).

Stage 2. As shown in Fig. 7, the adult group maintained a clear differential run speed between positive and negative arms regardless of the condition, including the novel pair condition which was only exposed to the animals for four daily sessions. In contrast, the aged group (comprising the mice that had reached criterion performance in the first stage, i.e. the ‘unimpaired’ aged group referred to above) showed a less consistent pattern. Significant difference in run speed between positive and negative arms was only detected in the successive go–no-go trials. Although a trend was present in the familiar pair (see Fig. 7), it failed to attain statistical significance.

An ANOVA of the run speed in the go–no-go condition with the between-subjects factor age and the within-subjects factor reinforcement was performed. It yielded a significant effect of reinforcement but no effect of age or its interaction ($F<1$ in both cases). An ANOVA (including a second within-subjects factor: condition) was also performed on the run times relative to the different tests of simultaneous discriminations. There was again a significant effect of reinforcement ($F_{1,23}=25.65$; $P<0.001$), but now its interaction with age was also significant ($F_{1,23}=11.13$; $P<0.01$), which arose because only the adult subjects displayed a significant differential run speed between positive and negative arms in the simultaneous conditions. No other effects reached the statistical significance except the reinforcement–condition interaction ($F_{2,46}=5.32$; $P<0.01$), which was mainly due to the difference between the familiar and novel conditions.

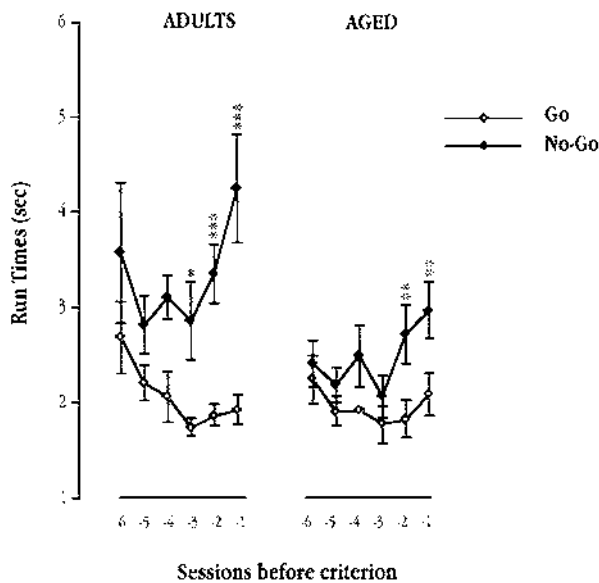


FIG. 8. Evolution of the mean run time in positive and negative arms over the last six sessions prior to reaching the predetermined criterion of accuracy at stage 1 of Experiment B (concurrent successive discriminations), for the adults ($n=8$) and aged ($n=8$) subjects. ** $P<0.01$ versus Go; *** $P<0.001$ versus Go.

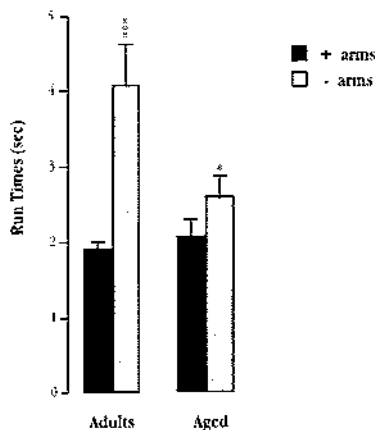


FIG. 9. Mean run time in positive and negative arms in the second stage of Experiment B (two sessions of concurrent three-pair simultaneous discriminations), for the adults ($n=8$, on the left side) and aged ($n=8$, on the right side) subjects. *** $P<0.001$ versus + arms; * $P<0.05$ versus + arms.

Experiment B

A similar analysis of run time in Experiment B (see Figs 8 and 9) further complements the observation described above. Adult mice showed a differential run speed between positive and negative arms at both stages of the experiment, i.e. the final six sessions of successive discriminations prior to attainment of criterion performance (first stage) and the subsequent two sessions of simultaneous discriminations (second stage). Aged mice presented a similar (although slightly reduced) pattern of run speed in the final six sessions of successive discriminations. However, they performed clearly under the level of their adult controls with respect to this measure in the second stage of Experiment B. The differential run speed between positive and negative arms at that stage was indeed clearly reduced in the aged group as compared with the adult group.

The run times of the final six sessions of stage 1 were subjected to an ANOVA with the between-subject factor age and two within-subjects factors: reinforcement and session. There was a main effect of the factor age ($F_{1,14}=5.08$; $P<0.05$) because the adult mice in general took significantly more time than the aged subjects to run down to the food well. This between-groups difference appeared to be particularly pronounced in negative arms, yet the age \times reinforcement effect did not reach statistical significance ($F_{1,14}=3.36$; $P=0.088$). Restricted analyses went on to show that the effect of reinforcement was significant in all groups (in adults: $F_{1,7}=12.2$; $P=0.01$; in aged: $F_{1,7}=8.34$; $P<0.05$). In the overall statistical analysis, the main effect of the reinforcement ($F_{1,14}=19.5$; $P=0.001$) and session ($F_{5,70}=3.62$; $P<0.01$), as well as their interaction ($F_{5,70}=4.78$; $P=0.001$), all attained statistical significance. The presence of the interaction term and absence of a significant three-way interaction reflected that the run time differential between negative and positive arms increased as training progresses, and that this effect was similar between groups.

An ANOVA using a design identical to the previous one (i.e. age \times reinforcement \times session) was applied to the run times data recorded in the two sessions of stage 2. Again, the main effect of age ($F_{1,14}=4.60$; $P=0.05$) and reinforcement ($F_{1,14}=36.93$; $P<0.01$) emerged significant, and now their interaction also attained statistical significance ($F_{1,14}=13.73$; $P<0.01$). This significant interaction was indicative that the magnitude of the differential run speed between positive and negative arms was reduced in the aged mice relative to the adult controls. No other effect attained statistical significance.

Summary of the results

In the main analysis, the discriminative performance was measured by percentage correct choice in simultaneous discriminations, or by relative arm entry latency in successive discriminations. These results showed the following. (i) During the initial learning phase, most of the aged mice were impaired in learning the concurrent simultaneous two-choice discriminations (Experiment A), whereas all the aged subjects acquired the discrimination task as well as the adult controls in a successive go-no-go design involving the same set of items (Experiment B). (ii) When challenged with modified presentations of familiar items in the second test phase, aged mice were impaired if two arms were presented to them simultaneously in a novel pairing, but not if they were presented one at a time, in a successive go-no-go procedure. More precisely, those aged mice who could acquire the task in stage 1 of Experiment A were found to be impaired when challenged with the 'recombined' trials in stage 2. At the same time, their ability to respond appropriately to the same two arms when presented one at a time was shown to be normal, as indicated by the longer latency to enter the negative arm relative to the positive one. Equally, in the second stage of Experiment B, when confronted with a choice between two arms that had only been experienced one by one before, aged mice behaved as if they had learnt nothing about their valence, although their accurate successive discrimination at the end of stage 1 undoubtedly showed that they did acquire such a knowledge. Thus, our results showed that the extent to which ageing could alter the ability to acquire (stage 1) or to use previously acquired spatial discriminations in novel situations (stage 2), strictly depends on the manner the discriminanda were presented to the subject.

The supplementary analysis of the animals' performance further demonstrated the selective effect of ageing upon discriminative performance. In this analysis, evidence for successful discrimination was indicated by a differential run speed between positive and negative arms. Overall, this set of analysis confirmed the main

analysis summarized above: ageing did not significantly modify the performance in successive discrimination, either in the first learning phase or in the subsequent test phase, but it did lead to deteriorated performance in simultaneous discrimination. The run time analysis added to the main analysis by further showing the following. (i) In the second test phase, not only did the aged mice fail to choose accurately between two arms which were experienced separately before, but they also failed to show any (expressed) knowledge concerning the valence of an arm after a choice had been initiated. Expression of such a knowledge in terms of differential run speed towards the food tray was only seen during successive discrimination trials. (ii) The two subsets of our aged mice were differentially affected. This was most clearly seen during the first stage of Experiment A: while one subset of aged mice was impaired the other subset displayed a discriminative pattern of run speed between positive and negative arms similar to that seen in controls. What is surprising is that this 'unimpaired' subgroup of aged mice was composed of the subjects that were labelled as 'impaired-aged' according to the (main) percentage correct analysis. This subset of aged mice failed to choose correctly between the individuals of a pair but were able to express some knowledge about the valence of each arm in terms of relative run speed. In contrast, the other subset of aged mice was able to correctly choose the positive arm in initial pairs discrimination training, but this successful discriminative performance was not reflected in their run (it was only expressed in this form in subsequent successive go–no-go testing). Hence, although analysis of run speed or percentage correct yielded identical conclusions about performance in the adult group, no such parallelism was found in the aged group.

Discussion

The cognitive specificity of the deficit observed in aged mice

The selectivity of the deficits demonstrated here led us to conclude that they are unlikely to be attributed to confounding (non-specific) changes in affect, motivation, perception or motor control associated with senescence. It follows that the impairment seen can be interpreted as solely cognitive in nature. What might be the precise nature of the cognitive process(es) compromised in our aged mice? The similarity between the deficit observed in our aged mice and that seen in rats with hippocampal damage in the studies of Eichenbaum *et al.* (1988, 1989; see Introduction) is obvious. Therefore we shall discuss the present data with respect to the relational theory as well as in relation to the literature on hippocampal dysfunction in ageing. Secondly, the observed behavioural differences between two subsets of aged mice here are also relevant to the general issue regarding the heterogeneity of the ageing effect between individuals. These are discussed in turn below.

Our results and the relational theory

To some extent, the anomalous performance seen in our aged mice resembled that of rats following fornix lesion (Eichenbaum *et al.* 1988, 1989). First they were impaired in the acquisition of simultaneous discrimination tasks, but not in successive discriminations. Second, a small proportion of animals, however, did manage to acquire the simultaneous discrimination task but failed when subsequently assessed in the 'recombined' trials. One possible explanation of this deficit, based on the theorization proposed by Eichenbaum (1992) and Eichenbaum *et al.* (1994), is that the relational processing of incoming informations is altered. In this view, what suffers during ageing is the organizational function of the hippocampus whereby new information is represented in relation to

the full richness of ongoing and past experience, thereby providing a basis for accurately distinguishing related but distinct events (citation from Rapp, 1998). According to this, the aged mice stored or encoded the experiences during the first learning stage as impoverished and separate representations of arm entry. Hence, they lacked the representation of a complex framework incorporating the relative relationships among choice arms which normally enable comparisons and contrasts between separately experienced items. This is why they could perform normally whenever the test situations encourage the storage and use of separate representations of individually experienced items (go–no-go successive discrimination) but failed in test situations that emphasize a judgement of the relative valence between two arms (hence requiring a comparison of two separate representations). This kind of inflexibility was evident in the aged mice during the test phase. Hence, no modification can induce a deficit in the aged mice: the presence or absence of impairment was dependent on whether the arms were presented successively or simultaneously. The impairment, therefore, is not merely a general failure of retrieval or acquisition as such, but a selective deficit in the application of acquired knowledge in specific situations where explicit comparison of acquired experiences is required.

However, our data also lead to divergent conclusions from Eichenbaum and colleagues' interpretation.

In their original experiment, some rats with hippocampal system damage occasionally succeeded in learning some of the pairs' discrimination problems. The authors attributed their successful performance to the acquisition of adapted responding to each discrimination pair without recourse to its individual components. This interpretation implies that these lesioned rats perceived and stored each pair of discriminanda as a unique compound cue associated with a given response, and this was responsible for the fact that lesioned rats did not recognize the individuals of the pair when presented in a novel arrangement (recombinations).

Actually, a similar strategy could equally account for the accurate choice responding in the concurrent three-pairs discrimination task (stage 1 of Experiment A) and subsequent impairment in recombined trials (stage 2 of experiment A) observed in our aged subjects. One such strategy would involve a conditional rule as follows: 'go left (or go right) when confronted with either pair A or B (or faced in this general direction), but go right (or left) when confronted with pair C'. This rule would be applicable because the egocentric position of the rewarded arm between the two sets of discrimination problems was always in reverse (see Fig. 1). Such a conditional egocentric strategy that relies on extra-maze spatial cues would lead to below chance level performance in the subsequent 'recombined' trials as the egocentric position of the rewarded arm was opposite to that of the two separate discrimination problems (pairs A and B) from which the 'recombined' pair was derived. Our results clearly showed that the subgroup of aged mice that succeeded in stage 1 tended to display below chance level performance in the recombined condition. Furthermore, this same subset of aged mice failed to exhibit a differential run speed between arms of opposing valence. This pattern of deficits seems to support an interpretation similar to that proposed by Eichenbaum and colleagues, that aged animals solved the simultaneous discriminations problems in stage 1 without paying attention to the individual components of each pair. But, this interpretation contradicted the observation that aged mice were as accurate as controls in successive go–no-go trials intermixed with the 'recombined' trials. This indeed clearly indicated that aged mice did acquire some knowledge about individuals during stage 1, even though such a knowledge remained undetectable (i.e. not expressed) in simultaneous discrimination trials. When the results of

Experiments A and B are taken together, our data demonstrated that aged mice were impaired in choosing between two arms that were experienced separately even though the animals did acquire some knowledge about their individual valence. This conclusion summarizes our point of departure from Eichenbaum *et al.*'s interpretation.

Nevertheless, it seems to us that some aspects of the methodological differences between our task design and that of Eichenbaum *et al.*'s original experiments might also be critical factors in determining if (and how much) the aged subjects could acquire information about individual items. In Eichenbaum *et al.*'s original task design, the subjects were never allowed to experience the individual odours (of a discrimination pair) separately. The task design thus appeared to encourage perceptual fusion of the two simultaneously presented odours, thereby biasing the rats against the acquisition of knowledge about individual odours. In contrast, in our radial maze experiment, each arm was experienced on its own as soon as the animal had committed choosing a particular arm (i.e. made an entry into one arm). On the basis of such experiences, elemental associations could be formed that could sustain accurate responding in successive go–no-go testing. And, our results demonstrated that such elemental associations were not sufficient to sustain accurate responding in simultaneous discrimination, i.e. choosing the positive arm and avoiding the negative one.

This led us to discuss another set of apparently conflicting data reported by Dusek & Eichenbaum (1997) recently. They found that hippocampotomized rats were able to learn a four-pair odours discrimination task (A+ and B–, B+ and C–, C+ and D–, and D+ and E–) and also performed like normal animals in the subsequent (A+ and E–) recombination. In this design, the odours were presented simultaneously with each odour localized in a separated cup such that they could be investigated separately. Then, what is the critical determinant of a simultaneous discrimination/recombination task that makes it sensitive to hippocampal/relational processing dysfunction?

One possible determining factor might be the degree of overlap (common elements) between the discriminanda. When at the choice point between adjacent arms on a radial maze, the mice are exposed to the stimuli associated with both arms. The correct explicit choice must be selected despite this overlap of the informative stimuli. This is a consequence of the spatial layout of the apparatus, but might also be expected to be the case when choosing between two odours in the design of the 1988 and 1989 experiments of Eichenbaum *et al.* (but not in that of Dusek and Eichenbaum's experiment). In contrast, when testing object recognition (in which concurrent discrimination deficits have not been seen reliably in hippocampotomized animals or amnesiac humans, see Deacon & Rawlins, 1996 for discussion and references), the choice of whether to select a particular object depends on the stimulus properties of that object alone. Objects are typically investigated in turn, so their stimulus properties are typically experienced separately. Thus, even a simultaneous discrimination can be broken down into two, separate go–no-go discriminations. This interpretation was tested by examining simultaneous discrimination performance using more widely separated arms (90° instead of 45°) on a radial maze: the deficit we have observed was abolished. Not only were aged mice able to accurately choose the positive arm when assessed in recombined trials, but they also displayed a discriminative pattern of running time (similar to that seen in successive go–no-go discriminations in the present experiments). Equally, simultaneous discrimination of non-spatial stimuli should become more difficult the more the discriminanda overlap: just such an effect has been reported in a study of monkeys with fornix transection (Gaffan, 1991).

Another possible determining factor might be the amount of initial training. We have evidence that overtraining in initial successive discriminations could also lead to the disappearance of the age-related deficit in subsequent simultaneous discriminations (as reported here). One possible explanation could be that overtraining in a go–no-go design could favour the breaking down of a simultaneous discrimination into two go–no-go discriminations. Another possibility is that overtraining could compensate the underlying relational processing deficit through the prolonged and repeated presentations of individual discriminanda such that relatively more complex representations of separated experiences could be formed.

Whatever the critical determining factor, the selective deficit observed in our aged mice suggested that, under the present experimental conditions, the formation of appropriate stimulus–response association alone is not sufficient to sustain accurate simultaneous discriminations.

Explicit versus implicit expression of a same past experience

The dissociation between simultaneous and successive discrimination testing (stage 2 of Experiment A) suggests the conclusion that different forms of memory expressions of the same acquired experience/knowledge can be preferentially engaged through a change of discriminanda presentation. This is reminiscent of the dissociation between implicit and explicit expression of the same piece of previously acquired material in human amnesiac subjects (Schacter, 1987). Hence, if the tendency to approach a previously rewarded arm and to hesitate when faced with a previously non-rewarded arm (successive go–no-go discrimination) is analogous to some aspects of implicit memory in humans, then the failure to select between two such arms, when they are presented simultaneously, would parallel the loss of explicit memory for events that can be seen in humans whose implicit memory is apparently intact.

It may be argued that a simultaneous discrimination calls for an explicit choice, such that the emission of the chosen response is driven by an intention to obtain an expected reward. This may be characterized as an 'informed' choice, meaning that the subject has the representation for the outcome associated with each available choice, and the ability to compare and contrast them. The mental representations of each outcome can be perceptually driven by the presentation of both discriminanda (Johnson, 1992). This is why we assume that the deficit observed in our aged subjects here might therefore be attributed to a loss of the ability to compare and contrast the evoked representations in order to inform an explicit relative judgement between the available choice. This judgement requires a form of 'manipulation' of the representations that is dependent on the 'relational quality' of the stored representations.

Although the existence of relational process and the formation of stimulus–response habits are not mutually exclusive, activation of the former may in certain circumstances suppress the latter when it may be serving as a check for the expression of the latter. We indeed observed, at least in some of the aged mice, that all forms of expression of acquired knowledge concerning individual arms were suppressed (not expressed) in choice situation. This is why we suggest that simultaneous discrimination preferentially engages declarative/explicit memory processing. Conversely, when only one discriminandum is presented during a go–no-go discrimination, response based on stimulus–response habit strengths prevails.

Cognitively impaired and unimpaired aged animals?

Ironically, the analysis of run time in the first stage of Experiment A indicates that if we had adopted a criterion (for successful transition

from the first to second stage of testing) in terms of differential run speed instead of choice accuracy, the membership of the 'impaired' and 'unimpaired' aged subgroups would have been interchanged! This highlights that the distinction of cognitively impaired and cognitively unimpaired should not be taken literally, but should be interpreted with care. Indeed, our results suggested that the entire aged group was impaired in a similar fashion when the subjects were assessed in probe trials consisting of simultaneous presentation of two arms that had only been experienced separately before. Thus, the cognitive decline of ageing might be less variable than classically believed to be in animals (e.g. Markowska *et al.*, 1989; Rapp & Amaral, 1992 for a review) as well as in humans (see Morse, 1993 for an overview). Hence, there might only be limited qualitative difference within the ageing population, and the heterogeneity in cognitive capacities might be rather exaggerated by the diverse use of different evaluation methods, with a varying degree of sensitivity and/or task difficulty. (Does anyone know any man over 60 claiming that his memory is as good as when he was 20 years old?) In this sense, the paradigm adopted here may offer a highly sensitive detection of some aspects of the cognitive decline common to normal ageing.

In Experiment A, about one-third of the ageing population managed to acquire the task while the remaining subjects failed to do so. The aged mice that failed to reach the criterion performance were nonetheless displaying a differential run time for positive and negative arms. Why did these 'impaired' aged mice express what the 'unimpaired' aged mice only express in go-no-go successive discrimination trials? This appears to be closely related to their readiness to respond at the choice point. In the measure of response latency (results not shown) at the first stage of Experiment A, there was a significant difference between the two aged subgroups. The 'impaired' aged group took significantly less time to initiate a response than the 'unimpaired' aged group. The spontaneity of choice response exhibited by the former subgroup may be correlated with the observation that their choice behaviour was being less accurate and more susceptible to the influence to implicit control (see previous discussion contrasting the explicit and implicit expression of memory).

The same dichotomy with respect to response spontaneity was also seen in the aged mice in Experiment B during the second stage. Three subjects out of eight (similar to the proportion in Experiment A) took significantly longer to initiate a response than the other five mice. In these three mice, there was no sign of discriminative pattern in the running times, whereas the remaining five mice responded more quickly, and their differential run time for positive and negative arms was statistically significant (as the 'impaired' subjects in the first stage of Experiment A).

These observations further highlight that the extent to which simultaneous discrimination testing might be able to suppress the expression of acquired knowledge about individually experienced items (i.e. an implicit expression of memory) varies within the aged population and might be dependent on additional factors concerning decision-making or emotional reactivity. From this aspect, the aged population might be considered as heterogeneous as has been shown in most studies on cognitive ageing. Notwithstanding, the ability to accurately choose between separately experienced items seems to be consistently altered in our aged mice.

Conclusions

The present data demonstrated the value of the relational memory framework in the design of novel animal models of cognitive ageing.

Although successful simultaneous discriminations do not necessarily require relational processing, we interpreted the age-related deficit here as evidence for a deficiency in their capacity in relational processing of incoming information. Information processing of this kind has been suggested to be dependent on the integrity of the hippocampus.

Thus, our results are consistent with, and add to, the large body of data showing that some aspects of spatial learning, amongst other hippocampal-dependent functions, are impaired in aged rodents (e.g. Zyzak *et al.*, 1995; Oler & Markus, 1998, and see review in Gallagher *et al.*, 1995). This is also in agreement with data from electrophysiological studies in aged rats describing altered patterns of hippocampal place cell firings (e.g. Barnes *et al.*, 1983). Of particular relevance are the recent results (Barnes *et al.*, 1997; Mizumori & Kalayani, 1997; Shen *et al.*, 1997; Tanila *et al.*, 1997a,b) providing evidence that normal ageing has relatively little effect on the overall incidence of memory-related firing but significantly influences the representational properties of the hippocampal formation (citation from Rapp, 1998).

This is similar to the prevalent view in the human literature. For example, recent functional imagery studies are suggesting that the nature of medial temporal lobe dysfunction in the elderly might stem from an underlying impairment in the processing of new information, i.e. encoding, rather than that of retrieval (Grady *et al.*, 1995; Schacter *et al.*, 1996; Cabeza *et al.*, 1997).

Acknowledgements

This work was supported by the C.N.R.S. and the Conseil Régional d'Aquitaine.

References

- Barnes, C.A., McNaughton, B.L. & O'Keefe, J. (1983) Loss of place specificity in hippocampal complex spike cells of senescent rat. *Neurobiol. Aging*, **4**, 113–119.
- Barnes, C.A., Suster, M.S., Shen, J. & McNaughton, B.L. (1997) Multistability of cognitive maps in the hippocampus of old rats. *Nature*, **388**, 272–275.
- Bunsey, M. & Eichenbaum, H. (1996) Conservation of hippocampal memory function in rats and humans. *Nature*, **379**, 255–257.
- Cabeza, R., Grady, C.L., Nyberg, L., McIntosh, A.R., Tulving, E., Kapur, S., Jennings, J.M., Houle, S. & Craik, F.I.M. (1997) Age-related differences in neural activity during memory encoding and retrieval: a positron emission tomography study. *J. Neurosci.*, **17**, 391–400.
- Cohen, N.J. (1984) Preserved learning capacity in amnesia: evidence for multiple memory systems. In Squire, L.R. & Butters, N. (eds), *Neuropsychology of Memory*. Guilford Press, New York, pp. 83–103.
- Cohen, N.J. & Squire, L.R. (1980) Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. *Science*, **210**, 207–210.
- Craik, F.I.M. & Jennings, J.M. (1992) Human memory. In Craik, F.I.M. & Salthouse, T.A. (eds), *Handbook of Aging and Cognition*. Erlbaum, Hillsdale, pp. 51–83.
- Crook, T., Bartus, R.T., Ferris, S.H., Wittehouse, P., Cohen, G.D. & Gershon, S. (1986) Age-associated memory impairment: proposed diagnostic criteria and measures of clinical change: report of a NIMH work group. *Dev. Neuropsychol.*, **2**, 261–276.
- Deacon, R.M.J. & Rawlins, J.N.P. (1996) Effects of aspiration lesions of hippocampus or overlying neocortex on concurrent and configural object discriminations in rats. *Behav. Brain Res.*, **77**, 165–174.
- Dusek, J.A. & Eichenbaum, H. (1997) The hippocampus and memory for orderly stimulus relations. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 7109–7114.
- Eichenbaum, H., Fagan, A., Mathews, P. & Cohen, N.J. (1988) Hippocampal system dysfunction and odour discrimination learning in rats: impairment or facilitation depending on representational demands. *Behav. Neurosci.*, **102**, 3531–3542.
- Eichenbaum, H., Mathews, P. & Cohen, N.J. (1989) Further studies of hippocampal representation during odour discrimination learning in rats. *Behav. Neurosci.*, **103**, 1207–1216.

- Eichenbaum, H., Otto, T. & Cohen, N.J. (1994) The hippocampus – What does it do? *Behav. Neural Biol.*, **57**, 2–36.
- Eichenbaum, H. (1992) The hippocampal system and declarative memory in animals. *J. Cogn. Neurosci.*, **4**, 217–231.
- Gaffan, D. (1991) Spatial organisation of episodic memory. *Hippocampus*, **1**, 262–264.
- Gallagher, M., Nagahara, A.H. & Burwell, R.D. (1995) Cognition and hippocampal system in aging: animal models. In McGaugh, J.L., Weinberger, N. & Lynch, G. (eds), *Brain and Memory: Modulation and Mediation of Neuroplasticity*. Oxford University Press, New York, pp. 103–126.
- Gallagher, M. & Rapp, P.R. (1997) The use of animal models to study the effects of aging on cognition. *Annu. Rev. Psychol.*, **48**, 339–370.
- Grady, C.L., McIntosh, A.R., Horwitz, B., Maisog, J., Ungerleider, L., Mentis, M.J., Pietrini, P., Shapiro, M.B. & Haxby, J.V. (1995) Age-related reductions in human recognition due to impaired encoding. *Science*, **269**, 218–221.
- Graf, P. & Schacter, D.L. (1985) Implicit and explicit memory for new associations in normal and amnesic subjects. *J. Exp. Psychol. Learn. Memory Cogn.*, **11**, 501–518.
- Johnson, M.K. (1992) MEM: mechanisms of recollection. *J. Cogn. Neurosci.*, **4**, 268–280.
- Markowska, A.L., Stone, W.S., Ingram, D.K., Reynolds, J., Gold, P.E., Conti, L.H., Pontecorvo, M.J., Wenk, G.L. & Olton, D.S. (1989) Individual differences in aging: behavioral and neurobiological correlates. *Neurobiol. Aging*, **10**, 31–43.
- Marighetto, A., Micheau, J. & Jaffard, R. (1993) Relationships between testing-induced alterations of hippocampal cholinergic activity and memory performance on two spatial tasks in mice. *Behav. Brain Res.*, **56**, 133–144.
- Marighetto, A., Etchamendy, N., Touzani, K., Yee, B.K. & Jaffard, R. (1997) Cognitive inflexibility in aged mice: a potential model for age-related human declarative memory decline? *Soc. Neurosci. Abstr.*, **23**, 2005.
- Mishkin, M., Vargha-Khadem, F. & Gadian, D.G. (1998) Amnesia and the organization of the hippocampal system. *Hippocampus*, **8**, 212–216.
- Mizumori, S.J.Y. & Kalyani, A. (1997) Age and experience-dependent representational reorganization during spatial learning. *Neurobiol. Aging*, **18**, 651–659.
- Morse, C.K. (1993) Does variability increase with age? An archival study of cognitive measures. *Psychol. Aging*, **8**, 156–164.
- Oler, J.A. & Markus, E.J. (1998) Age-related deficits on the radial maze and in fear conditioning: hippocampal processing and consolidation. *Hippocampus*, **8**, 402–415.
- Olton, D.S., Markowska, A.L., Pang, K., Golski, S., Voytko, M.L. & Gorman, L.K. (1992) Comparative cognition and assessment of cognitive processes in animals. *Behav. Pharmacol.*, **3**, 307–318.
- Rapp, P.R. & Heindel, W.C. (1994) Memory system in normal and pathological aging. *Curr. Opin. Neurol.*, **7**, 294–298.
- Rapp, P.R. & Amaral, D.G. (1992) Individual differences in the cognitive and neurobiological consequences of normal aging. *Trends Neurosci.*, **15**, 340–344.
- Rapp, P.R. (1998) Representational organization in the aged hippocampus. *Hippocampus*, **8**, 432–435.
- Rapp, P.R., Kansky, M.T. & Eichenbaum, H. (1996) Learning and memory for hierarchical relationships in the monkey: effects of aging. *Behav. Neurosci.*, **110**, 887–897.
- Schacter, D.L. (1987) Implicit memory: history and current status. *J. Exp. Psychol. Learn. Memory Cogn.*, **13**, 501–518.
- Schacter, D.L., Savage, C.R., Alpert, N.M., Rauch, S.L. & Albert, M.S. (1996) The role of the hippocampus and frontal cortex in age-related memory changes: a PET study. *Neuroreport*, **7**, 1165–1169.
- Shen, J., Barnes, C.A., McNaughton, B.L., Skaggs, W.E. & Weaver, K.L. (1997) The effect of aging on experience-dependent plasticity of hippocampal place cells. *J. Neurosci.*, **17**, 6769–6782.
- Shimamura, A.P. (1994) Neuropsychological perspectives on memory and cognitive decline in normal human aging. *Seminars Neurosci.*, **6**, 387–394.
- Squire, L.R. (1992) Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys and humans. *Psychol. Rev.*, **99**, 195–231.
- Squire, L.R. & Zola, S.M. (1998) Episodic memory, semantic memory, and amnesia. *Hippocampus*, **8**, 205–211.
- Tanila, H., Shapiro, M., Gallagher, M. & Eichenbaum, H. (1997a) Brain aging: changes in the nature of information coding by the hippocampus. *J. Neurosci.*, **17**, 5155–5166.
- Tanila, H., Sipila, P., Shapiro, M. & Eichenbaum, H. (1997b) Brain aging: impaired coding of novel environmental cues. *J. Neurosci.*, **17**, 5167–5174.
- Tulving, E. & Markowitsch, H.J. (1998) Episodic and declarative memory: role of the hippocampus. *Hippocampus*, **8**, 198–204.
- Zyzak, D.R., Otto, T., Eichenbaum, H. & Gallagher, M. (1995) Cognitive decline associated with normal aging in rats: a neuropsychological approach. *Learn. Memory*, **2**, 1–16.

CHAPITRE III

EFFETS CONTRASTÉS D'UNE LÉSION DE L'HIPPOCAMPE DANS UNE EPREUVE DE DISCRIMINATIONS D'EMPLACEMENTS

CHAPITRE III

EFFETS CONTRASTES D'UNE LESION DE L'HIPPOCAMPE DANS UNE EPREUVE DE DISCRIMINATIONS D'EMPLACEMENTS

Nous avons précédemment développé dans un labyrinthe radial à 8 bras, une épreuve comportementale en deux étapes permettant d'évaluer comment les capacités discriminatives de l'animal évoluent lorsque la façon de leur présenter les informations est modifiée. Cette stratégie expérimentale visait à mesurer la capacité des animaux à utiliser, dans une situation nouvelle, les informations qu'ils ont acquises au préalable. Il s'agissait donc de tester la flexibilité d'expression mnésique. Cette épreuve comprend une phase d'apprentissage dans laquelle six bras du labyrinthe (trois sont toujours appâtés alors que les trois autres ne le sont jamais) sont présentés à l'animal l'un après l'autre. L'animal est ensuite soumis à des essais-test au sein desquels les discriminanda précédemment présentés un par un, successivement, sont arrangés sous forme de paire. A chaque essai, l'animal se trouve ainsi confronté à une paire de bras et doit, sur la base des connaissances acquises au cours de la phase précédente, discriminer le bras appâté de celui qui ne l'est pas. Notre première étude avait montré que les animaux âgés présentaient une acquisition normale de la tâche de discriminations successives mais s'avéraient ultérieurement incapables (contrairement à leurs congénères jeunes adultes) de répondre correctement lorsque les mêmes informations leur étaient présentées simultanément par paire. En accord avec les perspectives de la théorie relationnelle sur le rôle de la formation hippocampique dans la fonction mnésique, l'inflexibilité cognitive que révèle cette incapacité à utiliser des informations en dehors de leur contexte initial d'apprentissage, résulterait d'une altération de la fonction cognitive permettant l'organisation des informations en mémoire, fonction qui nécessiterait l'intégrité de l'hippocampe.

Pour mettre à l'épreuve ces interprétations, nous avons évalué ici les effets d'une lésion de l'hippocampe (HPC) chez la souris jeune adulte, dans notre tâche comportementale. Nous avons ajouté au protocole initial une troisième phase dans laquelle les six bras (présentés initialement un par un, puis par paires) seront proposés à l'animal tous en même temps. A l'origine, l'objectif était d'évaluer ainsi la flexibilité cognitive des animaux d'une façon nouvelle afin de disposer d'un indicateur comportemental supplémentaire.

PRINCIPAUX RESULTATS

Analyses principales

Dans l'ensemble, les résultats montrent que le profil des performances observées chez des souris adultes hippocampectomisées (lésion bilatérale par injection d'acide iboténique) est le même que celui des sujets âgés.

Dans la phase initiale, la majorité des animaux porteurs d'une lésion de l'HPC présentent une acquisition quasiment normale des discriminations successives, même si le niveau de discrimination atteint en fin d'entraînement tend à être plus faible que celui des animaux de contrôle. Un tiers des animaux lésés s'avère toutefois incapable d'atteindre le critère d'acquisition fixé. Par ailleurs, tous les animaux lésés s'engagent plus rapidement dans les bras que leurs contrôles.

Dans la seconde phase, contrairement aux témoins pseudo-lésés, ces souris hippocampectomisées s'avèrent incapables de choisir le bras appâté d'une paire plus souvent que le bras non appâté. Elles répondent donc au hasard lorsqu'elles sont confrontées aux discriminations simultanées par paire.

Finalement, dans la situation de libre choix, lorsque les six bras du labyrinthe sont ouverts simultanément, les animaux porteurs de lésions HPC présentent des performances très significativement supérieures au hasard et comparables à celles des congénères témoins.

Ces premières analyses révèlent chez les souris adultes hippocampectomisées un déficit marqué dans la phase de discriminations simultanées par paire. Nous avons procédé à des analyses supplémentaires visant à vérifier si, bien que subtiles, les modifications comportementales induites par la lésion au stade 1 pouvaient expliquer le déficit observé au stade 2.

Le niveau de discrimination atteint en fin d'acquisition, est plus faible chez les animaux hippocampectomisés. Cette diminution (non significative) des performances ne peut cependant pas rendre compte de leur déficit au stade 2 parce que ce déficit persiste si l'on restreint l'analyse

statistique à des groupes d'animaux, lésés et pseudo-lésés, présentant le même niveau de discrimination à la fin du stade 1.

Les animaux lésés présentent par ailleurs une réduction des latences d'engagement dans les bras au cours du stade 1. Cette différence ne peut vraisemblablement pas non plus, expliquer le déficit observé en phase de discriminations simultanées par paire. Tout d'abord, les souris hippocampectomisées, comme leurs témoins, présentent une augmentation significative de latences de décision lorsqu'elles sont transférées de la première à la seconde phase de l'épreuve. Ceci prouve qu'elles réagissent normalement au caractère nouveau de la situation test. Ensuite, même si les latences des animaux lésés restent plus faibles que celles des témoins lors du stade 2, la comparaison d'animaux lésés et pseudo-lésés présentant des latences de choix similaires, confirme le déficit de performance en discriminations par paire chez les souris hippocampectomisées.

Finalement, quel que soit le groupe expérimental considéré, aucune corrélation n'est observée entre les performances du stade 1 (niveau de discrimination en fin d'acquisition, nombre de séances au critère, valeur des latences d'entrée) et le pourcentage de choix corrects au stade 2.

Parmi le trois paires de bras du labyrinthe qui sont présentées en alternance au cours du stade 2, deux d'entre elles sont renforcées du même côté et la troisième du côté opposé. Cette configuration peut encourager l'utilisation d'une stratégie égocentrique (i.e., répondre préférentiellement d'un côté indépendamment des éléments composant la paire). L'utilisation d'une telle stratégie pourrait expliquer le déficit observé chez les souris hippocampectomisées. Tous les animaux répondent préférentiellement d'un côté donné, et les analyses indiquent que cette tendance est plus marquée dans le groupe des animaux lésés. Néanmoins, la constitution de sous-groupes d'animaux lésés et pseudo-lésés, à faible ou à forte tendance égocentrique, permet de montrer que le déficit de performance induit par la lésion bilatérale de l'hippocampe au stade 2 persiste, quelque soit le niveau de la tendance égocentrique. Ce n'est donc pas l'utilisation préférentielle d'une stratégie égocentrique qui peut expliquer le déficit des animaux lésés dans cette phase du protocole.

L'ensemble de ces données semble montrer que le déficit de performance observé chez les animaux lésés est sélectif de la phase de discriminations simultanées par paire. Aucune des modifications comportementales induites par la lésion dans la phase 1 de l'épreuve (diminution des latences de choix, niveau de discrimination en apparence plus faible en fin d'acquisition), ni la tendance plus marquée des animaux lésés à adopter une stratégie égocentrique ne peuvent rendre compte du déficit de performance dans les situations de choix par paire.

Une série d'analyses supplémentaires visant à rechercher les relations potentielles entre les performances mesurées au cours des 3 phases de l'épreuve, a alors été effectuée. Il s'agissait de comparer, entre les trois stades, l'ordre des préférences exprimées par l'animal entre les six bras. Ces analyses ont permis de (i) confirmer la sélectivité du déficit observé chez les animaux porteurs d'une lésion de l'hippocampe (ii) caractériser, pour chaque groupe expérimental, les connaissances acquises au cours d'une phase de l'épreuve qui sont utilisées dans une phase ultérieure.

La comparaison des stades 2 et 3, montre que les préférences exprimées sont stables chez les animaux témoins mais pas chez les animaux hippocampectomisés. Si l'animal est pseudo-lésé, celui des bras appâtés qu'il visite le plus dans la phase de discriminations par paire, est celui qu'il choisira le plus tôt (i.e., avant tout les autres) dans l'étape de choix libres entre les six bras. De même, moins il visite un bras non renforcé dans la phase 2, plus tardivement il visitera ce bras dans la phase ultérieure. Ces données montrent que la façon dont répond l'animal pseudo-lésé dans la phase 2 détermine ses choix dans la phase 3. Cette cohérence des choix entre le stade 2 et le stade 3 n'est pas du tout retrouvée chez les souris hippocampectomisées. Ces dernières présentent des performances très au-dessus du hasard au stade 3, mais se comportent comme si elles n'avaient jamais été soumises aux discriminations simultanées par paire dans lesquelles elles ont échoué dramatiquement.

Les mêmes analyses ont été réalisées pour décrire les relations entre les stades 1 et 3. Dans ce cas, la cohérence la plus grande entre les préférences exprimées à chacun de ces stades est observée dans le groupe des animaux lésés. Ainsi plus l'animal hippocampectomisé refuse d'entrer dans un bras non renforcé (latence élevée) dans la phase initiale, plus tardivement il visitera ce bras lors de la phase de choix libre entre les six bras. De même, plus il entre rapidement dans un bras renforcé lors de l'acquisition, plus tôt il visitera ce bras au cours des essais du stade 3. Il existe donc une correspondance stricte entre l'amplitude des latences d'entrées dans chacun des six bras au stade 1 et l'ordre des visites de ces mêmes bras au stade 3. Cette correspondance est beaucoup moins marquée chez les animaux pseudo-lésés et ne concerne que les bras non renforcés.

En résumé, alors que les animaux lésés se comportent au stade 2 comme s'ils n'avaient rien appris de la valence des bras au stade 1, ils présentent au stade 3 une préférence significative pour les bras appâtés, et l'ordre des préférences qu'ils expriment à ce stade entre les six bras, est le même que celui qu'ils exprimaient au stade 1. L'absence de relation entre les préférences du stade 2 et celles du stade 3, exclut la possibilité que les performances normales des animaux hippocampectomisés au stade 3 résultent d'un effet d'entraînement au stade 2. De ce fait, le déficit sélectivement observé dans la phase intermédiaire ne peut être expliqué par l'ordre dans

lequel les différentes versions de la tâche de discrimination se sont succédées. En revanche, la stabilité de l'ordre des préférences entre les stades 1 et 3, suggère que les animaux hippocampectomisés utilisent la même stratégie cognitive (efficace) pour discriminer les bras appâtés des bras non-appâtés, que ces six bras leur soient présentés successivement ou tous en même temps.

Selon des données de la bibliographie (Brown *et al.*, 1992 ; 1993), le libre choix entre les six bras du labyrinthe peut être résolu de façon efficace par une succession de décisions lors desquelles chaque bras est investi individuellement (une forme de stratégie dite du « go/nogo » comme dans la phase initiale). En d'autres termes, le problème de discrimination simultanée entre les six bras peut être décomposé en discriminations successives sur chacun des bras pris individuellement, et pourrait ainsi être sous-tendu par des associations simples de type stimulus-réponse (S-R). Nos résultats montrant que nos animaux hippocampectomisés résolvent efficacement et dans le même ordre de préférences, les stades 1 et 3 de l'épreuve, seraient alors cohérents avec un ensemble de données de la littérature qui suggèrent que la formation de ces associations simples de type S-R ne requière pas l'intégrité de l'hippocampe et pourrait sous-tendre une forme de mémoire procédurale.

A l'inverse, le déficit mnésique sélectif des souris hippocampectomisées révélé au stade 2, ainsi que l'absence de relations entre les préférences exprimées à ce stade et aux autres stades de l'épreuve, suggèrent que les stratégies cognitives reposant sur des associations de type S-R ne suffisent pas pour choisir efficacement entre deux bras présentés ensemble. Les discriminations simultanées par paire sollicitent des opérations mnésiques dépendantes de l'intégrité fonctionnelle de l'hippocampe et donc différentes de celles que l'animal lésé mobilise dans les deux autres versions de l'épreuve. Contrairement à la situation où les six bras du labyrinthe sont ouverts simultanément, lorsque l'animal doit choisir entre deux bras adjacents, il se trouve confronté aux seuls éléments informationnels communs aux deux bras. Un certain nombre de données de la littérature invitent à penser que ce recouvrement des indices informatifs entre les discriminanda, pourrait être suffisant pour obliger l'animal à «se représenter», pour les comparer, les conséquences de chacune des deux alternatives offertes. Selon le modèle théorique d'Eichenbaum (1992), ces opérations de comparaisons et d'opposition entre éléments d'information acquis séparément, reposeraient sur l'existence de représentations relationnelles du passé. Et, toujours conformément à cette théorie, la construction de ces représentations relationnelles, basées sur des associations complexes entre divers types de stimuli, dépendrait de façon critique de l'intégrité fonctionnelle de la formation hippocampique. Cette fonction cognitive d'organisation des informations acquises, serait spontanément mise en jeu chez des animaux normaux, rendant compte du succès des animaux pseudo-lésés au stade 2 mais aussi de

la cohérence apparente de leurs choix entre les stades 2 et 3 et de l'impossibilité de prédire cette cohérence sur la base de leurs performances au stade 1.

CONCLUSION

La sélectivité du déficit observé chez la souris porteuse d'une lésion de l'hippocampe suggère que différentes formes d'expression mnésique d'une même expérience vécue peuvent être évaluées, chez les mêmes animaux, par la seule manipulation du mode de présentation des stimuli.

Hippocampal Lesions and Discrimination Performance of Mice in the Radial Maze: Sparing or Impairment Depending on the Representational Demands of the Task

Nicole Etchamendy, Aline Desmedt,
Cedric Cortes-Torrea, Aline Marighetto
and Robert Jaffard*

*Laboratoire de Neurosciences Cognitives, Université de
Bordeaux 1, Talence Cedex, France*

ABSTRACT: The effects of ibotenate hippocampal lesions on discrimination performance in an eight-arm radial maze were investigated in mice, using a three-stage paradigm in which the only parameter that varied among stages was the way the arms were presented. In the initial learning phase (stage 1), animals learned the valence or reward contingency associated with six (three positive and three negative) adjacent arms of the maze using a successive (go/no-go) discrimination procedure. In the first test phase (stage 2), the six arms were grouped into three pairs, so that on each trial, the subject was faced with a choice between two adjacent arms of opposite valence (concurrent two-choice discrimination). In the second test phase (stage 3), the subject was faced with all six arms simultaneously (six-choice discrimination). Hippocampal-lesioned mice acquired the initial learning phase at a near-normal rate but behaved as if they had learned nothing when challenged with the two-choice discriminations at stage 2. In contrast, they behaved normally when confronted with the six-choice discrimination at stage 3. Detailed examination of within- and between-stage performance suggests that hippocampal-lesioned mice perform as intact mice when presentation of the discriminanda encourages the storage and use of separate representations (i.e., in initial learning and six-choice discrimination testing), but that they fail in test situations that involve explicit comparisons between such separate representations (two-choice discriminations), hence requiring the use of relational representations. *Hippocampus* 2003;13:155–169.

© 2003 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: ibotenate lesions; hippocampus; learning; relational representations

INTRODUCTION

The hippocampus and its related structures play a fundamental role in human declarative memory (Squire, 1992). In rodents, considerable data

Grant sponsor: Centre National de la Recherche Scientifique; Grant sponsor: Conseil Régional d'Aquitaine.

*Correspondence to: Robert Jaffard, Laboratoire Neurosciences Cognitives, CNRS UMR 5106, Université de Bordeaux 1, Avenue des Facultés, 33405 Talence Cedex, France. E-mail: jaffard@neurocog.u-bordeaux.fr

Accepted for publication 26 February 2002

DOI 10.1002/hipo.10055

support the hypothesis that the hippocampus is selectively and/or disproportionately involved in spatial learning and memory (O'Keefe and Nadel, 1978; see Jarrard, 1993). Nevertheless, it has now been demonstrated that rats with hippocampal damage can acquire information relative to places (Eichenbaum et al., 1990; McDonald and White, 1995; Whishaw et al., 1995) and can display severe learning and memory impairment with nonspatial learning material (Eichenbaum et al., 1988, 1989). This pattern of results suggests that the hippocampal system is critical to a certain type of memory representation that is especially prominent in, but not unique to, spatial learning. In this view, one existing theory is that the hippocampus is involved in the storage and use of representations based on relations between multiple cues (Cohen and Eichenbaum, 1993; Eichenbaum, 1994, 1997). Such relational representations might make it possible to compare and contrast information originating from different sources and to support the flexible use of memory in novel situations. Because these properties have been proposed as the fundamental characteristics of human declarative memory (Cohen, 1984) and can be assessed without requiring verbal expression, we recently developed learning tasks for their experimental analysis in mice. Based on the original report by Eichenbaum et al. (1988) on the contrasting effects of fornix lesion in different versions of an odor-guided discrimination task in rats, these learning tasks consisted of unambiguous discriminations between arms of opposite valence in a radial maze, with the individuals of each pair presented either simultaneously or successively. Using two-stage paradigms comprising an initial learning phase followed by a test phase, we repeatedly showed that, as in humans (see Gabrieli, 1996), aging in mice is associated with a preferential loss of relational/declarative memory (Marighetto et al., 1999, 2000; Etchamendy et al., 2001). Aged mice normally acquired discriminations among a set of three rewarded (positive) and three unrewarded (nega-

tive) arms when the latter were presented one at a time (successive go/no-go discrimination), thereby encouraging the storage and use of separate representations of individually experienced items; conversely, they consistently failed in subsequent two-choice discrimination probe trials calling for judgement of the relative valence between two of the same arms (simultaneous discriminations), hence requiring comparisons between separately experienced items. According to the relational view of hippocampal function in memory, such an inflexibility in mnemonic expression might result from an alteration in the organizational function of the hippocampus, whereby separate arm-entry can be represented in relation to the full richness of ongoing and past experience with the arms. In this view, hippocampal damage should result in the same selective deficit as that seen in aged mice. The present study addresses this question by studying the effects of an excitotoxic hippocampal lesion on acquisition of the go/no-go version of the task (stage 1) and on the ability of lesioned mice to transfer their acquired knowledge when challenged with two-choice discrimination probe trials (stage 2). After this, additional probe trials in which all the six arms were made accessible simultaneously (stage 3: six-choice discrimination) were performed. The original aim was to further assess memory flexibility, although our unexpected results led us to reexamine the task demands associated with this (third) way of presenting arms.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The subjects were naive mice of the C57/Bl6 Jico inbred strain obtained from IFFA Credo (Lyon, France). They were 4 months of age at the beginning of the experiment. Upon arrival, the mice were caged in groups of 10 and housed in a temperature-controlled and ventilated animal room, maintained under a 12-h light/dark cycle with ad libitum food and water. They were caged singly 4–5 weeks before the start of experiments. All experiments were performed in accordance with the official French regulations for the care and use of laboratory animals.

Surgery

Bilateral lesions of the hippocampus were induced by multiple stereotactically guided injections of ibotenic acid dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) (final pH = 7.4) at a concentration of 10 mg/ml. The mice were anesthetized by intraperitoneal injections of pentobarbital sodium (100 mg/kg). They were placed in a stereotactic apparatus, an incision of the skin overlying the skull was made, and small burr holes were drilled through the skull to introduce the injectors. Injections of ibotenic acid were made with a 1- μ l Hamilton syringe connected to a 32-gauge cannula with polyethylene tubing. A volume of 50 nl of the ibotenic acid solution was injected at a rate of 18 nl/10 min at each of four injection sites per hemisphere according to the after posterior (P),

lateral (L), and vertical (V) coordinates in relation to the bregma and the skull surface: P, $-1,700 \mu\text{m}$; L, $\pm 1,300 \mu\text{m}$; and V, $1,900 \mu\text{m}$; P, $-2,100 \mu\text{m}$; L, $\pm 2,800 \mu\text{m}$; and V, $3,000 \mu\text{m}$; P, $-2,400 \mu\text{m}$; L, $\pm 2,900 \mu\text{m}$; and V, $4,000 \mu\text{m}$; P, $-2,800 \mu\text{m}$; L, $\pm 3,100 \mu\text{m}$; and V, $3,700 \mu\text{m}$. Sham-lesioned mice underwent the same procedure but did not receive injections. Behavioral training took place after 7–10 days of recovery from surgery.

Apparatus

The apparatus was a fully automated, elevated, eight-arm radial maze, located in a quiet testing room enriched with distal cues. Its dimension and construction have been described in full elsewhere (Marigetto et al., 1999). A door was mounted at the entrance to each arm, and a pellet dispenser was installed at the end of each arm. Door movements were controlled by a computer program, which also tracked the position of the mouse within the maze continuously via pressure captors underneath the central platform and two pairs of photocell beams installed along each arm. One pair of photocell beams guarded the entrance of the arm, and one just in front of the food well. This enabled real-time control of the accessibility to the maze arm(s) according to a predetermined test schedule.

Behavioral Procedure

The animals were deprived of food to maintain their body weight at a stable level, i.e., 90% of the free feeding weight throughout the duration of training.

Shaping

The animals were first habituated to the maze over a period of 2 days. During this period, they were individually allowed to move freely in the maze until they had collected a reward from each of the eight pre-baited arms. Subjects that failed to collect all the food within 15 min on the second day were given one additional session on the same day. Subjects that failed to collect all the food on this extra session within 15 min were excluded from further testing.

Discrimination tasks

The experimental design is depicted in Figure 1. Each subject was separately assigned six adjacent arms. Out of these, three served as positive (baited) arms and the remaining three served as negative (not baited) arms. The relative locations of these arms were such that all six could be grouped into three pairs of adjacent arms with opposing valence (pairs A, B, and C). In addition, it was ensured that if the positive arms of pairs A and B were on the left (or right), the positive arm of pair C had to be on the right (or left).

Stage 1. In stage 1, the six arms were presented one at a time using a go/no-go discrimination procedure. In each trial, the door to only one arm (which could be a positive or negative one) was open and remained so for a duration of 30 s. If the subjects failed to enter the arm during this period, the door was closed and the trial ended. Each daily session consisted of 24 trials separated by a 10-s

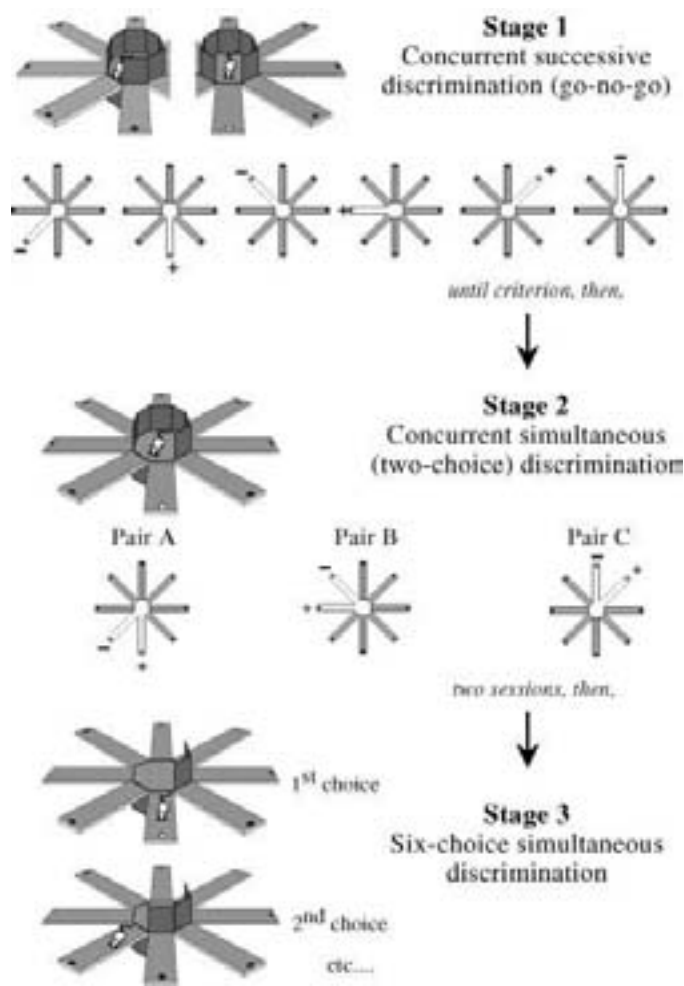


FIGURE 1. Design of the behavioral training procedure.

interval during which the subject was confined to the central platform, with four presentations of each of the six arms according to a pseudo-randomized sequence. Subjects were trained until they reached a criterion performance, at which they were judged suitable to proceed to stage 2 the next day. A mouse was considered to have attained criterion performance when the ratio between the median latency to enter negative and positive arms was >1.5 for the (last) session and with both an overall ratio of >1.4 for the last 2 and of >1.3 for the last 3 consecutive sessions. Nevertheless, mice that did not attain the criterion level of performance within 15 sessions (see results) were tested in stage 2.

Stage 2. Stage 2 lasted 2 consecutive days. The problems presented in stage 2 were between the same discriminanda as in stage 1 (i.e., the reward contingency of the discriminanda remained unchanged) but their presentation was modified. The six arms were now grouped into, and presented as, three adjacent pairs (A, B, and C). Each session of these simultaneous two-choice discriminations comprised 20 consecutive trials with alternate presentation of pairs A, B, and C according to a pseudo-random sequence and separated by a 10-s interval: six trials with pairs A and B for

which the positive arm was on the same side (e.g., right), and eight trials with pair C for which the positive arm was on the opposite side (i.e., left).

Stage 3. Stage 3 comprised four successive trials separated by a 10-s interval in which presentation of the discriminanda was again modified. On each trial, the six doors giving access to the three positive and three negative arms were opened simultaneously. After a choice was made on a given arm, and as soon as the subjects returned to the central platform, this triggered the closure of the door giving access to that arm. The trial was finished when the subject had visited the six arms.

Measures of Performance

In stage 1 (go/no-go discrimination), choice accuracy was indexed by the entry latency ratio

$$[(E -) - (E +)] / [(E -) + (E +)]$$

where E- represents the median latency to enter negative arms and E+ the median latency to enter positive arms. This ratio contrasts the readiness of a subject to enter negative arms relative to positive ones, with a value of zero indicating chance level performance and values above zero indicating that the subject is more ready to enter positive arms and/or more reluctant to enter negative ones.

In stage 2 (concurrent simultaneous two-choice discrimination), accuracy was measured by percentage correct (chance: 50%).

In stage 3 (simultaneous six-choice discrimination), accuracy was measured by the percentage of correct choices recorded across the first three choices of each trial (chance: 50%) and by the mean rank order of visits to the three positive and three negative arm (chance: 3.5).

Further behavioral analysis of the animal's performance was conducted using a measure, which could be obtained in the three stages. This was the run time, defined as the time taken to traverse from the entrance to the food well of a chosen arm. As for the entry latency, performance was indexed by the run time discrimination ratio

$$[(R -) - (R +)] / [(R -) + (R +)]$$

where R- represents the median run latency in the negative arms and R+ the median run latency in the positive arms.

Histology

After completion of behavioral testing, all animals were administered a lethal dose of the anaesthetic and perfused with physiological saline followed by 10% formalin. The brains were removed from the skull and soaked in a sucrose formalin solution for 24 h, then cut into 50-µm sections on a microtome. A cresyl violet stain was used to determine cell loss attributable to the lesion. The extent of hippocampal cell loss together with any encroachment in adjacent structures were determined by visual inspection.

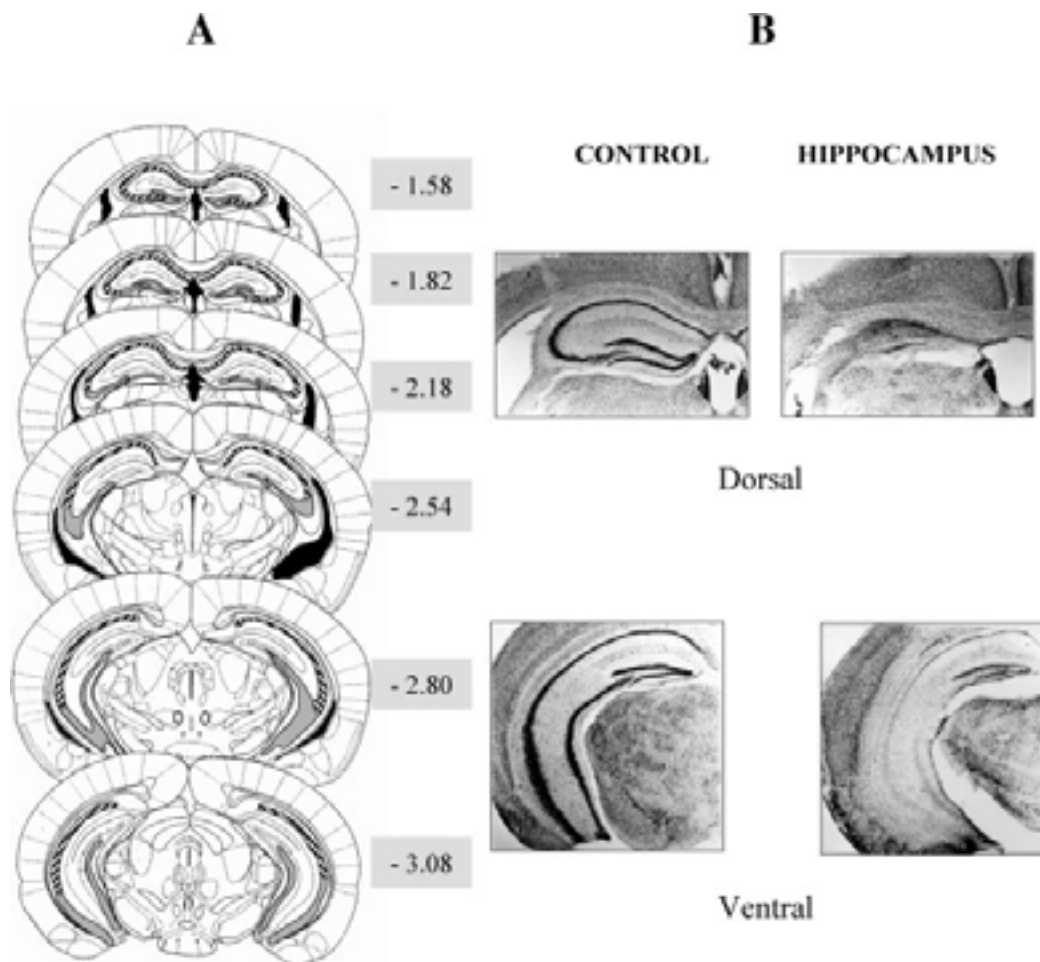


FIGURE 2. A: Histological reconstructions of the smallest (hatched) and largest (gray) hippocampal lesion in serial coronal brain sections. Numbers indicate the relative position of the sections in millimeters from bregma. B: Photomicrographs showing a repre-

sentative ibotenate lesion of the dorsal and ventral regions of the hippocampus (right), compared with the brain of a sham-operated animal (left).

RESULTS

Histological Data

The extent of the brain damage resulting from ibotenate lesions of the hippocampus can be seen in Figure 2. Photomicrographs of cell-stained sections from a representative hippocampal-lesioned mouse and from a sham-lesioned (control) mouse are shown in Figure 2B. Histological evaluation of the damage indicated that hippocampal-lesioned animals sustained more than 70% bilateral damage to the hippocampus (Fig. 2A). The relative damage of the dorsal versus ventral hippocampus varied among animals, but with more cells spared in the ventral hippocampus. Most of the animals had almost complete removal of the pyramidal (CA1–CA3) cells, but in some animals the dentate granule cells were entirely spared throughout the anteroposterior extent of the hippocampus. The extrahippocampal cortex was generally intact. No cell loss was observed in either the entorhinal cortex or the subiculum, except

for unilateral lesions in one and two animals, respectively. Finally, a minor unilateral cell loss was observed in the mediolateral thalamus of three animals.

Behavioral Data

Data analysis was divided into two parts: (1) a main analysis designed to characterize and contrast the lesion deficits in each successive stage, and (2) a supplementary analysis designed to elucidate the contrasted stage-dependent effects of the lesion on performance.

Main analysis

Stage 1. All mice in the sham (control) group (11/11) but only 11 of 15 mice in the hippocampal (HIP) group attained the criterion level of performance within the 15 sessions allowed. However, the group difference on the number of sessions did not reach the statistical level of significance [median number of ses-

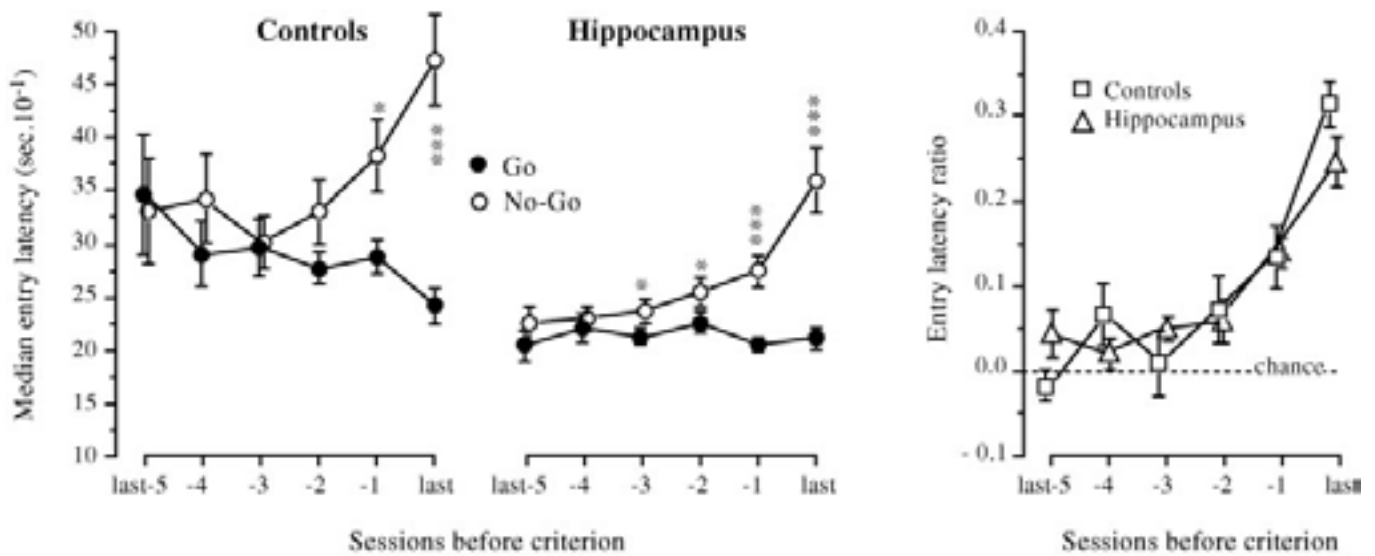


FIGURE 3. Evolutions of the mean (\pm SEM) median latency to enter the positive (go) and negative (no-go) arms (left) and of the mean (\pm SEM) entry latency discrimination ratio (right) over the last six sessions of training before reaching the criterion in stage 1 (con-

current successive discrimination) for the sham-lesioned ($n = 11$) and the hippocampal-lesioned ($n = 15$) groups of mice. Significantly different from go latencies (ANOVA with repeated measures): * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

sions and interquartile range: 11 (7.75–12) for controls and 12 (10–15.5) for the hippocampal group; Mann-Whitney U-test: $P = 0.08$]. Figure 3 (left) depicts the mean median latency to enter the positive and negative arms over the last six sessions of training. For both groups, the latency to enter between positive and negative arms continued to diverge as training progressed, thereby leading to a progressive increase in the entry latency ratio (Fig. 3, right).

Analysis of variance (ANOVA) of entry latency yielded a significant effect of lesion [$F_{(1,24)} = 19.2$; $P < 0.001$], as the HIPP group took less time than the control group to enter an arm in general, regardless of its reward valence. The main effect of reinforcement ($F_{(1,24)} = 95.3$; $P < 0.001$) and its interaction with sessions ($F_{(5,120)} = 23.8$; $P < 0.001$) were also significant. Finally, although the interaction between lesion and reinforcement did not reach the statistical level of significance ($F_{(1,24)} = 2.59$; $P = 0.12$), there was a significant lesion \times reinforcement \times session interaction ($F_{(5,120)} = 2.42$; $P < 0.05$), as by the end of training (i.e., over the last/last two sessions, see Fig. 3A), the control group displayed a slightly more marked (absolute) difference on the latency to enter between positive and negative arms than the HIPP group. ANOVA of the entry latency ratio yielded similar conclusions, with both groups displaying significant learning (session effect: $F_{(5,120)} = 27.1$; $P < 0.001$), but with no significant effect of lesion over the last six sessions ($F < 1$). There was no significant lesion \times session interaction on this (relative) measure of performance ($F_{(5,120)} = 1.70$; $P = 0.14$).

Stage 2. The mice were confronted with three simultaneous two-choice discriminations composed of the six arms presented individually to them in stage 1. As shown in Figure 4A, this led to a pronounced and persistent impairment in the HIPP group. Un-

like controls, hippocampal-lesioned mice displayed close-to-chance level performance and this impairment was observed irrespective of the 10-trial block across the two sessions. ANOVA of the percentage of correct scores (with the within-subject factor 10 trial-block) showed a significant effect of lesion ($F_{(1,24)} = 28.2$; $P < 0.001$) with a significant lesion \times block interaction ($F_{(3,72)} = 3.19$; $P < 0.05$) as performance of the HIPP group fluctuated across the four successive blocks according to an (albeit limited) pattern of within-session increase and between-session decrease in accuracy. Figure 4B contrasts this specific deficit (right) with normal performance over the last two sessions of stage 1 (left). This comparison showed that when each group was divided into two subgroups so that the entry latency ratio of hippocampal-lesioned mice over the last two sessions of stage 1 approximately matched that of control mice (see legend of Fig. 4B), the lesion effect on percentage of correct scores in stage 2 remained unchanged, as shown by a lack of significant lesion \times entry latency ratio (stage 1) interaction ($F < 1$). This was confirmed by an absence of significant correlation between measures of performance in stage 1 and the percentage of correct choices in stage 2. Specifically, regression analysis indicated that neither the number of training sessions, nor the choice latencies to enter the positive arms and the negative arms, nor the combinations of these latencies (i.e., sum, difference and ratio over the last 2 sessions) were significantly correlated with the subsequent percentage of correct choices (HIPP group: $-0.37 \times r \times + 0.42$; all p values of >0.15 ; control group: $-0.22 \times r \times + 0.23$; all p values of >0.50). Accordingly, it seems unlikely that the global and massive impairment of hippocampal-lesioned mice in the two-choice discrimination of stage 2 may be accounted for by their slightly (but not significantly) diminished performance in stage 1 (but see supplementary analysis).

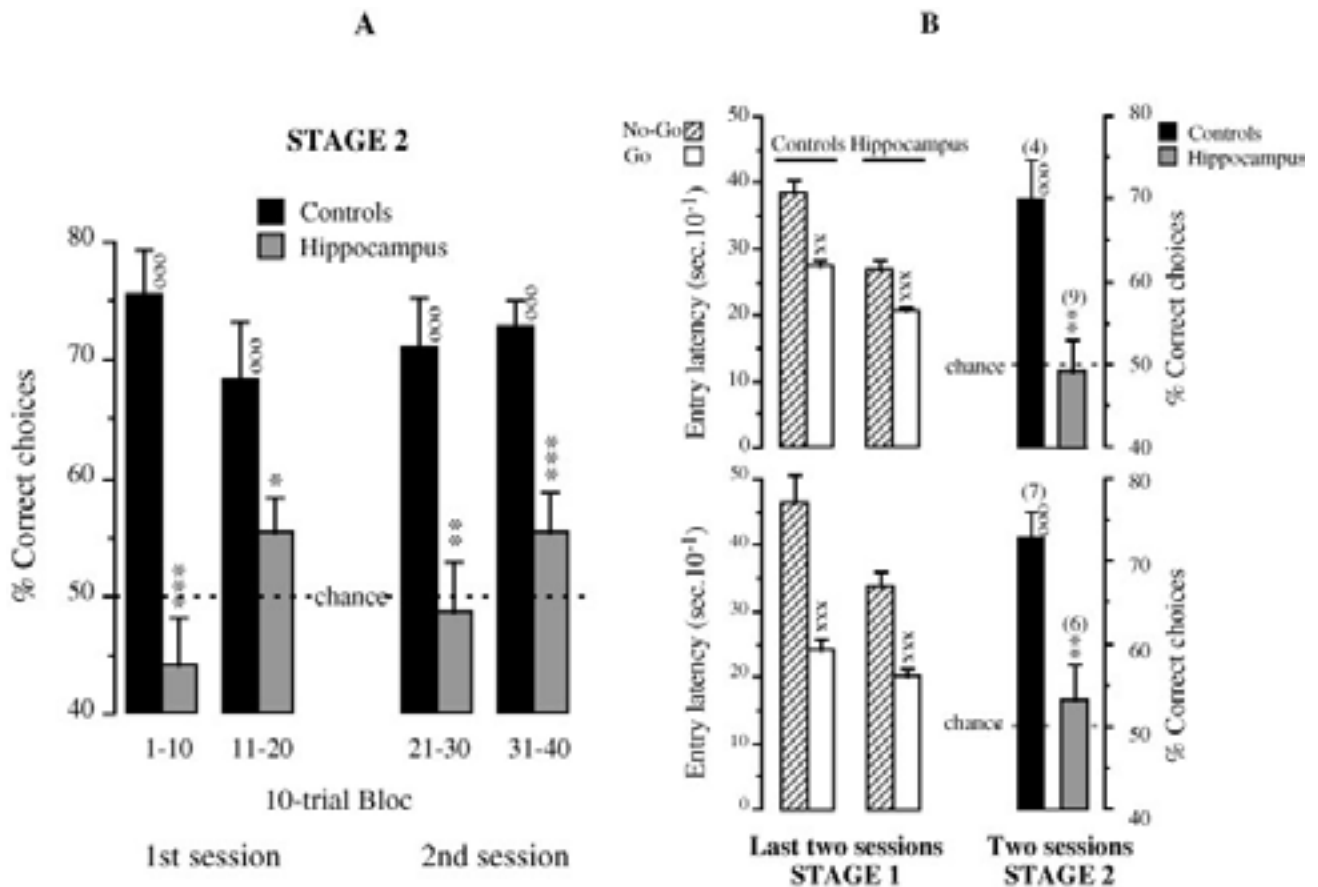


FIGURE 4. A: Mean (\pm SEM) percentage of correct choices over the 10-trial blocks of the first and second sessions on the three-pair simultaneous discrimination (stage 2) for the sham-lesioned ($n = 11$) and the hippocampal-lesioned ($n = 15$) groups of mice. B: Comparisons of performance over the last two sessions of stage 1 expressed as mean (\pm SEM) no-go versus go latencies, with performance over the two sessions of stage 2 expressed as mean (\pm SEM) percentage correct

in two subgroups composed of lesioned ($n_1 = 4$ and $n_2 = 7$) and sham ($n_1 = 9$ and $n_2 = 6$) individuals that had displayed lower (upper panel) or higher (lower panel) discrimination ratios than the median value (0.196) recorded in the whole set of subjects ($n = 26$). Significantly different from sham: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Significantly different from chance: °°° $P < 0.001$. Significantly different from go: xx $P < 0.05$; xxx $P < 0.001$.

Stage 3. The mice were confronted with the six-choice simultaneous discrimination composed of the six arms presented individually to them in stage 1, then by pairs in stage 2. This led this time to normal performance in the HIPP group, which displayed an above-chance level, and similar performance with respect to the control group. Figure 5 (left) depicts the mean percentage of correct choices during the first three visits (chance: 50%), and (right) the mean rank order of visits to positive and negative arms (chance: rank 3.5) across the four successive trials of the task. Both measures of performance were similar among the two groups, although as testing continued (trials 3 and 4) there was a slight tendency for hippocampal-lesioned mice to display a decrease in the percentage of correct choices with respect both to their own performance on trials 1 and 2 and to performance of the control group. ANOVA of the percentage of correct score and of the rank order of visits (with the within-subject factor trials) demonstrated no significant effect of lesion [percentage correct: $F_{(1,24)} = 1.72$; n.s.; rank: $F < 1$], and no significant lesion \times trial interaction (both F values < 1).

Supplementary analysis

By using measures of performance both within and across stages, the aim of the following analysis was twofold: (1) to determine which other aspects of performance are spared by HIPP lesions and which kind of response bias might eventually explain the selectivity of the deficit seen in stage 2; and (2) to characterize and contrast those aspects of previously acquired knowledge that were used to manage tasks in stages 2 and 3 and those that were not between the HIPP and control groups. For this purpose, we further examined whether performance at one stage can or cannot be predicted by performance in one (or both) of the previous stages.

Accuracy across stages as reflected by run times. Measures of performances used in the main analysis (entry latency ratio, percentage correct) corresponded to what occurred (overtly or covertly) before the initiation of the approach response. In contrast, the run time measure made it possible to evaluate the animal's

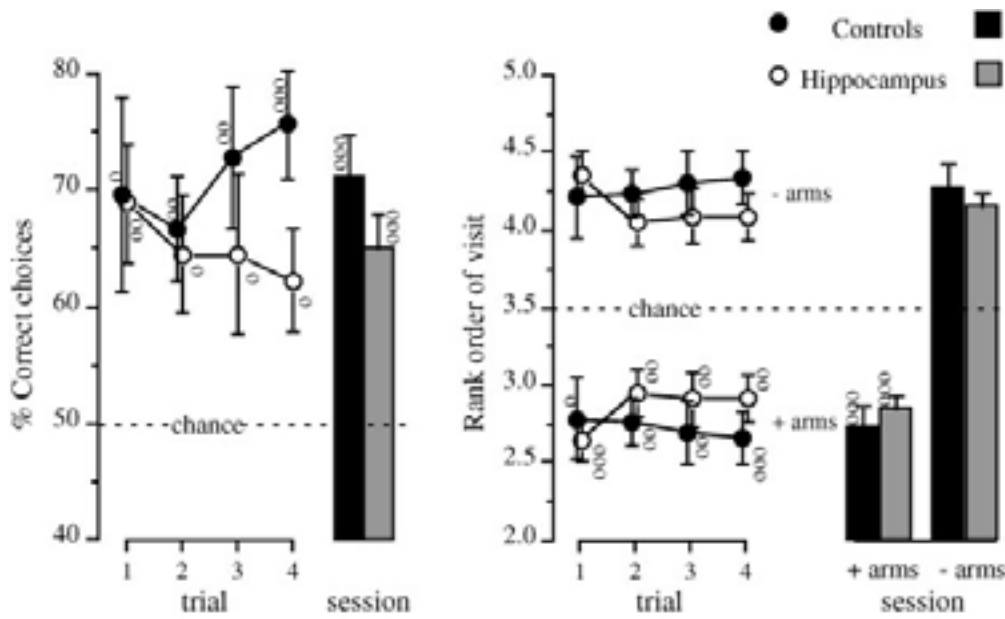


FIGURE 5. Mean (\pm SEM) percentage of correct choices for the first three visits (left) and mean (\pm SEM) rank order of visits over the four-trial session in the six-arm simultaneous discrimination (stage 3), for the sham-lesioned ($n = 11$) and for the hippocampal-lesioned

($n = 15$) groups. Histograms on the right side of each panel represent the means for the entire session. Significantly different from chance: ° $P < 0.05$; °° $P < 0.01$; °°° $P < 0.001$.

behavior after the initiation of an approach response. Moreover, it permitted direct comparison of performance across stages. Figure 6 depicts the mean run time in the negative and positive arms (left) and the corresponding mean run time ratio (right) across the final six daily sessions before attainment of the criterion performance in stage 1, over the two sessions of stage 2, and in the single four-trial

session of stage 3. During stage 1, the run speed between positive and negative arms continued to diverge as training progressed. Although less marked in the HIPP group than in the control group, the differential run speed level attained over the last two sessions of stage 1 was maintained across stages 2 and 3 in each group. ANOVA of run time restricted to the last six sessions of

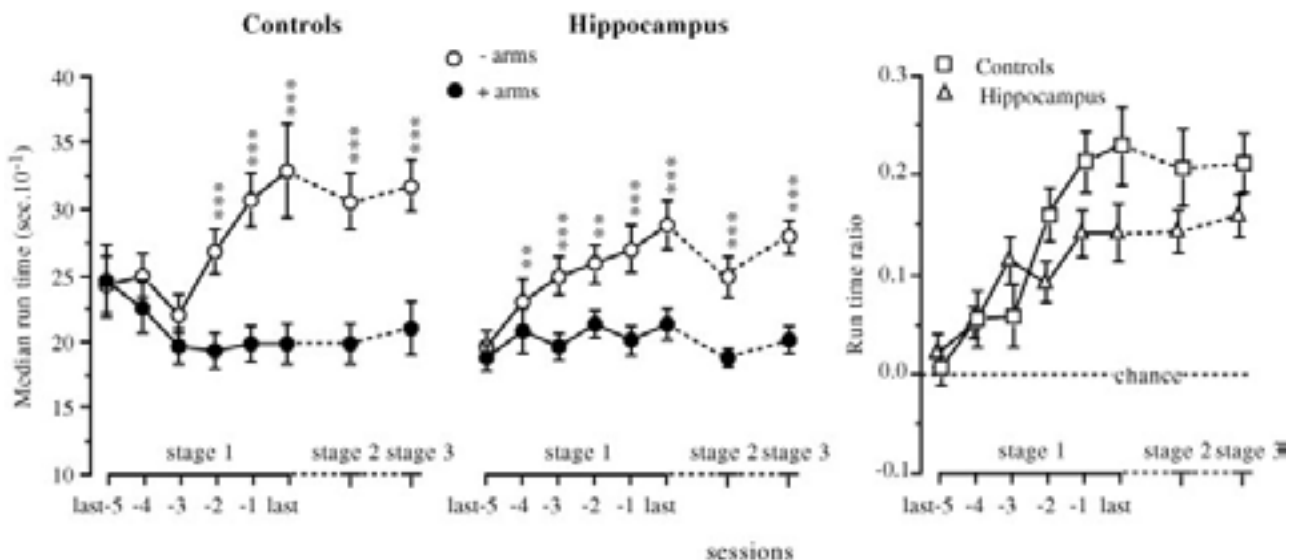


FIGURE 6. Evolutions of the mean (\pm SEM) median run time in positive (+) and negative (-) arms (left) and of the mean (\pm SEM) run time ratio (right) over the last six sessions of training before reaching the criterion in stage 1 (successive discrimination), in stage 2

(three-pair simultaneous discrimination) and in stage 3 (six-arm simultaneous discrimination) for the sham-lesioned ($n = 11$) and the hippocampal-lesioned ($n = 15$) groups of mice. Significantly different from + arms: ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

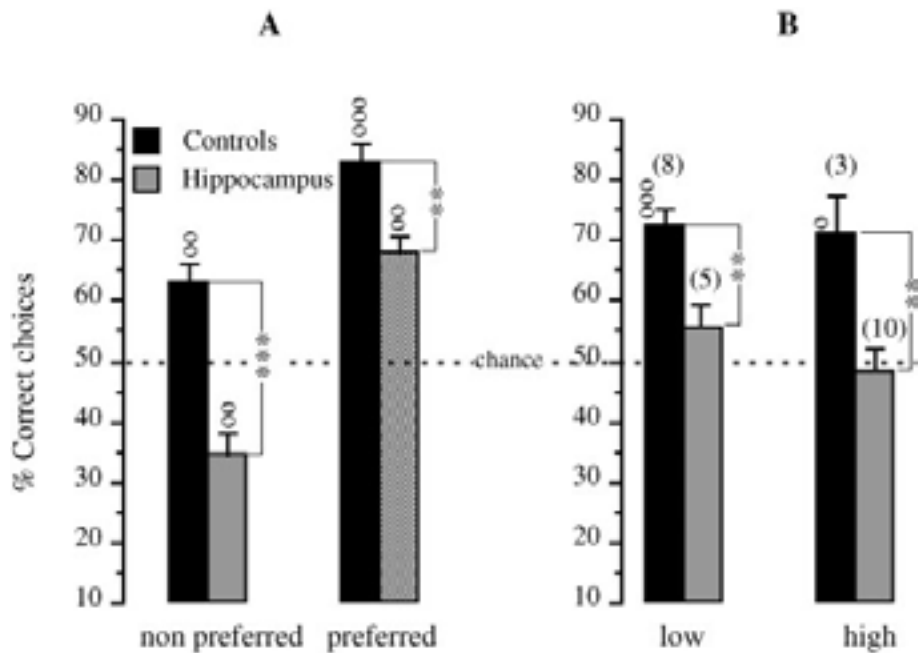


FIGURE 7. Mean percentage of correct choices (\pm SEM). **A:** For the preferred [positive (+) arm on either the left or the right side] and the nonpreferred (opposite) position in the three-pair simultaneous discrimination of stage 2 for the sham-lesioned ($n = 11$) and the hippocampal-lesioned ($n = 15$) groups of mice. **B:** In subgroups

composed of individuals that displayed lower (left) or higher (right) preference than median value (preferred minus nonpreferred = percentage) recorded on the whole set of subjects. Sham versus hippocampus: ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Significantly different from chance: ° $P < 0.05$; ∞° $P < 0.01$; ∞∞° $P < 0.001$.

stage 1 yielded a significant effect of reinforcement ($F_{(1,24)} = 53.4$; $P < 0.001$) but with no significant reinforcement \times lesion interaction ($F_{(1,24)} = 1.02$; n.s.). However, ANOVA of run time across the last two sessions of stages 1, 2, and 3 demonstrated a significant effect of lesion ($F_{(1,24)} = 4.41$; $P < 0.05$), but with no other effect attaining statistical significance (i.e., the effect of session and its interaction with reinforcement: both F values < 1). Hence, despite dramatic changes in choice accuracy across stages, hippocampal-lesioned animals maintained a clear differential run speed between positive and negative arms regardless of the testing design.

Response biases (or preferences) at stage 2. What made the testing design of stage 2 different from that of the two other stages was the possibility for animals to use a motor response strategy. Indeed, stage 2 comprised alternate presentations of pairs A, B, and C, with the positive arm of two pairs (A and B) on the left (or right) and the positive arm of the third pair (C) on the right (or left) (see Materials and Methods). We reasoned that if lesioned mice displayed a greater propensity than controls to make egocentrically based responses, this could overshadow their ability to solve the (allocentric) two-choice discrimination problems. Figure 7A shows the percentage of correct score responses sorted according to preferred (left or right) versus nonpreferred (i.e., opposite) position. In both groups, there was a marked difference between the percentage of correct choices on each of the two positions, thereby indicating the presence of a response bias, or a preference, for a particular one. Nevertheless, it is clear that whatever the position (i.e., preferred or nonpreferred), the control group displayed

above-chance and better percentage of correct scores than the HIPP group. Two-way ANOVA performed on these data showed that, in addition to the main effects of lesion ($P < 0.001$) and position ($P < 0.001$), there was a significant lesion \times position interaction ($F_{(1,24)} = 5.29$; $P < 0.05$), hence indicating that hippocampal-lesioned mice were more susceptible to preferences than control mice. However, as shown in Figure 7B, the possibility that such increased susceptibility fully accounts for the overall impairment of choice accuracy seems unlikely. Indeed, when each of the two groups was divided into two subgroups that, irrespective of the lesion, displayed either a “weak” or a “strong” tendency to prefer a given position (see legend of Fig. 7B), the lesion deficit was still observed in each subgroup. This was confirmed by ANOVA of the percentage of correct score, indicating that neither the effect of preference [i.e., “weak” versus “strong”: ($F_{(1,22)} = 0.91$; n.s.)] nor its interaction with lesion ($F_{(1,22)} = 0.42$; n.s.) were significant. Therefore, the massive deficit in hippocampal-lesioned mice seen in stage 2 cannot be explained by their greater susceptibility than controls to response biases (or preferences).

Influence of choice latencies on percentage of correct scores at stage 2. We previously observed (see Main Analysis) that during stage 1, the HIPP group took less time than the control group to enter an arm in general, regardless of its reward valence (Fig. 3). The question therefore arose as to whether, if maintained (or even amplified) in stage 2, such a readiness to enter arms would not be detrimental to performance in the two-choice problems. Table 1 shows that confrontation with the simultaneous discrimination

TABLE 1.

Entry (or Choice) Median Latency in Stage 1 and Stage 2 and Relationships With Choice Accuracy in Stage 2

Group	Stage 1 + arms (last 2 sessions)	Range of latencies	Stage 2 [2 sessions]			
			≤27.0	27.5–34.0	≥34.5	All
Controls	Entry latency	Choice	— (0)	31.67 ± 0.92 (6)	46.80 ± 5.00 (5)	38.55 ± 3.22 (11)
		% correct	—	72.50 ± 3.59	71.0 ± 3.90	71.82 ± 2.53
Hippocampus	Entry latency	Choice	22.25 ± 0.73 (8)	30.71 ± 1.19 (7)	— (0)	26.20 ± 1.30* (15)
		% correct	46.56 ± 4.57	55.71 ± 2.16*	—	50.83 ± 2.83*

^a Mean ± SEM in sec10⁻¹.

^b Number of animals.

* Significantly different from controls: *P* < 0.001.

(stage 2, two sessions) was in both groups associated with a significant increase in entry (choice) latency with respect to entry latency of positive (+) arms over the last two sessions of stage 1 (controls: from 25.5 ± 1.2 to 38.6 ± 3.2 10⁻¹ s; *P* < 0.01; hippocampus: from 20.5 ± 2.3 to 26.2 ± 1.3 10⁻¹ s; *P* < 0.001). Although the magnitude of this increase was less in the HIPP group than in the control group (lesion × stage interaction: *F*_(1,24) = 5.95; *P* < 0.05), it nevertheless showed that the hippocampal group reacted quite normally to the change in the way the arms were presented. Table 1 also shows that the subgroup of hippocampal-lesioned mice (*n* = 7) displaying choice latencies within the same (medium) range (i.e., 27.5–34.0 10⁻¹ s) as control mice (*n* = 6) still had a significant impairment in the percentage of correct scores [(55.7 ± 1.2% vs 72.5 ± 3.6%; (*F*_(1,11) = 17.2; *P* < 0.01)], whose magnitude was similar to that observed in the whole set of subjects (see right column). Moreover, although HIPP-lesioned animals with choice latencies within the medium range exhibited a trend toward better percentage of correct scores than with choice latencies within the short (i.e., = 27.0 10⁻¹ s) range (55.7 ± 1.2% vs 46.6 ± 4.6%), the difference between these two hippocampal subgroups was not significant (*F*_(1,13) = 2.96; *P* = 0.11). The lack of significant relationships between choice latency and percentage of correct score in stage 2 was confirmed by using a regression analysis in which each pair was considered separately [i.e., 45 (3 × 15) observations in the hippocampal group and 33 (3 × 11) observations in the control group]. As in the previous analysis, this yielded a nonsignificant trend toward a positive correlation in the hippocampal group (*r* = + 0.20; *P* > 0.15), and a total lack of correlation in the sham group (*r* = -0.001; *P* > 0.90). Taken together, these results strongly suggest that the contribution of the diminished choice latency to the deficit of the HIPP group in the two-choice discrimination problems was at best very marginal.

Relationships between accuracy of performance across stages.

The main analysis showed that HIPP-lesioned mice displayed normal performance when the three positive (+) arms and three neg-

ative (-) arms were presented one by one (stage 1), failed to choose correctly when these arms were grouped into three pairs of opposing valence (stage 2), but chose correctly again when the six arms were presented simultaneously (stage 3). Using separate measures of performance on each of the six arms, our principal aim was to determine which aspects of their previously acquired knowledge (as measured in stages 1 and 2) animals used in correctly managing the simultaneous six-arm discrimination (stage 3), and whether this used knowledge was the same or different between the HIPP and control groups. Furthermore, we reexamined relationships between performance in stages 1 and 2. To this end, we reasoned that in addition to discriminating between the set of positive and the set of negative arms, the mice might discriminate within the three positive and within the three negative arms. We then examined whether such within-arm discrimination, as assessed by ordering levels of performance on the + arms and on the - arms in each individual at a given stage, was (or was not) related to performance measured in a later stage. Changes in performance among each of the three + arms and among each three - arms at any stage was then submitted to ANOVA with ordered arm discriminative performance observed in a previous stage as the within-subject factor (repeated measures) and lesion as the between-group factor.

Stage 3 vs stage 2. We reasoned that the difference in the magnitude of reward obtained in (and thus the number of entries into) each of the three positive arms during stage 2 might have subsequently determined the order in which the animals visited these + arms in stage 3. Specifically, the greater the number of entries into a given positive arm in stage 2, the earlier might the visit be to (and hence the lower the rank order for) that + arm in stage 3. Conversely, the greater the number of entries into a given negative arm (i.e., the greater the magnitude of nonreward in that arm), the later might the visit be to (and hence the higher the rank order for) that - arm. As shown in Figure 8A, the rank order of visits to each of the three positive arms in stage 3 was related to the number of visits to these same + arms in stage 2 in the control

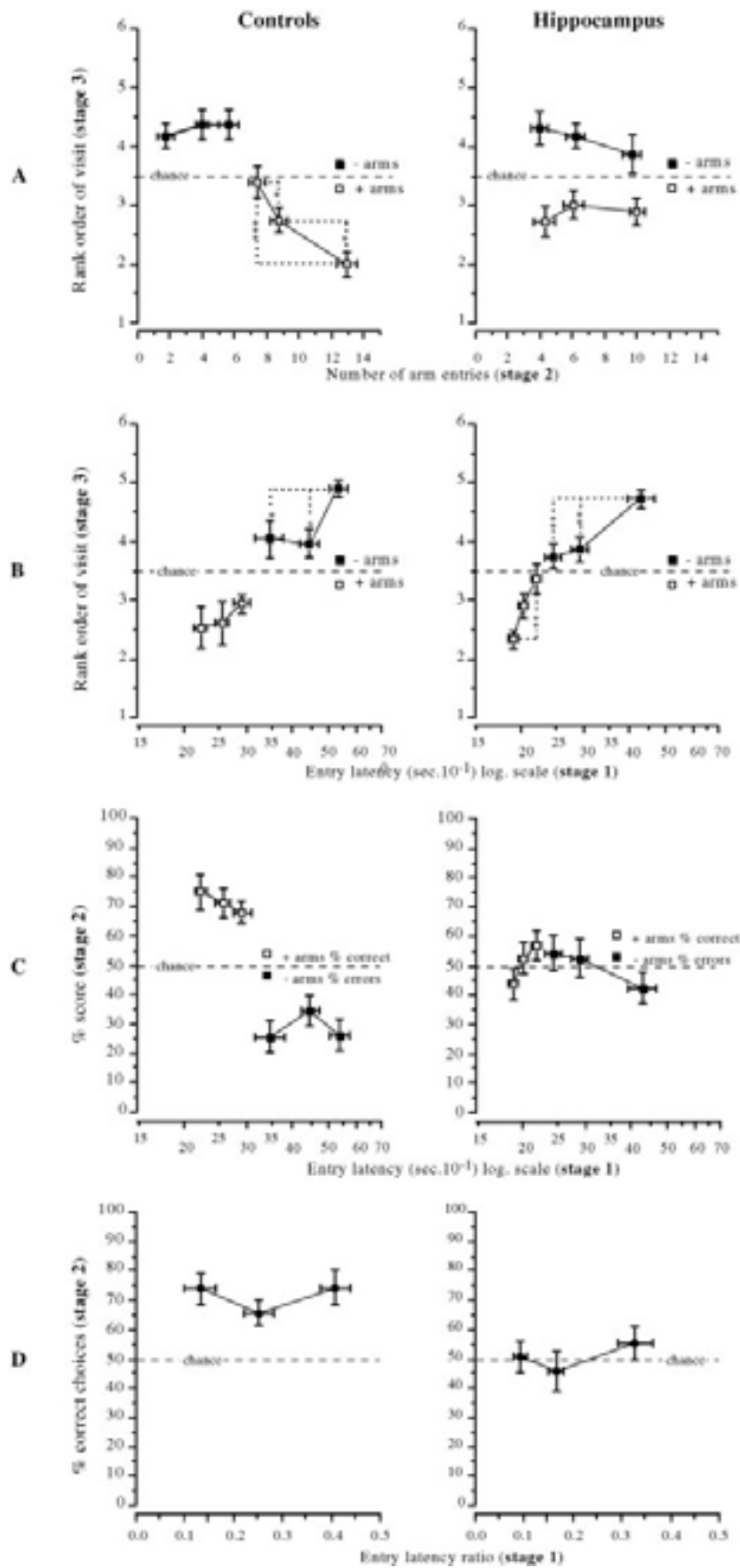


FIGURE 8

group, but not in the HIPP group. In neither group was there any evidence for a relationship between the rank order of visits to each of the three negative arms in stage 3 and the number of visits to these same $-$ arms in stage 2. ANOVA performed on these data confirmed these impressions, i.e., the rank order of visits to each of the three $+$ arms in stage 3 was significantly related to the previous number of entries into these same arms in the control group (repeated measures: $F_{(2,20)} = 10.13$; $P < 0.001$), but not in the hippocampal group ($F_{(2,28)} = 0.4$; n.s.). This yielded a significant lesion \times repeated measures interaction ($F_{(2,48)} = 4.65$; $P < 0.05$). The analysis performed on negative arms did not reveal any significant effect (all F values < 1).

Stage 3 versus stage 1. The same line of reasoning as above was used to assess relationships between performance in stages 1 and 3. Namely, the shorter the latency to enter (and thus the greater the attractiveness for) a given positive arm in stage 1, the earlier might the visit be to (and thus the lower the rank order for) that $+$ arm in stage 3. Conversely, the longer the latency (and thus the reluctance) to enter a given negative arm in stage 1, the later might the visit be to (and thus the higher the rank order for) that $-$ arm in stage 3. Results are depicted in Figure 8B. Although less marked in the control than in the hippocampal group, there was an overall trend toward relationships between the rank order of visits to $+$ arms in stage 3 and entry latency in stage 1; among any two $+$ arms, animals were likely to choose earlier the one for which they had displayed the shorter entry latency in stage 1. Moreover, for $-$ arms, both groups displayed a similar trend toward choosing later the $-$ arm for which they had displayed the longer entry latency in stage 1. Two-way ANOVA performed on these data indicated that the rank order of visits both to $+$ arms (repeated measures $F_{(2,48)} = 3.91$; $P < 0.05$) and to $-$ arms in stage 3 ($F_{(2,48)} = 10.4$; $P < 0.001$) was significantly related to the entry latency in stage 1, but that neither of these relationships was significantly affected by the lesion (lesion \times repeated measures interaction: both F values < 1).

Stage 2 versus stage 1. Our previous main analysis showed that HIPP-lesioned mice were slightly (although not significantly) impaired with respect to controls in the initial (go/no-go) learning stage, but that this impairment was unlikely to be responsible for their massive impairment seen in stage 2. Figure 8C again shows

that irrespective of the huge difference between the two groups in their ability to correctly discriminate between the set of $+$ arms and the set of $-$ arms when grouped into three separate pairs, there was no evidence in either group that changes in the degree of readiness (or reluctance) to enter each $+$ arm (or $-$ arm) in stage 1 (as indexed by entry latencies) was translated into significant changes in the percentage of correct (or incorrect) choices in stage 2. This description was confirmed by ANOVA yielding no significant relationships between percentage of either correct or incorrect scores in stage 2 and latency to enter $+$ arms (or $-$ arms) in stage 1 (repeated measures: all F values < 1.6 ; all p values of > 0.20 ; lesion \times repeated measures interaction: all F values < 1.7 ; all p values of > 0.18). This lack of relationships was further strengthened by an analysis in which the percentage of correct score on each of three pairs of arms actually used in stage 2 was plotted against levels of entry latency ratio for the same pairs over the last two sessions in stage 1. As shown in Figure 8D, this analysis provided no evidence for a significant change in percentage of correct choices as a function of entry latency ratio (repeated measures: $F_{(2,48)} = 1.18$; $P = 0.32$), nor for any significant effect of the lesion on this change (lesion \times repeated measure interaction: $F < 1$).

Therefore, the results from the present analysis corroborated those obtained from the main analysis indicating that in both groups, there was a lack of detectable relationships between measures of performance in the successive (go/no-go) discrimination of stage 1 and in the three-pair simultaneous discrimination of stage 2. Moreover, this analysis made it possible to further contrast performance in stages 2 and 3 (six-choice simultaneous discrimination); in the latter (but not the former), significant relationships with stage 1 were observed using the same (entry latency) measure of performance (cf. Fig. 8B and C).

DISCUSSION

Using a three-stage behavioral paradigm, the findings described in this study show that compared with intact mice, HIPP-lesioned mice displayed a pattern of impaired versus spared performance when confronted with different versions of a place discrimination in a radial maze. They learned the initial successive (go/no-go) discrimination task involving three positive and three negative arms at a near-normal rate (stage 1). When subsequently challenged with a modified presentation of the same set of arms, they were dramatically impaired when confronted with choices between two adjacent arms of opposite valence (the three-pair simultaneous discrimination of stage 2), whereas they performed normally if the six arms were presented simultaneously (the six-choice simultaneous discrimination of stage 3). Therefore, these findings suggest that the extent to which the HIPP lesion alters performance depends on the way of presenting discriminanda to the subject.

Before discussing the issue regarding the specific demands each task places on hippocampal-related performance, the question will be addressed as to whether the order at which the three versions of

FIGURE 8. A,B: Relationships between the mean rank order of visit to each of the three positive ($+$) arms and to each of the three negative ($-$) arms in stage 3 and, respectively, the mean (\pm SEM) number of entries in stage 2 and the mean entry latency of these same arms in stage 1. (C) Relationships between the mean percentage score for each of the three $+$ arms (percentage correct) and for each of the three $-$ arms (percentage errors) in stage 2 and the mean entry latency of these same arms in stage 1. For each subject, and each arm category (i.e., positive and negative) the three values of the parameters represented in abscissae (i.e., number of entries and entry latency) are arranged in ascending order and plotted against the value represented in ordinate (i.e., rank order of visits and percentage score). Values are represented as means \pm SEM. post-hoc Fisher test: * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$; *** $P < 0.001$.

the task were used, rather than their own intrinsic performance demands, might explain the present findings.

Is the Deficit of Hippocampal Mice Really Specific to the Two-Choice Version of the Task?

There was already a slight (although nonsignificant) impairing effect of the HIPP lesion in the initial successive (go/no-go) discrimination; that is, some lesioned mice failed to reach the criterion of acquisition within 15 sessions, and even those that succeeded normally displayed a reduced entry latency ratio as compared with controls in the final sessions of training. Accordingly, one could argue that the change in the way of presenting the arms in stage 2 had only amplified an underlying deficit in place discrimination that was not clearly seen using the initial acquisition design. In this view, the impairing effect of the lesion in stage 2 (as assessed by the percentage of correct score) should disappear by restricting the between-group comparison of those control and HIPP-lesioned mice that displayed similar levels of performance in stage 1. Moreover, this impairing effect should be maintained in stage 3 in which a (new) change in the way of presenting arms was introduced. Both of these hypotheses were actually refuted by the results. Neither measure of performance taken at stage 1 (i.e., number of sessions to reach criterion, entry latency and entry latency ratio) was found to account for the deficit seen in stage 2, which almost completely disappeared in stage 3.

Nevertheless, it might still be argued that because lesioned mice would be slowed down slightly in acquiring the initial version of the task, further training in stage 2 (although in a modified manner) would help them to complete their still insufficient level of training, within the two sessions allowed. Accordingly, they would perform normally in the last stage. Notwithstanding the fact that such a line of reasoning can hardly account for the impaired performance in stage 2 of those lesioned mice that otherwise displayed normal performance in stage 1 (see above), this would imply a progression of performance from stage 1 to stage 3. Moreover, even though not directly seen in choice accuracy, such a progression should at least be detectable in the form relationships between some other learned aspects of performance across the three stages. Such relationships were actually observed in controls, for which the preferences among positive arms and to a lesser extent among negative arms were significantly maintained both from stage 2 to stage 3 (Fig. 8A) and from stage 1 to stage 3 (Fig. 8B). In contrast, these relationships were observed only between stages 1 and 3 in HIPP-lesioned mice, thereby clearly ruling out stage 2 from any consistent progression of learning from stage 1 to stage 3. This observation is further strengthened by results from a pilot experiment showing that HIPP-lesioned mice trained in stage 1, as in the present experiment, did not exhibit any sign of consistent improvement of choice accuracy in stage 2 across four daily sessions (instead of two in the present experiment). Therefore, none of our existing data supports the view that the particular ordering of the three versions of the task used in the present experiment can be considered as a determining factor for the selectivity of the deficit seen in stage 2.

Such a deficit is also unlikely to be due to confounding changes in any of the nonspecific aspects (affect, motivation, perception), as all the basic requirements of the task (in terms of stimulus, reward, and motor responses involved) were mainly identical in the three versions. Nevertheless, mice with hippocampal lesions responded faster and had a greater propensity than intact mice to exhibit responses, biases or preferences. Both alterations, which may stem from a failure of hippocampal mice to inhibit responding at the time of choice, might have contributed to their deficit in the two-choice task. In fact, data analysis did not provide any evidence for such a contribution. First, HIPP-lesioned mice that displayed choice latencies within the same range as controls remained significantly impaired in the two-choice task (see table 1); moreover, their increased readiness to enter arms should also have influenced their performance in the simultaneous six-arm discrimination of stage 3. Second, the deficit of HIPP-lesioned mice in managing the two-choice task was still observed in those lesioned mice that displayed similar levels of response bias as controls (Fig. 7). Rather than being the cause of impaired choice accuracy performance, it is possible that the overall increase in response bias of the HIPP group is the consequence of a deficient memory which, in contrast with the effective memory of controls, would no longer be able to reduce the occurrence of such responses (for a similar view, see Hampson et al., 1999). Finally, even though in the second stage, hippocampal-lesioned mice chose at close-to-chance level between two arms, they nevertheless displayed preserved learning and memory-related capabilities. With respect to controls, HIPP-lesioned mice reacted quite normally to the change in the way arms were presented, as evidenced by their significant increase in entry (choice) latency when shifted from stage 1 to stage 2 (see table 1). Moreover, they successfully discriminated between positive and negative arms after a choice had been initiated as evidenced by their significant differential run speed between these arms (Fig. 6).

Therefore, the selectivity of the deficit in mice with hippocampal lesions provides further evidence for the contrasting effects of hippocampal damage on cognitive function. It also corroborates our previous studies suggesting that the two-choice version of the task makes it possible to specifically assess a form of mnemonic expression that critically depends on the functional integrity of the hippocampus (Etchamendy et al., 2001).

What Makes the Two-Choice Version Sensitive to Hippocampal Dysfunction?

The deficit observed in adult mice with hippocampal lesions is similar to that seen in aged mice (Marighetto et al., 1999), and both resemble the deficit observed in rats with fornix lesions in the studies of Eichenbaum et al. (1988). In each of these studies, experimental animals could acquire successive discrimination tasks in which they were presented with one discriminandum at a time, but they were impaired when presented simultaneously with two discriminanda. Furthermore, even for those aged mice or fornix-lesioned rats that were able to acquire the two-choice simultaneous discrimination, a significant deficit could still be revealed in the flexible use of memory by challenging them with a rearrangement

of familiar items. Similarly, rats with hippocampal damage were found to be successful in learning to navigate from a constant-start position to a submerged platform in the Morris water-maze, but were impaired when subsequently required to navigate by novel routes (Eichenbaum et al., 1990). Our present results are in agreement with these findings. They show that (1) some learning about the location of reward can be spared after hippocampal damage, but that (2) this cannot be translated systematically into an efficient approach to reward in modified situations.

On the basis of the theorization proposed by Eichenbaum and colleagues (see the Introduction section), one explanation of such a loss of flexibility is that the relational processing of incoming information is altered. According to this view, HIPP-lesioned mice might store and encode experience acquired in stage 1 as impoverished and separate representations of each arm with its assigned reward valence. They might lack the representation of a complex framework incorporating the relative relationships among choice arms that normally enable comparisons and contrasts between separately experienced items, as presumably required in stage 2.

Up to this point, the interpretation seems tenable. However, the question remains as to why HIPP-lesioned mice perform normally when subsequently challenged with the six-choice discrimination in stage 3, a version of the task that seemingly requires comparisons between separately experienced items. With respect to the present theorization, this in fact supposes the existence of differences between the design of the two-choice and six-choice task that might involve the use of relational representations in the former but not in the latter.

We previously hypothesized (Marighetto et al., 1999) that one critical determinant that makes a simultaneous two-choice discrimination sensitive to hippocampal lesions or dysfunction (as exemplified by fornix lesions or aging) might be the degree of overlap (common elements) between the discriminanda. When at the choice point between two adjacent arms on a radial maze, the mice are exposed to the stimuli associated with both arms. The correct explicit choice must be selected despite this overlap of the informative stimuli. This is a consequence of the spatial layout of the apparatus, but it might also be expected to be the case when choosing between two odors, although not in every design; compare the experiments of Eichenbaum et al. (1988, 1989) with the experiment carried out by Dusek and Eichenbaum (1997). In contrast, when testing object recognition, in which concurrent discrimination deficits have not been seen reliably in hippocampectomized animals or in amnesiac humans (see discussion and references in Deacon and Rawlins, 1996), the choice of whether to select a particular object depends on the stimulus properties of that object alone. Objects such as the odors in the experiment conducted by Dusek and Eichenbaum (1997) are typically investigated in turn, so their stimulus properties are typically experienced separately. Thus, even a simultaneous discrimination can be broken down into two separate go/no-go discriminations. This interpretation was tested by examining the simultaneous discrimination performance of aged mice using more widely separated arms (90 degrees instead of 45 degrees) on a radial maze: the deficit was abolished. It may consequently be assumed that the six-choice task

design enables the mice to escape, at least partially, from the absolute need to compare selected adjacent arms. Such a design would allow them to travel from any given arm to any other one, a behavior that could result in the breaking-down of this "simultaneous discrimination" into separate go/no-go discriminations. In support of this view, the experiments carried out by Brown's group have shown that in the typical radial-maze "reference" memory task (in which all arms are made accessible simultaneously), arm visits are better described as the end product of a series of go/no-go decisions than as a spatial guidance-related behavior based on a cognitive map of the maze (Brown, 1992; Brown et al., 1993). Interestingly, it has been shown that restricting access to extramaze visual cues results in a higher level of spatial guidance (Brown et al., 1993). Taken together, these observations suggest that the overlapping stimuli associated with both arms, and possibly the restricted access to extramaze cues, might contribute to the specificity (and hence the selectivity) of hippocampal lesions on performance in stage 2 with respect to stage 3. Alleviating these perceptual constraints by giving access to the six arms simultaneously (stage 3) would be associated with a shift from a prevailing relational to a prevailing procedural-based memory expression of acquired preference for positive arms.

Data from the analysis devoted to relationships between measures of performance across stages both support and refine our present suggestion. We first observed that the rank order at which control mice targeted the three positive arms in the six-choice version of the task was not random but significantly related to their previous (stage 2) level of accuracy to discriminate each of these positive arms (Fig. 8A). Such a specific relationship would not have been observed if their six-choice discriminative performance had solely relied on a sequence of go/no-go decisions in which each arm had been investigated in turn and had either been accepted (effective visit) or rejected (Brown et al., 1993). The behavior of control mice would rather indicate that they were using a representation of the specific locations of the baited arms and, in a sense, of the relative probability of finding food in each of them. This type of representation would be lacking (or not translated into behavior) in HIPP-lesioned mice that were shown to visit the positive arms at random with respect to the previous (second) stage. Hence, HIPP-lesioned mice might successfully manage the six-choice version of the task by using the sole go/no-go strategy. This assumption was actually supported by the significant relationships observed between the relative magnitude of rejection (or acceptance) of a given arm in stage 1 and the rank order of visits in stage 3 (Fig. 8B). Although relationships between performance in stages 3 and 1 were also observed in controls, they were limited to the degree of rejection among negative arms, the order at which these mice visited positive arms being better predicted by their performance in stage 2. Therefore, HIPP-lesioned mice differed from controls in that not only they behaved in stage 2 as if they had learned nothing during stage 1, but they behaved in stage 3 as if stage 2 testing had not occurred. A noticeable exception to this was the maintenance throughout testing of the constant differential run speed between positive and negative arms acquired in stage 1. Together with their ability in succeeding in testing designs allowing the use of a go/

no-go strategy, this strongly suggests that HIPP-lesioned mice were able to form simple associations between individual set of cues and the behavior either reinforced (or not reinforced) by food. Thus, as mentioned above, what would be lacking after hippocampal lesions is a representation of the relationships between the individual set of cues that would allow comparisons among them, and hence successful performance whenever the task design (i.e., stage 2) encourages the use of such representations.

Evidence of Relational Processing of Information in Control Mice and of Its Alteration in Hippocampal Mice

Our major assumption in interpreting the present findings is that control mice would spontaneously become engaged in the relational processing of the separately experienced arms whereas HIPP-lesioned mice would not. To obtain supportive experimental evidence for this assumption, further analysis of performance in stage 1 was conducted. During each daily session of the task, each arm was presented four times within a pseudo-randomized sequence of visits to the six arms. In this way, two consecutive trials with any one arm within a given session were separated by a variable number of interposed concurring trials with any one of the five other arms. We thus examined whether the behavior of animals, as assessed by the total time taken to reach the food well after opening the door giving access to a given positive or negative arm, was influenced by the remoteness of the preceding trial on the same arm, as assessed by the number of interposed concurring trials. The results from the analysis summarized in Figure 9 (left) showed that as soon the first six sessions of training were over, control mice did display enhanced preference for a positive with respect to a negative arm, provided the preceding entry into these arms had occurred recently (i.e., with no more than 2–3 interposed concurring trials). These observations suggest that over the first training sessions control mice spontaneously used their memories of previous experience with arms, insofar as these memories had not vanished due to the length of the time interval and/or the number of interfering concurring trials. Moreover, their ongoing differential responses with respect to positive and negative arms indicated that these memories informed them as to whether or not a specific arm was rewarded.

These data strongly suggest that normal mice have the capability of relating such temporally discontinuous events with each other (Wallenstein et al., 1998), at least when the gap between them is not too large. Therefore, they give further support to the view that discrimination learning performance in our control mice might, at any stage, rely on the encoding and use of relational representations. Also coherent with this view is the fact that such a delay/interference-dependent pattern of arm discrimination was still visible over the last six sessions of the go/no-go training (Fig. 9, right), a phenomenon that would also suggest that despite further training, control mice had not—or at least not completely—shifted from a relational/declarative to a procedural form of mnemonic expression (Packard and McGaugh, 1996).

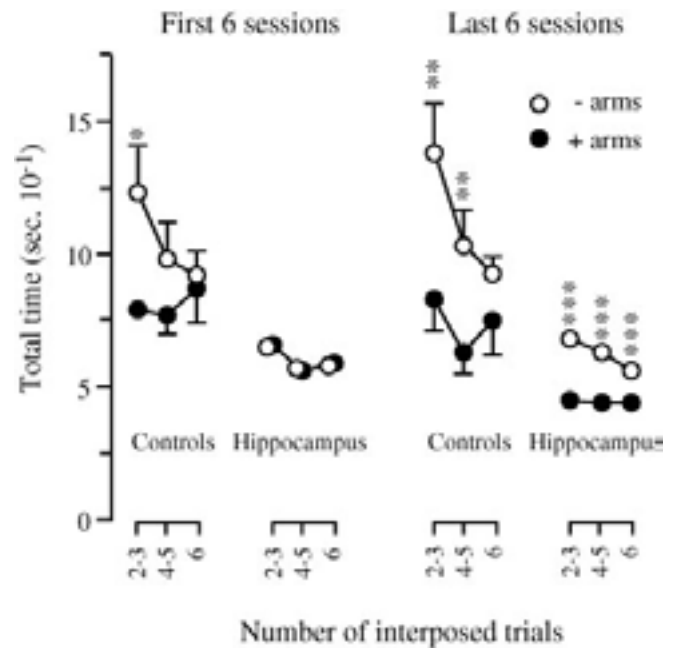


FIGURE 9. Mean (\pm SEM) of the mean individual total time (i.e., entry latency + run time) to reach the food cup of a given positive (+) or negative (–) arm as a function of the number of interposed trials on the other 5 arms over the first 6 (left) and last 6 (right) sessions of stage 1 (successive discrimination) in controls and hippocampal-lesioned mice. ANOVA of total time: lesion \times reinforcement \times interposed trials interaction: first six sessions: $F_{(2,48)} = 3.21$; $P < 0.05$; last six sessions: $F_{(2,48)} = 1.57$; n.s.). Significantly different from + arms: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. All values of SEM in the hippocampal group are inferior to the size of the circle.

Whatever the case, such a specific pattern was clearly not observed in HIPP-lesioned mice, although their behavior did appear to be significantly influenced by the relative recency of any preceding experience with a given arm (Fig. 9, left). Namely, even though as soon as the first six sessions were over, they took significantly more time to visit an arm that was encountered recently as compared with remotely, this change was strictly unrelated to the valence of the arm. In other words, the influence of past experience on their current ongoing behavior might not include knowledge about the valence of the arm. Thus, in contrast with controls, HIPP-lesioned mice might express their memory of previous entries into an arm in the form of a familiarity-based judgment toward that arm, but without any prediction as to the probability of finding food at its end.

It follows that hippocampal damage might not result in a deficit (not even a retardation) in place discrimination learning per se. The behavior of hippocampal mice in the earliest sessions of training rather indicates that they somehow recognized an arm that had been visited recently; however, their mnemonic representations might not (or not sufficiently) have allowed them to retrieve such a recent episode in a way that suggests discrimination between positive and negative arms, as observed in controls. Discrimination among positive and negative arms in HIPP-lesioned mice appeared after repeated training and was still largely—but not entirely—

unrelated to the remoteness of past episodes (Fig. 9, right). This suggests that the discriminative performance of mice with hippocampal lesions mainly relied on a procedural form of learning.

Taken together, these results provide evidence that in stage 1, control mice related information presented across trials, unlike HIPP-lesioned mice. Normal mice might thus be able to encode separate experiences with each arm into relational representations that could support comparisons among these arms in stage 2, whereas mice with hippocampal damage might not. The lack of relational processing in lesioned mice may be due to a failure either to encode, to retain, and/or to retrieve episodic arm-related information across trials. It follows that manipulating the temporal gap between successive trials on any given arm in normal adults, aged, or even HIPP-lesioned mice in stage 1, should alter their respective capability to manage the two-choice discrimination problems in stage 2. Experiments aimed at testing this possibility are currently in progress.

CONCLUSIONS

The selectivity of the deficit seen in hippocampal mice suggests that different forms of memory expression of the same acquired experience can be preferentially triggered through a change in the way discriminanda are presented. This is reminiscent of the dissociation between implicit and explicit expression of the same piece of previously learned material in human amnesiac subjects (Schacter, 1987). Hence, if the tendency to approach a previously rewarded arm and to hesitate or avoid when faced with a previously nonrewarded arm (as observed in stages 1 and 3 of the present experiment) is analogous to some aspects of implicit memory in humans, the failure to select between two such arms when they are presented simultaneously (as observed in stage 2) might parallel the loss of explicit memory for events that can be seen in humans whose implicit memory is apparently intact. This outlines the potential interest of animal models of human cognition derived from the relational theory.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Ray Cook for helpful comments on this manuscript and for suggestions for English revision.

REFERENCES

- Brown MF. 1992. Does a cognitive map guide choices in the radial-arm maze? *J Exp Psychol Anim Behav Process* 18:56–66.
- Brown MF, Rish PA, VonCulin JE, Edberg JA. 1993. Spatial guidance of choice behavior in the radial-arm maze. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 19:195–214.
- Cohen NJ. 1984. Preserved learning capacity amnesia: evidence for multiple memory systems. In: Squire LR, Butters N, editors. *The neuropsychology of memory*. New York: Guilford. p 83–103.
- Cohen NJ, Eichenbaum H. 1993. *Memory, amnesia and the hippocampal system*. Cambridge, MA: MIT Press.
- Deacon RMJ, Rawlins JNP. 1996. Effects of aspiration lesions of hippocampus or overlying neocortex on concurrent and configural object discriminations in rats. *Behav Brain Res* 77:165–174.
- Dusek JA, Eichenbaum H. 1997. The hippocampus and memory for orderly stimulus relations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7109–7114.
- Eichenbaum H. 1994. The hippocampal system and declarative memory in humans and animals: Experimental analysis and historical origins. In: Shacter DL, Tulving E, editors. *Memory systems*. Cambridge MA: MIT Press. p 147–202.
- Eichenbaum H. 1997. Declarative memory: insights from cognitive neurobiology. *Annu Rev Psychol* 48:547–572.
- Eichenbaum H, Fagan A, Mathews P, Cohen NJ. 1988. Hippocampal system dysfunction and odor discrimination learning in rats: impairment or facilitation depending on representational demands. *Behav Neurosci* 102:331–339.
- Eichenbaum H, Mathews P, Cohen NJ. 1989. Further studies of hippocampal representation during odor discrimination learning. *Behav Neurosci* 103:1207–1216.
- Eichenbaum H, Stewart C, Morris RGM. 1990. Hippocampal representation in place learning. *J Neurosci* 10:3531–3542.
- Etchamendy N, Enderlin V, Marighetto A, Vouimba RM, Pallet V, Jaffard R, Higeret P. 2001. Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling. *J Neurosci* 21:6423–6429.
- Gabrieli JD. 1996. Memory systems analyses of mnemonic disorders in aging and age-related diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13534–13540.
- Hampson RE, Jarrard LE, Deadwyler SA. 1999. Effects of ibotenate hippocampal and extrahippocampal destruction on delayed-match and -nonmatch-to-sample behavior in rats. *J Neurosci* 19:1492–1507.
- Jarrard LE. 1993. On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behav Neural Biol* 60:9–26.
- Marighetto A, Etchamendy N, Touzani K, Torrea CC, Yee BK, Rawlins JN, Jaffard R. 1999. Knowing which and knowing what: a potential mouse model for age-related human declarative memory decline. *Eur J Neurosci* 11:3312–3322.
- Marighetto A, Touzani K, Etchamendy N, Torrea CC, De Nanteuil G, Guez D, Jaffard R, Morain P. 2000. Further evidence for a dissociation between different forms of mnemonic expressions in a mouse model of age-related cognitive decline: effects of tacrine and S 17092, a novel prolyl endopeptidase inhibitor. *Learn Mem* 7:159–169.
- McDonald RJ, White NM. 1995. Hippocampal and non-hippocampal contributions to place learning in rats. *Behav Neurosci* 109:579–593.
- O'Keefe J, Nadel L. 1978. *The hippocampus as a cognitive map*. New York: Oxford University Press.
- Packard MG, McGaugh JL. 1996. Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiol Learn Mem* 65:65–72.
- Schacter DL. 1987. Implicit expressions of memory in organic amnesia: learning of new facts and associations. *Hum Neurobiol* 6:107–118.
- Squire LR. 1992. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev* 99:195–231.
- Wallenstein GV, Eichenbaum H, Hasselmo ME. 1998. The hippocampus as an associator of discontinuous events. *Trends Neurosci* 21:317–323.
- Whishaw IQ, Cassel JC, Jarrard LE. 1995. Rats with fimbria-fornix lesions display a place response in a swimming pool: a dissociation between getting there and knowing where. *J Neurosci* 15:5779–5788.

CHAPITRE IV

ETUDE DES EFFETS DE L'ADMINISTRATION D'ACIDE RÉTINOÏQUE SUR UN MODELE DE DEFICIT MNESIQUE LIE A L'AGE

CHAPITRE IV

ETUDE DES EFFETS DE L'ADMINISTRATION D'ACIDE RETINOÏQUE SUR UN MODELE DE DEFICIT MNESIQUE LIE A L'AGE

Les raisons de notre intérêt pour l'étude des relations potentielles entre la voie de signalisation nucléaire des rétinoïdes et la fonction mnésique, ont été exposées dans la deuxième partie de notre introduction générale. Nous en résumons ici les principaux points.

Les rétinoïdes forment un complexe fonctionnel avec leurs récepteurs nucléaires (RAR et RXR). Ces complexes récepteur-ligand se lient à l'ADN au niveau d'éléments de réponse spécifiques situés sur le promoteur de certains gènes cibles et modulent ainsi l'activité transcriptionnelle de ces gènes (Mangelsdorf, 1994). Parmi les gènes cibles des rétinoïdes, plusieurs d'entre eux codent pour des protéines neuronales impliquées dans la PLT et certains apprentissages.

La neurogranine (RC3) est un exemple de protéine neuronale dont l'expression génique est régulée par les rétinoïdes (Iníguez *et al.*, 1994). La RC3 est spécifiquement localisée dans les densités postsynaptiques des épines dendritiques et fortement enrichie dans l'hippocampe, le striatum, l'amygdale et le néocortex (Pak *et al.*, 2000 ; Watson *et al.*, 1994). Cette protéine, sensible au calcium, est un des substrats de la protéine kinase C et possède un site de liaison à la calmoduline. A l'état basal, la RC3 est liée à la calmoduline. En réponse à une activation phosphorylante de la PKC et à une augmentation du calcium intracellulaire, la RC3 va libérer la calmoduline qui à son tour activera la calmoduline kinase pour l'initiation de cascades moléculaires prenant part aux processus sous-tendant la PLT. Ainsi, la localisation et les propriétés biochimiques de la RC3 suggèrent un rôle possible dans les phénomènes de plasticité synaptique. A l'appui de cette hypothèse, des travaux ont montré que la RC3 était phosphorylée

après induction d'une PLT (Ramakers *et al.*, 1995) et que l'injection d'anticorps dirigés contre la RC3 dans des cellules d'hippocampe en culture, abolissait le maintien de la PLT (Fedorov *et al.*, 1995). Une étude plus récente montre que des souris knock-out dépourvues du gène codant pour la RC3, présentent des déficits de PLT hippocampique, des altérations dans les mécanismes d'activation de la Calmoduline Kinase II et des détériorations mnésiques dans la version spatiale de la piscine de Morris (Pak *et al.*, 2000).

En régulant l'expression de gènes cibles spécifiques, les rétinoïdes contrôleraient la teneur en protéines neuronales (comme la neurogranine) impliquées dans les phénomènes de plasticité synaptique et pourraient donc, de ce fait, être impliqués dans les fonctions mnésiques.

Cette hypothèse générale a été éprouvée, dans un premier temps, sur le modèle physiopathologique du vieillissement. Ce choix est fondé sur les travaux d'Enderlin et collaborateurs (1997) menés chez la souris, qui ont montré 1°) que le vieillissement s'accompagne d'une diminution notable des taux cérébraux d'ARN messagers des récepteurs nucléaires de l'AR et de la neurogranine et 2°) qu'une administration systémique d'AR augmente les taux de ces transcrits dans le cerveau des animaux âgés jusqu'à un niveau comparable à celui mesuré chez de leurs congénères adultes. Ces résultats suggèrent que les récepteurs nucléaires de l'AR sont sous exprimés chez l'animal âgé et que la voie d'activation transcriptionnelle contrôlée par ces récepteurs s'en trouve altérée. Cette altération se traduit notamment par une moindre expression génique de la neurogranine. L'hypothèse corollaire à notre hypothèse principale est donc que cet hypofonctionnement de la voie de régulation transcriptionnelle contrôlée par les rétinoïdes générerait une modification des propriétés fonctionnelles des cellules dont certains aspects, comme les altérations de l'efficacité et/ou de la plasticité synaptique, participeraient au déclin des capacités mnésiques observé au cours du vieillissement. Cette première série d'expérience visait à étudier les conséquences fonctionnelles potentielles du rétablissement d'un niveau *normal* d'expression de la voie des rétinoïdes dans un cerveau âgé. Nous avons donc évalué les effets d'un traitement à l'AR chez la souris âgée, sur un déficit de PLT hippocampique et sur un déficit cognitif.

RESUME DE LA METHODOLOGIE UTILISEE

Dans un premier temps, nous avons étudié les effets de l'AR, administré à une dose qui normalise le niveau d'expression de la voie des rétinoïdes, sur un modèle *in vivo* de déficit de PLT hippocampique lié à l'âge. Cette PLT est enregistrée au niveau des cellules pyramidales du champ CA1 de l'hippocampe après une stimulation téτανisante de la voie commissurale ventrale.

Ensuite nous avons évalué les effets de l'administration chronique de la même dose d'AR sur les performances des souris âgées dans notre épreuve de discrimination d'emplacements en deux

étapes (cf description et analyse dans les chapitres précédents). Afin de vérifier que les effets du traitement sont effectivement induits par une action nucléaire de cet acide, nous avons inclus un groupe d'animaux âgés recevant conjointement à l'AR, un antagoniste des récepteurs RAR. A l'issue des expériences comportementales, nous avons quantifié grâce à une mesure semi-quantitative par RT-PCR, plusieurs indicateurs biochimiques de la voie de signalisation des rétinoïdes dans le cerveau de ces animaux. Les taux d'ARN codant pour les RAR β , les RXR β/γ , la neurogranine et la transglutaminase tissulaire (tTG) ont été mesurés dans le cerveau entier, tandis que seuls ceux codant pour les RXR β/γ et la neurogranine ont été mesurés dans l'hippocampe. La transglutaminase tissulaire est une protéine cellulaire dont le gène est régulé par les rétinoïdes (Chiocca *et al.*, 1989). La littérature indique que le niveau d'expression de cette protéine et son activité sont à considérer comme des indicateurs fiables de l'action *in vivo* des rétinoïdes (Verma *et al.*, 1992). C'est la raison pour laquelle nous avons choisi de mesurer le niveau d'expression du gène codant pour la tTG pour estimer l'état fonctionnel de la voie de signalisation des rétinoïdes.

PRINCIPAUX RESULTATS

Chez les souris âgées traitées avec le placebo, les données électrophysiologiques montrent qu'une potentialisation persistante des réponses synaptiques enregistrées dans le champ CA1 de l'hippocampe s'établit après stimulation à haute fréquence de la voie commissurale. Néanmoins, cette PLT est significativement réduite en amplitude comparativement à celle que l'on mesure chez les animaux adultes. L'administration d'AR supprime presque totalement ce déficit de PLT hippocampique lié à l'âge. Ces premiers résultats suggèrent que l'hypoexpression modérée de la voie de signalisation des rétinoïdes pourrait être suffisante pour induire l'altération de la plasticité synaptique que nous observons chez nos animaux âgés.

L'analyse des données comportementales confirme l'existence d'un déficit mnésique chez les souris âgées traitées avec le placebo, déficit sélectif tel que nous l'avons caractérisé dans la première partie de notre travail. Alors qu'ils présentent une acquisition normale des discriminations successives, les animaux âgés traités avec le placebo répondent comme s'ils n'avaient rien appris lorsqu'ils sont confrontés à des discriminations simultanées (par paire) des mêmes bras du labyrinthe. L'administration d'AR supprime ce déficit de performance dans la phase-test et cet effet est sélectif puisque l'amélioration ne concerne que les seuls aspects de la performance qui sont détériorés chez la souris âgée. En outre, l'effet bénéfique de l'AR sur l'expression d'une forme de mémoire dite relationnelle/déclarative chez l'animal âgé, est annulé par la co-administration d'un antagoniste des RAR.

Les résultats biochimiques confirment que l'animal âgé (traité avec le placebo) présente une hypoexpression des ARN codant pour les récepteurs à l'AR, la RC3 et la tTG mesurés dans le cerveau entier. Une diminution de même amplitude est également observée dans l'hippocampe, pour les taux d'ARN codant pour les RXR β/γ et pour la RC3. L'administration d'AR rétablit un niveau d'expression des ces ARN comparable à celui mesuré chez les animaux adultes recevant le placebo. Cette normalisation du niveau d'expression de la voie de signalisation par l'apport exogène d'AR à l'animal âgé est bloquée par la co-administration de l'antagoniste des récepteurs RAR.

Ces résultats montrent qu'un traitement à l'AR qui rétablit, chez l'animal âgé, un niveau normal d'expression de la voie de signalisation des rétinoïdes, supprime concomitamment leur déficit de performance, déficit interprété comme reflétant l'altération préférentielle d'une forme relationnelle/déclarative de mémoire. Ils montrent également que le même traitement réduit un déficit de PLT hippocampique. Ces différents corrélats, comportementaux biochimiques et électrophysiologiques, des niveaux d'expression des récepteurs de l'AR (hypoexpression liée à l'âge et normalisation de l'expression par l'apport d'AR) suggèrent que les événements nucléaires contrôlés par les rétinoïdes sont importants pour un fonctionnement normal du cerveau, et plus particulièrement pour certaines formes d'expression mnésique. Finalement, l'ensemble des données présentes conforte l'hypothèse selon laquelle l'hypoexpression modérée de la voie de régulation génique contrôlée par les rétinoïdes pourrait être à l'origine des altérations de la plasticité synaptique et des troubles mnésiques associés au vieillissement.

Alleviation of a Selective Age-Related Relational Memory Deficit in Mice by Pharmacologically Induced Normalization of Brain Retinoid Signaling

Nicole Etchamendy,¹ Valérie Enderlin,² Aline Marighetto,¹ Rose-Marie Vouimba,¹ Véronique Pallet,² Robert Jaffard,¹ and Paul Huguere²

¹Laboratory of Cognitive Neurosciences, Unité Mixte de Recherche Centre National de la Recherche Scientifique 5106, and ²Laboratory of Nutrition and Cellular Signalization, Unité sous contrat Institut National de la Recherche Agronomique, University of Bordeaux 1, 33405 Talence Cedex, France

Vitamin A and its derivatives, the retinoids, have been implicated recently in the synaptic plasticity of the hippocampus and might therefore play a role in associated cognitive functions. Acting via transcription factors, retinoids can regulate gene expression via their nuclear receptors [retinoic acid receptors (RARs) and retinoid X receptors]. In a series of experiments, the present study investigated the possible role of age-related downregulation of retinoid-mediated transcription events in the cognitive decline seen in aged mice. We observed that the brain (and hippocampal) levels of retinoid receptors and the expression of specific associated target genes were restored to pre-senescent (adult) levels in aged mice after acute administration (150 μ g/kg, s.c.) of retinoic acid (RA). These effects of RA, however, could be abolished by the coadministration of an RAR antagonist. RA was also demonstrated to alleviate the age-related deficit in the CA1 long-term potentiation efficacy of

aged mice *in vivo*. Moreover, RA was found to alleviate completely the performance deficit of aged mice to the control level in a two-stage spatial discrimination paradigm designed to assess relational memory. This promnesic effect of RA was again susceptible to abolition by RAR antagonist treatment. The parallel molecular, cellular, and behavioral correlates associated with the decrease of retinoid receptor expression and its normalization demonstrated here suggest that the fine regulation of retinoid-mediated gene expression is fundamentally important to optimal brain functioning and higher cognition. Specifically, a naturally occurring dysregulation of retinoid-mediated molecular events might be a potential etiological factor for cognitive deterioration during senescence.

Key words: cognitive aging; retinoic acid receptors; vitamin A; neurogranin; synaptic plasticity; LTP; learning; RAR; RXR

Vitamin A is a micronutrient with an unusually wide scope of biological actions that includes morphogenesis, vision, immune function, reproduction (Malik et al., 2000), and a major role in the fetal development of the nervous system (Maden et al., 1998). In the adult brain, the recent cartography of multiple nuclear receptors for the vitamin A metabolite retinoic acid (RA) by Krezel et al. (1999) has provided the basis for investigation into the potential role of vitamin A in the maintenance of mature nervous function (Malik et al., 2000). Retinoic acid receptors (RAR α , β , and γ) and retinoid X receptors (RXR α , β , and γ) are DNA-binding proteins that, after activation by specific retinoid ligands, induce gene transcription by interacting with distinct promoter sequences in the target genes (Kastner et al., 1995). Knock-out studies have shown that these receptors (*viz.*, RAR β and RXR γ) (Chiang et al., 1998) as well as certain target genes coding for neuronal proteins, such as neurogranin (RC3), a Ca²⁺-sensitive calmodulin-binding protein (Iñiguez et al., 1994; Pak et al., 2000),

play a critical role in hippocampal long-term potentiation (LTP), the most widely studied form of synaptic plasticity thought to underlie information storage (McNaughton and Morris, 1987). A similar conclusion can also be derived from studies in mice deprived of vitamin A (Jacobs et al., 2000), and together the data strongly suggest a likely involvement of brain retinoid signaling in higher cognitive functions.

It has also been reported that the levels of mRNA for brain retinoid (RAR β and RXR β/γ) nuclear receptors and the expression of certain target genes (including RC3) are reduced in aged mice by 20–30% relative to the levels in adults. Furthermore, such senescence-related reductions are susceptible to reversal by acute systemic RA (Enderlin et al., 1997). Prompted by these initial findings, the present study was undertaken to evaluate the extent to which the reduction in retinoid-related molecular signaling, despite being of moderate magnitude, might contribute to the cognitive and associated physiological alterations seen in aged mice.

Because previous studies have attributed to retinoid receptors an essential role in hippocampal synaptic plasticity, we first examined the effects of RA administration on the efficacy of LTP in CA1 induced by commissural stimulation *in vivo*. We then evaluated our principal hypothesis of an association between the downregulation of retinoid signaling and the emergence of a specific cognitive impairment in aged mice. To this end, we used a two-stage behavioral paradigm that can distinguish between the expression of declarative memory (which is impaired in senes-

Received Feb. 23, 2001; revised May 29, 2001; accepted May 30, 2001.

This research was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and by the Conseil Régional d'Aquitaine. We thank Dr. U. Reichert (Galderma Laboratory, Sofia-Antipolis, France) for donating the RAR antagonist CD3106 and Drs. B. K. Yee, T. Durkin, and Y. Cho for their helpful comments on this manuscript and suggestions for the English revision.

Correspondence should be addressed to Dr. Robert Jaffard, Laboratory of Neurosciences Cognitives, Unité Mixte de Recherche 5106, Université de Bordeaux 1, Avenue des Facultés, 33405 Talence Cedex, France. E-mail: jaffard@neurocog.u-bordeaux.fr.

Copyright © 2001 Society for Neuroscience 0270-6474/01/216423-07\$15.00/0

cence) and the expression of procedural memory (which remains primarily intact in senescence) related to the same piece of learned material (Marighetto et al., 1999, 2000). This dissociation between the two forms of memory expression is also noted in human senescence, and the specific impairment in declarative memory is believed to stem from a dysfunction of the hippocampal region (Gabrieli, 1996).

Current theories suggest that declarative memory is critically dependent on the formation of a complex and coherent memory trace in which the configuration and inter-relationship among various aspects of past experience are represented (Johnson, 1992; Eichenbaum, 1997). Such complex relational representations enable two unique features of declarative memory expression: (1) the ability to compare and contrast separately acquired information and (2) the inferential use of past memories in novel situations (i.e., flexibility) (Cohen, 1984). The behavioral paradigm used here was specifically designed to assess these two features of declarative memory and is able to capture the selective declarative memory deficit of aged mice (Marighetto et al., 1999) as well as that of mice with hippocampal lesions (Etchamendy et al., 1999). Using this paradigm, we evaluated the potential promnesic effect of RA on declarative memory expression. In addition, we investigated whether such an effect could be antagonized by a blockade of retinoic acid receptors. If so, it would be consistent with the hypothesis that the promnesic effect of RA was mediated via an increase in the expression of brain (and hippocampal) retinoid receptors and their associated target genes in aged mice.

MATERIALS AND METHODS

Animals and drug preparation. The subjects were naive male mice of the C57BL/6 Jico inbred strain obtained from IFFA Credo (Lyon, France). They belonged to two distinct age ranges: ~21–23 months old (aged) and ~4–5 months old (adult). Mice of the latter age range served as presenescent controls. They were housed in a temperature-controlled and ventilated animal room under a 12 hr light/dark cycle. Mice destined for behavioral testing were placed on a restricted diet with their body weight maintained at 90% of their free-feeding level. All other mice were fed *ad libitum*.

Retinoic acid (Sigma, St. Louis, MO) and the RAR antagonist (CD3106; gift of Dr. U. Reichert) were dissolved in a vehicle solution containing polyethylene glycol, NaCl (0.9%), and ethanol mixed in a proportion of 70:20:10 by volume. CD3106 is also referred to as AGN193109 by Klein et al. (1996).

We used a dose of retinoic acid (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) that has been shown to be effective in reversing the age-related hypoexpression of brain retinoid signaling (Enderlin et al., 1997) and a dose of CD3106 (1 mg/kg) that is effective in blocking this reversal when coadministered. Both drugs were administered via the subcutaneous route.

In the electrophysiological study, three groups of mice of equal size ($n = 6$) were constituted: aged + RA, adult + vehicle, and aged + vehicle groups. They were injected daily with RA or vehicle solution for 4 d before high-frequency stimulation.

In the behavioral experiment, there were four groups of mice: (1) aged + RA group ($n = 10$; aged mice receiving an RA injection), (2) aged + RA + CD3106 group ($n = 6$; aged mice receiving injection of a mixture containing RA and the RAR antagonist CD3106) (Klein et al., 1996), (3) aged + vehicle group ($n = 8$; aged mice receiving a vehicle injection), and (4) adult + vehicle group ($n = 8$; adult mice receiving a vehicle injection). Daily injection began 4 d before behavioral testing commenced and continued until the end of behavioral testing. Injection was always made between 18:00 and 19:00 hr, whereas behavioral testing was conducted between 10:00 and 16:00 hr.

For reverse transcription (RT)-PCR analysis, two sets of subjects were used. The first set consisted of the mice that were used in the behavioral test and killed at the end of behavioral testing. Their hippocampi were submitted to RT-PCR analysis. The second set of mice was also divided into four groups ($n = 6$) according to age and drug treatment, similar to those in the first set. However, the second set of mice was never behav-

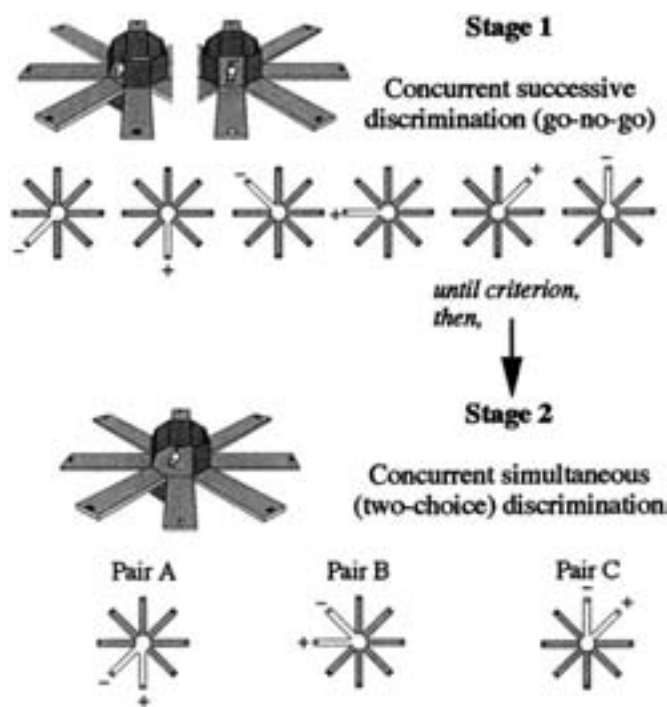


Figure 1. Design of the behavioral procedure.

iorally tested and was killed after 4 consecutive days of injection. Thus, the analysis of the second set of mice allows an evaluation of the effects of age and drug in naive subjects, free from any influence because of behavioral training. For the second (nontrained) set, RT-PCR analysis was performed either for the hippocampus alone or for the whole brain.

Learning and memory testing. The apparatus was a fully automated eight-arm radial maze, 150 cm in diameter, as described previously by Marighetto et al. (1999). The testing procedure is depicted in Figure 1. Before training on the discrimination task, the mice were habituated to the apparatus daily, with free access to all arms, for 2 d. For discrimination training, each subject was individually assigned a set of six adjacent arms. Of these, three served as positive (always baited) arms, and the remaining three served as negative (never baited) arms.

Animals first acquired (stage 1) the valence or reward contingencies associated with each arm. For this purpose, subjects were tested continuously in a series of trials in which they were confronted with only one arm (either rewarded or not rewarded) open at a time. On each daily session, each arm was presented four times (i.e., 24 trials). Go-no-go discriminative performance was evaluated by the ratio between the median latency to enter nonrewarded (negative) arms and rewarded (positive) arms. A ratio above unity indicates that the mouse was more ready to enter rewarded arms than nonrewarded ones. Stage 2 began when performance based on this measure attained the criterion level. The criterion was defined as an overall ratio exceeding 1.5 over 2 consecutive days and exceeding 1.3 for each of the three pairs of arms to be designated at stage 2.

At stage 2, the reward contingencies remained unchanged, but the six arms were grouped into three pairs of adjacent arms of opposite valence (pairs A–C). In each trial, the subject was confronted with access to two adjacent arms of opposite valence (either of pairs A–C). A choice was considered to be made when the subject had reached the food well of an arm; this also triggered the closure of the door to the alternative arm. The trial was finished as soon as the subject returned to the central platform. Each daily session consisted of 20 consecutive trials comprising alternate presentations of pairs A–C according to a pseudorandom sequence. Two-choice discriminative performance was measured by the percentage correct (choice of the positive arm) and expressed as blocks of 2 d.

Biochemical analysis. The amounts of mRNAs coding for retinoic acid receptors (RAR β and RXR β/γ), and for two protein products of their target genes, the tissue-type transglutaminase (tTG) (Chiocca et al., 1989) and RC3, were measured in the whole brain, as well as in the

hippocampus, for RXR β/γ and RC3. The four groups of mice were killed either on the day after the fourth day of drug administration (i.e., before the beginning of behavioral training) or after the end of behavioral testing (i.e., after 25 d of drug administration). Their brain or hippocampi were removed and stored at -80°C . mRNAs were quantified by RT-PCR assay using β -actin as the internal control. The stability of β -actin mRNA levels (Dong et al., 1990; Rogue et al., 1993) was checked in all experimental conditions using a competitive RT-PCR method and the PCR MIMIC Construction Kit (Clontech, Palo Alto, CA). Total mRNA was extracted using the method described by Chomczynski and Sacchi (1987). cDNA preparation, PCR analysis, and quantitative determination of PCR products were performed as described previously by Alfons et al. (1996). Aliquots of the PCR reaction were sampled after each of the 7th through 24th amplification cycles. Amplification products were measured after their resolution by electrophoresis. The determination of the proportion of RAR β , RXR β/γ , RC3, and tTG mRNA to that of β -actin was calculated according to the method of Chelly et al. (1990) using a semilogarithmic representation of the relative extent of amplification measured by counting the amount of incorporated ^{32}P . The oligonucleotide primers for RAR β , RXR β/γ , tTG, and RC3 were as described previously by Enderlin et al. (1997).

In vivo electrophysiology. Mice were anesthetized with Avertin (10 ml/kg, i.p.). The stimulating and recording electrodes were made of two twisted pairs of platinum–iridium wires (90 μm in diameter) insulated except at the tip. By means of stereotaxic surgery, one electrode was positioned in the ventral hippocampal commissure (0.5 mm posterior to bregma and 0.3 mm lateral to the midline), and the other was in the contralateral pyramidal layer of CA1 (1.8 mm posterior to bregma and 1.3 mm lateral to the midline). The electrode positions were adjusted to maximize evoked field potentials, and then they were fixed with dental cement. Afterward, the animals were allowed to recover for 6 d. They were then habituated to the recording conditions for 3 d before recording sessions began.

CA1 field potentials evoked by single-pulse commissural stimulation (0.1 msec biphasic pulses) were recorded through junction field effect transistor operational amplifiers placed on the head of the animals and amplified, displayed on an oscilloscope, and recorded by a microcomputer for on-line averaging (each average was obtained with 20 responses at 0.2 Hz). The population spike was measured between the early positive peak and the large negative peak of the evoked potential. Stimulation intensity was adjusted to produce a population spike that was 30% of the maximum amplitude obtained from the baseline input–output curves. The baseline was established over a 2 d period (two recording sessions of 5 min/d). After the last 5 min baseline period, high-frequency stimulation (HFS) of the commissural path consisting of one train of 100 pulses was delivered at 100 Hz. The post-tetanus amplitudes of population spikes were followed every 5 min for 1 hr using the same single-pulse test that was used for the establishment of baseline.

After completion of the experiment, all mice were given an overdose of Avertin and perfused with saline (0.9%) followed by formol saline (10%). The exact placement of the electrodes was then verified by conventional histology.

Statistical analysis. Data were submitted to ANOVAs with the appropriate design. *Post hoc* comparisons were performed using the Scheffe F test.

RESULTS

Electrophysiological data

As shown in Figure 2*b*, a 1 sec train of HFS (at 100 Hz) of the ventral commissure induced a potentiation of the population spike in hippocampal CA1. LTP was evident in all groups, because the mean population spike amplitudes were significantly increased with respect to baseline (repeated measures followed by Scheffe F test, all p values < 0.05). However, the potentiation seen across time after HFS was significantly different among the three groups ($F_{(2,16)} = 3.86$; $p = 0.043$). Specifically, LTP seen in the aged + vehicle group was significantly weaker than that in the adult + vehicle group ($F_{(1,10)} = 4.99$; $p = 0.049$). This deficit in LTP was partially reversed in the aged mice treated with RA over the previous 4 d. Indeed, the mean population spike amplitudes seen across time after HFS were significantly increased in the aged + RA group compared with the aged + vehicle group

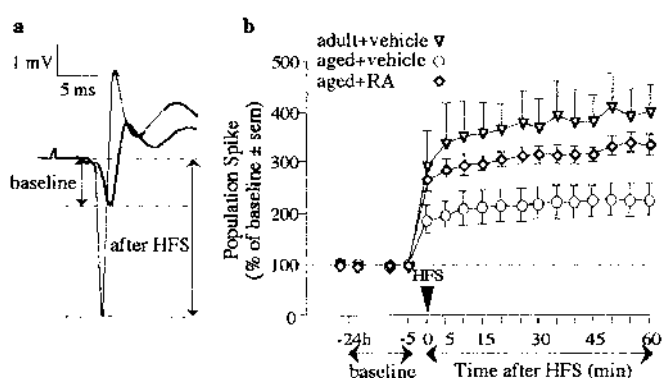


Figure 2. *a*, Representative records of the population spike in the CA1 region of the hippocampus before and after HFS of the contralateral ventral hippocampal commissure. *b*, The average amplitude of the population spike normalized to the average baseline value before HFS.

($F_{(1,11)} = 8.71$; $p = 0.013$) and were close to the amplitudes recorded in the adult + vehicle group.

Behavioral data

During stage 1 of behavioral testing, when the arms were presented one by one following a successive go–no-go discrimination procedure, neither the effect of age nor drugs significantly affected performance. There was no significant between-groups difference in the mean (\pm SEM) number of sessions needed to attain criterion performance (adult + vehicle, 10.25 ± 0.91 ; aged + vehicle, 9.75 ± 0.91 ; aged + RA, 11.60 ± 0.81 ; aged + RA + CD3106, 10.17 ± 1.05 ; $F_{(3,28)} = 0.89$; $p = 0.46$). Moreover, as shown in Figure 3, *left*, all groups displayed a similar response accuracy across the first and last six sessions as evaluated by measures of the no-go/go enter-latency ratio. Specifically, an ANOVA performed on this measure of performance across the first six sessions revealed no significant between-groups difference ($F_{(3,28)} = 0.39$; $p = 0.76$) with no significant improvement of performance across sessions ($F_{(5,140)} = 1.63$; $p = 0.16$) or group \times session interaction ($F_{(15,140)} = 1.17$; $p = 0.30$). The same analysis performed across the last six sessions showed that all groups learned to distinguish between the positive (rewarded) and negative (nonrewarded) arms as evidenced by their progressive increased readiness to enter positive relative to negative arms. An ANOVA performed on these data yielded a significant effect of sessions ($F_{(5,140)} = 22.63$; $p < 0.001$) but no evidence of any between-groups difference ($F_{(3,28)} = 0.13$; $p = 0.94$) or group \times session interaction ($F_{(15,140)} = 0.32$; $p = 0.99$). Thus, all groups were performing at a similar level (group, $F_{(3,28)} = 0.07$; $p = 0.97$) with a mean enter-latency ratio between 2.19 and 2.40, which was significantly above chance ($p < 0.001$ for each group), over the last two training sessions preceding stage 2 (Fig. 3, *middle*).

In contrast, significant between-groups differences emerged ($F_{(3,28)} = 8.99$; $p < 0.001$) when the mice were confronted with the three simultaneous discriminations composed of the six arms that were presented individually to them in stage 1 (Fig. 3, *right*). The vehicle-treated aged mice failed to translate their acquired preference for single arms into a choice between one positive and one negative arm presented as an explicit pair. With a mean percentage correct rate of 50.4%, they were performing significantly poorer (*post hoc* comparison, $p < 0.001$) than were adult controls that attained a level of 72.2% correct. Remarkably, RA-treated aged mice showed no sign of such a deficit (averaged at 68.4% correct) and significantly outperformed vehicle-treated

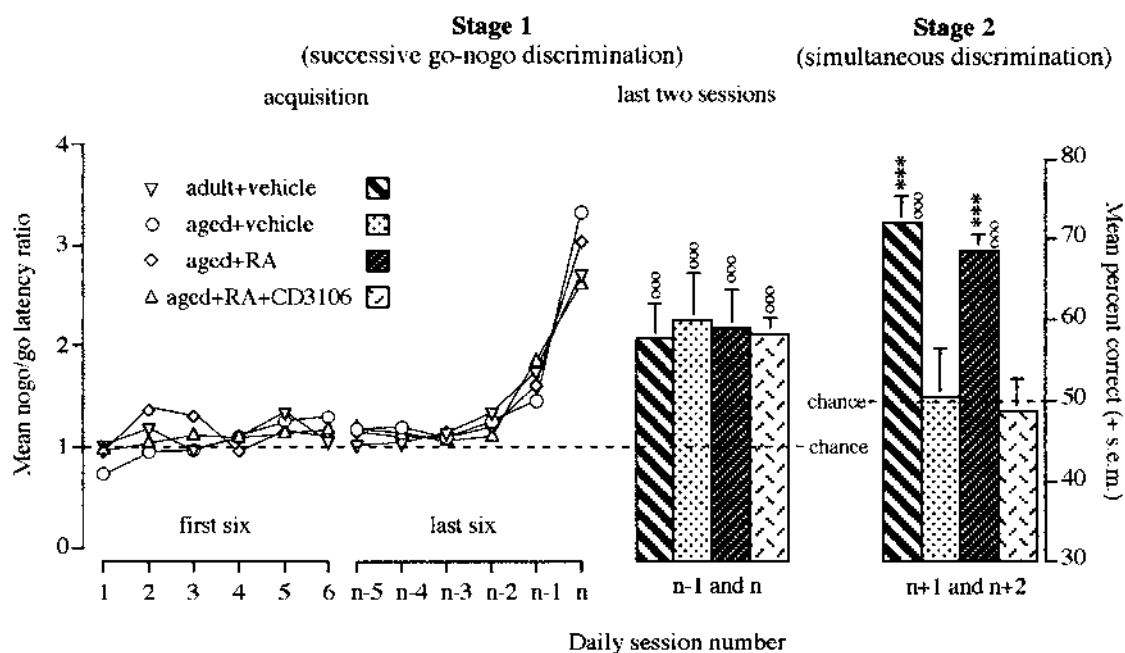


Figure 3. *Left*, Progression of the go–no-go discriminative performance evaluated by the no-go/go enter-latency ratio over the first six (1–6) sessions (i.e., the presently observed minimum number of sessions required to attain the criterion) and the last six ($n - 5$ to n) sessions of training before reaching criterion in stage 1. *Middle*, Mean no-go/go enter-latency ratio over the last two sessions ($n - 1$, n) of stage 1. *Right*, Two-choice discriminative performance expressed as the mean percentage correct over the two daily sessions of stage 2 ($n + 1$, $n + 2$). *Post hoc* Scheffe test: *** $p < 0.001$ versus aged + vehicle group; $^{\infty}p < 0.001$ versus chance (50%).

aged mice (*post hoc* comparison, $p < 0.001$). Furthermore, this promnesic effect of RA was entirely abolished by the coadministration of the RAR antagonist CD3106. The aged + RA + CD3106 group attained an average correct rate of 48.7% and was not different from the aged + vehicle group (*post hoc* comparison, $p = 0.99$).

Biochemical data

One-way ANOVAs performed on biochemical data relative to the whole brain of mice submitted to 4 d of treatment revealed significant between-groups differences (all $F_{(3,11)} > 9.74$; all p values < 0.05). The aged + vehicle group exhibited significantly lower levels of brain mRNAs coding for retinoid receptors (RAR β , -27% ; RXR β/γ , -21%), for tTG (-26%), and for RC3 (-20%) relative to the levels of the adult + vehicle group (*post hoc* comparisons, all p values < 0.05). On the other hand, the mRNA contents in the aged + RA group were significantly increased relative to their age-matched controls (*post hoc* comparisons, aged + RA vs aged + vehicle, all p values < 0.05) and were at a level comparable with those seen in adult mice (*post hoc* comparisons, aged + RA vs adult + vehicle, all p values > 0.05). This RA-induced normalization of mRNA contents was almost completely blocked by the coadministration of the RAR antagonist CD3106 (*post hoc* comparisons, aged + RA + CD3106 vs aged + vehicle, all p values > 0.05 ; aged + RA + CD3106 vs aged + RA, all p values < 0.05) (Fig. 4a). A similar pattern of results was observed in the hippocampus (Fig. 4b; all $F_{(3,11)} > 26.1$; all p values < 0.001).

The biochemical data derived from the behaviorally tested mice conformed to the results described above (all $F_{(3,11)} > 8.38$; all p values < 0.008). This indicated that, irrespective of the time of death, vehicle-treated aged mice displayed lower levels of mRNAs coding for either RXR β/γ (-39%) or RC3 (-31%)

relative to the levels of the adult + vehicle group. Two-way ANOVAs incorporating data from both sets of mice yielded an overall main effect of age for both variables [RXR, $F_{(1,8)} = 55.39$; $p < 0.001$; RC3, $F_{(1,8)} = 137.44$; $p < 0.001$] with no significant interaction between age and time of death [RXR, $F_{(1,8)} = 1.46$; $p = 0.26$; RC3, $F_{(1,8)} = 1.15$; $p = 0.31$]. RA administration alone almost totally abolished the age-related decrease in mRNA contents [effect of treatment, RXR ($F_{(2,12)} = 20.62$; $p < 0.001$) and RC3 ($F_{(2,12)} = 31.12$; $p < 0.001$)], and this effect was again similar regardless of the time of death [treatment \times time of death interaction, RXR ($F_{(2,12)} = 0.05$; $p = 0.95$) and RC3 ($F_{(2,12)} = 0.41$; $p = 0.67$)]. Finally, this reversal effect of RA was totally blocked by the coadministration of CD3106 (*post hoc* comparisons, aged + RA + CD3106 vs aged + RA, p values < 0.05 ; aged + RA + CD3106 vs aged + vehicle, p values > 0.05) (Fig. 4b).

DISCUSSION

Long-term potentiation

First, the present data showed that the potentiation of the CA1 population spike induced by HFS of the ventral commissure was reduced in aged mice. This deficit is in agreement with a previous experiment using a similar brief HFS protocol to induce LTP (see Geinisman et al., 1995). Second, we demonstrated that this age-related deficit in LTP amplitude was ameliorated by the administration of RA. Because the dose of RA used here was also effective in restoring the 30% age-related decrease in retinoid signaling (as shown by the biochemical analyses) to the normal (adult) level, our data suggest that the initial moderate retinoid hypoexpression might be sufficient to produce the significant deficiency in synaptic plasticity seen in our vehicle-treated aged mice.

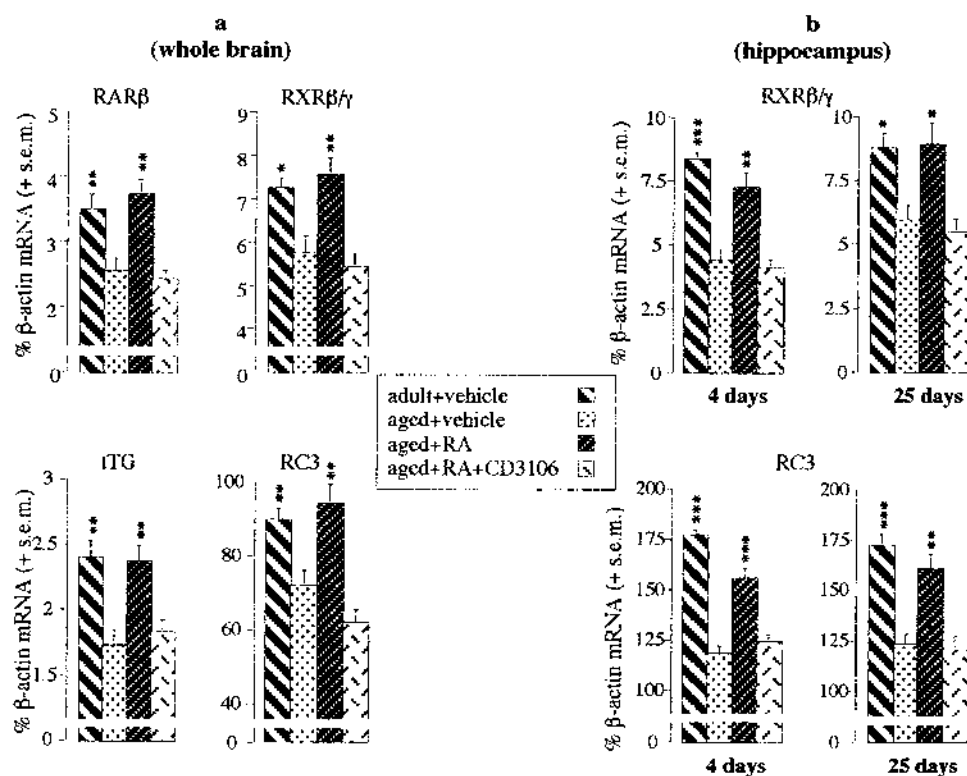


Figure 4. *a*, Whole-brain mRNAs in mice killed 24 hr after the fourth daily drug treatment. *b*, Hippocampal mRNAs in mice killed either 24 hr after the fourth daily administration of treatments (i.e., before the beginning of behavioral training) or after completion of testing in stage 2 (i.e., the day after the 25th daily administration of treatments). All values are expressed as the mean \pm SEM of measures derived from three independent samples ($n = 3$). Each sample unit consisted of two pooled whole brains or two pooled hippocampi (i.e., a total of 6 animals). *Post hoc* Fisher tests: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; all significantly different from the aged + vehicle group.

In this respect, our data complement and further extend previous studies in knock-out mice that demonstrated, *in vitro*, an LTP deficit in mice not expressing RAR β , RAR β /RXR γ (Chiang et al., 1998), or RC3 (Pak et al., 2000). Our data suggest that normal mice with a natural, yet more limited, retinoid hypoexpression also exhibit significant functional alterations in hippocampal synaptic plasticity that can be reduced by pharmacological normalization of retinoid signaling. Thus, not only are retinoid-mediated transcription events involved in the molecular mechanisms underlying functional synaptic plasticity (as suggested by knock-out studies), but also a precise control in these nuclear events is a prerequisite for the functional integrity of such neural plasticity.

Effects of RA administration on the cognitive and associated retinoid-signaling dysfunction in aged mice

In sum, our biochemical and behavioral data show that (1) aged mice with a reduced expression of brain RAR β and RXR β / γ mRNAs relative to those of adult mice were severely and specifically impaired in stage 2 of the discrimination task, (2) reversal of the age-related hypoexpression of brain retinoid receptors by RA administration was accompanied by a complete restoration of this behavioral impairment, and (3) the promnesic effect of RA was abolished by the coadministration of a selective RAR antagonist that concomitantly blocked the RA-induced normalization of retinoid signaling, hence demonstrating that this effect was mediated via brain retinoid receptors.

The selectivity of the cognitive deficit seen in our aged mice in stage 2 of the task as well as its reversal by RA renders unlikely the possibility that the amnesic effect of age and the promnesic effect of the drug are simply caused by their nonspecific effects on affect, motivation, perception, or motor control. Specifically, such nonspecific effects would have similarly influenced performance in both stage 1 and stage 2 because the basic requirements of the

task were the same in both stages. It follows that the deleterious effect of age, and its reversal by RA, must be cognitive in nature. These contrasting effects should be taken as further evidence that these two versions of the position discrimination (i.e., stage 1 and stage 2) rely on distinct and dissociable memory systems (Etchamendy et al., 1999; Marighetto et al., 1999, 2000). The go-no-go discrimination in stage 1 involves separate unitary responses to individual arms and therefore can be achieved using elemental stimulus-response associations, forms of procedural and/or implicit memory that are independent of the hippocampal system. Conversely, the transfer to the two-choice problems at stage 2 entails comparisons between information acquired separately. Effective transfer would require the use of relational representations of past experiences and the functional integrity of the hippocampal formation (Eichenbaum et al., 1992).

Possible cellular and molecular mechanisms involved in the reversal of the age-related cognitive deficit by RA administration

The first line of explanation is based on the involvement of retinoid-mediated transcription events in synaptic plasticity. Because the formation of relational mnemonic representations is considered to be critically dependent on the Hebbian plastic properties of hippocampal synapses (Wallenstein et al., 1998), the observed promnesic effect of RA might stem from some restoration of the well documented age-related alterations in hippocampal synaptic plasticity (Barnes, 1994). In this respect, the RA-induced normalization of the age-related retinoid hypoexpression would reestablish a sufficient level of downstream-activated protein products for supporting the functional synaptic properties required for relational memory processing. RC3 is one of the numerous synaptic protein products of the retinoid-activated target genes [others include NMDA receptors (Younkin et al., 1993) or synaptophysin (Gaetano et al., 1992)]. Because the

content of these proteins in the brain is decreased via the aging process (Tamaru et al., 1991; Chen et al., 1998; but see Nicolle et al., 1999), they could well be implicated in the observed effects of RA here.

However, because of the large profile of genes the expression of which is under the control of nuclear retinoid receptors (Mangelsdorf, 1994), other related mechanisms could be considered as likely candidates for explaining our present results. Specifically, numerous studies have provided evidence that RA exerts a direct effect on the expression of a variety of cholinergic-specific proteins (Pedersen et al., 1995; Malik et al., 2000) and on the expression of neurotrophic factors (e.g., NGF) that, in turn, could be involved in the survival of cholinergic neurons (Korsching, 1993; Rylett and Williams, 1994; Corcoran and Maden, 1999). This is of particular interest because a decrease in central cholinergic neurotransmission has been one of the most consistently advanced hypothesis to account for the cognitive impairment associated with aging and certain age-related neurodegenerative diseases (Gallagher and Colombo, 1995).

Regardless of the cellular mechanisms involved, our results show that a 20–30% change in the expression of brain (and hippocampal) retinoid receptors is associated with significant alterations in certain target-gene mRNA contents, hippocampal LTP, and a hippocampal-dependent form of memory. These molecular, cellular, and behavioral correlates suggest that, although such alterations in retinoid signaling might be considered as moderate in magnitude, they can have significant consequences at various levels of brain function or organization. Our results thus point to retinoid hyposignaling as a potential cause of cognitive aging. This is consistent with recent data showing that a similar retinoid-signaling hypofunction, induced by a vitamin A-deprived diet in adult mice, also results in the same specific cognitive impairment as seen in our aged mice here (Etchamendy et al., 2000). Furthermore, this hypothesis is in line with the general principle “that the signals transduced by cells during growth and physiologic activity are the same as those that become overloaded during pathologic events and aging” (Malik et al., 2000). In other words, retinoids might play a role in the maintenance of phenotypic and functional properties of mature neurons, hence extending beyond their well documented role in neurodevelopment. It is noteworthy that dysregulation in retinoid transcription events has also been considered as a potential etiological factor in neurodevelopmental diseases such as schizophrenia (Goodman, 1998) or in age-related neurodegenerative disorders such as Alzheimer’s disease (Connor and Sidell, 1997).

The present results as well as previous studies on the functional significance of retinoid signaling lead us to conclude that a precise control of the level of retinoid signaling is of fundamental importance; “dysregulated genes” implicated would provide a potential target for therapeutic intervention. Furthermore, intervention directed at the level of nuclear receptors would be expected to produce a more long-lasting effect than would other cognitive enhancers. The efficacy of such cognitive enhancers is usually limited by their narrow therapeutic time window. This advantage is illustrated in the present study, because RA was administered between 18:00 and 19:00 hr whereas behavioral testing was performed the next day between 10:00 and 16:00 hr. Finally, although traditional cognitive enhancers, such as acetylcholinesterase inhibitors (Mohammed, 1993), were designed to restore the deficiency of neurotransmission of a specific type, retinoid receptor-targeted drugs could potentially normalize a broad profile of gene

expressions, thereby achieving a more global influence on the cellular homeostasis of the senescent brain.

Conclusion

The memory decline associated with normal aging is becoming a serious clinical issue among the populations of developed countries. Our study conducted in mice points to an altered regulation of the expression of selected genes as a potential cause of age-related cognitive impairment. Specifically, our data suggest that brain retinoid-signaling hypofunction deserves further consideration as a key potential target for curative therapeutic attempts.

REFERENCES

- Alfos S, Higuieret P, Pallet V, Higuieret D, Garcin H, Jaffard R (1996) Chronic ethanol consumption increases the amount of mRNA for retinoic acid and triiodothyronine receptors in mouse brain. *Neurosci Lett* 206:73–76.
- Barnes CA (1994) Normal aging: regionally specific changes in hippocampal synaptic transmission. *Trends Neurosci* 17:13–18.
- Chelly J, Montarras D, Pinset C, Berwald-Netter Y, Kaplan JC, Kahn A (1990) Quantitative estimation of minor mRNAs by cDNA-polymerase chain reaction. Application to dystrophin mRNA in cultured myogenic and brain cells. *Eur J Biochem* 187:691–698.
- Chen YC, Chen QS, Lei JL, Wang SL (1998) Physical training modifies the age related decrease of GAP-43 and synaptophysin in the hippocampal formation in C57BL/6J mouse. *Brain Res* 806:238–245.
- Chiang MY, Misner D, Kempermann G, Schikorski T, Giguere V, Sucov HM, Gage FH, Stevens CF, Evans RM (1998) An essential role for retinoid receptors RAR β and RXR γ in long-term potentiation and depression. *Neuron* 21:1353–1361.
- Chiocca EA, Davies PJ, Stein JP (1989) Regulation of tissue transglutaminase gene expression as a molecular model for retinoid effects on proliferation and differentiation. *J Cell Biochem* 39:293–304.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156–159.
- Cohen NJ (1984) Preserved learning capacity amnesia: evidence for multiple memory systems. In: *The neuropsychology of memory* (Squire LR, Butters N, eds), pp 83–103. New York: Guilford.
- Connor MJ, Sidell N (1997) Retinoic acid synthesis in normal and Alzheimer diseased brain and human neural cells. *Mol Chem Neuropathol* 30:239–252.
- Corcoran J, Maden M (1999) Nerve growth factor acts via retinoic acid synthesis to stimulate neurite outgrowth. *Nat Neurosci* 2:4307–4308.
- Dong JM, Li F, Chiu JF (1990) Induction of F9 differentiation by transient exposure to retinoic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 170:147–152.
- Eichenbaum H (1997) Declarative memory: insights from cognitive neurobiology. *Annu Rev Psychol* 48:547–572.
- Eichenbaum H, Otto T, Cohen NJ (1992) The hippocampus: what does it do? *Behav Neural Biol* 57:2–36.
- Enderlin V, Pallet V, Alfios S, Dargelos E, Jaffard R, Garcin H, Higuieret P (1997) Age-related decreases in mRNA for brain nuclear receptors and target genes are reversed by retinoic acid treatment. *Neurosci Lett* 229:125–129.
- Etchamendy N, Desmedt A, Cortes-torrea C, Marighetto A, Jaffard R (1999) Contrasting effects of selective hippocampal lesion on different memory expression. The Fifth IBRO World Congress of Neuroscience Abstracts, p 75.
- Etchamendy N, Enderlin V, Marighetto A, Pallet V, Higuieret P, Jaffard R (2000) Evidence for a role of vitamin A in higher cognitive functions. *Soc Neurosci Abstr* 26:1748.
- Gabrieli JD (1996) Memory systems analyses of mnemonic disorders in aging and age-related diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:13534–13540.
- Gaetano C, Matsumoto K, Thiele CJ (1992) In vitro activation of distinct molecular and cellular phenotypes after induction and differentiation in a human neuroblastoma cell line. *Cancer Res* 52:4402–4407.
- Gallagher M, Colombo PJ (1995) Ageing: the cholinergic hypothesis of cognitive decline. *Curr Opin Neurobiol* 5:161–168.
- Geinisman Y, Detolledo-Morrell L, Morrell F, Heller RE (1995) Hippocampal markers of age-related memory dysfunction: behavioral, electrophysiological and morphological perspectives. *Prog Neurobiol* 45:223–252.
- Goodman AB (1998) Three independent lines of evidence suggest retinoids as causal to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7240–7244.
- Iniguez MA, Morte B, Rodriguez-Pena A, Munoz A, Gerendasy D, Sutcliffe JG, Bernal J (1994) Characterization of the promoter region and flanking sequences of the neuron-specific gene RC3 (neurogranin). *Mol Brain Res* 27:205–214.
- Jacobs S, Misner D, Evans RM, Stevens CF (2000) A novel role for

- vitamin A signaling in hippocampal long-term synaptic plasticity. Soc Neurosci Abstr 26:1118.
- Johnson MK (1992) MEM: mechanisms of recollection. J Cognit Neurosci 4:268–280.
- Kastner P, Mark M, Chambon P (1995) Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? Cell 83:859–869.
- Klein ES, Pino ME, Johnson AT, Davies PJ, Nagpal S, Thacher SM, Krasinski G, Chandraratna RA (1996) Identification and functional separation of retinoic acid receptor neutral antagonists and inverse agonists. J Biol Chem 271:22962–22966.
- Korsching S (1993) The neurotrophic factor concept: a reexamination. J Neurosci 13:2739–2748.
- Krezel W, Kastner P, Chambon P (1999) Differential expression of retinoid receptors in the adult mouse central nervous system. Neuroscience 89:1291–1300.
- Maden M, Gale E, Zile M (1998) The role of vitamin A in the development of the central nervous system. J Nutr 128:471S–475S.
- Malik MA, Blusztajn JK, Greenwood CE (2000) Nutrients as trophic factors in neurons and the central nervous system: role of retinoic acid. J Nutr Biochem 11:2–13.
- Mangelsdorf DJ (1994) Vitamin A receptors. Nutr Rev 52:S32–S44.
- Marighetto A, Etchamendy N, Touzani K, Torrea CC, Yee BK, Rawlins JN, Jaffard R (1999) Knowing which and knowing what: a potential mouse model for age-related human declarative memory decline. Eur J Neurosci 11:3312–3322.
- Marighetto A, Touzani K, Etchamendy N, Torrea CC, De Nanteuil G, Guez D, Jaffard R, Morain P (2000) Further evidence for a dissociation between different forms of mnemonic expressions in a mouse model of age-related cognitive decline: effects of tacrine and S 17092, a novel prolyl endopeptidase inhibitor. Learn Mem 7:159–169.
- McNaughton BL, Morris RGM (1987) Hippocampal synaptic enhancement and information storage within a distributed memory system. Trends Neurosci 10:408–415.
- Mohammed AH (1993) Effects of cholinesterase inhibitors on learning and memory in rats: a brief review with special reference to THA. Acta Neurol Scand Suppl 149:13–15.
- Nicolle MM, Gallagher M, McKinney M (1999) No loss of synaptic proteins in the hippocampus of aged, behaviorally impaired rats. Neurobiol Aging 20:343–348.
- Pak JH, Huang FL, Li J, Balschun D, Reymann KG, Chiang C, Westphal H, Huang KP (2000) Involvement of neurogranin in the modulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, synaptic plasticity, and spatial learning: a study with knockout mice. Proc Natl Acad Sci USA 97:11232–11237.
- Pedersen WA, Berse B, Schuler U, Wainer BH, Blusztajn JK (1995) All-*trans*- and 9-*cis*-retinoic acid enhance the cholinergic properties of a murine septal cell line: evidence that the effects are mediated by activation of retinoic acid receptor- α . J Neurochem 65:50–58.
- Rogue PJ, Ritz MF, Malviya AN (1993) Impaired gene transcription and nuclear protein kinase C activation in the brain and liver of aged rats. FEBS Lett 334:351–354.
- Rylett RJ, Williams LR (1994) Role of neurotrophins in cholinergic-neurone function in the adult and aged CNS. Trends Neurosci 17:486–490.
- Tamaru M, Yoneda Y, Ogita K, Shimizu J, Nagata Y (1991) Age-related decreases of the *N*-methyl-D-aspartate receptor complex in the rat cerebral cortex and hippocampus. Brain Res 542:83–90.
- Wallenstein GV, Eichenbaum H, Hasselmo ME (1998) The hippocampus as an associator of discontinuous events. Trends Neurosci 21:317–323.
- Younkin DP, Tang CM, Hardy M, Reddy UR, Shi QY, Pleasure SJ, Lee VM, Pleasure D (1993) Inducible expression of neuronal glutamate receptor channels in the NT2 human cell line. Proc Natl Acad Sci USA 90:2174–2178.

CHAPITRE V

ETUDE DES EFFETS D'UNE PRIVATION DE VITAMINE A SUR LES FONCTIONS MNESIQUES DE L'ANIMAL ADULTE

CHAPITRE V

ETUDE DES EFFETS D'UNE PRIVATION DE VITAMINE A SUR LES FONCTIONS MNESIQUES DE L'ANIMAL ADULTE

Les résultats de l'étude exposée précédemment montrent que le vieillissement s'accompagne d'un déficit mnésique sélectif de la phase-test de notre épreuve comportementale, associé à une diminution du niveau d'expression génique des récepteurs de l'AR (RAR β et RXR β/γ) et de certains de leurs gènes cibles (RC3 et tTG). Le traitement chronique des animaux âgés à la dose d'AR, qui rétablit le niveau d'expression génique des récepteurs de l'AR et des gènes cibles mesurés, supprime leur déficit de performance mnésique dans notre épreuve.

Ces premiers résultats sont cohérents avec notre hypothèse de travail initiale prévoyant qu'un hypofonctionnement de la voie de signalisation des rétinoïdes relativement à un niveau normal devait se traduire par une altération de certaines capacités cognitives. Ils montrent plus précisément qu'une simple variation de 20 à 30% du niveau d'expression de la voie de signalisation des rétinoïdes semblerait suffire pour induire chez la souris des modifications des capacités mnésiques.

Afin de démontrer qu'un niveau optimum d'expression de ces récepteurs est une condition nécessaire au déroulement de certains processus sous-tendant les fonctions cognitives, il nous est apparu important d'examiner dans d'autres situations physiologiques que le vieillissement les effets délétères d'une altération du niveau d'expression génique.

Cette étude a donc eu pour but d'analyser, sur des souris jeunes adultes, les conséquences d'une carence en vitamine A d'une part sur les capacités cognitives évaluées dans notre épreuve comportementale et d'autre part sur l'expression cérébrale et/ou hippocampique des ARN codant pour les récepteurs de l'AR (RAR β et RXR β/γ), pour la neurogranine et pour la transglutaminase tissulaire.

METHODOLOGIE UTILISEE

Les modèles murins de privation alimentaire de vitamine A sont peu disponibles dans la littérature. Le modèle animal le plus souvent utilisé est le rat et même dans ce cas précis, ces modèles ne nous sont que peu utiles pour étudier les conséquences d'une déficience en vitamine A « acquise » sur les fonctions mnésiques. En effet, la plupart des modèles utilisés dans la littérature visent à étudier les modifications de la voie de signalisation des rétinoïdes sur le développement du cerveau. De ce fait, les privations en vitamine A débutent *in utero* (en soumettant les femelles gestantes à un régime alimentaire dépourvu en vitamine A) pour interférer avec le développement normal de l'embryon. Dans notre cas précis, l'objectif est justement d'éviter ce type de situation expérimentale pour étudier davantage les conséquences d'une privation en vitamine A sur le fonctionnement d'un cerveau arrivé à maturation normale.

Nous avons donc soumis de jeunes souris au régime carencé approprié à l'âge de 3 semaines. La cinétique temporelle des effets de cette carence en vitamine A est rapportée dans une publication (Enderlin *et al.*, 2000).

Pour ce qui nous concerne, nous avons dans un premier temps évalué les performances mnésiques de souris soumises au régime pendant 31 semaines, les analyses biochimiques antérieures révélant que cette période de privation était suffisante pour induire une diminution du niveau d'expression des récepteurs de l'AR, d'une amplitude comparable à celle observée chez nos souris âgées. A la suite de l'épreuve comportementale, les animaux ont été sacrifiés et les taux d'ARN codant pour les RAR β , les RXR β/γ , la RC3 et la tTG ont été quantifiés dans le cerveau entier (au moyen d'une mesure semi-quantitative par RT-PCR). Comme nous le verrons, les résultats comportementaux de cette première expérience n'ont révélé aucun effet délétère de la privation en vitamine A ni sur les performances mnésiques des animaux, ni sur le niveau d'expression génique de la RC3. Une seconde expérience a donc été réalisée avec des souris soumises au régime alimentaire dépourvu de vitamine A pendant 39 semaines, les analyses biochimiques préliminaires indiquant que cette période de privation est suffisante pour induire une baisse significative de la teneur cérébrale en ARN codant pour la RC3. Les animaux ont été soumis comme précédemment à l'épreuve comportementale en labyrinthe radial. En plus des différents ARN mesurés dans le cerveau entier, ceux codant pour les RXR β/γ et pour la RC3 ont également été quantifiés dans l'hippocampe. Le protocole expérimental comprend aussi un groupe de souris privées en vitamine A et recevant le temps de l'épreuve comportementale une injection quotidienne d'AR (à la dose de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ayant permis la normalisation du niveau d'expression de la voie de signalisation des rétinoïdes chez la souris âgée et la suppression du déficit mnésique associé).

PRINCIPAUX RESULTATS

Effets de la durée de privation en vitamine A : Analyses comportementales et biochimiques

Les analyses statistiques réalisées sur les données biochimiques indiquent que quel que soit sa durée (31 ou 39 semaines), la privation en vitamine A induit une diminution cérébrale significative de 25 à 30% des taux d'ARN codant pour les récepteurs de l'AR (RAR β et RXR β/γ) et pour la tTG. En revanche seule une privation en vitamine A d'une durée de 39 semaines entraîne une réduction notable du niveau d'expression génique de la RC3 dans le cerveau entier. Cette hypoexpression génique de la RC3 liée à la privation alimentaire (39 semaines) en vitamine A, est également observé dans l'hippocampe, associée à une diminution du taux d'ARN codant pour les RXR β/γ .

Les résultats comportementaux montrent que quel que soit la durée de privation, les animaux carencés témoignent d'une acquisition normale de la connaissance séparée des bras du labyrinthe. Au cours de cette phase, ils ne se distinguent des animaux témoins ni par leur vitesse d'acquisition, ni par le niveau de discrimination atteint à la fin de ce stade. En fin d'acquisition, ils discriminent normalement les bras appâtés de ceux qui ne le sont pas.

Lors de la phase-test, dans laquelle les bras sont présentés simultanément par paire, les souris soumises au régime carencé pendant 31 semaines utilisent de façon efficace leurs acquis antérieurs et choisissent significativement plus souvent le bras renforcé. Leurs performances sont similaires à celles de leurs congénères témoins. A l'inverse, alors qu'ils présentent une acquisition normale des discriminations successives, les animaux soumis à une privation alimentaire en vitamine A pendant 39 semaines répondent au hasard lorsqu'ils sont confrontés à des discriminations simultanées (par paire) des mêmes bras.

Résumé : Alors que les taux d'ARN codant pour les récepteurs de l'AR et pour la tTG sont diminués chez les deux groupes d'animaux privés de vitamine A (31 et 39 semaines), une diminution significative de l'expression génique de la RC3 n'est observé que chez les souris soumises au régime carencés pendant 39 semaines. Et ce n'est que dans cette condition expérimentale (39 semaines de privation) que les animaux présentent un déficit mnésique sélectif de la phase test dans l'épreuve de discrimination d'emplacements.

Effets comportementaux et biochimiques de l'administration d'AR aux souris privées de vitamine A pendant 39 semaines

Les mesures biochimiques réalisées sur le cerveau entier montrent que l'administration d'AR à nos animaux carencés normalise complètement le niveau d'expression génique des RAR β

et partiellement (mais significativement) celui de la tTG. En revanche, ce traitement s'avère inefficace pour rétablir à un niveau normal les taux d'ARN codant pour les RXR β/γ et la RC3.

Les analyses restreintes aux quantifications d'ARN dans l'hippocampe indiquent que comme pour le cerveau entier, l'expression génique de la RC3 dans l'hippocampe reste diminuée malgré l'administration d'AR. Finalement, contrairement aux résultats relatifs aux mesures dans le cerveau entier, le traitement à l'AR est efficace pour restaurer l'hypoexpression génique des RXR β/γ dans l'hippocampe des souris privés de vitamine A

Les analyses comportementales montrent que les animaux carencés traités à l'AR présentent une acquisition normale des discriminations successives et acquièrent une connaissance séparée des bras du labyrinthe. Ils atteignent avec le même nombre de séances d'entraînement un niveau de discrimination en fin d'acquisition comparable à celui des animaux contrôles traités au placebo. Lors de la phase test, ces souris privées, traitées à l'AR échouent de la même façon que leurs contrôles face aux situations de choix par paire.

Résumé : L'administration d'AR ne normalise pas complètement l'hypoexpression de la voie de signalisation des rétinoïdes induite par 39 semaines de privation alimentaire en vitamine A et ne supprime pas le déficit mnésique associé. Plus particulièrement, l'administration d'AR ne rétablit pas à un niveau normal l'expression génique de la RC3 et les animaux ne présentent aucune amélioration de leurs performances dans la phase test de discriminations simultanées par paire.

CONCLUSION

Globalement, nos résultats suggèrent qu'une hypoexpression post-natale de la voie de signalisation des rétinoïdes induite chez la souris adulte peut être associée à des détériorations spécifiques de certaines formes de mémoire et identiques à celles observées chez la souris âgée. Confortant notre étude sur le vieillissement, ces données sont cohérentes avec nos hypothèses initiales postulant qu'une dérégulation du signal nucléaire contrôlé par les rétinoïdes devrait s'accompagner d'un déficit mnésique.

Plus précisément, le déficit cognitif est exclusivement observé chez les groupes d'animaux présentant une diminution significative (25 à 30%) d'expression génique de RC3. Ces observations suggèrent qu'un niveau optimal d'expression des gènes cibles des rétinoïdes est requis pour un fonctionnement normal du cerveau et plus particulièrement pour les fonctions cognitives supérieures.

Vitamin A deficiency and relational memory deficit in adult mice : relationships with changes in brain retinoid signalling

(soumis à *EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE*)

Nicole Etchamendy^{1*}, Valérie Enderlin^{2*}, Aline Marighetto¹, Véronique Pallet², Paul Higuieret²,
and Robert Jaffard¹

¹CNRS UMR 5106, Lab. Neurosciences Cognitives and ²USC INRA, Lab. Nutrition et Signalisation Cellulaire, Université de Bordeaux 1, Avenue des Facultés, 33405 Talence Cedex, France.

* The first two authors have contributed equally to this work.

Abbreviated title : Vitamin A deficiency, retinoids and memory

Number of pages : 21

Number of figures : 4

Number of words : Abstract: 282

Introduction: 705

Discussion: 2223

Author for correspondence :

Nicole Etchamendy

Lab. Neurosciences Cognitives CNRS UMR 5106

Université de Bordeaux 1

Avenue des Facultés

33405 Talence Cedex, France.

Phone : (33) 5 56 84 87 42

Fax : (33) 5 56 84 87 43

E-mail : n.etchamendy@neurocog.u-bordeaux.fr

Acknowledgements

We thank Dr. Ray Cook for his helpful comments on this manuscript and suggestions for the English revision. This research was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and by the Conseil Régional d'Aquitaine.

ABSTRACT

Vitamin A and its derivatives, the retinoids, have recently been reported to be implicated in the synaptic plasticity of the hippocampus and in cognitive functions. Acting via transcription factors, retinoids can regulate gene expression via their nuclear receptors [retinoic acid receptors (RARs) and retinoid X receptors (RXRs)]. We recently showed that even a moderate (i.e. with respect to knock-out studies) hypoexpression of brain (and hippocampal) retinoid signalling, like that naturally occurring in the aged brain of mice (about 30 %), might be related to a selective relational memory deficit. To further assess this hypothesis, the present study investigated the effects of vitamin A deprivation of varying duration both on the brain expression of retinoid receptors (RAR β and RXR β/γ) and two associated target genes [tissue-type transglutaminase (tTG) and neurogranin, (RC3)], and on radial maze discrimination learning using young adult mice as subjects. We observed that irrespective of its duration (i.e. 31 or 39 weeks), vitamin A deprivation resulted in a significant reduction (25-30%) in the expression of brain RAR β , RXR β/γ and tTG mRNAs. Conversely, only the 39-week condition was found to induce a significant decrease in brain RC3 mRNAs contents and a selective relational memory impairment. Finally, daily administration of retinoic acid (RA) failed to reverse the 39-week Vitamin A deficiency (VAD)-related cognitive deficit or to fully normalise the associated brain retinoid hyposignalling. In particular, there was no evidence for an up-regulating effect of RA on whole brain (and hippocampal) RC3 mRNAs of the 39-week depleted mice. The results show that post-natal VAD may induce a selective memory impairment and give further support to the hypothesis that the fine regulation of retinoid-mediated gene expression is important for optimal brain functioning and higher cognition.

Key Words : vitamin A deficiency ; radial maze ; relational memory ; hippocampus ; retinoid receptors ; neurogranin

INTRODUCTION

Vitamin A is a pleiotropic micronutrient with an unusually wide scope of biological actions that include morphogenesis, vision, immune function and reproduction (Malik *et al.*, 2000). Directly involved in the processes of cell differentiation, the retinoids [and particularly retinoic acid (RA)] which are vitamin A derivatives play a major role in the development of the central nervous system (CNS) (Maden *et al.*, 1998). In the adult brain, recent cartography of multiple nuclear receptors for RA (Krezel *et al.*, 1999) as well as of cytosolic binding proteins (CRBP for retinol and CRABP for RA, Zetterstrom *et al.*, 1994) has provided the basis for investigation into a potential role of vitamin A in mature CNS functions. The retinoic acid receptors (RAR α , β and γ) and retinoid X receptors (RXR α , β and γ) are DNA-binding proteins that after activation by specific retinoid ligands, induce gene transcription by interacting with distinct promoter sequences in the target genes (Kastner *et al.*, 1995). Hence, the liganded RAR and RXR, alone or in interaction with other nuclear receptors (including receptors for thyroid hormone or for glucocorticoids, orphan nuclear receptors and peroxisome proliferator-activated receptors) control the expression of a wide range (> 300) of genes (Gudas *et al.*, 1994 ; Clagett-Dame and Plum, 1997). Consequently, changes in retinoid levels are capable of producing alterations in the availability of several neuronal proteins. Knock-out studies have shown that RAR β and RXR γ receptors (Chiang *et al.*, 1998) as well as certain target genes coding for neuronal proteins, such as the Ca²⁺-sensitive calmodulin-binding protein neurogranin (RC3) (Iñiguez *et al.*, 1994; Pak *et al.*, 2000), play a critical role in hippocampal long-term potentiation (LTP) which is the most widely studied form of synaptic plasticity thought to underlie information storage (McNaughton and Morris, 1987). A similar conclusion can also be drawn from a recent study using mice suffering a postnatally-induced VAD (Misner *et al.*, 2001). Together these data suggest a likely involvement of retinoid signalling pathways in higher cognitive functions.

In mice, a moderate downregulation of retinoid-mediated transcription events presumably resulting from decreased bioavailability of retinoid ligands naturally occurs with senescence (Enderlin *et al.*, 1997b). Recently, we showed that this age-related brain retinoid hyposignalling might play a role in the concomitant decline of cognitive abilities (Etchamendy *et al.*, 2001). In particular, restoring to pre-senescent levels the age-related 20-30 % decrease in brain (and hippocampal) expression of retinoid receptors and specific associated target genes by acute administration of RA was found to alleviate both the relational memory and hippocampal LTP deficits seen in aged mice. In this experiment, the improving effect of RA was abolished by the co-administration of an RAR antagonist, hence indicating that it was mediated via retinoid receptors. In addition to confirming the implication of vitamin A in higher cognitive function, these findings provided evidence that a fine regulation of retinoid-mediated gene expression was

fundamentally important to optimal brain functioning. To further assess this hypothesis, the present study examines whether inducing a similarly moderate brain retinoid signalling hypofunction in young adult mice would result in the same selective cognitive deficit as that seen in aged mice.

To this end, mice were fed with a vitamin A-deprived diet, the duration of which was varied according to the kinetics of VAD development (Enderlin *et al.*, 2000). Vitamin A-depleted mice and their controls were trained in a two-stage behavioural paradigm specifically designed to assess relational memory (Etchamendy *et al.*, 1999; Marighetto *et al.*, 1999) and previously used to demonstrate the selectivity of this memory deficit in aged mice and its reversal by the administration of RA (Etchamendy *et al.*, 2001). As in the latter experiment, whole brain and/or hippocampal contents of mRNAs coding for RAR β and RXR β/γ receptors as well as for two protein products of their target genes, RC3 and tissue-type transglutaminase (tTG), were measured. tTg is a protein whose expression is highly regulated by the liganded RAR (Chiocca *et al.*, 1989) and it is considered as a biological marker of early VAD (Savouré *et al.*, 1996). As mentioned above, the neuronal protein RC3, whose expression is regulated in part by RA receptors, has been found to be involved in the functional plasticity of hippocampal synapses (Fedorov *et al.*, 1995) thought to be required for relational memory processing (Wallenstein *et al.*, 1998).

METHODS

Animals, vitamin A deprived diet, and drug preparation.

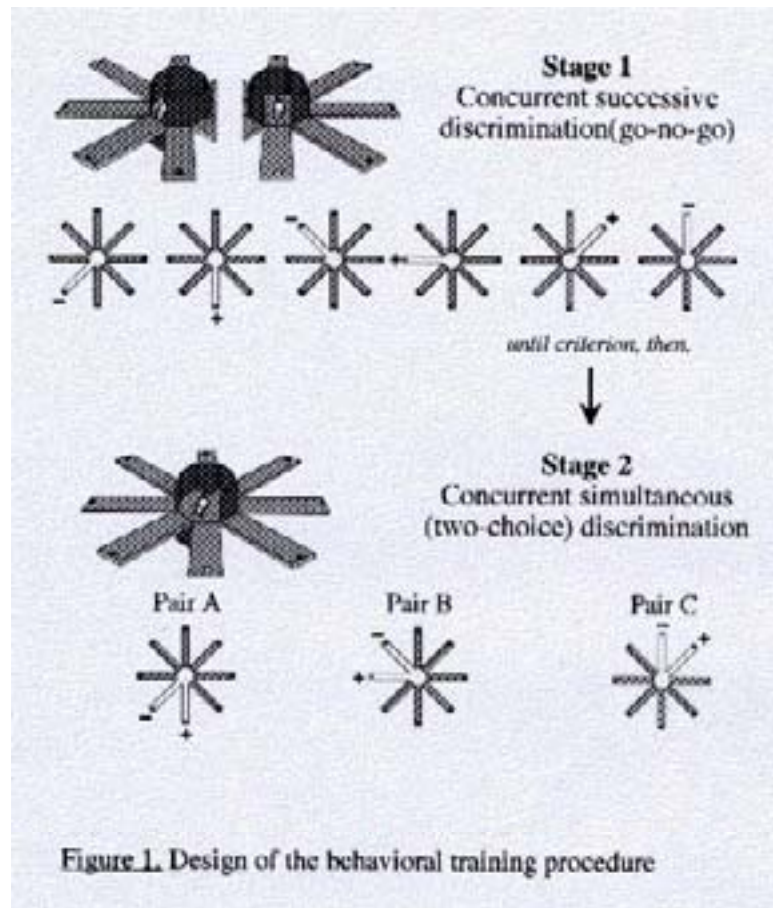
The subjects were naive male mice of the C57BL6 Jico inbred strain obtained from IFFA Credo (Lyon, France). They were three weeks old at the beginning of the experiment. All animals were housed singly in a temperature-controlled and ventilated animal room under a 12-hr light-dark cycle. All experiments were performed in accordance with the official French regulations for the care and use of laboratory animals.

Vitamin A-free diet for mouse and its control diet (containing 5IU retinol/g) were obtained from the experimental diet preparation facility Centre de Recherche INRA (Jouy en Josas, France). Vitamin A status was monitored from the 12th to the 28th weeks after the start of deprivation as described in Enderlin *et al.* (2000). Mice fed with the vitamin A-free diet developed a vitamin A deficiency characterised after 27 weeks by a 20-30% decrease in the expression of brain retinoic acid receptors similar to that previously observed in senescent mice (Enderlin *et al.*, 1997 ; Etchamendy *et al.*, 2001). Therefore, the effects of vitamin A status on cognitive function

were investigated 28 weeks after the start of the regimen in a first set of subjects. These effects were further examined after 36 weeks of the same regimen in a second set of subjects. Indeed, after such a duration of diet, not only the brain expression of retinoid receptors but also of the target gene RC3 was decreased (about 25 %, as confirmed here, see results section) to the same extent as previously observed in aged mice. For each duration, mice were randomly assigned to either the experimental group fed with the vitamin-A free diet and to the control group fed with the control diet. Feeding conditions were maintained during the entire (three-week) period of behavioural testing. Therefore, at the time of sacrifice that followed completion of behavioural experiments, animals had been submitted to their respective diet for either 31 or 39 weeks. They had free access to food and water except during the period of behavioural training during which they individually received the daily requirement of dry food to maintain their body weight at 90 % of their free-feeding level..

All mice were injected daily via the subcutaneous route with either a retinoic acid (RA) solution or vehicle. All-*trans* RA (obtained from Sigma Chemical, St. Louis MO, no. R 2625) was dissolved in a vehicle solution containing polyethyleneglycol, NaCl (0.9 %) and ethanol mixed in a proportion of 70:20:10 by volume. We used a dose of retinoic acid (150 µg/kg) that has been shown to be effective in reversing the age-related hypoexpression of brain retinoid signalling and the associated relational memory impairment (Etchamendy *et al.*, 2001). Daily injections began 4 days before behavioural training commenced and continued until the end of behavioural testing and/or sacrifice. Injection was always conducted between 18:00 and 19:00 hr, whereas behavioural testing was conducted between 10:00 and 16:00 hr.

All mice submitted to the diet for 31 weeks before sacrifice, i.e. the 31-w depleted group fed with the vitamin A-free diet (n = 9) and the 31-w control group fed with the control diet (n = 7), received the vehicle injection only. Mice submitted to the diet for 39 weeks before sacrifice were divided into three groups: (i) the 39-w-depleted + vehicle group (n = 7) receiving the vehicle injection ; (ii) the 39-w depleted + RA group (n = 7) receiving the RA injection ; and (iii) the 39-w control + vehicle group (n = 7) receiving the vehicle injection. All mice were sacrificed for RT-PCR analysis the day after completion of behavioural testing. As detailed in the section on biochemical analysis, a supplementary set of mice was used to allow RT-PCR analysis in the hippocampus alone in the 39-week condition. These animals were divided into three groups of 6 mice each and submitted to exactly the same regimen as that used for each of the three 39-week groups described above, except that they were not submitted to behavioural training.



Learning and Memory testing

The apparatus was a fully automated 8-arm radial maze, 150-cm in diameter, as described previously in Marighetto *et al.* (1999). The testing procedure is depicted in Figure 1. Prior to training on the discrimination task, the mice were habituated to the apparatus daily, with free access to all arms for two days. For discrimination training, each subject was individually assigned a set of six adjacent arms. Of these, three served as positive (always baited) arms and the remaining three served as negative (never baited) arms.

Animals first acquired (stage 1) the valence or reward contingencies associated with each arm. For this purpose, subjects were tested continuously in a series of trials in which they were confronted with only one arm (either rewarded or not rewarded) open at a time. On each daily session, each arm was presented four times (i.e., 24 trials). Go-no-go discriminative performance was evaluated by the ratio between the median latency to enter non-rewarded (negative) and rewarded (positive) arms. A ratio above unity indicates that the mouse was more ready to enter rewarded arms than non-rewarded ones. Stage 2 began when performance based on this measure attained criterion level. The criterion was defined as an overall no-go/go ratio exceeding 1.5 over two consecutive days and exceeding 1.3 for each of the three pairs of arms to be designated at stage 2.

Choice accuracy in stage 1 was indexed by the entry latency ratio $[(E-) - (E+)] / [(E-) + (E+)]$ where E- represents the median latency to enter negative arms and E+ the median latency to enter positive arms.

At stage 2, the reward contingencies remained unchanged but the 6 arms were grouped into three pairs of adjacent arms of opposite valence (pairs A, B and C). In each trial, the subject was confronted with access to two adjacent arms of opposite valence (either of pairs A-C). A choice was considered to be made when the subject had reached the food well of an arm ; this also triggered the closure of the door to the alternative arm. The trial was finished as soon as the subject returned to the central platform. Each daily session consisted of 20 consecutive trials comprising alternate presentations of pairs A, B and C according to a pseudo-random sequence. Two-choice discriminative performance was measured by percent correct (choice of the positive arm) and expressed as a block of two days.

Biochemical analysis

The amounts of mRNAs coding for retinoic acid receptors (RAR β , RXR β/γ) and for two protein products of their target genes, the tTG and RC3, were measured in the whole brain, as well as in the hippocampus for RXR β/γ and RC3. Mice were sacrificed by decapitation. Their brain or hippocampi were removed and stored at -80°C. The mRNAs were quantified by reverse transcription (RT)-PCR assay using β -actin as internal control. The stability of β -actin mRNA

levels (Dong *et al.*, 1990 ; Rogue *et al.*, 1993) was checked in all experimental conditions using a competitive RT-PCR method and the PCR MIMICTM Construction Kit (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA). Total mRNA was extracted using the method described by Chomczynski and Sacchi (1987). cDNA preparation, PCR analysis and quantitative determination of PCR products were performed as previously described by Alfos *et al.* (1996). Aliquots of PCR reaction were sampled after each of the 7th to the 24th amplification cycles. Amplification products were measured following their resolution by electrophoresis. The determination of the proportion of RAR β , RXR β/γ , RC3 and tTG mRNA to β -actin was calculated according to the method of Chelly *et al.* (1990) using a semi-logarithmic representation of the relative extent of amplification measured by counting the amount of incorporated ³²P. The oligonucleotide primers for RAR β , RXR β/γ , tTG and RC3 were as previously described by Enderlin *et al.* (1997b). RAR β , RXR β/γ , RC3 and tTG mRNAs were measured in samples composed of two pooled brains. For each of our five groups submitted to behavioural training, the analyses were performed on six animals, leading to three observations per condition. In mice submitted to the diet for 39 weeks, RXR β/γ and RC3 mRNAs were also measured in sample units composed of two pooled hippocampi. To attain the minimum number of subjects required for these analyses (six per group), the animals used were naive (i.e., submitted to the diet but not to behavioural training before being sacrificed).

RESULTS

Effect of vitamin A deprivation (31 versus 39 weeks)

Biochemical data

Whole brain data are summarised in Figure 2A. It can be seen that both depleted groups (treated with vehicle) exhibited lower levels of brain mRNAs coding for retinoid receptors and tTG in comparison with the control group. With respect to controls, groups fed with the vitamin A-deprived diet (31 or 39 weeks) displayed an overall reduction in whole brain RAR β (-33.8 %), RXR β/γ (-25.4 %) and tTG (-36.9 %) mRNAs contents, the magnitude of which was very similar in the 31-week and 39-week conditions. Conversely, the decrease in the brain level of RC3 mRNA appeared to depend on the duration of vitamin A deprivation. In effect, while the 39-w depleted group displayed a consistent decrease (-29.5 %) in brain RC3 mRNA contents with respect to controls, no such decrease was observed in the 31-w depleted group (-6.4 %). This

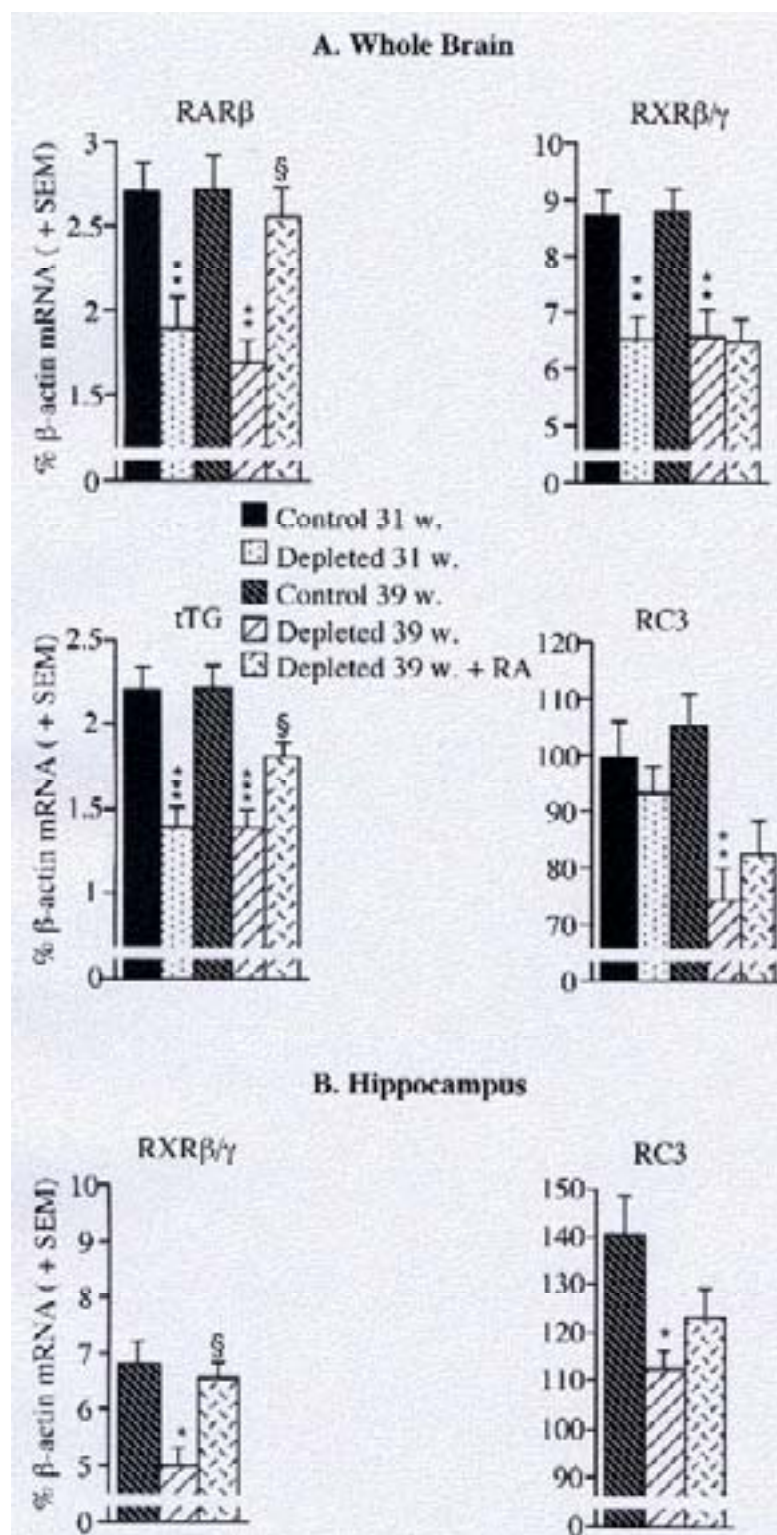


Figure 2. **A**, Whole-brain mRNAs in groups of mice that were fed with the vitamin-A free diet or the control diet for either 31 weeks or 39 weeks and that were sacrificed after completion of behavioural testing in stage 2. All mice received daily injections of vehicle from 4 days before testing began and until sacrifice, except the 39-depleted + RA group that received retinoic acid. **B**, Hippocampal mRNAs in the three groups of mice, each treated exactly like each of the three 39-week groups of **A**, except that they were not submitted to behavioural testing. All values are expressed as the mean + SEM of measures derived from three independent samples ($n = 3$). Each sample unit consisted of two pooled whole brains each or two pooled hippocampi (i.e., a total of six animals). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; all significantly different from the matched (either 31 or 39 weeks) control group. § $p < 0.05$; significantly different from the 39-w depleted group.

description was confirmed by two-way ANOVAs of whole brain mRNAs contents. Specifically RAR β , RXR β/γ and tTG mRNAs contents were significantly reduced in the depleted groups compared to the non-depleted (control) ones (Diet: $F(1,8) = 28.7$; $p < 0.001$ for RAR β . $F(1,8) = 25.9$; $p < 0.001$ for RXR β/γ . $F(1,8) = 47.4$; $p < 0.001$ for tTG), but with no significant Diet x Duration (i.e. 31 weeks versus 39 weeks) interaction ($F(1,8) = 0.36$; $p = 0.57$ for RAR β . $F(1,8) = 0.002$; $p = 0.962$ for RXR β/γ . $F(1,8) = 0.00$; $p = 0.989$ for tTG). In contrast, although the depleted groups displayed an overall significant decrease in RC3 mRNAs contents (Diet : $F(1,8) = 10.9$; $p = 0.01$), the Diet x Duration interaction approached statistical significance ($F(1,8) = 4.71$; $p = 0.06$), with the 39-w depleted group but not the 31-w group, displaying a 26% decrease in RC3 mRNA.

RC3 and RXR β/γ mRNAs were also measured in the hippocampi of mice submitted to the diet for 39 weeks. Figure 2B shows that contents of both mRNAs were decreased in depleted animals as compared to controls. ANOVAs performed on these data revealed a significant effect of Diet (RC3: $F(1,4) = 10.06$; $p = 0.034$. RXR β/γ : $F(1,4) = 12.71$; $p = 0.02$).

Behavioural data

Stage 1

The arms were presented one by one according to a successive go-no-go discrimination procedure. The four groups of mice treated with vehicle needed a similar mean number of sessions to reach the predetermined criterion of performance (31 w-control : 8.14 ± 0.59 ; 31w-depleted : 10.3 ± 1.03 ; 39 w-control : 9.14 ± 1.1 ; 39 w-depleted : 10.3 ± 1.2). Two-way ANOVAs performed on this measure of performance revealed that neither the effect of Diet ($F(1,26) = 2.66$; $p = 0.12$) nor Duration ($F(1,26) = 0.21$; $p = 0.64$), nor their interaction ($F(1,26) = 0.26$; $p = 0.61$), were significant.

Figure 3 depicts the mean median latency to enter the positive and the negative arms over the first six (left) and last six sessions of training (right). In the first six sessions there was no difference between the latency to enter positive (go) and negative (no-go) arms whatever the group considered. Nevertheless, depleted mice took more time than controls to enter an arm in general regardless of its reward valence, and this was particularly visible in the first two sessions of training. These impressions were confirmed by an ANOVA of entry latency including the two between-subject factors Diet and Duration, and the two within-subject factors Session and Reinforcement. This yielded significant effects of Diet ($F(1,26) = 28.09$; $p = 0.000$), Duration ($F(1,26) = 8.15$; $p = 0.008$) and their interaction ($F(1,26) = 9.31$; $p = 0.005$), as the 39-w depleted group took more time to enter an arm than the 31-w depleted group.

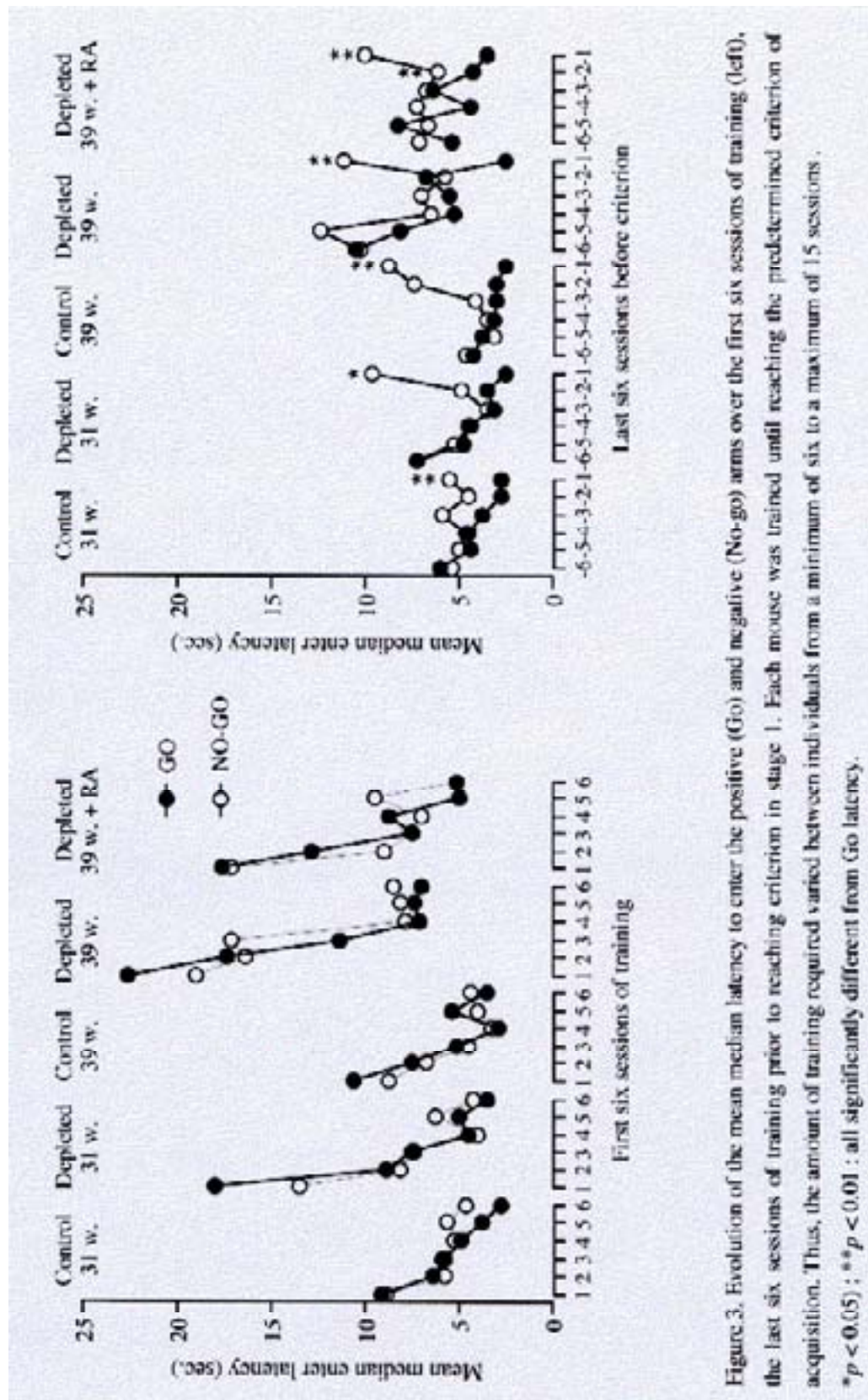


Figure 3. Evolution of the mean median latency to enter the positive (Go) and negative (No-go) arms over the first six sessions of training (left), the last six sessions of training prior to reaching criterion in stage 1. Each mouse was trained until reaching the predetermined criterion of acquisition. Thus, the amount of training required varied between individuals from a minimum of six to a maximum of 15 sessions. $*p < 0.05$; $**p < 0.01$: all significantly different from Go latency.

The effect of Session ($F(5,130) = 29.31 ; p = 0.000$) as well as its interaction with Diet ($F(5,130) = 5.22 ; p = 0.000$) were also significant, as the overall decrease in entry latency as training progressed was more marked in both the 39-w and 31-w depleted groups than in the control groups. There was no significant effect of Reinforcement ($F(1,26) = 0.001 ; p = 0.97$), nor of its interactions with other factors (all p values > 0.11), thereby indicating that across the first six sessions and irrespective of the group to which they belonged, animals did not exhibit significant improvement in learning to discriminate between positive and negative arms.

A two-way analysis was performed specifically on the first two sessions of training, where the relative changes in overall latencies were maximised. It revealed a main effect of Diet ($F(1,26) = 20.5 ; p < 0.001$) with no significant effect of its interaction with Duration ($F(1,26) = 3.07 ; p = 0.09$). Animals from both depleted groups displayed significantly increased latency to enter an arm in comparison to their respective controls (31- w duration: $F(1,14) = 5.26 ; p = 0.038$; 39- w duration: $F(1,12) = 14.78 ; p = 0.002$).

In the final six sessions of training (Figure 3 right), the between-group difference in the overall latency to enter arms was strongly reduced with respect to initial sessions and was no longer statistically significant (Diet : $F(1,26) = 3.11 ; p = 0.089$; Diet x Duration : $F(1,26) = 1.86 ; p = 0.18$). In all groups the latency to enter between positive and negative arms continued to diverge, as indicated by the significant effect of Reinforcement ($F(1,26) = 23.07 ; p = 0.000$) and of its interaction with Session ($F(5,130) = 9.63 ; p = 0.000$). This showed that regardless of the group, mice were able to discriminate between positive and negative arms as training progressed. However, this pattern of discrimination was visible earlier and incremented more progressively in the control groups than in the depleted groups, although the effect of Diet x Session x Reinforcement failed to reach the statistical level of significance ($F(5,130) = 2.24 ; p = 0.054$). In particular, the 39-w depleted group presented a discrimination profile over the final two sessions of acquisition which looked different from that in the other three groups (i.e., both control groups and the 31-w depleted one). Namely, this 39-w depleted group was unique in displaying no sign of discrimination between the positive and negative arms in session -2 (i.e., the one before criterion was reached), although all groups reached similar levels of discriminative performance by the end of stage 1. As can be seen in Figure 4 (left panel), the entry latency ratio over the last two sessions preceding stage 2 was significantly above chance (versus chance (0.0) ; all p values < 0.01) and similar among the four groups ($F(3,26) = 0.03 ; p = 0.55$). Neither the effects of Diet ($F(1,26) = 0.02 ; p = 0.97$), nor of its Duration ($F(1,26) = 0.38 ; p = 0.55$), nor the Diet x Duration interaction ($F(1,26) = 1.89 ; p = 0.18$) were statistically significant.

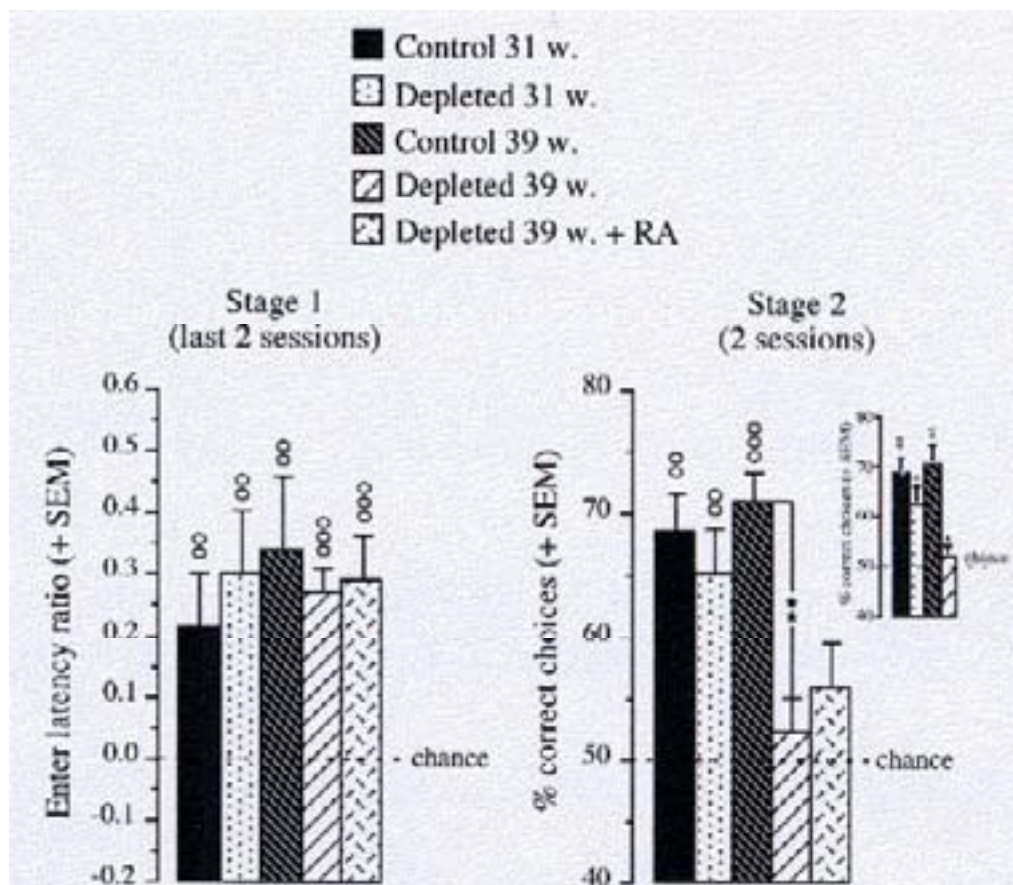


Figure 4. **Left.** Mean median entry latency ratio (+SEM) over the last two sessions of stage 1. **Right.** Two-choice discriminative performance expressed as the mean percentage correct (+ SEM) over the two daily sessions in stage 2. Right top: the same for the subgroups of mice that presented a profile of go-no-go performance in the final two sessions of stage 1 similar to the one seen in the 39-w depleted mice [i.e., a discrimination ratio around zero in the session that preceded the one where the criterion was reached. 31-w control: n = 4, mean discrimination ratio in session -2 = 0.003; 31-w depleted: n = 4, mean (-2 session) ratio = 0.011; 39-w control: n = 4, mean (-2 session) ratio = -0.024; 39-w depleted: n = 7, mean (-2 session) ratio = -0.048; 39-w depleted +RA: n = 0] * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$: all significantly different from chance. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$: significantly different from the 39-w control group

Stage 2

The six arms were now combined into three independent pairs of adjacent arms of opposite valence. When the mice were confronted with such simultaneous discrimination problems composed of the six arms that were presented individually to them in the previous stage, significant between-group differences emerged (see Figure 4, right panel). In contrast with all the other groups that displayed a preference for the positive arms, the 39-w depleted group entered the negative arms as often as the positive ones (mean percent correct choices over the two sessions : 52.1 ± 2.7 % ; versus chance (50 %) : $p > 0.90$). An ANOVA performed on the percentage of correct scores revealed that the effects of Diet ($F(1,26) = 12.66$; $p = 0.0015$) and its interaction with Duration ($F(1,26) = 5.90$; $p = 0.022$) were significant. Post-hoc comparisons showed that in comparison with their matched (non-depleted) control groups, the 31-w depleted group performed normally (65.0 ± 3.8 % versus 68.6 ± 3.1 % for controls ; $p = 0.418$), whereas the 39-w depleted group did not (52.1 ± 2.7 % versus 71.1 ± 2.1 % ; $p < 0.001$).

The selectivity of the deficit seen in stage 2 in the 39-w depleted group was further confirmed by comparing this group to controls and 31-w depleted mice, which presented exactly the same profile of performance in the final two sessions of stage 1. Indeed, (as shown in figure 4, top right), those controls and 31-w depleted mice which, like the 39-w depleted group, presented no sign of discrimination in session -2 of go/no-go training (i.e., the session that preceded the one where the criterion was reached) still displayed over-chance performance in stage 2. The effects of VAD on percentage of correct scores in stage 2 remained unchanged when assessed in animals presenting the same progression of performance in the final sessions of stage 1. Thus, the appearance of a different profile of acquisition performance in the 39-w depleted group cannot be considered as a valid explanation for their dramatic impairment in stage 2.

Summary of biochemical and behavioural data

While both the 31-w and 39-w depleted groups exhibited significant and similar decreases in both the expression of brain (RAR β and RXR β/γ) retinoid receptors and tTG, a significant decrease in brain (and hippocampal) RC3 mRNAs was observed only in the 39-w depleted group. Otherwise, this 39-w depleted group was the sole that displayed a severe impairment in managing the two-choice discrimination problems in stage 2. The purpose of the following was to determine whether, as previously shown in aged mice (Etchamendy *et al.*, 2001), administration of RA to these 39-w depleted animals was able to normalise the VAD-induced brain retinoid hyposignalling and cognitive deficit.

Effect of RA administration to mice submitted to vitamin A deprivation for 39 weeks

Biochemical data

As can be seen in Figure 2A, the effect of RA administration to 39-w depleted animals on mRNAs contents in the whole brain differed with respect to mRNA type. Specifically, while RA induced an up-regulation of RAR β mRNA contents to levels observed in non-depleted animals, such an up-regulation was incomplete for tTG, extremely reduced and/or not observed at all for RC3 and RXR β/γ mRNAs. This was confirmed by statistical analysis indicating that both RAR and tTG mRNAs contents in the 39-w depleted+RA group were significantly increased with respect to those of the 39-w depleted+vehicle group (RAR β : $F(1,4) = 16.28$; $p = 0.016$. tTG: $F(1,4) = 9.54$; $p = 0.034$), whereas both RC3 and RXR β/γ mRNAs were not (RC3: $F(1,4) = 0.96$; $p = 0.382$. RXR β/γ : $F(1,4) = 0.00$; $p = 0.92$). Analysis of mRNAs measured in the hippocampus (see Figure 2B) showed that while RA administration up-regulated RXR β/γ mRNA expression to control (non depleted) levels (effect of RA in depleted mice : $F(1,4) = 11.75$; $p = 0.024$), such an effect was much more inconsistent (non-significant) on RC3 mRNA ($F(1,4) = 2.40$; $p = 0.19$)

Behavioural data

Stage 1. As can be seen in Figure 3, daily administration of RA to mice that underwent vitamin A deprivation for 39 weeks had no visible effect on performance in stage 1. In comparison with their matched controls treated with the vehicle, they reached the criterion of performance after a similar number of sessions (10.1 ± 1.1 for the 39-w depleted+RA group *versus* 10.3 ± 1.2 for the 39-w depleted+vehicle group : $F(1,12) = 0.007$; $p = 0.93$), and neither the effect of RA nor its interaction with reinforcement and/or sessions across both the first six (Treatment: $F(1,12) = 1.64$; $p = 0.22$. Interaction: $F(5,60) = 1.15$; $p = 0.35$) and last six sessions of training (Treatment: $F(1,12) = 0.29$; $p = 0.60$. Interaction: $F(5,60) = 0.59$; $p = 0.71$) were significant. As shown in Figure 4 (left panel), the 39-w depleted group receiving RA reached an above chance level of entry latency ratio (versus chance (0.0) ; $p < 0.001$) which was close to that observed in depleted mice receiving the vehicle ($F(1,12) = 0.37$; $p = 0.56$).

However, the major behavioural changes seen in the 39-w depleted animals in comparison with their non-depleted controls at this stage (i.e., a significant increase in overall latencies in the first two sessions of go-no-go training and a modified profile of performance in the last two sessions) were at least reduced in magnitude in the 39-w depleted group receiving RA. First, the overall latencies to enter an arm in the initial two sessions were not statistically increased in comparison with the 39-w control group ($F(1,12) = 2.68$; $p = 0.128$). Secondly, the 39-w depleted group treated with RA, unlike the 39-w depleted group treated with placebo, displayed a progressively

increasing pattern of go-no-go discrimination in the final sessions of stage 1, and particularly presented a discriminative ratio different from zero in session -2.

Stage 2. Figure 4 (right panel) shows that when required to make an “explicit” choice between two arms of opposing valence that were previously experienced separately, mice in the 39-w depleted group receiving RA behaved as poorly as their 39-w depleted group treated with vehicle (Treatment : $F(1,12) = 0.62$; $p = 0.45$). Specifically, they also failed to express any preference for the positive arms, entering the negative arms as often as the positive ones (percentage of correct choices : $55.7 \pm 3.6\%$; *versus* chance (50 %) : $p > 0.20$).

Summary of biochemical and behavioural data

Administration of RA failed both to fully normalise brain retinoid hyposignalling and to reverse the behavioural deficit induced by 39 weeks of vitamin A deprivation. In particular, neither the whole brain nor the hippocampal measures provided evidence for RA-induced normalisation of RC3 mRNA expression, and the animals did not display any improvement in accuracy in the two-choice discrimination task in stage 2.

DISCUSSION

The present biochemical and behavioural data show the following: (i) Groups of mice fed with a vitamin A-free diet for either 31 weeks or 39 weeks displayed reduced expression of brain RAR β , RXR β/γ and tTG mRNAs relative to their matched control groups fed with the control diet; conversely, only vitamin A deprivation for 39 weeks induced a concomitant decrease in brain RC3 mRNA contents and a selective behavioural impairment in the two-choice discrimination task in stage 2; (ii) Despite inducing some up-regulating effect on the expression of both RAR β and tTG mRNAs, treatment with RA failed to fully normalise the whole brain retinoid hyposignalling seen in the 39-w depleted group and had no beneficial effect on the associated cognitive deficit.

Two major points emerge from these data. Firstly, vitamin A deficiency induced postnatally can result in some cognitive deficit in adult mice. Secondly, this cognitive deficit was exclusively observed when the expression of RC3 was significantly decreased (by about 30 %), thereby suggesting that normal cognitive function might critically depend on a sufficient level of expression of certain retinoid target genes. Before discussing these two points, we will address the issue of the cognitive specificity of the behavioural deficit seen in our vitamin A-depleted mice.

The literature relative to mammalian VAD models provides evidence for VAD-associated defects in the ocular tissues such as micro- or anophthalmia and a wide range of abnormalities (Dräger and McCaffery, 1997). Therefore, the question arises as to whether the deficit in performance observed here in vitamin-A depleted mice might not be consecutive to a primary alteration of vision. The developing eye is particularly vulnerable to vitamin A deficiency although the gestational time-window of vulnerability appears to be rather narrow (i.e. days 11.5-13.5 according to Smith *et al.*, 1998). Because our mice were deprived at a post-natal stage and since they displayed normal serum retinol concentrations up to 20 weeks after the start of vitamin-A free diet administration (Enderlin *et al.*, 2000), the risk of abnormal eye development may be ruled out. Nevertheless, it is important to keep in mind that vitamin A also plays a role in the visual cycle via a non-genomic mechanism (Wald, 1968). For this reason, adult patients suffering from postnatally acquired vitamin A deficiency and displaying a dramatic decrease in retinol serum concentrations also display ocular symptoms mainly characterised by night blindness (Russell, 2000). Although the possibility that our 39-w depleted mice suffer visual alteration cannot surely be excluded, a recent experiment in RBP (retinol binding protein) knockout mice, show that, in the adult, residual serum retinol (12.5 %, as in our deficient mice, see Enderlin *et al.*, 2000) is sufficient for supporting normal vision (Quadro *et al.*, 1999).

Furthermore, that ocular defects may account for their behavioural impairment can be excluded for the following reasons. First, serum retinol concentrations were decreased to the same extent in 31-w depleted mice (see Enderlin *et al*, 2000), which otherwise did not exhibit any sign of deficit in performing the same (two-choice) discrimination task. The sole behavioural alteration visible in both the 31-w and 39-w depleted groups was the overall increase in latencies to enter arms in the very first sessions of the initial (go-no-go) learning task, and this had no meaningful consequence on subsequent discriminative performance in this task. Indeed, both depleted groups acquired the successive go-no-go discrimination task, and only one of them, the 39-w depleted group, failed in subsequent testing on simultaneous two-choice discriminations. Second, this deficit seen in the 39-w depleted group was selectively limited to the second stage of the task. Although this 39-w depleted group displayed an apparently peculiar profile of acquisition within the final sessions of stage 1, this could not account for the subsequent impairment, since the effects of VAD on percent correct scores in stage 2 remained unchanged when examined in animals which presented the same progression of performance in the final session of stage 1. Namely, 39-w depleted mice were still the sole group which failed in stage 2 testing. Furthermore, the 39-w depleted +RA group, which displayed a stage 1-discrimination profile similar to that seen in the control groups was nevertheless significantly impaired in stage 2. The selectivity of the deficit seen in the 39-w depleted mice in stage 2 renders it unlikely that it can be attributed to confounding (non-specific) changes in vision, affect, motivation, perception or motor control associated with vitamin A deficiency. Such non-specific effects are indeed extremely probable given the large spectrum of genes whose expression is regulated by the retinoids. In particular, a concomitant modification of emotional reactivity is strongly suggested here, since the depleted animals displayed significant increases in their decision time during the first sessions of training. Yet whatever the concomitant changes in behaviour presumably induced by VAD, their influence could not account for the selective deficit in stage 2 discriminative performance seen in 39-w depleted animals. Such non-specific effects would have similarly influenced performance in both stages 1 and 2 since the basic requirements of the task were the same in both stages. It follows that the deleterious effect of VAD on discriminative performance observed here must be cognitive in nature. Therefore, our present data support the view that acquired VAD can result in highly selective memory impairment. To our knowledge, this is the first report of CNS functional alterations resulting from VAD, as until now the VAD-related literature has exclusively reported brain defects observed at the structural level. Furthermore, such reported defects are mainly characterised by congenital abnormalities of neural crest derivatives in embryos born to VAD females (Maden *et al*, 1998).

The present data obtained in young adult VAD mice support the same conclusion as that put forward in our previous experiments in aged mice. Both approaches suggest a causal

relationship between the hypoexpression of brain retinoid signalling and the impairment of a relational/declarative form of memory. Specifically, we have shown (Etchamendy *et al.*, 2001) that the cognitive deficit seen in aged mice with a naturally occurring hypoexpression of brain retinoid signalling may be reversed by pharmacological manipulation, but that this reversal is effective only when it is accompanied by normalisation of brain (and hippocampal) retinoid-related molecular signalling to pre-senescent levels. In line with these previous findings, the present data using vitamin A deprivation show that inducing in young adult mice a brain (and hippocampal) retinoid signalling hypofunction of the same magnitude as that prevailing in aged mice can result in the same selective cognitive impairment as in aged mice. Hence, together with recent data of Jacobs *et al.*, (2000) obtained in VAD mice, both our present and prior experiments complement and extend previous knock-out studies showing both hippocampal LTP and spatial learning deficits in mice lacking brain (RAR β or RAR β /RXR γ) nuclear receptors (Chiang *et al.*, 1998) or RC3 (Pak *et al.*, 2000). In effect, not only are retinoid-mediated transcription events involved in the molecular mechanisms underlying synaptic plasticity and cognitive function, but also a precise control in these nuclear events is a prerequisite for the functional integrity of such processes.

In contrast to what was observed in aged mice, administration of the same dose of RA as that used in our ageing experiments here failed to reverse the VAD-induced cognitive impairment. The precise mechanisms underlying the efficacy of RA to up-regulate retinoid hyposignalling in the aged brain, as well as its lack of reliable effect in the VAD mouse brain, remain to be elucidated. Given that the residual serum retinol concentration must have been at around 10% (of normal) in our depleted mice whereas normal ageing is classically associated with an increase in such concentrations, it might be that the dose of 150 μ g of RA is insufficient to fully normalise the expression of the retinoid pathway in our present study. Further dose-effects experiments in our VAD model are needed to test the validity of such an hypothesis. Other possible lines of explanation might be related to the complex hetero-regulations existing between this retinoid pathway and others, like the thyroid hormone one (Enderlin *et al.*, 1997a, 1997b). Whatever these mechanisms, both the lack of VAD-induced cognitive impairment in the 31-w depleted group with respect to the 39-w depleted group, and the lack of beneficial effect of RA administration on the cognitive deficit seen in the latter group, constitute further evidence for our current hypothesis about relationships between brain retinoid hyposignalling and cognitive impairment. In contrast with our previous work carried out in aged mice, the novel finding here is that RC3 was the only presently measured gene expression, the level of which was reliably linked with cognitive abilities, i.e. two-choice discriminative performance in stage 2 was only impaired in the groups of mice that exhibited decreased levels of RC3 mRNAs. Therefore, it appears that normal cognitive function might indeed critically rely on a sufficient level of

expression of certain retinoid target genes. The question thus arises as to the nature and putative physiological function of these genes. In the present experiment, all mice irrespective of the group were able to learn a preference for the positive arms, as evidenced by their readiness (versus reluctance) to enter these baited arms (versus unbaited arms) when confronted with only one arm open at a time (end of stage 1). Such an acquired preference was not systematically translated into the choice of a positive arm if the latter was presented simultaneously with a negative one in stage 2. Thus, in contrast with all other groups, mice in the 39-w depleted group actually behaved as if they were naive, as evidenced by their failure to enter positive arms more often than negative ones. The contrasting effects of VAD on performance in these two stages hence provides further evidence for the involvement of dissociable memory systems in each version of the task. As suggested previously (see Etchamendy *et al.*, 1999, 2001 ; Marighetto *et al.*, 1999, 2000), the successive (go-no-go) discrimination in stage 1 might rely on separate unitary responses to individual arms, and therefore could be achieved using elemental stimulus-response associations, a form of procedural/implicit memory that is not dependent on the integrity of the hippocampal system (Cohen, 1984). Conversely, the two-choice discrimination problems in stage 2 might entail comparisons between information acquired separately, hence requiring the use of relational representations of past experiences that would depend on the functional integrity of the hippocampal formation (Eichenbaum *et al.*, 1992). The selective deficit observed in the 39-w depleted mice might thus stem from an incapacity to form relational representations, a process which is thought to critically depend on the Hebbian plastic properties of hippocampal synapses (Wallenstein *et al.*, 1998). In this respect, for the cognitive deficit to be observed, VAD-induced retinoid hyposignalling should be seen to result in a reduction in amounts of downstream-activated protein products at a level below that required to support synaptic plasticity-related relational processing. As shown here, RC3 is one of the retinoid target genes that could well be implicated in the contrasted behavioural effects of vitamin A deprivation observed here (i.e. 31-w versus 39-w of vitamin A deprivation). RC3 releases calmodulin kinase II (CaM) in response to activation of protein kinase C and local increase of free Ca^{2+} concentration, and it has been proposed that a selective enrichment of RC3 within dendritic shafts and spines would place it in an ideal position to release CaM in response to a transient Ca^{2+} signal (e.g., Gerendasy and Sutcliffe, 1997). Consistent with a role for the CaM-binding protein RC3 in Ca^{2+} /CaM-induced synaptic potentiation, an increase in the amount of phosphorylated form of RC3 has been reported during the maintenance phase of LTP (Chen *et al.*, 1997) and it has been demonstrated that the post-synaptic injection of monoclonal antibodies against the phosphorylation site domain of RC3 in hippocampal CA1 pyramidal cells prevents the induction of LTP (Fedorov *et al.*, 1995). More recently, it has been shown that mice lacking RC3 gene exhibited deficits in hippocampal synaptic plasticity (Pak *et al.*, 2000). However, many other retinoid-activated target

genes involved in plasticity-related mechanisms [e.g. NMDA receptors (Martin & Morris, 2000 ; Younkin *et al.*, 1993), the calmodulin kinase II (Soderling, 2000 ; Chen & Kelly, 1996) and numerous phosphoproteins (Greengard *et al.*, 1993 ; Gaetano *et al.*, 1992] could also be considered as likely candidates in explaining the cognitive consequences of VAD.

Thus, whatever the precise synaptic protein products of the retinoid-activated genes that are involved in the observed VAD-induced relational memory deficit, the present results strengthen the hypothesis that a dysregulation of retinoid-mediated molecular events, including the production of RC3, may be a potential factor for cognitive deterioration. In this respect, our findings complement studies carried out in the field of nutrition. Specifically, while numerous epidemiological and experimental studies have provided strong evidence that both in humans and animals, a lack or excess of vitamin A is harmful to the embryo (Zile, 1998), the present and previous studies (Etchamendy *et al.*, 2001 ; Krezel *et al.*, 1998) indicate that sufficient levels of vitamin A are also fundamental for the maintenance of mature brain function. Further studies aimed at elucidating the potential role of brain retinoid-signalling pathways in cognition are needed to reinforce the scientific knowledge required for improving health and well being worldwide. This is a serious concern given the hundreds of millions of adults and children who are vitamin A deficient (Sommer, 1981, 1986,WHO, 1995 ; see also Underwood, 1998).

REFERENCES

- Alfos, S., Higuere, P., Pallet, V., Higuere, D., Garcin, H. & Jaffard, R. (1996) Chronic ethanol consumption increases the amount of mRNA for retinoic acid and triiodothyronine receptors in mouse brain. *Neurosci. Lett.*, **206**, 73-76.
- Chelly, J., Montarras, D., Pinset, C., Berwald-Netter, Y., Kaplan, J.C. & Kahn, A. (1990) Quantitative estimation of minor mRNAs by cDNA-polymerase chain reaction. Application to dystrophin mRNA in cultured myogenic and brain cells. *Eur. J. Biochem.*, **187**, 691-698.
- Chen, S. J. & Kelly, P.T. (1996) Retinoic acid stimulates alpha-CAMKII gene expression in PC12 cells at a distinct transcription initiation site. *J. Neurosci.*, **16**, 5704-5714.
- Chen, S.J., Sweatt, J.D. & Klann, E. (1997) Enhanced phosphorylation of the postsynaptic protein kinase C substrate RC3/neurogranin during long-term potentiation. *Brain Res.*, **749**, 181-187.
- Chiang, M.Y., Misner, D., Kempermann, G., Schikorski, T., Giguere, V., Sucov, H.M., Gage, F.H., Stevens, C.F. & Evans, R.M. (1998) An essential role for retinoid receptors RAR β and RXR γ in long-term potentiation and depression. *Neuron*, **21**, 1353-1361.
- Chiocca, E.A., Davies, P.J. & Stein, J.P. (1989) Regulation of tissue transglutaminase gene expression as a molecular model for retinoid effects on proliferation and differentiation. *J. Cell Biochem.*, **39**, 293-304.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.*, **162**, 156-159.
- Clagett-Dame, M. & Plum, L.A. (1997) Retinoid-regulated gene expression in neural development. *Crit. Rev. Euk. Gene Expr.*, **7**, 299-342.
- Cohen, N.J. (1984) Preserved learning capacity amnesia: Evidence for multiple memory systems. In Squire, L.R. & Butters, N. (eds), *The Neuropsychology of Memory* Guilford Press, New York, pp 83-103.
- Dong, J.M., Li, F. & Chiu, J.F. (1990) Induction of F9 differentiation by transient exposure to retinoic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **170**, 147-152.
- Dräger, U.C. & McCaffery, P. (1997) Retinoic acid and the development of the retina. *Prog. Retin. Eye Res.*, **16**, 323-351.
- Eichenbaum, H., Otto, T. & Cohen, N.J. (1992) The hippocampus-What does it do? *Behav. Neural Biol.*, **57**, 2-36.
- Enderlin, V., Alfos, S., Pallet, V., Garcin, H., Azais-Braesco, V., Jaffard, R. & Higuere, P. (1997a) Aging decreases the abundance of retinoic acid (RAR) and triiodothyronine (TR) nuclear receptor mRNA in rat brain: effects of the administration of retinoids. *FEBS. Lett.* **412**, 629-632.

- Enderlin, V., Higuieret, D., Alfos, S., Husson, M., Jaffard, R., Higuieret, P. & Pallet, V. (2000) Vitamin A deficiency decreases the expression of RAR β and RXR β/γ in adult mouse brain: Effect of RA administration. *Nutr. Neurosci.*, **3**, 173-181.
- Enderlin, V., Pallet, V., Alfos, S., Dargelos, E., Jaffard, R., Garcin, H. & Higuieret, P. (1997b) Age-related decreases in mRNA for brain nuclear receptors and target genes are reversed by retinoic acid treatment. *Neurosci. Lett.* **229**, 125-129.
- Etchamendy, N., Desmedt, A., Cortes-torrea, C., Marighetto, A. & Jaffard R. (1999) Contrasting effects of selective hippocampal lesion on different memory expression. *The Fifth IBRO World Congress of Neurosci. Abstracts*, p 75.
- Etchamendy, N., Enderlin, V., Marighetto, A., Vouimba, R.M., Pallet, V., Jaffard R. & Higuieret, P. (2001) Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signalling. *J. Neurosci.*, **21**, 6423-6429.
- Fedorov, N.B., Pasinelli, P., Oestreicher, A.B., DeGraan, P.N. & Reymann, K.G. (1995) Antibodies to postsynaptic PKC substrate neurogranin prevent long-term potentiation in hippocampal CA1 neurons. *Eur. J. Neurosci.*, **7**, 819-822.
- Gaetano, C., Matsumoto, K. & Thiele, C.J. (1992) In vitro activation of distinct molecular and cellular phenotypes after induction and differentiation in a human neuroblastoma cell line. *Cancer Res.*, **52**, 4402-4407.
- Gerendasy, D.D. & Sutcliffe, J.G. (1997) RC3/neurogranin, a postsynaptic calpacitin for setting the response threshold to calcium influxes. *Mol. Neurobiol.*, **15**, 131-163.
- Greengard, P., Valtorta, F., Czernik, A.J. & Benfenati, F. (1993) Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science*, **259**, 780-785.
- Gudas, L.J., Sporn, M.B. & Roberts, A.B. (1994) Cellular biology and biochemistry of the retinoids. In Sporn, M.B., Roberts, A.B. & Goodman, D.S. (eds), *The Retinoids: Biology, chemistry and medicine*. Raven Press, New York, pp 443-520.
- Iñiguez, M.A., Morte, B., Rodriguez-Pena, A., Munoz, A., Gerendasy, D., Sutcliffe, J.G. & Bernal, J. (1994) Characterization of the promoter region and flanking sequences of the neuron-specific gene RC3 (neurogranin). *Mol. Brain Res.*, **27**, 205-214.
- Kastner, P., Mark, M. & Chambon, P. (1995) Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell*, **83**, 859-869.
- Krezel, W., Ghyselinck, N., Samad, T.A., Dupe, V., Kastner, P., Borrelli, E., Chambon, P. (1998) Impaired locomotion and dopamine signaling in retinoid receptor mutant mice. *Science*, **279**, 863-867.
- Krezel, W., Kastner, P. & Chambon, P. (1999) Differential expression of retinoid receptors in the adult mouse central nervous system. *Neuroscience*, **89**, 1291-1300.

- Maden, M., Gale, E. & Zile, M. (1998) The role of vitamin A in the development of the central nervous system. *J. Nutr.*, **128**, 471S-475S.
- Malik, M.A., Blusztajn, J.K. & Greenwood, C.E. (2000) Nutrients as trophic factors in neurons and the central nervous system: role of retinoic acid. *J. Nutr. Biochem.*, **11**, 2-13.
- Marighetto, A., Etchamendy, N., Touzani, K., Torrea, C.C., Yee, B.K., Rawlins, J.N. & Jaffard, R. (1999) Knowing which and knowing what: a potential mouse model for age-related human declarative memory decline. *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 3312-3322.
- Marighetto, A., Touzani, K., Etchamendy, N., Torrea, C.C., De Nanteuil, G., Guez, D. Jaffard, R. & Morain, P. (2000) Further evidence for a dissociation between different forms of mnemonic expressions in a mouse model of age-related cognitive decline: effects of tacrine and S 17092, a novel prolyl endopeptidase inhibitor. *Learn. Mem.*, **7**, 159-169.
- Martin, S.J., Grimwood, P.D. & Morris, R.G. (2000) Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu. Rev. Neurosci.*, **23**, 649-711.
- McNaughton, B.L. & Morris, R.G.M. (1987) Hippocampal synaptic enhancement and information storage within a distributed memory system. *Trends Neurosci.*, **10**, 408-415.
- Misner, D.L., Jacobs, S., Shimizu, Y., de Urquiza, A.M., Solomin, L., Perlmann, T., De Luca, L.M., Stevens, C.F. & Evans, R.M. (2001) Vitamin A deprivation results in reversible loss of hippocampal long-term synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 11714-11719.
- Pak, J.H., Huang, F.L., Li, J., Balschun, D., Reymann, K.G., Chiang, C., Westphal, H. & Huang K.P. (2000) Involvement of neurogranin in the modulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, synaptic plasticity, and spatial learning: A study with knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 11232-11237.
- Quadro, L., Blaner, W.S., Salchow, D.J., Vogel, S., Piantadosi, R., Gouras, P., Freeman, S., Cosma, M.P., Colantuoni, V. & Gottesman, M.E. (1999) Impaired retinal function and vitamin availability in mice lacking retinol-binding protein. *EMBO J.*, **18**, 4633-4644.
- Rogue, P.J., Ritz, M.F. & Malviya, A.N. (1993) Impaired gene transcription and nuclear protein kinase C activation in the brain and liver of aged rats. *FEBS Lett.*, **334**, 351-354.
- Russell, R.M. (2000) The vitamin A spectrum: from deficiency to toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.*, **71**, 878-884.
- Savouré, N., Nio, C., Maudet, M. & Nicol, M. (1996) Liver transglutaminases and vitamin-A deficiency in hairless mice. *Ann. Nutr. Metab.*, **40**, 52-60.
- Smith, S.M., Dickman, E.D., Power, S.C. & Lancman, J. (1998) Retinoids and their receptors in vertebrate embryogenesis. *J. Nutr.*, **128**, 467S-470S.
- Soderling, T.R. (2000) CaM-kinases: modulators of synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **10**, 375-380.

- Sommer, A., Tarwotjo, I., Hussaini, G., Susanto, D. & Soegiharto, T. (1981) Incidence, prevalence, and scale of blinding malnutrition. *Lancet*, **1**, 1407-1408.
- Sommer, A., Tarwotjo, I., Djunaedi, E., West, K.P. Jr., Loeden, A.A., Tilden, R. & Mele, L. (1986) Impact of vitamin A supplementation on childhood mortality. A randomised controlled community trial. *Lancet*, **1**, 1169-1173.
- Underwood, B.A. (1998) From research to global reality: the micronutrient story. *J. Nutr.*, **128**, 145-151.
- Wald, G. (1968) The molecular basis of visual excitation. *Nature*, **219**, 800-807.
- Wallenstein, G.V., Eichenbaum, H. & Hasselmo, M.E. (1998) The hippocampus as an associator of discontinuous events. *Trends Neurosci.*, **21**, 317-323.
- WHO (1995) Global prevalence of vitamin A deficiency. In MDIS working paper #2. (Document WHO/NUT/95.1 available from the Nutritional Program) World health Organization, Geneva, Switzerland.
- Younkin, D.P., Tang, C.M., Hardy, M., Reddy, U.R., Shi, Q.Y., Pleasure, S.J., Lee, V.M. & Pleasure, D. (1993) Inducible expression of neuronal glutamate receptor channels in the NT2 human cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 2174-2178.
- Zetterstrom, R.H., Simon, A., Giacobini, M.M., Eriksson, U. & Olson, L. (1994) Localization of cellular retinoid-binding proteins suggests specific roles for retinoids in the adult central nervous system. *Neuroscience*, **62**, 899-918.
- Zile, M.H. (1998) Vitamin A and embryonic development: an overview. *J. Nutr.*, **128**, 455S-458S.

CHAPITRE VI

DISCUSSION GENERALE

CHAPITRE VI

DISCUSSION GENERALE

I_ RESUME ET DISCUSSION DES RESULTATS ISSUS DE NOS EXPERIENCES

A_ Résumé de nos principaux résultats

L'objectif de nos travaux était d'étudier les implications potentielles de la voie de signalisation des rétinoïdes dans les fonctions cognitives. Pour mettre à l'épreuve ces hypothèses, nous avons choisi le modèle physiopathologique du vieillissement qui se caractérise par une hypoexpression de ce signal nucléaire et une altération des processus de mémoire déclarative.

Un des pré-requis à la réalisation de cette étude a été de développer une épreuve comportementale permettant d'objectiver chez la souris âgée, un déficit spécifiquement cognitif dont la sélectivité pourrait modéliser l'atteinte préférentielle de la composante déclarative de la mémoire chez le sujet humain vieillissant. Pour ce faire, nous nous sommes inspirés du modèle théorique de l'équipe d'Eichenbaum permettant d'opérationnaliser les composantes fondamentales (aptitude à comparer et à opposer des items en mémoire et utilisation inférentielle des souvenirs dans des situations nouvelles) de la mémoire déclarative, pouvant être étudiées chez l'animal. Notre épreuve comportementale composée d'une phase d'apprentissage (discriminations successives d'emplacements) et d'une phase test (discriminations simultanées des mêmes emplacements) a permis de mettre en évidence chez la souris âgée une altération sélective des performances dans la phase de discriminations simultanées des bras du labyrinthe. Selon le cadre théorique de référence, ce déficit sélectif a pu être interprété comme reflétant une altération de la mémoire relationnelle/déclarative secondaire à un dysfonctionnement hippocampique.

Cette interprétation a été mise à l'épreuve par une seconde étude visant à évaluer les effets d'une lésion hippocampique dans cette épreuve comportementale. Les résultats ont montré que

les animaux porteurs de cette lésion bilatérale présentent une détérioration sélective des performances pour les discriminations simultanées d'emplacements, similaire à celle observée chez nos animaux âgés. Cette étude conforte l'hypothèse selon laquelle la phase test de notre épreuve permettrait d'évaluer une forme de mémoire dite relationnelle dépendante de l'intégrité de l'hippocampe et altérée au cours du vieillissement.

C'est donc sur ce modèle comportemental que nous avons mis à l'épreuve nos hypothèses opérationnelles relatives à l'implication des rétinoïdes dans le vieillissement cognitif.

La première série d'expériences a consisté à évaluer les effets de l'administration d'AR sur notre modèle d'altération mnésique liée au vieillissement et sur un déficit de PLT.

En accord avec les résultats d'Enderlin et collaborateurs (1997), nos travaux ont montré que le vieillissement s'accompagne d'une hyposignalisation de la voie des rétinoïdes. Celle-ci a été caractérisée par une diminution d'expression des ARN des gènes codant pour les récepteurs nucléaires de l'AR ($RAR\beta$ et $RXR\beta/\gamma$) et certains de leurs gènes cibles codant pour la neurogranine (RC3) et la transglutaminase tissulaire. Cette hypoexpression de la voie des rétinoïdes a été observée au niveau du cerveau entier et plus spécifiquement au sein de la formation hippocampique (pour la RC3 et les $RXR\beta/\gamma$). De façon concomitante, nous avons objectivé chez ces mêmes animaux un déficit sélectif de mémoire relationnelle. Une expérience électrophysiologique a également permis de démontrer chez les souris âgées, un déficit de potentialisation à long-terme des synapses commissurales de la région CA1 de l'hippocampe dorsal.

Comme nous l'avons mentionné en introduction, cette voie de signalisation nucléaire présente la propriété d'auto-réguler son propre système d'expression (Yamagata *et al.*, 1994 ; Enderlin *et al.*, 1997) ; notre étude confirme ce phénomène puisque l'administration d'AR (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) à des souris âgées rétablit un niveau normal (comparable à celui d'animaux jeunes adultes) d'expression des différents ARN cités précédemment et ce aussi bien au niveau du cerveau entier que de façon plus circonscrite à l'hippocampe. Cette normalisation du signal rétinoïde s'accompagne d'un rétablissement des performances dans la phase test de mémoire relationnelle. Par ailleurs, ce même traitement, reverse partiellement le déficit de PLT hippocampique observé chez les souris âgées traitées au placebo.

Les effets induits résultent d'une action nucléaire de l'AR puisque l'administration conjointe d'un antagoniste des RAR supprime les effets bénéfiques de l'AR sur l'expression de la voie de signalisation des rétinoïdes et sur le déficit mnésique des souris âgées.

Ces résultats suggèrent que l'hyposignalisation des rétinoïdes observée chez nos animaux âgés participe à leur déclin cognitif. Plus généralement, ces données constituent une première démonstration en faveur de notre hypothèse principale suggérant que les récepteurs de l'AR, via

leurs capacités à contrôler l'expression de nombreux gènes, jouent un rôle fondamental dans les fonctions cognitives.

Pour étayer cette conclusion et conforter l'idée qu'un niveau optimum d'expression de la voie de signalisation des rétinoïdes est une condition nécessaire au déroulement normal de certains des processus sous-tendant les fonctions cognitives, nous avons finalement étudié les conséquences fonctionnelles d'une hypoactivation de cette voie induite par un régime alimentaire dépourvu en vitamine A, chez l'animal adulte.

Une première expérience a consisté à soumettre des souris jeunes (3 semaines) à un régime alimentaire totalement dépourvu en vitamine A pour une durée de 31 semaines. Ces animaux n'ont montré aucun déficit de performance au cours des deux stades de notre épreuve. Au plan biochimique, cette période de carence en vitamine A s'est révélée suffisante pour induire une diminution notable de l'expression des ARNm des récepteurs nucléaires de l'AR (RAR β et RXR β/γ) et du gène cible tTG, mais pas de la neurogranine.

Dans une seconde série d'expériences, les souris jeunes ont été soumises à un régime dépourvu en vitamine A pendant une durée plus importante (39 au lieu de 31 semaines). Les résultats comportementaux montrent une perturbation sélective des performances dans la phase test de mémoire relationnelle (stade 2). Parallèlement, les données biochimiques ont montré une baisse générale d'expression de tous les ARNm mesurés, y compris cette fois ceux de la neurogranine dont la diminution était très prononcée au niveau hippocampique. L'administration d'AR à ces animaux carencés n'a pas eu d'effet bénéfique sur leurs performances mnésiques; elle n'a permis qu'une restauration partielle du niveau d'expression génique des récepteurs nucléaires et de la tTG (les niveaux d'expression des gènes codant respectivement pour les RXR β et γ ne sont pas normalisés dans le cerveau entier), et s'est finalement révélée inefficace pour normaliser l'expression hippocampique du gène codant pour la neurogranine.

Cette dernière étude conforte nos premières expériences sur le vieillissement en suggérant que les événements nucléaires contrôlés par les rétinoïdes sont impliqués dans les mécanismes neurobiologiques sous-tendant les fonctions cognitives. Plus encore, nos données révèlent que seule la neurogranine, parmi les indicateurs biochimiques mesurés, présente un niveau d'expression concordant avec les performances mnésiques évaluées. Ces observations sont donc conformes à nos hypothèses initiales postulant une implication des rétinoïdes dans les fonctions cognitives via la régulation de l'expression de gènes cibles codant pour des protéines neuronales (telle la neurogranine) sollicitées dans les processus de plasticité synaptique potentiellement nécessaires aux opérations mnésiques. Nous reviendrons sur ces hypothèses dans un paragraphe ultérieur.

B_ Un niveau optimal d'expression des récepteurs de l'AR semble être nécessaire pour l'expression d'une forme de mémoire relationnelle.

Les études menées respectivement chez les souris âgées et chez les souris adultes carencées apparaissent complémentaires dans la démonstration: d'une part, nous montrons sur le modèle du vieillissement qu'en restaurant un niveau d'expression normal (c'est à dire similaire à celui mesuré chez les animaux jeunes adultes) d'un signal nucléaire contrôlé par les rétinoïdes, nous supprimons parallèlement un déficit cognitif associé; d'autre part, en réduisant d'une même amplitude (20 à 30%) l'expression de ce signal chez un organisme sain et normal (le jeune adulte), nous observons un déficit mnésique de même nature que celui observé au cours du vieillissement. Ces résultats suggèrent qu'une diminution de 20 à 30 % du niveau d'expression de la voie de signalisation des rétinoïdes est suffisante pour induire une altération sélective des processus de mémoire relationnelle. En d'autres termes, un niveau optimal d'expression de ce signal semblerait requis pour l'élaboration et/ou l'utilisation de représentations relationnelles. De ces études, émerge l'idée qu'un niveau critique d'expression du signal rétinoïde est important pour un fonctionnement normal de la mémoire.

Cette idée est confortée par une étude récemment publiée par Alfos et ses collaborateurs (2001). Ces travaux montrent que des animaux jeunes adultes soumis à une consommation chronique d'éthanol présentent une augmentation significative du niveau d'expression cérébrale des gènes codant respectivement pour les récepteurs RAR β et RXR β/γ et pour la tTG. Parallèlement, les performances mnésiques de ces animaux dans une épreuve d'alternance spontanée sont diminuées comparativement aux animaux témoins. Enfin, l'administration d'un antagoniste des récepteurs RAR β supprime à la fois l'hyperexpression de la voie de signalisation des rétinoïdes (les niveaux d'expression génique des récepteurs et de la tTG sont normalisés) et le déficit mnésique associé. Ces résultats suggèrent que la surexpression de la voie de signalisation des rétinoïdes est impliquée dans l'apparition de certaines altérations mnésiques liées à la consommation d'alcool.

Ces résultats relatifs à une hyperexpression de la voie des rétinoïdes, associés aux nôtres concernant des hypoexpressions, confortent l'idée que des variations de 20 à 30% par rapport à un niveau d'expression normal du signal rétinoïde entraînerait des altérations mnésiques. Finalement, un équilibre critique des niveaux d'expression des récepteurs de l'AR semble être nécessaire pour un fonctionnement normal du cerveau et, en particulier, pour une expression normale de certaines formes de mémoire.

C_ Pourquoi l'hyposignalisation de la voie des rétinoïdes induite chez le jeune adulte et le déficit mnésique associé ne sont pas réversibles par l'administration d'AR ?

Si le vieillissement se caractérise par une hypoexpression de la voie de signalisation des rétinoïdes néanmoins réversible par l'apport exogène d'AR, l'hyposignalisation de la voie des rétinoïdes induite chez le jeune adulte soumis à une alimentation dépourvue de vitamine A pendant 39 semaines correspondrait à un état physiologique différent qui ne peut être normalisé par ce même traitement. Nous tenterons dans ce qui suit, de proposer des hypothèses pouvant rendre compte de ces différences.

Un des raisonnements consisterait à supposer que ces deux états physiologiques sont de nature comparable mais différent en intensité. De nombreuses données (cf Introduction, deuxième partie, IV-C) indiquent que le sujet vieillissant dispose d'une concentration sérique en vitamine A très importante, mais que toute la machinerie nécessaire au métabolisme de cette vitamine est déficitaire. Ces modifications auraient une incidence sur la conversion de la vitamine A en AR et pourraient être à l'origine d'une bio-disponibilité réduite de cet acide dans la cellule. L'administration d'AR à une dose de 150 µg/Kg serait suffisante pour venir combler les taux d'AR manquant dans la cellule et ramener l'expression de la voie de signalisation des rétinoïdes à un niveau normal. Dans la situation d'hypovitaminose chez la souris adulte, les mesures effectuées au laboratoire indiquent une chute dramatique du taux de vitamine A sérique (10% du taux normal mesuré chez les contrôles, voir Enderlin *et al.*, 2000), qui pourrait se traduire au niveau de la cellule par une déplétion en AR bien plus importante que celle observée au cours du vieillissement. Dans cette situation donc, l'administration d'AR n'aurait que partiellement réinduit le signal rétinoïde parce que le traitement serait trop faiblement dosé pour pallier l'absence quasi totale d'AR dans la cellule. En particulier, la disponibilité en ligand ne serait pas suffisante pour obtenir un rétablissement du niveau d'expression des RXRβ/γ dans le cerveau entier. RXR étant connu pour être le partenaire d'hétérodimérisation préférentiel de RAR et de nombreux modulateurs de gènes (voir chapitre I, seconde partie, paragraphe II-B et C), l'hypoexpression persistante de ces récepteurs suffirait, en dépit du niveau normal d'expression de RAR, au maintien de l'hypoexpression de certains gènes cibles comme RC3. L'étude des effets dose de l'administration d'AR sur ce modèle animal devrait permettre dans l'avenir de tester la validité de cette hypothèse selon laquelle l'hyposignalisation des rétinoïdes induite par l'hypovitaminose chez l'adulte, comme celle associée au vieillissement, est susceptible d'être reversée par un apport exogène en AR.

Toutefois, des données issues du laboratoire, semblent indiquer que ces deux situations d'hyposignalisation de la voie des rétinoïdes correspondent à des états physiologiques différents. L'effet limité de l'AR chez l'adulte carencé vitamine A serait alors expliqué par le caractère plus général du déséquilibre des voies de modulation génique observé dans cette situation.

Comme nous l'avons indiqué en introduction, les rétinoïdes régulent en effet l'expression génique en étroite relation avec d'autres modulateurs, dont les hormones thyroïdiennes. Ces deux voies de signalisation (rétinoïdes et hormones thyroïdiennes) présentent des propriétés d'hétérorégulation. Les travaux d'Enderlin ont montré que le vieillissement s'accompagne non seulement d'une hypoexpression de la voie de signalisation des rétinoïdes mais également d'une diminution du signal nucléaire des hormones thyroïdiennes. Ces deux phénomènes sont réversibles aussi bien par l'administration d'AR que par l'apport de T3 (Enderlin *et al.*, 1997a, 1997b). Ces données indiquent que si ces deux voies sont hypoexprimées au cours du vieillissement, elles conservent néanmoins des propriétés d'hétérorégulation telles que la réinduction d'une voie par l'apport du ligand correspondant permet et entraîne la normalisation de l'expression de la seconde voie.

Une étude menée chez le rat montre qu'une privation de vitamine A pendant 10 semaines entraîne une diminution importante d'expression cérébrale des ARNm codant pour les RAR β , les RXR β/γ , les TR et pour la RC3. L'administration d'AR à ces animaux n'entraîne que la réinduction de l'expression génique des récepteurs de l'AR, alors qu'un traitement avec la T3 induit à la fois la restauration de l'expression génique des TR, et celle des récepteurs de l'AR et de la RC3 (Husson *et al.*, 2001). Des données de la littérature montrent effectivement que le gène codant pour la RC3 présente un élément de réponse pour les RAR (Iñiguez *et al.*, 1994) mais est également régulé par les hormones thyroïdiennes (Guadano-Ferraz *et al.*, 1997 ; Martinez de Arrieta *et al.*, 1999 ; Morte *et al.*, 1997). L'hypoexpression de la voie de signalisation des rétinoïdes observée chez ces rats adultes privés de vitamine A entraînerait un dysfonctionnement critique des actions nucléaires des hormones thyroïdiennes, dysfonctionnement qui devient un facteur limitant pour une éventuelle récupération fonctionnelle des deux voies.

De tels dysfonctionnements pourraient rendre compte des résultats que nous avons obtenus chez les souris adultes rendues déficientes en vitamine A. Des résultats biochimiques préliminaires semblent effectivement indiquer que la situation d'hypovitaminose telle que nous l'avons induite chez la souris adulte se caractérise aussi par une diminution de l'expression génique des TR dans le cerveau entier. Toutefois, l'administration d'AR (même dose et même période de traitement que dans notre protocole expérimental) permet une restauration du niveau d'expression des TR. Cette normalisation du niveau d'expression des TR ne suffit cependant pas à garantir que leur fonctionnalité soit normale. Ces récepteurs, en effet, ne sont fonctionnels que lorsque le ligand correspondant (T3) est suffisamment disponible dans la cellule. Nous ne

disposons pas encore de données relatives au statut thyroïdien périphérique de nos souris carencées. Mais, une privation alimentaire en vitamine A entraîne chez le rat, des modifications dans le métabolisme et le transport des hormones thyroïdiennes caractérisées par une augmentation de la concentration sérique en T3 et en T4 consécutive à une diminution du transport de la T3 aux cellules cibles et à une diminution de la formation des complexes hormone-récepteur (Garcin et Higuere, 1979 ; Higuere et Garcin, 1984). Si ces modifications métaboliques étaient également observées chez nos animaux carencés, elles pourraient contribuer à l'explication de nos résultats . Les données de la littérature indiquent en effet, que dans la cellule, les TR dépourvus de ligand forment des apo-récepteurs qui exerceraient une activité répressive sur l'expression des gènes cibles (Damm *et al.*, 1989). Ce phénomène pourrait donc expliquer la persistance des dysfonctionnements nucléaires chez nos souris déficientes en vitamine A après l'administration d'AR.

Une étude supplémentaire serait donc nécessaire pour, d'une part contrôler le statut thyroïdien de nos animaux carencés, et d'autre part déterminer dans quelle mesure l'administration de T3 permettrait de restaurer la fonctionnalité des deux voies de signalisation (et supprimer le déficit mnésique associé).

D_ Réseaux de signalisation nucléaire multiples : les rétinoïdes et les hormones thyroïdiennes

Notre travail a exclusivement porté sur la fonctionnalité de la voie de signalisation des rétinoïdes dans les fonctions cognitives sans intégrer dans les hypothèses, les possibles et très probables interactions avec la voie des hormones thyroïdiennes ou encore d'autres modulateurs. Cette omission était volontaire dans un premier temps pour limiter les hypothèses opérationnelles. Néanmoins nous ne pouvons ignorer dans nos interprétations (ou dans notre perception de cette problématique) l'existence de réseaux de signalisation nucléaire multiples et complexes régulant de concert l'expression génique.

Les travaux menés *in vitro* sur différentes souches cellulaires témoignent de l'extrême complexité de ces voies de signalisation nucléaires qui, via des phénomènes d'hétérorégulation assureraient une certaine forme de plasticité fonctionnelle. Et les données issues de l'expérimentation *in vitro* montrent que ces phénomènes d'hétérorégulation sont dépendants d'une multitude de facteurs : le type cellulaire, la concentration relative des différents ligands dans la cellule, la nature des récepteurs présents dans la cellule, l'état physiologique global de l'organisme qui se traduit par des signaux transmis au niveau nucléaire pour réguler l'expression et la coordination de ces voies de signalisation. Les études visant à comprendre la co-fonctionnalité de ces réseaux de signaux nucléaires sur des modèles *in vivo* sont encore rares

aujourd'hui. Toutefois, la majeure partie des travaux menés au laboratoire de Nutrition vise à analyser ces phénomènes sur des modèles physiologiques pour tenter d'en extraire des lois minimales de fonctionnement. Ces études se sont essentiellement intéressées au co-fonctionnement des voies de signalisation des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes sur plusieurs modèles physiologiques et aboutissent à l'idée que ces deux voies sont fonctionnellement inter-dépendantes.

Plusieurs modèles physiopathologiques rendent compte de ces phénomènes d'hétérorégulation. Le modèle du vieillissement, nous l'avons vu, en est un excellent exemple. Cet état physiologique se caractérise par une diminution d'expression des deux voies de signalisation qui peuvent être réinduites par l'administration d'un seul des deux ligands (T3 ou AR) (Enderlin et al., 1997 ; Enderlin, 1997). Une réduction du niveau d'expression des récepteurs de l'AR et des TR est aussi observée chez des rats soumis à un régime alimentaire dépourvu de vitamine A, mais dans ce modèle, ces deux voies de signalisation ne peuvent être normalisées qu'après administration de T3 (Husson et al., 2001). Une étude a également montré chez le rat qu'un état de déficience en vitamine A peut induire une modification des récepteurs des glucocorticoïdes avec une augmentation de leur capacité de liaison (Audouin-Chevallier et al., 1993). La situation d'hypothyroïdie chez l'animal est également très représentative des propriétés d'hétérorégulation des voies de signalisation nucléaire contrôlées par ces récepteurs ligand-dépendant. Chez le rat, elle entraîne une diminution du niveau d'expression (Coustaut et al., 1996) et de la capacité de liaison des RAR qui peut être normalisée soit par un apport exogène d'AR, soit par une administration de T3 (Pallet et al., 1994).

Plus qu'une coopérativité de ces deux voies de signalisation, des résultats issus de ces deux dernières études semblent indiquer une forme de synergie fonctionnelle entre ces deux signaux nucléaires. Plus précisément, la capacité de liaison des RAR de même que leur niveau d'expression génique sont potentialisés par la co-administration des deux ligands relativement à la situation expérimentale où un seul des deux ligands est injecté. L'activation des deux voies aurait donc un effet synergique.

C'est très sûrement dans ces aspects que réside la plus grande difficulté à décrypter les mécanismes de régulation de l'expression génique. Il ne s'agit plus d'étudier un signal régulant l'expression d'un gène mais de prendre en compte, dans chaque modèle physiologique, les interactions particulières entre plusieurs signaux permettant de réguler de façon optimale l'expression des gènes cible.

Si nos hypothèses opérationnelles concernent uniquement la voie des rétinoïdes, il apparaît clairement que cette voie de signalisation est indissociable des autres modulateurs d'expression génique appartenant à la même superfamille. Par conséquent, si nos données indiquent que le signal rétinoïde joue un rôle dans les mécanismes neurobiologiques associés aux processus

mnésiques, il est fort probable que cette hypothèse s'applique de façon plus élargie à l'ensemble des modulateurs d'expression génique de cette superfamille et à leurs interactions.

E_ Conclusion partielle

Nos études constituent les toutes premières démonstrations sur des modèles physiologiques (vieillesse et hypovitaminose chez l'adulte) d'une implication des voies de signalisation nucléaire des rétinoïdes dans les processus mnésiques. Elles viennent compléter les études déjà existantes, utilisant des souris modifiées génétiquement et dépourvues de certains récepteurs de l'AR (plus précisément RAR β et RXR γ ; Chiang *et al.*, 1998), suggérant le rôle des rétinoïdes dans des apprentissages spatiaux (c'est à dire aussi une forme de mémoire relationnelle) et dans des modèles de PLT et DLT (dépression à long terme) hippocampique. Nos travaux montrent plus précisément qu'une diminution de 20 à 30% du niveau d'expression cérébrale de la voie de signalisation des rétinoïdes est suffisante pour induire, chez l'animal normal, une altération sélective de la mémoire relationnelle. Un niveau optimal d'expression de ce signal nucléaire semble donc être requis pour l'élaboration et l'utilisation efficace de représentations relationnelles.

Ces travaux apportent des données fondamentales dans le domaine de la nutrition et des neurosciences jusqu'alors exclusivement centré sur les fonctions de la vitamine A dans le système nerveux d'un organisme en cours de développement. Ils soulignent l'intérêt des modulateurs d'expression de gènes dans l'étude du cerveau adulte et en particulier des mécanismes neurobiologiques sous-tendant les processus mnésiques.

Toutefois, ces travaux sont davantage descriptifs qu'explicatifs. Plus précisément, s'ils démontrent qu'une variation du niveau d'expression de la voie de signalisation des rétinoïdes s'accompagne d'une modification de l'expression de certaines formes de mémoire, l'explication des liens entre ce signal nucléaire et les processus mnésiques, qui suppose d'intégrer l'ensemble des niveaux d'organisation neurobiologique, ne peut être formulée que sous forme d'hypothèses.

II_ LES HYPOTHESES RELATIVES AUX RELATIONS FONCTIONNELLES ENTRE LA VOIE DE SIGNALISATION DES RETINOÏDES ET LA FONCTION MNESIQUE

Etant donné la large palette de gènes impliqués et contrôlés par les rétinoïdes, plusieurs scénarios explicatifs peuvent être invoqués. Nous reviendrons dans un premier temps sur les hypothèses qui nous ont conduit à rechercher les relations potentielles entre le signal des rétinoïdes et une forme d'expression de la mémoire. Dans un deuxième temps, nous tenterons d'élargir notre raisonnement en considérant que les différents niveaux d'organisation biologique peuvent interagir, voire se déterminer mutuellement. Nous verrons cela dans le cadre du vieillissement cognitif, les connaissances scientifiques concernant le modèle adulte de carence en vitamine A étant à ce jour pratiquement inexistantes.

A_ De la nature du déficit mnésique aux mécanismes cellulaires sous-jacents

Dans nos deux études, l'effet bénéfique de l'administration d'AR à des animaux âgés aussi bien que le déficit engendré chez l'adulte par une carence en vitamine A ne concernent que la situation de discrimination simultanée par paire et non celle de discrimination successive. Selon les théories développées par l'équipe d'Eichenbaum (voir l'introduction) sur la base desquelles a été développé ce modèle comportemental, la capacité à discriminer deux items reposerait sur la construction de représentations relationnelles qui permettent à l'animal d'opposer et de comparer les conséquences de chacun des deux choix possibles. Toujours selon cette même théorie, et comme le confirme notre étude lésionnelle, les processus de représentation relationnelle supposés être critiques à certains aspects de la performance mesurée dans cette épreuve dépendraient de l'intégrité de l'hippocampe. Plus précisément, comme nous l'avons exposé en introduction, Wallenstein et collaborateurs (1998) font l'hypothèse que l'élaboration et la conservation de représentations relationnelles reposerait sur les propriétés de plasticité synaptique des neurones de l'hippocampe. Les mécanismes moléculaires mis en jeu seraient les mêmes que ceux qui sous-tendent le phénomène de PLT. Si notre interprétation du déficit ou de l'amélioration mnésique observée dans nos deux études est correcte, et si nous acceptons le postulat de Wallenstein et collaborateurs concernant les mécanismes sous-jacents, les effets comportementaux de la manipulation de la voie des rétinoïdes résulteraient d'un rétablissement des propriétés normales de plasticité synaptique des neurones hippocampiques. Ce modèle explicatif est conforme à nos hypothèses de départ et a été repris dans nos discussions restreintes

à chacune des deux études. En résumé, la voie de signalisation des rétinoïdes contrôlerait l'expression de nombreux gènes codant pour des protéines neuronales impliquées dans les cascades moléculaires participant aux processus de plasticité analogues à ceux mobilisés dans le phénomène de PLT. De nombreuses protéines dont l'expression est régulée par les rétinoïdes et qui sont par ailleurs impliquées dans ces mécanismes cellulaires ont été évoquées: la neurogranine (que nous avons utilisé comme indicateur fonctionnel, voir aussi, Fedorov *et al.*, 1995 ; Gerendasy et Sutcliffe, 1997), les récepteurs NMDA (Younkin *et al.*, 1993), la synaptophysine (Gaetano *et al.*, 1992). Une teneur synaptique suffisante en ces protéines serait un pré-requis au développement d'un phénomène de plasticité synaptique comme la PLT. A charge de ce modèle, certains arguments provenant de nos travaux peuvent être mentionnés. Tout d'abord, dans notre expérience portant sur le vieillissement, nous montrons que le déficit de PLT observé chez nos souris âgées est partiellement supprimé par une administration d'AR qui normalise le signal nucléaire rétinoïde. Ce résultat montre sur un modèle artificiel de plasticité synaptique, que l'administration d'AR améliore les propriétés fonctionnelles des synapses hippocampiques, propriétés requises pour l'induction et le maintien d'une PLT. Une seconde donnée importante issue de nos travaux est l'existence, dans le modèle de carence en vitamine A chez l'adulte, d'un lien entre le niveau d'expression de la RC3 et les performances comportementales dans la tâche de discriminations simultanées par paires. Cette observation suggère que, davantage que les récepteurs de l'AR ce sont les gènes cibles des rétinoïdes, en particulier ceux codant pour des protéines nécessaires à la PLT, qui sont impliqués dans les effets observés.

Comme nous venons de le voir, nos données expérimentales sont cohérentes avec les hypothèses formulées pour débiter notre travail expérimental. Notre modèle d'analyse des relations entre le niveau d'expression de la voie de signalisation nucléaire des rétinoïdes et certaines fonctions cognitives peut être par conséquent conservé. Il nous apparaît cependant nécessaire de préciser à nouveau les limites des hypothèses majeures qui constituent ce modèle. En premier lieu, les liens observés ici entre des modifications de la voie de signalisation des rétinoïdes et des performances mnésiques, sont expliqués par la diminution de protéines neuronales (e.g., RC3) qui sont potentiellement impliquées dans les processus de plasticité synaptique, eux-mêmes supposés nécessaires à la formation et à la conservation des représentations relationnelles. La fragilité de cette hypothèse est évidente. Elle s'appuie en effet sur l'idée non démontrée selon laquelle les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la PLT sont les mêmes que ceux qui participent à l'élaboration des représentations internes qui sous-tendent la mémoire (relationnelle).

Par ailleurs, ce modèle explicatif suppose des liens de causalité relativement univoques et linéaires entre les différents niveaux d'organisation neurobiologique : le niveau moléculaire détermine l'organisation cellulaire qui à son tour spécifie une configuration cérébrale permettant

la réalisation d'opérations mnésiques particulières. Certaines études suggèrent pourtant que ce déterminisme peut également s'exercer en sens contraire. Nous verrons que la description des multiples interactions bidirectionnelles entre les différents niveaux d'organisation biologique permet davantage de rendre compte du fonctionnement du cerveau en interaction avec l'environnement. C'est pourquoi nous tenterons à présent d'intégrer nos premières hypothèses dans un modèle explicatif plus complet, c'est-à-dire considérant le fonctionnement cérébral à la fois dans ses aspects dynamiques et dans sa relative globalité.

Etant donné que nous avons utilisé le vieillissement cérébral comme modèle de dysfonctionnement de la voie des rétinoides, une façon de modifier dans ce sens nos hypothèses relatives aux interactions rétinoides / fonction cognitive est de les confronter aux hypothèses cellulaires plus générales du vieillissement cognitif. Nous allons voir dans ce qui suit que cette démarche, appliquée en particulier à l'hypothèse d'une dérégulation de l'homéostasie calcique présente un double intérêt. Elle nous permettra de nous affranchir de l'hypothèse PLT-mémoire dont nous avons à maintes reprises souligné les limites et d'intégrer la potentielle bidirectionalité des relations existant entre les différents niveaux d'organisation du fonctionnement cérébral.

B_ L'Homéostasie calcique dans le cerveau âgé

La littérature nous offre un profil de détériorations cellulaires liées au vieillissement assez vaste. C'est dans ce large profil d'altérations neurobiologiques que nous allons tenter de replacer le dysfonctionnement de la voie de signalisation des rétinoides. Ces altérations cellulaires se concrétisent dans la cellule par un déséquilibre structural et fonctionnel, et se regroupent sous le terme générique de l'hypothèse calcique du vieillissement (Verkhatsky et Toescu, 1998). Cette hypothèse calcique concerne tous les niveaux de fonctionnement de la cellule et les altérations décrites aux niveaux membranaire, intracellulaire et nucléaire sont liées entre elles, voire se déterminent mutuellement.

Données électrophysiologiques : modifications de l'activité cellulaire et des propriétés plastiques des neurones

De nombreux auteurs s'accordent aujourd'hui pour dire que vieillissement s'accompagne d'une modification de l'activité électrique des neurones hippocampiques et de la plasticité calcium-dépendante de leurs synapses (Shankar *et al.*, 1998 ; Norris *et al.*, 1996). Plus précisément, les études électrophysiologiques menées sur les modèles hippocampiques de dépression et de potentialisation à long terme montrent au cours du vieillissement, une augmentation du seuil d'induction de la PLT, et une diminution du seuil d'induction de la DLT (Norris *et al.*, 1996 ; Foster *et al.*, 1999). De même, des travaux ont été menés sur l'augmentation d'amplitude et de fréquence des potentiels de champ (EPSP) apparaissant pendant ou après une stimulation

répétée, phénomène considéré comme le substrat potentiel de la plasticité comportementale ou fonctionnelle (Massicotte et Baudry, 1991 ; Muller *et al.*, 1991). Il a été ainsi noté une diminution dans la possibilité de faciliter la fréquence de décharge des neurones hippocampiques chez des rats âgés (Landfield et Lynch, 1977). Ces modifications de l'activité électrique et des propriétés de plasticité synaptique des cellules au cours du vieillissement ont été examinées plus en détail.

Une étude publiée par Sankar et ses collaborateurs en 1998 dissocie dans le phénomène de PLT des neurones du champ CA1 de l'hippocampe, deux composantes différenciellement atteintes par le vieillissement: la PLT NMDA dépendante serait altérée (diminuée en amplitude) alors que celle dépendante des canaux calciques voltage dépendant (ou VDCC) serait facilitée. Ces résultats sont cohérents avec des données de la littérature montrant sur les cellules CA1 de rats âgés, un allongement de la durée des potentiels d'action liés au calcium qui peut être réduit en bloquant les canaux calciques de type L par la nimodipine (Moyer et Disterhoft, 1994). Ce phénomène serait à l'origine d'une augmentation de la durée de l'hyperpolarisation post-décharge (after hyperpolarization ou AHP) diminuée de façon similaire par la nimodipine (Moyer *et al.*, 1992). Ces modifications liées à l'âge pourrait rendre compte de la diminution de la fréquence de décharge neuronale au cours du vieillissement.

Ces altérations de l'activité électrique seraient étroitement liées à des changements physico-chimiques des composants membranaires. Des données biochimiques indiquent une augmentation de la densité des VDCC de type L et des courants calciques associés (Foster et Norris, 1997 ; Thibault et Landfield, 1996) ainsi qu'une diminution de la quantité des récepteurs NMDA et de leur activité (Magnusson et Cotman, 1993 ; Foster, 1999). Ce déséquilibre se traduirait par une augmentation d'influx calcique par les VDCC et une diminution de cet influx par les canaux associés aux RNMDA. Ceci contribuerait à augmenter et à modifier le seuil d'induction d'une plasticité calcium-dépendante, en faveur d'une DLT (Foster, 1999). Pour preuve, un antagoniste des canaux calciques de type L administré à des animaux âgés, bloque l'induction d'une DLT et diminue le seuil d'induction d'une PLT (Norris *et al.*, 1998). Ces résultats suggèrent que ces canaux calciques de type L régulent "l'orientation" de la plasticité synaptique. Ces modifications des VDCC et de leur activité seraient impliquées dans les déficits d'apprentissage liés à l'âge. De nombreuses études montrent que l'administration de nimodipine ou d'autres antagonistes des VDCC de type L supprime des déficits mnésique chez l'animal âgé (Batuecas *et al.*, 1998 ; Kowalska et Disterhoft, 1994) et facilite l'acquisition et la rétention de certains types d'apprentissage chez l'animal jeune adulte (Kane and Robinson, 1999).

En résumé, au niveau des cellules hippocampiques, le vieillissement s'accompagne d'un allongement de la durée des potentiels d'action et surtout des phénomènes d'AHP, d'une diminution de la fréquence de décharge, d'une augmentation du seuil d'induction de la PLT, d'une réduction du nombre de RNMDA associé à une augmentation de la densité et des courants

des VDCC aboutissant finalement à un déséquilibre des différents influx calciques. Ces altérations peuvent être perçues tout aussi bien comme étant à l'origine ou comme résultant d'autres anomalies concernant d'une part les mécanismes intracellulaires de gestion du calcium et d'autre part les phénomènes de dégénérescence neuronale.

Altérations des mécanismes intracellulaires de régulation du calcium intracellulaire et des voies de signalisation calcium-dépendantes impliquées dans la plasticité synaptique.

Dans le compartiment intracellulaire, on observe au cours du vieillissement, une altération dans les mécanismes d'extrusion, de tampon et de capture du calcium, de même qu'une diminution de la capacité de « vidange » du calcium suite à une activité de la cellule (Verkhatsky et Toescu, 1998). De façon concomitante, les cascades intracellulaires, régulant la concentration en calcium intracellulaire et initiant les événements participant au renforcement de l'efficacité synaptique, sont fortement perturbées. Ces cascades impliquent des enzymes cytoplasmiques, les kinases et les phosphatases. L'intégration normale des signaux afférents à la synapse dépend d'un équilibre subtil entre l'activité phosphorylante des kinases et celle déphosphorylante des phosphatases (Foster, 1999 ; Norris *et al.*, 1998 ; Wyllie et Nicoll, 1995). Cet équilibre s'exerce selon un gradient de concentration en calcium intracellulaire et en retour ces activités kinase et phosphatase régulent la teneur en calcium intracellulaire et sont indispensables pour renforcer l'efficacité synaptique. Pour exemple, une augmentation modeste de calcium intracellulaire interagirait avec la calmoduline pour activer la calcineurine (CaN) phosphatase régulant l'activité de la protéine phosphatase 1 (PP1), abondante dans la synapse et pouvant inhiber l'activité d'enzymes comme la calmoduline kinase II impliquée dans l'accroissement d'efficacité synaptique (Foster, 1999). Lorsque la concentration de calcium intracellulaire atteint des taux très importants, des kinases dépendante du calcium s'activent pour renforcer l'efficacité des synapses, notamment en phosphorylant les récepteurs au glutamate qui augmentent leur propre affinité et conductance (Foster, 1999). Rappelons que l'activité de ces différentes enzymes est dépendante du taux de calcium intracellulaire, mais participe à son tour à la régulation du calcium intracellulaire et finalement est déterminante pour l'activité électrique de la cellule et par conséquent pour sa capacité à répondre de façon efficace aux signaux afférents.

De nombreuses études suggèrent que la diminution liée à l'âge de l'efficacité synaptique résulte d'un déplacement de l'équilibre kinase/phosphatase vers une activité dominante des phosphatases. Pour appuyer cette hypothèse, une étude montre *in vitro* que l'application d'un inhibiteur de phosphatase induit une augmentation durable de la réponse synaptique des cellules CA1 de l'hippocampe uniquement de rats âgés (Norris *et al.*, 1998). Cette même étude indique qu'à l'inverse l'application d'un inhibiteur de kinase entraîne une diminution des réponses synaptiques, mais cette fois ci seulement chez les rats jeunes. Enfin, une des dernières études de

l'équipe de Foster (2001) fait état, chez l'animal âgé, d'une augmentation de l'activité et de l'expression de la CaN corrélée au degré d'atteinte mnésique et d'une diminution de l'état de phosphorylation des substrats de la CaN.

Ce modèle de déséquilibre peut être relié à bon nombre de modifications physiologiques observées au cours du vieillissement et décrits précédemment. Pour exemple, Lanahan et collaborateurs (1997) montrent une augmentation liée à l'âge de l'expression du gène précoce *c-fos* (dont l'expression est rapidement induite après formation d'une PLT) en réponse à une stimulation téтанisante qui, pourtant, induit une PLT réduite chez les animaux âgés. Ainsi du fait d'une dérégulation des voies de signalisations calcium-dépendantes « en amont », cette expression génique normalement induite dans des conditions précises de stimulation pourrait, chez les sujets âgés, être déclenchée par des conditions variables de signaux afférents, sans relation avec les modifications effectives de l'efficacité synaptique.

En conclusion, les modifications électriques de la cellule se traduisant notamment par une suractivation des courants calciques liés aux VDCC induisent un influx anormal de calcium dans la cellule qui pourrait être à l'origine des déséquilibres kinase/phosphatase. En retour une suractivité dephosphorylante des phosphatases au détriment de l'activité des kinases empêche la phosphorylation des composants membranaires comme les RNMDA et des protéines intracellulaires impliquées dans la gestion de la concentration calcique intracellulaire et de ce fait peut être considérée également comme pouvant être à l'origine des « réponses électriques erronées » de la cellule. Par ailleurs, l'activité accrue des VDCC et l'augmentation du calcium intracellulaire qui en résulte découlerait d'une augmentation de l'activité des phosphatases et d'une diminution de l'activités des kinases (Fleming et Mogul, 1997 ; Foster, 1999 ; Shinohara et Kawasaki, 1997). Cet aller-retour ou boucle causale entre les mécanismes intracellulaires et la réponse cellulaire, en particulier celle à l'origine des phénomènes de plasticité synaptique, peut être transposée à l'analyse d'une part des phénomènes de dégénérescence neuronale et d'autre part des dysfonctionnements de la voie de signalisation nucléaire des rétinoides.

Neurodégénérescence et neurotoxicité liées au calcium

Des travaux font état d'une vulnérabilité accrue des neurones âgés à la neurotoxicité et à la neurodégénérescence liées au calcium (Landfield *et al.*, 1992 ; Mattson *et al.*, 1992). Les problèmes de dégénérescence neuronale peuvent être effectivement liés à une accumulation excessive de calcium intracellulaire. Mais en retour, la mort neuronale peut être également à la source des dysfonctionnements des synapses restantes et peut conduire à l'intoxication au calcium des cellules survivantes.

L'excès calcique à l'état basal rend la cellule plus vulnérable à sa propre activité électrique, des événements locaux excitateurs aggravant la teneur en calcium intracellulaire deviendraient

neurotoxiques pour la cellule et se traduirait par la perte des synapses les plus actives (Verkhratsky et Toescu, 1998). De même une suractivité des phosphatases comme la CaN peut engendrer l'apoptose neuronale en déphosphorylant des protéines cytosoliques (comme le CREB) fondamentales pour la survie cellulaire (Walton *et al.*, 1999 ; Foster, 1999). Ce dysfonctionnement de l'homéostasie calcique de la cellule participerait de façon dramatique à la mort neuronale, si bien que plus la cellule est active et communique avec d'autres cellules, plus elle court vers sa propre mort. Mais en retour, la dégénérescence neuronale peut être à la source de la dérégulation de l'équilibre calcique de la cellule. De nombreuses études s'accordent aujourd'hui sur l'existence au cours du vieillissement d'une perte et/ou une atrophie des neurones cholinergiques dont la gravité corrèle assez fortement avec le degré d'atteinte mnésique. Des études lésionnelles visant à préciser l'influence de ces pertes neuronales sur les structures cibles ont montré chez l'animal jeune adulte qu'une lésion sélective des neurones cholinergiques septo-hippocampiques (grâce à l'immunotoxine 192 Ig-Gsaporin) va induire une modification de la fonctionnalité des neurones cibles du champ CA1 de l'hippocampe. Ces altérations se traduisent notamment par une augmentation de l'amplitude et de la durée de l'AHP (Jouveneau *et al.*, 1994 ; Gallagher et Colombo, 1995). Des études récentes ont montré *in vitro* que l'application de metrifonate (inhibiteur de cholinestérase) sur des cellules CA1 de l'hippocampe d'animaux âgés entraîne une diminution de l'amplitude et de la durée des AHP (Oh *et al.*, 1999; Power *et al.*, 2001). Ainsi de façon indirecte, la dégénérescence neuronale observée chez l'animal âgé modifierait l'activité électrique des cellules cibles qui engendrerait à son tour une modification de leurs flux calciques intracellulaires. Si l'état cellulaire dans l'organisme vieillissant (surcharge calcique) peut conduire à la mort cellulaire, la dégénérescence neuronale peut être à son tour responsable des anomalies dans l'activité électrique et l'homéostasie des cellules restantes.

La première partie de ce modèle d'analyse des dysfonctionnements neurobiologiques liées à la sénescence a permis de montrer comment des dérégulations dans le compartiment intracellulaire pouvait rendre compte des dysfonctionnements électriques de la cellule qui en retour pouvait être à l'origine des mêmes altérations des mécanismes intracellulaires. De même, les hypothèses relatives aux dysfonctionnements neurobiologiques liés au vieillissement se centrent aujourd'hui vers l'idée soit d'une perte des composants neuronaux et plus particulièrement au sein de la formation hippocampique, soit de l'existence d'erreurs biochimiques et physiologiques au sein même des cellules. Ces deux conceptions comme nous l'avons vu auparavant ne sont pas exclusives : les modifications physiologiques peuvent précéder l'élimination des contacts synaptiques ou la dégénérescence neuronale et la mort neuronale peut

avoir des incidences sur la physiologie des cellules et plus généralement sur l'organisation des structures cérébrales.

La dernière partie de ce modèle d'analyse se centre autour du niveau d'organisation nucléaire. Le vieillissement cognitif peut être caractérisé également par une altération des voies de signalisation nucléaire. Notre travail en est un exemple. Nous nous appuyons donc sur notre connaissance de la voie de signalisation des rétinoïdes pour montrer comment des modifications dans la régulation génique peut avoir des incidences sur les niveaux d'organisation supérieure mais également, nous verrons comment les réorganisations, les altérations dans le fonctionnement des niveaux d'organisation biologiques plus intégrés peuvent expliquer les modifications observées au niveau nucléaire au cours du vieillissement.

Altération des voies de signalisation nucléaire

De part, la large palette de gènes régulés par les rétinoïdes, les dysfonctionnements de cette voie de signalisation observés au cours du vieillissement peuvent être intégrés au sein de l'hypothèse plus globale de l'homéostasie calcique.

L'hypoexpression du signal rétinoïde participerait directement aux modifications de teneur en protéines cellulaires fondamentales pour l'activité électrique de la cellule et les processus de plasticité synaptique (et plus particulièrement les RNMDA, la RC3, la calmoduline kinase II) (Magnusson et Cotman, 1993 ; Enderlin *et al.*, 1997 ; Mons *et al.*, 2001), pour la synthèse et la libération de neurotransmetteurs (notamment dans le système cholinergique, avec la synaptophysine et l'acétylcholine transferase) pour la gestion du calcium intracellulaire (pour exemple, la calbindin) et finalement pour la survie neuronale (NGF). De part son action pleiotropique, cette voie de modulation génique régulerait de nombreux mécanismes cellulaires indispensables au fonctionnement normal de la cellule et par ailleurs altérés au cours du vieillissement. L'hypoexpression de ce signal peut donc être considérée comme étant à l'origine des dysfonctionnements multiples constitutifs de la modification de l'homéostasie calcique de la cellule. Encore à ce niveau d'analyse, la littérature nous montre que si l'hypofonctionnement de la voie de signalisation des rétinoïdes peut être à l'origine de l'organisation fonctionnelle des niveaux supérieurs, il peut aussi en résulter. Un certain nombre de données tendent en effet à montrer sur différents modèles cellulaires que les mécanismes intracellulaires impliquant les kinases et les phosphatases contrôleraient la fonctionnalité de différentes voies de signalisation nucléaire.

Ainsi, la diminution apparente de l'affinité des récepteurs TR au cours du vieillissement résulterait d'un changement du cycle phosphorylation- déphosphorylation. En effet, le récepteur TR est un substrat de la PKC, puisque son état de phosphorylation est accentué après activation de la PKC (Golberg et al, 1988) et son activité ligand-dépendante est dramatiquement réduite

lorsqu'une phosphatase est ajoutée au milieu d'incubation (Faure et Dusault, 1988). Par conséquent, la diminution de l'affinité des TR s'accorde parfaitement avec les données de Rogue et de ses collaborateurs (1993) montrant une diminution de l'activité de la PKC au cours du vieillissement. De même, le récepteur à la vitamine D peut être phosphorylé par la PKC β (dépendante du calcium) sur son domaine de liaison à l'ADN, ce qui entraînerait une modification de ses propriétés de transactivation (Hsieh *et al.*, 1991 ; 1993). L'activité transcriptionnelle d'autres membres de cette superfamille (PPAR, GR, ER) peut être également contrôlée par l'activation de différentes voies MAP kinases. Finalement, une première étude réalisée par Lefebvre et ses collaborateurs (1995) montre que les propriétés d'hétérodimérisation des RAR α_1 sont altérées par les phosphatases PP1 et PP2. Plusieurs sites de phosphorylation de la PKC ont été par ailleurs identifiés sur le Tbox sollicité pour la dimérisation de ces récepteurs (Delmotte *et al.*, 1999). Ces données indiquent que la fonctionnalité de la voie de signalisation des rétinoïdes peut être déterminée par des signaux intracellulaires impliquant les kinases et les phosphatases dont l'équilibre dépend de la teneur en calcium intracellulaire. Il apparaît facile de concevoir ici que la dérégulation de la voie de signalisation des rétinoïdes observée au cours du vieillissement, puisse tout autant être la cause que l'effet du déséquilibre de l'homéostasie calcique.

Alors que nos hypothèses initiales tendaient à considérer le signal nucléaire comme déterminant de façon univoque les niveaux d'organisation supérieurs, ces nouvelles considérations sur le vieillissement cérébral replace tout d'abord les dysfonctionnements de la voie de signalisation des rétinoïdes au sein d'un profil de détériorations neurobiologiques plus global. L'hypothèse de l'homéostasie calcique présente l'avantage de présenter le vieillissement cérébral dans son unité sans parcelliser les différents niveaux d'organisation. En résumé, elle révèle des liens de causalité bi-directionnels (boucle causale) entre la dégénérescence neuronale, les dysfonctionnements électrique de la cellule, les modifications d'activité des voies de signalisation intracellulaires régulant le calcium et les altérations de la voie nucléaire de modulation génique contrôlée par les rétinoïdes. Elle montre d'une part que les altérations liées au vieillissement s'expriment à tous les niveaux d'organisation biologique (moléculaire, cellulaire, synaptique et finalement systémique) et d'autre part que ces différentes modifications se déterminent mutuellement. En d'autres termes, quelque soit le niveau d'organisation biologique considéré, les altérations qui y sont observées peuvent résulter et/ou induire des changements neurobiologiques objectivés au sein des autres niveaux d'organisation supérieurs et inférieurs. Plus précisément, les modifications liées à l'âge spécifiées à un niveau d'analyse donné peuvent être tout autant la résultante que la cause d'autres altérations précisées à un niveau d'organisation en amont et/ou en aval. Ces considérations théoriques et expérimentales soulèvent l'extrême

complexité du cerveau âgé. Plus généralement, ce modèle rend compte des difficultés inhérentes à l'étude de la fonction mnésique et illustre parfaitement la nécessité d'explorer l'ensemble des niveaux d'organisation biologique (de la compréhension des composantes psychologiques jusqu'à la dissection des mécanismes cellulaires et moléculaires) pour procéder un jour à une analyse intégrée des phénomènes de la cognition.

III_ LE VIEILLISSEMENT : ORIGINE DU DEFICIT

Le vieillissement altère le fonctionnement du cerveau, le modifie à tous les niveaux d'organisation, du psychologique au moléculaire. Tenter de donner une réponse à celui qui s'interroge sur l'origine de ces altérations apparaît chose difficile. Peut-on croire à l'existence d'un seul facteur limitant responsable d'une cascade d'événements menant à l'ensemble des altérations neurobiologiques caractérisant le vieillissement cérébral et sous-tendant le déclin des fonctions cognitives? Existe t il un ou plusieurs facteurs neurobiologiques et/ou environnementaux à l'origine du vieillissement cognitif? L'hypothèse du déséquilibre de l'homéostasie calcique exposée précédemment montre d'une part que les altérations liées au vieillissement s'expriment à tous les niveaux d'organisation biologique (moléculaire, cellulaire, synaptique et finalement systémique) et d'autre part que ces différentes modifications se déterminent mutuellement. Au vu de ces hypothèses, les problèmes posés par ces questions sont à ce jour insolubles. Si la question relative à ou aux origines du vieillissement cognitif reste sans réponse, nous pouvons éventuellement lui substituer des interrogations plus spécifiques de nos résultats: qu'en est-il de la portée de nos résultats ? dans quelle mesure nos données nous permettent elles d'attribuer un sens causal à la relation entre l'hypoexpression de la voie de signalisation des rétinoides, observée au cours du vieillissement et les troubles mnésiques associés ? Si cette relation de causalité existe, nous devons pouvoir trouver dans nos résultats des arguments montrant que l'administration d'AR à nos animaux âgés ait normalisé sélectivement certains aspects de la fonction cognitive et des mécanismes cellulaires associés, leur faisant défaut. Dans le cas contraire, cet hypofonctionnement ne serait nullement impliqué dans le vieillissement cognitif et l'activation de cette voie ne ferait qu'entraîner des phénomènes de compensation qui viendraient masquer les altérations neurobiologiques primaires et de façon ultime les déficits mnésiques associés.

Les données issues de nos travaux montrent que l'administration chronique d'AR à des animaux âgés restaure à un niveau normal l'expression des récepteurs de l'AR et la fonctionnalité de ces récepteurs puisque le niveau d'expression de certains gènes cibles (tTG et RC3) est également normalisée. Si cet effet observé sur l'expression de ces gènes cibles se traduit

également par une augmentation de la teneur en protéines pour lesquelles ils codent, alors la normalisation de la voie de signalisation des rétinoides conduirait à une augmentation de la quantité de certaines protéines dont la RC3, impliquées dans le signal calcique. Cette restauration à un niveau normal de la fonction rétinoides s'accompagne d'une amélioration sélective des performances dans l'étape de l'épreuve portant sur les discriminations simultanées, performances par ailleurs sélectivement altérées chez nos animaux âgés. Finalement, comme le témoigne notre travail portant sur un modèle de déficit de PLT lié à l'âge, ce même traitement rétablit partiellement certaines propriétés de plasticité des synapses hippocampiques. Ces données nous encouragent à penser que le dysfonctionnement de la voie de signalisation des rétinoides joue un rôle critique dans le vieillissement cognitif et que la restauration de cette voie permettrait de (re)normaliser (ou tendre vers une renormalisation) du fonctionnement du cerveau âgé.

Néanmoins, la littérature fait état de l'existence de nombreux agents promnésiants qui améliorent de façon significative les altérations mnésiques liées à l'âge. En prenant en compte les critères d'identification d'un système de mémoire énoncés par Schacter et Tulving (1994), montrer en quoi une substance améliore de façon sélective les déficits mnésiques liés à l'âge constitue un premier argument en faveur du fait que le dysfonctionnement du système neurobiologique ciblé par cet agent contribue significativement à l'apparition du déclin cognitif associé au vieillissement. La question qui nous intéresse alors devient : en quoi la voie de signalisation des rétinoides présente-elle ces propriétés ? Une façon de répondre à cette question est de comparer les effets de l'AR avec ceux induits par d'autres substances.

Nous avons déjà évoqué les nombreuses données de la littérature qui supportent « l'hypothèse cholinergique » du vieillissement cognitif. Le vieillissement s'accompagne d'une perte partielle des neurones cholinergiques et une modification morphologique et physiologique de ceux qui survivent (Gallagher et Colombo, 1995). Par ailleurs cette perte neuronale est corrélée avec le degré d'atteinte mnésique. Des agents pharmacologiques ciblant le système cholinergique ont été donc développés pour pallier ces altérations. Les effets de la tacrine, inhibiteur de la cholinestérase (dégradant l'acétylcholine dans la fente synaptique) ont été largement étudiés sur plusieurs modèles d'altérations neurobiologiques et cognitives liées au vieillissement. Une expérience que nous avons menée au laboratoire (Marighetto *et al.*, 2000 ; voir annexe) montre que cet agent améliore significativement les performances des animaux âgés dans la phase de discriminations simultanées de notre épreuve. Les données ainsi considérées suggèrent que la facilitation de la transmission cholinergique semble être un bon moyen pour améliorer la fonction mnésique au cours du vieillissement. Néanmoins, l'examen plus approfondi des paramètres comportementaux mesurés montre que la sélectivité des effets comportementaux de l'administration de tacrine peut être remise en cause, à l'inverse de celle relatives aux effets du traitement à l'AR. Cette étude, rapportée en annexe de ce manuscrit, montrait que si les animaux

âgés recevant une injection quotidienne de tacrine présentaient une amélioration des performances dans la phase test de la mémoire relationnelle (discriminations simultanées), ils étaient aussi améliorés dans la phase initiale d'apprentissage go/nogo. Plus précisément, ils apprenaient plus vite que les sujets témoins (nombre de séances nécessaires à l'atteinte du critère) et « exprimaient » plus nettement que ces derniers leurs capacités à discriminer les bras positifs des bras négatifs (rapport de discrimination bras-/bras+ plus élevé). L'injection de tacrine facilite donc un apprentissage insensible au vieillissement. Aucune de ces modifications comportementales induites par l'administration de tacrine n'est observée chez nos animaux âgés traités avec l'AR.

A l'inverse, dans la phase test de l'épreuve, le déficit normalement observé chez l'animal âgé n'est que partiellement supprimé par la tacrine. Les données montrent que si globalement les performances sont améliorées par ce traitement (pourcentage de réponses correctes moyennées sur les deux séances), la tacrine s'avère inefficace au début du test (les trois premières visites de la première séance, c'est à dire lorsque l'animal se trouve confronté pour la première fois aux informations présentées simultanément par paire). Les mêmes analyses portant sur nos travaux montrent que l'administration d'AR à des souris âgées a des effets bénéfiques tout autant sur les performances globales que sur celles restreintes aux trois premiers essais de la première séance. Ces effets contrastés de la tacrine entre le début et l'ensemble du test, ainsi que les effets bénéfiques dans la phase d'acquisition suggèrent que cette substance est susceptible d'accélérer l'acquisition ou la ré-acquisition d'informations. Ils ne permettent donc pas de conclure quant à aux effets de la tacrine sur les opérations spécifiques de la mémoire relationnelle/déclarative (flexibilité d'utilisation des acquis).

Finalement, alors que l'AR restaure de façon sélective les performances (globales ou uniquement sur les trois premiers essais) dans la phase de discriminations simultanées sans modifier les indices de performance de la première phase go/nogo, la tacrine modifie les performances dans les deux étapes de l'épreuve et n'a pas d'effet significatif sur l'indice comportemental reflétant les propriétés de flexibilité de la mémoire relationnelle. Les effets « globaux » de la tacrine sont en accord avec les hypothèses suggérant que la fonction cholinergique joue un rôle général dans les processus d'attention et de traitement de l'information sensorielle (Bokland, 1996 ; Sarter et Bruno, 1997). Cette interprétation apparaît d'autant plus vraisemblable que les latences d'entrée dans les bras sont aussi globalement très considérablement augmentées chez les animaux âgés traités à la tacrine. Cette drogue retarderait l'initiation de la réponse en modifiant la capacité attentionnelle et/ou les processus d'inhibition comportementale.

Finalement, cette analyse suggère que notre épreuve comportementale permet une dissociation qualitative des effets induits par chacune de ces drogues. Nous pouvons

raisonnablement penser que les effets de la tacrine relèvent d'une amélioration de processus « aspécifiques » (comme l'attention) qui viennent compenser et/ou masquer les déficits mnésiques liés à l'âge. En revanche, parce que limité à la restauration des capacités sélectivement altérées, l'effet de l'AR traduirait une modification du fonctionnement du cerveau âgé le rapprochant du fonctionnement normal (c'est à dire du sujet adulte). Pour revenir à notre question initiale, l'hyposignalisation des rétinoïdes aurait un rôle causal dans le déclin cognitif associé au vieillissement, puisque nos analyses suggèrent que la normalisation de cette voie de signalisation tend à normaliser le fonctionnement cognitif. A l'inverse, l'hypofonctionnement cholinergique n'aurait pas de réelle contribution causale mais davantage modulerait les déficits mnésiques des sujets âgés. Ceci est cohérent avec des études montrant que des animaux jeunes adultes porteurs de lésion sélective des neurones cholinergiques ne présentent pas de déficits mnésiques, habituellement observés chez les animaux âgés (Colombo et Gallagher, 1995).

Si ces données ne constituent pas une démonstration définitive, elles nous encouragent à poursuivre l'examen expérimental de ces hypothèses. L'hyposignalisation de la voie des rétinoïdes s'insère sans difficulté dans l'hypothèse générale du déséquilibre de l'homéostasie calcique du vieillissement. Par ailleurs, ces récepteurs nucléaires à l'AR agissent en synergie avec certaines hormones comme les hormones thyroïdiennes et les glucocorticoïdes mis en cause dans le vieillissement cognitif. Au vu du large profil de gènes régulés par les rétinoïdes incluant des gènes codant pour des protéines impliquées dans la régulation du calcium intracellulaire et/ou plus généralement dans la transmission de signaux intercellulaires, ce signal nucléaire semblerait être une cible thérapeutique intéressante qui permettrait une amélioration générale de l'équilibre cellulaire.

L'ensemble de ces arguments s'ajoutent à nos observations pour faire de la voie de signalisation des rétinoïdes un élément particulièrement critique dans l'étiologie des troubles mnésiques associés à l'âge.

GLOSSAIRE

GLOSSAIRE

18-OH-RA : 18-hydroxy-retinoic acid
4-OH-RA : 4-hydroxy-retinoic acid
9-*cis* RA : acide 9-*cis* rétinoïque
ADH : alcool deshydrogénase
AHP : after hyperpolarization (hyperpolarisation post-décharge)
ALDH : aldehyde deshydrogénase
apo-RBP : RBP libre, sans rétinol
AR 9-*cis* : acide 9-*cis* rétinoïque
AR tout-*trans* : acide tout-*trans* rétinoïque
ARAT : acyl-coA retinol acyltransferase
ARP-1 : apoAI regulatory protein-1
CA1 : champ ammoniacal 1
CaN : calcineurine
COUP (ou EAR-3) : récepteur apparenté à v-erbA
CRABP : cellular retinoic acid binding protein
CRBP : cellular retinol binding protein (protéine porteuse cellulaire)
DesH : deshydrogénases
DLT : dépression à long terme
DR : direct repeat (séquences répétées)
ER : récepteurs des œstrogènes
GR : récepteurs des glucocorticoïdes
holo-RAR : RAR porteur du ligand
holo-RBP : RBP porteur de rétinol
HPC : hippocampe
hRAR : human retinoic acid receptor
HRE : hormone response element
LRAT : lecithine retinol acyltransferase
MCT : mémoire à court terme
MLT : mémoire à long terme
NGF : nerve growth factor (facteur de croissance nerveux)
PKC : protéine kinase C

PLT : potentialisation à long terme
PP1 : phosphatase 1
PP2 : phosphatase 2
PPAR : récepteurs des activateurs de prolifération péroxisomale
PRS : système de représentation perceptive
RAR : retinoic acid receptor
RARE : élément de réponse au RAR
RBP : rétinol binding protein (protéine porteuse plasmatique)
RC3 : neurogranine
Récepteurs D1 et D2 : récepteurs dopaminergiques
RNMDA : récepteurs du N-méthyl-D-aspartate
RPH : retinyl palmitate hydrolase
RT-PCR : reverse transcriptase – polymerase chain reaction
RXR : retinoid X receptor
RXRE : élément de réponse au RXR
SNC : système nerveux central
S-R : stimulus – réponse
SS : stimulus – stimulus
T₃ : triiodothyronine
T₄ : thyroxine
TR : récepteur de la triiodothyronine
t-RA : acide tout-*trans* rétinolique
TRH : thyrolibérine
TSH : thyrotropine
TTG : transglutaminase tissulaire
TTR : transthyrétine
VAD : vitamin A deficiency
VDCC : canaux calciques voltage dépendants
VDR : récepteur à la vitamine D₃

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Alfos, S., Boucheron, C., Pallet, V., Higuere, D., Enderlin, V., Beracochea, D., Jaffard, R., & Higuere, P. (2001). A retinoic acid receptor antagonist suppresses brain retinoic acid receptor overexpression and reverses a working memory deficit induced by chronic ethanol consumption in mice. *Alcohol Clin Exp Res.*, *25*(10), 1506-14.

Arendt, T., Bruckner, M. K., Bigl, V., & Marcova, L. (1995). Dendritic reorganization in the basal forebrain under degenerative conditions and its defects in Alzheimer's disease. II. Ageing, Korsakoff's disease, Parkinson's disease, and Alzheimer's disease. *J Comp Neurol*, *351*(2), 189-222.

Artola, A., & Singer, W. (1987). Long-term potentiation and NMDA receptors in rat visual cortex. *Nature*, *330*(6149), 649-52.

Atkinson, R.C., & Shiffrin, R.M. (1968). Human memory : A proposed system and its control processes. In K.W. Spence & J.T. Spence (eds), *The psychology of learning and motivation*. New York : Academic Press, pp. 89-195.

Audouin-Chevallier, I., Higuere, P., Pallet, V., Higuere, D., & Garcin, H. (1993). Dietary vitamin A modulates the properties of retinoic acid and glucocorticoid receptors in rat liver. *J Nutr*, *123*(7), 1195-202.

Baddeley, A. D. (1986). *Working Memory*. Oxford : Oxford University Press.

Bannerman, D.M., Good, M.A., Blatcher, S.P., Ramsay, M., & Morris, R.G. (1995). Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade. *Nature*, *378*, 182-186.

Barnes, C. A. (1995). Involvement of LTP in memory: are we "searching under the street light"? *Neuron*, *15*(4), 751-4.

Barnes, C.A., & McNaughton, B.L. (1985). An age comparison of the rates of acquisition and forgetting of spatial information in relation to long-term enhancement of hippocampal synapses. *Behav. Neurosci.*, *99*(6), 1040-8.

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

Batuecas, A., Pereira, R., Centeno, C., Pulido, J. A., Hernandez, M., Bollati, A., Bogonez, E., & Satrustegui, J. (1998). Effects of chronic nimodipine on working memory of old rats in relation to defects in synaptosomal calcium homeostasis. *Eur J Pharmacol*, *350*(2-3), 141-50.

Beckman, M., & Iverfeldt, K. (1997). Increased gene expression of beta-amyloid precursor protein and its homologues APLP1 and APLP2 in human neuroblastoma cells in response to retinoic acid. *Neurosci Lett*, *221*(2-3), 73-6.

Beczowska, I. W., Buck, J., & Inturrisi, C. E. (1996). Retinoic acid-induced increase in delta-opioid receptor and N-methyl-D-aspartate receptor mRNA levels in neuroblastoma x glioma (NG108-15) cells. Brain Res Bull, *39*(3), 193-9.

Bedo, G., Santisteban, P., & Aranda, A. (1989). Retinoic acid regulates growth hormone gene expression. Nature, *339*(6221), 231-4.

Berger, T. W. (1984). Long-term potentiation of hippocampal synaptic transmission affects rate of behavioral learning. Science, *224*(4649), 627-30.

Berse, B., & Blusztajn, J. K. (1995). Coordinated up-regulation of choline acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter gene expression by the retinoic acid receptor alpha, cAMP, and leukemia inhibitory factor/ciliary neurotrophic factor signaling pathways in a murine septal cell line. J Biol Chem, *270*(38), 22101-4.

Bhaumik, S., Collacott, R. A., Garrick, P., & Mitchell, C. (1991). Effect of thyroid stimulating hormone on adaptive behaviour in Down's syndrome. J Ment Defic Res, *35* (Pt 6), 512-20.

Bliss, T. V., & Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. J Physiol, *232*(2), 331-56.

Blomhoff, R. (1994). Transport and metabolism of vitamin A. Nutr Rev, *52*(2 Pt 2), S13-23.

Borel, P., Mekki, N., Boirie, Y., Partier, A., Alexandre-Gouabau, M. C., Grolier, P., Beaufriere, B., Portugal, H., Lairon, D., & Azais-Braesco, V. (1998). Comparison of the postprandial plasma vitamin A response in young and older adults. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, *53*(2), B133-40.

Boylan, J. F., & Gudas, L. J. (1991). Overexpression of the cellular retinoic acid binding protein-I (CRABP-I) results in a reduction in differentiation-specific gene expression in F9 teratocarcinoma cells. J Cell Biol, *112*(5), 965-79.

Bradley, D. J., Towle, H. C., & Young, W. S., 3rd. (1992). Spatial and temporal expression of alpha- and beta-thyroid hormone receptor mRNAs, including the beta 2-subtype, in the developing mammalian nervous system. J Neurosci, *12*(6), 2288-302.

Brand, N., Petkovich, M., Krust, A., Chambon, P., de The, H., Marchio, A., Tiollais, P., & Dejean, A. (1988). Identification of a second human retinoic acid receptor. Nature, *332*(6167), 850-3.

Brown, M.F. (1992). Does a cognitive map guide choices in the radial-arm maze ? J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process., *18*, 56-66.

Brown, M.F., Rish, P.A., VonCulin, J.E., & Edberg, J.A. (1993). Spatial guidance of choice behavior in the radial-arm maze. J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process., *19*, 195-214.

Buck, J., Myc, A., Garbe, A., & Cathomas, G. (1991). Differences in the action and metabolism between retinol and retinoic acid in B lymphocytes. J Cell Biol, *115*(3), 851-9.

Cain, D. P., Hargreaves, E. L., Boon, F., & Dennison, Z. (1993). An examination of the relations between hippocampal long-term potentiation, kindling, afterdischarge, and place learning in the water maze. Hippocampus, *3*(2), 153-63.

Cain, D.P., Saucier, D., Hall, J., Hargreaves, E.L., & Boon, F. (1996). Detailed behavioral analysis of water maze acquisition under APV or CNOX : contribution of sensorimotor disturbances to drug-induced acquisition deficits. Behav. Neurosci., 110, 86-102.

Calza, L., Aloe, L., & Giardino, L. (1997). Thyroid hormone-induced plasticity in the adult rat brain. Brain Res Bull, 44(4), 549-57.

Calza, L., Giardino, L., Ceccatelli, S., & Hokfelt, T. (1996). Neurotrophins and their receptors in the adult hypo- and hyperthyroid rat after kainic acid injection: an in situ hybridization study. Eur J Neurosci, 8(9), 1873-81.

Carson, D. D., Rosenberg, L. I., Blaner, W. S., Kato, M., & Lennarz, W. J. (1984). Synthesis and secretion of a novel binding protein for retinol by a cell line derived from Sertoli cells. J Biol Chem, 259(5), 3117-23.

Castro, C. A., Silbert, L. H., McNaughton, B. L., & Barnes, C. A. (1989). Recovery of spatial learning deficits after decay of electrically induced synaptic enhancement in the hippocampus. Nature, 342(6249), 545-8.

Chambaut-Guerin, A. M., Rouher, C., & Gauthereau, X. (1997). p55 tumour necrosis factor receptors distribution in neuroblastoma cells. Neuroreport, 8(6), 1451-6.

Chen, J., & Kelly, P. T. (1996). Retinoic acid stimulates alpha-CAMKII gene expression in PC12 cells at a distinct transcription initiation site. J Neurosci, 16(18), 5704-14.

Cheung, W. M., Chu, A. H., Leung, M. F., & Ip, N. Y. (1996). Induction of trk receptors by retinoic acid in a human embryonal carcinoma cell line. Neuroreport, 7(6), 1204-8.

Chiang, M. Y., Misner, D., Kempermann, G., Schikorski, T., Giguere, V., Sucov, H. M., Gage, F. H., Stevens, C. F., & Evans, R. M. (1998). An essential role for retinoid receptors RARbeta and RXRgamma in long-term potentiation and depression. Neuron, 21(6), 1353-61.

Chiocca, E.A., Davies, P.J., & Stein, J.P. (1989) Regulation of tissue transglutaminase gene expression as a molecular model for retinoid effects on proliferation and differentiation. J. Cell Biochem., 39, 293-304.

Cho, S., Cho, H., Geum, D., & Kim, K. (1998). Retinoic acid regulates gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release and gene expression in the rat hypothalamic fragments and GT1-1 neuronal cells *in vitro*. Brain Res Mol Brain Res, 54(1), 74-84.

Chun, M.M., & Phelps, E.A. (1999). Memory deficits for implicit information in amnesic subjects with hippocampal damage. Nature Neurosci., 2(9), 844-847.

Clugnet, M.C. & LeDoux, J.E. (1990). Synaptic plasticity in fear conditioning circuits : induction of LTP in the lateral nucleus of the amygdala by the stimulation of the medial geniculate body. J. Neurosci., 10, 2818-24.

Cohen, N.J., & Squire, L.R. (1980) Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. Science, 210, 207-210.

Cohen, N.J. (1984) Preserved learning capacity amnesia: Evidence for multiple memory systems. In Squire, L.R. & Butters, N. (eds), The Neuropsychology of Memory. New York: Guilford Press, pp 83-103.

Cohlan, S.Q. (1953). Excessive intake of vitamin A as a cause of congenital abnormalities in the rat. Science, 117, 535-536.

Correa da Costa, V. M., & Rosenthal, D. (1996). Effect of aging on thyroidal and pituitary T4-5'-deiodinase activity in female rats. Life Sci, 59(18), 1515-20.

Cosgaya, J. M., Recio, J. A., & Aranda, A. (1997). Influence of Ras and retinoic acid on nerve growth factor induction of transin gene expression in PC12 cells. Oncogene, 14(14), 1687-96.

Courtin, F., Chantoux, F., & Francon, J. (1986). Thyroid hormone metabolism by glial cells in primary culture. Mol Cell Endocrinol, 48(2-3), 167-78.

Coustaut, M., Pallet, V., Garcin, H., & Higuere, P. (1996). The influence of dietary vitamin A on triiodothyronine, retinoic acid, and glucocorticoid receptors in liver of hypothyroid rats. Br J Nutr, 76(2), 295-306.

Craik, F.I.M., & Lockhart, R.S. (1972). Levels of processing : a framework for memory research. J. Verbal Learn. and Verbal Behav., 11, 671-684.

Crow, J. A., & Ong, D. E. (1985). Cell-specific immunohistochemical localization of a cellular retinol-binding protein (type two) in the small intestine of rat. Proc Natl Acad Sci U S A, 82(14), 4707-11.

Damm, K., Thompson, C. C., & Evans, R. M. (1989). Protein encoded by v-erbA functions as a thyroid-hormone receptor antagonist. Nature, 339(6226), 593-7.

Danysz, W., Zajackowski, W., & Costa E. (1995) Modulation of learning processes by ionotropic glutamate receptor ligands. Behav. Pharmacol., 6, 455-474.

Davidson, T. L., McKernan, M. G., & Jarrard, L. E. (1993). Hippocampal lesions do not impair negative patterning: a challenge to configural association theory. Behav Neurosci, 107(2), 227-34.

Davis, P. J. (1979). Ageing and endocrine function. Clin Endocrinol Metab, 8(3), 603-19.

Davis, S., Blutchter, S.P., & Morris, R.G.M. (1992) The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-aAP5) impairs spatial-learning and LTP *in vivo* at intra-cerebral concentrations comparable to those that block LTP *in vitro*. J. Neurosci., 12, 21-34.

Dawson, H. D., Yamamoto, Y., Zolfaghari, R., Rosales, F. J., Dietz, J., Shimada, T., Li, N., & Ross, A. C. (2000). Regulation of hepatic vitamin A storage in a rat model of controlled vitamin A status during aging. J Nutr, 130(5), 1280-6.

De Nayer, P., Rennotte, B., & Caucheteux, D. (1991). Thyroid hormone receptors in brain and liver during ageing. Horm Metab Res, 23(1), 12-4.

de The, H., Marchio, A., Tiollais, P., & Dejean, A. (1989). Differential expression and ligand regulation of the retinoic acid receptor alpha and beta genes. Embo J, 8(2), 429-33.

Delacour, J. (1984). Neurobiologie des comportements. Paris : Hermann Presses.

Delacour, J. (1998). Une introduction aux neurosciences cognitives. Paris : DeBoeck Univesité Presses.

Delmotte, M. H., Tahayato, A., Formstecher, P., & Lefebvre, P. (1999). Serine 157, a retinoic acid receptor alpha residue phosphorylated by protein kinase C *in vitro*, is involved in RXR.RARalpha heterodimerization and transcriptional activity. J Biol Chem, 274(53), 38225-31.

Dev, S., Adler, A. J., & Edwards, R. B. (1993). Adult rabbit brain synthesizes retinoic acid. Brain Res, 632(1-2), 325-8.

Dolle, P., Fraulob, V., Kastner, P., & Chambon, P. (1994). Developmental expression of murine retinoid X receptor (RXR) genes. Mech Dev, 45(2), 91-104.

Dolle, P., Ruberte, E., Kastner, P., Petkovich, M., Stoner, C. M., Gudas, L. J., & Chambon, P. (1989). Differential expression of genes encoding alpha, beta and gamma retinoic acid receptors and CRABP in the developing limbs of the mouse. Nature, 342(6250), 702-5.

Dusek, J. A., & Eichenbaum, H. (1998). The hippocampus and transverse patterning guided by olfactory cues. Behav Neurosci, 112(4), 762-71.

Eccles, J.C. (1989). Evolution du cerveau et création de la conscience. France : Flammarion Presses.

Eichenbaum, H. (1994) Système hippocampique et Mémoire déclarative chez l'homme et chez l'animal : Analyse expérimentale et Origines historiques. In Schacter, D.L. & Tulving, E., Solal (eds), Systèmes de mémoire chez l'animal et chez l'homme. Marseille, pp 151-204.

Eichenbaum, H., Fagan, A., & Cohen, N. J. (1986). Normal olfactory discrimination learning set and facilitation of reversal learning after medial-temporal damage in rats: implications for an account of preserved learning abilities in amnesia. J Neurosci, 6(7), 1876-84.

Eichenbaum, H., Fagan, A., Mathews, P., & Cohen, N. J. (1988). Hippocampal system dysfunction and odor discrimination learning in rats: impairment or facilitation depending on representational demands. Behav Neurosci, 102(3), 331-9.

Eichenbaum, H., Mathews, P., & Cohen, N. J. (1989). Further studies of hippocampal representation during odor discrimination learning. Behav Neurosci, 103(6), 1207-16.

Eichenbaum, H., Otto, T., & Cohen, N. J. (1992). The hippocampus--what does it do? Behav Neural Biol, 57(1), 2-36.

Eichenbaum, H., Schoenbaum, G., Young, B., & Bunsey, M. (1996). Functional organization of the hippocampal memory system. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 93(24), 13500-7.

Ekstrom, A.D., Meltzer, J., McNaughton, B.L., & Barnes, C.A. (2001). NMDA receptor antagonism blocks experience-dependent expansion of hippocampal "place fields". Neuron, 31(4), 631-8.

Enderlin, V., Pallet, V., Alfos, S., Dargelos, E., Jaffard, R., Garcin, H., & Higuieret, P. (1997). Age-related decreases in mRNA for brain nuclear receptors and target genes are reversed by retinoic acid treatment. Neurosci Lett, 229(2), 125-9.

Erfurth, E.M.T., & Hagmar, L.E. (1995). Decreased serum testosterone and free triiodothyronine levels in healthy middle-age men indicate an age effect at the pituitary level. Eur J Endocrinol, 132, 663-667.

Esposito, S., Prange, A. J., Jr., & Golden, R. N. (1997). The thyroid axis and mood disorders: overview and future prospects. Psychopharmacol Bull, 33(2), 205-17.

Eustache, F., Rioux, P., Desgranges, B., Marchal, G., Petit-Taboué, M-C., Dary, M., Lechevalier, B., & Baron, J-C. (1995). Healthy aging, memory subsystems and regional cerebral oxygen consumption. Neuropsychologia, *33*(7), 867-887.

Farooqui, S. M. (1994). Induction of adenylate cyclase sensitive dopamine D2-receptors in retinoic acid induced differentiated human neuroblastoma SHSY-5Y cells. Life Sci, *55*(24), 1887-93.

Faure, R., & Dussault, J. H. (1988). Effects of adenosine triphosphate and alkaline phosphatase on solubilized 3,5,3'-triiodothyronine-binding activity. Endocrinology, *123*(3), 1245-52.

Fedorov, N. B., Pasinelli, P., Oestreicher, A. B., DeGraan, P. N., & Reymann, K. G. (1995). Antibodies to postsynaptic PKC substrate neurogranin prevent long-term potentiation in hippocampal CA1 neurons. Eur J Neurosci, *7*(4), 819-22.

Finucane, P., & Anderson, C. (1995). Thyroid disease in older patients. Diagnosis and treatment. Drugs Aging, *6*(4), 268-77.

Fiorella, P. D., & Napoli, J. L. (1991). Expression of cellular retinoic acid binding protein (CRABP) in Escherichia coli. Characterization and evidence that holo-CRABP is a substrate in retinoic acid metabolism. J Biol Chem, *266*(25), 16572-9.

Fleming, K. M., & Mogul, D. J. (1997). Adenosine A3 receptors potentiate hippocampal calcium current by a PKA-dependent/PKC-independent pathway. Neuropharmacology, *36*(3), 353-62.

Foster, T. C. (1999). Involvement of hippocampal synaptic plasticity in age-related memory decline. Brain Res Brain Res Rev, *30*(3), 236-49.

Foster, T. C., & Norris, C. M. (1997). Age-associated changes in Ca(2+)-dependent processes: relation to hippocampal synaptic plasticity. Hippocampus, *7*(6), 602-12.

Foster, T. C., Sharrow, K. M., Masse, J. R., Norris, C. M., & Kumar, A. (2001). Calcineurin links Ca2+ dysregulation with brain aging. J Neurosci, *21*(11), 4066-73.

Gabrieli, J.D.E. (1996). Memory systems analyses of mnemonic disorders in aging and age-related diseases. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., *93*, 13534-13540.

Gaetano, C., Matsumoto, K., & Thiele, C. J. (1992). *In vitro* activation of distinct molecular and cellular phenotypes after induction of differentiation in a human neuroblastoma cell line. Cancer Res, *52*(16), 4402-7.

Gallagher, M., & Colombo, P. J. (1995). Ageing: the cholinergic hypothesis of cognitive decline. Curr Opin Neurobiol, *5*(2), 161-8.

Gallagher, M., & Holland, P. C. (1992). Preserved configural learning and spatial learning impairment in rats with hippocampal damage. Hippocampus, *2*(1), 81-8.

Garcin, H., & Higuieret, P. (1979). Vitamin A-deficiency and thyrotropin secretion in the rat. J Physiol (Paris), *75*(8), 887-90.

Gerendasy, D. D., & Sutcliffe, J. G. (1997). RC3/neurogranin, a postsynaptic calpacitin for setting the response threshold to calcium influxes. Mol Neurobiol, *15*(2), 131-63.

Giardino, L., Ceccatelli, S., Hokfelt, T., & Calza, L. (1995). Expression of enkephalin and dynorphin precursor mRNAs in brain areas of hypo-and hyperthyroid rat: effect of kainic acid injection. Brain Res, *687*(1-2), 83-93.

Giguere, V., Ong, E. S., Segui, P., & Evans, R. M. (1987). Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. Nature, *330*(6149), 624-9.

Glass, C. K., & Holloway, J. M. (1990). Regulation of gene expression by the thyroid hormone receptor. Biochim Biophys Acta, *1032*(2-3), 157-76.

Goldberg, Y., Glineur, C., Gesquiere, J. C., Ricouart, A., Sap, J., Vennstrom, B., & Ghysdael, J. (1988) EMBO J., *7*, 2425-2433.

Gould, E., Allan, M. D., & McEwen, B. S. (1990). Dendritic spine density of adult hippocampal pyramidal cells is sensitive to thyroid hormone. Brain Res, *525*(2), 327-9.

Green, E. J., McNaughton, B. L., & Barnes, C. A. (1990). Exploration-dependent modulation of evoked responses in fascia dentata: dissociation of motor, EEG, and sensory factors and evidence for a synaptic efficacy change. J Neurosci, *10*(5), 1455-71.

Greengard, P., Valtorta, F., Czernik, A. J., & Benfenati, F. (1993). Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. Science, *259*(5096), 780-5.

Griffin, D.R. (1976). The question of animal awareness. New York : Rockefeller University Press.

Guadano-Ferraz, A., Escamez, M. J., Morte, B., Vargiu, P., & Bernal, J. (1997). Transcriptional induction of RC3/neurogranin by thyroid hormone: differential neuronal sensitivity is not correlated with thyroid hormone receptor distribution in the brain. Brain Res Mol Brain Res, *49*(1-2), 37-44.

Gudas, L.J., Sporn, M. B., & Roberts, A.B. (1994). Cellular Biology and Biochemistry of the retinoids. In Sporn, M.B., Roberts, A.B., & Goodman, D.S. (eds). The Retinoids: biology, chemistry and Medicine. New York : Raven Press, pp 443-520.

Gustafson, A.L., Donovan, M., Annerwall, E., Dencker, L., & Eriksson, U. (1996). Nuclear import of cellular retinoic acid-binding protein type I in mouse embryonic cells. Mech. Dev., *60*(2), 241.

Hebb, D.O. (1979). The organization of behavior. New York : Wiley .

Heyman, A., Wilkinson, W. E., Hurwitz, B. J., Schmechel, D., Sigmon, A. H., Weinberg, T., Helms, M. J., & Swift, M. (1983). Alzheimer's disease: genetic aspects and associated clinical disorders. Ann Neurol, *14*(5), 507-15.

Heyman, R. A., Mangelsdorf, D. J., Dyck, J. A., Stein, R. B., Eichele, G., Evans, R. M., & Thaller, C. (1992). 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. Cell, *68*(2), 397-406.

Higueret, P., & Garcin, H. (1979). Transport of thyroxine in the serum of vitamin A-deficient rats. J Endocrinol, *80*(2), 223-8.

Higueret, P., & Garcin, H. (1984). Triiodothyronine and vitamin A-deficiency in the rat. J Physiol (Paris), *79*(5), 373-7.

Hirsch, R. (1974). The hippocampus and contextual retrieval of information from memory : A theory. Behavioral Psychology, *12*, 421-444.

Hollander, D., & Dadufalza, V. (1990). Influence of aging on vitamin A transport into the lymphatic circulation. Exp Gerontol, 25(1), 61-5.

Hsieh, J. C., Jurutka, P. W., Galligan, M. A., Terpening, C. M., Haussler, C. A., Samuels, D. S., Shimizu, Y., Shimizu, N., & Haussler, M. R. (1991). Human vitamin D receptor is selectively phosphorylated by protein kinase C on serine 51, a residue crucial to its trans-activation function. Proc Natl Acad Sci U S A, 88(20), 9315-9.

Hsieh, J. C., Jurutka, P. W., Nakajima, S., Galligan, M. A., Haussler, C. A., Shimizu, Y., Shimizu, N., Whitfield, G. K., & Haussler, M. R. (1993). Phosphorylation of the human vitamin D receptor by protein kinase C. Biochemical and functional evaluation of the serine 51 recognition site. J Biol Chem, 268(20), 15118-26.

Husson, M., Enderlin, V., Pallet, V., Alfos, S., & Higuieret, P. (2001). Effet d'une carence en vitamine A sur l'expression des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque (RAR, RXR), de la triiodothyronine (TR), et de la protéine (RC3) dans le cerveau de rat. Abstracts des Neurosciences Françaises, D-34, p 119.

Ichikawa, K., & Hashizume, K. (1995). Thyroid hormone action in the cell. Endocr J, 42(2), 131-40.

Iniguez, M. A., Morte, B., Rodriguez-Pena, A., Munoz, A., Gerendasy, D., Sutcliffe, J. G., & Bernal, J. (1994). Characterization of the promoter region and flanking sequences of the neuron-specific gene RC3 (neurogranin). Brain Res Mol Brain Res, 27(2), 205-14.

Jaffard, R. (1995). Les systèmes de mémoire. In Journées Internationales d'Orsay sur les Sciences Cognitives. 3-58.

Jaffard, R., & Meunier, M. (1993). Role of the hippocampal formation in learning and memory. Hippocampus, 3 Spec No, 203-17.

Jaffard, R., Vouimba, R. M., Marighetto, A., & Garcia, R. (1996). Long-term potentiation and long-term depression in the lateral septum in spatial working and reference memory. J. Physiol. Paris, 90(5-6), 339-41.

Jarrard, L.E. (1993). On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. Behavioral and neural Biology, 50, 9-26.

Jeandel, C., Jonveaux, T., & Blain, H. (1996). Vieillesse cérébrale : l'hypothèse nutritionnelle. Cah. Nutr. Diét., 31(2), 88-92.

Jeffrey, K.J., & Morris, R.G.M. (1993). Cumulative long term potentiation in the rat dentate gyrus correlates with, but does not modify, performance in the water maze. Hippocampus, 3, 133-140.

Johnson, M.K., & Chalfonte, B.L. (1994). Liaisons entre souvenirs complexes : Rôle de la réactivation de l'hippocampe. In Schacter, D.L. & Tulving, E., Solal (eds), Systèmes de mémoire chez l'animal et chez l'homme. Marseille, pp 305-342.

Jones, K. E., Yaffe, B. M., & Chin, W. W. (1993). Regulation of thyroid hormone receptor beta-2 mRNA levels by retinoic acid. Mol Cell Endocrinol, 91(1-2), 113-8.

Jouveneau, A., Billard, J. M., Wiley, R. G., Lamour, Y., & Dutar, P. (1994). Cholinergic denervation of the rat hippocampus by 192-IgG-saporin: electrophysiological evidence. Neuroreport, *5*(14), 1781-4.

Kalter, H., & Warkany, J. (1959). Experimental production of congenital malformations in mammals by metabolic procedure. Physiol. Rev., *39*, 69-115.

Kane, K. A., & Robinson, G. B. (1999). Effect of chronic nimodipine on spatial learning and on long-term potentiation. Behav Brain Res, *98*(1), 95-101.

Kersten, S., Dawson, M. I., Lewis, B. A., & Noy, N. (1996). Individual subunits of heterodimers comprised of retinoic acid and retinoid X receptors interact with their ligands independently. Biochemistry, *35*(12), 3816-24.

Kim, J. J., & Baxter, M. G. (2001). Multiple brain-memory systems: the whole does not equal the sum of its parts. Trends Neurosci, *24*(6), 324-30.

Kobayashi, M., Matsuoka, I., & Kurihara, K. (1994). Cholinergic differentiation of cultured sympathetic neurons induced by retinoic acid. Induction of choline acetyltransferase-mRNA and suppression of tyrosine hydroxylase-mRNA levels. FEBS Lett, *337*(3), 259-64.

Kowalska, M., & Disterhoft, J. F. (1994). Relation of nimodipine dose and serum concentration to learning enhancement in aging rabbits. Exp Neurol, *127*(1), 159-66.

Krezel, W., Ghyselinck, N., Samad, T. A., Dupe, V., Kastner, P., Borrelli, E., & Chambon, P. (1998). Impaired locomotion and dopamine signaling in retinoid receptor mutant mice. Science, *279*(5352), 863-7.

Krezel, W., Kastner, P., & Chambon, P. (1999). Differential expression of retinoid receptors in the adult mouse central nervous system. Neuroscience, *89*(4), 1291-300.

Krust, A., Kastner, P., Petkovich, M., Zelent, A., & Chambon, P. (1989). A third human retinoic acid receptor, hRAR-gamma. Proc Natl Acad Sci U S A, *86*(14), 5310-4.

Kurokawa, R., DiRenzo, J., Boehm, M., Sugarman, J., Gloss, B., Rosenfeld, M. G., Heyman, R. A., & Glass, C. K. (1994). Regulation of retinoid signalling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding. Nature, *371*(6497), 528-31.

Lanahan, A., Lyford, G., Stevenson, G. S., Worley, P. F., & Barnes, C. A. (1997). Selective alteration of long-term potentiation-induced transcriptional response in hippocampus of aged, memory-impaired rats. J Neurosci, *17*(8), 2876-85.

Landfield, P. W., & Eldridge, J. C. (1994). The glucocorticoid hypothesis of age-related hippocampal neurodegeneration: role of dysregulated intraneuronal calcium. Ann N Y Acad Sci, *746*, 308-21; discussion 321-6.

Landfield, P. W., & Lynch, G. (1977). Impaired monosynaptic potentiation in *in vitro* hippocampal slices from aged, memory-deficient rats. J Gerontol, *32*(5), 523-33.

Landfield, P. W., Thibault, O., Mazzanti, M. L., Porter, N. M., & Kerr, D. S. (1992). Mechanisms of neuronal death in brain aging and Alzheimer's disease: role of endocrine-mediated calcium dyshomeostasis. J Neurobiol, *23*(9), 1247-60.

Larson, J., & Lynch, G. (1988). Role of N-methyl-D-Aspartate receptors in the induction of synaptic potentiation by burst stimulation patterned after the hippocampal theta rhythm. Brain Research, *411*, 111-118.

Lauque, S. (1995). Nutritional intake and neurocognitive functions. Age et Nutrition, *6*, 68-72.

Le Doze, F., Debruyne, D., Albessard, F., Barre, L., & Defer, G. L. (2000). Pharmacokinetics of all-trans retinoic acid, 13-cis retinoic acid, and fenretinide in plasma and brain of Rat. Drug Metab Dispos, *28*(2), 205-8.

Lefebvre, P., Gaub, M. P., Tahayato, A., Rochette-Egly, C., & Formstecher, P. (1995). Protein phosphatases 1 and 2A regulate the transcriptional and DNA binding activities of retinoic acid receptors. J Biol Chem, *270*(18), 10806-16.

Leonard, L., Horton, C., Maden, M., & Pizzey, J. A. (1995). Anteriorization of CRABP-I expression by retinoic acid in the developing mouse central nervous system and its relationship to teratogenesis. Dev Biol, *168*(2), 514-28.

Leroy, P., Krust, A., Zelent, A., Mendelsohn, C., Garnier, J. M., Kastner, P., Dierich, A., & Chambon, P. (1991). Multiple isoforms of the mouse retinoic acid receptor alpha are generated by alternative splicing and differential induction by retinoic acid. Embo J, *10*(1), 59-69.

Levin, A. A., Sturzenbecker, L. J., Kazmer, S., Bosakowski, T., Huselton, C., Allenby, G., Speck, J., Kratzeisen, C., Rosenberger, M., Lovey, A., & et al. (1992). 9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha. Nature, *355*(6358), 359-61.

Levitt, A. J., & Karlinsky, H. (1992). Folate, vitamin B12 and cognitive impairment in patients with Alzheimer's disease. Acta Psychiatr Scand, *86*(4), 301-5.

Levy, E.G. (1991). Thyroid disease in the elderly. Med. Clin. North. Am., *75*, 151-167.

Lin, M. H., & Akera, T. (1978). Increased (Na⁺,K⁺)-ATPase concentrations in various tissues of rats caused by thyroid hormone treatment. J Biol Chem, *253*(3), 723-6.

Loosen, P. T. (1992). The thyroid state of depressed patients. Clin Neuropharmacol, *15 Suppl 1 Pt A*, 382A-383A.

Lynch, G., & Granger, R. (1994). Variations de la plasticité synaptique et types de mémoire dans les réseaux cortico-hippocampiques. In Schacter, D.L. & Tulving, E., Solal (eds), Systèmes de mémoire chez l'animal et chez l'homme. Marseille, pp 73-94.

Lynch, G. (1998) Memory and the brain : unexpected chemistries and a new pharmacology. Neurobiol. Learn. Mem., *70*, 82-100.

Maden, M., Gale, E., & Zile, M. (1998). The role of vitamin A in the development of the central nervous system. J Nutr, *128*(2 Suppl), 471S-475S.

Magnusson, K. R., & Cotman, C. W. (1993). Age-related changes in excitatory amino acid receptors in two mouse strains. Neurobiol Aging, *14*(3), 197-206.

Mangelsdorf, D. J., Borgmeyer, U., Heyman, R. A., Zhou, J. Y., Ong, E. S., Oro, A. E., Kakizuka, A., & Evans, R. M. (1992). Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. Genes Dev, *6*(3), 329-44.

Mangelsdorf, D. J., Ong, E. S., Dyck, J. A., & Evans, R. M. (1990). Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. Nature, *345*(6272), 224-9.

Mangelsdorf, D. J., Umesono, K., Kliewer, S. A., Borgmeyer, U., Ong, E. S., & Evans, R. M. (1991). A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. Cell, *66*(3), 555-61.

Mangelsdorf, D.J. (1994). Vitamin A receptors. Nutr. Rev. *52*, S32-S44.

Mangelsdorf, D.J., Ka zuhiko, U., & Evans, R.M. (1994). The Retinoid Receptors. In Sporn, M.B., Roberts, A.B. & Goodman, D.S. (eds). The Retinoids: biology, chemistry and Medecine. New York : Raven Press, pp 319-350.

Marighetto, A., Micheau, J., & Jaffard, R. (1993). Relationships between testing-induced alterations of hippocampal cholinergic activity and memory performance on two spatial tasks in mice. Behav Brain Res, *56*(2), 133-44.

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

Marr, D. (1971). Simple memory: a theory for archicortex. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, *262*(841), 23-81.

Martin, S. J., Grimwood, P. D., & Morris, R. G. (2000). Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. Annu Rev Neurosci, *23*, 649-711.

Martinez de Arrieta, C., Morte, B., Coloma, A., & Bernal, J. (1999). The human RC3 gene homolog, NRG1 contains a thyroid hormone-responsive element located in the first intron. Endocrinology, *140*(1), 335-43.

Massicotte, G., & Baudry, M. (1991). Triggers and substrates of hippocampal synaptic plasticity. Neurosci Biobehav Rev, *15*(3), 415-23.

Matsumoto, K., Gaetano, C., Daughaday, W. H., & Thiele, C. J. (1992). Retinoic acid regulates insulin-like growth factor II expression in a neuroblastoma cell line. Endocrinology, *130*(6), 3669-76.

Mattson, M. P. (1992). Calcium as sculptor and destroyer of neural circuitry. Exp Gerontol, *27*(1), 29-49.

Mc Collum, E.V. (1913). Necessity of certain lipids in the diet during growth. J. Biol. Chem., *15*, 167.

McCaffery, P., & Drager, U. C. (1994). High levels of a retinoic acid-generating dehydrogenase in the meso-telencephalic dopamine system. Proc Natl Acad Sci U S A, *91*(16), 7772-6.

McEarchern, J.C., & Shaw, C.A. (1996). An alternative to the LTP orthodoxy : a plasticity-pathology continuum model. Brain Res. Brain Res. Rev., *22*, 51-92.

McLaren, D. S., Mawlayi, Z., & Downing, A. (1979). Distribution of vitamin A in human liver. Proc Nutr Soc, *38*(2), 49A.

McNaughton, B. L., Barnes, C. A., Rao, G., Baldwin, J., & Rasmussen, M. (1986). Long-term enhancement of hippocampal synaptic transmission and the acquisition of spatial information. J Neurosci, *6*(2), 563-71.

McNaughton, B. L., Douglas, R. M., & Goddard, G. V. (1978). Synaptic enhancement in fascia dentata: cooperativity among coactive afferents. Brain Res, *157*(2), 277-93.

McNaughton, B.L., & Morris, R.G.M. (1987). Hippocampal synaptic enhancement and information storage within a distributed memory system. Trends Neurosci, *10*, 408-415.

Meunier, M., Bachevalier, J., & Mishkin, M. (1994). L'anatomie de la mémoire. La Recherche, *25*, 760-766.

Mobarhan, S., Seitz, H. K., Russell, R. M., Mehta, R., Hupert, J., Friedman, H., Layden, T. J., Meydani, M., & Langenberg, P. (1991). Age-related effects of chronic ethanol intake on vitamin A status in Fisher 344 rats. J Nutr, *121*(4), 510-7.

Mons, N., Enderlin, V., Jaffard, R., & Higuere, P. (2001). Selective age-related changes in the PKC-sensitive, calmodulin-binding protein, neurogranin, in the mouse brain. J Neurochem, *79*(4), 859-67.

Morte, B., Martinez de Arrieta, C., Manzano, J., Coloma, A., & Bernal, J. (1999). Identification of a cis-acting element that interferes with thyroid hormone induction of the neurogranin (NRGN) gene. FEBS Lett, *464*(3), 179-83.

Moser, E. I., Krobot, K. A., Moser, M. B., & Morris, R. G. (1998). Impaired spatial learning after saturation of long-term potentiation. Science, *281*(5385), 2038-42.

Moser, E., Mathiesen, I., & Andersen, P. (1993). Association between brain temperature and dentate field potentials in exploring and swimming rats. Science, *259*(5099), 1324-6.

Moyer, J. R., Jr., & Disterhoft, J. F. (1994). Nimodipine decreases calcium action potentials in rabbit hippocampal CA1 neurons in an age-dependent and concentration-dependent manner. Hippocampus, *4*(1), 11-7.

Moyer, J. R., Jr., Thompson, L. T., Black, J. P., & Disterhoft, J. F. (1992). Nimodipine increases excitability of rabbit CA1 pyramidal neurons in an age- and concentration-dependent manner. J Neurophysiol, *68*(6), 2100-9.

Muller, R. U., Kubie, J. L., & Saypoff, R. (1991). The hippocampus as a cognitive graph (abridged version). Hippocampus, *1*(3), 243-6.

Norris, C. M., Halpain, S., & Foster, T. C. (1998a). Alterations in the balance of protein kinase/phosphatase activities parallel reduced synaptic strength during aging. J Neurophysiol, *80*(3), 1567-70.

Norris, C. M., Halpain, S., & Foster, T. C. (1998b). Reversal of age-related alterations in synaptic plasticity by blockade of L-type Ca²⁺ channels. J Neurosci, *18*(9), 3171-9.

Norris, C. M., Korol, D. L., & Foster, T. C. (1996). Increased susceptibility to induction of long-term depression and long-term potentiation reversal during aging. J Neurosci, *16*(17), 5382-92.

- O**'Keefe, J., & Nadel, L. (1978). The hippocampus as a cognitive map. Oxford : Clarendon Press.
- O'Keefe, J. (1991). An allocentric spatial model for the hippocampal cognitive map. Hippocampus, *1*, 230-235.
- O'Keefe, J. (1979). A review of the hippocampal place cells. Prog Neurobiol, *13*(4), 419-39.
- O'Keefe, J., & Conway, D. H. (1978). Hippocampal place units in the freely moving rat: why they fire where they fire. Exp Brain Res, *31*(4), 573-90.
- O'Keefe, J., & Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. Brain Res, *34*(1), 171-5.
- O'Keefe, J., & Speakman, A. (1987). Single unit activity in the rat hippocampus during a spatial memory task. Exp Brain Res, *68*(1), 1-27.
- Oh, M. M., Power, J. M., Thompson, L. T., Moriearty, P. L., & Disterhoft, J. F. (1999). Metrifonate increases neuronal excitability in CA1 pyramidal neurons from both young and aging rabbit hippocampus. J Neurosci, *19*(5), 1814-23.
- Olton, D. S. (1979). Mazes, maps, and memory. Am Psychol, *34*(7), 583-96.
- Olton, D. S., & Papas, B. C. (1979). Spatial memory and hippocampal function. Neuropsychologia, *17*(6), 669-82.
- Ong, D. E., Goodwin, W. J., Jesse, R. H., & Griffin, A. C. (1982). Presence of cellular retinol and retinoic acid-binding proteins in epidermoid carcinoma of the oral cavity and oropharynx. Cancer, *49*(7), 1409-12.
- Otnaess, M.K., Brun, V.H., Moser, M-B., & Moser, E.I. (1999). Pretraining prevents spatial learning after saturation of hippocampal long-term potentiation. J. Neurosci., *19*, 1-5.
- P**ailler-Rodde, I., Garcin, H., & Higeret, P. (1991). Effect of retinoids on protein kinase C activity and on the binding characteristics of the tri-iodothyronine nuclear receptor. J Endocrinol, *128*(2), 245-51.
- Pak, J. H., Huang, F. L., Li, J., Balschun, D., Reymann, K. G., Chiang, C., Westphal, H., & Huang, K. P. (2000). Involvement of neurogranin in the modulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, synaptic plasticity, and spatial learning: a study with knockout mice. Proc Natl Acad Sci U S A, *97*(21), 11232-7.
- Pallet, V., Audouin-Chevallier, I., Verret, C., Garcin, H., & Higeret, P. (1994). Retinoic acid differentially modulates triiodothyronine and retinoic acid receptors in rat liver according to thyroid status. Eur J Endocrinol, *131*(4), 377-84.
- Pallet, V., Azais-Braesco, V., Enderlin, V., Grolier, P., Noel-Suberville, C., Garcin, H., & Higeret, P. (1997). Aging decreases retinoic acid and triiodothyronine nuclear expression in rat liver: exogenous retinol and retinoic acid differentially modulate this decreased expression. Mech Ageing Dev, *99*(2), 123-36.

Panariello, L., Quadro, L., Trematerra, S., & Colantuoni, V. (1996). Identification of a novel retinoic acid response element in the promoter region of the retinol-binding protein gene. J Biol Chem, *271*(41), 25524-32.

Peiffer, A., Veilleux, S., & Barden, N. (1991). Antidepressant and other centrally acting drugs regulate glucocorticoid receptor messenger RNA levels in rat brain. Psychoneuroendocrinology, *16*(6), 505-15.

Periquet, B., Periquet, A., Bailly, A., Ghisolfi, J., & Thouvenot, J. P. (1986). Effects of retinoic acid on hepatic cytochrome P-450 dependent enzymes in rats under different vitamin A status. Int J Vitam Nutr Res, *56*(3), 223-9.

Petkovich, M., Brand, N. J., Krust, A., & Chambon, P. (1987). A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. Nature, *330*(6147), 444-50.

Petri, H.L., & Mishkin, M. (1994). Behaviorism, cognitivism and the neuropsychology of memory. American Scientist, *82*, 30-37.

Piolino, P., Desgranges, B., & Eustache, F. (2001). Les Aleas de la Mémoire autobiographique. In La Mémoire : le jardin de la pensée., Pour la Science, 120-125.

Plum, L. A., & Clagett-Dame, M. (1995). 9-cis-retinoic acid selectively activates the cellular retinoic acid binding protein-II gene in human neuroblastoma cells. Arch Biochem Biophys, *319*(2), 457-63.

Poon, L.W. (1985). Differences in human memory with aging : Nature, causes, and clinical implications. In Biren, J. & Schaie, K.W. (eds), Handbook of the psychology of aging. New-York : NY, pp. 427-462.

Posch, K. C., Boerman, M. H., Burns, R. D., & Napoli, J. L. (1991). Holocellular retinol binding protein as a substrate for microsomal retinal synthesis. Biochemistry, *30*(25), 6224-30.

Posch, K. C., Burns, R. D., & Napoli, J. L. (1992). Biosynthesis of all-trans-retinoic acid from retinal. Recognition of retinal bound to cellular retinol binding protein (type I) as substrate by a purified cytosolic dehydrogenase. J Biol Chem, *267*(27), 19676-82.

Power, J. M., Oh, M. M., & Disterhoft, J. F. (2001). Metrifonate decreases sI(AHP) in CA1 pyramidal neurons *in vitro*. J Neurophysiol, *85*(1), 319-22.

Puymirat, J., Miehé, M., Marchand, R., Sarlieve, L., & Dussault, JH. (1991). Immunocytochemical localization of thyroid hormone receptors in the adult rat brain. Thyroid, *1*(2), 173-84.

Ramakers, G.M.J., DeGraan, P.N.E., Urban, I.J.A., Kraay, D., Tang, T., Pasinelli, P., Oestreicher, A.B., & Gispen, W.H. (1995). Temporal differences in the phosphorylation state of pre- and postsynaptic protein kinase C substrates B-50/GAP-43 and neurogranin during Long Term Potentiation. The Journal of Biological Chemistry, *270*(23), 13892-13898.

Redfern, C. P., Daly, A. K., Latham, J. A., & Todd, C. (1990). The biological activity of retinoids in melanoma cells. Induction of expression of retinoic acid receptor-beta by retinoic acid in S91 melanoma cells. FEBS Lett, *273*(1-2), 19-22.

Rescorla, R. A., Grau, J. W., & Durlach, P. J. (1985). Analysis of the unique cue in configural discriminations. J Exp Psychol Anim Behav Process, *11*(3), 356-66.

Rogue, P. J., Ritz, M. F., & Malviya, A. N. (1993). Impaired gene transcription and nuclear protein kinase C activation in the brain and liver of aged rats. FEBS Lett, *334*(3), 351-4.

Rosenfield, I. (1994). L'Invention de la Mémoire. In France : Flammarion Presses.

Ruberte, E., Dolle, P., Chambon, P., & Morriss-Kay, G. (1991). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. II. Their differential pattern of transcription during early morphogenesis in mouse embryos. Development, *111*(1), 45-60.

Ruberte, E., Dolle, P., Krust, A., Zelent, A., Morriss-Kay, G., & Chambon, P. (1990). Specific spatial and temporal distribution of retinoic acid receptor gamma transcripts during mouse embryogenesis. Development, *108*(2), 213-22.

Russell, R. M., & Suter, P. M. (1993). Vitamin requirements of elderly people: an update. Am J Clin Nutr, *58*(1), 4-14.

Saavadra, M. (1975). Pavlovian compound conditioning in the rabbit. Learning and motivation, *6*, 314-326.

Sarter, M., & Bruno, J. P. (1997). Cognitive functions of cortical acetylcholine: toward a unifying hypothesis. Brain Res Brain Res Rev, *23*(1-2), 28-46.

Saucier, D., & Cain, D.P. (1995) Spatial learning without NMDA receptor dependent long-term potentiation. Nature, *278*, 186-189.

Schacter, D.L., & Tulving, E. (1994). Qu'en est-il de la Notion de Systèmes Mnésiques en 1994 ? In Schacter, D.L., & Tulving, E., Solal (eds), Systèmes de mémoire chez l'animal et chez l'homme. Marseille, pp 151-204.

Schacter, D.L. (1992). Priming and multiple memory systems : Perceptual mechanisms of implicit memory. Journal of Cognitive Neuroscience, *4*, 244-256.

Scheibe, R. J., & Wagner, J. A. (1992). Retinoic acid regulates both expression of the nerve growth factor receptor and sensitivity to nerve growth factor. J Biol Chem, *267*(25), 17611-6.

Scoville, W.B., & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry, *20*, 11-21.

Shankar, S., Teyler, T. J., & Robbins, N. (1998). Aging differentially alters forms of long-term potentiation in rat hippocampal area CA1. J Neurophysiol, *79*(1), 334-41.

Sharp, P.E., McNaughton, B.L., & Barnes, C.A. (1989). Exploration-dependent modulation of evoked response in fascia dentata : fundamental observation and time-course. Psychobiology, *17*, 257-269.

Sherry, D.F., & Schacter, D.L. (1987) The evolution of multiple memory systems. Psychological Review, *94*, 439-454.

Shinohara, S., & Kawasaki, K. (1997). Electrophysiological changes in rat hippocampal pyramidal neurons produced by cholecystinin octapeptide. Neuroscience, *78*(4), 1005-16.

Smith, W. C., Nakshatri, H., Leroy, P., Rees, J., & Chambon, P. (1991). A retinoic acid response element is present in the mouse cellular retinol binding protein I (mCRBPI) promoter. Embo J, *10*(8), 2223-30.

Smith-Maxwell, C. J., Eatock, R. A., & Begenisich, T. (1991). Induction of K-channel expression in a neuroblastoma cell line. J Neurobiol, *22*(4), 327-41.

Sporn, M. B., & Roberts, A. B. (1985). What is a retinoid? Ciba Found Symp, *113*, 1-5.

Sundboom, J., & Olson, J. A. (1984). Effect of aging on the storage and catabolism of vitamin A in mice. Exp Gerontol, *19*(4), 257-65.

Sutherland, M. K., Wong, L., Somerville, M. J., Handley, P., Yoong, L., Bergeron, C., & McLachlan, D. R. (1992). Reduction of thyroid hormone receptor c-ERB A alpha mRNA levels in the hippocampus of Alzheimer as compared to Huntington brain. Neurobiol Aging, *13*(2), 301-12.

Sutherland, R. J., Kolb, B., & Whishaw, I. Q. (1982). Spatial mapping: definitive disruption by hippocampal or medial frontal cortical damage in the rat. Neurosci Lett, *31*(3), 271-6.

Sutherland, R. J., McDonald, R. J., Hill, C. R., & Rudy, J. W. (1989). Damage to the hippocampal formation in rats selectively impairs the ability to learn cue relationships. Behav Neural Biol, *52*(3), 331-56.

Sutherland, R.J., & Rudy, J.W. (1989). Configural association theory : the role of the hippocampal formation in learning, memory and amnesia. Psychobiology, *17*, 129-144.

Takase, S., Ong, D. E., & Chytil, F. (1986). Transfer of retinoic acid from its complex with cellular retinoic acid-binding protein to the nucleus. Arch Biochem Biophys, *247*(2), 328-34.

Taneja, R., Bouillet, P., Boylan, J. F., Gaub, M. P., Roy, B., Gudas, L. J., & Chambon, P. (1995). Reexpression of retinoic acid receptor (RAR) gamma or overexpression of RAR alpha or RAR beta in RAR gamma-null F9 cells reveals a partial functional redundancy between the three RAR types. Proc Natl Acad Sci U S A, *92*(17), 7854-8.

Thaller, C., & Eichele, G. (1990). Isolation of 3,4-didehydroretinoic acid, a novel morphogenetic signal in the chick wing bud. Nature, *345*(6278), 815-9.

Thibault, O., & Landfield, P. W. (1996). Increase in single L-type calcium channels in hippocampal neurons during aging. Science, *272*(5264), 1017-20.

Tolman, E.C. (1948). Cognitive maps in rats and men. Psychol. Rev., *55*, 189-208.

Tulving, E. (1972) Episodic and semantic memory. In E. Tulving & W. Donaldson (eds), Organization of memory. New York : Academic Press.

Tulving, E. (1993). What is episodic memory ? Current Perspectives in Psychological Science, *2*, 67-70.

Tulving, E., & Markowitsch, H. J. (1997). Memory beyond the hippocampus. Curr Opin Neurobiol, *7*(2), 209-16.

Van Der Linden, M., & Hupet, M. (1994). Le vieillissement cognitif, Presses Universitaires de France (Eds), Paris.

Vanderwolf, C. H., & Cain, D. P. (1994). The behavioral neurobiology of learning and memory: a conceptual reorientation. Brain Res Brain Res Rev, *19*(3), 264-97.

Vargha-Khadem, F., Gadian, D. G., Watkins, K. E., Connelly, A., Van Paesschen, W., & Mishkin, M. (1997). Differential effects of early hippocampal pathology on episodic and semantic memory. Science, *277*(5324), 376-80.

Vauclair, J. (1992). Psychologie cognitive et représentation animale. In Gervet J., Livet P. & Tête A. (eds), La Représentation animale : représentation de la représentation. Nancy : Presses Universitaires de Nancy, pp 127-142.

Verma, A.K., Shoemaker, A., Simsiman, R., Denning, M., & Zachman, R.D. (1992). Expression of retinoic acid nuclear receptors and tissue transglutaminase is altered in various tissues of rats fed a vitamin A-deficient diet. J. Nutr. Nov.; *122*(11), 2144-52.

von Holst, A., Rodriguez-Tebar, A., Michaille, J. J., Dhouailly, D., Backstrom, A., Ebendal, T., & Rohrer, H. (1995). Retinoic acid-mediated increase in TrkA expression is sufficient to elicit NGF-dependent survival of sympathetic neurons. Mol Cell Neurosci, *6*(3), 185-98.

Wald, G. (1968). The molecular basis of visual excitation. Nature, *219*(156), 800-7.

Wallenstein, G. V., Eichenbaum, H., & Hasselmo, M. E. (1998). The hippocampus as an associator of discontinuous events. Trends Neurosci, *21*(8), 317-23.

Walton, M., Woodgate, A. M., Muravlev, A., Xu, R., During, M. J., & Dragunow, M. (1999). CREB phosphorylation promotes nerve cell survival. J Neurochem, *73*(5), 1836-42.

Wan, Y. J., Wang, L., & Wu, T. C. (1994). The expression of retinoid X receptor genes is regulated by all-trans- and 9-cis-retinoic acid in F9 teratocarcinoma cells. Exp Cell Res, *210*(1), 56-61.

Wang, Y. Z., & Christakos, S. (1995). Retinoic acid regulates the expression of the calcium binding protein, calbindin-D28K. Mol Endocrinol, *9*(11), 1510-21.

Warrington, E.K., & Weiskrantz, L. (1968). New method of testing long-term retention with special reference to amnesic patients. Nature, *217*, 972-974.

Warrington, E.K., & Weiskrantz, L. (1974). The effect of prior learning on subsequent retention in amnesic patients. Neuropsychologia, *12*, 419-428.

Watson, J.B., Szijan, I., & Coulter, P.M. (1994). Localization of RC3 (neurogranin) in rat brain subcellular fractions. Molecular Brain Research, *27*, 323-328.

Whybrow, P. C. (1994). The therapeutic use of triiodothyronine and high dose thyroxine in psychiatric disorder. Acta Med Austriaca, *21*(2), 47-52.

Wiener, S. I., Paul, C. A., & Eichenbaum, H. (1989). Spatial and behavioral correlates of hippocampal neuronal activity. J Neurosci, *9*(8), 2737-63.

Williams, G. R., & Franklyn, J. A. (1994). Physiology of the steroid-thyroid hormone nuclear receptor superfamily. Baillieres Clin Endocrinol Metab, *8*(2), 241-66.

Wion, D., Houlgatte, R., Barbot, N., Barrand, P., Dicou, E., & Brachet, P. (1987). Retinoic acid increases the expression of NGF gene in mouse L cells. Biochem Biophys Res Commun, *149*(2), 510-4.

Wuarin, L., Chang, B., Wada, R., & Sidell, N. (1994). Retinoic acid up-regulates nuclear retinoic acid receptor-alpha expression in human neuroblastoma cells. Int J Cancer, *56*(6), 840-5.

Yamagata, T., Momoi, M. Y., Yanagisawa, M., Kumagai, H., Yamakado, M., & Momoi, T. (1994). Changes of the expression and distribution of retinoic acid receptors during neurogenesis in mouse embryos. Brain Res Dev Brain Res, *77*(2), 163-76.

Yamagata, T., Momoi, T., Kumagai, H., Nishikawa, T., Yanagisawa, M. & Momoi, M. (1993). Distribution of retinoic acid receptor β proteins in rat brain: up-regulation by retinoic acid. Biomedical Research, *14*(3), 183-190.

Younkin, D. P., Tang, C. M., Hardy, M., Reddy, U. R., Shi, Q. Y., Pleasure, S. J., Lee, V. M., & Pleasure, D. (1993). Inducible expression of neuronal glutamate receptor channels in the NT2 human cell line. Proc Natl Acad Sci U S A, *90*(6), 2174-8.

Zelent, A., Krust, A., Petkovich, M., Kastner, P., & Chambon, P. (1989). Cloning of murine alpha and beta retinoic acid receptors and a novel receptor gamma predominantly expressed in skin. Nature, *339*(6227), 714-7.

Zetterstrom, R. H., Lindqvist, E., Mata de Urquiza, A., Tomac, A., Eriksson, U., Perlmann, T., & Olson, L. (1999). Role of retinoids in the CNS: differential expression of retinoid binding proteins and receptors and evidence for presence of retinoic acid. Eur J Neurosci, *11*(2), 407-16.

Zgombic, M., & Duester, G. (1993). DNA elements mediating retinoid and thyroid hormone regulation of alcohol dehydrogenase gene expression. Adv Exp Med Biol, *328*, 571-80.

ANNEXE

Further Evidence for a Dissociation Between Different Forms of Mnemonic Expressions in a Mouse Model of Age-related Cognitive Decline: Effects of Tacrine and S 17092, a Novel Prolyl Endopeptidase Inhibitor

Aline Marighetto,² Khalid Touzani, Nicole Etchamendy, Cedric Cortes Torrea, Guillaume De Nanteuil,¹ David Guez,¹ Robert Jaffard, and Philippe Morain¹

CNRS - UMR-5106, Laboratoire Neurosciences Comportementales and Cognitives, 33405 Talence Cedex, France; and ¹Institut de Recherches Internationales Servier, 92415 Courbevoie Cedex, France

It has been demonstrated previously on the radial maze that the emergence of an age-related mnemonic impairment is critically dependent on the form which the discrimination problems took. Hence, when the arms were presented one by one (i.e., successive go-no-go discrimination), both adult and aged mice learned to distinguish between positive (baited) and negative (unbaited) arms readily, as evidenced by their increased readiness to enter positive relative to negative arms (i.e., by a differential in arm-entry latencies). A selective impairment in the aged mice was seen when these arms were presented subsequently as pairs, such that the mice were confronted with an explicit choice (i.e., simultaneous 2-choice discrimination). When discriminative performance was measured by the differential run speed between positive and negative arms, aged mice were also impaired. This was particularly pronounced in the 2-choice discrimination condition. We examined the effects of tacrine (3mg/kg, subcutaneously) or S 17092 (10mg/kg, orally) in aged mice on the three behavioral indices of this 2-stage spatial discrimination paradigm. The results indicated that: (1) Tacrine, but not S 17092, enhanced the acquisition of go-no-go discrimination as reflected in arm-entry latencies; (2) both drugs improved choice accuracy in simultaneous discrimination, although the effect of tacrine was less striking and, in particular, far from statistical significance in the very first 2-choice responses; and (3) neither drugs significantly affected run-speed performance. We conclude further that the specific patterns of drug effects on the three indices of discriminative performance might suggest that each index is associated with a distinct form of mnemonic expression relying on separate neural systems.

In humans, declarative/explicit memory appears to be more vulnerable to deterioration in senescence than procedural/implicit memory (Poon 1985; Gabrieli 1996; Schugens et al. 1997). One cardinal characteristic of declarative memory is its flexibility as exemplified by its capacity to support inferential use of memories in novel situations (Cohen 1984). Using a two-stage paradigm of discrimination learning, Marighetto et al. (1999) have previously demonstrated that aged mice displayed impaired inferential abilities when they were required to make an explicit choice between two eventualities that were only encountered before separately, but never conjointly. In Stage 1, the mice learned to discriminate between the valence of three baited (positive) and three unbaited (negative) arms in a radial maze with each of the arms presented one at a time, i.e., successive

go-no-go discrimination. Successful discrimination was indicated by the animals' increased readiness to enter positive arms relative to negative ones. In Stage 2, the animals were confronted with an explicit choice between one positive arm and one negative arm they had learned to discriminate previously. Aged mice, but not young ones, were unable to translate their preference for the positive arm shown in Stage 1 into a correct choice in Stage 2.

In this paradigm, the presence or absence of a mnemonic impairment in the aged mice is critically dependent on the different forms that a discrimination problem can take. One interpretation is that these corresponded to two forms of memory expression for the same piece of previously acquired information, and that only one is impaired in the aged mice. Such inflexibility of mnemonic expression has been proposed as a mouse model of age-related declarative memory decline in humans. Indeed, it represents a specific alteration in the ability to compare and contrast information originating from separate sources and this ability has

²Corresponding author.
E-MAIL a.marighetto@neurocog.u-bordeaux.fr; FAX 33-5-5684-8743.

LEARNING & MEMORY 7:159–169 © 2000 by Cold Spring Harbor Laboratory Press ISSN1072-0502/00 \$5.00

L E A R N I N G & M E M O R Y

www.learnmem.org

159

been considered as a cardinal characteristic of human declarative memory (Cohen 1984). Furthermore, the specificity of this deficit is consistent with the relational theory of hippocampal function (Eichenbaum 1992; Eichenbaum et al. 1994). According to this theory, the neural substrate underlying memory for separate pieces of information (as in successive go-no-go discrimination) is distinct from the hippocampal-dependent one that sustains the construction and storage of relational representations of past experiences. Flexible deployment of memories (as exemplified in the explicit 2-choice discrimination) is critically dependent on the integrity of the latter system centred on the hippocampal formation.

We believe that this mouse model of the preferential loss of declarative memory seen in human senescence might be of particular relevance to preclinical evaluation of potential pharmacological interventions against age-related cognitive disorders. Because the basic components involved in the two stages are essentially identical (in terms of the stimuli presented, the responses required, motivation, and reward magnitude), this design should enable one to evaluate "direct" effects of drugs on cognition without confounding from nonspecific (motivation, affect) factors that could "indirectly" affect cognitive performance. This design should also enable one to discriminate among procognitive drugs, those that specifically affect a form of memory that is altered in our aged subjects from those that possess a more general facilitatory effect on memory. Therefore this model might be useful in selecting from among alternative development candidates. It could also be helpful in evaluating potential mechanisms of cognitive impairment with consequent implications for directing future therapeutical approaches.

The primary objective of our study was to assess the potential value of this novel paradigm in pharmacological research. To this end, we examined the effects of two potential pro-cognitive agents, each targeted at a separate neurobiological process, on this mouse model of age-related cognitive decline.

The first drug, tacrine, was selected here as it represents one of the most popular agents designed to augment cholinergic transmission, a therapeutic route motivated by the classical cholinergic hypothesis of cognitive decline in aging. Supports for this hypothesis have derived from evidence of a cholinergic deficiency in aged animals and humans, as well as in age-related pathological conditions such as Alzheimer's disease (for a review, see Bartus et al. 1985; Gallagher and Colombo 1995). This has led to the development of cholinomimetics as potential therapeutic agents, designed to compensate for the atrophy or loss of basal forebrain cholinergic neurones seen in senescence (Bartus et al. 1985) and related pathologies (Davies and Maloney 1976; Coyle et al. 1983). Among such cholinergic agents, the cholinesterase inhibitor, tacrine, has generated consid-

erable preclinical (for review, see Mohammed 1993) and clinical interests (Qizilbash et al. 1998). Here, we adopted a chronic treatment regime of this drug that has been shown previously to be effective in ameliorating memory performance in rodents (Flood and Cherkin 1988; Itoh et al. 1990; Riekkinen et al. 1991; Kirkby et al. 1996; Pavone et al. 1998).

However, clinical trials have shown that the efficacy of cholinomimetics is often limited and their therapeutic window is relatively narrow. These limitations highlighted the need for the development of alternative pharmacological approaches. Potential targets for novel therapeutic intervention include factors that might influence the activity and/or survival of the cholinergic system as well as other neurotransmitter systems known to undergo alteration during aging. S 17092, the second drug selected in our study, represented such a drug in this category.

S 17092 is a novel inhibitor of prolyl endopeptidase (PEP, EC3.4.21.26). PEP is a member of the serine-protease family that hydrolyzes peptide bonds at the L-proline carboxy terminal. PEP plays an important role in the catabolism of proline-containing peptides such as substance P, arginin-vasopressin, thyrotropin-releasing hormone (TRH), bradykinin, angiotensin, neurotensin, and oxytocin (Wilk 1983). Hence, the action of S 17092 is expected to retard the degradation of a wide range of neuroactive peptides. There are a number of hypotheses suggesting that pharmacological interventions targeted at neuropeptides might be effective treatment for age-related decline.

Firstly, the neuropeptide TRH (among others) has been shown to promote cholinergic function and the release of acetylcholine (Giovannini et al. 1991; Bennett et al. 1997). Secondly, it has been demonstrated that several neuropeptides can promote processes related to functional recovery following CNS damage (Dekker et al. 1987; Pitsikas et al. 1991; Mattioli et al. 1992; Lestage et al. 1998a) and display neurotrophic actions in vitro (Iwasaki et al. 1989; Whitty et al. 1993). Thirdly, a number of neuropeptides are also found to be reduced in aged animals and humans (Buck et al. 1981; Dupont et al. 1981; Wang et al. 1981). For example, deficiencies in substance P and vasopressin have been reported in postmortem studies of cerebral tissue derived from patients with neurodegenerative diseases (Ferrier et al. 1983; Rossor et al. 1986; Beal and Mazurek 1987; Husain and Nemeroff 1990). Hence, peptidergic alterations might play a significant role in age-related cognitive decline.

This suggestion is further supported by evidence for a beneficial effect on mnemonic performance following substance P treatment in aged rats (Hasenöhrle et al. 1990). A similar facilitation has also been seen in patients with Alzheimer's disease following TRH treatment (Mellow et al. 1989, 1993; Molchan et al. 1992) and in volunteer subjects treated with scopolamine (Molchan et al. 1990, 1992). However, the effectiveness of systemic neuropeptidergic treat-

ment is generally viewed with scepticism because of the peptides' relative impermeability through the blood-brain barrier. This is further complicated by the possibility that not one but several neuropeptides might be involved in mnemonic decline associated with aging. Therefore, an agent such as S 17092 that can increase the brain levels of several neuropeptides concomitantly might provide a promising approach. Chronic administration of S 17092 in rodents has been shown to possess beneficial effects on different forms of memory performance (Lépagnot et al. 1996; Lestage et al. 1998b). We further investigated the procognitive effects of this compound at a PEP inhibitory dose (~50% inhibition of cortical PEP activity; Portevin et al. 1996) that has been reported to be behaviorally effective in aged mice (Lépagnot et al. 1996; Lestage et al. 1998b).

The results described here have been previously presented in an abstract form.

RESULTS

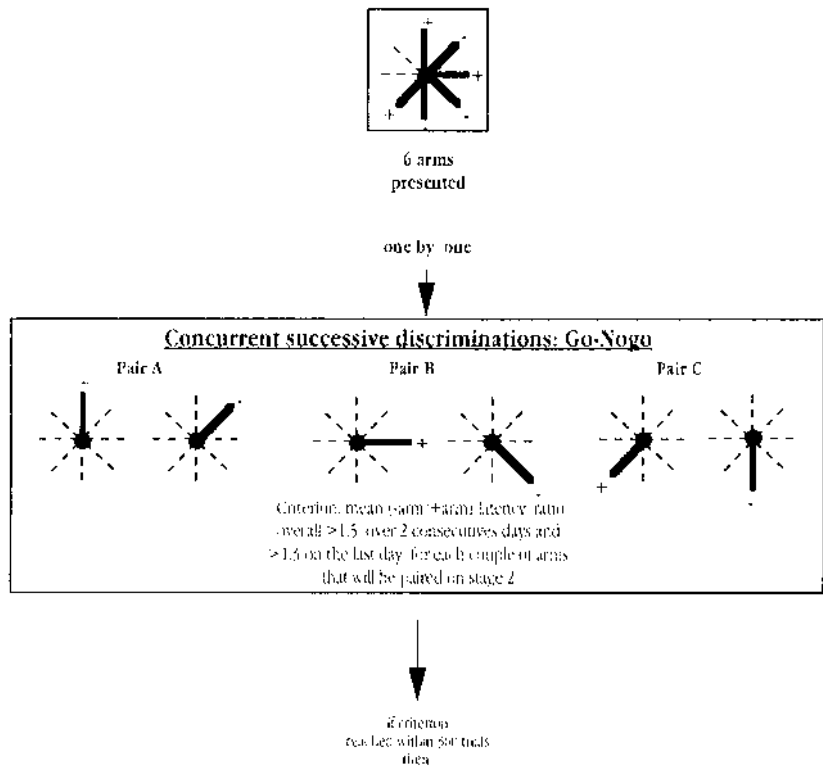
Stage 1

Response Latency

All mice, except two from the vehicle group (which were rejected from further testing and excluded from any analysis) reached the criterion performance required for transition from Stage 1 to Stage 2. As shown in Figure 2, tacrine-treated mice appeared to require less training to attain criterion performance compared to the other two groups. A randomized block one-way ANOVA on the number of sessions to criterion yielded a significant Group effect [$F(2,34) = 3.649$; $P = 0.04$]. However, post-hoc pair-wise comparisons revealed that the difference between the tacrine group and each of the two others failed to reach statistical significance [tacrine vs. vehicle: $P = 0.068$; tacrine vs. S 17092: $P = 0.116$; vehicle vs. S 17092: $P = 0.82$].

The change of the response latencies for the three treatment groups over the initial six sessions of training, and as a function of go and no-go trials, are depicted in Figure 3. In the first session, there was no apparent difference between go and no-go trials regardless of groups. However,

STAGE 1: ACQUISITION



STAGE 2: MODIFIED PRESENTATIONS OF FAMILIAR ITEMS

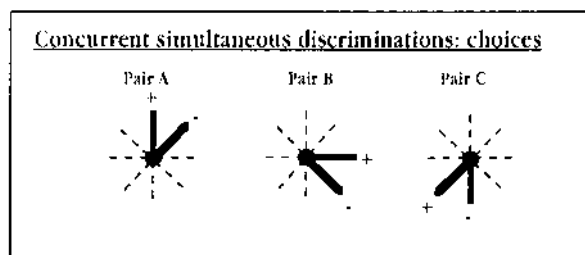


Figure 1 A diagrammatic illustration of the design of the experiment.

both S 17092 and tacrine affected the overall response latency to arm-entry. Whereas tacrine-treated mice took longer than vehicle controls to initiate an entry, S 17092-treated mice were quicker. Furthermore, the response latencies were found to decrease progressively in the tacrine group and to a lesser extent in the vehicle group. In contrast, this measure remained relatively stable across the six first sessions in the S 17092 group. A 3-way ANOVA, with the between-subjects factor, Group and two within-subjects

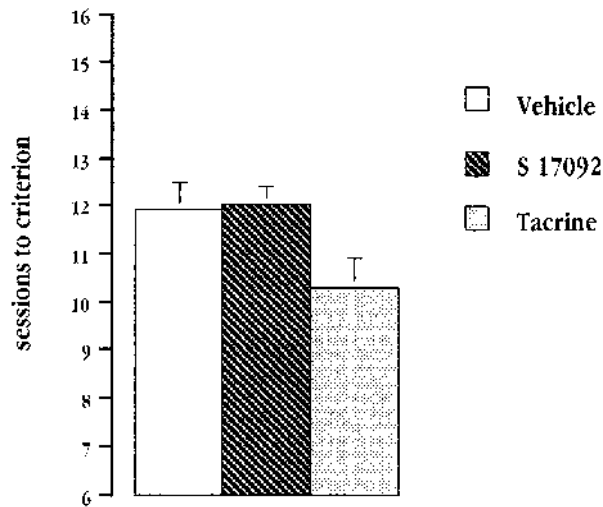


Figure 2 Mean number of sessions to criterion during successive go/no-go discrimination in Stage 1 for vehicle-treated aged controls, and tacrine- or S 17092-treated aged mice.

factors, Reinforcement (positive vs. negative arms) and Session, confirmed these impressions. It revealed a significant effect of Group [$F(2,34) = 23.70$; $P < 0.001$] and of Session [$F(5,170) = 9.60$; $P < 0.001$], as well as their interaction [$F(10,170) = 2.53$; $P = 0.007$]. However, neither the main effect of Reinforcement nor its interactions attained significance (all F 's < 1). Furthermore, the main effect of Group remained significant when any one of the three groups was dropped from the ANOVA.

Over the final six sessions, there was a progressive increment in the difference on response latencies between go and no-go trials in all three groups, suggesting that all animals were able to discriminate between positive and negative arms as training progressed. These impressions were supported by the significant effect of Reinforcement [$F(1,34) = 59.59$; $P < 0.001$] and its interaction with Session [$F(5,170) = 8.37$; $P < 0.001$]. Furthermore, the latency differential between go and no-go trials over the last four sessions appeared to be larger in tacrine-treated mice relative to vehicle controls. A similar but less pronounced trend was also seen in the S 17092 group. This impression was supported by the highly significant Group \times Reinforcement interaction [$F(2,34) = 5.72$; $P = 0.007$]

Further restrictive analysis suggested that this interaction stemmed mainly from the contrast between the tacrine and vehicle groups. The Group \times Reinforcement interaction remained significant when the S 17092 group was dropped from the ANOVA, but not when the tacrine group was removed.

Over the final six sessions of training, tacrine treatment continued to retard the overall latency to initiate an arm-entry, while the opposite effect associated with S 17092 treatment had disappeared. This was supported by post-hoc

pair-wise comparisons (tacrine vs. vehicle or tacrine vs. S 17092, $P < 0.001$; S 17092 vs. vehicle, n.s.).

Run Time

Analyses were also performed on the run time measure (defined as the time necessary to run from the entrance to the food well of an arm) on go and no-go trials. Performance over the first six sessions and the last six sessions was analyzed separately.

Over the first six sessions (Fig. 4A), there was no difference in run times between go and no-go trials (Reinforcement and Reinforcement \times Session: both F 's < 1 , n.s.) but there was a significant decrease in the overall run time over the six sessions [Session: $F(5,170) = 33.33$; $P < 0.001$]. This trend appeared to be similar across groups (Group \times Session: $F < 1$). Both tacrine and S 17092 tended to slightly

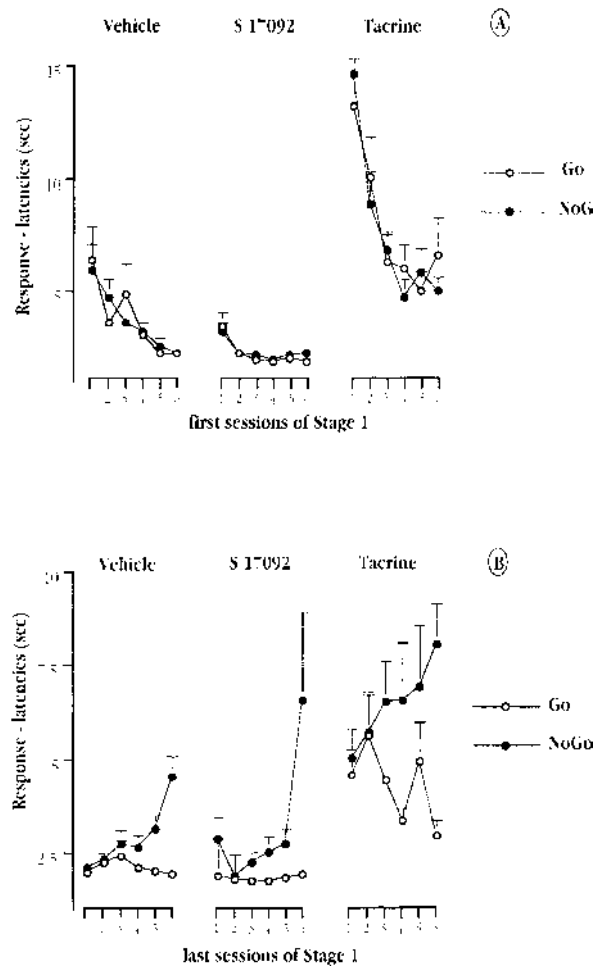


Figure 3 Mean response latency (in sec) to enter the positive (go trials) and negative arms (no-go trials) over the first six (A) and the last six (B) sessions of training prior to reaching criterion in Stage 1, for each of the three groups of aged mice: vehicle, tacrine, and S 17092.

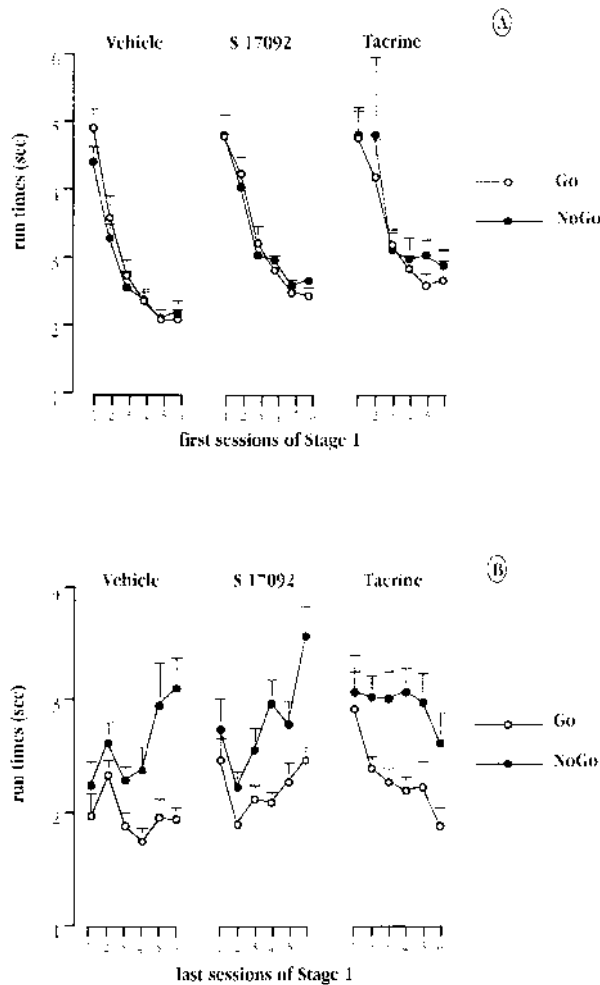


Figure 4 Mean run time (in sec) in positive (go trials) and negative (no-go trials) arms over the first six (A) and the last six (B) sessions of training in Stage 1, for each of the three groups of aged mice: vehicle, tacrine, and S 17092.

increase the overall run time but this failed to yield a significant Group effect [$F(2,34) = 2.79$; $P = 0.075$].

Over the last six sessions (Fig. 4B), the run time on no-go trials was slower than on go trials, and this difference was increased as training progressed. This gave rise to a main effect of Reinforcement [$F(1,34) = 61$; $P < 0.001$] and its interaction with Session [$F(5,170) = 9.16$; $P < 0.001$]. The run time differential between go and no-go trials was of similar magnitude among groups (Group \times Reinforcement: $F < 1$). In these final sessions of Stage 1, there was also no evidence for any between-group difference in terms of overall run speed (Group: $P > 0.15$).

Summary

S 17092 treatment did not significantly affect the acquisition of successive go-no-go discriminations. Neither the rate of

acquisition nor the level of discrimination performance was modified in terms of response latency or run time. The only clear effect of S 17092 was to reduce overall response latency in the first six sessions.

Conversely, tacrine showed some beneficial effects on performance. Tacrine-treated mice attained criterion performance earlier (i.e., with fewer sessions) and their discriminative performance as measured by the differential in arm-entry latencies between go and no-go trials in the final sessions was also enhanced. However, it should be noted that the latter effect might be partly attributed to the near-asymptotic level (of go latencies) seen in the other groups (but not in the tacrine group) at this phase of training. The discriminative performance reflected in the absolute differential in arm-entry latencies in the vehicle and S 17092 groups might have been underestimated due to this floor effect.

Stage 2

Choice Accuracy

When required to make an explicit choice between two arms of opposing valence that were previously experienced separately, vehicle-treated aged mice failed to show any preference for the positive arm. They performed at a level close to chance with a mean (\pm s.e.m.) percent correct of $53.00 \pm 2.84\%$ in the first session and $58.33 \pm 2.99\%$ in the second session. On the other hand, mice treated with S 17092 or tacrine were performing at a superior level (see Fig. 5). S 17092 group was performing at $68.80 \pm 4.19\%$ and $72.50 \pm 2.11\%$, whereas the tacrine group was performing at $65.90 \pm 3.27\%$ and $66.2 \pm 4.03\%$, in the first and second sessions, respectively.

Further pair-wise comparison indicated that the performance of S 17092-treated mice was significantly above that

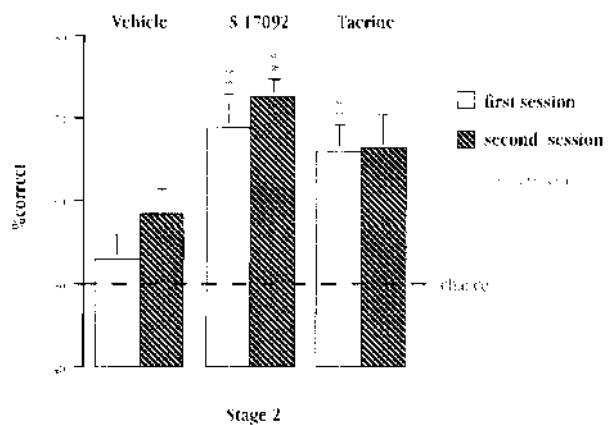


Figure 5 Mean percent correct on each of the two sessions of Stage 2 (three-pair simultaneous discrimination) for each of the three groups of aged mice: vehicle, tacrine, and S 17092.

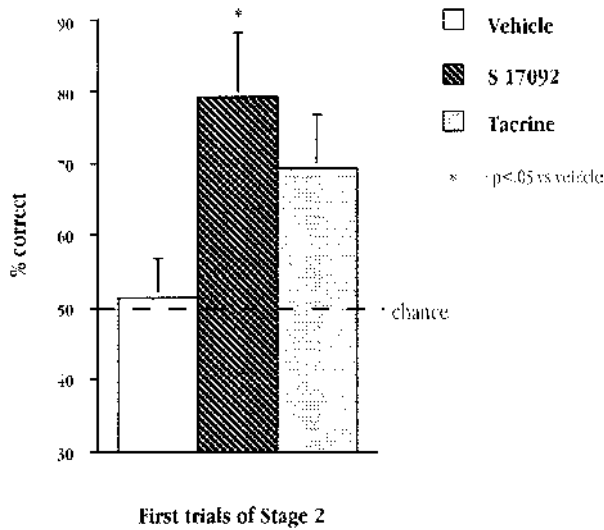


Figure 6 Mean percent correct on the three first trials of Stage 2 (initial exposure to each of the three pairs: A, B, and C) for each of the three groups of aged mice: vehicle, tacrine, and S 17092.

of vehicle-aged controls on both sessions ($P = 0.004$). Although, the present experiment did not consist of a group of young mice, it is interesting to note that our S 17092-treated mice were performing at a level comparable to younger untreated animals (75.1%) from an earlier experiment with identical design (see Fig. 5 of Marighetto et al. 1999). Conversely, the enhancing effect of tacrine was less striking, only attaining significance in the first session ($P = 0.006$ vs. vehicle) but not in the second session ($P = 0.13$ vs. vehicle).

A 2-way (Group \times Session) ANOVA on choice accuracy only yielded a significant effect of Group [$F(2,34) = 6.62$; $P = 0.004$]. This supported the conclusion that both drugs were effective in enhancing choice accuracy in Stage 2.

Supplementary analyses were performed separately on the choice accuracy on the first three trials of the first session. These trials are of particular interest because they comprised the first presentation of each of the three pairs (A, B, and C), i.e., when these pair-wise arrangements were presented to the mice for the very first time.

Analysis of these trials would enable us to determine whether the enhancing effects of the drugs on choice accuracy described above was attributable to improved acquisition of pair discrimination as such, rather than via a flexible deployment of knowledge (individual arm's reward valence) acquired during Stage 1. If so, performance on these initial trials should be close to chance level. However, if the enhancing effects

of the drugs were already apparent in these initial trials, it would support the interpretation that they facilitate flexible transfer of past experience in novel situations.

As shown in Figure 6, the beneficial effects of both drugs on choice accuracy were already visible on these initial pair-wise discrimination trials (mean \pm s.e.m.: 69.21 \pm 6.5% for tacrine, 79.25 \pm 8.6% for S 17092, and 51.47 \pm 6.26% for vehicle). This was confirmed by a one-way ANOVA that yielded a significant effect of Group [$F(2,34) = 3.91$; $P = 0.03$]. However, pair-wise comparisons further revealed that this enhancing effect was only significant for S 17092 treatment ($P = 0.044$ vs. vehicle) but not for tacrine ($P = 0.159$ vs. vehicle).

Response Latency

Figure 7 depicted the response (arm-entry) latency expressed according to whether the response was directed to rewarded (correct response) or non-rewarded (incorrect response) arms as a function of treatment and session. The response latency for go trials and no-go trials in the last session of Stage 1 is also shown in Figure 7 to illustrate the effect associated with the transfer from Stage 1 to Stage 2 on this measure. It can be seen that tacrine treatment again led selectively to a global increase in the latency to initiate an arm entry.

An ANOVA with the factor Group and the two within-subjects factors, Reinforcement (whether the chosen arm was positive or negative) and Session, was performed on the latency measures obtained in the two sessions of simultaneous 2-choice discrimination testing. This revealed a main effect of Group [$F(2,34) = 4.99$; $P = 0.013$] which stemmed mainly from a significant difference between tacrine and vehicle groups ($P = 0.009$). The other pair-wise comparisons failed to attain significance (tacrine vs. S 17092: $P = 0.142$; vehicle vs. S 17092: $P = 0.15$).

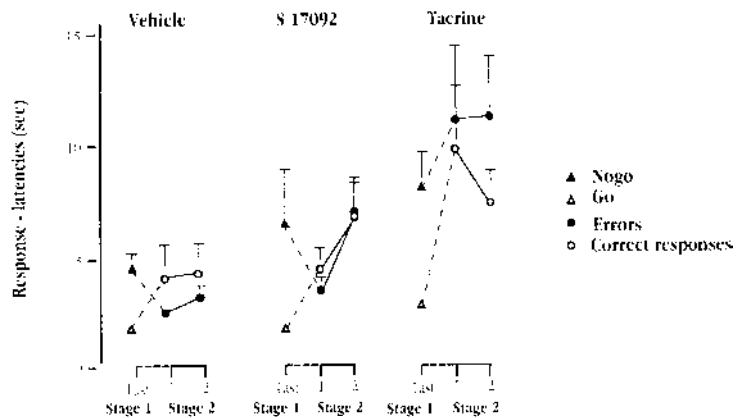


Figure 7 Mean latencies (in sec) to enter the positive and the negative arms (i.e., go vs. no-go trials in stage 1, and correct responses vs. errors in stage 2) over the last session of Stage 1 and the two sessions of Stage 2 (three-pair simultaneous discriminations) for each of the three groups of aged mice: vehicle, tacrine, and S 17092.

This is consistent with the previous (Stage 1) conclusion that tacrine significantly increased response latency. As shown in Figure 7, tacrine also appeared to modify the pattern of response latency as a function of whether the response was correct or not. This impression, however, only received tentative statistical support, with the Group \times Reinforcement interaction approaching, but failing to attain significance [$F(1,34) = 3.05$; $P = 0.06$]. No other effect was statistically significant.

Run Time

The run time measure obtained in Stage 2 was submitted to an ANOVA with the between-subjects factor Group and the two within-subjects factors, Reinforcement and Session (see Fig. 8). This revealed a main effect of Group [$F(2,34) = 3.5$; $P = 0.04$]. Regardless of whether the chosen arms were rewarded or not, S 17092 increased the run time relative to vehicle ($P = 0.006$).

The main effect of Session [$F(1,34) = 7.5$; $P = 0.01$] and of Reinforcement [$F(1,34) = 49.8$; $P < 0.001$] as well as their interaction [$F(2,34) = 4.4$; $P = 0.045$] were also significant. The two main effects were associated with a reduction of run time as a function of Session, and overall shorter run time into positive arms relative to negative ones. The interaction effect arose because the effect of Reinforcement was increased from the first to second session. There was no evidence that these effects were differentially expressed between groups as there was no significant interaction terms involving Group.

Summary

In agreement with our previous data in normal (undrugged) mice (Marighetto et al. 1999), the present results demonstrated that vehicle-treated aged mice successfully discrimi-

nate between arms of opposing valence when these are presented one by one, in a successive go-no-go procedure. This was demonstrated in the final sessions of Stage 1, by the increased readiness of the mice to enter positive arms relative to negative ones (response latencies analysis). Their discriminative performance was also reflected in the run-time differential. However, they failed to translate their preference for the positive arms to correct choices in subsequent simultaneous discriminations (Stage 2).

The main result of this study is that chronic treatment of either S 17092 (10mg/kg per os) or tacrine (3mg/kg s.c.) significantly enhanced choice accuracy (percent correct analysis) relative to controls in Stage 2, although the effects of the two drugs on 2-choice performance were not identical, particularly on the very first trials. Furthermore, the procognitive effect on choice accuracy was not consistently accompanied by a similar effect on discriminative indices based on response latency or run-time. Specifically: (1) tacrine also increased the acquisition speed of go-no-go discrimination as reflected on the no-go/go ratio of arm-entry latencies in Stage 1, whereas S 17092 exhibited no such effect, (2) both tacrine and S 17092 failed to affect the run-time differential in both Stage 1 and Stage 2, despite the fact that this measure of discrimination was altered in control-aged mice, particularly at Stage 2 (Marighetto et al. 1999).

Finally, tacrine consistently increased overall response latency, an effect that persisted throughout the entire experiment, and was particularly pronounced in novel or changed situations (i.e., the initial sessions of Stage 1 or Stage 2). In contrast, an opposite effect of S 17092 on response latency was clearly seen only in the initial sessions of Stage 1. Furthermore, while tacrine failed to affect the overall run time along the arms, S 17092 increased it, even though the latter effect was only apparent in Stage 2.

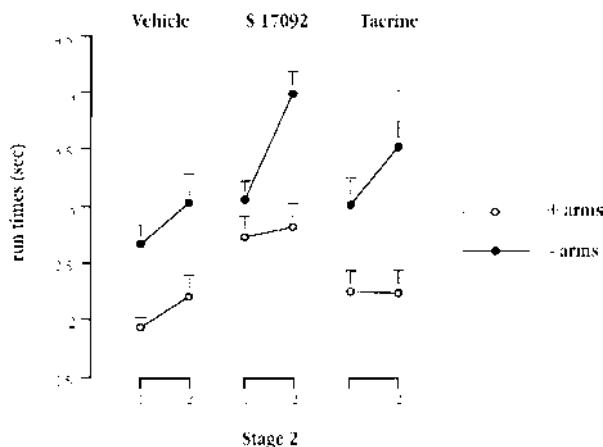


Figure 8 Mean run time (in sec) in positive (correct responses) and negative arms (incorrect responses) over the two sessions of Stage 2 (three-pair simultaneous discriminations) for each of the three groups of aged mice: vehicle, tacrine, and S 17092.

DISCUSSION

The deficit observed in control aged mice (see Marighetto et al. 1999 for a direct comparison between aged and younger adult mice) was specific for one form of memory expression for acquired spatial discriminations. Successful discrimination between arms of opposing valence was obtained when these arms were presented one at a time in a successive go-no-go procedure. This was reflected in the subject's relative response (arm-entry) latency and run time between positive and negative arms. Yet, such demonstrable acquired knowledge failed to guide the aged mice towards the positive arm when confronted with an explicit choice between two arms. In the latter test condition, the acquired knowledge remained undetectable in the subject's choice behavior until the subject has committed an entry. Indeed, once the mouse has entered an arm, its run speed was affected by the valence of the arm as it was in Stage 1, although this form of memory expression was also found to

be reduced in aged mice as compared to younger adults when assessed in choice situations (Marighetto et al. 1999). Based on the theoretical interpretation offered by Eichenbaum et al. (1992, 1994), we have previously suggested that this kind of mnemonic inflexibility seen in the aged mice could be linked to an alteration in the relational processing of incoming/stored information. According to this, the aged mice stored or encoded the experiences during the first learning stage as separate, and therefore, impoverished representations of arm entries. Hence, they lacked the representation of a complex framework incorporating the relative relationships among arms, which normally enables comparisons and contrasts between separately experienced items. This is why they could perform normally when the test situations encourage the storage and use of separate representations of individually experienced items (successive go-no-go discriminations of arms), but failed in test situations that emphasize a judgement of the relative valence between two arms (which involves a comparison between two separate representations). The selectivity of the age-related deficit was therefore in coherence with the relational hypothesis that the system which sustains the acquisition of complex associations among items (relational representations) is dissociated from the one that enables the memorization of separate representations of information based on simple (stimulus-response or stimulus-reward) associations. By showing that choice performance of aged mice could be improved with or without a concomitant enhancement of the successive go-no-go discrimination, the present comparison of the effects associated with tacrine and S 17092 further support this hypothesis.

More specifically, it appeared that S 17092 enhanced choice accuracy in Stage 2 without inducing major changes on other performance indices in Stage 1 or in Stage 2. This led to the conclusion that this drug specifically improved flexible deployment of passed experiences. This interpretation is further supported by the fact that the beneficial effect of S 17092 was readily visible and statistically significant in the initial trials of Stage 2. Within the theoretical framework of relational memory, this flexible deployment of memories can be seen as a result of the acquisition of complex associations among separately experienced items.

In contrast, tacrine affected discriminative performance at both stages of the experiment and its beneficial effect on choice accuracy was not significant in the first trials of Stage 2. These cannot be interpreted as a specific improvement of the flexible deployment of memories in novel situations. This less-specific effect of tacrine might be taken as evidence for the hypothesis that acetylcholine plays a general role in sensory information processing and attention (for review, see Blokland 1996; Sarter and Bruno 1997). This latter interpretation is further supported by the observation that overall response latencies were increased in tacrine-treated mice, and in particular, in novel or

changed situations. Given that tacrine did not affect run time, it appeared that the drug specifically retarded response initiation but not response execution. This suggested that the drug had no effect on locomotion but affected attention or behavioral inhibition processes. Interestingly, S 17092 was effective in modifying the overall response latency in the initial sessions of Stage 1, but the direction of this effect was opposite to that of tacrine. The possible mechanisms that might underlie such a disinhibiting effect are unknown. This is further complicated by the fact that S 17092 slowed down the run speed in Stage 2. Nevertheless, the observation that the two drugs exerted opposite effects on the time parameters while at the same time are both effective in enhancing choice accuracy demands further considerations. Firstly, the effects of tacrine can be seen as evidence for a positive effect on attention that can lead to enhanced choice performance on Stage 2 by aged mice. Secondly, the equally beneficial effect of S 17092 on choice accuracy in Stage 2 indicates that the hypothesized effect on attention of tacrine is not a necessary condition for the amelioration of the specific cognitive impairment experience by our aged mice. Hence, it might be suggested that the two drugs are targeting different neurobiological processes, acting as cognitive enhancers via distinct cognitive processes.

We have observed previously that aging did not alter the go-no-go discriminative performance as measured by response-latency differential, but tended to reduce the differential in run times between positive and negative arms (Marighetto et al. 1999). This latter index was also affected by aging in the 2-choice condition in Stage 2. Our results showed that tacrine enhanced the go-no-go differential in terms of response latency but not in terms of run time, whereas both indices remained unaffected by S 17092. Hence, it is tempting to speculate that the cognitive system that underlies the discriminative performance as measured by run time is, at least partially, dissociable from the one underlying the performance revealed by arm-entry latency. On the one hand, the progressively increasing divergence between the latency to enter positive and negative arms could be considered as following a progressive increment in stimulus-response associations in the form of: "when this particular arm is opened→Go" and "when this one is presented→No go," the progressive increase in the differential run time between positive and negative arms can be viewed as a result of the progressive formation of stimulus-reward associations in the forms of "whenever I am in this particular arm, I would get a food reward," and "whenever I am in that arm, I would not be rewarded."

When our study comparing tacrine and S 17092 and the previous report (Marighetto et al. 1999) comparing normal aged and adult mice are considered together, one might speculate the existence of three distinct behavioral expressions of acquired knowledge concerning the reward va-

lence of individual arms as demonstrated through such a spatial discrimination paradigm. These are represented by (1) the percentage of correct choices in simultaneous discriminations; (2) the relative readiness to make an entry in the successive discrimination procedure; and (3) the relative run speed toward the food well in both procedures.

The different expressions of 2-arm discriminations revealed by the effects of aging and those of drug administration are reminiscent of a triple dissociation of memory systems revealed through a comparative analysis among the effects of hippocampal, striatal, and amygdalar lesions (McDonald and White 1993). Hence, one can speculate that these aspects of mnemonic performance might rely on separate and more or less independent memory systems. The “relational” memory system, sustaining the ability to compare information originating from separate sources, and hence 2-choice discrimination performance, would be impaired by aging but enhanced by tacrine or S 17092. The “habit” memory system, acquiring stimulus-response associations revealed in relative response latencies, would be unaffected by aging and S 17092 but sensitive to the effects of tacrine. The “affective” memory system, sustaining the formation of stimulus-reward associations reflected in run speed, would be largely preserved in aged mice and unaffected by either procognitive agents studied here, although its expression can be compromised in certain conditions (Marighetto et al. 1999). Further studies are needed to test the validity of these hypotheses. A lesion approach would be particularly suited to address these issues concerning the critical anatomical substrates underlying these hypothetically distinct memory systems.

MATERIALS AND METHODS

Subjects and Drugs

Subjects were 48 naive mice of the C57/bl6 Jico inbred strain obtained from IFFA Credo (Lyon, France). They were between the ages of 23 and 25 months at the beginning of the experiment. On arrival, the mice were caged in groups and housed in a climatized animal-keeping room, maintained under a 12:12 light-dark cycle and ad lib food and water. After 4–6 weeks, they were caged singly. Pharmacological treatment commenced a fortnight later.

The mice were divided into three treatment groups: vehicle ($n = 18$), tacrine ($n = 18$) and S 17092 ($n = 12$). Preliminary experiments indicated that tacrine treatment was associated with higher between-subjects variability. Thus, more subjects were included in the tacrine group than in the S 17092 one. In the course of the experiment, eight mice died (1 vehicle, 4 tacrine, and 3 S 17092) and three others (2 vehicle and 1 S 17092) were dropped from further behavioral training (see Behavioral Procedure below). The final group sizes were: vehicle ($n = 15$), Tacrine ($n = 14$) and S 17092 ($n = 8$).

S 17092, at a dose of 10mg/kg, was administered orally whereas tacrine, at a dose of 3mg/kg, was administered subcutaneously. Mice in the vehicle condition, received 10ml/kg of saline either orally ($n = 9$) or subcutaneously ($n = 9$). These relevant drug doses and the chosen routes of administration were established on

the basis of previous reports on the procognitive effects of these compounds (for S 17092: Lépagnot et al. 1996; Lestage et al. 1998b; for tacrine: Flood and Cherkin 1988; Itoh et al. 1990; Riekkinen et al. 1991; Kirkby et al. 1996; Pavone et al. 1998). Tacrine (9 amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine hydrochloride: hydrate) was obtained from Sigma Aldrich (St. Quentin Fallavier, France, product no. A3773). S 17092 was obtained from the Institut de Recherches Internationales SERVIER (IRIS) (Courbevoie, France).

Treatment began one week prior to the beginning of behavioral training. In the first week, the mice were treated daily at ~1600 hrs. From the first day of behavioral training, treatment was administered either 45 min (for tacrine and placebo-oral groups) or 1 hr (for S 17092 and vehicle-subcutaneous) prior to behavioral training.

Food deprivation was introduced progressively over the three days prior to the beginning of behavioral testing. The animals were eventually given a fixed amount of laboratory food chow per day, and their body weight was maintained at a stable level, ~90% of the free feeding weight.

Experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC).

Apparatus

The apparatus was a fully automated, elevated, 8-arm radial maze, located in a quiet testing room enriched with distal cues. Its dimension and construction have been described in full elsewhere (Marighetto et al. 1999). A door was mounted at the entrance to each arm, and a pellet dispenser was installed at the end of each arm. Door movements were controlled by a computer program which also tracked the position of the mouse within the maze continuously via pressure captors underneath the central platform and two pairs of photocell beams installed along each arm. One pair of photocell beams guarded the entrance of the arm, and one just in front of the food well. This enabled a real-time control of the accessibility to the maze arm(s) according to a predetermined test schedule.

Behavioral Procedure

Shaping

The animals were first habituated to the maze over a period of two days. On each of these days, the animals were allowed to move freely in the maze individually until they had collected a reward from each of the eight prebaited arms. Subjects that failed to collect all the food within 15 min on the second day were given one additional session on the same day. Subjects that failed to collect all the food during this extra session within 15 min were dropped from further testing.

Discrimination Tasks

Each subject was separately assigned six adjacent arms. Out of these, three served as positive (baited) arms, and the remaining three as negative (not baited) arms. The relative locations of these arms were such that these six arms could be grouped into three pairs of adjacent arms with opposing valence (see in Figure 1, pairs A,B,C). In addition, it was ensured that if the positive arms of Pairs A and B were on the left, the positive arm of pair C had to be on the right, and vice versa.

As shown in Figure 1, the present experiment consisted of a two-stage paradigm. The only parameter that was changed from Stage 1 to Stage 2 was the way in which the arms were presented

to the mice. As detailed below, the arms were presented one at a time in Stage 1 and in pairs in Stage 2.

Stage 1

In Stage 1, the six arms were always presented one at a time using a go-no-go discrimination procedure. On each trial, the door to one arm (which could be a positive or a negative one) was open, and remained so for a maximum duration of 120 sec; this was later reduced to 20 sec as training progressed. If the subject entered and reached the food well within the allotted time, the door would close as soon as they returned to the central platform. If the subject failed to enter in time, the door would close. If the subject entered the arm but failed to reach the food well in time, the door would close as soon as it returned to the central platform. In all cases, the trial ended as the door closed, and the mouse was confined to the central platform for 5 sec, which constituted the inter-trial interval.

Each daily session consisted of 24 trials with four presentations of each of the six arms according to a pseudo-random sequence.

Training continued until the mice attained criterion performance (as specified below) with respect to each of the three predetermined pairs of arms (Fig. 1, pairs A,B,C). All mice must undergo a minimum of six daily sessions in Stage 1, and mice failing to reach criterion performance in 16 sessions were dropped from further testing. When a mouse attained criterion performance at this stage, it was transferred to Stage 2 testing on the following day.

Two distinct performance indices were used to evaluate the discriminative performance in Stage 1. The first index was based on response latency, defined as the time elapsed from the beginning of the trial (opening of one door) to the moment when the mouse interrupted the photocell-beam at the entrance of the arm. This first index was also mentioned as arm-entry latency. The second index was based on run time, defined as the time elapsed between the interruption of the photocell beam at the arm entrance and interruption of the second photocell beam located in front of the food well. For each predetermined pair of arms of opposing valence (pairs A,C) discriminative performance was measured by: (1) the difference between the medial response latency (per session) to enter the negative arm relative to the positive arm; and (2) the equivalent difference based on run time. Whereas the latter measure enabled us to evaluate the animals' behavior after the initiation of an approach response, the former measure corresponded more closely to the decision-making process of the approach response.

The criterion for transfer from Stage 1 to Stage 2 was based on a ratio between response latency for the negative arm and response latency for the positive arm. This "discriminative ratio" contrasts the readiness of a subject to enter negative arms relative to positive ones. A ratio of unity represents chance performance or no preference. When this ratio is well above unity, it indicates that the subject is more ready to enter the positive arms and/or more reluctant to enter the negative ones. A mouse was considered to have attained criterion performance when its overall discriminative ratio was >1.5 for two consecutive sessions, and provided that the discriminative ratio of each of the three adjacent pairs (A,B,C) was >1.3 on the last session of Stage 1.

Stage 2

This lasted for two consecutive days. The discrimination problems presented in Stage 2 were between the same six arms as those in Stage 1 and the reward valence of each arm also remained unchanged. However, their presentation was modified, namely, the six arms were now grouped into three pairs.

In each trial, the subject was confronted with access to two adjacent arms with opposing valence as depicted in Figure 1 as pairs A, B, or C. A choice was considered to be made when the subject had reached the food well of an arm; this also triggered the closure of the door to the alternative arm. The trial was finished as soon as the subject returned to the central platform. As in Stage 1, the inter-trial interval was 5 sec. Each daily session consisted of 20 consecutive trials comprising of alternating presentations of pairs A, B, and C according to a pseudo-random sequence.

Again, two distinct behavioral indices were used to evaluate discriminative performance. The first measure was choice accuracy in terms of percent correct. The second was the difference between the median run time in the positive and negative arms. Whereas the first measure more closely referred to the decision-making process of an approach/avoidance response, the second measure enabled one to evaluate the animals' behavior after the initiation of an approach response. In addition, the second index also allowed a direct comparison with Stage 1 (successive go-no-go discrimination) performance because the same index was also obtained in Stage 1.

Although they were not used as an index of discriminative performance at this stage, response latencies were also recorded, and still analyzed as a function of whether the chosen arm was positive or negative.

Statistical Analysis

Data were analyzed by analyses of variance (ANOVAs). Each ANOVA always included a between-subject factor, Group, which contrasted the three treatment conditions. Post-hoc pair-wise comparisons were performed using the Scheffe's procedure.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and the Institut de Recherches Internationales Servier. We are very grateful to Dr. Jacques Micheau and Dr. Benjamin K. Yee for their helpful comments on previous versions of the manuscript.

The publication costs of this article were defrayed in part by payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734 solely to indicate this fact.

REFERENCES

- Bartus, R.T., R.L. Dean, M.J. Pontecorco, and C. Flicker. 1985. The cholinergic hypothesis: A historical overview, current perspective, and future directions. *Ann. NY Acad. Sci.* 444: 332-358.
- Beal, M.F. and M.F. Mazurek. 1987. Substance P-like immunoreactivity is reduced in Alzheimer's disease cerebral cortex. *Neurology* 37: 1205-1209.
- Bennett, G.W., T.M. Ballard, C.D. Watson, and K.C.F. Fone. 1997. Effects of neuropeptides on cognitive function. *Exp. Gerontol.* 32: 451-469.
- Blokland, A. 1996. Acetylcholine: A neurotransmitter for learning and memory? *Brain Res. Rev.* 21: 285-300.
- Buck, S.H., P.P. Deshmukh, T.F. Burks, and H.I. Yamamura. 1981. A survey of substance P, somatostatin, and neurotensin levels in aging in the rat and human central nervous system. *Neurobiol. Aging* 2: 257-264.
- Cohen, N.J. 1984. Preserved learning capacity in amnesia: Evidence for multiple memory systems. In *Neuropsychology of memory* (ed. L.R. Squire and N. Butters), pp. 83-103. Guilford Press, New York, NY.
- Coyle, J.T., D.L. Price, and M.R. DeLong. 1983. Alzheimer disease: A disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* 219: 1184-1190.
- Davies, P. and A.J.F. Maloney. 1976. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 2: 1403-1046.

- Dekker, A., W.H. Gispen, and D. De Wied. 1987. Axonal regeneration, growth factors and neuropeptides. *Life Sci.* **41**: 1667-1678.
- Dupont, A., P. Savard, Y. Merand, F. Labrie, and J.R. Boissier. 1981. Age-related changes in central nervous system enkephalins and substance P. *Life Sci.* **29**: 2317-2322.
- Eichenbaum, H. 1992. The hippocampal system and declarative memory in animals. *J. Cognitive Neurosci.* **4**: 217-231.
- Eichenbaum, H., T. Otto, and N.J. Cohen. 1994. The hippocampus—What does it do? *Behav. Neural Biol.* **57**: 2-36.
- Flood, J.F. and A. Cherkin. 1988. Effect of acute arecoline, tacrine and arecoline+tacrine post-training administration on retention in old mice. *Neurobiol. Aging* **9**: 5-8.
- Ferrier, I.N., A.J. Cross, J.A. Johnson, G.W. Roberts, T.J. Crow, J.A. Corsellis, Y.C. Lee, D. O'Shaughnessy, T.E. Adrian, G.P. McGregor, et al. 1983. Neuropeptides in Alzheimer type dementia. *J. Neurol. Sci.* **62**: 159-170.
- Gabrieli, J.D.E. 1996. Memory systems analyses of mnemonic disorders in aging and age-related diseases. *PNAS* **93**: 13534-13540.
- Gallagher, M. and P.J. Colombo. 1995. Aging: the cholinergic hypothesis of cognitive decline. *Curr. Opinion Neurobiol.* **5**: 161-168.
- Giovannini, M.G., F. Casamenti, A. Nistri, F. Paoli, and G. Pepeu. 1991. Effect of thyrotropin releasing hormone (TRH) on acetylcholine release from different brain areas investigated by microdialysis. *Br. J. Pharmacol.* **102**: 363-368.
- Hasenöhrl, R.U., J.P. Huston, and T. Schuurman. 1990. Neuropeptide Substance P improves water maze performance in aged rats. *Psychopharmacol.* **101**: 23-26.
- Husain, N.M. and C.B. Nemeroff. 1990. Neuropeptides and Alzheimer's disease. *J. Am. Geriatr. Soc.* **38**: 918-925.
- Itoh, J., T. Nabeshima, and T. Kameyama. 1990. Utility of an elevated plus-maze for the evaluation of memory in mice: Effects of nootropics, scopolamine and electroconvulsive shock. *Psychopharmacol.* **101**: 27-33.
- Iwasaki, Y., M. Kinoshita, K. Ikeda, K. Takamiya, T. Shiojima. 1989. Trophic effect of various neuropeptides on the cultured ventral spinal cord of rat embryo. *Neurosci. Lett.* **101**: 316-320.
- Kirkby, D.L., D.N.C. Jones, J.C. Barnes, and G.A. Higgins. 1996. Effects of anticholinesterase drugs tacrine and E2020, the 5HT₃ antagonist ondansetron, and the H₃ antagonist thioperamide, in models of cognition and cholinergic function. *Behav. Pharmacol.* **7**: 513-525.
- Lépnagnol, J., C. Lebrun, P. Morain, G. de Nanteuil, and V. Heidet. 1996. Cognition enhancing effects of S 17092, a potent and long acting inhibitor of post-proline cleaving enzyme (PPCE). *Soc. Neurosci. Abst.* **142**.
- Lestage, P., A. Iris-Hugot, M.H. Gandon, and J. Lépnagnol. 1998a. Involvement of nicotinic mechanisms in thyrotropin-releasing hormone-induced neurologic recovery after concussive head injury in the mouse. *Eur. J. Pharmacol.* **357**: 163-171.
- Lestage, P., C. Lebrun, F. Iop, A. Hugot, N. Rogez, P. Greve, D. Favale, M.H. Gandon, O. Rainbault, and J. Lépnagnol. 1998b. S 17092-1, new post-proline cliving enzyme inhibitor: Memory enhancing effect and substance P neuromodulatory activity. In *Behavioural Biology Advance. Progress in Alzheimer's and Parkinson's diseases.* (ed. A. Fischer, I. Hanin, and M. Yoshida), pp. 653-660. Plenum Press, New York, NY.
- Marighetto, A., N. Etchamendy, K. Touzani, C. Cortes-Torrea, B.K. Yee, J.N.P. Rawlins, and R. Jaffard. 1999. Knowing which and knowing what: A potential mouse model for age-related human declarative memory decline. *Eur. J. Neurosci.* **11**: 3312-3322.
- Mattioli, R., R.K.W. Schwarting, and J.P. Huston. 1992. Recovery from unilateral 6-hydroxydopamine lesion of substantia nigra promoted by the neurotachykinin substance P¹⁻¹¹. *Neuroscience* **48**: 595-605.
- McDonald, R.J. and N.M. White. 1993. A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala and dorsal striatum. *Behav. Neurosci.* **107**: 3-22.
- Mellow, A.H., T.S. Sunderland, R.M. Cohen, B.A. Lawlor, L.J. Hill, P.A. Newhouse, M.R. Cohen, and D.L. Murphy. 1989. Acute effects of high-dose thyrotrophin-releasing hormone infusions in Alzheimer's disease. *Psychopharmacol.* **98**: 403-407.
- Mellow, A.H., S.M. Aronson, B. Giordani, and S. Berent. 1993. A peptide enhancement strategy in Alzheimer's disease; Pilot study with TRH/physostigmine infusions. *Biol. Psychol.* **34**: 271-273.
- Mohammed, A.H. 1993. Effects of cholinesterase inhibitors on learning and memory in rats: A brief review with special reference to THA. *Acta. Neurol. Scand.* **49**: 29-35.
- Molchan, S.E., A.H. Mellow, J.L. Hill, H.J. Weingartner, R.A. Martinez, B. Vitiello, and T. Sunderland. 1992. The effects of thyrotrophin-releasing hormone and scopolamine in Alzheimer's disease and normal volunteers. *J. Psychopharmacol.* **6**: 489-500.
- Molchan, S.E., A.H. Mellow, B.A. Lawlor, H.J. Weingartner, R.M. Cohen, M.R. Cohen, and T. Sunderland. 1990. TRH attenuates scopolamine-induced memory impairment in humans. *Psychopharmacol.* **100**: 84-89.
- Pavone, F., F. Capone, M. Battaglia, and M. Sansone. 1998. Shuttle-box avoidance learning in mice: Improvement by combined glucose and tacrine. *Neurobiol. Learn. Mem.* **69**: 204-210.
- Pitsikas, N., B.M. Spruijt, M. Josephy, S. Algeri, and W.H. Gispen. 1991. Effect of ORG 2766, an ACTH(4-9) analogue, on recovery after bilateral transection of the fimbria fornix in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **38**: 931-934.
- Poon, L.W. 1985. Differences in human memory with aging: Nature, causes, and clinical implications. In *Handbook of the psychology of aging* (ed. J. Birren and K.W. Schaie), pp. 427-462. New York, NY.
- Portevin, B., A. Benoist, G. Rémond, Y. Hervé, M. Vincent, J. Lépnagnol, and G. Denanteuil. 1996. New prolyl endopeptidase inhibitors: in vitro and in vivo activities of azabicyclo[2.2.2]octane, azabicyclo[2.2.1]heptane, and perhytroidole derivatives. *J. Med. Chem.* **39**: 2379-2391.
- Qizilbash, N., A. Whitehead, J. Higgins, G. Wilcock, L. Schneider, and M. Farlow. 1998. Cholinesterase inhibition for Alzheimer disease: A meta-analysis of the tacrine trials. Dementia trialists collaboration. *JAMA* **280**: 1777-1782.
- Riekkinen, P.J.R., J. Sirvio, M. Riekkinen, and P. Riekkinen. 1991. Effects of THA on passive avoidance retention performance of intact, nucleus basalis, frontal cortex and nucleus basalis + frontal cortex-lesioned rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **39**: 841-846.
- Rossor, M.N., P.C. Emson, D. Dawbarn, C.Q. Mountjoy, and M. Roth. 1986. Neuropeptide and dementia. *Progr. Brain Res.* **66**: 143-159.
- Sarter, M. and J.P. Bruno. 1997. Cognitive functions of cortical acetylcholine: Towards a unifying hypothesis. *Brain Res. Rev.* **23**: 28-46.
- Schugens, M.M., I. Daum, M. Spindler, and N. Birbaumer. 1997. Differential effects of aging on explicit and implicit memory. *Aging, Neuropsychology and Cognition* **4**: 33-44.
- Wang, Z.P., S.Y. Man, and F. Tang. 1981. Age-related changes in the contents of neuropeptides in the brain and pituitary. *Neurobiol. Aging* **15**: 529-534.
- Whitty, C.J., G. Kapatos, and M.J. Bannon. 1993. Neurotrophic effects of substance P on hippocampal neurons in vitro. *Neurosci. Lett.* **164**: 141-144.
- Wilk, S. 1983. Minireview on prolyl endopeptidase. *Life Sci.* **33**: 2149-2157.

Received December 14, 1999; accepted in revised form April 5, 2000.

IMPLICATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION DES RÉTINOÏDES DANS LA MÉMOIRE RELATIONNELLE ET SES DYSFONCTIONNEMENTS

Les rétinoïdes (métabolite de la vitamine A), en régulant l'expression de nombreux gènes codant pour des protéines neuronales spécifiques, interviendraient dans les processus de plasticité synaptique supposés sous-tendre l'élaboration et la conservation de représentations mnésiques/relationnelles. Cette hypothèse a été éprouvée en utilisant deux modèles physiologiques d'hypofonctionnement de ce signal nucléaire (vieillesse et jeune adulte en carence vitaminique A).

La première partie de ce travail a consisté à valider, dans un labyrinthe radial deux protocoles expérimentaux visant à évaluer de façon sélective chez la souris les processus de mémoire relationnelle et ses dysfonctionnements au cours du vieillissement. Ces deux épreuves comportent chacune deux étapes. L'animal doit d'abord apprendre la valence respective (présence ou non d'un renforcement alimentaire) de 6 bras du labyrinthe. Cet objectif atteint, la deuxième étape vise à modifier le mode de présentation de ces informations. Dans l'ensemble, nos résultats montrent que seules les performances en situation de choix (discriminations simultanées de 2 bras) sont affectées par le vieillissement, qui à l'inverse n'altère pas les performances en discriminations successives (présentation des bras l'un après l'autre). Nous avons mis en évidence chez l'animal hippocampotomisé le même type de déficit.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous montrons 1°) sur le modèle du vieillissement, que la restauration du signal nucléaire contrôlé par les rétinoïdes à un niveau normal d'expression (par un apport exogène d'acide rétinoïque) s'accompagne d'une suppression du déficit mnésique (relationnel) associé 2°) que l'animal jeune carencé en vitamine A (diminution du signal comparable à celle observé chez l'animal âgé) présente le même déficit cognitif que celui observé au cours du vieillissement.

Ces résultats suggèrent une relation fonctionnelle entre la voie de signalisation des rétinoïdes et la fonction mnésique.

MOTS-CLES

mémoire relationnelle, déclarative, vieillissement, PLT, labyrinthe radial, rétinoïdes, vitamine A, carence, récepteurs nucléaires, RAR, RXR, gènes, souris.

INVOLVEMENT OF THE RETINOID SIGNALLING PATHWAY IN THE RELATIONAL MEMORY AND ITS DYSFUNCTIONS

Retinoids, (derivatives of vitamin A) regulate gene expression via their nuclear receptors. They have been implicated in the synaptic plasticity of the hippocampus and might therefore play some role in cognitive functions. We have directly investigated this hypothesis by using two mouse models of retinoid hyposignalling (ageing and vitamin A deficiency in young mice).

We first developed a mouse model of the age-related declarative / relational memory deficit. This consisted of using two-stage paradigms comprising an initial learning phase followed by a test phase in an 8-arm radial maze. We showed that aged mice were able to discriminate normally between three always-rewarded and three never-rewarded arms when they were presented one at a time; conversely they failed in two-choice discrimination trials calling for judgement of the relative valence of the two arms. In another series of experiments, this same type of selective memory deficit was observed in hippocampal-lesioned mice.

In the second part of our study, we showed that 1) administration of retinoic acid to aged mice normalised the level of retinoid signalling in the brain and at the same time completely alleviated their relational memory deficit. The beneficial effect of RA on memory performance was abolished by co-administration of a RAR antagonist. 2) vitamin A deprivation in young mice resulted in a reduction in the level of retinoid signalling (similar amplitude as that seen in aged mice) and induced a selective relational memory impairment similar to that observed in aged mice.

The results suggest the existence of a functional relationship between retinoid signalling in the brain and cognitive functions.

KEY WORDS

relational memory, declarative, ageing, LTP, radial maze, retinoids, vitamin A, deficiency, nuclear receptors, RAR, RXR, genes, mouse.