

THESE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Louis Pasteur (Strasbourg I)
Spécialité : Neurosciences

par

Alexandra BOUR

**Implication d'un dérivé sécrété du précurseur
de la protéine β -amyloïde (sAPP₆₉₅) et de différentes
isoformes de l'apolipoprotéine E humaine (apoE3 et apoE4)
dans les processus mnésiques chez la Souris**

Soutenue publiquement le 10 décembre 2004

Membres du Jury :

Rémy SCHLICHTER	Rapporteur interne
Marie-Christine BUHOT	Rapporteur externe
Benoît MARTIN	Rapporteur externe
Marie-Christine CHARTIER-HARLIN	Membre invité
Chantal MATHIS	Directeur de thèse

Merci...

Ce travail a d'abord commencé au Laboratoire d'Ethologie et de Neurobiologie de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, et je tiens à remercier les Docteurs Arielle Ungerer et Jean-Jacques Roeder de m'avoir accueillie dans leur laboratoire au début de mon DEA.

Au premier jour de l'an 2000, l'aventure continuait au Laboratoire de Neurosciences Comportementales et Cognitives. Merci au Professeur Bruno Will d'avoir accueilli notre petite équipe au sein de la grande famille du LN2C.

Je remercie les Docteurs Marie-Christine Buhot, Marie-Christine Chartier-Harlin et Benoît Martin, ainsi que le Professeur Rémy Schlichter de m'avoir fait l'honneur d'examiner cette thèse malgré leurs lourdes obligations.

Je tiens à remercier particulièrement mon directeur d'équipe Christian Kelche, qui a su intégrer les petites moustaches parmi les grandes, et apporter son expérience scientifique pour guider, conseiller et souvent rassurer l'étudiante que j'étais. Christian, je te souhaite tout le bonheur possible dans tes nouvelles fonctions de directeur de laboratoire, ton humanité restera pour moi exemplaire.

Je tiens à adresser mes remerciements à nos collaborateurs de Lilly à Indianapolis, les Docteurs Sheila Little, Steven Paul et Kelly Bales, sans qui cette thèse n'aurait pu être initiée, ainsi qu'au Docteur Patrick Sullivan pour ses souris transgéniques apoE. Un merci particulier à Jean-Cosme Dodart, qui passait sa thèse à mon arrivée au laboratoire et qui me paraissait déjà « un grand ». Tu es encore un « plus grand » maintenant et je te remercie pour ta disponibilité et tes conseils avisés.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et toute mon admiration envers les membres de l'association Alsace Alzheimer Haut-Rhin, qui, vivant cette terrible maladie au quotidien, ont eu le courage de soutenir notre projet de recherche.

Un panier fleuri rempli de mercis vont à :

Patounette pour nos échanges sur le sens de bien des choses, sur notre avenir et nos angoisses, puissions-nous « progresser » encore longtemps en parallèle... ; Mam' Krieger pour sa bienveillance ; Seb l'homme qui murmurait à l'oreille des ordis ; Olivier notre maître des clefs ; Bernard Neusch, Annabelle, Daniel et Georges qui ont soigné mes petites bêtes ; Elise pour son aide dans les expériences, sa bonne humeur et l'élevage des petites noiraudes à puces ; Monsieur Wolf pour son savoir-faire incomparable ; Simon pour son efficacité, Suzanne pour ses couleurs qui illuminent les couloirs ; Fabounet pour son humour incomparable (surtout à table) ; Alain pour sa bonté et ses (toujours) bonnes idées ; Rodrigue pour m'avoir tant appris ; Marion pour la complicité d'émotions vécues ; Dave pour nos confidences de dessous d'ongles ; Yo pour



l'animation du bureau (souvent aux dépens d'Alex) ; Alex pour l'animation du bureau (à l'insu de ton plein gré mais le plus souvent de ton plein gré !) ; Natalia la discrète et tellement adorable ; Myschaton à qui je souhaite une vie pleine d'au moins autant de rires que ceux qu'on a eus ensemble au labo ; Olivia pour ses ambiances exotiques ; Jeannette pour ton amitié, ta rigueur scientifique et ton aide précieuse, je te souhaite de plonger à chaque seconde dans une vie chatoyante ; Nico pour ton courage d'avoir supporté les deux Alex pendant plus d'un an ; Alexandra pour ta gentillesse et ta disponibilité : t'es une vraie Alexandra ! ; Hélène pour nos petites discussions bien agréables ; Brigitte pour tous tes sourires qui sentent bon le blé noir ; Booboo pour ton humour pimenté ; Monique pour ton punch et pour m'avoir fait aimer l'enseignement ; Karin pour ton éternelle bonne humeur (non, le

pessimisme ce n'est pas toi !); Christine pour tes paroles réconfortantes; Jean-Christophe pour ton brillant; Sarah pour nos discussions qui m'ont permis d'avancer, je te souhaite de trouver le chemin vers la félicité des petits doigts...; Philippe pour m'avoir initiée à la recherche, m'avoir fait connaître tes bombes à eau sympas qu'on met au frigo, et pour tes conseils de passionné de la recherche; Anne et Aude pour leur accueil chaleureux pendant mon stage pratique de dea



et pour leur amitié; Anne, Ekaterina et Virginie pour la chaleur de l'équipe 4; Lilianne pour son dynamisme scientifique; Georges pour ton enthousiasme dans la recherche et dans la vie; Sandra, Myriam et Morgan, qui sont venues s'initier avec enthousiasme aux petites dents de nos souris; Christophe, Hervé et Sami, vous êtes « la relève » qui assurez le renouveau de cette convivialité légendaire du LN2C, et je vous souhaite de réussir vos (diverses...) entreprises.

Tant de souvenirs... merci à tous pour votre chaleur humaine au cours de mon cheminement dans ce labyrinthe initiatique qu'est la thèse, au sein de cette grande famille à laquelle je souhaite une longue vie pleine de découvertes.

Molly, Molly, Molly... Titruc et Bidule, je vous souhaite bon repos et abondance de croquettes vertes. Jo, Isabella, Keaton, ma Lolotte-Lola, Laulau, Didi, Donnes, Morgane, ma Mugs, ma Morveuse et mon bon garçon Oscar, mes petites soupapes de sécurité, je vous ai appris, vous m'avez appris. Continuez à m'apprendre plus encore. J'ai encore soif...

A tous mes amis humains qui se reconnaîtront, entre autres Poya, Cath, Sylvain, Anne, Michel et Marguerite-Marie, Fabien et les autres... je dis merci pour votre soutien et votre amitié sans faille. Merci à Alexandre de m'avoir appréciée, merci à Jean-Claude pour sa vision des choses. Merci au Docteur Coret pour son aide précieuse.

Et enfin Chantal...

Ma directrice de thèse.

D'un petit 'avorton' arrivé en DEA, tu as sculpté ton yearling pour en faire un champion. Avec maîtrise, tact et encouragements, tu m'as aidée à franchir les ponts et les flaques de la science. A force de patience et de persévérance, tu as rendu ton poulain plus musclé, l'as guidé vers l'indépendance sans briser son exubérance. Si le parcours n'était pas sans fautes sur ce grand prix de CSO, « le tour était propre » et tu as su tirer le meilleur de ton petit cheval. Ce sera peut-être un champion de TREC...? Il est par nature un peu froid à la jambe, mais tu en as en tout cas fait une monture fidèle, confiante et au pied sûr.

A ma maman scientifique donc, mais pas seulement et tu le sais bien,

Je dis merci...

à ma maman... ma tendre louve,
à mon papa... que je retrouve,
et à Daniel... que je découvre.

SOMMAIRE

INTRODUCTION

I. <u>La maladie d'Alzheimer</u>	1
1. Historique	1
2. Prévalence et symptômes de la MA	1
3. Aspects neuropathologiques	2
a. Les plaques séniles	2
b. Les dégénérescences neurofibrillaires	3
II. <u>Les rôles centraux de l'APP et de l'apoE dans la maladie d'Alzheimer</u>	4
1. Les formes familiales de la MA : perturbation du métabolisme de l'APP par des mutations génétiques.....	4
a. Les différentes isoformes de l'APP	4
b. Métabolisme de l'APP	5
c. Rôles de l'APP et de ses dérivés.....	7
2. Formes sporadiques	11
a. Les facteurs de risque	11
b. L'apolipoprotéine E.....	15
c. Les effets de l'apoE au niveau cérébral.....	17
III. <u>Buts de la thèse</u>	21
1. Précision des rôles du sAPP dans les processus mnésiques	21
2. Caractériser le comportement des souris transgéniques pour l'apoE.....	22
3. Evaluer les effets du sAPP dans un modèle de déficit cognitif lié à l'âge	23

MATERIELS ET METHODES

I. <u>Sujets d'expérience</u>	24
1. Souris non consanguines	24
2. Souris consanguines et souris transgéniques.....	24
II. <u>Administration des traitements</u>	27
1. Injections sous-cutanées	27
2. Injections intracérébroventriculaires (i.c.v.).....	27
a. Anesthésie.....	27

b. Dispositif d'injection	28
c. Chirurgie stéréotaxique.....	28
d. Préparation des différentes solutions.....	29
e. Procédure d'injection intracérébroventriculaire	30
f. Contrôles histologiques	30
III. <u>Détermination du cycle ovarien</u>	31
IV. <u>Prélèvements sanguins et dosages de corticostérone plasmatique</u>	32
V. <u>Tâches d'apprentissage et de mémoire</u>	33
1. Tâches de reconnaissance d'objet et de reconnaissance spatiale	33
a. Appareil de test	33
b. Objets utilisés	34
c. Déroulement des tests de reconnaissance	34
d. Problèmes rencontrés au cours des tests de reconnaissance.....	37
2. Tâche d'apprentissage opérant en boîte de Skinner	38
a. Restriction alimentaire.....	38
b. Dispositif de conditionnement.....	39
c. Déroulement du test.....	39
3. Tâches dans la piscine de Morris.....	40
a. Dispositif.....	40
b. Déroulement des différents tests	41
c. Représentation graphique de la fréquentation des zones du bassin.....	43
4. Tâche du labyrinthe en Y	44
a. Dispositif.....	44
b. Déroulement du test.....	44
5. Tâche d'évitement passif.....	45
a. Dispositif.....	45
b. Déroulement du test.....	45
6. Détermination du seuil de réactivité aux chocs électriques.....	46
VI. <u>Analyses statistiques</u>	46

CONTRIBUTION EXPERIMENTALE : CHAPITRE I

I. <u>Introduction</u>	48
1. Intérêt et mise au point des tâches de reconnaissance	48
2. Projet de thèse initial	49
II. <u>Problèmes rencontrés dans les tâches de reconnaissance et essais</u> <u>de « remise au point »</u>	50
1. Tâche de reconnaissance spatiale	50
a. Performances des souris femelles	50
b. Comparaison des performances de mâles et de femelles	51
c. Effet des manipulations sur des souris OF1 mâles	52
2. Tâche de reconnaissance d'objet	54
a. Préférence pour un des objets durant la séance d'acquisition	54
b. Utilisation de plus grands objets	56
c. Utilisation de la souche de souris CD1	57
d. Conclusion	59
III. <u>Influence du système de ventilation</u>	59
1. Emergence d'une hypothèse	59
2. Déroulement de l'expérience	60
3. Résultats	61
a. Séance d'habituation à l'enceinte	61
b. Exploration des objets à la séance d'acquisition	62
c. Exploration des objets à la séance de rétention	62
d. Variation des performances d'une série de test à l'autre	62
e. Mesures des paramètres physiques dans les salles de test	63
f. Mesures des paramètres physiques dans les salles d'hébergement	63
g. Dosages de corticostérone	64
4. Conclusion	64
IV. <u>Discussion du chapitre</u>	66

CONTRIBUTION EXPERIMENTALE : CHAPITRE II

I. <u>Introduction</u>	70
II. <u>Effets promnésiants d'une injection post-apprentissage de sAPP₆₉₅</u>	71
1. Déroulement de l'expérience	72
2. Résultats	73
3. Conclusion	73
III. <u>Gradient temporel d'efficacité du sAPP₆₉₅</u>	74
1. Déroulement de l'expérience	74
2. Résultats	75
3. Conclusion	76
IV. <u>Effets du sAPP₆₉₅ sur une forme de mémoire spatiale</u>	76
1. Déroulement de l'expérience	77
2. Résultats	78
3. Conclusion	79
4. Mémoire de la configuration spatiale ou simple mémoire des objets ?	80
a. Expérience de vérification	80
b. Résultats	81
c. Conclusion	81
V. <u>Implication des sAPP dans un apprentissage opérant en boîte de Skinner</u>	82
1. Effet du sAPP sur des déficits induits par la scopolamine	82
a. Déroulement de l'expérience	82
b. Résultats	83
c. Conclusion	84
2. Implication des sAPP endogènes dans les processus de consolidation	85
a. Vérification des performances des souris CD1	85
b. Déroulement de l'expérience	86
c. Résultats	87
d. Conclusion	88
VI. <u>Discussion du chapitre</u>	90
1. L'action des sAPP sur les performances de mémoire	90
2. Implication des sAPP endogènes dans la mémorisation de l'apprentissage	92
3. Modes d'action possibles des sAPP sur les processus mnésiques	93

4. Un effet (indirect ?) du sAPP ₆₉₅ sur le comportement exploratoire 24 h après la séance d'acquisition dans la tâche de reconnaissance spatiale	95
5. Effet propre des injections i.c.v. post-apprentissage sur la performance de reconnaissance d'objet.....	96
6. Effet de la scopolamine sur l'état de santé des souris testées dans un apprentissage opérant en boîte de Skinner	97

CONTRIBUTION EXPERIMENTALE : CHAPITRE III

I. Caractérisation comportementale de souris âgées transgéniques

<u>pour le gène de l'apoE</u>	100
1. Introduction	100
2. Batterie de tests comportementaux.....	103
3. Différents groupes de souris utilisés.....	103
4. Evolution de la masse corporelle des souris.....	104
5. Reconnaissance spatiale	105
a. Déroulement de l'expérience.....	105
b. Résultats	105
6. Test de la piscine de Morris.....	110
a. Vitesse de nage	110
b. Tâche de mémoire de référence (4 j).....	111
c. Test de rétention (probe trial, 1 j).....	112
d. Tâche d'appariement différé (delayed matching-to-place task – 4 j).....	114
e. Plate-forme visible (1 j).....	116
7. Labyrinthe en Y	116
a. Voltage des chocs électriques.....	116
b. Séance d'acquisition dans la tâche du labyrinthe en Y	117
c. Séance de rétention dans la tâche du labyrinthe en Y	118
d. Comparaison des performances des souris « jeunes » et « âgées ».....	119
8. Evitement passif	120
a. Acquisition de la tâche.....	120
b. Rétention de la tâche	120
c. Comparaison des performances des souris « jeunes » et « âgées ».....	121

9. Seuil de réactivité aux chocs électriques	122
II. <u>Effets du sAPP₆₉₅ chez la souris femelle âgée apoE4 dans la tâche de mémoire de référence de la piscine de Morris</u>	123
1. Introduction	123
2. Déroulement de l'expérience.....	124
3. Résultats	125
a. Vitesse de nage	125
b. Tâche de mémoire de référence (4 j).....	125
c. Test de rétention (probe trial, 1 j).....	126
d. Plate-forme visible (1 j).....	127
III. <u>Discussion du chapitre</u>	128
1. Effets mnésiques des allèles humains chez les souris	128
2. Effets non mnésiques des allèles humains chez les souris	131
3. Effets du sAPP ₆₉₅ sur les performances des souris femelles apoE4 âgées.....	133
4. Evaluation des effets du vieillissement : l'avantage d'une batterie de tests.....	135
5. Différences de performances mnésiques entre mâles et femelles	138
6. Absence d'apoE murine vs présence d'apoE humaine.....	139
CONCLUSIONS	
.....	141
BIBLIOGRAPHIE	
.....	144

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1 : Séquences d'acides aminés constituant l'APP chez l'Homme (isoformes 695, 751 et 770) et chez la Souris (exemple de l'isoforme 695)

Figure 2 : Les voies de sécrétion de l'APP

Figure 3 : Séquences d'acides aminés constituant l'apoE humaine (isoformes apoE2, apoE3 et apoE4) et l'apoE murine

MATERIEL ET METHODES

Figure 4 : Création de souris chimères portant un allèle humain de l'apolipoprotéine E

Figure 5 : Création des souris transgéniques pour le gène de l'apolipoprotéine E

Figure 6 : Dispositif d'injection intracérébroventriculaire (i.c.v.)

Figure 7 : Détermination des différents stades du cycle ovarien chez la souris femelle

Figure 8 : Dispositif utilisé pour les tâches de reconnaissance

Figure 9 : Déroulement des tâches de reconnaissance

Figure 10 : Dispositif d'apprentissage opérant en boîte de Skinner

Figure 11 : Dispositif de la piscine de Morris

Figure 12 : Déroulement des tâches dans la piscine de Morris

Figure 13 : La tâche d'évitement actif dans le dispositif du labyrinthe en Y

CONTRIBUTION EXPERIMENTALE : CHAPITRE I

Figure 14 : Indice de reconnaissance d'objet de souris OF1 mâles à différents délais après la séance d'acquisition (adaptée de Dodart et coll., 1997)

Figure 15 : Performances de reconnaissance spatiale à différents délais après l'acquisition chez les souris OF1 mâles et femelles

Figure 16 : Performances de reconnaissance spatiale de souris OF1 mâles et femelles 1h ou 24h après la séance d'acquisition

Figure 17 : Performances de reconnaissance spatiale 1h après la séance d'acquisition chez des souris OF1 mâles soumises à différentes manipulations

Figure 18 : Plan des salles d'expérimentation et animaleries

Figure 19 : Illustration de la variabilité des résultats de reconnaissance d'objet

Figure 20 : Objets utilisés dans l'expérience évaluant l'influence du lieu d'hébergement des souris sur leurs performances de reconnaissance

Figure 21 : Salle d'hébergement (animaleries) et performances de reconnaissance d'objet chez des souris mâles CD1

Figure 22 : Variables physiques mesurées dans les salles d'hébergement des souris (animaleries)

Figure 23 : Niveaux plasmatiques de corticostérone

CONTRIBUTION EXPERIMENTALE : CHAPITRE 2

Figure 24 : Effets d'une injection post-apprentissage de sAPP₆₉₅ sur les performances de reconnaissance d'objet

Figure 25 : Effets d'injections de sAPP₆₉₅ effectuées à différents délais post-apprentissage sur les performances de reconnaissance d'objet au délai de rétention de 24h

Figure 26 : Effets d'injections i.c.v. de sAPP₆₉₅ sur les performances de reconnaissance spatiale au délai de rétention de 24h

Figure 27 : Performances de reconnaissance spatiale (RS) ou de reconnaissance d'objet (RO), 24h après une séance d'acquisition de 15 mn avec 5 objets différents

Figure 28 : Effets du sAPP₆₉₅ sur les déficits induits par la scopolamine dans la tâche d'apprentissage opérant

Figure 29 : Performances des souris de souche CD1 dans la tâche d'apprentissage opérant

Figure 30 : Effets d'anticorps dirigés contre les sAPP sur les performances d'apprentissage opérant

CONTRIBUTION EXPERIMENTALE : CHAPITRE 3

Figure 31 : Evolution de la masse corporelle des souris entre le début et la fin de la période expérimentale

Figure 32 : Activité locomotrice dans l'enceinte de test pendant la tâche de reconnaissance spatiale

Figure 33 : Exploration totale des objets pendant la tâche de reconnaissance spatiale

Figure 34 : Exploration des objets déplacés et non déplacés lors des séances d'acquisition et de rétention de la tâche de reconnaissance spatiale

Figure 35 : Indice de reconnaissance spatiale

Figure 36 : Comparaison des performances de reconnaissance spatiale des cohortes "jeune" et "âgée"

Figure 37 : Performances d'apprentissage de la tâche de mémoire de référence dans la piscine de Morris (4j)

Figure 38 : Performances des différentes lignées lors du test de rétention

Figure 39 : Temps passé dans le quadrant cible lors du test de rétention

Figure 40 : Fréquentation du bassin durant le test de rétention

Figure 41 : Distance parcourue pour rejoindre la plate-forme dans le protocole d'appariement différé (DMP) du test de la piscine de Morris

Figure 42 : Distance parcourue pour rejoindre la plate-forme visible

Figure 43 : Essais nécessaires pour atteindre le critère dans la tâche d'évitement actif dans le labyrinthe en Y

Figure 44 : Erreurs commises durant la séance d'acquisition de la tâche d'évitement actif dans le labyrinthe en Y

Figure 45 : Erreurs commises durant la séance de rétention de la tâche d'évitement actif dans le labyrinthe en Y

Figure 46 : Comparaison des performances de rétention des cohortes "jeune" et "âgée" dans la tâche d'évitement actif

Figure 47 : Performances des différentes lignées dans la tâche d'évitement passif (sexes confondus)

Figure 48 : Performances des différentes lignées dans la tâche d'évitement passif (sexes séparés)

Figure 49 : Performances d'apprentissage de la tâche de mémoire de référence dans le test de la piscine de Morris (4j)

Figure 50 : Performances des différents groupes lors du test de rétention

Figure 51 : Temps passé dans le quadrant cible durant le test de rétention

Figure 52 : Fréquentation du bassin durant le test de rétention

Figure 53 : Distances parcourues pour rejoindre la plate-forme visible

CONCLUSIONS

Figure 54 : Tableau récapitulatif

Introduction

I. La maladie d'Alzheimer

1. Historique

Au début du XX^{ème} siècle, la démence du sujet âgé était considérée par la majorité des psychiatres comme liée à l'usure « normale » du temps. Un médecin psychiatre allemand, Aloïs Alzheimer, exposa en 1906 le cas clinique d'une de ses patientes de 51 ans, Auguste D., souffrant d'une altération progressive de ses capacités de compréhension et de mémoire, d'hallucinations, de confusion mentale et d'une inaptitude psychosociale (Maurer et coll., 1997). A l'examen *post-mortem*, le cerveau de cette patiente a révélé deux types de lésions corticales : des enchevêtrements de fibrilles intracellulaires nommés dégénérescences neurofibrillaires et des plaques séniles caractérisées par le dépôt d'une substance particulière. En 1910, l'appellation « maladie d'Alzheimer » (MA) est employé pour la première fois par Ernest Kraepelin pour caractériser cette démence neurodégénérative du sujet âgé, pouvant parfois atteindre le sujet de moins de 60 ans. Aujourd'hui encore, seule la présence des deux types de lésions cérébrales permet de diagnostiquer avec certitude une MA.

2. Prévalence et symptômes de la MA

En raison du vieillissement de la population, la MA, forme de démence la plus répandue, est devenue une priorité de Santé publique. A titre d'exemple, le nombre de personnes touchées par la MA atteindrait environ 500 000 personnes en France, et 4,5 millions de personnes aux Etats-Unis (Dartigues et coll., 2002 ; Hebert et coll., 2003). La prévalence de la MA augmente avec l'âge : elle est de 0,6 % entre 65 à 69 ans et atteint 22,2 % après 90 ans (Dartigues et coll., 2002).

La MA se caractérise sur le plan clinique par l'apparition progressive de troubles des fonctions supérieures (Rigaud et Forette, 2002), dont l'évolution inexorable conduit à un état démentiel en 5 à 10 ans en moyenne. Au cours de la maladie, les capacités mnésiques s'altèrent progressivement, sans que la plainte mnésique du patient soit proportionnelle au déficit : le patient est souvent inconscient de ses troubles (anosognosie) ou les minimise. Les troubles mnésiques concernent d'abord les faits récents (détails de la vie quotidienne, emplacement d'objets, noms de personnes peu familières), puis les faits anciens (personnages connus, dates historiques, dates d'anniversaire, etc.). La désorientation spatio-temporelle des

patients au début de la maladie est liée à l'atteinte précoce et massive de la mémoire épisodique. Cette forme de mémoire permet d'enregistrer, de conserver et de récupérer les informations concernant un événement acquises dans un contexte spatio-temporel donné (Almkvist, 1996 ; Adelstein et coll., 1992, Dubois et coll., 1997). L'évolution de la maladie induit une perturbation des fonctions exécutives (pensée abstraite, planification, organisation dans le temps, contrôle des comportements complexes) et des troubles du langage (aphasie) conduisant à une altération de la compréhension. Apparaissent également les incapacités à faire certains gestes (apraxies), à reconnaître les objets (agnosie) ou les visages (aprosognosie). A un stade avancé de la maladie, le patient peut être atteint de troubles moteurs voire de crises d'épilepsie. Les patients ont fréquemment des troubles du comportement précoces et divers : troubles de la motivation (apathie, désintérêt, indifférence affective), anxiété, dépression, idées délirantes (hallucinations, jalousie), agitation verbale, vocale ou motrice (déambulation, comportements compulsifs, agressivité), etc.

3. Aspects neuropathologiques

Depuis la découverte des plaques séniles par Emil Redlich en 1898 et la description des dégénérescences neurofibrillaires par Alzheimer en 1907, la recherche sur la MA progresse de façon significative et surtout depuis les années soixante. C'est à cette époque que sont caractérisées au niveau ultrastructural ces lésions caractéristiques de la MA.

a. Les plaques séniles

Les plaques séniles ou neuritiques sont formées par des dépôts de fibrilles amyloïdes, nommées ainsi en raison de leurs propriétés physicochimiques ressemblant à celles de polysaccharides. Les fibrilles sont constituées de protéine β -amyloïde ($A\beta$) d'une longueur de 40 ou 42 acides aminés (respectivement $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$) et sont entourées de neurites dystrophiques, de cellules microgliales et astrogliales réactives (Selkoe, 2004). La plus grande partie de l' $A\beta$ formant les plaques neuritiques est sous la forme de fibrilles insolubles, qui peuvent être révélées par une coloration au rouge Congo ou à la thioflavine-S. Ces fibrilles sont mélangées à un réseau informe constitué d' $A\beta$ sous forme non fibrillaire, pouvant être mise en évidence par immunohistochimie. Cette technique permet de révéler l'existence de plaques « diffuses », constituées de dépôts non fibrillaires (préamyloïdes) d' $A\beta_{1-42}$. Cette forme du peptide est la plus encline à l'agrégation, comparée à l' $A\beta_{1-40}$ moins hydrophobe. Il

semblerait donc que l'A β ₁₋₄₂ soit la première à former des fibrilles insolubles (Iwatsubo et coll., 1994). Il existerait un continuum entre les deux types de plaques, neuritiques et diffuses. Les taux relatifs des formes fibrillaires et non fibrillaires de l'A β seraient liés au niveau d'altération neuritique et à l'activation gliale dans l'environnement des plaques (Selkoe, 2004). Ainsi, les plaques neuritiques seraient plus dommageables que les plaques diffuses, sur le plan de la sévérité des déficits cognitifs qu'elles engendrent (Cummings et coll., 1996). En effet, des individus âgés peuvent présenter une charge importante en A β dans le cerveau sous forme de plaques diffuses et présenter des performances cognitives normales (Näslund et coll., 2000).

b. Les dégénérescences neurofibrillaires

Les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) désignent des agrégats de matériel fibrillaire anormal dans le cytoplasme des neurones. A l'observation de ces lésions en microscopie électronique, apparaissent des paires de filaments appariés en hélice (PHF pour *paired helical filament* ; Kidd, 1963) qui sont principalement composés d'une protéine associée au cytosquelette, la protéine tau. Cette protéine est normalement capable de promouvoir l'assemblage des microtubules et d'en réguler la stabilité. La protéine tau joue un rôle essentiel au niveau des axones en étant impliquée dans le transport antérograde des substances. Dans le cerveau normal, l'équilibre entre phosphorylation et déphosphorylation de la protéine tau module la stabilité du cytosquelette et, par conséquent, la morphologie axonale. L'hyperphosphorylation de la protéine tau (Iqbal et coll., 1986) provoque une diminution de l'affinité de la protéine pour la tubuline, donc une déstabilisation du cytosquelette et une accumulation de protéine tau sous la forme de PHF dans le cytoplasme (Maccioni et coll., 2001 ; Mandelkow et Mandelkow, 1998). Les DNF se forment en particulier dans la MA, mais peuvent également survenir suite à une mutation du gène de la protéine tau (sur le chromosome 17 humain), par exemple dans la démence fronto-temporale (Hardy et coll., 1998) dans laquelle on n'observe pas de dépôts amyloïdes. Les DNF surviennent également au cours du vieillissement normal (Mukaetova-Ladinska et coll., 1996 ; Davis et coll., 1999 ; Delacourte et coll., 1999). Il est probable que la formation des DNF au cours de la MA soient une réponse cytologique des neurones à l'accumulation graduelle de protéine β -amyloïde. Cette hypothèse est étayée par des résultats obtenus récemment chez des souris transgéniques développant des plaques amyloïdes avec l'âge et

exprimant une forme humaine de la protéine tau : le dépôt d'A β chez ces animaux semble précéder la formation des DNF, que les souris expriment ou non une forme mutée de la protéine tau (Kurt et coll., 2003 ; Oddo et coll., 2003). Il se pourrait que ce soit principalement le stress oxydatif (lié ou non au dépôt d'A β) qui soit à l'origine de l'hyperphosphorylation de la protéine tau (Smith et coll., 2002 ; Perry et coll., 2002). De façon générale, l'augmentation du niveau de stress oxydatif avec le vieillissement ou lors d'un processus pathologique, pourrait être à l'origine de l'apparition des DNF et des plaques séniles (Benzi et Moretti, 1995 ; Joseph et coll., 2001).

II. Les rôles centraux de l'APP et de l'apoE dans la maladie d'Alzheimer

Bien que la grande majorité des cas de MA soit d'origine sporadique, il existe de rares cas familiaux où la MA se transmet de façon quasi systématique et se déclenche précocement (avant 60 ans). L'étude de ces familles a conduit à la découverte de mutations sur le gène du précurseur de la protéine β -amyloïde (APP), cloné pour la première fois en 1987.

1. Les formes familiales de la MA : perturbation du métabolisme de l'APP par des mutations génétiques

Plusieurs mutations de l'APP et des protéines nommées présénilines (PS) ont été découvertes et sont responsables de formes héréditaires de MA à développement précoce et à transmission autosomale dominante (Tanzi et coll., 1996). Ces mutations perturbent le métabolisme de l'APP, dont le clivage protéolytique anormal ou excessif conduit à l'accumulation de protéine β -amyloïde (A β) dans le cerveau.

a. Les différentes isoformes de l'APP

L'APP est une glycoprotéine transmembranaire dont le gène se situe sur le chromosome 21 humain. Ce gène code pour plusieurs isoformes de l'APP membranaire (mAPP), de 365 à 770 acides aminés, obtenues par épissage alternatif de l'ARN messager (Rossner et coll., 1998). Ces isoformes de mAPP contiennent toutes la séquence de 39 à 43 acides aminés correspondant à l'A β retrouvée dans les plaques séniles. Les isoformes principales, que sont l'APP₆₉₅, l'APP₇₅₁ et l'APP₇₇₀, diffèrent structuralement par leur nombre d'acides aminés, et par la présence ou non d'une séquence analogue des inhibiteurs de protéase



Séquence APP murin isoforme 695

1 mlpslallll aawt ralev ptdgnaglla epqiamfcg lnmhmvqng kw sdpstgk
 61 tci tkegil qycqevpel qitnvveanq pvtiqnwckr grkqckth h n vipyrclvg
 121 efvsdallvp dkckflhqer mdvcethlhw htvaketcse kstnlhdygm llpcgidkfr
 181 gvefvccpla eesd vdsad aeedsdvww ggadtdyadg edkvvevae eeeva veee
 241 eaddded ed gdeveeeae pyeatertt s iatntttt esveevvr vp ttaastpdav
 301 dkyletpgde nehahfqak erleakh rer ms qvmrewee aerqaknlpk adkkaviqhf
 361 qekvesleqe aanerqqlve thmarveaml ndrirlalen yitalqavpp r p hvfnmlk
 421 kyvraeqkdr qhtlkhfehv rmvdpkkaaq irsqvmthlr viyermnqsl sllynvpava
 481 eeiqdevdel lqkeqnysdd vlnmisepr isygdalmp sltetkttve llpvngfsl
 541 ddlqpwh fg dsvpanten evvpdarpa adrglttrpg sgltniktee iver mdaef
 601 rhdsqevh qklvffaevd gsnkqaiql mvqqvviatv ivitlvmlkk kqytsihhg
 661 vevdaavtpe erhlskmqgn gyenptykff eqmqn

Séquence APP humain isoforme 695

1 mlpglallll aawtaralev ptdgnaglla epqiamfcgr lnmhmvqng kwdsdpstgk
 61 tcidtkegil qycqevpel qitnvveanq pvtiqnwckr grkqckthph fvipyrclvg
 121 efvsdallvp dkckflhqer mdvcethlhw htvaketcse kstnlhdygm llpcgidkfr
 181 gvefvccpla eesdnvdsad aeedsdvww ggadtdyadg sedkvvevae eeveaevee
 241 eadddedded gdeveeeae pyeatertt siatntttt esveevvr vp ttaastpdav
 301 dkyletpgde nehahfqak erleakh rer ms qvmrewee aerqaknlpk adkkaviqhf
 361 qekvesleqe aanerqqlve thmarveaml ndrirlalen yitalqavpp rprhvfmlk
 421 kyvraeqkdr qhtlkhfehv rmvdpkkaaq irsqvmthlr viyermnqsl sllynvpava
 481 eeiqdevdel lqkeqnysdd vlnmisepr isygdalmp sltetkttve llpvngfsl
 541 ddlqpwhsfg adsvpant en evvpdarpa adrglttrpg sgltniktee iver mdaef
 601 rhdsqevvh qklvffaevd gsnkqaiql mvqqvviatv ivitlvmlkk kqytsihhg
 661 vevdaavtpe erhlskmqgn gyenptykff eqmqn

Séquence APP humain isoforme 751

1 mlpglallll aawtaralev ptdgnaglla epqiamfcgr lnmhmvqng kwdsdpstgk
 61 tcidtkegil qycqevpel qitnvveanq pvtiqnwckr grkqckthph fvipyrclvg
 121 efvsdallvp dkckflhqer mdvcethlhw htvaketcse kstnlhdygm llpcgidkfr
 181 gvefvccpla eesdnvdsad aeedsdvww ggadtdyadg sedkvvevae eeveaevee
 241 eadddedded gdeveeeae pyeatertt siatntttt esveevvr ev cseqaetgpc
 301 ramisrwyfd vteqkcapff vggqgnrnn fdteeycmav qsa lptta stpdavdkyl
 361 etpgdeneha hfqkakerle akh rerms qv mreweeaerq aknlpkadkk aviqhfqekv
 421 esleqeane rqlvethma rveamlndrr rlalenyita lqavpprrh vfnmlkkyvr
 481 aeqdrqhtl khfehrmvd pkkaaqirsq vmthlrviye rnmqslsly nvpavaeeiq
 541 devdellqke qnysddvlan miseprisyg ndalmpslte tkttvellpv ngefslldlq
 601 pwhsfgadsv pantenevvp vdarpaadrg lttrpgsglt nikteeisev k mdaefrhds
 661 qyevhhqklv ffaedvgsnk qaiqlmvqq vviatv vitlvmlkkkqyt sihhgvvevd
 721 aavtpeerhl skmqngyen ptykffeqm n

Séquence APP humain isoforme 770

1 mlpglallll aawtaralev ptdgnaglla epqiamfcgr lnmhmvqng kwdsdpstgk
 61 tcidtkegil qycqevpel qitnvveanq pvtiqnwckr grkqckthph fvipyrclvg
 121 efvsdallvp dkckflhqer mdvcethlhw htvaketcse kstnlhdygm llpcgidkfr
 181 gvefvccpla eesdnvdsad aeedsdvww ggadtdyadg sedkvvevae eeveaevee
 241 eadddedded gdeveeeae pyeatertt siatntttt esveevvr ev cseqaetgpc
 301 ramisrwyfd vteqkcapff vggqgnrnn fdteeycmav qsa mqsl kttqeplard
 361 pvkl lpttaas tpdavdkyle tpgdenehah fqkakerlea kh rerms qvm reweeaerqa
 421 knlpkadkka viqhfqekve sleqeaneer qqlvethmar veamlndrrr lalenyital
 481 qavpprrhv fnmkkyvra eqkdrqhtlk hfehvrmdp kkaaqirsq mthlrviyer
 541 mnqslslyln vpavaeeiq evdellqkeq nysddvlanm isepris ygn dalmpsltet
 601 kttvellpvn gefslldlqp whsfgadsv antenevvp darpaadrgl ttrpgsgltn
 661 ikteeisevk mdaefrhdsq yevhhqklvf faedvgsnkq aiqlmvqqv vviatv vitlvmlkkkqyts
 721 vmlkkkqyts ihhgvevda avtpeerhls kmqngyenp tykffeqm n



Homo sapiens

Figure 1 : Séquences d'acides aminés constituant l'APP chez l'Homme (isoformes 695, 751 et 770) et chez la Souris (exemple de l'isoforme 695)

Zones vertes : domaine KPI présent dans les isoformes 751 et 770
 Zones rouges : différences Homme/Souris
 Zones bleues : polymorphismes des isoformes humaines
 Souligné : séquence correspondant à la protéine β-amyloïde de 40 ou 42 acides aminés
 Encadré gras : séquence RERMS responsable des effets trophiques (Mileusnic et coll., 2000)

à sérine (domaine KPI pour *Kunitz-like Protease Inhibitor*) (voir **figure 1**). Alors que la forme neuronale prépondérante est l'APP₆₉₅ dépourvue de domaine KPI, les isoformes APP₇₅₁ et APP₇₇₀ possédant un domaine KPI sont exprimées majoritairement dans les tissus périphériques et par les cellules gliales du cerveau (LeBlanc et coll., 1991 ; Rohan de Silva et coll., 1997 ; Selkoe, 1998). La maturation de l'APP (O-glycosylations, N-glycosylations et tyrosyl-sulfatations) s'effectue au cours de son trajet vers la membrane plasmique par le réseau trans-golgien.

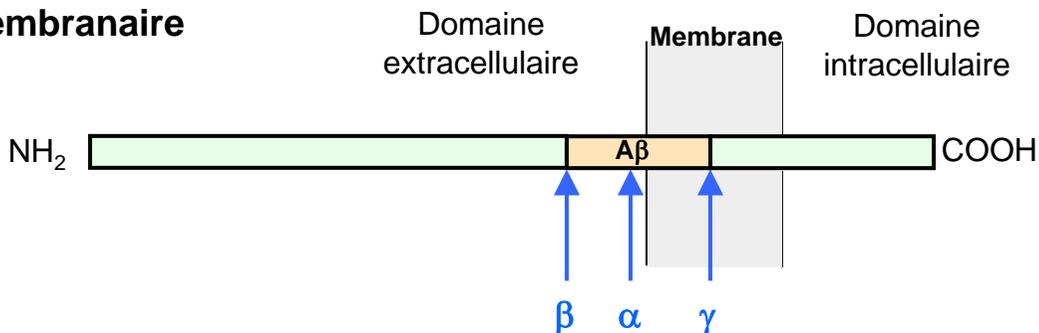
L'APP fait partie d'une famille de protéines comprenant également des APLP (pour *amyloid precursor-like proteins*) très conservée sur le plan de l'évolution (Coulson et coll., 2000 ; Daigle et Li, 1993 ; van den Hurk et coll., 2001). Chez l'Homme et chez la Souris il existe en plus de l'APP, une APLP1 et une APLP2, alors que chez des invertébrés comme la *Drosophila melanogaster* ou le *Coenorhabditis elegans*, il n'existe qu'un seul membre de la famille des APP, respectivement l'APLL et l'APL-1 pour ces deux espèces. Ceci laisse à penser que l'APP et les APLP dériveraient d'un seul gène ancestral commun (Coulson et coll., 2000). L'APP et les APLP possèdent des propriétés fonctionnelles redondantes (par exemple : Bush et coll., 1994), ce qui explique la viabilité de souris *knock-out* pour un seul, voire deux, des gènes des protéines membres de la famille de l'APP. En effet, la double mutation est létale lorsqu'elle implique à la fois le gène de l'APP et celui de l'APLP2, supposant une forte homologie fonctionnelle de ces deux protéines (von Koch et coll., 1997). Néanmoins, ces deux protéines possèdent également des rôles physiologiques distincts, car les doubles mutants pour l'APLP1 et l'APP ou pour l'APLP1 et l'APLP2 montrent des phénotypes clairement différents, respectivement viable et létal (Heber et coll., 2000).

b. Métabolisme de l'APP

Les sécrétases

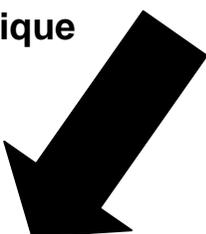
L'APP membranaire peut être clivé au niveau de trois sites endoprotéolytiques, par trois activités enzymatiques : les α -, β - et γ -sécrétases (voir pour revue : Mills et Reiner, 1999) (voir **figure 2**). Traditionnellement, les différentes voies de sécrétion sont qualifiées d'amyloïdogéniques, si elles génèrent de l'A β , ou de non amyloïdogéniques, si elles n'en génèrent pas (Checler et coll., 2002). L'équilibre entre la production et la dégradation du

APP membranaire



Voie non amyloïdogénique

**α-sécrétase
(et γ-sécrétase)**



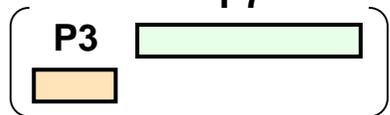
sAPP α



P10



P7

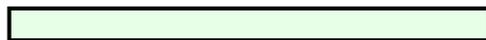


Voie amyloïdogénique

γ et β-sécrétases



sAPP β



**Protéine
β-amyloïde**



P7

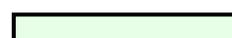


Figure 2 : Les voies de sécrétion de l'APP

La voie non-amyloïdogénique conduit à la sécrétion de sAPP α et de peptide P10 par l'activité α -sécrétase, et éventuellement des peptides P7 et P3 par l'activité γ -sécrétase. La voie amyloïdogénique conduit à la formation de sAPP β par l'activité β -sécrétase, puis l'activité γ -sécrétase conduit à la formation de la protéine β -amyloïde (A β) et de peptide P7.

peptide A β se stabilise dans les conditions normales à un seuil en dessous duquel le peptide reste soluble. Le dérèglement de cet équilibre peut conduire à l'accumulation d'A β .

La voie non amyloïdogénique fait intervenir une activité α -sécrétase qui coupe le mAPP au milieu de la séquence correspondant à l'A β , permettant ainsi la sécrétion dans l'espace extracellulaire d'une forme sécrétée de l'APP, le sAPP α . Ce clivage peut avoir lieu au sein du réseau trans-golgien ou bien au niveau de la membrane plasmique, puis le sAPP α est libéré dans l'espace extracellulaire. Le fragment C-terminal de l'APP restant, nommé P10 (10 acides aminés), peut être clivé par l'activité γ -sécrétase pour générer deux fragments P7 et P3 (respectivement 3 et 7 acides aminés). Cette voie de sécrétion ne produit donc pas de protéine β -amyloïde. A ce jour, plusieurs α -sécrétases de la famille des ADAM (pour *a disintegrin and metalloprotease*) ont été identifiées : ADAM 10, ADAM 17 (appelée aussi TACE pour *tumor necrosis factor α converting enzyme*) ou encore MDC9. Ces métalloprotéases sont généralement impliquées dans la coupure de protéines transmembranaires (Buxbaum et coll., 1998 ; Lammich et coll., 1999).

La voie amyloïdogénique fait intervenir les activités β - et γ -sécrétases qui clivent le mAPP de part et d'autre de la séquence correspondant à l'A β . Cette voie conduit à la libération dans l'espace extracellulaire du peptide A β et d'une forme sécrétée de l'APP, le sAPP β . Le fragment C-terminal de l'APP restant est le fragment P7. Les clivages par la β - et la γ -sécrétase peuvent survenir au niveau du réticulum endoplasmique, au sein du réseau trans-golgien, au niveau de la membrane plasmique ou encore dans des endosomes après réinternalisation du mAPP. Il semblerait que l'A β ₁₋₄₂ soit produite dans le réticulum endoplasmique et que l'A β ₁₋₄₀ soit produite dans le compartiment golgien. En effet, l'épaisseur plus importante de la membrane du réticulum endoplasmique pourrait être à l'origine du « décalage » du site de coupure de la γ -sécrétase, conduisant ainsi à la production d'A β ₁₋₄₂. Les β -sécrétases identifiées à ce jour sont nommées BACE-1 et BACE-2 (pour *β -site APP cleaving enzyme*), et sont deux protéases acides membranaires (Vassar, 2002). Les recherches thérapeutiques actuelles contre la maladie d'Alzheimer visent, entre autres, à réduire l'activité de BACE-1 afin de réduire la production d'A β . Les cellules de souris *knock-out* pour le gène de BACE-1 ne montrent en effet plus aucune production d'A β (Luo et coll., 2001 ; Cai et coll., 2001). La nature de la γ -sécrétase est, quant à elle, encore aujourd'hui objet de débat. On a d'abord cru que des protéines nommées présénilines (PS1 et PS2)

pouvaient avoir une activité γ -sécrétase, mais il semblerait que les présénilines représentent plutôt une des parties d'un « complexe protéique à activité γ -sécrétase » (de Strooper, 2003).

Les présénilines

Les présénilines (PS1 et PS2) sont des protéines membranaires multifonctionnelles. La PS1 et la PS2 possèdent respectivement 467 et 448 acides aminés et leurs gènes sont situés respectivement sur les chromosomes 14 et 1 humains. De nombreuses mutations de ces gènes ont été découvertes (à ce jour 111 pour la PS1, 10 pour la PS2), et sont à l'origine de plus de 60 % des formes familiales de MA (contre 10 % environ pour les mutations connues de l'APP).

Les présénilines semblent en majorité situées dans les membranes du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. Elles possèdent 8 domaines transmembranaires et une large boucle cytoplasmique, au niveau de laquelle sont situés des sites de coupure par des protéases. L'attaque protéolytique de la boucle cytoplasmique engendre deux fragments N- et C-terminaux. Ces deux fragments peuvent ensuite former un hétérodimère stable correspondant aux complexes biologiquement actifs des présénilines (Capell et coll., 1998). Il se pourrait que les présénilines jouent le rôle de protéine « chaperon », c'est-à-dire qu'elles soient capables d'interagir avec d'autres protéines (par exemple l'APP) et de les stabiliser au sein d'un complexe (Van Gassen et coll., 2000 ; De Strooper et Annaert, 2000).

Ainsi, les présénilines ne sont pas seulement impliquées dans la formation du complexe à activité γ -sécrétase capable de protéolyser l'APP, mais également dans d'autres voies de protéolyse comme celle de la protéine Notch (Selkoe, 2002). Etant donné que la protéine Notch joue un rôle dans la différenciation des cellules (par exemple, lors de l'hématopoïèse), les stratégies thérapeutiques visant à diminuer l'activité γ -sécrétase afin de réduire la production d'A β ne semblent pas dénuées de risques d'effets secondaires majeurs (par exemple, une immunodéficiences).

c. Rôles de l'APP et de ses dérivés

En raison de l'évidence de la perturbation du métabolisme de l'APP ou cours de la MA, de nombreuses recherches se sont focalisées sur la compréhension des rôles physiologiques normaux de l'APP et de ses dérivés (Turner et coll., 2003 ; Dodart et coll.,

2000). L'APP est exprimé de façon ubiquitaire dans l'organisme, mais ses fonctions physiologiques multiples ne sont pas encore bien connues.

Des propriétés diverses

Avec les APLP, l'APP joue un rôle clé dans le développement embryonnaire (von Koch et coll. 1997). La variation d'expression des différentes isoformes de l'APP au cours du développement suggère une implication différentielle de ces isoformes dans l'ontogénèse du système nerveux, le sAPP₇₅₁ favoriserait la croissance cellulaire et la synaptogenèse, alors que le sAPP₆₉₅ favoriserait plutôt l'établissement et la maturation de connections entre les neurones (Apelt et coll., 1997). Le mAPP peut stimuler *in vitro* la croissance des neurites de neurones d'hippocampe en culture, en particulier les isoformes APP751 et APP770 (Qiu et coll., 1995). A ces propriétés neurotrophiques s'ajoutent également des propriétés neuroprotectrices (Isacson et coll., 2002, Wallace et coll., 1997). Les formes sécrétées (sAPP), possèdent également des propriétés neurotrophiques et neuroprotectrices (Barger et Mattson, 1996 ; Mattson et coll., 1997). Le mAPP, comporte divers domaines pouvant se lier à divers substrats de la matrice extracellulaire comme l'héparine, le collagène ou la laminine et peut se comporter *in vitro* comme une molécule d'adhésion cellulaire (Storey et coll., 1996 ; Gillian et coll., 1997). Le mAPP pourrait également jouer le rôle de récepteur, couplé, au niveau de sa partie C-terminale intracellulaire, à une protéine G0 (Okamoto et coll., 1995 ; Brouillet et coll., 1999). Les sAPP peuvent également modifier *in vitro* le métabolisme cellulaire, par exemple en activant les voies de signalisation cellulaire dépendantes de la protéine kinase C (Ishiguro et coll., 1998).

Malgré un nombre important d'études réalisées sur l'APP, les véritables rôles de cette protéine demeurent aujourd'hui encore cachés dans un « brouillard de spéculations » selon l'expression de De Strooper et Annaert (2000) dans leur revue sur les fonctions cellulaires de l'APP. Néanmoins, on sait que la partie intracellulaire C-terminale de l'APP peut être reconnue par plusieurs ligands comme les protéines Fe65, X11 et mDAB-1. Par leurs autres sites de liaisons, ces protéines fixant l'APP sont par exemple impliquées dans la signalisation nucléaire, l'adhésion cellulaire, la modélisation du cytosquelette et le recrutement de kinases. L'ensemble de ces données, suggère que l'APP ne serait en fait qu'une des unités d'un ensemble complexe de protéines multifonctionnelles. Cette hypothèse pourrait en partie expliquer les rôles joués par l'APP dans les processus d'adhésion cellulaire, de stimulation de

la croissance neuritique et de synaptogenèse (De Strooper et Annaert, 2000). Enfin, une étude très récente montre que les sAPP ont la capacité de réguler la prolifération de cellules progénitrices dans la zone subventriculaire cérébrale du rat adulte (Caillé et coll., 2004). Les sAPP pourraient donc également jouer un rôle dans la neurogenèse.

Rôles de l'APP dans les processus mnésiques

L'ensemble des propriétés de l'APP nous oriente naturellement vers l'hypothèse d'un rôle de cette protéine dans les changements neurochimiques et structuraux qui sous-tendent les processus mnésiques (Dodart et coll. 2000 ; Turner et coll., 2003).

L'intervention de l'APP (mAPP et/ou sAPP) dans les processus mnésiques a d'abord été suggérée par des travaux utilisant une approche indirecte (Doyle et coll., 1990 ; Huber et coll., 1993 ; et plus récemment, Mileusnic et coll., 2000). En administrant à des rats ou à des poulets des anticorps anti-APP par voie intracérébroventriculaire (i.c.v.), ces auteurs ont pu mettre en évidence une perturbation des performances de mémoire dans des tâches d'évitement passif et actif. De plus, Doyle et collaborateurs (1990) n'ont observé de déficit mnésiques que lorsque les anticorps étaient injectés juste avant ou 2 h et demie après la séance d'acquisition de la tâche, et pas lorsque l'injection était effectuée 4 ou 6 h après. Ces travaux suggèrent l'implication relativement précoce des APP endogènes dans les processus de consolidation de la trace mnésique, sans toutefois préciser les rôles respectifs des mAPP et des sAPP. L'APP, par son implication dans la croissance des neurites et la formation/remodélisation des synapses, pourrait jouer un rôle crucial dans l'induction et/ou le maintien de la plasticité synaptique. Le phénomène de potentialisation à long terme (PLT) est considéré comme un reflet de la plasticité synaptique et un paradigme moléculaire pour la formation de la mémoire. Ishida et collaborateurs (1997) ont montré que les sAPP étaient capables d'augmenter le seuil de fréquence nécessaire pour induire une PLT, ainsi que l'amplitude de la PLT dans la région CA1 induite par une stimulation haute fréquence de coupes d'hippocampe de Rat adulte. De plus, Fazeli et collaborateurs (1994) ont observé une augmentation des concentrations extracellulaires d'APP 90 minutes après l'induction de la PLT. Il est possible que l'APP puisse influencer la PLT par modulation de l'entrée de calcium (Morimoto et coll., 1998 ; Bouron et coll., 2004). Enfin, Roch et collaborateurs (1994) ont mis en évidence les effets promnésiants d'un fragment neurotrophique du sAPP₆₉₅. Des rats ayant subi une infusion de ce fragment par voie i.c.v. ont montré de meilleures

performances de mémoire spatiale que les rats témoins. Ce fragment de sAPP₆₉₅ contenait une séquence d'acides aminés « RERMS » provenant du sAPP₆₉₅. Ce pentapeptide correspond au domaine de l'APP responsable de ses effets neurotrophiques (Ninomiya et coll., 1993). Chez des poulets, l'administration du pentapeptide RERMS bloque les déficits de mémoire provoqués par une baisse de l'expression de l'APP induite par de l'ADN antisens (Mileusnic et coll., 2000). Très récemment, la même équipe a également obtenu des effets promnésiants avec la séquence RER contenue dans le peptide RERMS (Mileusnic et coll., 2004). L'ensemble de ces données suggère que les propriétés neurotrophiques des sAPP pourraient jouer un rôle dans les processus mnésiques.

En suivant une autre approche, les travaux réalisés dans l'équipe par Meziane et collaborateurs (1998) ont pu montrer les effets promnésiants d'une administration i.c.v. de sAPP α humain chez la Souris. Ainsi, une injection i.c.v. de sAPP améliore les performances mnésiques dans plusieurs tâches d'apprentissage et de mémoire. En effet, des souris ayant reçu de faibles doses de la protéine (entre 0,05 et 5000 pg) montrent de meilleures performances que les souris témoins dans une tâche de discrimination visuelle (avec le sAPP₇₅₁ injecté 3 mn après l'apprentissage) et une tâche de reconnaissance d'objet (avec le sAPP₇₅₁ ou le sAPP₆₉₅ injecté 20 mn avant l'apprentissage). L'administration de sAPP est également capable de bloquer les déficits mnésiques induits par la scopolamine dans une tâche d'apprentissage opérant en boîte de Skinner (sAPP₇₅₁ injecté 3 mn après l'apprentissage) et dans la tâche de reconnaissance d'objet (sAPP₇₅₁ ou sAPP₆₉₅ injecté 20 mn avant l'apprentissage ; Meziane et coll., 1998). On peut remarquer que les effets promnésiants du sAPP sont validés pour l'isoforme 695 comme pour l'isoforme 751 : le domaine KPI présent sur cette dernière isoforme ne semble donc pas être impliqué dans les effets promnésiants du sAPP.

Spécificité d'action des sAPP sur la mémoire

Durant leurs travaux, Meziane et collaborateurs (1998) n'ont observé aucun effet de l'injection de sAPP α sur l'activité locomotrice des animaux, sur le nombre de redressements et sur le niveau d'exploration des objets, ce qui suggère une spécificité des effets des sAPP α sur les processus mnésiques. De plus, une expérience réalisée au laboratoire (Vogel, non publié) a permis de montrer que le sAPP₆₉₅ n'avait apparemment pas d'influence sur le niveau

d'anxiété des souris évalué dans le test de la cage claire-obscur, couramment utilisé afin d'évaluer les effets anxiolytiques ou anxiogéniques de substances pharmacologiques (Crawley et Goodwin, 1980). Ce test a été utilisé pour évaluer les effets de l'injection de différentes doses de sAPP₆₉₅ (0,05 à 5 pg par souris, injection i.c.v. 20 mn avant la séance) sur le comportement des souris dans le dispositif. Aucune de ces doses de sAPP α n'a, dans ce test, montré d'effet sur les variables sensibles aux actions des substances anxiolytiques ou anxiogènes (temps passé dans les deux compartiments ou nombre de transitions entre les deux compartiments de la cage). Le sAPP₆₉₅ ne semble donc pas avoir d'effet sur la réactivité émotionnelle des souris, aux doses que nous avons utilisées dans les tests d'apprentissage et de mémoire.

La description des formes familiales de la MA m'a permis de vous présenter l'APP, une protéine jouant un rôle fondamental dans l'apparition de cette maladie. Dans les prochains paragraphes consacrés aux facteurs de risque jouant un rôle critique dans les formes sporadiques de la MA, je vous présenterai l'apolipoprotéine E (apoE), une autre protéine jouant un rôle clé dans le développement de cette pathologie.

2. Formes sporadiques

Les formes familiales de MA dues aux mutations de l'APP ou des présénilines ne représentent que moins de 10% des cas. La grande majorité des formes de MA sont en effet sporadiques à développement tardif (au-delà de 65 ans), et pour celles-ci, il est difficile d'identifier des facteurs génétiques responsables.

a. Les facteurs de risque

Les facteurs de risque sont des caractéristiques appartenant à l'individu (par exemple : le sexe, l'âge) ou des variables de l'environnement (par exemple : le style de vie, la prise de médicaments) statistiquement associées à la fréquence accrue d'une maladie. Les facteurs de risque semblent avoir une influence sur la progression de la pathologie, mais ne causent pas nécessairement la maladie. Certains facteurs de risque sont accessibles à la prévention (par exemple le style de vie), tandis que d'autres facteurs de risque ne sont pas modifiables (par exemple, l'âge ou l'hérédité). En contrôlant les facteurs de risque modifiables, le but, pour un

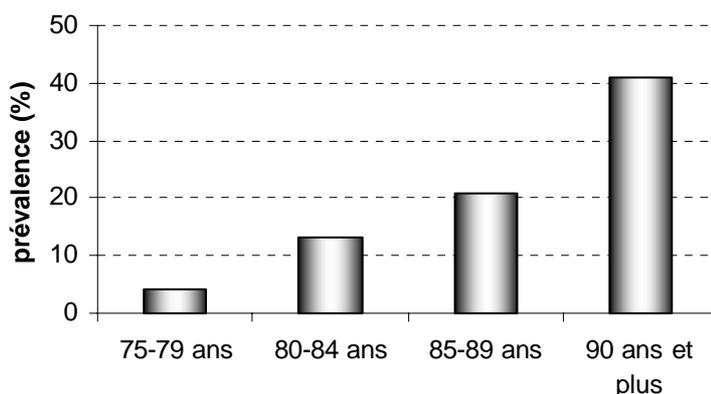
malade donné, est de retarder autant que possible la survenue et/ou la progression de la maladie.

Plusieurs études de cohortes ont permis d'identifier ou, tout au moins, de suspecter plusieurs facteurs de risque possibles dans le développement de la MA (Dartigues et coll., 2002). Ceci révèle que la MA fait intervenir une combinaison de facteurs individuels et environnementaux, l'ensemble de ces facteurs interagissant. Par exemple, grâce à l'étude française PAQUID (pour « personnes âgées QUID ? »), réalisée en Gironde et en Dordogne, des scientifiques ont suivi l'évolution de la santé d'un groupe de plus de 4000 personnes âgées depuis 1988 (Résultats disponibles sur le site : <http://www.isped.u-bordeaux2.fr/RECHERCHE/paquid/FR-PAQUID-Resultats.htm>).

L'âge

Le facteur de risque le plus évident est l'âge : l'étude PAQUID a montré que l'évolution du risque de démence en fonction de l'âge est relativement stable avant 75 ans et s'établit à environ 3,5 pour 1000 personnes/année. Après 75 ans, l'incidence (nombre de nouveaux cas par an) croît de façon linéaire pour atteindre 60 pour 1000 personnes/année chez les 90 ans et plus. Le graphique ci-dessous représente la prévalence de la MA (pourcentage de personnes atteintes dans la population) exprimée en pourcentage de la population pour une catégorie d'âge donnée (Résultats PAQUID, 2003).

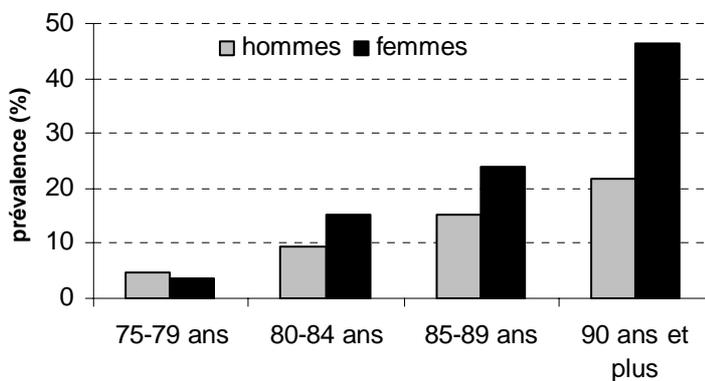
Prévalence (%) de la maladie d'Alzheimer
- Données PAQUID 2003 -



Le sexe

Les femmes ont plus de risque que les hommes de développer une MA. Letenneur et collaborateurs (1999) ont montré que l'incidence de la MA devenait plus importante chez les femmes que chez les hommes après l'âge de 80 ans, et que cette différence n'était pas liée à la différence de niveau d'éducation. Cette différence en fonction du sexe pourrait s'expliquer par les différences génétiques et hormonales (notamment liée à la baisse du niveau d'oestrogènes avec l'âge chez la femme). Cependant, des différences sociales entre les deux sexes, ou simplement la différence de longévité entre hommes et femmes, pourraient aussi expliquer ce phénomène. En effet, les hommes dont la longévité est accrue par rapport à la moyenne pourraient justement être les hommes les plus résistants aux maladies neurodégénératives. Le graphique ci-dessous représente la prévalence de la MA pour les deux sexes, et pour une catégorie d'âge donnée (Résultats PAQUID, 2003).

**Prévalence (%) de la maladie d'Alzheimer
en fonction du sexe**
- Données PAQUID 2003 -



Chez la femme, il est possible que le traitement substitutif de la ménopause avec des oestrogènes puisse réduire le risque de développer une MA (par exemple : Kawas et coll., 1997), mais cette hypothèse reste encore très controversée.

La stimulation cognitive

Les personnes ayant un faible niveau d'éducation sont plus susceptibles de développer une MA (Letenneur et coll., 1999). Acquérir un haut niveau d'éducation pourrait différer la dégradation des capacités intellectuelles en constituant des possibilités de compensation lors du développement des symptômes habituels de la maladie. De la même façon, la pratique

d'activités de loisirs et d'activités sociales, développant l'initiative et la planification des tâches, pourraient diminuer le risque de démence en entretenant un bon niveau d'entraînement intellectuel et en favorisant la stimulation cognitive des sujets.

Les facteurs vasculaires

Les travaux de Hofman et collaborateurs (1997) ont montré que l'athérosclérose était fortement associée à la MA. En outre, il semble que le traitement de l'hypertension artérielle réduise l'incidence de la MA (Forette et coll., 1998). Ce facteur de risque représenté par les pathologies vasculaires est actuellement pris très au sérieux. Afin de confirmer les résultats déjà obtenus, une grande étude épidémiologique est actuellement menée afin d'étudier la relation entre pathologie vasculaire et démence, sur une cohorte d'environ 10 000 sujets âgés de 65 ans et plus de trois régions françaises (Etude des Trois Cités (E3C) à Bordeaux, Dijon et Montpellier).

Les anti-oxydants

Il se pourrait que la prise d'antioxydants comme la vitamine E puisse réduire le risque de MA (Engelhart et coll., 2002 ; Viña et coll., 2004). Il se pourrait également que les effets bénéfiques d'une consommation modérée d'alcool observés lors de l'étude PAQUID soient en partie dus aux propriétés anti-oxydantes des tannins contenus dans le vin, et/ou à l'action de l'alcool sur le système vasculaire.

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

La prise d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) pourrait également avoir un rôle protecteur sur la survenue de la MA. Ces substances pourraient contribuer à réduire l'inflammation cérébrale créée par la formation des plaques séniles au cours de la MA (Breitner, 1996).

Les facteurs de risque génétiques : le cas de l'allèle $\epsilon 4$ de l'apolipoprotéine E

Le rôle de l'hérédité dans la forme sporadique de la maladie d'Alzheimer est incertain et continue à faire l'objet de nombreuses recherches. Il est probable que les personnes dont un parent est atteint de MA ont plus de risque de développer eux aussi la maladie. Pour l'instant, le seul facteur de risque génétique dont l'implication dans la MA reste indiscutable est la **possession de l'allèle $\epsilon 4$ de l'apolipoprotéine E (apoE)**. Cet allèle $\epsilon 4$ s'est révélé être le

facteur de risque génétique présentant la plus grande force d'association avec la MA (Strittmatter et coll., 1993 ; Chartier-Harlin et coll., 1994), et il est également reconnu comme facteur de risque de maladies vasculaires (Horejsi et Ceska, 2000). Là encore, la possession de l'allèle $\epsilon 4$ ne provoque pas nécessairement la maladie. Il existe néanmoins plusieurs autres gènes qui peuvent représenter des facteurs de risque génétique dans le développement de la MA, par exemple le gène du LRP (pour *low density lipoprotein receptor-related protein* ; Wavrant-DeVrièze et coll., 1997). Cette protéine LRP occupe très certainement une position clef dans les processus impliqués dans la MA, car elle peut fixer l'apoE ou l'APP. La recherche d'autres facteurs de risque continue, dans le cadre de la recherche sur la MA mais également sur d'autres maladies complexes à début tardif (Roses, 1998)

b. L'apolipoprotéine E

L'apolipoprotéine E (apoE) fait partie de la famille des apolipoprotéines, comprenant également par exemple les apoA-I, apoA-II, apoA-IV, apoB, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoD, et apoJ (Bolanos-Garcia et coll., 2003). Les apolipoprotéines sont impliquées dans le transport des lipides dans le sang. Elles peuvent se combiner à des lipides pour former différentes classes de particules lipoprotéiques. Les lipoprotéines ainsi formées sont des structures sphériques à surface hydrophile, constituée d'apolipoprotéines ainsi que de cholestérol et de phospholipides dont la tête hydrophile est tournée vers l'extérieur. L'intérieur hydrophobe de la sphère contient des triglycérides et des esters de cholestérol. Les apolipoprotéines peuvent réguler certaines enzymes agissant sur les lipoprotéines, et intervenir dans les interactions des lipoprotéines avec des récepteurs. Les lipoprotéines sont impliquées dans le transport des lipides dans le sang, et sont classées selon leur taille en lipoprotéines à haute densité, à densité intermédiaire, à densité faible et à densité très faible (respectivement : HDL, IDL, LDL et VLDL pour *high, intermediate, low et very low density lipoproteins*).

L'apoE est produite dans une grande variété de tissus de l'organisme (foie, reins, muscles, gonades...) et également dans le cerveau où elle est produite essentiellement par les astrocytes et la microglie (Naidu et coll., 2002). Néanmoins, les travaux de Linton et collaborateurs (1991) suggèrent que l'apoE ne passe pas la barrière hémato-encéphalique et que l'ensemble des apoE cérébrales est indépendant de l'ensemble des apoE plasmatiques.



**Mus
musculus**

Séquence APO-E murine

```

1  kveqavetep epelrqqtew qsgqrwelal grfwdylrwv qtlseqvqee llssqvtqel
61  lssqvtqel halmdetmke lkaykselee qltpvaeetr arlskelqaa qarlgadmed vgrlvqyrg
121 rlqgyr evqamlgqst eelrvrlash lrklrkrllr daddlqklla vyqagarega erglsairer
181 erglsairer lgplveqgrv raatvgsllag qplqeraqaw gerlrammee mgsrtrdrld evkeqvaevr
241 evkeqvaevr kleeqaqqi rlqaeafqar lkswfeplve dmqrqwaglv ekvqaavgts aapvpsdnh
301  tltpvaetr

```

Séquence APO-E humaine isoforme E2

```

1  kveqavetep epelrqqtew qsgqrwelal grfwdylrwv qtlseqvqee llssqvtqel
61  halmdetmke lkaykselee qltpvaeetr arlskelqaa qarlgadmed vgrlvqyrg
121 evqamlgqst eelrvrlash lrklrkrllr daddlqklla vyqagarega erglsairer
181 lgplveqgrv raatvgsllag qplqeraqaw gerlrammee mgsrtrdrld evkeqvaevr
241 akleeqaqqi rlqaeafqar lkswfeplve dmqrqwaglv ekvqaavgts aapvpsdnh

```

Séquence APO-E humaine isoforme E3

```

1  kveqavetep epelrqqtew qsgqrwelal grfwdylrwv qtlseqvqee llssqvtqel
61  halmdetmke lkaykselee qltpvaeetr arlskelqaa qarlgadmed vgrlvqyrg
121 evqamlgqst eelrvrlash lrklrkrllr daddlqklla vyqagarega erglsairer
181 lgplveqgrv raatvgsllag qplqeraqaw gerlrammee mgsrtrdrld evkeqvaevr
241 akleeqaqqi rlqaeafqar lkswfeplve dmqrqwaglv ekvqaavgts aapvpsdnh

```

Séquence APO-E humaine isoforme E4

```

1  kveqavetep epelrqqtew qsgqrwelal grfwdylrwv qtlseqvqee llssqvtqel
61  halmdetmke lkaykselee qltpvaeetr arlskelqaa qarlgadmed vgrlvqyrg
121 evqamlgqst eelrvrlash lrklrkrllr daddlqklla vyqagarega erglsairer
181 lgplveqgrv raatvgsllag qplqeraqaw gerlrammee mgsrtrdrld evkeqvaevr
241 akleeqaqqi rlqaeafqar lkswfeplve dmqrqwaglv ekvqaavgts aapvpsdnh

```



**Homo
sapiens**

Figure 3 : Séquences d'acides aminés constituant l'apoE humaine (isoformes apoE2, apoE3 et apoE4) et l'apoE murine

Zones rouges : différences Homme/Souris (arginine (r) ou cystéine (c) en positions 112 et 158 chez l'Homme ; voir positions correspondantes chez la Souris)

Zones bleues : polymorphismes des isoformes humaines

Encadré gras : arginine (r) en position 61 de l'apoE humaine (voir texte à propos de la structure tertiaire des isoformes d'apoE). Chez la Souris, on trouve une thréonine (t) à l'emplacement correspondant.

Différentes isoformes de l'apoE humaine

L'apoE est une protéine de 299 acides aminés dont le gène se situe sur le chromosome 19 humain. Il existe plusieurs allèles du gène de l'apoE humaine, contrairement à celui, par exemple, de la Souris qui n'existe que sous une seule forme. Ces trois allèles humains de l'apoE sont nommés ϵ_2 , ϵ_3 et ϵ_4 . Les génotypes possibles sont donc au nombre de six, avec trois génotypes homozygotes ϵ_2/ϵ_2 , ϵ_3/ϵ_3 et ϵ_4/ϵ_4 , et trois génotypes hétérozygotes ϵ_2/ϵ_3 , ϵ_2/ϵ_4 et ϵ_3/ϵ_4 . L'allèle ϵ_3 est le plus fréquent dans la population (78%), suivi de l'allèle ϵ_4 (15%), puis de l'allèle ϵ_2 (7%). Les trois allèles sont à l'origine de la synthèse de trois isoformes de la protéine, l'apoE2, l'apoE3 et l'apoE4, qui ne diffèrent l'une de l'autre que par un ou deux acides aminés seulement. Les positions 112 et 158 de la séquence d'acides aminés de l'apoE sont les sites de polymorphisme. L'apoE2 possède une cystéine à chacune de ces deux positions, alors que l'apoE3 possède une arginine en position 158, et que l'apoE4 possède une arginine à chacune des deux positions (voir **figure 3**).

Différences de structure tertiaire des isoformes de l'apoE humaine

Weisgraber et Mahley (1996) expliquent que ces différences de séquence entre les trois isoformes sont à l'origine des variations de leurs affinités pour une catégorie donnée de lipoprotéine. L'apoE3 et l'apoE2 montrent une préférence pour les HDL alors que l'apoE4 montre une préférence pour les VLDL. Sur l'apoE4, la présence de l'arginine en position 112 provoque une modification de sa conformation spatiale (par rapport aux deux autres isoformes) : un fragment portant une arginine en position 61 change de position au sein de la structure tertiaire de la protéine. La position particulière de ce fragment, spécifique de l'apoE4, semble être responsable de la haute affinité de l'apoE4 pour les VLDL. En effet, si on remplace l'arginine en position 61 par une thréonine, la préférence de l'apoE4 pour les VLDL disparaît.

Les apoE humaines et l'apoE murine

Les données ci-dessus me permettent de discuter de la similitude entre les différentes isoformes d'apoE humaines et l'apoE murine unique. On pourrait penser que l'apoE murine ressemble à l'apoE4, en raison de ses deux arginines en positions 112 et 158. Cependant, les effets physiologiques de l'apoE murine se rapprochent en réalité de ceux de l'apoE3 humaine, pour la simple raison que l'apoE murine possède une thréonine en position 61. La

conformation de l'apoE4 humaine (due à la présence de l'arginine en position 61, pour l'instant spécifique à l'Homme) ne peut donc pas exister sur l'apoE murine (Weisgraber et Mahley, 1996).

c. Les effets de l'apoE au niveau cérébral

Au niveau périphérique, l'apoE joue un rôle prédominant dans le transport des lipides dans le sang. On sait que le polymorphisme de l'apoE joue un rôle déterminant dans l'initiation et la progression de l'athérosclérose. En effet, en comparaison de l'isoforme apoE3, l'isoforme apoE4 est un facteur de risque important pour l'athérosclérose, et l'apoE2 serait plutôt protecteur (Horejsi et Ceska, 2000).

Au niveau cérébral, les multiples rôles qui semblent être joués par l'apoE peuvent également se révéler dépendants de l'isoforme d'apoE considérée (voir pour revues : Mahley et Rall, 2000 ; Bales et coll., 2002 ; Chartier-Harlin et coll., 2002).

L'apoE et le dépôt de protéine β -amyloïde dans la MA

Dans la MA, l'apoE se trouve en grande quantité au niveau des plaques séniles. L'apoE est impliquée dans la formation des dépôts amyloïdes, comme l'ont montré les travaux de Bales et collaborateurs (1999) en utilisant des souris transgéniques PDAPP qui surexpriment une forme mutée de l'APP humain (APP^{V717F}) et développent des plaques amyloïdes avec l'âge. Ces auteurs ont croisé des souris PDAPP avec des souris déficientes en apoE, puis ont observé le développement des plaques chez les souris PDAPP/apoE obtenues portant zéro, un ou deux gènes de l'apoE murine. De façon surprenante, les souris PDAPP ne possédant pas d'apoE n'ont développé presque aucune plaque sénile, même à un âge avancé, contrairement aux souris APP^{V717F} possédant un ou deux gènes d'apoE murine. Afin d'explorer les effets potentiellement isoforme-dépendants de l'apoE humaine sur la formation des plaques amyloïdes, la même équipe a ensuite utilisé des souris issues du croisement de souris PDAPP avec des souris déficientes en apoE murine mais exprimant une isoforme humaine E4 ou E3 sous contrôle du promoteur de la GFAP (pour *glial fibrillary acidic protein* ; respectivement souris GFAP-apoE3 et GFAP-apoE4). Ces auteurs ont pu observer que les souris PDAPP/GFAP-apoE4 développaient environ 10 fois plus de plaques que les souris PDAPP/GFAP-apoE3 à l'âge de 15 mois (Holtzman et coll., 2000). Ce résultat est en

accord avec des données obtenues chez l'Homme montrant une association entre la charge cérébrale en plaques séniles et le génotype pour l'apoE (Schmechel et coll., 1993).

L'apoE en réponse à la neurodégénérescence

Après une lésion du système nerveux central ou périphérique, la synthèse de l'apoE est fortement augmentée près du site lésionnel (Ignatus et coll., 1986 ; Poirier et coll., 1991). En effet, l'apoE serait impliquée dans la réparation, la croissance et le maintien des membranes et de la myéline, en particulier après atteinte du système nerveux, en assurant la clairance des débris lipidiques et leur redistribution (White et coll., 2001). On comprend alors que toute altération du métabolisme de l'apoE peut gravement perturber les processus naturels de régénération neuronale. Par exemple, après un traumatisme crânien, des souris déficientes en apoE montrent un taux de dégénérescence neuronale et des déficits moteurs et comportementaux plus importants que des souris témoins exprimant l'apoE (Chen et coll., 1997).

Dans la MA, l'accumulation d'apoE et d'A β au niveau des plaques séniles pourrait refléter une altération du processus naturel de clairance de l'A β . Des travaux *in vitro* réalisés par Strittmatter et collaborateurs (1993) ont montré que l'apoE montrait une forte affinité pour la protéine β -amyloïde (A β). Les deux protéines se lient vraisemblablement de façon non covalente pour former un complexe relativement stable d'environ 40kDa. Russo et collaborateurs (1998) ont montré que ce complexe était sensible aux protéinases, et que l'A β libre était plus résistante à la dégradation que l'A β liée à l'apoE. Ainsi, l'apoE pourrait faciliter la dégradation de l'A β . La perturbation de ce processus lors de conditions pathologiques (par exemple, dans des conditions de stress oxydatif) pourrait induire une baisse de la stabilité du complexe A β -apoE et expliquer, en partie, l'accumulation d'A β en feuillets insolubles dans les plaques séniles. De plus, la liaison A β -apoE4 est moins stable que la liaison A β -apoE3 (Russo et coll., 1998). Par rapport à l'apoE3, l'apoE4 semble donc limiter la clairance de l'A β et favoriser l'agrégation de cette dernière, ce qui pourrait rendre compte de la prédisposition des individus possédant l'allèle ϵ 4 à développer une MA.

L'apoE pourrait également interagir avec la réponse inflammatoire à l'origine ou résultant des dépôts amyloïdes cérébraux dans la MA. En effet, Qiao et collaborateurs (2001) ont montré que l'induction d'une inflammation dans le cerveau de souris PDAPP augmente

de façon importante le nombre de plaques amyloïdes lorsque ces souris possèdent l'apoE murine, mais pas lorsqu'elles sont déficientes pour le gène de l'apoE. L'apoE semble donc jouer un rôle important dans la réaction inflammatoire. Des souris déficientes en apoE sont par exemple incapable de montrer une augmentation de la production d'antioxydants endogènes suite à un traumatisme crânien, comme c'est le cas chez des souris possédant l'apoE (Lomnitski et coll., 1997). L'apoE en elle-même pourrait avoir des propriétés anti-oxydantes, avec une activité anti-oxydante moins importante pour l'apoE4 que pour l'apoE3 (Kitagawa et coll., 2002 ; Miyata et Smith, 1996).

L'apoE et la plasticité synaptique

Le fait que les souris déficientes en apoE soient plus vulnérables aux effets d'atteintes cérébrales (par exemple, une ischémie ou un traumatisme crânien) suggère que l'apoE est impliquée dans la réparation neuronale après lésion cérébrale (Chen et coll., 1997 ; Kitagawa et coll., 2002). Puttfarcken et collaborateurs (1997) ont montré que l'apoE3 et l'apoE4 purifiées étaient capables de promouvoir la croissance des neurites d'une façon équivalente. Par contre, plusieurs études ont mis en évidence des effets opposés de l'apoE3 et de l'apoE4 sur la croissance neuritique quand ces isoformes étaient, non pas purifiées, mais intégrées dans une lipoprotéine. Dans ce cas, l'apoE3 favorise et l'apoE4 ne favorise pas, ou même, inhibe l'extension des neurites (Nathan et coll., 1994 ; Bellosta et coll., 1995). Etant donné que les lipoprotéines contenant l'apoE sont des ligands pour le récepteur membranaire LRP (pour *low density lipoprotein receptor related protein* ; Fagan et coll., 1996), il se pourrait que les effets isoforme-dépendants soient une conséquence de l'interaction apoE/LRP. En effet, le blocage de cette interaction abolit les différences d'effet des isoformes de l'apoE (Holtzman et coll., 1995 ; Nathan et coll., 2002). Les effets bénéfiques de l'apoE3 sur la croissance neuritique pourraient être expliqués par l'effet protecteur de l'apoE3 (et pas l'apoE4) contre la phosphorylation de la protéine tau ce qui favorise la stabilisation des microtubules du cytosquelette (Strittmatter et coll., 1994). L'ensemble de ces propriétés, impliquant l'apoE dans les phénomènes de plasticité synaptique, nous oriente naturellement vers l'hypothèse d'un rôle de cette protéine dans les processus mnésiques.

L'apoE et les processus mnésiques

Chez l'animal, de nombreuses études sur des souris génétiquement modifiées déficientes en apolipoprotéine E (souris apoE-KO), semblent indiquer un rôle de cette protéine dans les processus mnésiques. En effet, de nombreux travaux ont montré que les souris apoE-KO présentent des perturbations de l'apprentissage et de la mémoire (Oitzl et coll., 1997 ; Gordon et coll., 1995 ; Masliah et coll., 1997 ; Zhou et coll., 1998 ; Veinbergs et coll., 2000). En outre, l'infusion d'apoE dans le cerveau de ces souris apoE-KO peut permettre de restaurer des performances correctes (Masliah et coll., 1997). Néanmoins, selon les études, les souris apoE-KO ne présentent pas toujours des perturbations mnésiques (Anderson et Higgins, 1997 ; Anderson et coll., 1998 ; Krzywkowski et coll., 1999 ; Puolivali et coll., 2000). Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ces données contradictoires, tels qu'un effet du fond génétique, ou des différences dans les conditions d'élevage ou dans les protocoles de tests (Champagne et coll., 2002 ; de Kloet et coll., 2002 ; Lominska et coll., 2001). Le Dr Grootendorst et ses collaborateurs (2001) ont notamment étudié l'impact d'un stress chronique sur les performances de mémoire spatiale de souris déficientes en apoE : celles-ci améliorent leurs performances, alors que les souris « wild type » diminuent leurs performances. Il semblerait donc que les déficits des souris apoE-KO ne soient pas toujours apparents.

La découverte de l'implication différentielle des trois principaux allèles de l'apoE humaine dans des maladies graves, telles que l'athérosclérose et la MA, a stimulé la création de lignées de souris transgéniques portant chacune l'un ou l'autre de ces allèles. Ces souris transgéniques ont permis d'évaluer les influences des différentes isoformes de l'apoE humaine sur les processus mnésiques de la Souris. Ainsi, les premières études ont montré que les souris portant l'allèle $\epsilon 4$ humain montraient des déficits cognitifs plus importants que celles portant l'allèle humain $\epsilon 3$, en particulier chez les femelles (Hartman et coll., 2001 ; Raber et coll., 1998, 2000 et 2002 ; Veinbergs et coll., 1999). Ces travaux, réalisés sur des lignées distinctes, sont remarquablement concordants et suggèrent que l'allèle $\epsilon 4$ humain a un effet délétère sur les processus d'apprentissage et de mémoire des souris. Le modèle des souris porteuses de l'allèle $\epsilon 4$ humain apparaît donc très prometteur pour l'étude de ce facteur de risque de la MA. Les résultats obtenus sur ce modèle apportent aussi un argument supplémentaire en faveur de travaux, longtemps débattus, suggérant une influence de l'allèle

$\epsilon 4$ sur les performances cognitives de personnes âgées non démentes. En effet, chez l'Homme, il semble que la possession de l'allèle $\epsilon 4$ par rapport aux allèles $\epsilon 2$ et $\epsilon 3$ est liée à un déclin cognitif plus sévère (Schmidt et coll., 1996 ; Reed et coll., 1994 ; Small et coll., 1998). Les souris transgéniques apoE4 apparaissent donc également comme un modèle d'étude des déficits cognitifs liés au vieillissement.

III. Buts de la thèse

Les rôles centraux joués par l'APP et l'apoE dans la MA sont à l'origine de nombreuses études visant, d'une part, à comprendre l'implication de ces protéines dans les processus pathologiques et, d'autre part, à mieux connaître leurs fonctions dans des conditions métaboliques normales.

Notre travail se situe, d'une part,

- dans le cadre de l'étude du fonctionnement « normal » de ces deux protéines, où nous cherchons à préciser leurs implications dans les processus mnésiques et, d'autre part,
- dans le cadre de l'étude des altérations du métabolisme de ces deux protéines au cours du vieillissement, où nous cherchons à préciser leur implication dans l'apparition de troubles mnésiques liés à l'âge.

1. Précision des rôles du sAPP dans les processus mnésiques

Le premier objectif de ma thèse était de préciser l'implication du sAPP dans les différentes formes de mémoire et particulièrement dans les processus de consolidation mnésique. Ce travail sera exposé dans le deuxième chapitre de la partie « contribution expérimentale ».

Etant donné que la voie de sécrétion non amyloïdogénique qui produit les sAPP α est prépondérante dans le métabolisme normal de l'APP, et semble altérée à la fois dans le cadre du vieillissement non pathologique et dans le cadre de la maladie d'Alzheimer (Anderson et coll., 1999 ; Almkvist, 1997), on peut supposer que la diminution des taux cérébraux de sAPP α joue un rôle déterminant dans l'apparition des troubles mnésiques liés à l'âge ou à la maladie d'Alzheimer (J.-C. Dodart, thèse de doctorat, 1999). L'un des objectifs initiaux de ma thèse était de tester cette hypothèse en tentant de mettre en évidence une sécrétion de sAPP endogène au cours des processus de mémorisation chez la Souris. Je désirais ensuite évaluer les altérations éventuelles de cette sécrétion au cours du vieillissement, et leur lien avec

l'apparition de déficits mnésiques. Ce travail sur les sAPP endogènes a été entamé à travers une expérience évaluant les effets d'anticorps spécifiquement dirigés contre les sAPP α sur les performances mnésiques (présentée dans le chapitre II). Nous avons cependant rencontré des problèmes de répliquabilité des tâches de reconnaissance que nous avons l'intention d'utiliser.

Le deuxième objectif de ma thèse a donc été de découvrir la cause de nos problèmes de répliquabilité des tests de reconnaissance chez la souris. L'ensemble des expériences réalisées pour résoudre ce problème est présenté dans le premier chapitre de la partie « contribution expérimentale ». Par manque de temps, le projet initial concernant la mise en évidence d'une sécrétion de sAPP au cours d'un apprentissage n'a malheureusement pas pu être mené à bien au cours de cette thèse.

2. Caractériser le comportement des souris transgéniques pour l'apoE

Lorsque nos collaborateurs de Lilly, Jean-Cosme Dodart, Kelly Bales et Steven M. Paul, nous ont proposé de caractériser le comportement, et plus particulièrement les capacités mnésiques, de plusieurs lignées portant chacune un des allèles humains du gène de l'apoE, nous avons tout de suite pensé que ce projet était tout à fait complémentaire à nos travaux sur les effets promnésiants des sAPP. En effet, si ces souris présentaient bien des déficits de mémoire liés à l'âge, en accord avec les données obtenues chez l'Homme, elle fourniraient aussi un excellent modèle pour éprouver les effets des sAPP sur des déficits cognitifs liés au vieillissement. Lorsque j'ai débuté mes travaux sur ces souris, les performances mnésiques d'une cohorte de souris « jeunes » (4-5 mois) avaient déjà été évaluées au laboratoire (Grootendorst, Bour et coll., sous presse) et les premières analyses suggéraient déjà l'existence de déficits cognitifs chez les souris porteuses de l'allèle $\epsilon 4$.

Le troisième objectif de ma thèse était donc de caractériser les performances d'apprentissage et de mémoire d'une cohorte de souris transgéniques « âgées » afin de préciser les effets des différentes isoformes d'apoE humaine dans l'apparition de déficits cognitifs. L'ensemble de ces résultats est exposé dans le troisième chapitre de la partie « contribution expérimentale ».

3. Evaluer les effets du sAPP dans un modèle de déficit cognitif lié à l'âge

Le quatrième objectif de ma thèse était d'évaluer les effets du sAPP dans un modèle de vieillissement avec troubles cognitifs, dans une perspective de restauration fonctionnelle. J'ai donc éprouvé les effets de cette protéine sur les déficits de mémoire spatiale présentés par les souris femelles apoE4. Cette expérience est présentée à la fin du troisième chapitre de la partie « contribution expérimentale ».

Matériels et Méthodes

I. Sujets d'expérience

1. Souris non consanguines

Les expériences présentées dans la première partie de ce travail ont été réalisées sur des souris des souches « **OF1** » et « **CD1** », provenant du centre d'élevage Charles RIVER / Iffa Credo (Domaine des Oncins, L'Arbresle, France).

La souche OF1 (pour « Oncins France 1 », nomenclature officielle au 01/01/2005 : « CrI:OF1 ») est spécifique du centre d'élevage Iffa Credo et dérive d'une souche albinos nommée CF1 (pour « Carworth Farms strain 1 », Etats-Unis). La souche CD1 (nomenclature officielle au 01/01/2005 : « CrI:CD1[®](Icr) ») est qualifiée de souris « *Swiss* ». En effet, la souche CD1 dérive, comme d'autres souches de souris « *Swiss* », d'une souche initiale de souris non consanguines d'un laboratoire de Lausanne (Suisse, 1926). Les souris de ces deux souches OF1 et CD1 sont albinos et non consanguines, utilisées dans diverses études en Europe (souche OF1) et dans le monde (souche CD1).

A leur arrivée au laboratoire, les souris sont placées en cages collectives (4 à 5 individus par cage), dans une animalerie éclairée selon un cycle 12h :12h (période éclairée : 7h-19h) et maintenue à une température de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$. Les souris ont libre accès à l'eau et à la nourriture (croquettes UAR A04C) pendant toute la durée des expérimentations (sauf lors de la restriction alimentaire pour l'apprentissage opérant en boîte de Skinner). Les souris arrivent au laboratoire à l'âge de six semaines et sont utilisées à l'âge de 2 à 4 mois. Elles disposent ainsi d'au moins 15 jours d'acclimatation aux conditions d'élevage de notre laboratoire avant le début des expériences. Trois à cinq jours (selon l'expérience) avant le début des tests comportementaux, les animaux sont isolés, puis manipulés et pesés quotidiennement afin de les familiariser à l'expérimentateur. Tous les tests sont effectués durant la phase diurne (7h-19h). Les souris OF1 et CD1 ont été testées à l'âge de 3-4 mois, excepté lors de l'expérience évaluant les effets du sAPP dans la tâche d'apprentissage opérant, dans laquelle les souris OF1 étaient âgées de 7 à 9 mois au moment du test.

2. Souris consanguines et souris transgéniques

Dans les travaux présentés dans les chapitres 2 et 3, j'ai utilisé quatre lignées différentes de souris consanguines : deux lignées transgéniques pour le gène de

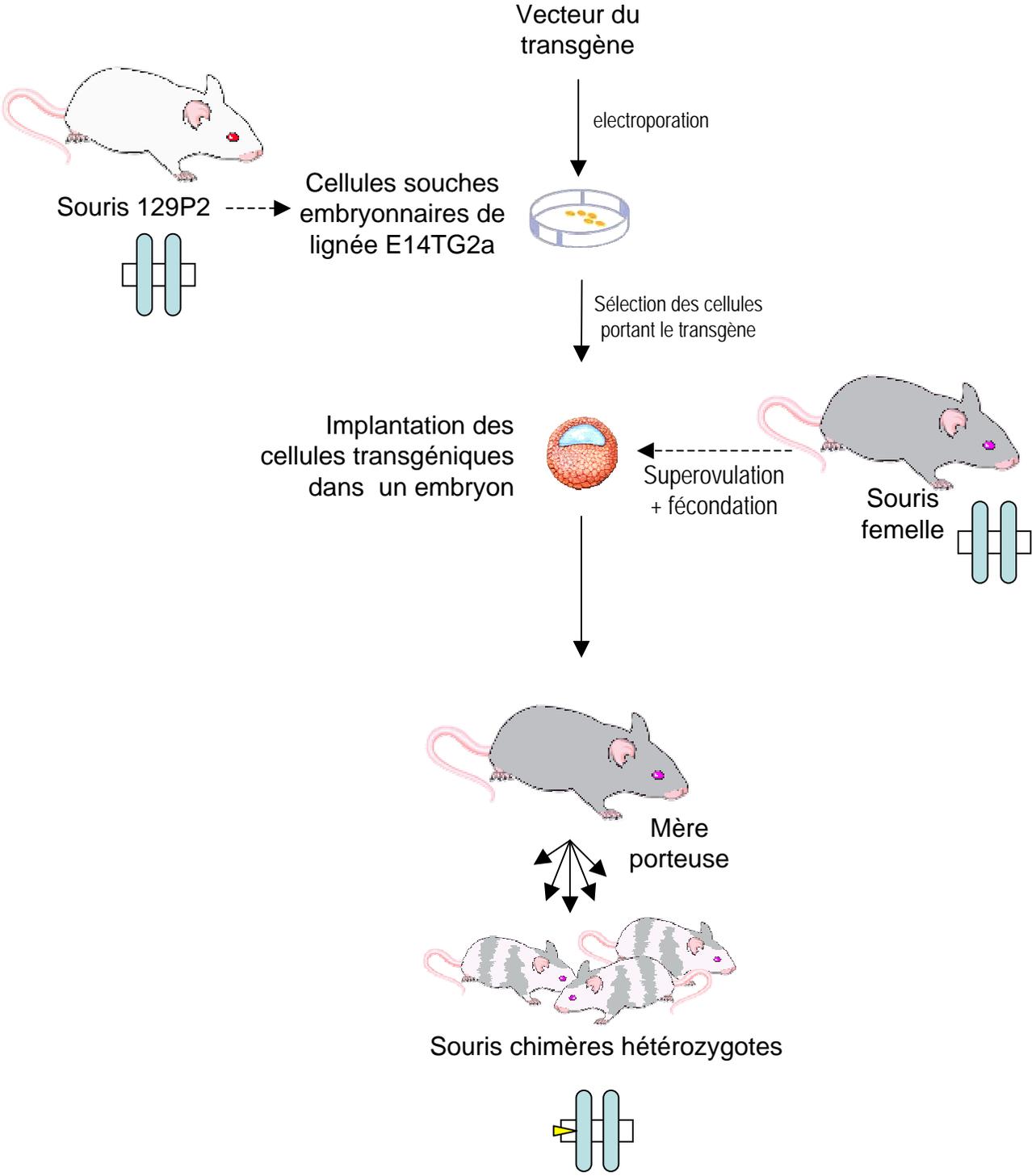


Figure 4 : Création de souris chimères portant un allèle humain de l'apolipoprotéine E

Les lignées de souris apoE3 et apoE4 utilisées dans notre étude ont été obtenues par remplacement ciblé du gène murin par un allèle humain, respectivement l'allèle ε3 ou ε4.

l'apolipoprotéine E désignées « **apoE3** » et « **apoE4** », une lignée déficiente pour le gène de l'apoE désignée « **apoE-KO** » (KO de l'anglais « *knockout* » ; nomenclature officielle de la lignée au 01/01/05 : « B6.129P2- *ApoE*^{tm1Unc}/Cr1 »), et une lignée désignée « **B6** » (nomenclature officielle au 01/01/05 : « C57BL/6Jlco »).

Chez des souris transgéniques générées par la méthode classique d'injection d'ADN humain dans le noyau de la cellule embryonnaire, l'emplacement chromosomique du transgène et le nombre de copies peuvent varier considérablement d'un animal à l'autre et le niveau d'expression du transgène varie entre les individus. Les souris transgéniques apoE3 et apoE4 que nous avons utilisées ont été créées par la méthode de remplacement ciblé du gène murin par l'allèle humain (*targeted gene replacement*), d'où le terme « *knock-in* » qualifiant les souris issues de ce type de manipulation. Les souris apoE3 et apoE4 possèdent donc, à la place de leur gène murin de l'apoE, un allèle du gène humain, respectivement l'allèle $\epsilon 3$ ou l'allèle $\epsilon 4$. Le contexte chromosomique naturel, c'est-à-dire les séquences connues de régulation du gène murin, reste intact (excepté pour d'éventuelles séquences de régulation intragéniques qui pourraient différer entre l'Homme et la Souris). Cette méthode de remplacement ciblé du gène murin par l'allèle humain permet ainsi d'obtenir des souris qui expriment une forme humaine d'apoE à des niveaux physiologiques comparables à ceux de l'apoE murine chez une souris non transgénique (Sullivan et coll., 1997).

Le remplacement ciblé du gène murin a été effectué en injectant un vecteur portant le transgène humain dans des cellules embryonnaires E14TG2a, qui proviennent de souris de la lignée 129P2 (Sullivan et coll., 1997 ; Knouff et coll., 1999). Les cellules portant le transgène ont été sélectionnées, puis intégrées dans des embryons. Ces embryons transplantés dans une mère porteuse ont donné naissance à des souris chimères (voir **figure 4**). Le croisement de ces souris chimères avec des souris B6 a permis d'obtenir des souris transgéniques homozygotes pour l'allèle humain $\epsilon 3$ ou $\epsilon 4$ à la deuxième génération (F2). Les parents des souris transgéniques utilisées dans cette étude, homozygotes $\epsilon 3$ ou $\epsilon 4$, sont issus du rétrocroisement (*backcrossing*) de ces souris F2 $\epsilon 3/\epsilon 3$ ou $\epsilon 4/\epsilon 4$ avec des souris B6 depuis 8 générations (voir **figure 5**).

De la même façon, les parents des souris expérimentales apoE-KO sont issus du rétrocroisement de souris homozygotes pour l'absence d'apoE murine avec des souris B6

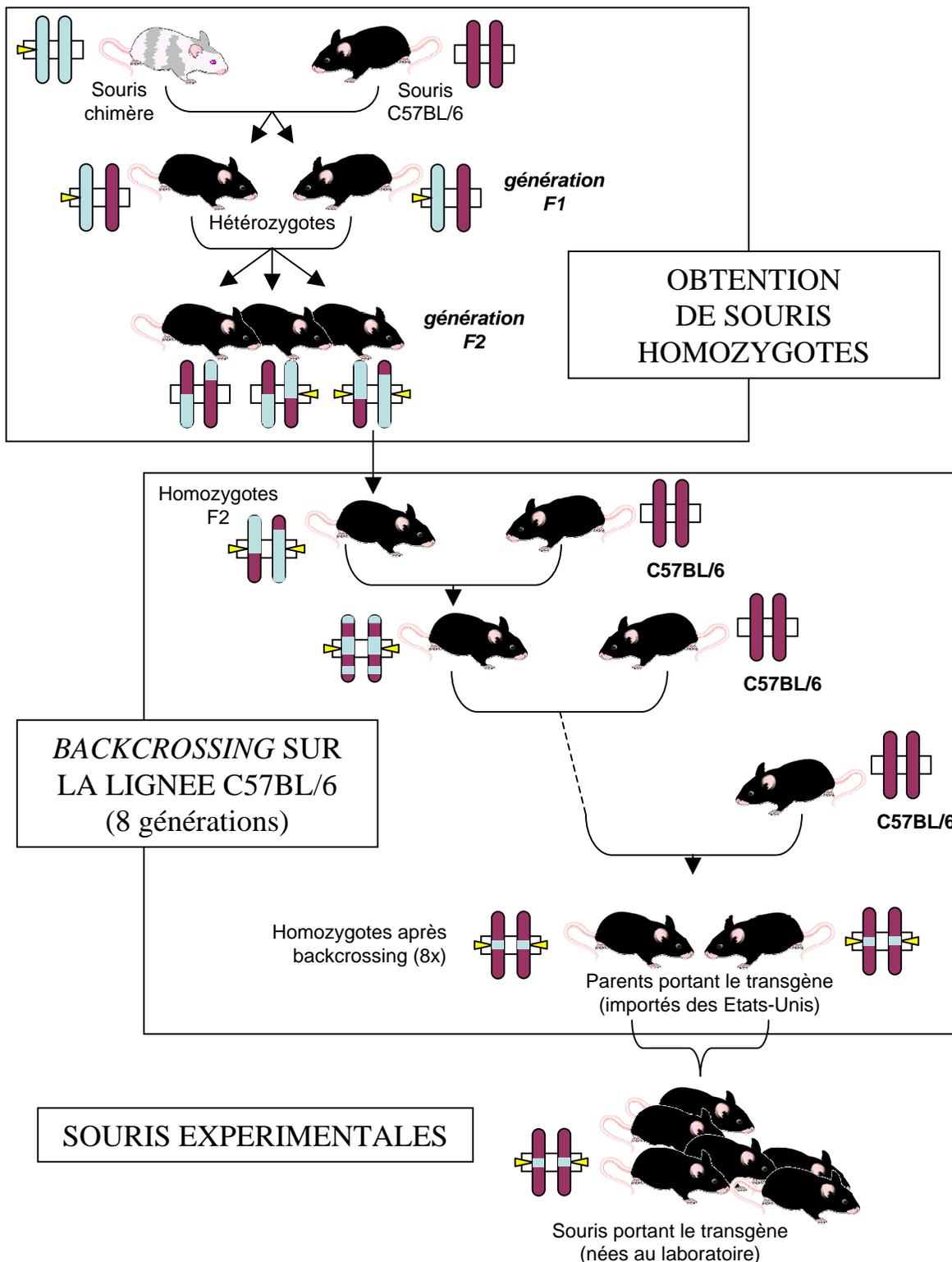


Figure 5 :Création des souris transgéniques pour le gène de l'apolipoprotéine E

Les souris apoE3 et apoE4 utilisées dans notre étude ont été obtenues par croisement des souris chimères portant les allèles humains $\epsilon 3$ ou $\epsilon 4$ de l'apolipoprotéine E avec des souris de lignée C57BL/6.

depuis au moins 9 générations. Les souris expérimentales issues de ces parents apoE-KO ont donc été utilisées comme contrôle de l'absence d'apoE murine.

La lignée de souris B6 « C57BL/6Jlco » a été considérée comme fond génétique des souris transgéniques apoE3, apoE4 et apoE-KO. En effet, les B6 « C57BL6Jlco » françaises (élevage Charles River /Iffa Credo) utilisées dans cette étude dérivent directement des souris B6 « C57BL/6J » américaines (*Jackson Laboratories*, Maine) qui ont été utilisées pour générer les lignées génétiquement modifiées apoE3, apoE4 et apoE-KO.

Des couples de souris provenant soit des Etats-Unis (parents homozygotes pour les allèles ϵ_3 et ϵ_4 , don du Dr. P.M. Sullivan, Duke University), soit du centre d'élevage Charles RIVER / Iffa Credo (parents B6 et apoE-KO) ont donné naissance aux différents groupes de souris utilisés dans les expériences (voir **figure 5**). Ainsi, les souris expérimentales des quatre lignées sont nées au laboratoire et ont pu être élevées de manière identique jusqu'aux expériences (animalerie d'élevage maintenue à une température de $26\pm 1^\circ\text{C}$). Les souris ont été nourries avec des croquettes UAR A03C. Etant donné que le génotype apoE peut influencer les fonctions cognitives et la réponse au stress (Grootendorst, 2001 - Thèse de doctorat), il nous a paru très important d'éviter tout transport des souris destinées aux expérimentations. Afin d'éviter une dérive génétique, l'élevage des souris transgéniques n'a pas dépassé deux (pour la caractérisation comportementale des 4 lignées) à trois générations (pour l'évaluation des effets du sAPP sur les performances des souris apoE4). Les deux sexes des 4 lignées de souris ont été testés séparément (cohorte de souris mâles, puis cohorte de souris femelles testée à 6 semaines d'intervalle), mais on peut observer que dans les groupes de souris apoE3 et apoE4, 76% des mâles et femelles sont frères et sœurs de même portée.

Après sevrage, les souris expérimentales sont maintenues par groupes de même portée et de même sexe dans l'animalerie d'élevage. Afin de faciliter leur identification, les souris apoE3 et apoE4 ont reçu par injection sous-cutanée une puce électronique (ABBI sarl, Usson-du-Poitou, France) au moment du sevrage. L'identité des animaux a été régulièrement contrôlée au cours de l'entretien des litières et au cours de la période expérimentale. Aucune erreur de marquage des animaux n'a été notée. Durant les périodes d'élevage et d'expérimentation, toutes les souris ont accès à volonté à l'eau et à la nourriture. Au début des expériences, les souris expérimentales sont isolées en cages individuelles et transférées dans une animalerie (température : $23\pm 1^\circ\text{C}$, période éclairée : 7h-19h). Trois à quatre jours avant le

début des expériences, les animaux sont manipulés et pesés quotidiennement afin de les familiariser à l'expérimentateur. Dans les expériences nécessitant l'implantation d'une canule d'injection, les animaux sont opérés, puis placés dans des cages individuelles. Après la chirurgie, les souris disposent d'une semaine de repos avant de commencer les tests comportementaux. Tous les tests sont effectués durant la phase diurne. Les souris B6, apoE-KO, apoE3 et apoE4 ont toutes été testées à l'âge de 14-15 mois. Ce travail de caractérisation comportementale, réalisé chez des souris « âgées », faisait suite à une étude similaire effectuée auparavant au laboratoire chez des souris « jeunes » de mêmes lignées, âgées de 4-5 mois. Lors de l'expérience évaluant les effets du sAPP sur les performances des souris apoE4, les animaux étaient âgés de 13 à 19 mois, la majorité des souris (65% des animaux) ayant de 14 à 15 mois.

II. Administration des traitements

1. Injections sous-cutanées

Lors de l'expérience évaluant les effets du sAPP dans la tâche d'apprentissage opérant, j'ai administré aux souris, soit une solution de scopolamine, soit une solution témoin de chlorure de sodium (NaCl). La scopolamine hydrobromide (Sigma, France) est dissoute dans une solution de NaCl à 0,9% (excipient). Les solutions sont injectées par voie sous-cutanée après immobilisation des souris en maintenant la peau du dos de l'animal entre le pouce et l'index. La solution (scopolamine à 3mg.kg^{-1} ou excipient) est injectée sous la peau du cou, à raison de 0,1mL pour 10g de poids corporel. En cas de reflux de solution au niveau du trou laissé par l'aiguille, l'animal est exclu des analyses statistiques.

2. Injections intracérébroventriculaires (i.c.v.)

a. Anesthésie

Afin de réaliser les opérations de chirurgie stéréotaxique permettant d'installer le dispositif d'injection intracérébroventriculaire (i.c.v.), les souris OF1 et CD1 ont été anesthésiées par une injection intrapéritonéale d'une solution de pentobarbital sodique à 70mg.kg^{-1} et à raison de 0,9 mL de solution pour 40 g de poids corporel. Après des essais préliminaires d'anesthésie, nous avons choisi d'utiliser, pour anesthésier les souris B6 et apoE4, une injection intrapéritonéale d'un mélange de xylazine à 1mg.kg^{-1} (Rompun 2%,

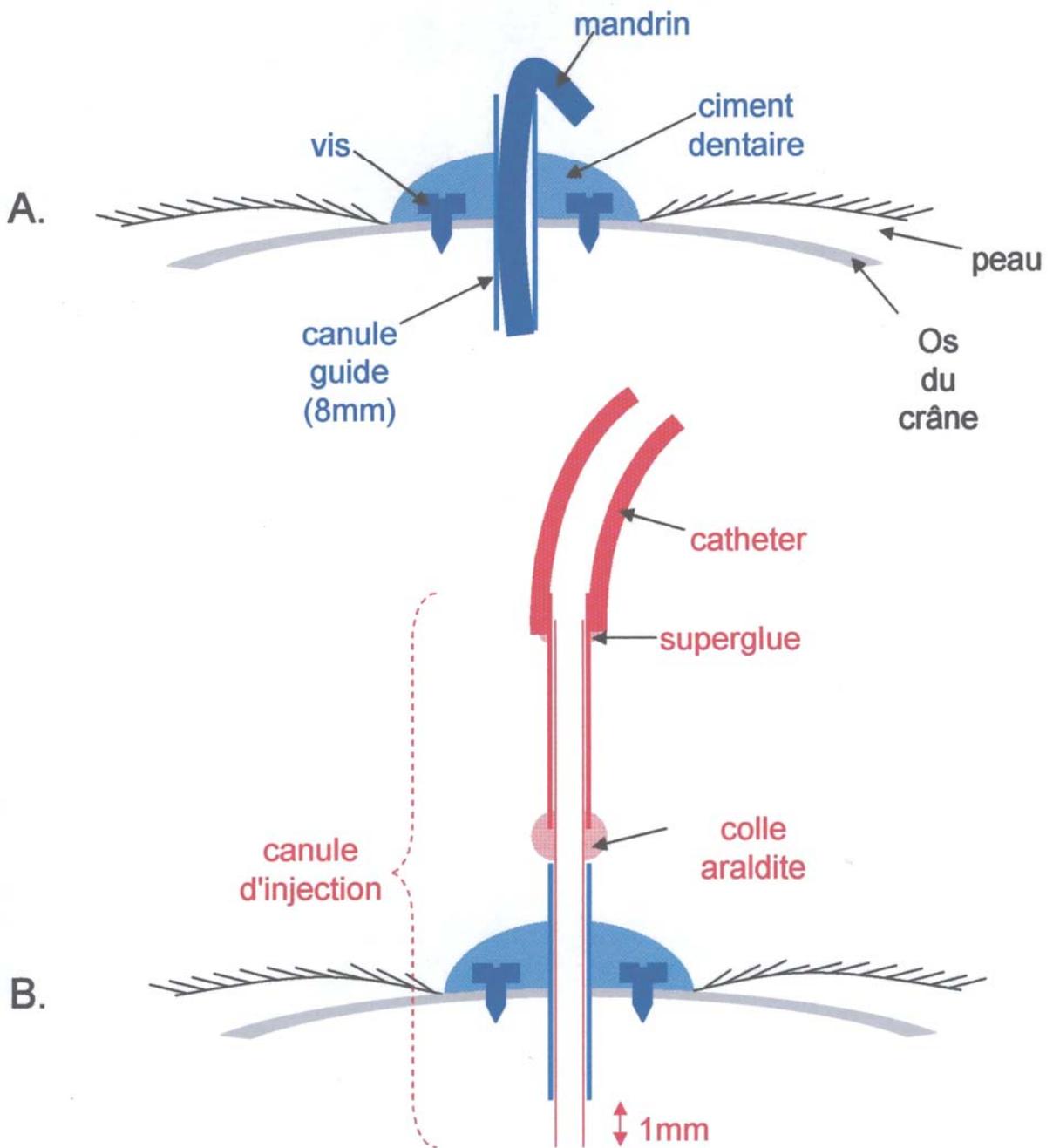


Figure 6 : Dispositif d'injection intracérébroventriculaire (i.c.v.)

A. Le dispositif expérimental est constitué d'une canule guide implantée dans un des ventricules latéraux de la souris et d'un mandrin glissé dans la canule guide afin d'éviter son obstruction.

B. Au moment des traitements, le mandrin est retiré et une canule d'injection (reliée par un cathéter à une seringue Hamilton) est insérée dans la canule guide. Après l'injection, la canule d'injection est retirée et le mandrin replacé dans la canule guide.

Bayer Pharma) et de kétamine à 10 mg.kg^{-1} (Imalgène 500, Merial), à raison de 0,1 mL pour 10 g de poids corporel. En effet, le mélange xylazine/kétamine ne provoque pas de problèmes d'encombrement respiratoire parfois observés avec le pentobarbital sodique.

b. Dispositif d'injection

Le dispositif expérimental (voir **figure 6**) est constitué d'une canule guide (tube en acier de 0,3 mm de diamètre interne, 0,4 mm de diamètre externe, 8 mm de long) implantée dans un des ventricules latéraux de la souris. La canule d'injection est constituée d'un tube en acier (0,28 mm de diamètre externe, 0,18 mm de diamètre interne, 20 mm de long) couissant parfaitement dans la canule guide. La longueur de la canule d'injection est ajustée, à l'aide d'un tube de type canule guide, de façon à ce qu'elle ne dépasse que d'un millimètre lorsqu'elle est introduite dans la canule guide implantée.

Entre les périodes d'injection, un mandrin est glissé dans la canule guide implantée afin d'éviter son obstruction. Le mandrin est un fil d'acier (0,28 mm de diamètre, 8 mm de long) présentant deux courbures. La première, située dans la longueur du mandrin, permet de le maintenir dans la canule guide par un léger effet ressort. La deuxième, située à l'extrémité du mandrin, permet d'ajuster sa longueur sur celle de la canule-guide implantée et de manipuler le mandrin facilement.

c. Chirurgie stéréotaxique

Les animaux sont fixés sur un cadre stéréotaxique pour l'opération. Le crâne est mis à nu par incision de la peau et élimination des tissus conjonctifs qui le recouvrent. Trois trous sont fraisés dans le crâne afin d'y fixer trois vis d'horloger en inox préalablement stérilisées. L'emplacement de la canule guide est repéré, puis foré. La canule guide est positionnée à la surface du cortex, puis descendue dans un des ventricules latéraux. Pour assurer la fixation du dispositif, la canule guide et les vis sont noyées dans du ciment dentaire (Paladur). Enfin, la canule guide est obturée par un mandrin. L'animal, placé dans une cage propre et légèrement chauffée, est surveillé jusqu'à son réveil. Les coordonnées utilisées pour positionner la canule guide sont : pour les souris OF1 et CD1 : 2,3 mm en avant du point lambda, 3,3 mm latéralement à la ligne médiane et 2,65 mm sous la surface du cortex ; pour les souris B6 et apoE4 : 2,3 mm en avant du point lambda, 3,2 mm latéralement à la ligne médiane et 2,40 mm sous la surface du cortex.

Les opérations sont effectuées au moins une semaine avant les tests comportementaux, ce qui permet aux animaux de retrouver un poids égal ou supérieur à celui du jour de l'opération. Les animaux non opérés participant à la même expérience sont isolés au même moment que les animaux opérés. Trois jours avant le début des tests comportementaux, les animaux sont manipulés et pesés chaque jour afin de les habituer à l'expérimentateur. La présence du mandrin est ainsi régulièrement vérifiée et les souris sont familiarisées à la contention dans un torchon et aux gestes de la procédure d'injection i.c.v.

d. Préparation des différentes solutions

Solutions de sAPP₆₉₅ et de NaCl:

La solution mère de sAPP₆₉₅ a été obtenue à partir du milieu de culture de cellules embryonnaires humaines de rein (lignée 293) transfectées avec un ADNc de la forme humaine de l'APP₆₉₅ (fournie par les Drs. S.M. Paul et S. Little, Eli Lilly and Company, USA). Dès son arrivée au laboratoire, une fraction de cette solution mère très concentrée (640 µg/ml) a été diluée dans une solution de NaCl stérile à 0,9 % pour obtenir des solutions de concentration la plus proche possible de celles utilisées dans les tests comportementaux. Ce sont des aliquots congelés de l'une de ces solutions qui ont été utilisés dans ce travail : à chaque expérience, un aliquot est décongelé puis dilué dans la même solution de NaCl pour atteindre la concentration voulue.

Les souris traitées avec du sAPP ont reçu 4 µL de solution de sAPP₆₉₅ dilués dans la même solution de NaCl stérile à 0,9 % ajustée à pH 7,5. D'après les travaux antérieurs de l'équipe (Meziane et coll., 1998), la dose de 0,5 pg de sAPP₆₉₅ par souris provoquait l'amélioration maximale des performances dans la tâche de reconnaissance d'objet. J'ai donc utilisé cette même dose pour les expériences utilisant la tâche de reconnaissance d'objet. Les effets de différentes doses de sAPP₆₉₅ n'ayant jamais été évalués dans la tâche de reconnaissance spatiale ni le test de la piscine de Morris, j'ai également utilisé cette dose de 0,5 pg / 4 µL / souris dans ces deux tâches. En ce qui concerne la tâche d'apprentissage opérant en boîte de Skinner, j'ai utilisé une dose de sAPP₆₉₅ de 5 pg / 4 µL / souris, car l'isoforme 751 du sAPP antagonisait, à cette même dose de 5 pg / 4 µL / souris, les déficits mnésiques induits par la scopolamine dans cette tâche (Meziane et coll., 1998).

Les souris témoins ont reçu une injection de 4 μL de solution de NaCl stérile à 0,9 %, ajustée à un pH de 7,5 par de la soude (NaOH à 0,5 N).

Solutions d'anticorps anti-sAPP α , anti-sAPP β et d'IgG de Lapin :

Dans l'expérience d'apprentissage opérant évaluant les effets d'un blocage des sAPP endogènes sur les performances, des solutions d'anticorps dirigés spécifiquement contre les sAPP α (anti-sAPP α , 0,5 mg.mL⁻¹) ou contre les sAPP β (anti-sAPP β , 0,5 mg.mL⁻¹) ont été injectées par voie i.c.v. à raison de 4 μL par souris. Les souris témoins ont reçu un même volume de solution d'immunoglobulines G de Lapin (IgG, 0,5mg.mL⁻¹), puisque les anticorps anti-sAPP α et anti-sAPP β ont été fabriqués chez le Lapin.

Les solutions mères d'anti-sAPP α (1 mg.mL⁻¹) et d'anti-sAPP β (1,3 mg.mL⁻¹ ; don de Eli Lilly and Company, Indianapolis, Etats-Unis) ont été diluées dans une solution de NaCl stérile à 0,9 % ajustée à un pH de 7,5 par de la soude (NaOH à 0,5 N).

e. Procédure d'injection intracérébroventriculaire

La canule d'injection est reliée à une seringue Hamilton (5 μl) par un cathéter. L'ensemble du dispositif est rempli d'eau ultra pure (issue d'un appareil Millipore). La solution du traitement est aspirée à partir de la canule d'injection en prenant soin d'intercaler une petite bulle d'air entre l'eau ultra pure et la solution. Le mandrin inséré dans la canule guide du sujet est retiré et remplacé par la canule d'injection. La solution est progressivement administrée sur une période de 40 s et la canule d'injection est maintenue en place durant les 30 s suivantes. La canule d'injection est ensuite doucement retirée et le mandrin replacé. Le volume injecté est de 4 μl par souris. Pendant la durée de l'injection et des manipulations du mandrin et de la canule, la souris est maintenue immobile dans le torchon (celui utilisé lors de la familiarisation des animaux). Toute souris pour laquelle on observe un reflux de solution, pendant l'injection ou juste après avoir retiré la canule, ainsi que toute souris tombant malade après l'injection i.c.v., est exclue des analyses statistiques.

f. Contrôles histologiques

Les souris sont sacrifiées après les épreuves comportementales par élévation cervicale, puis subissent immédiatement une injection i.c.v. de 4 μL de bleu de méthylène dans les mêmes conditions que lors des expériences. La solution de bleu de méthylène

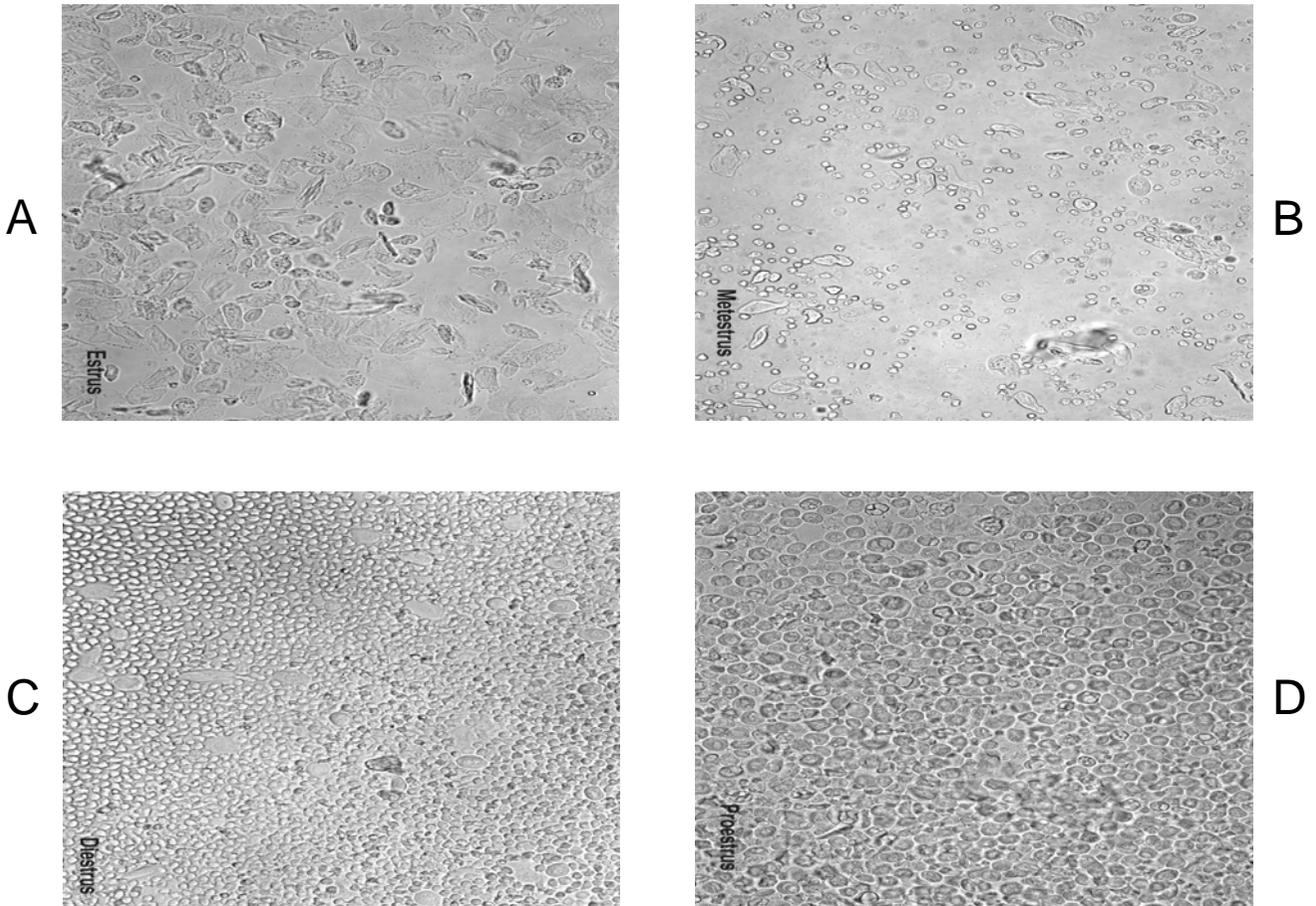


Figure 7 : Détermination des différents stades du cycle ovarien chez la souris femelle

L'observation des cellules du mucus vaginal sous un microscope optique permet de déterminer les différents stades du cycle ovarien :

A - Œstrus :

cellules épithéliales kératinisées et éventuellement agglomérées

B - Metœstrus :

leucocytes, cellules épithéliales nucléées et cellules kératinisées

C - Dicœstrus :

prédominance de leucocytes (cellules sphériques de petite taille)

D - Proœstrus :

prédominance de cellules épithéliales nucléées (cellules sphériques de grande taille)

D'après <http://www.princeton.edu/~altlab/Photos.htm>

injectée *via* la canule d'injection est obtenue par adjonction de bleu de méthylène en poudre dans de l'eau ultra pure, jusqu'à atteindre la limite de solubilité, puis par filtration.

Les animaux sont ensuite décapités et les têtes sont plongées pendant au moins 48h dans du paraformaldéhyde à 4% afin de fixer les tissus. Après extraction de la boîte crânienne, les cerveaux sont coupés au microtome à congélation en coupes d'environ 200 μm d'épaisseur. Ceci permet de vérifier d'une part l'implantation correcte de la canule d'injection (le cerveau étant fixé alors que la canule guide est encore en place, le site d'implantation est parfaitement visible, même à l'œil nu), et d'autre part la bonne diffusion du bleu de méthylène dans les ventricules. Les souris ne présentant pas ces caractéristiques sont exclues des analyses statistiques.

III. Détermination du cycle ovarien

Dans une expérience de reconnaissance spatiale présentée dans le premier chapitre, j'ai été amenée à déterminer le stade du cycle ovarien chez des souris OF1 femelles par des prélèvements quotidiens de mucus vaginal. Nous désirions ainsi évaluer l'influence possible du stade du cycle ovarien des souris femelles sur leurs performances de reconnaissance spatiale. Pour effectuer les prélèvements, j'ai utilisé une pipette fine en verre dont l'extrémité est fondue sous un bec bunsen afin de former une petite boule lisse (ceci afin d'éviter toute plaie vaginale) d'environ 2 mm de diamètre.

La souris est maintenue (contention par la peau du cou, pattes vers le haut) lors du prélèvement de mucus vaginal par introduction du bout de la pipette dans l'orifice génital sur lequel une goutte de solution de NaCl (0,9%) aura préalablement été déposée. Les cellules contenues dans ce mucus vaginal sont ensuite observées sous microscope. Les 4 stades du cycle ovarien chez la Souris (4 jours, **voir figure 7**) peuvent être déterminés suivant le type de cellules présentes dans le mucus :

- durant l'Œstrus : cellules épithéliales kératinisées et éventuellement agglomérées,
- durant le Métœstrus : leucocytes et cellules épithéliales nucléées et cellules kératinisées,
- durant le Diœstrus : prédominance de leucocytes,
- durant le Proœstrus : prédominance de cellules épithéliales nucléées non kératinisées.

Afin de déterminer, avec le plus de précision possible, le stade ovarien des souris au moment du test, les prélèvements et analyses de cellules présentes dans le mucus ont été

réalisés quotidiennement pendant les 7 jours précédant la tâche comportementale ainsi que pendant les jours où les souris ont été testées.

IV. Prélèvements sanguins et dosages de corticostérone plasmatique

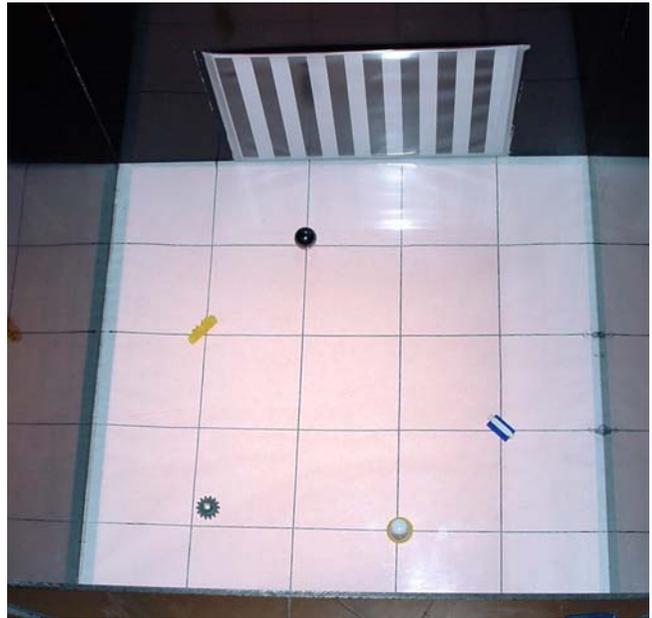
Afin d'évaluer le lien possible entre le niveau de stress de souris hébergées dans différentes animaleries et leurs performances de reconnaissance d'objet (voir la dernière expérience du chapitre I), j'ai effectué des prélèvements sanguins dans le but de doser la concentration de corticostérone plasmatique chez ces souris. En effet, la concentration sanguine de cette hormone est notamment liée au niveau de stress.

Les prélèvements sanguins ont été réalisés par incision de la veine caudale à la base de la queue des souris avec une lame de scalpel (Durschlag et coll., 1996). Les gouttes de sang (50 à 100 μ L) sont prélevées par l'extrémité d'un tube capillaire hépariné. Cette méthode de prélèvement rapide (1 à 2 mn) et ne nécessitant pas d'anesthésie peut être répétée plusieurs fois (deux prélèvements par souris dans cette étude : le matin et le soir) et permet de mesurer le niveau basal de corticostérone (le matin). Les prélèvements ont été réalisés le matin dans les 2 heures suivant l'allumage des lumières et le soir dans l'heure qui précède l'extinction des lumières de l'animalerie. Ceci nous a permis de mesurer les niveaux de corticostérone les plus représentatifs, c'est-à-dire respectivement aux alentours du « creux » et du « pic » du rythme circadien de sécrétion.

Immédiatement après le prélèvement, chaque tube est placé dans la glace avant d'être centrifugé (12000 tours/mn) à 5°C. Le plasma (minimum 15 μ L) est prélevé après centrifugation de l'échantillon, puis stocké dans un tube Eppendorf à -80°C jusqu'au dosage radio-immunologique (*¹²⁵I-corticosterone radioimmunoassay (RIA) for rats and mice* ; ICN Pharmaceuticals, Inc., New York, USA). Ces dosages de corticostérone plasmatique par RIA ont été réalisés par le Dr. J. Grootendorst au sein de la Division de Pharmacologie Médicale (Leiden/Amsterdam Center for Drug Research, 2300 RA Leiden, Pays Bas).



A



B



C



D

Figure 8 : Dispositif utilisé pour les tâches de reconnaissance

A. Enceinte de test (*open field*)

B. Fond de l'enceinte montrant le quadrillage, les objets et la carte plastifiée

C. Objets utilisés pour la tâche de reconnaissance d'objet

D. Objets utilisés pour la tâche de reconnaissance spatiale

V. Tâches d'apprentissage et de mémoire

1. Tâches de reconnaissance d'objet et de reconnaissance spatiale

a. Appareil de test

On utilise une enceinte ouverte (*open field*) en Plexiglas (voir **figure 8, A**) formée d'un plancher horizontal carré translucide de 52 cm de côté et de parois verticales noires d'une hauteur de 40 cm. Une feuille de papier blanc positionnée sous le fond translucide permet la division de cette surface en 25 carreaux identiques par des lignes noires, et une homogénéisation de l'éclairage provenant d'une ampoule de 60 W centrée 32 cm sous le plan horizontal. Pour la tâche de reconnaissance spatiale, une carte plastifiée de format A4 présentant des bandes verticales noires sur fond blanc est fixée à l'une des parois de l'enceinte (voir **figure 8, B**). La présence fixe de cette carte au cours de toutes les sessions du test apporte aux animaux un indice d'orientation dans l'enceinte. Les expériences sont menées dans une pièce dont la température est maintenue à $23\pm 1^\circ\text{C}$ et dans laquelle la soufflerie du système de ventilation fournit un bruit de fond durant toute l'expérience.

L'expérimentateur effectue ses observations à partir du reflet du fond de l'enceinte sur les parois, de façon à perturber le moins possible le comportement du sujet. Deux enceintes identiques sont utilisées lors des expériences. Le nettoyage des enceintes à l'aide d'un papier absorbant trempé dans l'alcool permet de réduire et d'homogénéiser les traces olfactives laissées par les souris après chaque passage dans l'enceinte. Cependant, l'animal macrosmate qu'est la Souris est très probablement capable de détecter des traces olfactives récentes laissées par un congénère, même après nettoyage de l'enceinte. Ainsi, afin que toutes les souris expérimentales, y compris la première, passent le test dans les mêmes conditions, une souris « pionnier » est placée une dizaine de minutes dans l'enceinte au début de chaque jour d'expérience.

Une caméra placée au-dessus de l'enceinte lors des expériences avec des souris de fond génétique B6 a permis d'enregistrer les déplacements de ces souris. Ceci a permis de mesurer ultérieurement l'activité locomotrice des animaux à partir de la bande vidéo prise lors de l'expérience, soit en comptant les carreaux traversés minute par minute dans l'enceinte, soit grâce à un logiciel de suivi de la trajectoire de l'animal (*Ethovision video tracking system*, version 2.3, Noldus Information Technology, Wageningen, Pays-Bas).

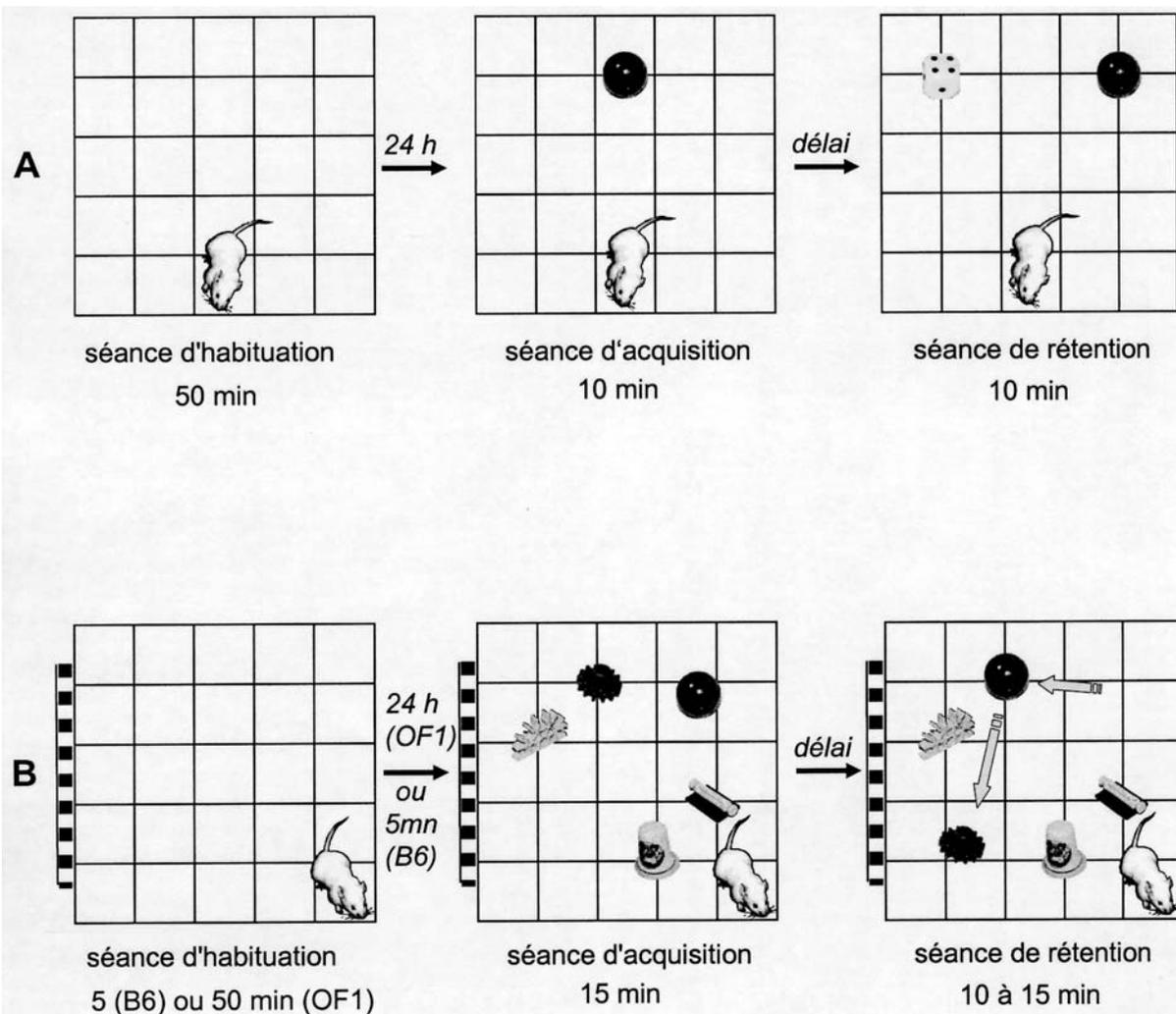


Figure 9 : Déroulement des tâches de reconnaissance

- A. Tâche de reconnaissance d'objet
- B. Tâche de reconnaissance spatiale

b. Objets utilisés

Les objets sont fixés au fond de l'enceinte par des pâtes adhésives (UHU Patafix) et mesurent de 2,4 à 3,8 cm de haut. Après chaque session, les objets sont trempés dans l'alcool (éthanol 96%), puis séchés afin d'éliminer le plus possible les traces odorantes laissées par les animaux. Pour la même raison, deux à trois jeux différents d'objets identiques sont utilisés alternativement pour les séances d'acquisition et de rétention.

Les objets (voir **figures 8, C et D**) utilisés pour la tâche de réactivité à la nouveauté d'objet sont : une bille de verre translucide verte et un dé à jouer en plastique blanc à points noirs. Dans chaque groupe expérimental, l'objet familier est la bille pour environ la moitié des souris, le dé pour les autres souris. Les objets utilisés pour la tâche de réactivité à la nouveauté spatiale sont : une bille de verre noire irisée, un dé à coudre de porcelaine collé sur un jeton de plastique jaune, une roue dentée en plastique gris, un «éventail» de plastique jaune (CD1 et OF1) ou rouge (B6, apoE-KO, apoE3 et apoE4), et un «essieu» de plastique blanc collé sur un jeton rectangulaire de plastique bleu. Les trois derniers objets sont des éléments d'un jeu de construction pour enfants.

c. Déroulement des tests de reconnaissance

Séance d'habituation

Les animaux sont d'abord soumis à une séance d'habituation : pour la tâche de reconnaissance d'objet, la souris est toujours déposée au milieu d'un des côtés de l'enceinte, la tête dirigée vers la paroi (voir **figure 9, A**) ; ou dans un coin pour la tâche de reconnaissance spatiale, la tête dirigée vers le coin (voir **figure 9, B**). La durée de la séance d'habituation était de 50 mn (souris OF1 et CD1) ou de 5 mn (souris sur fond génétique B6). Pendant que l'animal explore librement l'enceinte, on mesure l'activité locomotrice (nombre de carreaux traversés) et le nombre de redressements (les deux pattes antérieures quittent le sol en s'appuyant ou non sur la paroi). Les comptages sont effectués minute par minute par blocs de 5 mn, et les blocs de prise de données sont espacés de 10 mn (exemple pour une habituation de 50 mn : les données sont prises minute par minute pendant les blocs « 0-5 mn », « 15-20 mn », « 30-35 mn » et enfin « 45-50 mn »).

Séances d'acquisition et de rétention de la tâche de reconnaissance d'objet

Le lendemain de la séance d'habituation, l'animal est déposé au même endroit que la veille et explore librement pendant 10 mn l'enceinte où a été placé un objet A (bille ou dé à jouer). Le temps d'exploration de l'objet (en secondes) est mesuré minute par minute pendant cette séance d'acquisition. On considère que l'animal explore l'objet lorsque le museau est dirigé vers l'objet et à moins de 1 cm de celui-ci. Il s'agit du temps passé à renifler l'objet : les comportements de mordillement des objets, de passage sur ou à côté de l'objet n'étant pas considérés comme de l'exploration.

Après un délai dit « de rétention », l'animal est replacé dans l'enceinte durant 10 mn et explore librement les deux objets (A et B) placés comme indiqué sur la **figure 9, A**. Les temps d'exploration de ces deux objets sont relevés minute par minute pendant cette séance de rétention. Les temps d'exploration de l'objet familier A (TA) et de l'objet nouveau B (TB) permettent de calculer un indice d'exploration du nouvel objet défini par : $TB / (TA + TB)$.

Séances d'acquisition et de rétention de la tâche de reconnaissance spatiale

Après la séance d'habituation (24 h et 5 mn plus tard respectivement pour les souris OF1 et les souris sur fond génétique B6), la souris est déposée au même endroit que la veille et explore librement pendant 15 mn l'enceinte où ont été placés les cinq objets (bille, dé à coudre, essieu, éventail et roue dentée) selon la configuration indiquée sur la **figure 9, B**. Les temps d'exploration des objets (en secondes) sont mesurés minute par minute pendant cette séance d'acquisition. L'absence de préférence pour l'une ou l'autre catégorie d'objet lors de la séance d'acquisition (sur les 5 dernières mn de la séance d'acquisition pour les souris OF1, et sur l'ensemble des 15 mn de la séance d'acquisition pour les souris sur fond génétique B6) est vérifiée lors de chaque expérience.

Après un délai dit « de rétention », l'animal est replacé dans l'enceinte durant 10mn (pour les souris OF1) ou 15mn (pour les souris sur fond génétique B6) et explore librement les objets dont la configuration spatiale a été modifiée, comme indiqué sur la **figure 9, B**. Les temps d'exploration des cinq objets sont relevés individuellement et par périodes de 5 mn pendant cette séance de rétention.

Avec les souris OF1, la performance a été évaluée en comparant l'exploration des objets « déplacés » à celle des objets « non déplacés », uniquement au cours des 5 premières minutes de cette séance de rétention. En effet, ces souris ne montrent habituellement plus

aucune différence dans l'exploration de ces deux catégories d'objets lors des 5 dernières minutes de la séance de rétention (Bour et coll., 2004).

Par contre, les souris sur fond génétique B6 ont montré des différences d'exploration des deux catégories d'objet tout au long de la séance de rétention de 15 mn. Nous avons donc décidé d'évaluer la performance de ces souris en tenant compte de l'ensemble des 15 mn de la séance de rétention.

Je vais maintenant expliquer plus en détail pourquoi j'ai utilisé des protocoles différents pour les souris OF1 et les souris de fond génétique B6.

Pendant la mise au point de la tâche de reconnaissance spatiale dans notre laboratoire chez la souris OF1, nous avons comparé les performances des souris obtenues selon deux protocoles différents (Bour et coll., 2004). Le premier protocole était un protocole à sessions multiples (1 séance d'habituation de 50 mn, puis le lendemain trois séances d'acquisition de 5 mn chacune et enfin, 2 séances de rétention de 5 mn chacune) se rapprochant de celui classiquement utilisé dans la littérature chez la souris B6 (Thinus-Blanc et coll., 1996 ; Ammassari-Teule et coll., 1995). Le deuxième protocole était un protocole à sessions regroupées (1 séance d'habituation de 50 mn, puis le lendemain une séance d'acquisition de 15 mn, et enfin une séance de rétention de 10 mn) se rapprochant de celui utilisé dans les expériences de reconnaissance d'objet déjà effectuées au laboratoire chez la souris OF1 (Dodart et coll., 1997). Dans ces deux protocoles, les souris OF1 présentaient des performances comparables. C'est pour cette raison que nous avons choisi de réaliser les expériences présentées dans le deuxième chapitre selon le protocole à sessions regroupées.

Afin de caractériser les performances de nos 4 lignées de souris de fond génétique B6 (cohorte « jeune », puis cohorte « âgée ») en limitant au maximum les manipulations des animaux, nous avons de la même façon utilisé un protocole à sessions regroupées. Nous avons d'abord vérifié que les souris B6 montraient des performances identiques dans un protocole à sessions regroupées et dans un protocole à sessions multiples (données personnelles non publiées du Dr. Grootendorst). Puisque les travaux de la littérature utilisaient une séance courte d'habituation chez la souris B6, nous avons également utilisé pour cette expérience une séance d'habituation de 5 mn réalisée 5 mn seulement avant la séance d'acquisition. Les

souris B6 ayant montré le même niveau de performances dans les deux protocoles, nous avons donc conservé le protocole à sessions regroupées.

Une seconde expérience préliminaire, dans laquelle le Dr. Grootendorst a évalué les performances de souris B6 et de souris apoE-KO (données non publiées), a permis de montrer que la performance de reconnaissance spatiale des souris apoE-KO ne s'exprimait qu'au cours de la seconde moitié de la séance de rétention de 10 mn. Les bonnes performances de reconnaissance spatiale des souris apoE-KO ne pouvaient donc être mises en évidence qu'en évaluant l'exploration des deux catégories d'objets sur la totalité des 10 mn de la séance de rétention. A partir de ces observations, nous avons donc décidé d'évaluer les performances de reconnaissance spatiale de la cohorte de souris transgéniques « jeunes » sur l'ensemble de la séance de rétention.

D'autre part, le Dr. Mathis a pu constater que les souris B6 montraient une exploration globale des objets moins importante que celle des souris de souche OF1, avec le protocole utilisé au laboratoire. De la même façon, Chen et collaborateurs (2000) ont évalué les performances de souris hybrides Swiss Webster / DBA / C57BL6, en les laissant jusqu'à 20 mn dans l'enceinte de test pendant les séances d'acquisition ou de rétention, pour atteindre un total de 30 s d'exploration des objets. Compte tenu de ce faible niveau d'exploration des objets chez les souris B6, nous avons choisi de prolonger de 5 mn supplémentaires la séance de rétention. Ainsi, lors de la caractérisation des 4 lignées de souris de fond génétique B6, nous avons utilisé une séance de rétention de 15 mn.

Le protocole utilisé pour la caractérisation des performances des 4 lignées de fond génétique B6 était donc constitué d'une séance d'habituation de 5 mn, d'une séance d'acquisition de 15 mn et d'une séance de rétention de 15 mn, chaque séance étant séparée l'une de l'autre par un délai de 5 mn. La performance a été évaluée en comparant l'exploration des objets déplacés et non déplacés sur l'ensemble des 15 mn de la séance de rétention.

d. Problèmes rencontrés au cours des tests de reconnaissance

Peu après le début de mon travail de thèse, j'ai rencontré un problème de réplicabilité des tests de reconnaissance chez les souris non consanguines (OF1 et CD1).

Les premières expériences exposées dans ce manuscrit décrivent une partie du travail de recherche de la cause de ce problème et débouchent sur la mise en évidence de l'influence négative du système de ventilation de nos animaleries sur le comportement de reconnaissance des animaux.

Afin de ne pas surcharger la description des tests, les protocoles décrits dans les paragraphes précédents sont ceux qui ont été utilisés pour étudier les propriétés du sAPP chez les souris OF1. En effet, pour rechercher la cause de ce problème de répliquabilité, j'ai modifié plusieurs fois le protocole de base des tâches de reconnaissance. Ces variations sont décrites ultérieurement lors de la présentation de chaque expérience.

Le test de reconnaissance spatiale utilisé lors de la caractérisation comportementale des souris transgéniques pour le gène de l'apoE a été auparavant mis au point au laboratoire avec la lignée C57BL/6. Nous n'avons pas observé de problème particulier avec cette lignée de souris.

2. Tâche d'apprentissage opérant en boîte de Skinner

a. Restriction alimentaire

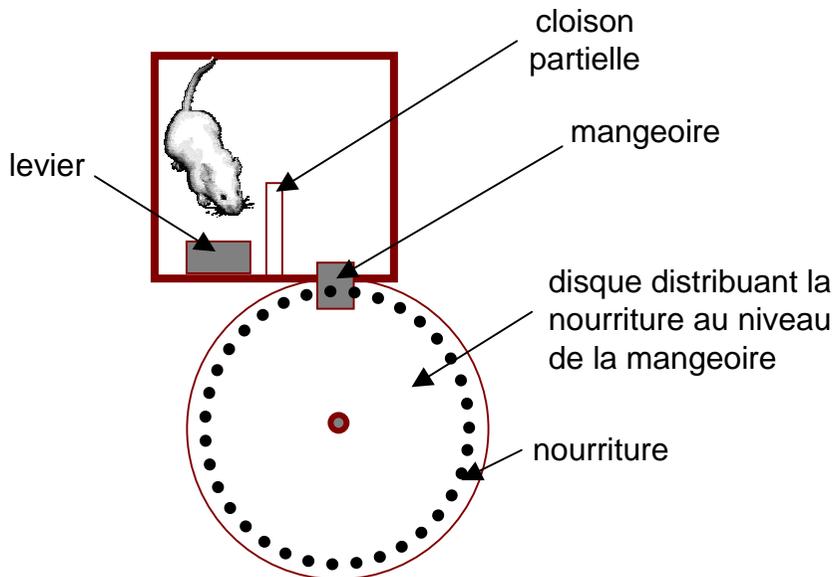
La tâche d'apprentissage opérant en boîte de Skinner est une tâche à renforcement positif dans laquelle les souris peuvent associer l'appui sur un levier à l'obtention d'un renforcement alimentaire. Afin d'atteindre un niveau de motivation suffisant lors de l'apprentissage, les souris subissent une restriction alimentaire qui débute trois jours avant l'expérience. Ainsi, la nourriture est retirée mais l'accès libre à l'eau est maintenu jusqu'à la fin de l'expérience. Les animaux sont nourris et pesés quotidiennement en fonction de leur perte de poids. Afin d'obtenir un niveau de motivation suffisant lors de l'apprentissage tout en évitant une perte de poids trop importante, les animaux sont amenés et maintenus ainsi entre 80 et 85% de leur poids *ad libitum*. Quelques pâtes alimentaires (« Invisibles », Casino, France), utilisées par la suite comme récompense lors de l'apprentissage, sont données aux souris avant le test afin de les familiariser à cette nourriture. Toutes les souris testées à ce jour montrent une grande appétence pour ces pâtes. Les jours de test, les pâtes ne sont données que durant les séances de conditionnement et les animaux ne reçoivent leur ration alimentaire quotidienne qu'une heure après leur passage en boîte de Skinner.



Figure 10 : Dispositif d'apprentissage opérant en boîte de Skinner

On peut distinguer sur cette photo les deux compartiments séparés par une cloison partielle, avec à gauche le côté "levier" et à droite le côté "mangeoire". Chaque appui sur le levier entraîne une rotation du disque et la délivrance au niveau de la mangeoire d'une pâte alimentaire.

Ci-dessous un schéma du dispositif vu du dessus.



b. Dispositif de conditionnement

Le dispositif (voir **figure 10**) se compose d'un compartiment dans lequel se trouvent un levier et un distributeur de nourriture. Ces deux éléments sont séparés par une cloison partielle en plexiglas ce qui oblige l'animal à faire un détour, soit pour actionner le levier, soit pour saisir la nourriture (pâtes alimentaires). Le distributeur de nourriture consiste en une roue de plexiglas creusée à son pourtour de godets équidistants. Chaque appui sur le levier déclenche une rotation de la roue, et la présentation devant la mangeoire d'un nouveau godet contenant une pâte alimentaire. Ce mécanisme évite ainsi l'accumulation de nourriture non consommée au niveau de la mangeoire.

c. Déroulement du test

Le conditionnement s'effectue sur deux séances séparées de 24 h. Durant la première séance, correspondant à la phase d'acquisition de la tâche, l'animal est placé dans le dispositif de conditionnement pour une période de 20 mn maximum. Un programme de renforcement continu est utilisé : chaque appui sur le levier permet à l'animal d'obtenir une pâte alimentaire au niveau de la mangeoire. L'animal est retiré du dispositif dès qu'il a effectué 15 réponses renforcées. Une réponse renforcée est définie comme un appui sur le levier et d'une prise alimentaire dans les 20 s qui suivent. Lorsque l'animal n'effectue pas les 15 appuis renforcés en moins de 20 minutes, ou bien lorsque le nombre d'appuis renforcés durant les 5 dernières minutes est inférieur à 3 ou supérieur à 10, l'animal est exclu des analyses statistiques.

Lors de la deuxième séance, correspondant à la phase de rétection, l'animal est replacé dans le dispositif de conditionnement pendant 15 mn et on enregistre le nombre d'appuis renforcés. Pour recueillir les données, l'expérimentateur est aidé par un dérouleur graphique enregistrant les appuis sur le levier, le nombre de visites dans la zone du levier et le nombre de visites à la mangeoire. L'expérimentateur note sur la bande d'enregistrement lorsque la récompense alimentaire obtenue après un appui est effectivement consommée par la souris. La performance est évaluée en comparant le nombre d'appuis renforcés effectué pendant les 5 dernières mn de la phase d'acquisition au nombre d'appuis renforcés effectué pendant les 5 premières mn de la phase de rétection. Les animaux ne présentant pas un état de santé général satisfaisant lors de cette séance de rétection sont exclus des analyses statistiques.

Dans ce protocole, la souris ne peut effectuer que 15 appuis renforcés pendant la première séance : l'acquisition est dite partielle. Ceci permet, durant la séance de rétection,

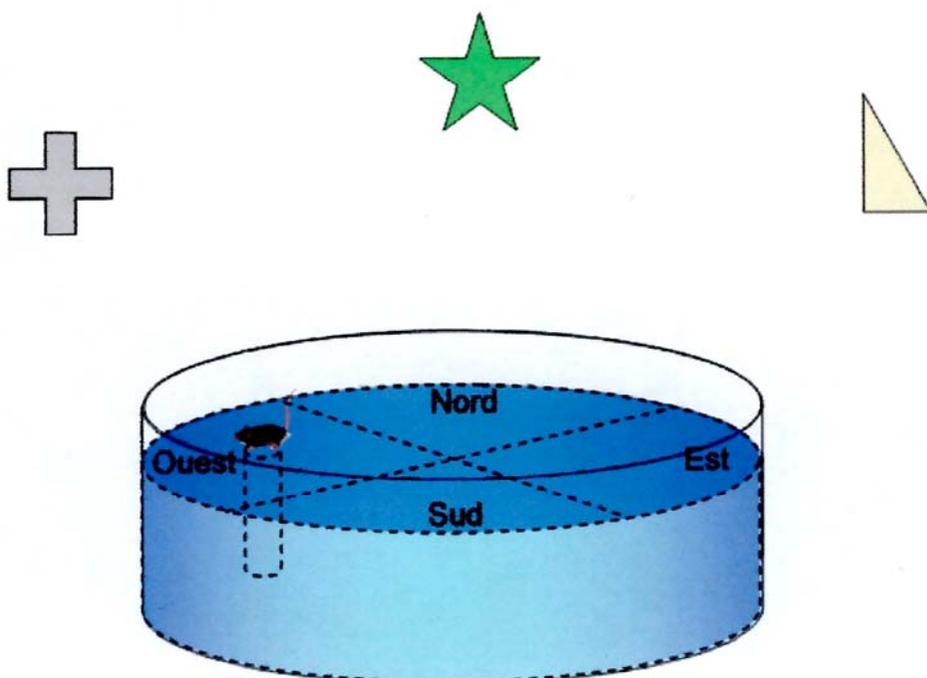
Figure 11: Dispositif de la piscine de Morris

Sur la photo du bassin vide, on peut distinguer les positions possibles de la plate-forme.



Voici un exemple de trajectoire suivie par une souris depuis le point de lâcher (contre la paroi) jusqu'à la plate-forme invisible située dans le quadrant virtuel cible « Ouest ».

Des indices visuels disposés sur les murs de la pièce (posters, formes...) permettent à l'animal de se repérer dans l'espace.



de mettre en évidence une amélioration spontanée des performances, dans les heures qui suivent (ici 24 h) l'acquisition d'une tâche. Il s'agit du phénomène de réminiscence décrit par Jaffard et collaborateurs en 1974.

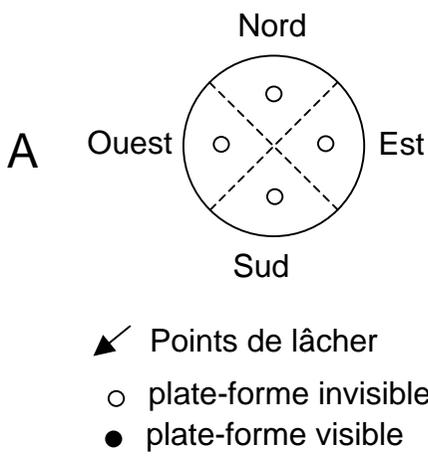
3. Tâches dans la piscine de Morris

Ce test a été conçu par R.G.M. Morris (1984) pour évaluer les capacités des rats à mémoriser et à gérer de l'information spatiale pour échapper à une situation aversive (l'eau d'un bassin) en atteignant un refuge le plus rapidement possible (une plate-forme non visible immergée à 1cm sous la surface). A partir de ce principe, de nombreux protocoles ont été développés pour distinguer différentes composantes de la mémoire (mémoire de référence, mémoire de travail) et déceler les différentes stratégies que peuvent utiliser les animaux pour se repérer dans l'espace. L'animal peut en effet retrouver la plate-forme en utilisant différentes sortes d'indices. Il peut répéter une séquence de mouvements l'ayant déjà mené jusqu'à la plate-forme : il utilisera alors une stratégie égocentrique. Il peut aussi se diriger vers des indices proximaux (situés à l'intérieur du bassin) qu'il aura auparavant associé à la position de la plate-forme. L'animal peut également utiliser des indices distaux (extérieurs au bassin) et repérer la plate-forme par triangulation : il utilisera alors une stratégie allocentrique. Pour une revue de synthèse sur l'utilisation de cette tâche dans les recherches sur l'apprentissage et la mémoire, on peut se référer à l'article de D'Hooge et De Deyn (2001).

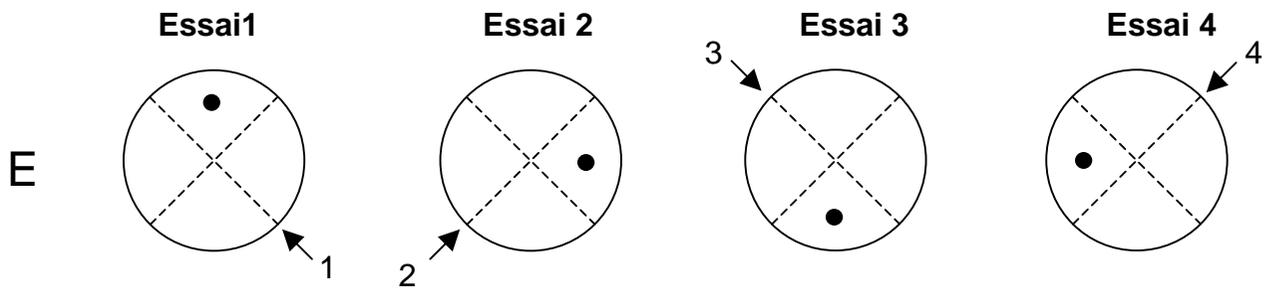
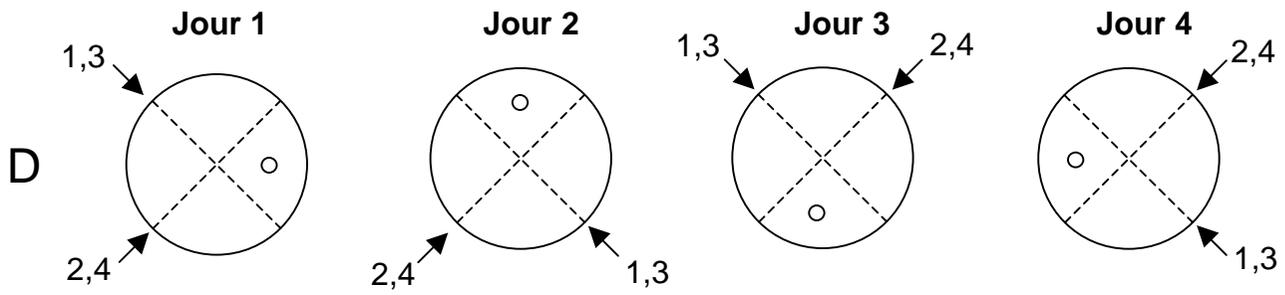
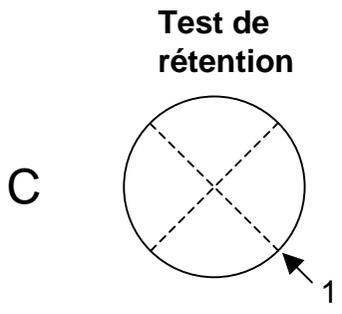
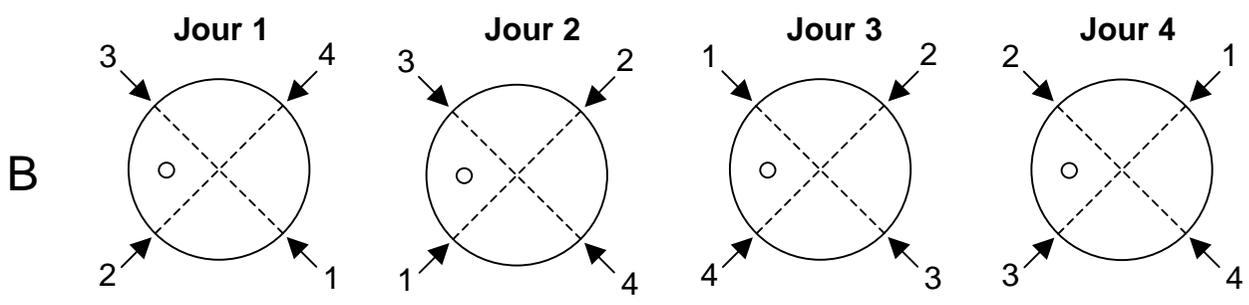
a. Dispositif

Le dispositif expérimental du test de la piscine de Morris est constitué d'une enceinte circulaire de plastique blanc de 140 cm de diamètre et de 40 cm de hauteur (voir **figure 11**) remplie à moitié (20 cm) par de l'eau rendue opaque par l'adjonction de lait en poudre. L'eau est changée quotidiennement. La température relativement basse de l'eau (20°C) confère à ce test un caractère aversif pour l'animal. Une plate-forme, constituée d'un bocal en verre de section hexagonale, est disposée à l'intérieur de l'enceinte et reste invisible pour l'animal, car située 1 cm sous la surface de l'eau. Dans la pièce, sont disposés plusieurs indices distaux (étagères contenant les cages, évier, radiateur, posters...) susceptibles de permettre à l'animal de se repérer dans l'espace. Ainsi, l'animal peut repérer la position de la plate-forme par rapport à un cadre de référence allocentrique comportant ces divers indices distaux. Dans cette tâche, l'animal cherche à trouver refuge sur la plate-forme le plus rapidement possible.

Figure 12 : Déroulement des tâches dans la piscine de Morris



- A. Différents quadrants virtuels du bassin et positions possibles de la plate-forme
- B. Protocole de mémoire de référence : apprentissage (4jours, plate-forme invisible)
- C. Test de rétention du protocole de mémoire de référence (1jour, plate-forme absente)
- D. Protocole d'appariement différé (4jours, plate-forme invisible)
- E. Quatre essais avec plate-forme visible (1jour)



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

b. Déroulement des différents tests

Avant le début du protocole de mémoire de référence, chaque souris est familiarisée au dispositif de test. Le premier jour, elle est déposée pendant 1 mn au centre du bassin contenant seulement 3,5 cm d'eau. La souris peut ainsi nager, mais aussi toucher le fond du bassin avec sa queue et/ou ses pattes postérieures. Comme la plate-forme émergée est visible (1 cm au-dessus du niveau de l'eau) et située à quelques centimètres du bord du bassin, la souris peut la rencontrer et se hisser dessus. Si la souris n'y parvient pas avant 1 mn, elle y est doucement amenée et laissée pendant 10 s, puis ramenée dans sa cage sur une grille de transport. Le lendemain, les souris sont encore une fois déposées au centre du bassin alors rempli (niveau d'eau à 20 cm du haut de la paroi) et peuvent nager pendant deux minutes. Durant cet essai, le bassin ne contient pas la plate-forme. Sachant que lors du protocole de mémoire de référence, les souris subiront 4 essais d'1 mn maximum, cet essai de « nage libre » vise à vérifier que toutes les souris sont capables de nager pendant au moins 2 mn sans fatigue excessive. De plus, cet essai de « nage libre » permet de vérifier que les souris ne montrent pas, avant l'apprentissage, de préférence spontanée pour un des 4 quadrants du bassin, ce qui pourrait gêner l'interprétation des performances lors du test de rétention après l'apprentissage. Après cet essai de « nage libre », les souris disposent d'une période de repos de 2 jours avant de commencer le protocole de mémoire de référence. Le schéma des différents protocoles est indiqué sur la **figure 12**.

Le protocole de **mémoire de référence** consiste à localiser la plate-forme immergée invisible dont la position reste inchangée (ici dans le quadrant Ouest) au cours de 4 jours consécutifs. Chaque souris subit une séance quotidienne de 4 essais séparés par un délai de 5 mn durant lequel l'animal est replacé dans sa cage. A chaque essai, l'animal est déposé dans l'eau face à la paroi depuis un point de départ déterminé qui varie d'essai en essai, (la

séquence des différents points de lâcher variant également d'un jour à l'autre). L'essai se termine lorsque la souris a atteint la plate-forme, ou bien lorsque 60 s se sont écoulées. Si la souris ne trouve pas la plate-forme durant les 60 s de l'essai, elle est guidée par l'expérimentateur jusqu'à la plate-forme. Une fois l'animal sur la plate-forme, il y est laissé pendant 10 s avant que l'expérimentateur ne lui présente une grille métallique de transport. La souris grimpe alors sur la grille et est ramenée jusqu'à sa cage. Les principales variables relevées sont la latence d'atteinte de la plate-forme (maximum : 60 s) et la distance parcourue au cours du trajet. Puisque les 4 points de lâchers utilisés au cours des 4 essais quotidiens ne sont pas tous situés à la même distance de la plate-forme, on calcule les moyennes des performances obtenues aux 4 essais d'un même jour, ceci pour les 4 jours de test. La performance d'apprentissage est évaluée par la diminution de la latence d'atteinte de la plate-forme ou de la distance parcourue jusqu'à atteindre la plate-forme au cours des 4 jours de test successifs (facteur « jour »).

Vingt-quatre heures après le dernier essai du protocole de mémoire de référence, la plate-forme est retirée du bassin et les souris subissent un **test de rétention** de 60 s (*probe trial*) durant lequel on mesurera principalement le temps passé dans le quadrant qui contenait la plate-forme au cours des essais précédents (le quadrant Ouest), ainsi que le nombre de passages au dessus de l'emplacement exact où se trouvait la plate-forme. Les souris disposent après ce test de rétention d'une période de repos de 2 jours.

Le protocole de mémoire dite « de travail », que j'appellerai plutôt protocole d'**appariement différé** ou **DMP** (pour *delayed matching-to-place*), consiste à retrouver la plate-forme invisible dont la position varie de jour en jour pendant 4 jours consécutifs. La plate-forme est donc située d'un jour à l'autre au centre des quadrants Est, puis Nord, puis Sud et enfin Ouest. Au cours des 4 essais d'un même jour, la position de la plate-forme demeure constante. Les points de lâcher varient d'un essai à l'autre, mais la distance entre un point de lâcher donné et la plate-forme est identique d'un essai à l'autre et d'un jour à l'autre. Les essais 1 et 2 sont séparés par un délai d'une heure, alors que les essais suivants ne sont espacés que de 5 mn. Dans cette version de la tâche, l'animal doit, lors du premier essai, « remettre à jour » les informations concernant la nouvelle position de la plate-forme dans le bassin. Les variables retenues sont les mêmes que celles utilisées lors du protocole de mémoire de référence. Puisque les différents points de lâcher sont toujours situés à une même distance de la plate-forme, on calcule les moyennes (pour les 4 jours de test) des

performances obtenues lors du premier, second, troisième et quatrième essai. La performance d'apprentissage est évaluée soit par les latences d'atteinte de la plate-forme soit par les distances parcourues jusqu'à la plate-forme obtenues aux essais 1 et 2 (facteur « essai »). Les essais suivants (3 et 4) permettent à tous les animaux d'apprendre la position de la plate-forme. Ainsi, tous les animaux ont la possibilité d'atteindre le même niveau de performance, avant de passer à un nouvel apprentissage le jour suivant (nouvelle localisation de la plate-forme).

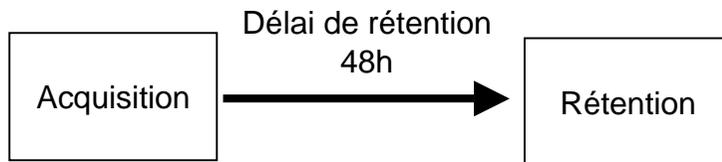
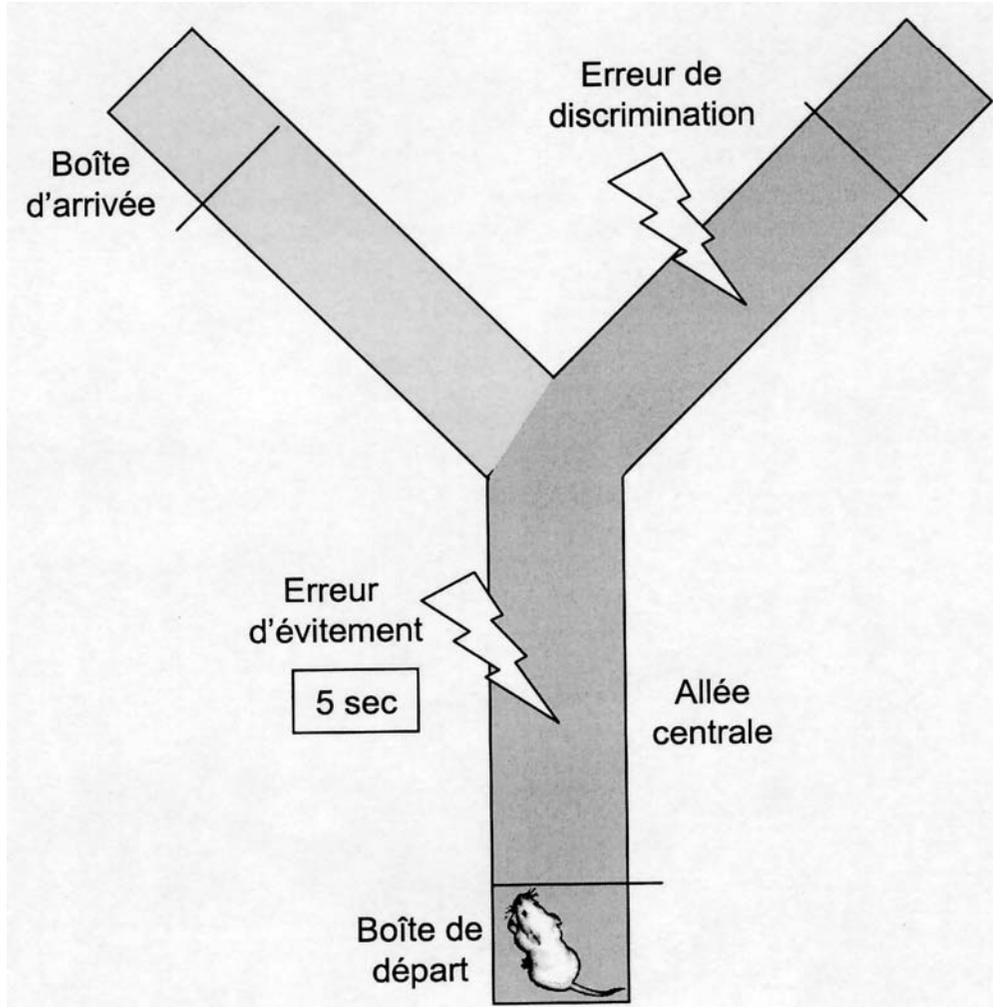
L'épreuve de la **plate-forme visible** est réalisée le dernier jour. Elle consiste en quatre essais espacés de 5 mn, durant lesquels la plate-forme est rendue visible (1 cm au-dessus de la surface de l'eau). Les positions de la plate-forme et les points de lâcher diffèrent lors des 4 essais successifs, mais la distance entre un point de lâcher et l'emplacement de la plate-forme lors de l'essai est identique d'un essai à l'autre. Les variables retenues sont les mêmes que lors du protocole de mémoire de référence.

c. Représentation graphique de la fréquentation des zones du bassin

Le logiciel de suivi vidéo utilisé dans le test de la piscine de Morris permet de suivre la trajectoire de chaque souris lors des essais sans plate-forme. Néanmoins, le logiciel ne permet pas d'obtenir une représentation graphique de la «trajectoire moyenne» des souris d'un même groupe, ou de la précision de la recherche de la plate-forme exprimée par les souris d'un groupe.

Afin de pouvoir visualiser les zones du bassin où les souris d'un groupe donné passent le plus de temps, l'idée était de quadriller le bassin en petits secteurs et de comptabiliser le nombre de passage des souris d'un groupe dans chacun de ces secteurs. Le logiciel de suivi vidéo fournit un fichier de données pour chaque souris comportant les coordonnées de la position de l'animal dans le bassin en fonction du temps. A partir de ces fichiers, un programme informatique (créé par Sébastien Geiger, informaticien dans notre unité) calcule le nombre de passages cumulés dans chaque secteur du quadrillage. En divisant ces valeurs par l'effectif du groupe de souris considéré, on obtient une matrice représentant le nombre moyen de passages dans chaque secteur.

A partir de cette matrice, un graphique en surface a été généré avec Microsoft Excel, sur lequel l'échelle de couleurs permet de représenter les zones dans lesquelles les souris sont passées le plus grand nombre de fois. Ces graphiques ont été réalisés afin d'illustrer les



Critère de 7 essais corrects
sur 8 essais consécutifs

Figure 13 : La tâche d'évitement actif dans le dispositif du labyrinthe en Y

La tâche d'évitement actif consiste pour la souris à apprendre à s'échapper de l'allée centrale en moins de 5 secondes pour aller dans l'allée de gauche.

Les chocs électriques sont délivrés dans les pattes toutes les 7 secondes : la souris commet une erreur d'évitement si elle ne quitte pas l'allée centrale en moins de 5 s, et commet une erreur de discrimination lorsqu'elle se dirige dans l'allée de droite.

Lors des séances d'acquisition et de rétention, séparées par un délai de 48 h, les essais sont menés jusqu'à ce que la souris atteigne le critère de 7 essais corrects sur 8 essais successifs.

différences de précision observées entre les groupes de souris dans leur recherche de la plate-forme.

4. Tâche du labyrinthe en Y

a. Dispositif

Le labyrinthe en Y est composé de trois allées identiques disposées selon les médianes d'un triangle équilatéral (voir **figure 13**). Ces allées ont une longueur de 13 cm, une largeur de 4,5 cm et une hauteur de 5,5 cm. Le plancher est constitué de barres métalliques de 2 mm de diamètre et régulièrement espacées de 0,5 cm. C'est à travers ce plancher que les souris recevront des chocs électriques. A chaque extrémité du labyrinthe, une boîte en plastique (10 x 4,5 x 5,5 cm) fermée par une port coulissante permet de réceptionner et de déplacer la souris de l'extrémité d'une branche à l'autre sans la manipuler.

b. Déroulement du test

La tâche d'évitement actif se déroule en deux temps : une séance d'acquisition et une séance de rétenion. Au début de chaque séance, la souris est introduite dans la boîte de départ. La porte donnant accès à l'allée centrale est ouverte au bout de 5 s puis refermée dès que la souris pénètre dans l'allée centrale. La souris est alors soumise à une épreuve de conditionnement comportant une composante temporelle et une composante spatiale. Le sujet doit quitter l'allée centrale avant 5 s (composante temporelle) et doit choisir l'allée de gauche (composante spatiale) afin d'éviter un choc électrique délivré dans les pattes pendant 1 s toutes les 7 s. L'animal peut donc faire deux types d'erreur : lorsqu'il met plus de 5 s pour quitter l'allée centrale, on comptabilise une erreur d'évitement ; si la souris pénètre au moins une fois dans l'allée de droite, elle commet une erreur de discrimination. Si l'animal effectue une erreur d'évitement et/ou une erreur de discrimination au cours du même essai, celui-ci est considéré comme un essai incorrect. Le sujet est entraîné au rythme d'un essai toutes les minutes jusqu'à l'atteinte du critère de 7 essais corrects sur 8 essais consécutifs. Quarante-huit heures plus tard, la souris est soumise à une nouvelle séance de conditionnement dans le but d'évaluer ses performances de rétenion. Cette séance est menée suivant un protocole en tout point semblable à celui de la séance d'acquisition. Le voltage des chocs électriques délivrés dans les pattes est déterminé individuellement pour chaque souris lors des premiers essais à

l'acquisition (maximum 40 volts en courant alternatif) de façon à ce que la souris réagisse en levant immédiatement une ou deux pattes du plancher grillagé.

Lors de la séance de rétention de cette tâche d'évitement actif en labyrinthe en Y, l'amélioration spontanée des performances (réminiscence) est également observée. Ce phénomène d'amélioration spontanée des performances peut être sensible au fond génétique des animaux (Ungerer et coll., 1993) et à l'administration d'agents pharmacologiques (Ungerer et coll., 1991).

5. Tâche d'évitement passif

a. Dispositif

L'appareil de test est constitué de deux compartiments : un compartiment blanc et clair (23 cm de long, 8 cm de large et 14 cm de haut) éclairé par une lampe de bureau (240 lx) ainsi qu'un compartiment noir et sombre (14 cm de long, 8 cm de large et 14 cm de haut) séparé du compartiment blanc par une porte à guillotine.

b. Déroulement du test

Pendant la séance d'acquisition, la souris est placée dans le compartiment éclairé pendant 1 mn, puis la porte à guillotine est ouverte. Dès l'ouverture de la porte, on mesure le temps que met l'animal pour entrer dans le compartiment sombre. Lorsque l'animal a les quatre pattes dans le compartiment sombre, la porte à guillotine est fermée et la souris reçoit immédiatement deux chocs électriques dans les pattes (40 volts en courant alternatif) à 5 s d'intervalle. Après 15 s passées dans ce compartiment sombre, la souris est retirée du dispositif et retourne dans sa cage.

Vingt-quatre heures plus tard, l'animal est replacé dans le dispositif pour une séance de rétention : la souris est déposée dans le compartiment éclairé. La porte à guillotine est ouverte au bout de 10 s. On enregistre la latence d'entrée dans le compartiment sombre, le nombre de transitions entre les deux compartiments ainsi que le temps total passé dans le compartiment sombre.

A chaque séance, la souris est déposée face contre la paroi opposée au compartiment sombre. Elle doit donc traverser tout le compartiment éclairé pour rejoindre la porte à guillotine et pénétrer dans le compartiment sombre. Le comportement d'approche du compartiment sombre a également été évalué par la mesure du temps mis par la souris pour

traverser la moitié du compartiment éclairé (les quatre pattes dans la moitié du compartiment éclairé la plus proche du compartiment sombre).

6. Détermination du seuil de réactivité aux chocs électriques

Le seuil de réactivité aux chocs électriques chez les quatre lignées de souris (B6, apoE-KO, apoE3 et apoE4) a été déterminé en augmentant progressivement (par tranche de 2 volts) le niveau des chocs dans les pattes à partir de 16 volts jusqu'à 40 volts maximum. Pour éviter que les souris ne prévoient le moment exact du choc (et ainsi éviter un sursaut conditionné), les chocs ont été espacés aléatoirement de 15 à 45 secondes. Les voltages seuils pour la première vocalisation et le premier saut ont été relevés.

VI. Analyses statistiques

Les données obtenues dans les différents tests en terme :

- de nombre de redressements, de cases parcourues ou de centimètres parcourus (activité locomotrice), de durée d'exploration des objets et d'indice de reconnaissance (tâches de reconnaissance),
- de nombre total d'appuis renforcés, d'alternances et d'appuis sur le levier (apprentissage opérant),
- de latence d'atteinte de la plate-forme, de distance parcourue, de vitesse de nage ou de temps passé dans un quadrant (piscine de Morris),
- de nombre d'erreurs d'évitement ou de discrimination, d'essais pour atteindre le critère d'apprentissage (labyrinthe en Y),
- de latence d'entrée dans le compartiment sombre (évitement passif),
- de voltage seuil (réactivité au choc électrique),

ont été traitées par des analyses de la variance (ANOVA) à un ou plusieurs facteurs (traitement, génotype, quadrant, sexe, moment d'injection, enceinte, objet A...), et éventuellement sur mesures répétées (périodes, minutes, catégorie d'objets, essais, jours de test, séances de test). Lorsqu'une interaction est significative, une ANOVA à un seul facteur, suivie d'un test post-hoc de Student-Newman-Keuls (seuil de significativité : $p < 0,05$) sont utilisés pour comparer les différents groupes. Pour les analyses post-hoc concernant les résultats des lignées transgéniques, nous avons préféré utiliser le test PLSD de Fisher (*Protected Least Significant Difference*) au seuil de significativité : $p < 0,05$. En effet,

puisque les effets des différents allèles de l'apoE sur les performances cognitives sont discrets chez l'Homme (Bartrès-Faz et coll, 2002 ; Bondi et coll., 1995 ; Mortensen et Høgh, 2001) et qu'il s'agit d'une première étude sur ce type de souris transgéniques, nous avons voulu utiliser un test post-hoc moins restrictif que le Student-Newman-Keuls pour analyser les données.

Nous avons utilisé une ANOVA dans tous les cas, afin de pouvoir étudier les différentes interactions entre facteurs. Puisque les cohortes de souris de fond génétique B6 mâles et femelles ont été testées dans les mêmes conditions mais séparément, nous avons analysé ensemble les performances des souris des deux sexes, mais également les performances des deux sexes considérés séparément. Puisque le but de l'étude présentée dans le deuxième chapitre est de comparer les effets des allèles humains e3 et e4 sur les performances des souris transgéniques, j'ai également effectué des analyses restreintes à ces deux lignées apoE3 et apoE4.

Dans certains cas, j'ai comparé la performance obtenue à un niveau de chance (hasard). Ce fut le cas pour les indices de reconnaissance d'objet ou de reconnaissance spatiale (hasard : indice = 0,5) et aussi pour le temps passé dans le quadrant cible de la piscine de Morris lors du test de rétention de la tâche (hasard : temps passé dans le quadrant cible = 15 secondes, soit le quart de la durée totale du test de rétention). Pour effectuer cette comparaison, j'ai utilisé le test de Student univarié.

Pour effectuer les analyses de corrélation (par exemple : entre le poids des animaux et leur seuil de réactivité au choc électrique) j'ai utilisé le test de corrélation des rangs de Spearman.

Contribution expérimentale : chapitre I

**Répliquabilité des tests de reconnaissance
chez les souris OF1 et CD1 :
un effet du système de ventilation**

I. Introduction

1. Intérêt et mise au point des tâches de reconnaissance

Les tâches de reconnaissance sont basées sur la tendance spontanée des rongeurs à explorer préférentiellement les aspects nouveaux de leur environnement. Un des intérêts majeurs de ce type de tâche réside dans le fait qu'elle ne nécessite ni restriction alimentaire, ni utilisation d'un renforçateur aversif, ni apprentissage d'une règle particulière.

Le test de reconnaissance d'objet, mis au point chez le Rat par Ennaceur & Delacour en 1988, a été adapté chez la Souris par Jean-Cosme Dodart sur des souris OF1 mâles élevées au laboratoire (URA 1295 CNRS). Le protocole utilisé est celui décrit en détail dans la partie « Matériel & Méthodes » (voir aussi Dodart et coll., 1997), et comprend une séance d'habituation de 50 mn, une séance d'acquisition de 10 mn, et une séance de rétention de 10 mn. Durant la séance d'habituation, la souris peut explorer librement l'enceinte de test, vide. Le lendemain, la souris est replacée dans l'enceinte pour la séance d'acquisition durant laquelle elle peut explorer un objet A. Après un délai donné (par exemple 1h ou 24h), l'animal est replacé dans l'enceinte pour la séance de rétention durant laquelle il peut explorer l'objet familier A accompagné d'un objet nouveau B. Les durées d'exploration des deux objets A et B sont mesurées durant la séance de rétention (respectivement TA et TB), et le calcul d'un indice $TB / (TA+TB)$ permet de rendre compte de la performance de reconnaissance.

Dans ces conditions, les souris OF1 montrent de très bonnes performances à des délais de 1 h, 3 h et même 6 h après la séance d'acquisition, avec des indices de reconnaissance approchant les 0,7 à 0,8 ; c'est-à-dire que 70 à 80 % du temps d'exploration des objets est consacré à l'objet nouveau. Vingt-quatre heures après la séance d'acquisition, l'indice de reconnaissance est proche de 0,5 (niveau du hasard : la souris explore autant les deux objets) et significativement plus faible qu'aux autres délais (**voir figure 14, adaptée de Dodart et coll., 1997**).

Le protocole de base de la tâche de reconnaissance spatiale, utilisé pour les expériences avec le sAPP, est également décrit dans la partie « Matériel & Méthodes ». Il a été mis au point au Laboratoire de Neurosciences Comportementales et Cognitives (UMR 7521 CNRS) sur des souris OF1 mâles provenant du centre d'élevage Iffa Credo. Dans de

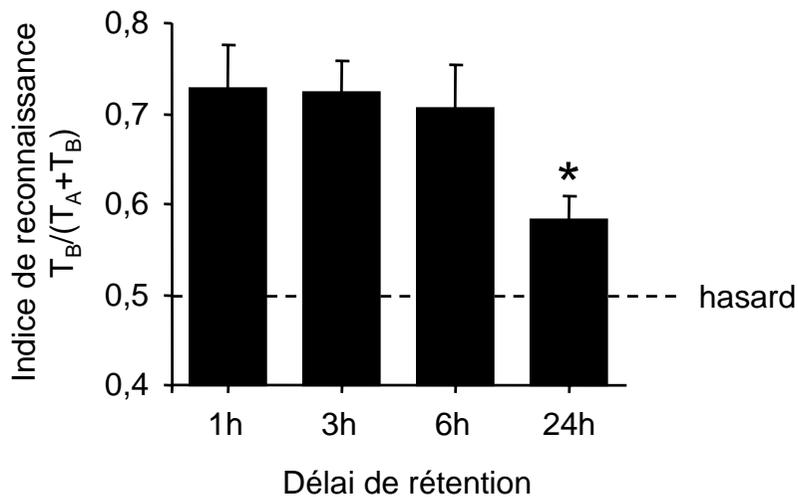


Figure 14 : Indice de reconnaissance d'objet de souris OF1 mâles à différents délais après la séance d'acquisition (adaptée de Dodart et coll., 1997)

L'indice est exprimé en moyennes + erreur type.

Les souris montrent de bonnes performances aux délais de rétention de 1h, 3h et 6h, mais pas au délai de 24h.

* = Différent des autres délais à $p < 0,05$.

nombreuses études, la séance d'acquisition de la tâche se déroule en plusieurs sessions séparées par un intervalle de temps durant lequel l'animal retourne dans sa cage d'élevage (Adriani et coll., 1998 & 2000 ; Rouillet et coll., 2001, Save et coll., 1992, Thinus-Blanc et coll., 1996). Une première expérience de mise au point (non présentée dans le manuscrit) a validé un nouveau protocole dans lequel les sessions d'acquisition étaient regroupées en une seule séance. Nous voulions ainsi limiter au maximum les manipulations des animaux au cours de l'épreuve. Une seconde expérience de mise au point a permis, en testant les animaux à différents délais après la séance d'acquisition, d'établir la courbe de rétention des animaux dans cette tâche. Ceci a permis de montrer que les souris mâles OF1 montrent de bonnes performances aux délais de 5 mn, 1 h et 3 h après l'acquisition, mais plus au délai de 24h (**voir figure 15, mâles**). Puisque la performance des animaux est très faible au délai de 24h, c'est à ce délai que les effets d'un promnésiant peuvent être mis en évidence. Dans le chapitre concernant les effets du sAPP sur la mémoire, j'ai donc testé les effets du sAPP à ce délai de 24 h après l'acquisition de cette tâche de reconnaissance spatiale.

En résumé, dans les deux tâches de reconnaissance, des souris OF1 mâles montrent de bonnes performances au délai de 3 h après la séance d'acquisition, et des performances très faibles à un délai de 24 h (**voir figure 14 et figure 15, mâles**).

2. Projet de thèse initial

Suite aux premières expériences de la thèse (décrites dans le 2^{ème} chapitre de la partie « Contribution Expérimentale ») montrant des effets promnésiants du sAPP dans les tâches de reconnaissance, le projet initial de ma thèse visait à mettre en évidence une sécrétion de sAPP lors d'un apprentissage chez la souris jeune. Suite à une séance d'acquisition de la tâche de reconnaissance spatiale, les souris auraient été sacrifiées après différents délais. Afin de détecter une éventuelle variation du taux de sAPP au cours de l'apprentissage, un dosage de ce APP soluble aurait été effectué par la technique de *western-blotting* ou par méthode immunoenzymatique (*ELISA = enzyme-linked-immunosorbent assay*) sur des prélèvements de liquide céphalo-rachidien (LCR). A ce dosage des sAPP aurait été associé une cartographie quantitative des APP membranaires (mAPP) sur des coupes de cerveaux par marquage immunohistochimique. En deuxième lieu, j'espérais évaluer les éventuelles altérations de cette sécrétion de sAPP lors du vieillissement, et ainsi étudier les relations entre la sécrétion de sAPP et le déclin cognitif lié à l'âge.

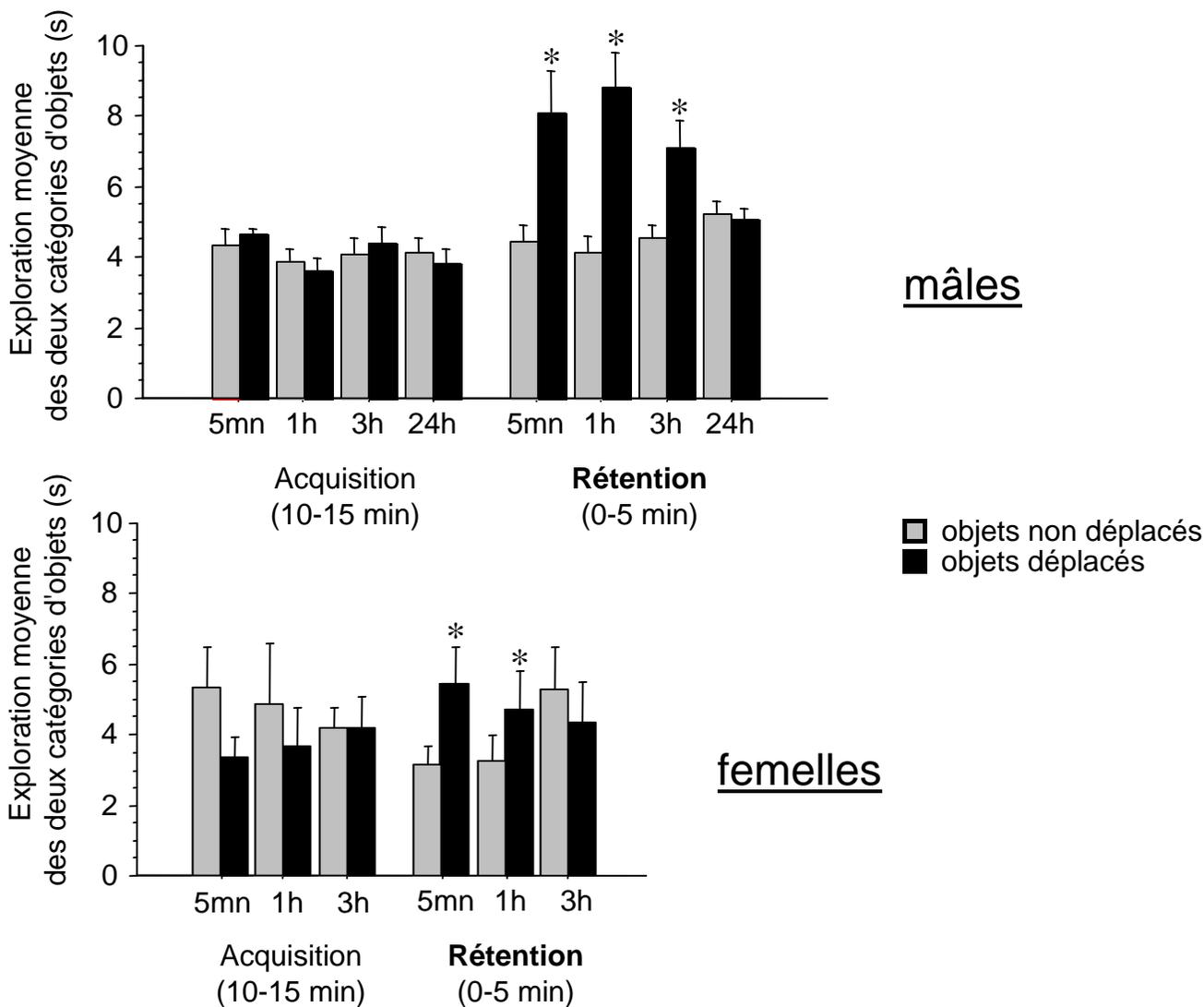


Figure 15 : Performances de reconnaissance spatiale à différents délais après l'acquisition chez les souris OF1 mâles et femelles

Cette figure indique l'exploration en secondes (moyenne + erreur-type) des objets déplacés et non déplacés. Les souris mâles et femelles ont été testées dans des expériences différentes.

Durant la séance d'acquisition, les souris ont exploré les deux catégories d'objets de la même façon.

Lors de la séance de rétention, les mâles ont montré de bonnes performances après des délais de 5 mn, 1 h et 3 h, mais plus après 24 h. Les femelles ont obtenu de bonnes performances après des délais de 5 mn et 1 h, mais plus après 3 h.

* = Différent des objets non déplacés à $p < 0,05$.

Dans ce projet sur le vieillissement, nous envisagions donc de travailler sur des souris femelles, qui, moins agressives que les mâles, sont plus faciles à élever en groupe jusqu'à un âge avancé. Nous envisagions également d'utiliser la tâche de reconnaissance spatiale, puisqu'il est connu que la mémoire spatiale est une des premières formes de mémoire affectée au cours du vieillissement. La première étape du travail, conditionnant la suite du projet, consistait donc à vérifier, d'une part, que les souris OF1 femelles pouvaient montrer des performances de reconnaissance spatiale similaires à celles obtenues chez les souris OF1 mâles, et, d'autre part, si le sAPP, montrait également un effet promnésiant chez des souris femelles. En effet, le sAPP n'avait jusqu'alors été testé que chez des souris mâles.

II. Problèmes rencontrés dans les tâches de reconnaissance et essais de « remise au point »

1. Tâche de reconnaissance spatiale

a. Performances des souris femelles

Nous avons utilisé avec les souris OF1 femelles un protocole rigoureusement identique à celui utilisé précédemment pour les mâles. Trois groupes de souris ont été formés : les groupes « **5 mn** », « **1 h** » et « **3 h** » étaient testés respectivement 5 mn, 1 h ou 3 h après la séance d'acquisition. Lors de la séance de rétention, les femelles n'ont pas montré une réexploration des objets déplacés aussi nette que celle observée chez les mâles. Néanmoins, les souris femelles des groupes « 5 mn » et « 1 h » ont montré une bonne performance de reconnaissance (**voir figure 15, femelles**), puisqu'elles ont exploré les objets déplacés significativement plus que les objets non déplacés, à la différence du groupe « 3 h » (*effet de la catégorie d'objet : « 5 mn » : $F(1,8) = 8,09$; $p = 0,022$; « 1 h » : $F(1,8) = 6,55$; $p = 0,034$; « 3 h » : $F(1,9) = 0,74$; $p = 0,413$).*

La comparaison de l'exploration des deux catégories d'objets pendant les 5 dernières minutes de l'acquisition et pendant les 5 premières minutes de la rétention avait révélé que la réexploration d'objets lors de la séance de rétention était spécifiquement dirigée vers les objets déplacés chez les souris mâles. Chez les souris femelles, cette même analyse a montré que les quantités totales d'exploration des objets aux séances d'acquisition et de rétention n'étaient pas significativement différentes (**voir figure 15, femelles**).

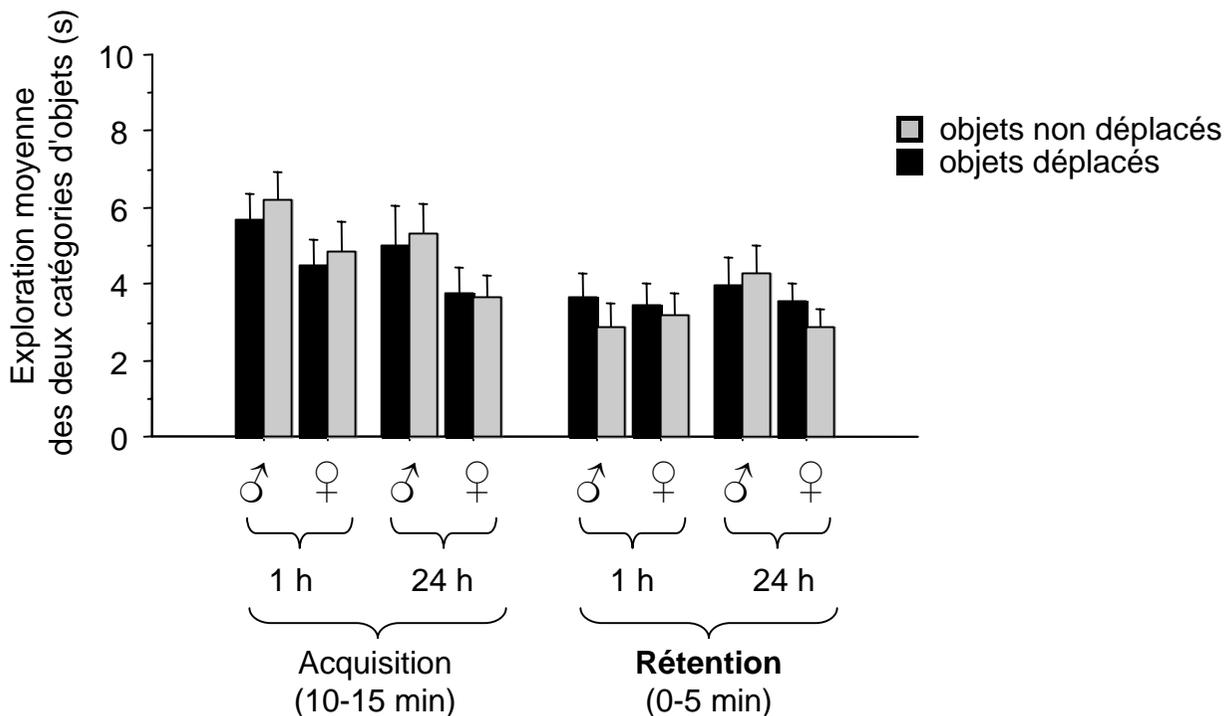


Figure 16 : Performances de reconnaissance spatiale de souris OF1 mâles et femelles 1h ou 24h après la séance d'acquisition

L'exploration des objets déplacés et non déplacés chez des souris mâles et femelles (testées dans la même expérience) est exprimée en secondes (moyenne + erreur-type).

On peut observer la dégradation des performances de reconnaissance spatiale attendues comme bonnes au délai de rétention de 1 h.

b. Comparaison des performances de mâles et de femelles

Puisque les deux expériences précédentes semblaient montrer des différences de comportement entre souris mâles et femelles, j'ai évalué les performances des deux sexes au cours de la même expérience. Durant cette expérience regroupant mâles et femelles, j'ai également déterminé le stade du cycle ovarien des femelles, ceci afin de vérifier si cette différence comportementale entre les deux sexes était liée au statut hormonal des femelles au moment du test.

Procédure expérimentale

Dans cette expérience, la performance de reconnaissance spatiale de mâles et de femelles OF1 a été évaluée aux délais de 1 h et de 24 h après la séance d'acquisition. D'après les résultats obtenus dans les expériences précédentes, on s'attend à retrouver de bonnes performances après un délai de 1 h mais plus après un délai de 24 h (voir **figure 15**). Le stade du cycle ovarien a été déterminé chez les femelles, par des prélèvements quotidiens de mucus vaginal les 7 jours précédents le test, ainsi que les jours de test (procédure décrite dans la partie « Matériel et Méthodes »). Afin d'éviter un éventuel effet de ces manipulations entre les deux groupes de souris, les mâles ont subi une procédure de manipulation comparable à celles des femelles, à savoir une contention manuelle quotidienne pendant quelques secondes, par la peau du cou, pattes vers le haut.

Résultats

Lors de la séance d'acquisition, les souris des deux sexes ont montré une exploration globale des objets comparable (*effet du sexe sur l'exploration totale sur 15 mn : $F(1,66) = 1,39 ; p = 0,242$*), et n'ont pas montré de différence dans l'exploration des deux catégories d'objet (*catégorie d'objet : $F(1,66) = 0,31 ; p = 0,582$; aucune interaction significative avec un autre facteur*).

Lors des 5 premières minutes de la séance de rétention, tous les groupes de souris ont montré une exploration équivalente des deux catégories d'objets (**voir figure 16**) (*catégorie d'objet : $F(1,64) = 2,53 ; p = 0,117$; sexe x catégorie d'objet : $F(1,64) = 0,24 ; p = 0,622$, délai x catégorie d'objet : $F(1,64) = 0,54 ; p = 0,466$) et les souris des deux sexes ont exploré l'ensemble des objets de la même façon quel que soit le délai de rétention (*sexe : $F(1,64) = 0,65 ; p = 0,423$; sexe x délai : $F(1,64) = 0,76 ; p = 0,386$*). Aucun groupe n'a donc*

d'avantage exploré les objets déplacés que les objets non déplacés à la séance de rétention, même dans le groupe testé seulement 1 h après la séance d'acquisition.

Puisque les souris ont toutes présenté de mauvaises performances, même au délai de rétention de 1 h, les analyses incluant le stade du cycle ovarien au moment des séances d'acquisition ou de rétention n'ont montré aucun effet du stade du cycle sur les performances de reconnaissances des femelles.

Conclusions

Lors de cette expérience, j'espérais pouvoir comparer le comportement de mâles et de femelles, chaque sexe testé seul ayant auparavant montré de bonnes performances entre autres au délai de rétention de 1 h. Contre toute attente, les performances de reconnaissance auparavant bonnes à ce délai de rétention de 1 h chez les deux sexes (testés séparément) s'étaient complètement dégradées durant cette expérience.

Une première hypothèse pouvait être une perturbation des souris d'un sexe donné par la présence (odeurs) de l'autre sexe. En effet, des souris des deux sexes ont été hébergées dans la même pièce et ont alternativement été testées dans les mêmes dispositifs expérimentaux, dans la même salle de test et dans un ordre aléatoire. Malgré le soin apporté au nettoyage des enceintes de test après chaque souris, des traces olfactives laissées par les souris d'un sexe donné ont pu subsister et perturber le comportement des souris de l'autre sexe.

La deuxième hypothèse pouvait être que les manipulations quotidiennes de contention, effectuées en vue de la détermination du stade du cycle ovarien chez les femelles, et pratiquées également sur les mâles, auraient pu altérer le comportement de nos souris.

c. Effet des manipulations sur des souris OF1 mâles

J'ai donc ensuite réalisé une expérience permettant d'évaluer les effets de différentes procédures de manipulations sur des souris mâles OF1. Quatre groupes de souris ont été formés pour cette expérience :

- un groupe « **non manipulé** » n'ayant subi aucune manipulation particulière avant l'expérience,
- un groupe « **3j habituelle** » ayant subi la manipulation habituelle : les 3 jours précédant l'expérience, la souris est quotidiennement saisie puis posée dans la main de l'expérimentateur, légèrement touchée puis reposée dans sa cage après 1 mn,

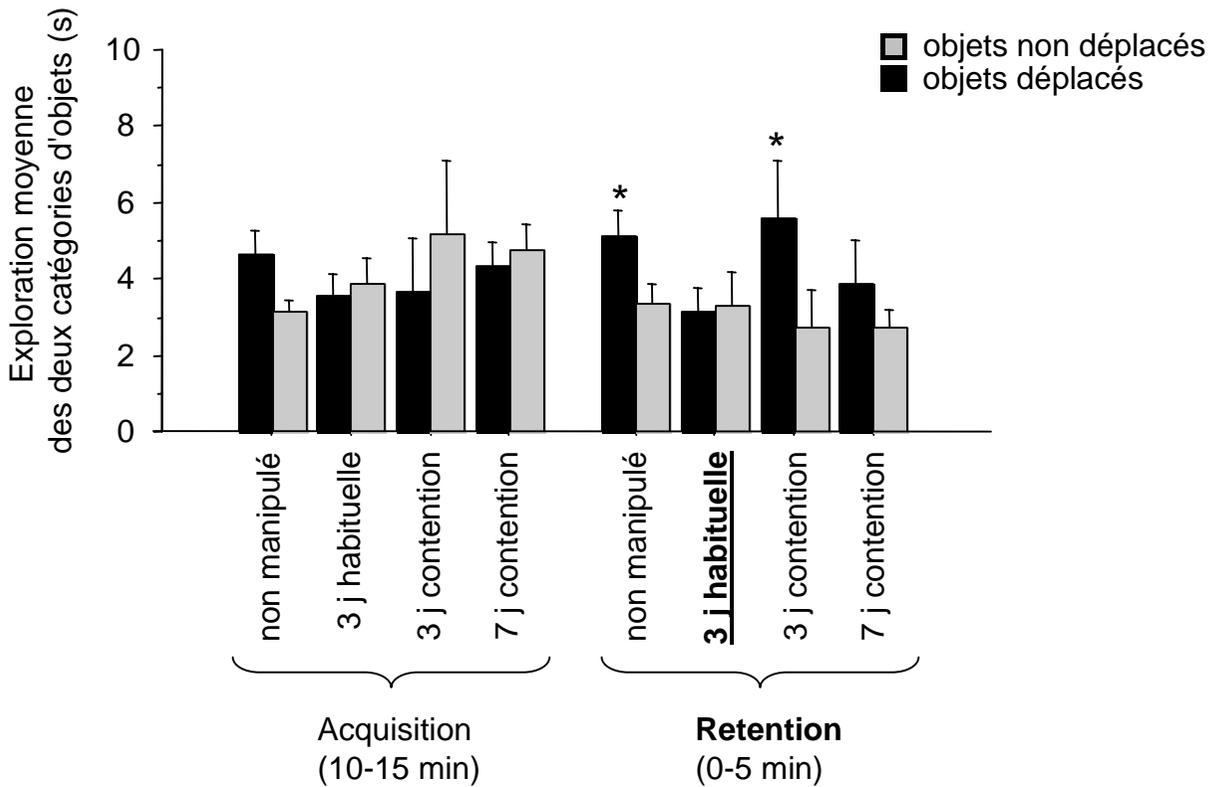


Figure 17 : Performances de reconnaissance spatiale 1h après la séance d'acquisition chez des souris OF1 mâles soumises à différentes manipulations

Cette figure indique l'exploration en secondes (moyenne + erreur-type) des objets déplacés et non déplacés.

Contre toute attente, on observe que le groupe "3 j habituelle" montre de mauvaises performances de reconnaissance lors de la séance de réten

* = Différent des objets non déplacés à $p < 0,05$.

- un groupe « **3j contention** » ayant subi une contention quotidienne pendant 3 jours, c'est-à-dire un maintien pendant une dizaine de secondes par la peau du cou pattes vers le haut,
- un groupe « **7j contention** » ayant subi une contention quotidienne pendant 7 jours. Ce dernier groupe se rapproche de ceux testés dans l'expérience précédente.

Toutes les souris, quel que soit leur groupe, ont été isolées 3 jours avant la séance d'habituation.

Durant la séance d'acquisition, tous les groupes de souris ont montré une exploration équivalente des deux catégories d'objets. Les différentes manipulations n'ont donc pas eu d'influence significative sur le comportement spontané d'exploration des objets encore inconnus.

Durant la séance de rétention (**voir figure 17**), les souris (tous groupes confondus) ont globalement exploré davantage les objets déplacés que les non déplacés (catégorie d'objet : $F(1,37) = 14,48$; $p = 0,0005$). Néanmoins, les souris du groupe « 3j habituelle », groupe pourtant comparable à ceux ayant obtenu de très bonnes performances dans les expériences de mise au point de la tâche, n'ont montré aucune reconnaissance spatiale (catégorie d'objet : $F(1,10) = 0,13$; $p = 0,726$). Devant la mauvaise performance de ce groupe considéré comme « témoin », l'interprétation des effets des différentes procédures de manipulations devenait impossible.

Conjointement à ces résultats décevants, des problèmes de variations de résultats chez des groupes témoins ont également été rencontrés lors d'expériences utilisant la tâche de reconnaissance d'objet (exposés dans la suite du manuscrit). Ce problème de réplicabilité rencontré dans les deux tâches de reconnaissance ayant probablement une origine commune, nous avons choisi d'essayer de remettre au point en premier la tâche de reconnaissance d'objet, puis de revenir ultérieurement à la tâche de reconnaissance spatiale. En effet, la tâche de reconnaissance d'objet était plus simple à mettre en œuvre, l'équipe disposait d'un recul plus important par rapport à cette tâche comportementale (la tâche de reconnaissance spatiale ayant été mise au point plus récemment au laboratoire) et la « demande mnésique » pour la souris lors de cette tâche nous paraissait moins importante.

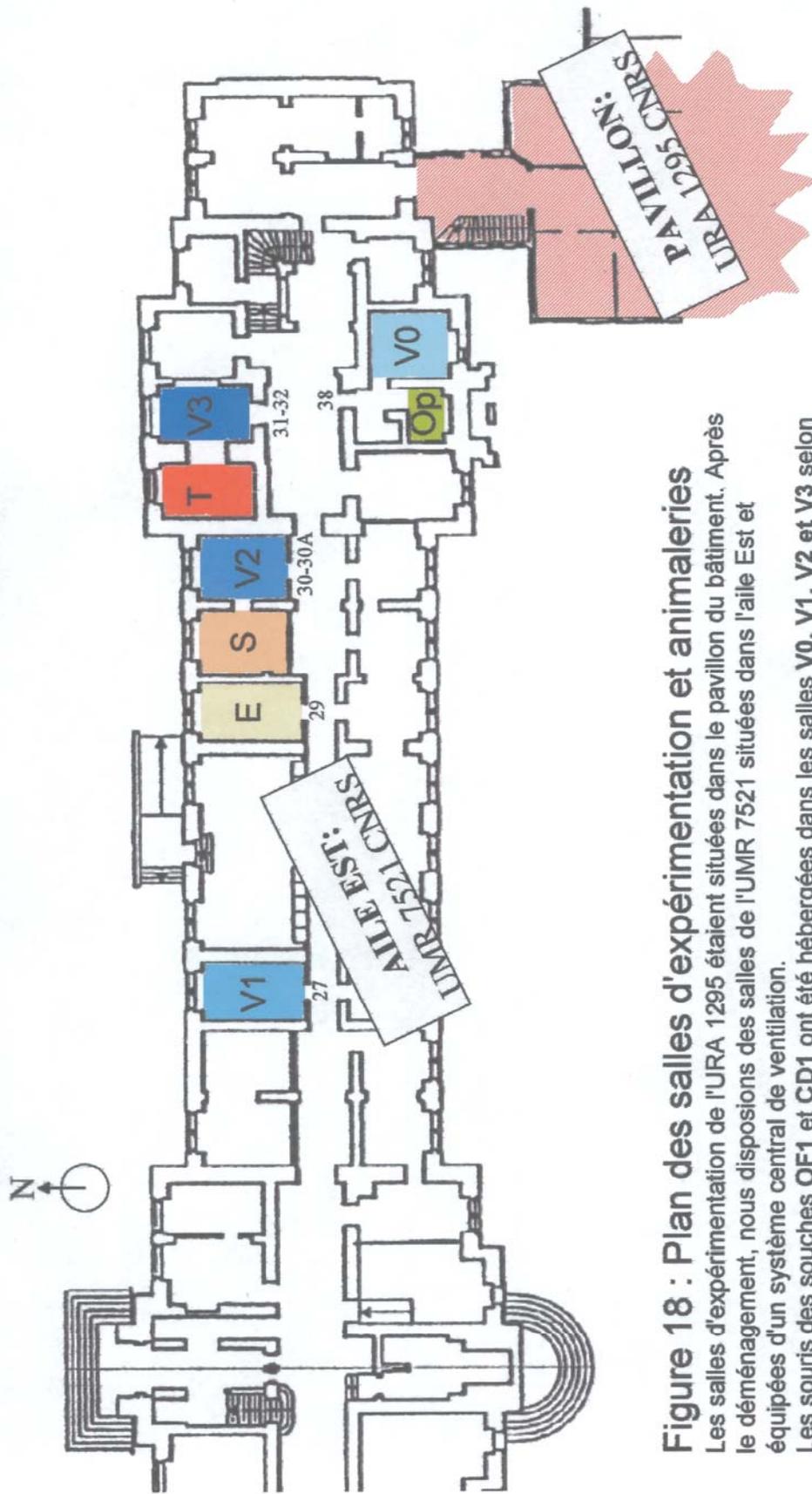


Figure 18 : Plan des salles d'expérimentation et animaleries

Les salles d'expérimentation de l'URA 1295 étaient situées dans le pavillon du bâtiment. Après le déménagement, nous disposons des salles de l'UMR 7521 situées dans l'aile Est et équipées d'un système central de ventilation.

Les souris des souches OF1 et CD1 ont été hébergées dans les salles V0, V1, V2 et V3 selon les expériences. Les souris des souches B6, apoE-KO, apoE3 et apoE4 ont été élevées dans la salle E, et hébergées pour les expériences dans les salles V3 (caractérisation comportementale des 4 lignées "jeunes" et "âgées") et V1 (effets du sAPP sur les souris apoE4).

Les salles d'expérimentation étaient les salles V0, S et T pour le test de reconnaissance d'objet, les salles E et S pour le test de reconnaissance spatiale, la salle T pour le test de la piscine de Morris et la salle Op pour le test d'apprentissage opérant.

2. Tâche de reconnaissance d'objet

a. Préférence pour un des objets durant la séance d'acquisition

Malgré l'utilisation du protocole couramment utilisé au laboratoire avant le début de ma thèse (Dodart et coll., 1997), les résultats que j'ai obtenus dans la tâche de reconnaissance d'objet ont montré d'importantes variations dans le comportement des souris. Après la fermeture de l'unité URA 1295 du CNRS (Directeurs : Dr. A. Ungerer puis J.-J. Roeder), ma directrice de thèse, Chantal Mathis, et moi-même avons déménagé au 1^{er} janvier 2000 vers l'unité UMR 7521 du CNRS située dans le même bâtiment. L'apparition des variations de comportement des souris est concomitante à ce déménagement. En effet, lors de l'expérience évaluant les effets du sAPP injecté à différents délais sur les performances de reconnaissance d'objet (présentée dans le chapitre 2 de la partie « Contribution Expérimentale ») est apparu un premier changement comportemental : une préférence spontanée des souris pour l'un des deux objets. Ce comportement n'avait jamais été mis en évidence auparavant, chez des souris OF1 élevées au laboratoire (jusqu'en 1999). Au cours des expériences ultérieures, les divergences de résultats entre « avant » et « après » le déménagement n'ont cessé de s'accroître. Voici donc les différences de conditions expérimentales entre mes travaux de thèse et ceux réalisés par Dodart et collaborateurs :

- les souris que j'ai pu utiliser au cours de ma thèse n'étaient plus élevées au laboratoire et provenaient directement du centre d'élevage (Iffa Credo),
- les pièces de test et les animaleries utilisées étaient situées dans le pavillon du bâtiment pour les travaux de Dodart et collaborateurs (URA 1295 CNRS) et dans l'aile Est lors de mes travaux de thèse (UMR 7521 CNRS). (voir **figure 18**)

Heureusement, les effets promnésiants du sAPP (voir chapitre 2) ont été suffisamment robustes pour pouvoir être mis en évidence malgré cette préférence inattendue pour un des objets à la séance d'acquisition de la tâche.

Afin d'avoir une vue d'ensemble de l'instabilité des niveaux de performance de reconnaissance d'objet, les résultats obtenus au cours des diverses expériences de mise au point (que je décrirai en détail dans les paragraphes suivants) ont été regroupés sur un graphique général (**voir figure 19**). Les performances de reconnaissance d'objet y sont représentées en terme d'indice de reconnaissance. Par souci de clarté, seules les performances

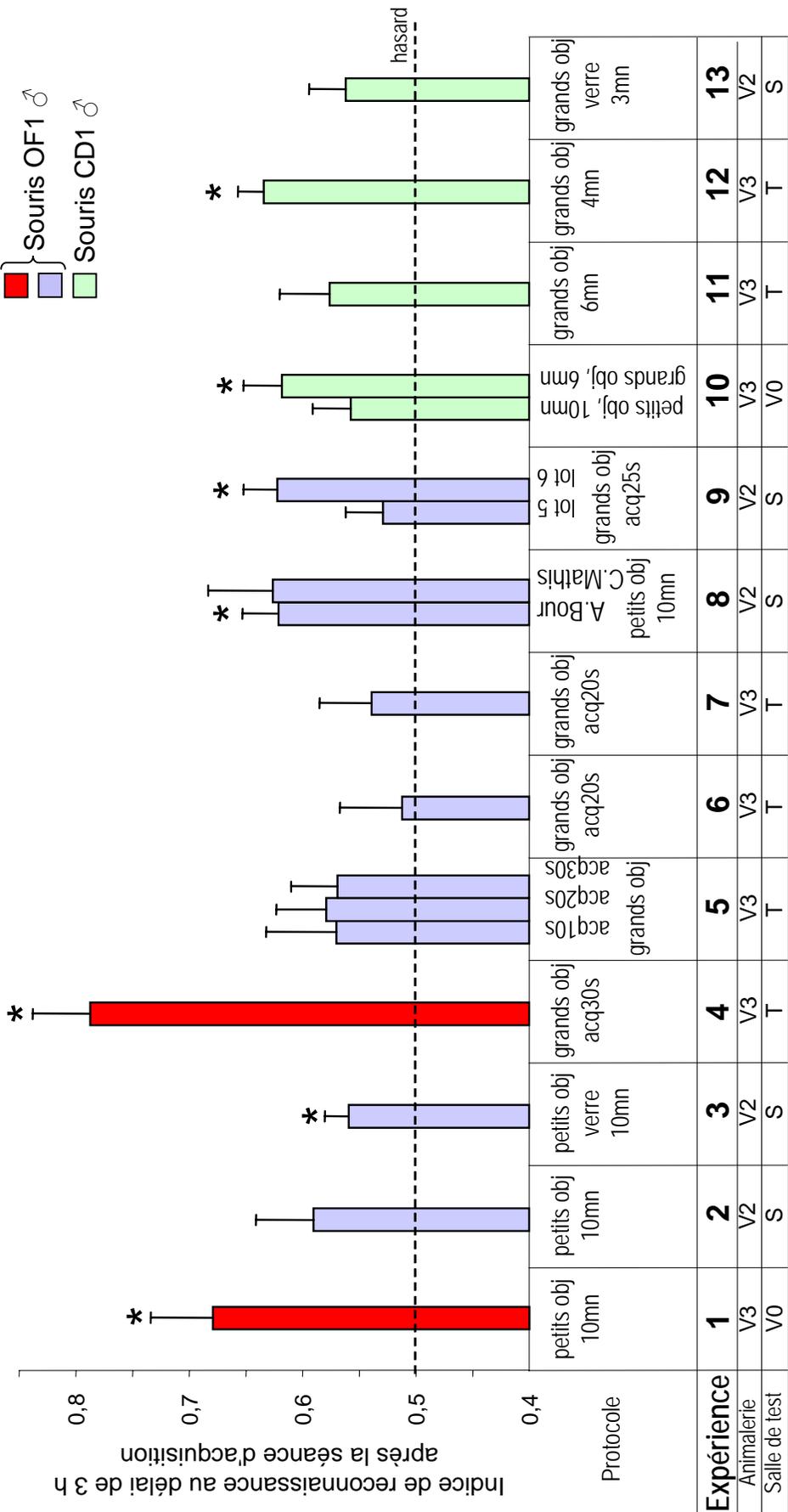


Figure 19 : Illustration de la variabilité des résultats de reconnaissance d'objet
Le but de ce graphique récapitulatif est de voir d'un simple coup d'œil l'extrême variabilité des performances des souris d'une expérience à l'autre. Ces expériences et leur conclusion seront décrites en détail dans le texte.

Les performances sont exprimées en terme d'indice de reconnaissance (moyenne + erreur-type) des souris OF1 et CD1. Sont indiquées les salles utilisées comme animalerie et salle de test, les tailles des objets (obj) utilisés (petits ou grands), et les durées de la séance d'acquisition ("3mn" à "10mn") ou de l'exploration maximale permise lors de cette séance ("acq10s" à "acq30s"). * = Performance supérieure au hasard à $p < 0,05$ (test de Student).

des groupes de souris testées à un délai de 3 h après la séance d'acquisition ont été représentées sur ce graphique général. Je rappelle qu'à ce délai, les souris devraient obtenir de bonnes performances. Les deux barres rouges indiquent les indices de reconnaissance obtenus à l'UMR 7521 par C. Mathis chez la souris OF1 (Iffa Credo) 1) avec un groupe de souris intactes lors d'une expérience utilisant de petits objets (première expérience décrite dans le deuxième chapitre de résultats ; voir **figure 19, expérience 1**) et 2) dans l'expérience de Dodart et collaborateurs (2002) utilisant de grands objets (voir **figure 19, expérience 4**). Les performances obtenues lors de ces deux expériences sont proches de celles obtenues à l'URA 1295 par Dodart et collaborateurs sur des souris OF1 élevées sur place (**voir figure 14**). On peut immédiatement noter 1) le faible niveau et 2) la variabilité des performances de reconnaissance obtenues lors de la série d'expériences de remise au point à l'UMR 7521, avec des souris OF1 puis CD1 (respectivement **barres bleues et vertes sur la figure 19**).

En fait, un des premiers signes d'instabilité comportementale et un des plus gros problèmes rencontrés dans la tâche de reconnaissance d'objet a été la préférence spontanée pour un des objets. Par exemple, dans l'expérience 2, j'ai obtenu un indice de reconnaissance médiocre au délai de 3h (**voir figure 19, expérience 2**). Lors de la séance d'acquisition, les souris ont montré une préférence spontanée pour la bille par rapport au dé à jouer. Lors de la rétention, les souris ont également eu tendance à explorer préférentiellement la bille, qu'elle soit l'objet familier ou l'objet nouveau : ceci a affecté la valeur de l'indice de reconnaissance.

Au vu de l'ensemble de ces informations, le protocole initial de Dodart et collaborateurs (utilisé lors des expériences sur le sAPP, et décrit dans la partie « Matériels et Méthodes ») ne semblait plus être adapté aux conditions propres à mes travaux de thèse (autres conditions d'élevage des souris et autres salles de test). J'ai donc entrepris une série d'expériences visant à remettre au point la tâche de reconnaissance d'objet pour obtenir de bonnes performances.

Je vais donc maintenant vous exposer le cheminement de ces différentes expériences de reconnaissance d'objet.

Puisque les souris avaient tendance à éviter le dé à jouer en plastique, nous avons pensé que son odeur, naturelle ou altérée par les nettoyages à l'alcool, pouvait être

désagréable pour les souris. Pour l'expérience suivante (expérience 3), j'ai donc troqué le dé et la bille pour des objets en verre. Lors de la séance d'acquisition, les souris n'ont pas montré de préférence spontanée pour l'un des objets. Lors de la séance de rétention 3h plus tard, le niveau de l'indice de reconnaissance n'a pas non plus été influencé par le type d'objet utilisé durant l'acquisition. Néanmoins, bien que significativement différent du hasard, le niveau de l'indice de reconnaissance est loin d'atteindre le niveau de performance obtenu par Dodart et collaborateurs (**voir figure 19, expérience 3 ; et figure 14**). Il semble donc que le problème ne soit pas lié à la matière des objets.

b. Utilisation de plus grands objets

Dans le même temps, Chantal Mathis a obtenu de bonnes performances avec un protocole adapté des travaux de Chen et collaborateurs (2000) (Dodart et coll, 2002) (**voir figure 19, expérience 4 en rouge**). Ce protocole utilise de plus grands objets (10 à 15 cm) et la séance d'acquisition est interrompue au bout de 20 mn ou lorsque la souris atteint 30 s d'exploration des objets. Pour tenter d'obtenir un meilleur indice de reconnaissance à un délai de rétention de 3h, j'ai donc également utilisé ces grands objets (canard en plastique jaune ou veilleuse pour enfant en plastique blanc) dans l'expérience 5 (**voir figure 19, expérience 5**) et j'ai fixé le temps d'exploration des paires d'objets à l'acquisition pour qu'il soit indépendant de la nature des objets. Le temps d'exploration des objets à l'acquisition était limité à 10, 20 ou 30 s (respectivement groupes « **acq10s** » n = 10, « **acq20s** » n = 11 et « **acq30s** » n = 11) afin de déterminer les conditions permettant d'obtenir le meilleur niveau de performance à la séance de rétention 3h plus tard. Lors de la séance de rétention 3h plus tard, le niveau de l'indice n'était pas différent du hasard quel que soit le groupe (*test de Student : acq10s : t = 1,124 ; p = 0,290 ; acq20s : t = 1,81 ; p = 0,101 ; acq30s : t = 1,66 ; p = 0,131*).

Dans deux expériences ultérieures (**voir figure 19, expériences 6 & 7**) comprenant également chacune un temps d'exploration des objets limité à 20 s, lors de la séance d'acquisition, le niveau de l'indice de reconnaissance des souris testées au délai de 3 h (n = 8 dans les deux expériences) n'était pas non plus différent du hasard (*t de Student : expérience B2 : t = 0,85 ; p = 0,423 ; expérience B3 : t = 0,22 ; p = 0,834*).

Le problème rencontré dans la tâche de reconnaissance d'objet ne venait donc ni de la durée d'exploration des objets à l'acquisition, ni de la taille des objets.

Devant l'inconstance des performances des souris d'une expérience à l'autre, et ma difficulté à obtenir des indices de reconnaissance d'un niveau comparable à ceux des travaux de Dodart et collaborateurs malgré l'utilisation du même protocole, j'ai voulu confronter ma méthode de travail avec celle d'un expérimentateur ayant déjà obtenu de meilleures performances de reconnaissance avec ses souris. Nous avons ainsi réalisé l'expérience C1 qui visait à comparer les performances obtenues par des souris OF1 testées après un délai de 3h par Chantal Mathis ou moi-même, en reprenant le protocole initial de Dodart et collaborateurs. Les performances des deux groupes de souris ont atteint un niveau comparable (*pas d'effet de l'expérimentateur* : $F(1,13) = 0,01$; $p = 0,936$) mais qui n'atteignait toujours pas le niveau obtenu par Dodart et collaborateurs (**voir figure 19, expérience 8**).

Le problème ne provenait donc pas non plus de l'expérimentateur.

c. Utilisation de la souche de souris CD1

Suite à ces résultats, nous avons tenté de remettre au point la tâche de reconnaissance d'objet sur une autre souche de souris. Lors du congrès de la Société des Neurosciences (Toulouse, 2001), la souche CD1 (souris non consanguines) nous avait été conseillée comme une alternative à la souche OF1, par la société d'élevage Iffa Credo, et également par le Dr Pascal Rouillet (UMR 5169) qui utilise cette souche dans des tests de reconnaissance (Rouillet et coll., 1996, Sargolini et coll., 2003). Nous avons donc cessé d'utiliser la souche de souris OF1 produite uniquement en France (spécifique de l'élevage Iffa Credo) et commencé à tester des souris CD1 (provenant également de l'élevage Iffa-Credo, et récemment introduite en France à partir de la souche originelle américaine), utilisées dans de nombreuses études comportementales au niveau international (Bouwknicht & Paylor, 2002 ; Coccorello et coll., 2000 ; Adams et coll., 2002 ; Costanzi et coll., 2003, Sik et al, 2003).

Dans l'expérience 10, nous avons comparé les performances des souris CD1 dans les protocoles utilisant de petits ou de grands objets. En effet, les souris CD1 explorent beaucoup les objets et présentent encore de bonnes performances 24 h après une séance d'acquisition de 10 mn dans une tâche de reconnaissance d'objet (Sargolini et coll., 2003). Afin de choisir le protocole le mieux adapté à nos conditions expérimentales au laboratoire, nous avons comparé les performances de ces souris CD1 dans deux protocoles différents : un protocole utilisant une séance d'acquisition de 10 mn durant laquelle les souris peuvent explorer un seul petit objet (Dodart et coll., 1997), et un autre protocole utilisant une séance d'acquisition

limitée à 6 mn durant laquelle les souris peuvent explorer deux objets identiques plus grands. Les souris testées 3h après l'acquisition de la tâche ont montré de meilleures performances avec de grands objets (*t de Student* : $t = 3,50$; $p = 0,007$) qu'avec de petits objets (*t de Student* : $t = 1,68$; $p = 0,122$) (**voir figure 19, expérience 10**). De plus, nous avons retrouvé une tendance spontanée à préférer un des deux objets avec les petits objets, mais pas avec les grands objets. Nous avons donc conservé les grands objets pour les expériences suivantes avec les souris CD1.

Afin d'étudier le décours temporel des performances de rétention de la souris CD1 dans l'expérience 11, j'ai évalué leurs performances à des délais de **1 h, 3 h, 24 h et 3 j** après une séance d'acquisition avec les grands objets. Lors de la séance d'acquisition, les souris ont à nouveau montré une tendance à préférer un objet. Lors de la séance de rétention, l'indice de reconnaissance n'a pas varié avec le délai mais avec la nature de l'objet utilisé comme objet familier. Dans cette expérience, une préférence spontanée est donc apparue pour le canard en plastique, gênant l'interprétation des performances de rétention. En effet, les performances des souris au délai de 3 h étaient médiocres (*t de Student au délai de 3 h* : $t = 1,75$; $p = 0,108$) (**voir figure 19, expérience 11**) alors que le groupe testé au délai de 24 h présentait un indice significativement différent du hasard (*t de Student au délai de 24 h* = $3,23$; $p = 0,008$).

Lors de l'expérience 12, j'ai réduit la séance d'acquisition à 4 mn afin de tenter de diminuer la performance des souris au délai de 24 h. Durant cette expérience, les souris n'ont plus montré de préférence spontanée pour un des objets durant l'acquisition, ont montré de bonnes performances au délai de 3 h (*t de Student* = $5,87$; $p = 0,0004$) (**voir figure 19, expérience 12**), mais plus après un délai de 24 h (*t de Student* : $t = 0,68$; $p = 0,514$, non représenté). Nous avons donc maintenu cette durée d'acquisition à 4 mn lors des expériences suivantes.

Ce protocole apparemment adapté à nos CD1 a été réutilisé lors d'une expérience visant à tester le sAPP chez la souris CD1. Au cours de cette expérience, les souris ont à nouveau montré une tendance à préférer un objet, ceci dans les 4 groupes expérimentaux, ce qui n'a ainsi pas permis de conclure quand à un effet promnésiant du sAPP chez la souris CD1 (non représenté).

Face à ce problème récurrent de préférence pour un des deux objets en plastique, probablement due à une différence d'odeur très marquée entre les deux objets proposés, j'ai tenté de les remplacer par de grands objets en verre, donc en matière inerte. Après sélection

de plusieurs objets (petites bouteilles en verre de formes et de couleurs variées, expérience non représentée) que les souris exploraient globalement de la même manière, j'ai réalisé l'expérience 13 visant à évaluer les performances des souris CD1 avec ces grands objets en verre, au délai de 3h. Pendant une séance d'acquisition de 3 mn, les souris ont pu explorer une paire donnée d'objets identiques (par exemple deux bouteilles vertes). Durant la séance de rétention, 3 h plus tard, les souris n'ont montré qu'une tendance à explorer davantage l'objet nouveau (par exemple une bouteille brune) par rapport à l'objet familier (par exemple une bouteille verte) (*t de Student* : $t = 1,95$; $p = 0,072$) (**voir figure 19, expérience 13**).

d. Conclusion

Malgré des changements de protocole, de conditions expérimentales, ou d'animaux dans notre nouveau laboratoire (UMR 7521), aucune des modifications mises en oeuvre n'a réussi à restaurer et surtout à maintenir chez nos animaux un bon niveau de performance dans les tâches de reconnaissance.

III. Influence du système de ventilation

1. Emergence d'une hypothèse

Les expériences effectuées pour tenter de remettre au point les tâches de reconnaissance ont pu faire émerger l'hypothèse d'un rôle possible des conditions de stabulation de nos souris dans la variabilité de leurs performances. En effet, l'hypothèse d'un effet de la salle de test n'avait pas semblé probante, puisque nous avons obtenu, dans plusieurs salles de test différentes, des performances parfois bonnes, parfois mauvaises (**voir figures 18 & 19**). A l'inverse, certains indices nous ont amenés à supposer que les conditions d'hébergement liées à des caractéristiques propres à nos différentes animaleries pouvaient avoir une influence sur le comportement de nos souris.

Lors de l'expérience 9, j'ai pu comparer les performances de souris provenant de deux lots différents, toutes arrivés au laboratoire à l'âge de six semaines. Les souris du lot le plus ancien avaient passé 1,5 mois de plus dans notre animalerie que le lot le plus récent. Les souris ont donc été testées au cours de la même expérience à l'âge de 2,5 et 4 mois, respectivement pour le lot le plus récent et le lot le plus ancien. Lors de la séance d'acquisition, les souris ont pu explorer les grands objets pendant 25 s. Lors de la séance de

rétenion, le lot le plus âgé a présenté les plus mauvaises performances ($F(1,13) = 4,33$; $p = 0,058$), avec un indice ne différant pas significativement du hasard (*t de Student* : $t = 0,86$; $p = 0,421$) alors que le lot le plus récent présentait de bonnes performances (*t de Student* : $t = 4,02$; $p = 0,005$) (voir **figure 19 expérience 9**). Cette expérience ne nous a pas permis de savoir si cette différence de performance était due à l'âge des souris (6 semaines de différence), à un effet du lot lui-même ou bien plutôt à un effet de la durée du séjour dans l'animalerie (11-12 semaines et 3-4 semaines respectivement pour les lots 5.01 et 6.01).

Nos anciennes observations sur des souris d'âge et de lots différents, ainsi que des discussions très poussées au sein de l'équipe nous ont amenés à favoriser l'hypothèse d'un effet du temps passé dans notre animalerie sur la performance de reconnaissance des souris. En effet, le système de ventilation qui équipe les animaleries de l'UMR 7521 est alors apparu comme un facteur de perturbation possible dans le lieux d'hébergement des souris. Acquis par le laboratoire afin de mettre les animaleries et salles de test aux normes européennes de ventilation, ce système présente un niveau sonore peu discret dans certaines salles, et n'existait pas dans les animaleries de l'URA 1295 utilisées jusqu'en 2000 situées dans le pavillon du bâtiment (conditions des travaux de Dodart et collaborateurs).

Afin de vérifier l'hypothèse d'un effet néfaste de ce système de ventilation sur le comportement de nos souris, nous avons donc décidé d'effectuer une expérience visant à comparer les performances de reconnaissance d'objet et le niveau de corticostérone (hormone dont la concentration sanguine est notamment liée au niveau de stress) de souris ayant séjourné 3-4 semaines dans des animaleries dont le niveau de la ventilation diffère (niveaux sonores ambiants différents).

2. Déroulement de l'expérience

Trente-huit souris mâles de la souche CD1 ont été utilisées. Dès leur arrivée au laboratoire, elles ont été réparties en quatre groupes, hébergés chacun dans une animalerie de niveau de ventilation différent (voir **figure 18**) : une pièce sans système de ventilation « **V0** », une pièce à ventilation faible « **V1** », une pièce à ventilation moyenne « **V2** » et dans une pièce à forte ventilation « **V3** ». Les souris des différents groupes ont séjourné dans leurs animaleries respectives pendant 3 à 4 semaines jusqu'au jour du test. Toutes les souris ont été testées dans la tâche de reconnaissance d'objet au cours de trois séries d'expériences, dans la salle « **T** », attenante à la salle V3.



Figure 20 : Objets utilisés dans l'expérience évaluant l'influence du lieu d'hébergement des souris sur leurs performances de reconnaissance

Les deux objets de grande taille utilisés étaient en verre.

À gauche la "fleur" et à droite la "bouteille".

Tout au long de la période de stabulation, et à la même heure de la journée, des mesures de la température, de l'hygrométrie, de la pression atmosphérique, de la luminosité et du niveau sonore ont été réalisées dans chaque pièce d'hébergement quasi quotidiennement. La veille de la séance d'habituation de la tâche de reconnaissance d'objet, des prélèvements sanguins ont été effectués matin et soir sur les souris hébergées dans les salles V0, V2 et V3, afin d'effectuer ultérieurement un dosage des niveaux de corticostérone des animaux.

Les objets utilisés lors de la tâche de reconnaissance d'objet étaient de grands objets en verre : une petite bouteille bleue et un bougeoir en forme de fleur portant une grosse bille (**voir figure 20**). L'activité locomotrice des animaux (nombre de cases parcourues et nombre de redressements effectués par mn) a été mesurée durant les 5 premières mn et les 5 dernières mn d'une séance d'habituation de 30 mn. Puis, 24 h plus tard, les animaux ont pu explorer une paire d'objets identiques lors d'une séance d'acquisition de 5 mn. Trois heures plus tard, les animaux ont été mis en présence d'un objet familier et d'un objet nouveau lors d'une séance de rétention de 10 mn. Des mesures de la température, de l'hygrométrie, de la pression atmosphérique, de la luminosité et du niveau sonore ont également été réalisées dans la salle de test (salle T) lors des séances d'acquisition et de rétention.

Comme pour toute expérience de reconnaissance d'objet, la moitié des souris de chaque groupe ont eu la bouteille comme objet familier, l'autre moitié la fleur. De la même façon, afin de réduire l'impact du rythme circadien sur l'activité exploratoire et les performances de chaque groupe expérimental, les horaires de passage des souris d'un même groupe ont été randomisés sur la journée de test. Trois séries d'expérimentations ont été nécessaires pour tester l'ensemble des souris sur une semaine et demie. Dans la mesure du possible, autant de souris de chaque groupe ont été testées au cours d'une même série.

3. Résultats

a. Séance d'habituation à l'enceinte

Lors de la séance d'habituation, aucun effet de la salle d'hébergement n'a été mis en évidence sur l'activité locomotrice, qu'elle soit mesurée en terme de nombre de cases parcourues ou de nombre de redressements durant les 5 premières et les 5 dernières minutes de la séance (*redressements* : $F(3,74) = 0,11$; $p = 0,952$; *nombre de cases parcourues* : $F(3,74) = 0,22$; $p = 0,884$).

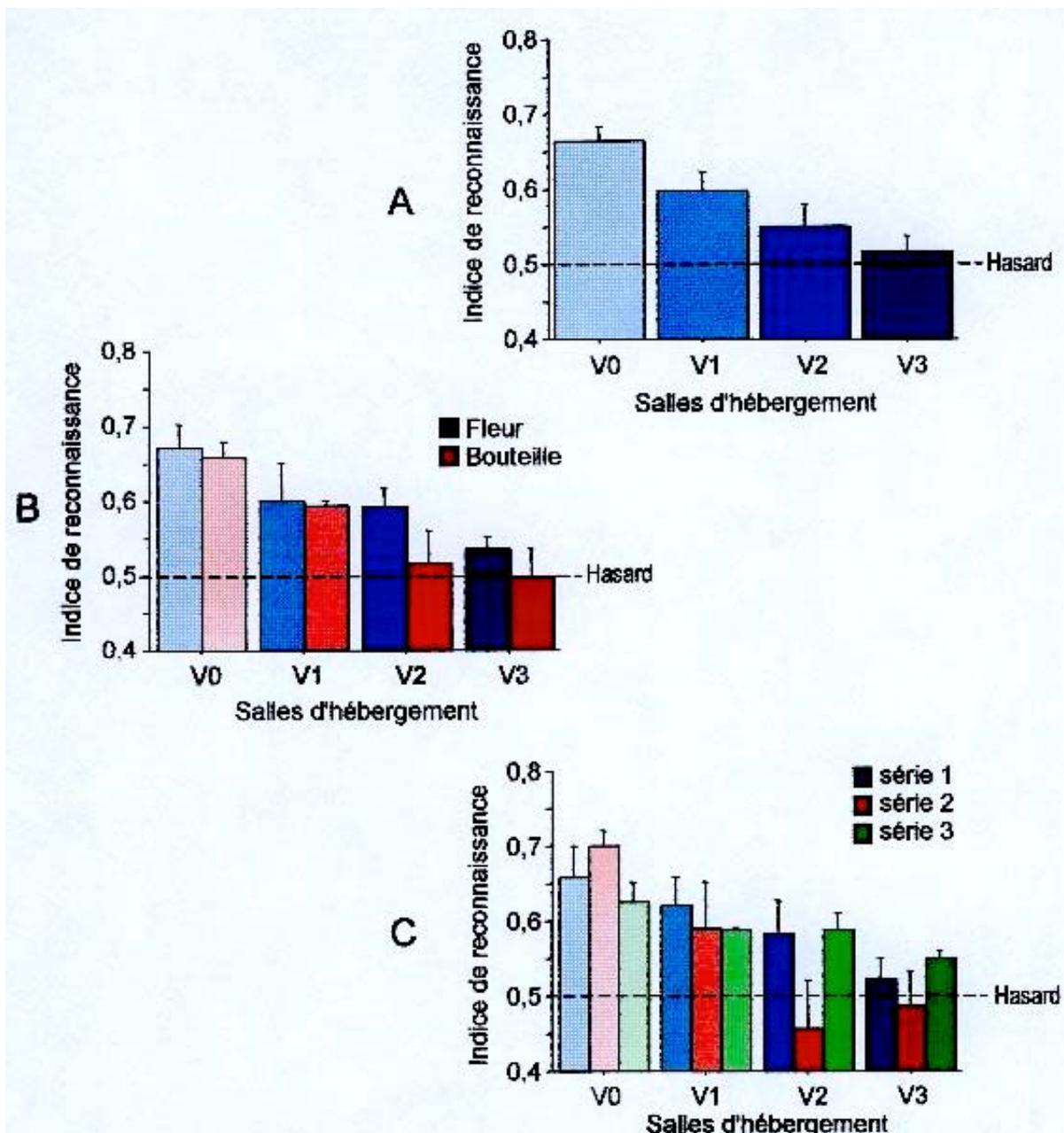


Figure 21 : Salle d'hébergement (animaleries) et performances de reconnaissance d'objet chez des souris mâles CD1

A. Effet de la salle d'hébergement : les souris provenant des salles les fortement ventilées montrent une dégradation de leurs performances.

B. Influence de l'objet familier utilisé : les performances n'ont pas été influencées par la nature de l'objet utilisé.

C. Variation des performances en fonction des séries de test : les résultats semblent varier selon la série de test lorsque les souris proviennent des salles les plus fortement ventilées.

V0, V1, V2 et V3 : animaleries avec un niveau de ventilation respectivement nul, faible, moyen et fort.

b. Exploration des objets à la séance d'acquisition

Pendant la séance d'acquisition, aucun effet de la salle d'hébergement n'a été observé sur la quantité d'exploration totale des deux objets (deux bouteilles ou deux fleurs) ($F(3,30) = 0,86$; $p = 0,472$). Les souris ont spontanément préféré la fleur par rapport à la bouteille (*objet* : $F(1,30) = 13,26$; $p = 0,001$; *interaction salle x objet* : $F(3,30) = 3,55$; $p = 0,026$) lorsqu'elles avaient été hébergées dans les salles V1 et V2 (*effet de l'objet* : pour la salle V0 : $F(1,8) = 4,43$; $p = 0,068$; pour la salle V1 : $F(1,5) = 26,67$; $p = 0,004$; pour la salle V2 : $F(1,9) = 7,54$; $p = 0,023$ et pour la salle V3 : $F(1,8) = 0,53$; $p = 0,488$).

c. Exploration des objets à la séance de rétention

Lors de la séance de rétention, les souris des 4 groupes ont exploré l'ensemble des objets pendant la même durée (*effet de la salle sur l'exploration totale*: $F(3,30) = 1,46$; $p = 0,246$). De plus, la nature de l'objet familier utilisé n'a pas eu d'effet sur la quantité totale d'exploration des objets (*objet* : $F(1,30) = 2,80$; $p = 0,104$; *salle x objet* : $F(3,30) = 0,62$; $p = 0,609$).

Cette fois pourtant, les indices de reconnaissance ont clairement varié en fonction de la salle d'hébergement ($F(3,34) = 7,31$; $p = 0,0008$) (**voir figure 21, A**). En effet, les souris hébergées dans la salle la moins ventilée V0 ont montré de meilleures performances que les souris hébergées dans les salles fortement ventilées V2 et V3 (*test de Student-Newman-Keuls* : V0 vs V2 et V0 vs V3 : $p < 0,01$; *autres comparaisons* : NS). Cet effet de la salle d'hébergement sur l'indice de reconnaissance était indépendant de l'objet utilisé à l'acquisition (*objet* : $F(1,30) = 1,78$; $p = 0,192$; *interaction salle x objet* : $F(3,30) = 0,41$; $p = 0,745$) (**voir figure 21, B**).

d. Variation des performances d'une série de test à l'autre

D'une série de test à l'autre (3 séries de souris testées sur 1,5 semaines), les performances n'ont pas varié de manière significative (*effet de la série sur l'indice de reconnaissance* : $F(2,26) = 1,00$; $p = 0,381$; *interaction série x salle* : $F(6,26) = 1,46$; $p = 0,232$). Néanmoins, dans les salles V2 et V3 fortement ventilées, les performances varient bien d'une série à l'autre, alors que dans les salles V0 et V1 faiblement ventilées, les performances sont plutôt uniformément bonnes (**voir figure 21, C**).

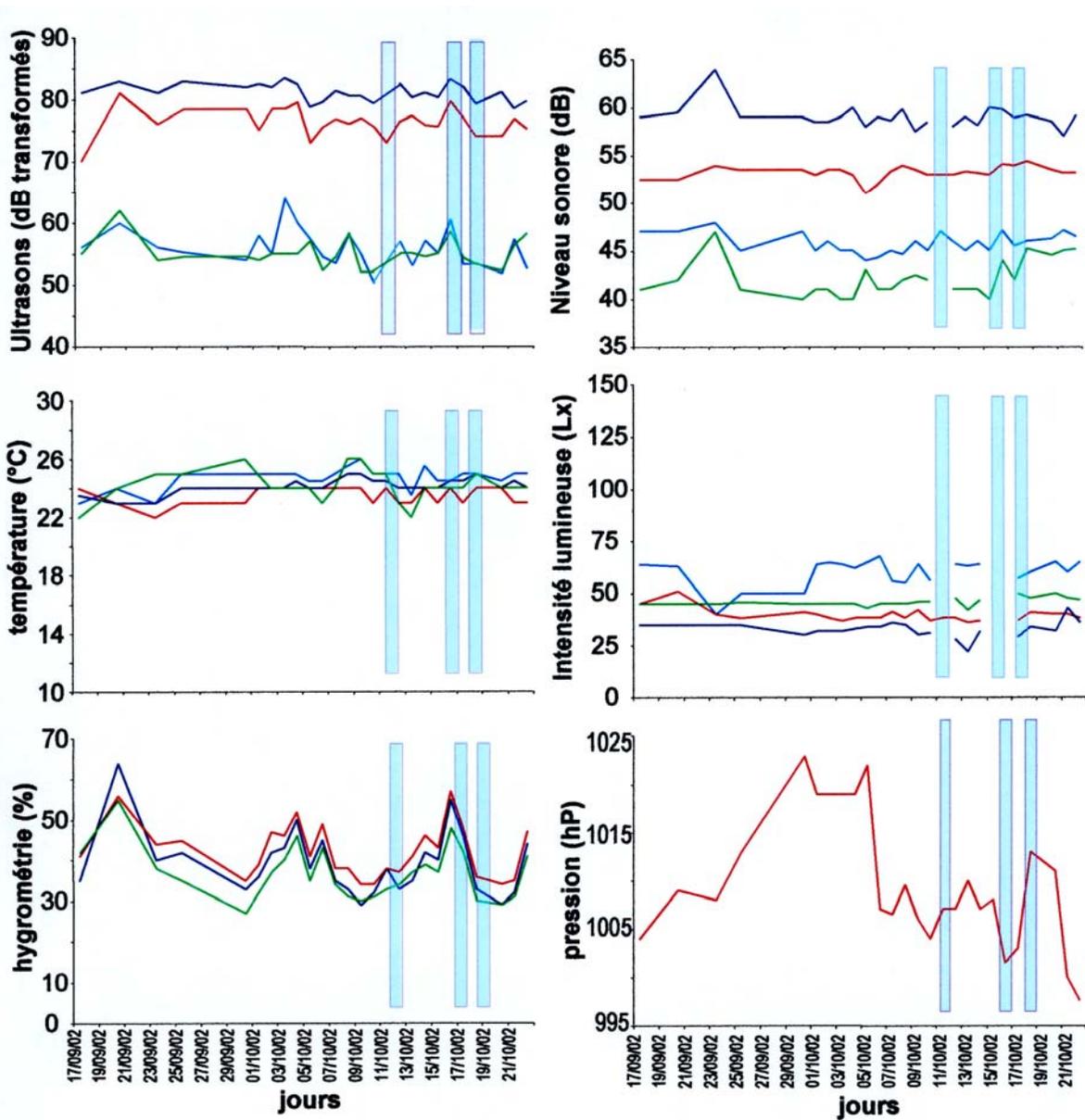


Figure 22 : Variables physiques mesurées dans les salles d'hébergement des souris (animaleries)

Cette figure indique les variations de température, d'hygrométrie, de pression atmosphérique, d'intensité lumineuse et des niveaux sonores (niveau sonore audible ou niveau d'ultrasons mesurés après conversion en sons audibles) en fonction des différentes animaleries hébergeant les souris (V0 à V3, voir code couleur). Les variables ont été mesurées tout au long de la période d'hébergement ainsi que lors des trois séries de test (barres bleu clair).

- V0
- V1
- V2
- V3

e. Mesures des paramètres physiques dans les salles de test

Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre la performance de reconnaissance de l'ensemble des souris et les valeurs de température, d'hygrométrie, de pression atmosphérique, de luminosité ou de niveau sonore mesuré dans la salle de test.

f. Mesures des paramètres physiques dans les salles d'hébergement

La température des salles d'hébergement V0, V1, V2 et V3 et la luminosité des salles V0, V2 et V3 ont peu varié tout au long de l'expérience (**voir figure 22**). La luminosité moyenne de la salle V1 était plus élevée et plus variable que celle des autres salles en raison de la présence d'une fenêtre non opacifiée laissant entrer la lumière naturelle. Les valeurs de température et de luminosité des salles d'hébergement n'ont corrélé avec aucune autre variable. La pression atmosphérique (mesurée dans la salle V2) a varié entre 997 et 1023 mm Hg au cours de la période d'hébergement, mais n'a été corrélée avec aucun autre paramètre (**voir figure 22**). L'hygrométrie des salles V0, V2 et V3 (pas de mesures dans la salle V1) a varié au cours de la durée de l'hébergement, mais de la même façon dans les 3 salles (hygrométrie moyenne de $36 \pm 6 \%$, $39 \pm 8 \%$ et $42 \pm 6 \%$ d'humidité, respectivement pour les salles V0, V2 et V3, **voir figure 22**).

Le niveau sonore relevé dans les salles d'hébergement était de $42,1 \pm 1,9$ dB dans la salle V0, de $45,8 \pm 1,0$ dB dans la salle V1, de $53,2 \pm 0,7$ dB dans la salle V2 et de $59,0 \pm 1,3$ dB dans la salle V3. Ces niveaux sonores sont significativement différents d'une salle à l'autre (*effet de la salle* : $F(3,98) = 838,70$; $p < 0,0001$; *test de Student-Newman-Keuls* : toutes les salles diffèrent à $p < 0,01$) (**voir figure 22**). A titre indicatif, pour l'oreille humaine, une ambiance sonore de 30 à 50 dB est considérée équivalente à celle de lieux de repos ou de travail intellectuel (chambre, bibliothèques, bureaux) alors qu'une ambiance sonore de 60 à 80 dB est équivalente à celle de lieux de vie (magasins, rues, communication parlée). A partir de 90 dB, le bruit est facteur de troubles auditifs chez l'homme.

Les souris étant capables d'entendre les ultrasons, nous avons voulu avoir une idée du niveau d'ultrasons délivrés dans chaque pièce par l'appareil de ventilation. Ainsi, nous avons mesuré le niveau sonore (en dB) sortant d'un appareil convertissant les ultrasons en sons audibles pour l'homme. Réglé sur un volume de sortie et une fréquence de détection identiques pour chaque salle et chaque jour de mesure, cet appareil nous a donc permis

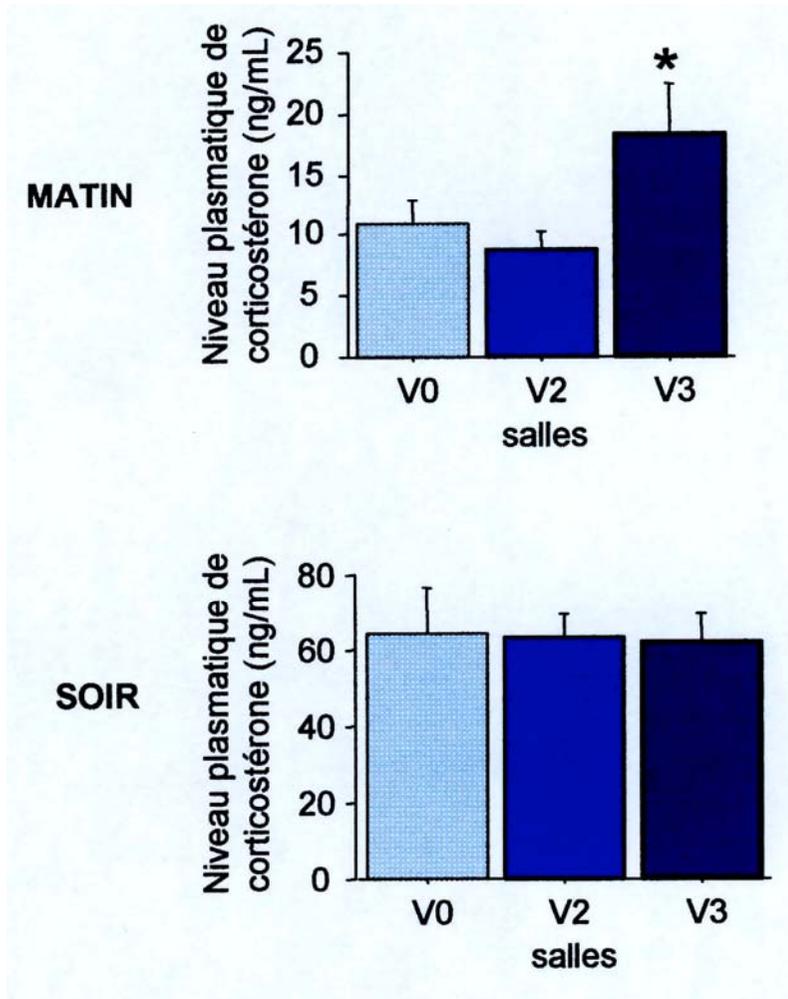


Figure 23 : Niveaux plasmatiques de corticostérone

Le niveau basal (prélèvement du matin) de corticostérone des souris hébergées en salle V3 est plus important que celui des souris hébergées dans les salles moins ventilées V0 et V2.

* = Différent des autres salles à $p < 0,05$.

d'estimer dans chaque salle des niveaux d'ultrasons « convertis », qui différaient selon la salle d'hébergement ($F(3,97) = 806,81 ; p < 0,0001$). Ces niveaux étaient identiques dans les salles V0 et V1, plus important dans la salle V2 et encore plus important dans la salle V3 (*test de Student-Newman-Keuls : V0 vs V1 : NS ; autres comparaisons : $p < 0,01$; voir figure 22*).

En conclusion, les salles ont présenté des niveaux de température, de luminosité et des niveaux sonores constants mais différents d'une salle à l'autre, et des niveaux de pression et d'hygrométrie variables au cours du temps. Le niveau d'ultrasons « convertis » était différent selon la salle, croissant de V0 à V3, comme le niveau de sons audibles par l'Homme. Il est donc probable que les sons et ultrasons mesurables dans chaque salle aient une origine commune, liée au fonctionnement du système de ventilation.

g. Dosages de corticostérone

Les dosages de corticostérone, effectués pour les souris des salles V0, V2 et V3 la veille de la séance d'habituation, ont révélé un effet de la salle d'hébergement sur le niveau de corticostérone du début de journée ($F(2,29) = 3,90 ; p = 0,032$), avec un niveau de corticostérone plus élevé dans la salle V3 que dans les deux autres salles V0 et V2 (*test de Student-Newman-Keuls : $p < 0,05$ pour les comparaisons V3 vs V0 et V2 vs V3*) (**voir figure 23, matin**). En fin de journée, les niveaux de corticostérone des trois groupes de souris n'ont plus montré de différence ($F(2,29) = 0,01 ; p = 0,987$), mais étaient plus élevés que le matin (*effet du moment du prélèvement : $F(1,29) = 107,78 ; p < 0,0001$*) (**voir figure 23, soir**).

4. Conclusion

L'ensemble des résultats apportés par cette expérience va dans le sens d'une influence néfaste du système de ventilation de notre laboratoire sur les performances de reconnaissance de nos souris. En effet, les souris ayant été hébergées dans les salles les plus fortement ventilées montrent, non seulement un faible niveau de performance de reconnaissance, mais semblent également présenter une variation de ces performances d'une série de test à l'autre. Le dosage de corticostérone semble aller dans le sens de ces conclusions puisque les souris provenant de la salle la plus ventilée possèdent le plus fort niveau matinal de corticostérone. Etant donné que les séances de test ont été réalisées entre 9h et 12h, on peut imaginer que cette différence de niveau de corticostérone a pu avoir une influence sur la performance des souris lors des tests.

La variabilité dans les résultats de reconnaissance d'objet lors des tentatives de remise au point pourrait donc être due à ces conditions d'hébergement non adaptées aux souris. En effet, aucune corrélation n'a été montrée entre le niveau de performance et les valeurs des variables physiques (température, humidité, etc....) mesurées dans la salle de test. De plus, au cours des expériences précédentes, de mauvais résultats avaient été obtenus dans plusieurs salles de test différentes. L'ensemble de ces données confirme que la salle de test n'était pas à l'origine du problème. Par contre, les différences de caractéristiques des 4 animaleries (en particulier le niveau sonore) sont plus vraisemblablement à l'origine de cet « effet salle d'hébergement » sur la performance des souris.

IV. Discussion du chapitre

Dans la première partie du travail exposé dans ce chapitre, j'ai mis en évidence un problème de régularité des performances des souris OF1 d'une expérience à l'autre dans la tâche de reconnaissance spatiale, puis dans la tâche de reconnaissance d'objet. A travers de multiples petites expériences, j'ai éprouvé tour à tour les hypothèses d'un effet du sexe, de la manipulation, de la taille ou la nature des objets, de l'expérimentateur, du lot des souris, de la salle d'expérience, de la durée d'exploration initiale des objets, sans succès. De plus, le changement de souche, de l'OF1 à la CD1, n'a pas fondamentalement amélioré notre problème de « réplicabilité » des résultats. Le passage de la souche OF1 à la souche CD1 n'a pas non plus permis, malgré une adaptation du protocole à la nouvelle souche, d'obtenir de bonnes performances de reconnaissance d'objet, comparables à celles obtenues auparavant au laboratoire.

En observant de façon détaillée l'ensemble de nos données, nous avons posé une dernière hypothèse d'un effet inhérent à la salle d'animalerie. C'est donc dans la dernière expérience exposée dans ce deuxième chapitre que j'ai pu, effectivement, mettre en évidence un effet des conditions d'hébergement des souris sur leurs performances de reconnaissance d'objet. Les souris hébergées avant l'expérience dans des salles fortement ventilées (et les plus bruyantes) pendant 3 à 4 semaines ont présenté une altération de leurs performances de reconnaissance d'objet. Le niveau basal de corticostérone des souris hébergées dans la salle la plus ventilée était significativement plus important que celui des souris hébergées dans les deux salles les moins ventilées. L'ensemble de ces données suggère qu'une ou plusieurs conséquences de l'installation du nouveau système de ventilation (niveau sonore, vibrations, production d'ultrasons) ont induit un stress « chronique » chez nos animaux expérimentaux, et que ce stress est à l'origine de la variabilité de leurs performances de reconnaissance. Or, les travaux de Grootendorst et collaborateurs en 2001 ont montré que l'exposition répétée à un stress (présence d'un rat sur la cage de la souris pendant 1 à 2 h / j pendant 7 j sur 14) altère les performances de mémoire spatiale de souris B6 dans une tâche de mémoire de référence en piscine de Morris, et augmente de façon persistante le niveau de corticostérone. En effet, dans cette étude, le niveau basal de corticostérone mesuré une semaine après l'exposition répétée au stress était plus importante de 62% que celle mesurée avant l'exposition. Dans notre laboratoire, le niveau basal de corticostérone de souris CD1 hébergées dans les salles

peu ventilées était comparable à celui obtenu par Grootendorst et collaborateurs (2001) chez des souris B6 avant la procédure de stress. Le niveau de corticostérone des souris CD1 hébergées dans la salle la plus ventilée est augmenté de plus de 68% par rapport à celui des souris hébergées dans les salles les moins ventilées. Etant donné que les souris B6 et CD1 semblent réagir à un stress de façon similaire en terme d'augmentation du niveau de corticostérone plasmatique (Hotchkiss et coll., 2004), on peut penser que ces différences de niveaux de corticostérone chez nos souris ont pu induire des modifications du comportement. L'ensemble de ces résultats va dans le sens d'une influence néfaste du système de ventilation sur nos souris, mais les expériences réalisées ne suffisent pas pour déterminer la cause exacte de la variabilité des performances de reconnaissance d'objet.

De plus, les souris semblent particulièrement sensibles aux effets des manipulations et de l'environnement, plus que les rats par exemple (Tabata et al, 1998).

L'ensemble de ces tentatives de remise au point des tâches de reconnaissance dans nos nouveaux locaux, dans le but de pouvoir effectuer la première partie du projet de thèse (à savoir mettre en évidence une sécrétion de sAPP au cours d'un apprentissage), ont nécessité plus d'un an d'expérimentation avec plus de 500 souris testées, sans que nous puissions retrouver de bonnes bases de travail. Le système de ventilation ne pouvant être interrompu ou changé/modifié dans des délais raisonnables pour mon travail de thèse, j'ai dû réorienter mes objectifs en fonction des études en cours dans notre équipe. J'ai donc axé la suite de mon travail sur la thématique « vieillissement » du projet initial, en effectuant la caractérisation comportementale d'une cohorte « âgée » de souris transgéniques pour le gène de l'apolipoprotéine E, et en testant les effets du sAPP sur les souris présentant des déficits cognitifs. Les données dont nous disposons à ce moment n'évoquaient pas de problème majeur dans la régularité des performances des souris de fond génétique B6.

Cependant, à la lumière des résultats discutés ci-dessus, nous avons été amenés à analyser et remettre en question nos choix concernant l'hébergement des souris destinées aux nouvelles expérimentations de ma thèse : une cohorte de souris « âgées » mâles et femelles B6, apoE-KO, apoE3 et apoE4, et une cohorte de souris « âgées » femelles B6 et apoE4 destinée à tester les effets du sAPP sur les performances de mémoire spatiale de ces souris.

Les cohortes « jeune » et « âgée » de souris B6, apoE-KO, apoE3 et apoE4 ont toutes deux été élevées dans une pièce peu ventilée du laboratoire (salle E). La cohorte « jeune » a été hébergée dans la pièce la plus ventilée (V3) pendant la durée des expérimentations (de

l'isolement jusqu'au sacrifice), et ont été testées dans la pièce T. A cette époque, la cohorte de souris « jeunes » avait déjà été testée, et l'équipe s'est alors retrouvée devant un dilemme : devait-on, pour la période d'expérimentation de la cohorte « âgée », héberger les souris dans une autre salle que celle utilisée pour l'hébergement de la cohorte « jeune » ? Nous avons finalement décidé de conserver les mêmes conditions d'hébergement pour la cohorte « âgée », donc hébergée dans la salle V3 pendant la durée des expérimentations (64 j), car nous voulions pouvoir comparer leurs performances avec celles de la cohorte « jeune » en maintenant exactement les mêmes conditions. Nous avons fait ce choix pour essentiellement deux raisons. La première raison est que lors de la mise au point de la tâche de reconnaissance spatiale avec des souris « jeunes » B6 et apoE-KO, les souris avaient également été hébergées dans la salle V3 et les résultats n'ont pas mis en évidence de problème particulier. Nous ne pouvons bien sûr écarter l'hypothèse d'une influence possible des conditions d'hébergement de ces souris sur les performances obtenues lors des expérimentations, mais il semblerait que les performances de ces souris consanguines de fond génétique B6 soient moins sensibles que les souris de souche OF1 et CD1 aux conditions d'hébergement en animalerie. En effet, les expériences préliminaires ont donné des résultats relativement reproductibles avec des niveaux de performance corrects. La deuxième raison est que les souris de fond génétique B6 sont connues pour développer une surdité avec l'âge par dégénérescence de la cochlée, et une perte progressive de l'audition depuis les hautes vers les basses fréquences (Prosen et coll., 2003 ; Francis et coll., 2003) à partir d'environ 6 mois. Cette perte auditive est liée chez la souris B6 au locus *ahl* (pour « age-related hearing loss ») situé sur le chromosome 10 (Keithley et coll., 2004). Bien que d'origine génétique, cette perte progressive de l'audition peut également être rendue plus sévère par une exposition répétée à un environnement sonore amplifié (Willot et Turner, 1999). Il est donc probable que les souris de la cohorte « âgée » aient été moins affectées par le bruit généré par le système de ventilation, néanmoins nous n'avons aucune certitude quand à l'existence d'un effet du lieu d'hébergement sur les souris des cohortes « jeune » et « âgée ».

Par contre, pour l'expérience visant à tester les effets du sAPP sur les souris âgées femelles apoE4, nous avons choisi d'héberger les femelles « âgées » B6 et apoE4 dans la pièce V1. En effet, il s'agissait d'une nouvelle expérience relativement indépendante de la précédente évaluation comportementale des cohortes « jeune » et « âgée ». Nous avons donc choisi d'héberger cette fois les animaux dans les meilleures conditions « du point de vue des

souris » c'est-à-dire essentiellement dans une animalerie moins bruyante. Les résultats de cette expérience, exposés à la fin du troisième chapitre, semblent indiquer que les souris B6 « âgées » qui ont été hébergées dans la pièce V1 ont obtenu des performances légèrement meilleures que lors du test de la cohorte « âgée ».

Contribution expérimentale : chapitre II

**Effets du sAPP₆₉₅ chez des souris non
consanguines**

I. Introduction

Dans les travaux de Meziane et collaborateurs (1998), il a été démontré que le sAPP₆₉₅ et le sAPP₇₅₁ (deux isoformes de sAPP) présentaient des effets promnésiants dans plusieurs tâches d'apprentissage et de mémoire chez des souris OF1. Cette étude a pu mettre en évidence :

- que le sAPP₇₅₁ était capable d'améliorer les performances des souris dans une tâche de reconnaissance d'objet, lorsqu'il était administré 20 mn avant l'apprentissage,
- que le sAPP₇₅₁ pouvait améliorer les performances de mémoire dans une tâche de discrimination visuelle (*go / no go*) lorsqu'il était administré juste après l'apprentissage,
- que le sAPP₇₅₁ était capable de bloquer les effets amnésiants induits par la scopolamine dans des tâches de reconnaissance d'objet, de discrimination visuelle et d'apprentissage opérant, et enfin,
- que le sAPP₆₉₅ était également capable, comme le sAPP₇₅₁, d'améliorer les performances de mémoire et/ou de bloquer les effets amnésiants de la scopolamine dans une tâche de reconnaissance d'objet.

L'ensemble de ces résultats a permis de formuler l'hypothèse d'une action des sAPP sur les processus de consolidation de la mémoire, puisque des effets promnésiants étaient également observés lorsque le sAPP était administré après l'acquisition des informations. Néanmoins, on ne peut complètement exclure la possibilité d'un effet du sAPP sur les processus de rappel de l'information. En effet, dans la plupart des tâches d'apprentissage et de mémoire que nous utilisons, la performance est évaluée après des délais ne dépassant pas 48h. Il se peut donc que des effets liés à l'administration du sAPP persistent au-delà de ce délai.

Afin d'approfondir les connaissances concernant les effets des sAPP sur les processus mnésiques, j'ai choisi d'étudier plus particulièrement l'isoforme 695 du sAPP, qui est la forme neuronale prépondérante (Rohan de Silva, 1997 ; Selkoe, 1998). Les études auparavant menées dans l'équipe avaient surtout utilisé l'isoforme 751, notamment parce qu'elle a été produite et nous a été donnée avant l'isoforme 695. Jusqu'à ce jour, les deux isoformes (sAPP₇₅₁ et sAPP₆₉₅) présentent tout deux des effets promnésiants et améliorent les performances de reconnaissance d'objet aux mêmes doses (0,05 à 5 pg / souris, i.c.v.). Néanmoins, il est à noter que, dans cette tâche, l'isoforme 695 bloque les déficits induits par

la scopolamine à des doses 10 à 100 fois plus faibles que celles de l'isoforme 751 (Meziane et coll., 1998). Les effets promnésiants des sAPP semblent donc ne pas impliquer le domaine KPI, présent dans l'isoforme 751, mais pas dans l'isoforme 695.

La première étape de mon travail visait à vérifier si le sAPP₆₉₅ pouvait améliorer les performances de mémoire lorsqu'il était injecté après l'apprentissage d'une tâche de reconnaissance d'objet. En effet, dans les travaux antérieurs, le sAPP avait toujours été injecté 20 mn avant la séance d'acquisition de cette tâche.

La deuxième étape visait à déterminer à quel moment le sAPP agissait sur les processus mnésiques. J'ai donc établi le gradient temporel d'efficacité du sAPP₆₉₅ en injectant la protéine à différents délais post-apprentissage.

Lors d'une troisième étape, afin de mieux définir le spectre d'action du sAPP sur la mémoire, j'ai testé l'efficacité du sAPP₆₉₅ dans une tâche de reconnaissance spatiale. En effet, les patients atteints de maladie d'Alzheimer montrent très tôt des troubles de désorientation spatiale et il nous a paru intéressant d'évaluer les effets du sAPP sur une tâche de reconnaissance impliquant une forme de mémoire spatiale.

Suite aux problèmes posés par la tâche de reconnaissance d'objet, j'ai poursuivi mon travail de thèse sur une autre tâche sensible aux effets des sAPP, la tâche d'apprentissage opérant en boîte de Skinner. Pour cette dernière étape de mon travail de caractérisation des effets promnésiants des sAPP, j'ai d'abord vérifié que l'administration (exogène) de sAPP₆₉₅ pouvait (comme le sAPP₇₅₁, voir Meziane et coll., 1998) bloquer les déficits de mémoire induits par la scopolamine dans cette tâche. Afin d'évaluer l'implication des sAPP endogènes dans les processus de consolidation de l'information mnésique, j'ai ensuite administré des anticorps spécifiquement dirigés contre les sAPP, 5 mn après l'acquisition de cette tâche d'apprentissage opérant.

II. Effets promnésiants d'une injection post-apprentissage de sAPP₆₉₅

Dans les expériences de reconnaissance d'objet réalisées jusqu'alors, nous avons utilisé un mode d'administration « pré-acquisition », car nous redoutions un effet de l'injection sur les processus de consolidation mnésique. En effet, un évènement peut influencer la mémorisation d'un autre évènement qui le précède dans un court laps de temps, et ceci de façon d'autant plus marquée que le second évènement est très agréable ou désagréable (voir pour revue : Izquierdo, 1989). C'est donc pour éviter que la séance

d'acquisition et le futur objet familier soient « associés » à l'expérience de l'injection i.c.v. (contention modérée) que nous avons opté pour un mode d'administration « pré-acquisition ». Afin de vérifier que le sAPP₆₉₅ pouvait améliorer les performances de mémoire lorsqu'il était injecté après l'apprentissage, nous avons donc évalué, dans une première expérience, les effets d'une injection de sAPP₆₉₅ (0,5 pg / souris) réalisée 5 mn après la fin de la séance d'acquisition, sur les performances de reconnaissance d'objet 24 h plus tard.

1. Déroulement de l'expérience

Je rappelle que pour cette expérience, ainsi que pour toutes les expériences de reconnaissance d'objet présentées dans ce chapitre, j'ai utilisé le protocole décrit dans la partie « Matériels et Méthodes ».

Quarante souris mâles OF1 ont été utilisées lors de cette expérience. Vingt souris ont été opérées pour l'implantation du dispositif d'injection i.c.v., et vingt autres, prélevées dans les mêmes cages et isolées au même moment, ont été laissées intactes. Toutes les souris ont été soumises à une séance d'acquisition de la tâche de reconnaissance d'objet, puis ont été réparties dans 4 groupes (**voir figure 24, schéma des différents groupes**) :

- un groupe « **intactes – 3 h** » (n = 10) qui a été soumis à la séance de rétention de la tâche après un délai de 3 h,
- un groupe « **intactes – 24 h** » (n = 10) qui a été soumis à la séance de rétention de la tâche après un délai de 24 h.
- un groupe « **NaCl – 24 h** » (n = 10) qui a reçu une injection i.c.v. de 4 µL de solution de NaCl 5 mn après la séance d'acquisition,
- un groupe « **sAPP – 24 h** » (n = 10) qui a reçu une injection i.c.v. de sAPP₆₉₅ à la dose de 5 pg / 4 µL / souris, 5 mn après la séance d'acquisition.

Les deux groupes de souris intactes testées 3h ou 24 h après la séance d'acquisition ont servi de groupes « repères » sans injection i.c.v. présentant respectivement de bonnes ou de mauvaises performances. En effet, les travaux précédents ont montré que les souris intactes montrent de bonnes performances après un délai de 3 h, mais pas après un délai de 24 h. Etant donné que nous espérions des effets promnésiants du sAPP, les performances des deux groupes traités (« NaCl - 24h » et « sAPP - 24h ») ont été évaluées au délai de rétention de 24 h. Il est important de noter que les souris de ces deux groupes ayant reçu une injection i.c.v.

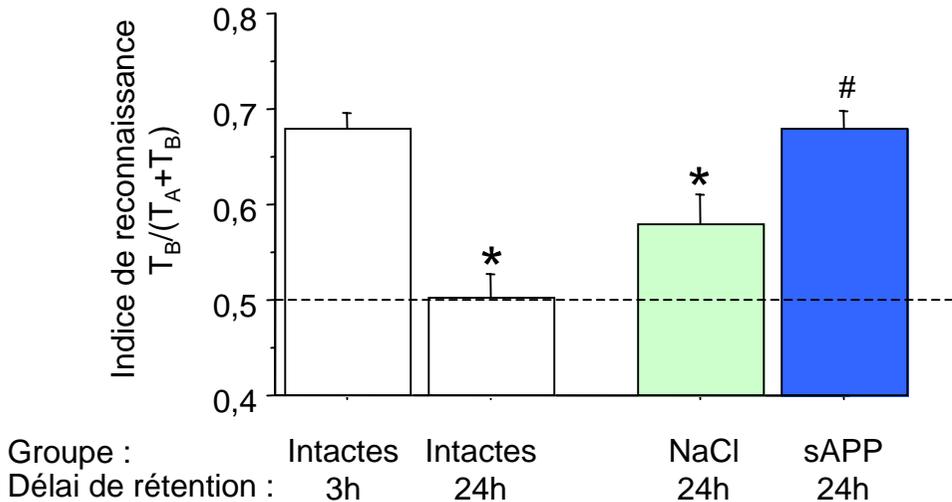


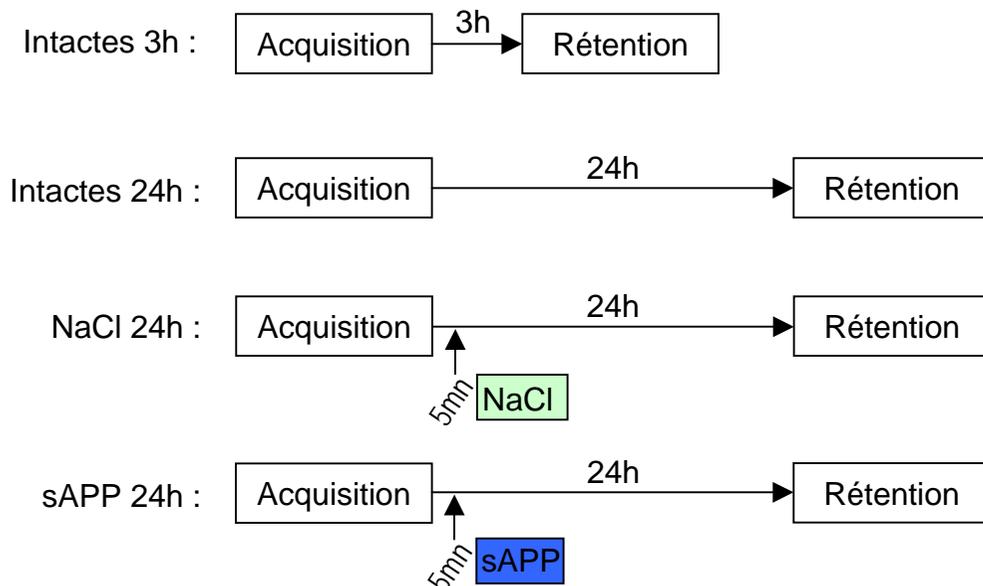
Figure 24 : Effets d'une injection post-apprentissage de sAPP₆₉₅ sur les performances de reconnaissance d'objet

L'indice de reconnaissance d'objet des différents groupes (voir schéma ci-dessous) est exprimé en moyenne + erreur-type.

Les souris intactes montrent de bonnes performances après un délai de 3h mais plus après 24h. Les souris traitées avec 5 pg de sAPP 5 mn après la séance d'acquisition montrent de très bonnes performances, significativement meilleures que celles des souris témoins traitées avec du NaCl. On peut remarquer que les souris traitées avec du NaCl montrent une amélioration modérée de leurs performances après un délai de 24 h.

* = Différent du groupe « Intactes – 3h » à $p < 0,05$

= Différent du groupe « NaCl – 24h » à $p < 0,05$



n'ont été sous l'influence du traitement (NaCl ou sAPP) que dans la période suivant l'acquisition de la tâche et jamais durant la séance d'acquisition.

2. Résultats

Lors de la séance d'acquisition, les quatre futurs groupes de souris ont exploré l'objet A de la même façon ($F(3,32) = 0,39$; $p = 0,762$) et n'ont pas exprimé de préférence marquée pour un objet ($objet : F(1,32) = 2,26$; $p = 0,142$; $objet \times groupe : F(3,32) = 0,13$; $p = 0,942$).

Lors de la séance de rétention (voir **figure 24**), l'indice de reconnaissance a varié selon le groupe de souris considéré ($F(3,32) = 15,79$; $p < 0,0001$). En accord avec les études précédentes, les souris intactes ont montré d'excellentes performances après un délai de 3 h, mais pas après un délai de 24 h (*test de Student-Newman-Keuls* : « intactes – 3h » vs « intactes – 24h » : $p < 0,01$). Les souris du groupe « NaCl – 24 h » ont montré de mauvaises performances (*test de Student-Newman-Keuls* : « intactes – 3 h » vs « NaCl – 24 h » : $p < 0,01$). Par contre, les souris du groupe « sAPP – 24h » ont montré d'excellentes performances, d'un niveau identique à celui des souris intactes testées après un délai de 3 h (*test de Student-Newman-Keuls* : « sAPP – 24 h » vs « intactes – 3 h » : NS ; « sAPP – 24h » vs « NaCl – 24h » : $p < 0,01$).

On peut remarquer que les souris ayant reçu une injection i.c.v. post-apprentissage de NaCl ont montré une amélioration modérée de leurs performances au délai de 24 h, par rapport aux souris n'ayant subi aucune injection (*test de Student-Newman-Keuls* : « intactes – 24h » vs « NaCl – 24h » : $p < 0,05$). Enfin, on peut encore remarquer que l'indice de reconnaissance a varié selon la nature de l'objet utilisé lors de la séance d'acquisition ($objet : F(1,32) = 8,82$; $p = 0,006$), mais cet effet était équivalent pour tous les groupes ($objet \times groupe : F(3,32) = 0,99$; $p = 0,411$).

3. Conclusion

L'administration de sAPP 5 mn après la séance d'acquisition a permis de restaurer les performances de rétention au délai de 24 h au niveau de celles de souris testées au délai de 3 h. L'injection post-apprentissage de sAPP₆₉₅ induit donc des effets comparables à ceux obtenus par Meziane et collaborateurs (1998) avec une injection effectuée 20 mn avant la séance d'acquisition. Dans cette expérience, le sAPP₆₉₅ n'a pas pu agir sur les processus

d'acquisition de l'information, puisqu'il était administré 5 mn après la séance d'acquisition. Ces résultats sont donc en accord avec l'hypothèse d'une action des sAPP sur les processus de consolidation mnésique.

Cette expérience nous permet également de noter que la procédure d'injection i.c.v. peut induire par elle-même un effet. Cette injection peut avoir une influence sur la performance des souris lorsqu'elle est effectuée après l'apprentissage, puisque les souris du groupe « NaCl – 24h » ont montré une reconnaissance d'objet faible, mais significative. Cet effet n'avait pas été observé par Meziane et collaborateurs (1998) lorsque l'injection i.c.v. de NaCl avait lieu 20 mn avant l'acquisition de la tâche. On peut supposer que le stress « aigu » engendré par la procédure d'injection i.c.v. a permis aux souris témoins traitées au NaCl de mieux retenir les informations stockées lors de la séance d'acquisition (par exemple, les caractéristiques de l'objet familier).

III. Gradient temporel d'efficacité du sAPP₆₉₅

Puisque les sAPP semblent agir sur les processus de consolidation de l'information, la seconde étape de ce travail visait à déterminer la fenêtre temporelle d'action du sAPP₆₉₅ sur ces processus. Afin d'établir un gradient temporel d'efficacité du sAPP₆₉₅, j'ai injecté la protéine à différents délais après l'acquisition d'une tâche de reconnaissance d'objet, puis j'ai observé les effets de ces injections lors d'une séance de rétention 24 h plus tard. Au délai d'injection de 5 mn après la séance d'acquisition déjà utilisé lors de l'expérience précédente, nous avons ajouté les délais de 1 h, 3 h et 6 h après l'acquisition. En effet, à ces trois délais les souris intactes présentent encore de bonnes performances de reconnaissance (Dodart et coll., 1997 ; voir figure 14).

1. Déroulement de l'expérience

Quatre-vingt-neuf souris mâles OF1 ont été utilisées lors de cette expérience. Toutes les souris ont été opérées pour l'implantation du dispositif d'injection i.c.v., et soumises à une séance d'acquisition de la tâche de reconnaissance d'objet. Les souris ont ensuite été réparties en huit groupes (voir schéma figure 25):

- quatre groupes d'animaux nommés « **NaCl 5mn** » (n = 12), « **NaCl 1h** » (n = 11), « **NaCl 3h** » (n = 12) et « **NaCl 6h** » (n = 11), subissant une injection i.c.v. de NaCl (0,9%) respectivement 5 mn, 1 h, 3 h et 6 h après la séance d'acquisition,

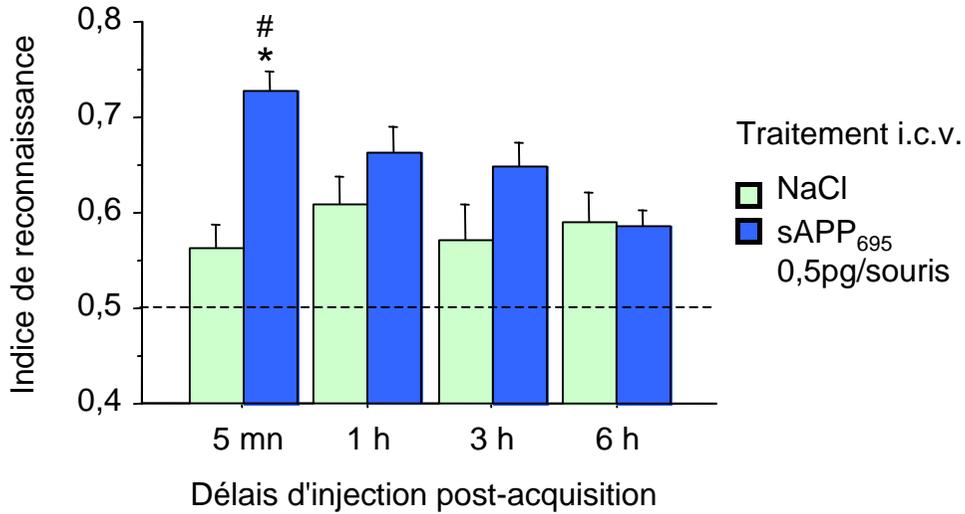


Figure 25 : Effets d'injections de sAPP₆₉₅ effectuées à différents délais post-apprentissage sur les performances de reconnaissance d'objet au délai de rétention de 24h

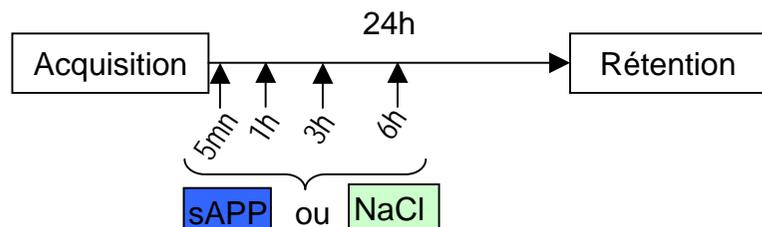
L'indice de reconnaissance d'objet des groupes de souris traitées avec du NaCl ou du sAPP à différents délais (5mn, 1h, 3h ou 6h) après la séance d'acquisition (voir schéma ci-dessous) est exprimé en moyennes + erreur-type.

Les souris traitées avec du NaCl présentent des performances relativement faibles quel que soit le délai d'injection, alors que les souris traitées au sAPP montrent une amélioration des performances de rétention lorsque le sAPP est injecté 5mn après la séance d'acquisition.

* = Différent du groupe NaCl correspondant (au même délai) à $p < 0,05$

= Différent des autres délais (pour le même traitement) à $p < 0,05$

Les groupes diffèrent selon le délai d'injection et le traitement :



- et quatre groupes « **sAPP 5mn** » ($n = 10$), « **sAPP 1h** » ($n = 11$), « **sAPP 3h** » ($n = 11$) et « **sAPP 6h** » ($n = 11$), subissant une injection i.c.v. de sAPP₆₉₅ respectivement 5 mn, 1 h, 3 h et 6 h après la séance d'acquisition.

Toutes ces souris ont été testées 24 h plus tard, lors d'une séance de rétention de 10 mn durant laquelle elles étaient libres d'explorer l'objet familier, présenté à l'acquisition, et un objet nouveau. Comme dans l'expérience précédente, les souris n'ont donc été sous l'influence du traitement que durant la période suivant l'acquisition de la tâche et jamais durant la séance d'acquisition.

2. Résultats

Lors de la séance d'acquisition, les huit futurs groupes de souris ont exploré l'objet A (bille ou dé) de la même façon (*traitement* : $F(1,81) = 1,00$; $p = 0,320$; *délai* : $F(3,81) = 2,43$; $p = 0,071$; *traitement x délai* : $F(3,81) = 0,40$; $p = 0,756$). Les souris ont spontanément davantage exploré la bille lorsque c'est cet objet qui était proposé comme objet A ($F(1,87) = 14,99$; $p = 0,0002$).

Lors de la séance de rétention (**voir figure 25**), l'indice de reconnaissance a été amélioré par l'administration de sAPP (*traitement* : $F(1,81) = 14,17$; $p = 0,0003$; *délai* : $F(3,81) = 1,82$; $p = 0,150$) et ceci, uniquement lorsque le sAPP était injecté 5 minutes après la séance d'acquisition (*traitement x délai* : $F(3,81) = 3,20$; $p = 0,028$). En effet, le groupe « sAPP 5mn » a présenté un indice de reconnaissance significativement plus élevé que tous les autres groupes traités avec du sAPP (*test de Student-Newman-Keuls* : vs « sAPP 1h » : $p < 0,05$; vs « sAPP 3h » : $p < 0,05$ et vs « sAPP 6h » : $p < 0,01$). De même, lorsque les effets des deux traitements (NaCl vs sAPP) ont été comparés pour un délai donné, seuls les groupes traités au délai de 5 mn après l'acquisition sont significativement différents (*traitement : délai de 5 mn* : $F(1,20) = 27,19$; $p < 0,0001$; *autres délais* : $F(1, 20 \text{ à } 21) \leq 2,82$; $p \geq 0,108$).

La valeur de l'indice de reconnaissance a été affectée par la nature de l'objet A ($F(1,73) = 21,54$; $p < 0,0001$). Cet effet est indépendant du délai d'injection (*objet x délai* : $F(3,73) = 1,37$; $p = 0,259$), mais dépend du traitement (*objet x traitement* : $F(1,73) = 4,69$; $p = 0,034$). En effet, chez les animaux témoins traités avec du NaCl, l'effet de l'objet présenté est indépendant du délai d'injection (*objet* : $F(1,38) = 20,71$; $p < 0,0001$; *délai* : $F(3,38) = 0,59$; $p = 0,625$; *objet x délai* : $F(3,38) = 0,95$; $p = 0,426$), alors que chez les animaux traités avec du sAPP l'effet de l'objet tend à disparaître ($F(1,35) = 3,58$; $p = 0,067$) et

n'altère pas le déroulement temporel des effets du sAPP en fonction du délai d'injection (*délai* : $F(3,35) = 6,52$; $p = 0,001$; *objet x délai* : $F(3,35) = 0,91$; $p = 0,444$).

On peut noter que tous les groupes de souris, excepté le groupe « NaCl 3h », ont présenté un indice de reconnaissance significativement différent du hasard (*t de Student* : $p = 0,094$ pour le groupe « NaCl 3h » ; $p \leq 0,022$ pour les 7 autres groupes).

3. Conclusion

Cette expérience visait à établir le gradient temporel d'efficacité du sAPP₆₉₅ injecté en post-acquisition dans la tâche de reconnaissance d'objet. Les souris traitées avec une injection de sAPP 5 mn après la séance d'acquisition ont présenté de bonnes performances de reconnaissance d'objet, comparé aux souris témoins (traitées avec du NaCl). Aux trois délais d'injection suivants (1 h, 3 h et 6 h) l'indice de reconnaissance décroît progressivement et devient comparable à celui présenté par les animaux témoins. Puisque les effets promnésiants du sAPP ne s'expriment que lorsqu'il est injecté 5 mn après la séance d'acquisition de la tâche, mais pas 1 h, 3h ni 6h après, il semble que le sAPP agisse sur des phénomènes précoces de consolidation de la trace mnésique.

Comme dans l'expérience précédente, les souris ayant reçu une injection de NaCl par voie i.c.v. présentent des performances faibles, mais significativement différentes du hasard. Ceci souligne à nouveau l'importance de prendre en compte l'influence des procédures d'injection dans la conception des protocoles expérimentaux.

IV. Effets du sAPP₆₉₅ sur une forme de mémoire spatiale

Les sAPP ont induit une amélioration sensible des performances dans plusieurs tâches de mémoire (apprentissage opérant, discrimination visuelle, reconnaissance d'objet) mais n'avaient jamais été testés dans une tâche impliquant une forme de mémoire spatiale. Les patients atteints par la maladie d'Alzheimer montrent en effet très tôt des troubles de désorientation spatiale. J'ai donc choisi de poursuivre l'étude des effets du sAPP₆₉₅ en évaluant leurs effets dans la tâche de reconnaissance spatiale, mise au point au laboratoire. Les conditions nécessaires à sa réalisation étaient très similaires à la tâche de reconnaissance d'objet et cette tâche est de courte durée (1 séance d'acquisition, 1 séance de rétention) contrairement à la plupart des autres tâches de mémoire spatiale telles que celles du labyrinthe radial et de la piscine de Morris qui nécessitent un apprentissage beaucoup plus long. Cette

tâche est donc idéale pour pouvoir réaliser des expériences de pharmacologie, et j'envisageais également de l'utiliser ultérieurement pour effectuer une « cartographie » cérébrale de l'APP membranaire par immunohistochimie (voir introduction du premier chapitre).

J'ai choisi de tester dans cette tâche les deux délais d'injection du sAPP qui avaient été efficaces dans la tâche de reconnaissance d'objet, à savoir 20 mn avant ou 5 mn après la séance d'acquisition, pour une dose de sAPP₆₉₅ de 0,5 pg / souris.

1. Déroulement de l'expérience

Cinquante-cinq souris mâles OF1 ont été utilisées lors de cette expérience. Quarante-trois souris ont été opérées pour l'implantation du dispositif d'injection i.c.v., puis réparties en 4 groupes :

- un groupe « **NaCl, -20mn** » (n = 11) et un groupe « **sAPP, -20mn** » (n = 11) ayant respectivement reçu une injection i.c.v. de 4 µL de NaCl ou une injection i.c.v. de 4 µL de sAPP₆₉₅ (0,5 pg / souris), 20 mn avant la séance d'acquisition de la tâche de reconnaissance spatiale,
- un groupe « **NaCl, +5mn** » (n = 11) et un groupe « **sAPP, +5mn** » (n = 10) ayant respectivement reçu une injection i.c.v. de 4 µL de NaCl ou une injection i.c.v. de 4 µL de sAPP₆₉₅ (0,5 pg / souris), 5 mn après la séance d'acquisition de la tâche de reconnaissance spatiale.

Les 12 souris restantes ont été laissées intactes et ont formé le groupe « **souris intactes** ». Ce dernier groupe permet d'évaluer les éventuels effets de la procédure d'injection i.c.v. sur les performances de reconnaissance spatiale des souris, en comparant les performances de ce groupe avec celles des deux groupes de souris traitées au NaCl.

Toutes les souris ont été soumises à la tâche de reconnaissance spatiale comprenant une séance d'acquisition de 15 mn et, 24 h plus tard, une séance de rétention de 10 mn. Durant ces deux séances, les souris sont libres d'explorer 5 objets différents. La configuration spatiale des 5 objets est modifiée entre la séance d'acquisition et la séance de rétention par le déplacement de 2 objets parmi les 5. La performance est évaluée en comparant l'exploration des objets « déplacés » à celle des objets « non déplacés » lors de la séance de rétention.

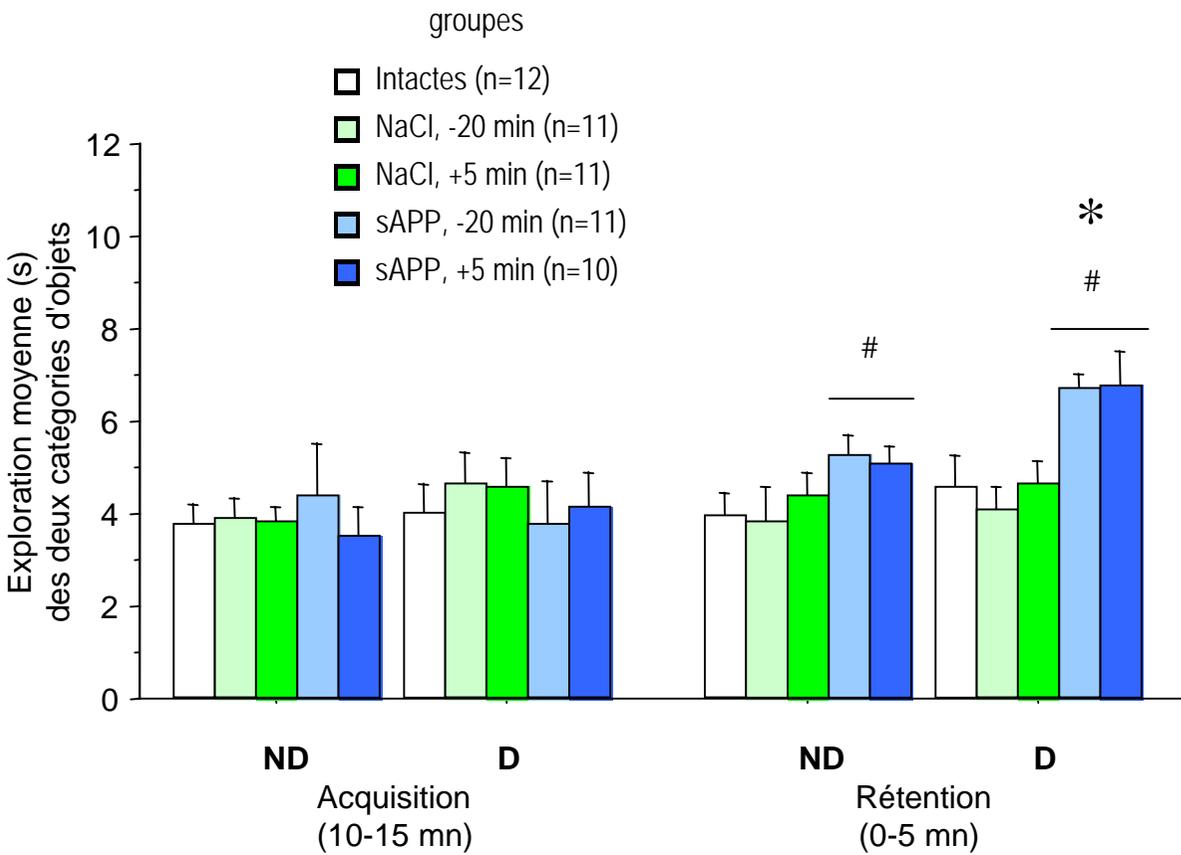


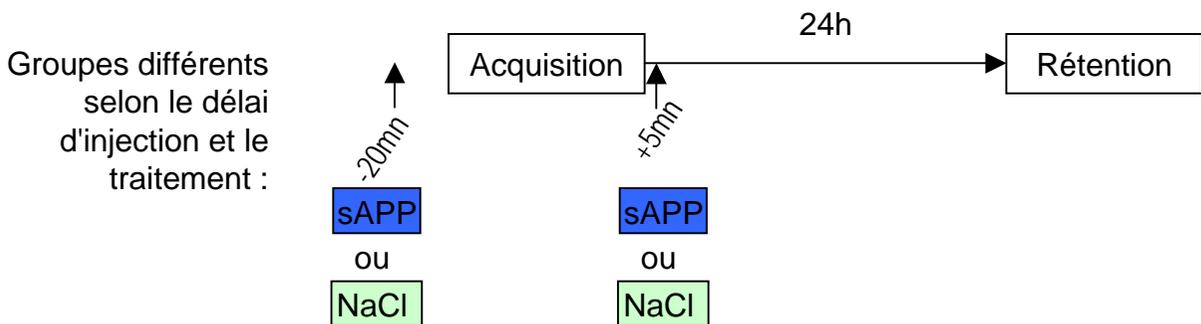
Figure 26 : Effets d'injections i.c.v. de sAPP₆₉₅ sur les performances de reconnaissance spatiale au délai de rétention de 24h

Cette figure indique l'exploration (moyenne + erreur-type) des objets déplacés (D) et non déplacés (ND) lors des séances d'acquisition et de rétention par des souris intactes ou des souris traitées avec du NaCl ou avec du sAPP (0,5pg/souris). Les traitements sont injectés 20 mn avant ou 5 mn après la séance d'acquisition.

Contrairement aux autres groupes, les souris traitées avec du sAPP montrent de bonnes performances de reconnaissance spatiale lors de la séance de rétention (en explorant davantage les objets D par rapport aux objets ND).

* = Différent des objets non déplacés (ND) à $p < 0,05$

= Différent des 2 groupes traités avec du NaCl et du groupe de souris intactes à $p < 0,05$



2. Résultats

Lors de la séance d'acquisition de 15 mn, tous les groupes de souris ont exploré les deux catégories d'objets de la même façon (*catégorie d'objet* : $F(1,51) = 3,19$; $p = 0,080$; *groupe* : $F(4,51) = 1,29$; $p = 0,288$; *interaction groupe x catégorie d'objet* : $F(4,51) = 1,41$; $p = 0,244$). La quantité d'exploration des deux catégories d'objets par les souris a diminué au cours des trois périodes de 5 mn ($F(2,102) = 60,64$; $p < 0,0001$).

Comme décrit dans la partie « Matériels et Méthodes », les performances de reconnaissance spatiale des souris OF1 ont été analysées sur les 5 premières minutes de la séance de rétention.

Lors des 5 premières minutes de la séance de rétention, les souris des groupes « NaCl, -20mn », « NaCl, +5mn » et « intactes » ont montré des comportements exploratoires semblables (*groupe* : $F(2,31) = 0,33$; $p = 0,722$) et ont exploré de la même façon les deux catégories d'objets (*catégorie d'objet* : $F(1,31) = 1,27$; $p = 0,268$; *catégorie d'objet x groupe* : $F(2,31) = 0,18$; $p = 0,833$). Pour ces raisons, nous avons ensuite analysé les résultats avec une ANOVA à deux facteurs (traitement et délai d'injection). Ainsi, les différents groupes de souris ayant reçu une injection i.c.v. n'ont pas exploré les deux catégories d'objets de la même façon (*catégorie d'objet* : $F(1,40) = 9,19$; $p = 0,004$; *traitement* : $F(1,40) = 15,43$; $p = 0,0003$; *interaction catégorie d'objet x traitement* : $F(1,40) = 5,01$; $p = 0,031$), néanmoins le moment d'injection du traitement n'a pas eu d'incidence sur la performance (*délai d'injection* : $F(1,40) = 0,36$; $p = 0,551$). Comme indiqué sur la **figure 26**, seuls les deux groupes de souris traitées avec du sAPP ont préférentiellement exploré les objets déplacés après le changement de configuration spatiale, alors que les souris traitées au NaCl n'ont montré aucune préférence pour une catégorie d'objets. Durant les 5 dernières minutes de la séance de rétention, tous les groupes de souris ont exploré les deux catégories d'objets de la même façon (pas d'effet de la catégorie d'objet, ni d'interaction avec aucun autre facteur).

Lorsque les périodes de fin d'acquisition (5 dernières mn) et de début de rétention (5 premières mn) sont comparées, on remarque que les souris traitées au sAPP montrent une augmentation importante de l'exploration des objets déplacés lors de la séance de rétention (*effet de la séance pour les objets déplacés* : $F(1,21) = 12,15$; $p = 0,002$), accompagnée d'une augmentation modérée et non significative de l'exploration des objets non déplacés

(*effet de la période pour les objets non déplacés : $F(1,21) = 3,42 ; p = 0,078$*). A la différence des souris traitées au sAPP, les souris témoins traitées avec du NaCl ne montrent aucun changement dans l'exploration des deux catégories d'objets entre la fin de l'acquisition et le début de la rétention (*effet de la séance pour les objets déplacés : $F(1,21) = 0,17 ; p = 0,686 ;$ et pour les objets non déplacés : $F(1,21) = 0,23 ; p = 0,640$*). Ainsi, au début de la séance de rétention, les souris traitées avec du sAPP ont montré un petit regain d'exploration des objets non déplacés contrairement aux souris témoins traitées avec du NaCl (*effet du traitement durant les 5 premières minutes de la rétention pour les objets non déplacés : $F(1,42) = 4,33 ; p = 0,044$*).

3. Conclusion

Cette expérience visait à évaluer les effets du sAPP₆₉₅ sur les performances des souris dans une tâche impliquant une forme de mémoire spatiale. Les souris traitées avec du sAPP ont clairement exprimé une préférence pour les objets déplacés après un délai de 24 h, alors que les souris témoins traitées avec du NaCl, ou les souris intactes, ne semblent plus détecter le changement de configuration des objets à ce délai. Cette amélioration des performances de reconnaissance spatiale est valable quel que soit le délai d'injection du sAPP, 20 mn avant ou 5 mn après la séance d'acquisition. Ceci confirme une fois encore que les effets promnésiants du sAPP ne sont pas dus à une action sur les processus d'acquisition de l'information, mais plutôt sur les processus de consolidation / maturation de la trace mnésique.

Dans les précédentes expériences de mise au point de la tâche de reconnaissance spatiale, les souris mâles OF1 avaient sélectivement réexploré les objets déplacés lors de la séance de rétention. Lors de cette expérience, les souris traitées avec du sAPP ont également modérément réexploré les objets non déplacés, en dehors de leur nette préférence pour les objets déplacés. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que dans cette dernière expérience, la séance de rétention s'effectue après un délai de 24 h. En effet, l'augmentation globale du comportement exploratoire des souris après ce « long » délai pourrait résulter de la détection du changement spatial (permise par le sAPP). Ce comportement de réexploration, déjà décrit par d'autres auteurs, pourrait permettre aux animaux de réactualiser une « ancienne » représentation spatiale (Poucet, 1993) en modifiant les informations concernant la nature (« *what* ») et la position (« *where* ») des objets.

4. Mémoire de la configuration spatiale ou simple mémoire des objets ?

Les trois premières expériences de ce chapitre ont montré 1) que le sAPP₆₉₅ est capable de favoriser la mémoire d'un objet après un délai de 24 h, et 2) que le sAPP favorise la mémoire d'une configuration spatiale d'objets à ce même délai de 24h après la séance d'acquisition. On peut se demander si l'effet promnésiant du sAPP dans la tâche de reconnaissance spatiale ne serait pas simplement dû au fait que les souris traitées se souviennent simplement mieux des objets. En effet, une telle hypothèse n'est pas en désaccord avec les résultats obtenus : si les souris témoins ne se souviennent plus des caractéristiques des objets au délai de 24 h après l'acquisition, elles seront incapables de détecter le changement de configuration des objets, alors que les souris traitées au sAPP en seront capables puisqu'elles se souviendront encore des objets.

a. Expérience de vérification

Pour répondre à cette question, une courte expérience a donc été réalisée afin de vérifier si les souris étaient capables d'avoir de bonnes performances de reconnaissance d'objet 24 h après une séance d'acquisition de type reconnaissance spatiale (RS), c'est-à-dire avec une séance d'acquisition de 15 mn avec 5 objets différents. En effet, dans le protocole habituel de reconnaissance d'objet, les souris montraient de mauvaises performances 24 h après une séance d'acquisition de seulement 10 mn avec un seul objet. Par conséquent, si des souris intactes sont capables de faire de la reconnaissance d'objet (RO) 24h après cette acquisition « longue » (15 mn, 5 objets), alors on pourra dire que l'effet du sAPP est vraiment lié à une amélioration des performances de reconnaissance de la configuration spatiale formée par les objets et pas (seulement) la reconnaissance des objets eux-mêmes.

Dans cette expérience, 20 souris mâles OF1 intactes ont été soumises à une séance d'acquisition de la tâche de reconnaissance spatiale (15 mn en présence d'une configuration de 5 objets). Vingt-quatre heures après cette séance d'acquisition, deux groupes de souris ont été formés (n = 10 pour chaque groupe) et ont subi une séance de rétention de 10 mn. Les souris du groupe « **RS** » ont subi une séance de rétention classique de la tâche de reconnaissance spatiale : 2 objets sur les 5 ont été déplacés, afin que ces 5 objets familiers (déjà vus à l'acquisition) forment une nouvelle configuration spatiale. Les souris du groupe « **RO** » ont, quant à elles, subi une séance de rétention de type « reconnaissance d'objet », puisque 2 objets parmi les 5 familiers (déjà vus à l'acquisition) ont été remplacés

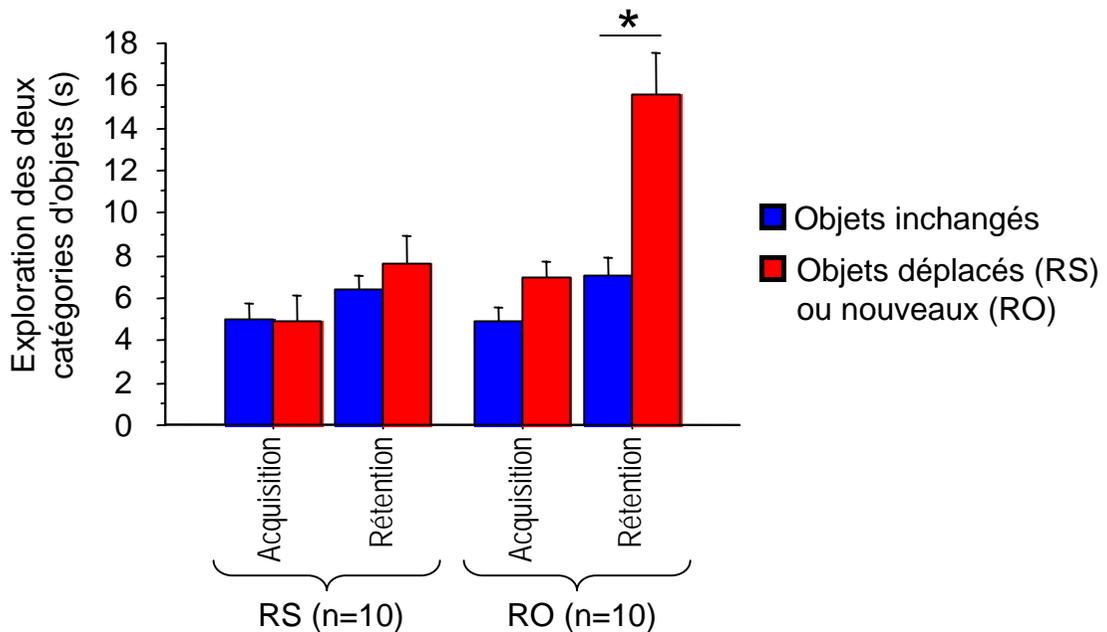


Figure 27 : Performances de reconnaissance spatiale (RS) ou de reconnaissance d'objet (RO), 24h après une séance d'acquisition de 15 mn avec 5 objets différents

L'exploration des différentes catégories d'objets est indiquée en moyennes + erreur-type. Pour la séance de rétention, 2 objets parmi les 5 sont déplacés pour le groupe "RS", et 2 objets parmi les 5 sont remplacés par de nouveaux objets pour le groupe "RO". Lors de la séance de rétention, les souris du groupe "RO" montrent de bonnes performances de reconnaissance d'objet (explorent davantage les objets nouveaux) alors que les souris du groupe "RS" ne montrent aucune reconnaissance spatiale (explorent les objets déplacés et les objets non déplacés de la même façon).

* = Différent des objets inchangés à $p < 0,05$

par 2 objets nouveaux. Ainsi, durant la séance de rétention, les souris du groupe « RS » explorent une configuration spatiale modifiée par le déplacement de 2 objets familiers sur 5, alors que les souris du groupe « RO » explorent une configuration spatiale identique constituée de 2 objets nouveaux et de 3 objets familiers. Le facteur « catégorie d'objet » utilisé dans l'analyse des résultats sera donc défini par le caractère « déplacé » vs « non déplacé » des objets pour le groupe « RS », et le caractère « nouveau » vs « familier » des objets pour le groupe « RO ».

b. Résultats

Durant la séance d'acquisition de 15 mn, les souris des groupes « RS » et « RO » ont exploré de la même façon les deux catégories d'objets (*catégorie d'objet* : $F(1,18) = 0,02$; $p = 0,900$; *pas d'interaction avec d'autres facteurs*).

Comme l'indique la **figure 27**, seul le groupe « RO » a préféré une catégorie d'objet à l'autre durant les 5 premières mn de la séance de rétention (*groupe* : $F(1,18) = 9,99$; $p = 0,005$; *catégorie d'objet* : $F(1,18) = 16,93$; $p = 0,0007$; *catégorie d'objet x groupe* : $F(1,18) = 9,35$; $p = 0,007$). Les souris du groupe « RO » ont exploré préférentiellement les objets nouveaux par rapport aux objets familiers ($F(1,9) = 17,91$; $p = 0,002$), alors que les souris du groupe « RS » ont exploré de la même façon les objets déplacés et non déplacés ($F(1,9) = 0,99$; $p = 0,346$).

c. Conclusion

Dans ce protocole de la tâche de reconnaissance spatiale, utilisant une acquisition longue de 15 mn avec 5 objets, les souris sont naturellement capables de montrer de bonnes performances de reconnaissance d'objet même après un délai de 24 h. Par contre, à ce même délai de 24 h, leurs performances de reconnaissance spatiale sont mauvaises. Les conditions expérimentales utilisées dans la tâche de reconnaissance spatiale permet donc de dissocier les performances sur deux types de mémoire : celle des objets eux-mêmes et celle de leur localisation.

Nous pouvons conclure de ces résultats que, dans l'expérience précédente visant à tester les effets du sAPP sur la reconnaissance spatiale, toutes les souris étaient vraisemblablement capables de reconnaître correctement les objets lors de la séance de rétention (également 24 h après l'acquisition). Les bonnes performances de reconnaissance

spatiale des souris traitées au sAPP₆₉₅ ne peuvent donc pas être uniquement liées à une amélioration des performances de reconnaissance d'objet par le sAPP. Ainsi, le sAPP présente donc bien une action sur les processus de traitement de l'information concernant la configuration spatiale des objets.

V. Implication des sAPP dans un apprentissage opérant en boîte de Skinner

1. Effet du sAPP sur des déficits induits par la scopolamine

Les problèmes apparus dans les tâches de reconnaissance (décrits dans le premier chapitre) m'ont poussée à rechercher une autre tâche de mémoire me permettant de poursuivre mon travail de thèse. Une autre tâche dans laquelle le sAPP avait montré des effets promnésiants était la tâche d'apprentissage opérant en boîte de Skinner. Cette tâche est caractérisée par une augmentation spontanée des performances de rétention entre 6 h et 24 h après la séance d'acquisition. Ainsi, en administrant une substance amnésiante juste après la séance d'acquisition (par exemple, par l'administration de scopolamine), on supprime cette amélioration spontanée des performances (Messier et coll., 1990). Il est alors possible de tenter de restaurer le phénomène d'amélioration spontanée des performances par l'administration d'un promnésiant. Les travaux de Meziane et collaborateurs ont ainsi montré que le sAPP (isoforme 751) pouvait bloquer les déficits de mémoire induits par la scopolamine dans ce test d'apprentissage opérant chez la souris OF1. L'expérience présentée ci-après visait à vérifier si la forme 695 du sAPP était aussi capable de bloquer les déficits induits par la scopolamine dans cette même tâche.

a. Déroulement de l'expérience

Quatre-vingt souris mâles OF1 en restriction alimentaire ont été soumises à une séance d'acquisition partielle d'un apprentissage opérant. Trois minutes après la fin de la séance d'acquisition, différents traitements ont été administrés à trois groupes de souris :

- un groupe « **NaCl-NaCl** » a reçu une injection sous-cutanée de 0,4 mL de NaCl et une injection i.c.v. de 4 µL de solution de NaCl,
- un groupe « **NaCl-scop** » a reçu une injection sous-cutanée de 0,4 mL de scopolamine à 3 mg.kg⁻¹ et une injection i.c.v. de 4 µL de solution de NaCl,

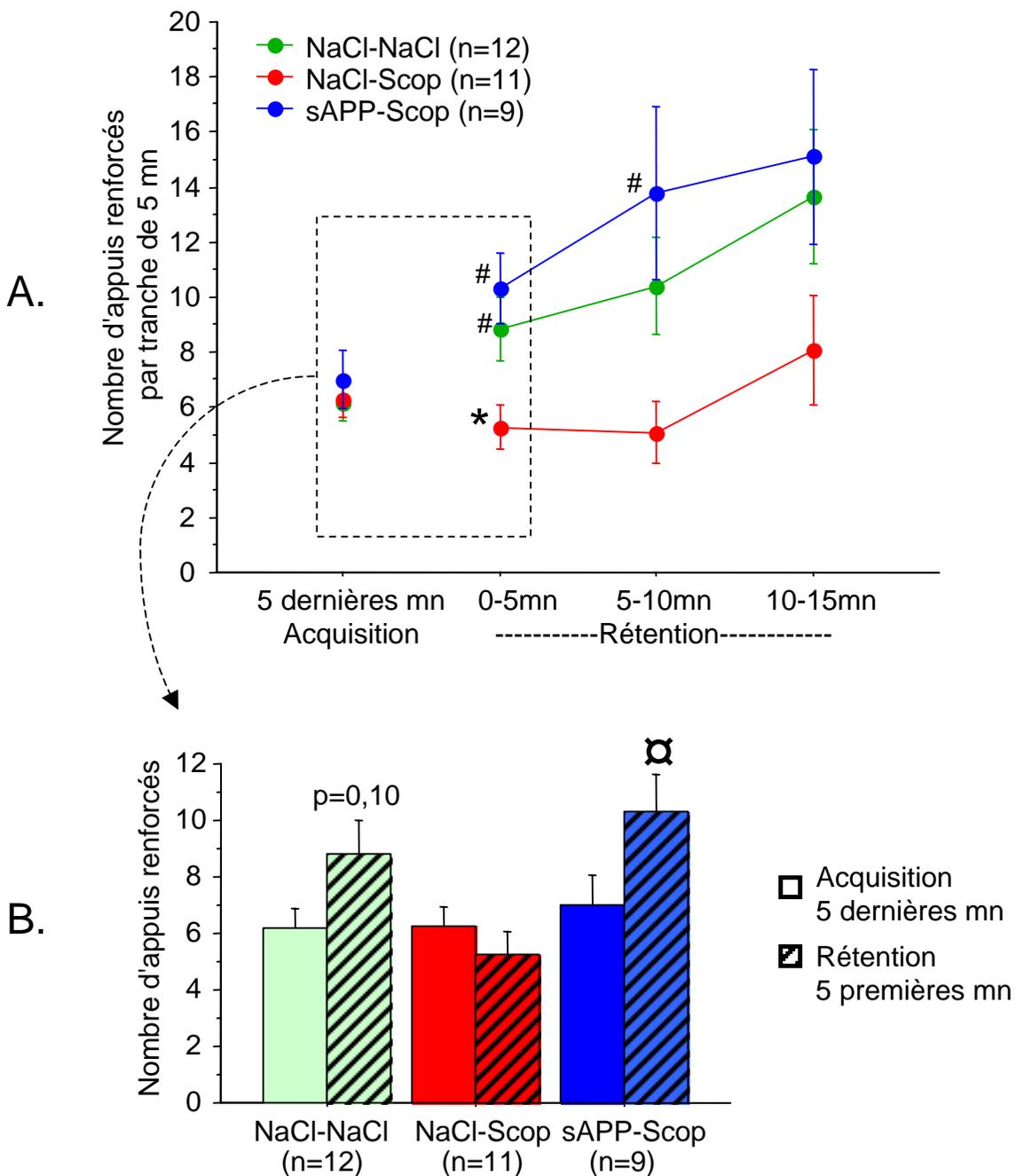


Figure 28 : Effets du sAPP₆₉₅ sur les déficits induits par la scopolamine dans la tâche d'apprentissage opérant

Les performances sont exprimées en terme de nombre d'appuis renforcés (moyenne + erreur-type) par période de 5 mn.

A. Lors de la séance de rétention, le groupe traité avec la scopolamine ("NaCl-Scop") a montré de mauvaises performances comparé au groupe témoin ("NaCl-NaCl"). Le traitement avec du sAPP a permis de retrouver de bonnes performances ("sAPP-Scop").

* = Différent du groupe "NaCl-NaCl" à $p < 0,05$

= Différent du groupe "NaCl-Scop" à $p < 0,05$

B. Entre les séances d'acquisition et de rétention, seul le groupe "NaCl-Scop" n'a montré aucune amélioration spontanée des performances.

α = Différent de la séance d'acquisition ($p < 0,05$)

- un groupe « **sAPP-scop** » a reçu une injection sous-cutanée de 0,4 mL de scopolamine à 3 mg.kg⁻¹ et une injection i.c.v. de sAPP à 5 pg / 4 µL / souris.

Les performances des souris de ces trois groupes ont été évaluées 24 h plus tard au cours d'une séance de rétention de 15 mn. La performance est évaluée en comparant les nombres d'appuis renforcés effectués pendant les 5 dernières mn de la phase d'acquisition et les 5 premières mn de la phase de rétention. Il est important de noter que les souris n'ont donc pas été sous l'influence du traitement pendant la séance d'acquisition de la tâche, mais dans les minutes qui suivent.

b. Résultats

Vingt souris ont été exclues de l'expérience suite à une acquisition ($n = 6$) ou une injection i.c.v. ($n = 3$) non satisfaisante, ou encore une mauvaise implantation de la canule ($n = 11$). De nombreuses souris ont présenté un mauvais état de santé général lors de la séance de rétention (3 souris « NaCl-NaCl », 8 souris « sAPP-scop » et 13 souris « NaCl-scop »), et 3 souris « NaCl-scop » sont mortes dans les 24 h précédant la séance de rétention. On peut noter la prépondérance du mauvais état général chez les souris traitées avec la scopolamine. Enfin, une souris du groupe « NaCl-scop » a montré un comportement d'immobilité (*freezing behaviour*) atypique durant la séance de rétention et a également été exclue des analyses statistiques. Les analyses ont donc porté sur des groupes d'effectif : $n = 12$ pour le groupe « NaCl-NaCl », $n = 11$ pour le groupe « NaCl-scop » et $n = 9$ pour le groupe « sAPP-scop ».

La **partie A de la figure 28** indique les performances obtenues par les différents groupes en terme de nombre d'appuis renforcés pendant les 5 dernières minutes de l'acquisition et lors des 15 minutes de la rétention. La **partie B de la figure 28** illustre plus précisément l'amélioration des performances entre les séances d'acquisition et de rétention en reprenant une partie des données indiquées sur la partie A.

Lors de la séance d'acquisition, les souris n'avaient encore reçu aucun traitement, puisque les injections n'ont été effectuées que 3 mn après la séance d'acquisition. Au cours de cette séance, les trois groupes de souris ont mis un temps équivalent (environ 15 mn) pour effectuer les 15 appuis renforcés ($F(2,29) = 1,80 ; p = 0,183$). Lors des 5 dernières minutes de cette séance d'acquisition, les souris des trois groupes expérimentaux ont effectué le même nombre d'alternances entre le côté levier et le côté mangeoire de la boîte de conditionnement, ont présenté un nombre identique d'appuis totaux sur le levier (*alternances* : $F(2,29) = 0,33 ;$

$p = 0,722$; appuis totaux : $F(2,29) = 0,21$; $p = 0,814$; non représentés) et d'appuis renforcés ($F(2,29) = 0,31$; $p = 0,733$; voir **figure 28, A ou B, acquisition**). Les trois groupes de souris ont donc présenté un comportement comparable au cours de la séance d'acquisition.

Lors de la séance de rétention, le comportement des trois groupes de souris a été évalué pendant 15 mn. On peut constater que même si l'ensemble des souris des trois groupes sont capables d'augmenter leur nombre d'appuis renforcés par période de 5 mn au cours des 15 mn de la séance de rétention (*période* : $F(2,58) = 8,75$; $p = 0,0005$), le groupe « NaCl-scop » montre des performances plus faibles que les deux autres groupes (*groupe* : $F(2,29) = 4,22$; $p = 0,025$). Cette différence se maintient sur l'ensemble des 15 mn de la séance de rétention (*période x groupe* : $F(4,58) = 0,61$; $p = 0,657$; voir **figure 28, A, rétention**).

Pendant les 5 premières minutes de la séance de rétention, toutes les souris ont effectué autant d'appuis totaux sur le levier ($F(2,29) = 0,87$; $p = 0,429$), mais le groupe « NaCl-scop » a effectué moins d'alternances et moins d'appuis renforcés que les groupes « NaCl-NaCl » et « sAPP-scop » (*nombre d'alternances* : $F(2,29) = 5,84$; $p = 0,007$; *nombre d'appuis renforcés* : $F(2,29) = 5,61$; $p = 0,009$; *test de Student-Newman-Keuls pour les 2 variables* : « NaCl-scop » vs « NaCl-NaCl » et « NaCl-scop » vs « sAPP-scop » : $p < 0,05$; non représenté).

On évalue l'amélioration spontanée des performances de rétention de chaque groupe en comparant le nombre d'appuis renforcés effectués pendant les 5 dernières minutes de la séance d'acquisition, au nombre d'appuis effectués pendant les 5 premières minutes de la séance de rétention (voir **figure 28, B**). Seul le groupe « NaCl-scop » ne présente aucune amélioration des performances entre les séances d'acquisition et de rétention (*période x groupe* : $F(2,29) = 3,82$; $p = 0,034$; *tendance à une amélioration pour le groupe « NaCl-NaCl »* : $F(1,11) = 3,10$; $p = 0,106$; *amélioration pour le groupe « sAPP-scop »* : $F(1,10) = 13,33$; $p = 0,007$; *pas d'amélioration pour le groupe « NaCl-scop »* : $F(1,10) = 1,49$; $p = 0,251$).

c. Conclusion

Contrairement au groupe témoin « NaCl-NaCl », le groupe des souris traitées avec de la scopolamine (3 mg / kg) trois minutes après la séance d'acquisition n'a pas montré d'amélioration de performance lors de la séance de rétention, 24h plus tard. Ces déficits sont

attribués à un effet perturbateur de la scopolamine sur les processus de consolidation mnésique chez ces souris (Messier et coll., 1990). Par contre, les souris traitées avec de la scopolamine et ayant également reçu du sAPP (5pg / 4µl / souris) ont montré des performances comparables aux souris témoins lors de la séance de rétention. Le sAPP a donc permis de restaurer les performances altérées par l'administration de scopolamine. Cette expérience confirme une action anti-amnésiante de l'isoforme 695 du sAPP dans la tâche d'apprentissage opérant, comme l'ont montré les travaux précédents de Meziane et collaborateurs avec la forme 751. De plus, puisque l'administration des traitements a été effectuée après l'apprentissage, les effets observés sont vraisemblablement le résultat des effets de ces traitements sur les processus de consolidation/maturation de la trace mnésique.

2. Implication des sAPP endogènes dans les processus de consolidation

Puisque les sAPP injectés par voie i.c.v. semblent favoriser les processus de consolidation de la trace mnésique et que les sAPP sont des protéines naturellement présentes dans le cerveau, nous avons formulé l'hypothèse que les sAPP endogènes du cerveau pourraient jouer un rôle dans les processus de formation de la trace mnésique. Grâce à nos collaborateurs des laboratoires E. Lilly à Indianapolis, nous avons pu obtenir une petite quantité d'anticorps spécifiquement dirigés contre les sAPP. En effet, certaines expériences de la littérature montrant une implication de l'APP et de ses dérivés dans les processus mnésiques ont utilisé des anticorps dirigés contre la partie N-terminale de l'APP : ces anticorps fixent à la fois les formes solubles (sAPP α et sAPP β) et les formes membranaires (mAPP) de l'APP. Le rôle spécifique des formes solubles restait donc à explorer. Dans cette expérience, nous avons donc administré des anticorps spécifiquement dirigés contre des formes solubles (sAPP) à des souris CD1 après la séance d'acquisition de l'apprentissage opérant. Ces anticorps, créés chez le Lapin, sont dirigés contre la partie C-terminale du sAPP α et contre la partie C-terminale du sAPP β et ne fixent donc pas l'APP membranaire (mAPP).

a. Vérification des performances des souris CD1

Pour les raisons décrites dans le chapitre précédent, notre équipe a privilégié l'utilisation de souris de la souche CD1. J'ai donc d'abord vérifié que les souris CD1

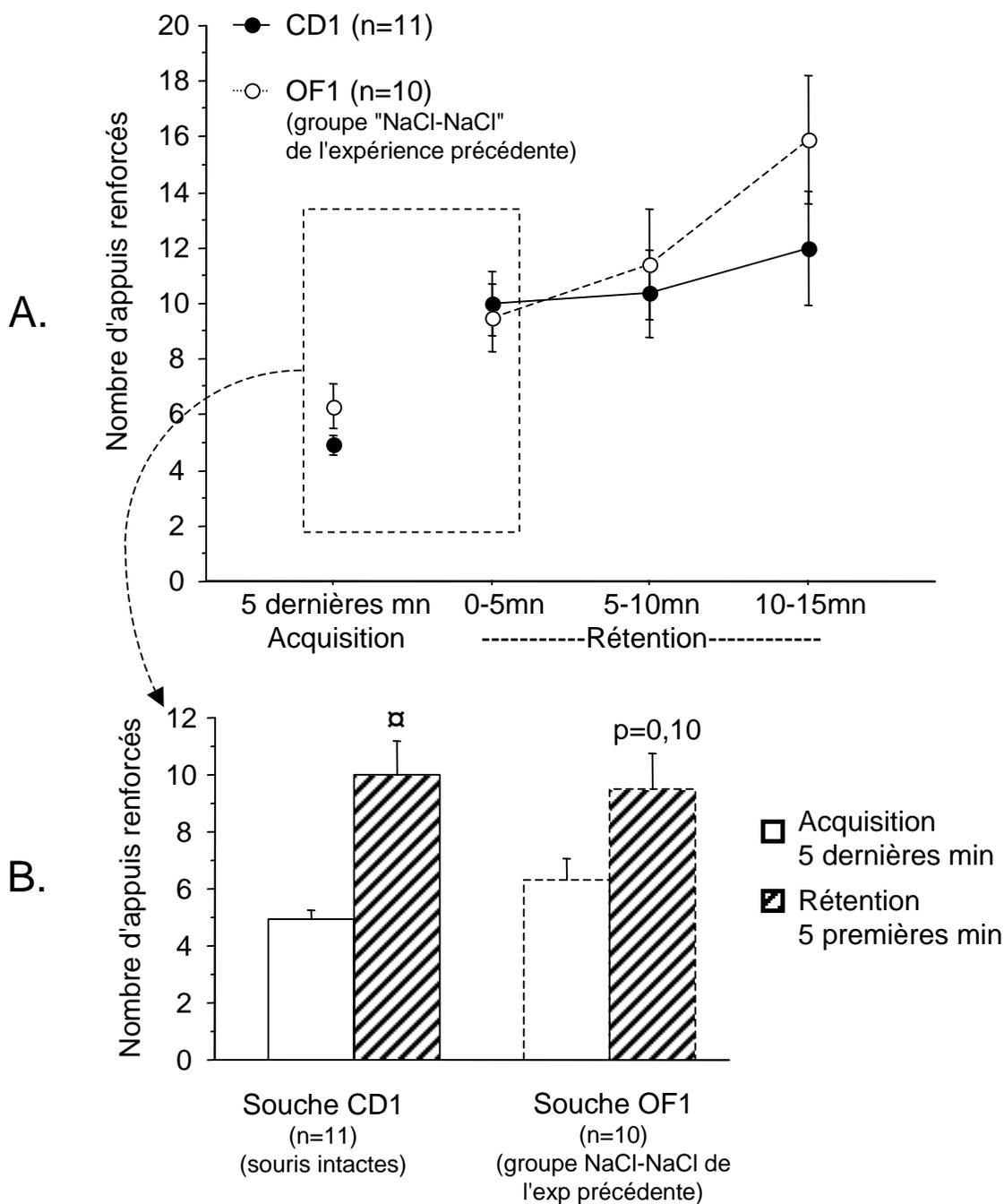


Figure 29 : Performances des souris de souche CD1 dans la tâche d'apprentissage opérant

Les performances sont exprimées en terme de nombre d'appuis renforcés (moyenne + erreur-type) par période de 5 mn.

A. Lors de la séance de rétention, la souche de souris CD1 a montré de bonnes performances, comparables à celles des souris OF1 (le groupe indiqué en pointillés est le groupe "NaCl-NaCl" de l'expérience précédente).

B. Entre les séances d'acquisition et de rétention, les souris de souche CD1 ont montré une amélioration spontanée des performances comparable à celle observée chez les souris OF1 (durant l'expérience précédente).

α = Différent de la séance d'acquisition à $p < 0,05$

pouvaient montrer un niveau de performance équivalent à celui des souris OF1 dans la tâche d'apprentissage opérant.

La **partie A de la figure 29** indique les performances obtenues par un groupe de 11 souris CD1 en terme de nombre d'appuis renforcés pendant les 5 dernières minutes de l'acquisition et pendant les 15 minutes de la rétention. La **partie B de la figure 29** illustre plus précisément l'amélioration des performances entre les séances d'acquisition et de rétention en reprenant une partie des données indiquées sur la partie A. Sur ces deux figures ont été ajoutées, à titre indicatif, les performances du groupe « NaCl-NaCl » de l'expérience précédente, afin d'indiquer, pour comparaison, les performances obtenues par des souris OF1 (en pointillés).

Les souris CD1 ont montré de bonnes performances au délai de 24 h après l'acquisition : l'amélioration spontanée du nombre d'appuis renforcés a été significative entre les 5 dernières minutes de l'acquisition et les 5 premières minutes de la rétention (*période* : $F(1,10) = 18,64$; $p = 0,002$). De plus, ces performances étaient comparables à celles de souris OF1. L'augmentation du nombre d'appuis renforcés par période de 5 mn effectués par les CD1 au cours des 15 mn de la séance de rétention tend à être plus faible que celle montrée auparavant par les souris OF1 et n'atteint pas la significativité (*souris CD1* : *période* : $F(2,20) = 0,84$; $p = 0,446$).

Les souris CD1 montrant une amélioration spontanée des performances de rétention comparable à celle observée chez les souris OF1, j'ai pu évaluer les effets des anticorps sur ces souris CD1.

b. Déroulement de l'expérience

Quatre-vingt-douze souris mâles CD1 en restriction alimentaire ont d'abord été soumises à une séance d'acquisition partielle de l'apprentissage opérant jusqu'à effectuer 15 appuis renforcés. Trois minutes après la fin de la séance d'acquisition, différents traitements ont été administrés par voie i.c.v. à trois groupes de souris :

- un groupe « **IgG** » a reçu une solution d'immunoglobuline G de Lapin,
- un groupe « **anti-sAPP α** » a reçu une solution d'anticorps dirigés contre l'extrémité C-terminale du sAPP α ,
- un groupe « **anti-sAPP β** » a reçu une solution d'anticorps dirigés contre l'extrémité C-terminale du sAPP β .

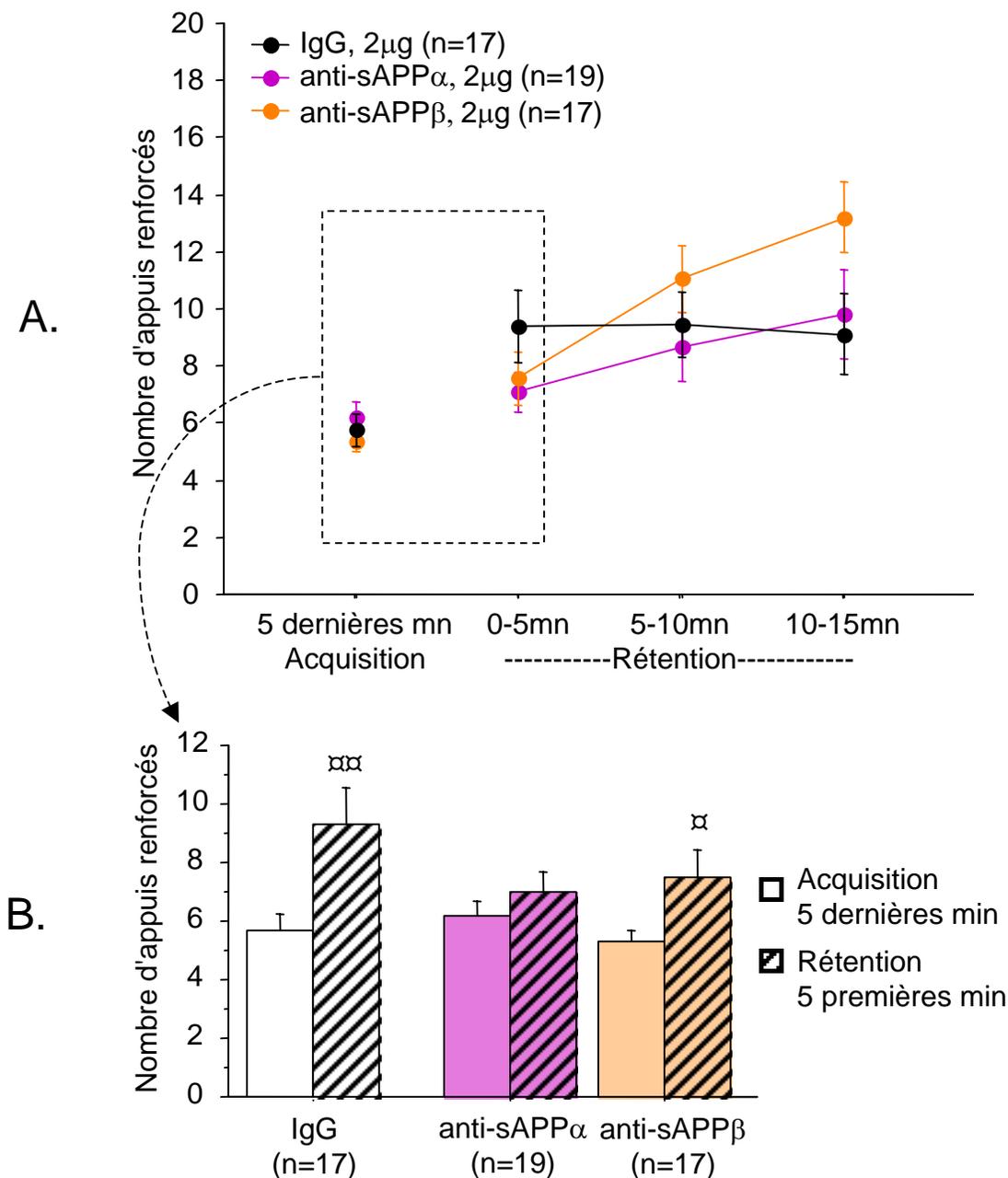


Figure 30 : Effets d'anticorps dirigés contre les sAPP sur les performances d'apprentissage opérant

Les performances sont exprimées en terme de nombre d'appuis renforcés (moyenne + erreur-type) par période de 5 mn.

A. A la différence du groupe témoin "IgG", qui présente un bon niveau de performances et le maintient au cours des 15 mn de la séance de rétention, les deux groupes de souris traitées avec des anticorps anti-sAPP montrent de faibles performances mais sont néanmoins capables de les améliorer au cours des 15 mn de la séance de rétention.

B. Entre les séances d'acquisition et de rétention, seul le groupe "anti-sAPP α " n'a montré aucune amélioration spontanée des performances.

α, αα = Différent de la séance d'acquisition (respectivement, $p < 0,05$ et $p < 0,01$)

Les conseils de nos collaborateurs et quelques essais préliminaires nous ont permis de sélectionner la dose de 2µg / 4µL / souris pour les anticorps anti-sAPP (fabriqués chez le Lapin). Cette dose a également été utilisée pour l'IgG de Lapin. Les performances des souris de ces trois groupes ont été évaluées 24 h plus tard, au cours d'une séance de rétention de 15 mn. Comme dans l'expérience précédente, les souris n'ont été sous l'influence du traitement que pendant la période suivant l'acquisition de la tâche.

c. Résultats

Trente-huit souris ont été exclues de l'expérience suite à une mauvaise acquisition ($n = 17$), une injection i.c.v. non satisfaisante ($n = 1$), ou une mauvaise implantation de la canule ($n = 20$). Une seule souris « IgG » a présenté un mauvais état de santé général lors de la séance de rétention. Les analyses ont donc porté sur des groupes aux effectifs suivants : $n = 17$ pour le groupe « IgG », $n = 19$ pour le groupe « anti-sAPP α » et $n = 17$ pour le groupe « anti-sAPP β ».

La **partie A de la figure 30** indique les performances obtenues par les différents groupes en terme de nombre d'appuis renforcés pendant les 5 dernières minutes de l'acquisition et pendant les 15 minutes de la rétention. La **partie B de la figure 30** illustre plus précisément l'amélioration des performances entre les séances d'acquisition et de rétention en reprenant une partie des données indiquées sur la partie A.

Lors de la séance d'acquisition, les souris n'avaient pas encore reçu leur traitement. Les trois groupes de souris ont mis un temps équivalent (environ 14 mn) pour effectuer les 15 appuis renforcés ($F(2,50) = 0,55 ; p = 0,581$). En fin de séance d'acquisition (voir **figure 30, A, acquisition**), les souris des trois groupes ont effectué le même nombre d'alternances entre le côté levier et le côté mangeoire de la boîte de conditionnement, le même nombre d'appuis totaux sur le levier et également le même nombre d'appuis renforcés ($F(2,50) \leq 0,77 ; p \geq 0,468$). Les trois groupes de souris, encore non traités, ont donc présenté un comportement comparable au cours de la séance d'acquisition.

Lors de la séance de rétention, le comportement des trois groupes de souris a été évalué pendant 15 mn. Pendant les 5 premières minutes de la séance de rétention, les traitements n'ont pas affecté significativement les nombres d'appuis totaux sur le levier, d'alternances et d'appuis renforcés ($F(2,50) \leq 1,53 ; p \geq 0,226 ;$ non représenté). On peut remarquer (voir **figure 30, A, rétention**) que le groupe « IgG » est le seul à ne pas augmenter

le nombre d'appuis renforcés par période de 5 mn au cours des 15 mn de la séance de rétention (*période* : $F(2,100) = 8,94$; $p = 0,0003$; *période x groupe* : $F(4,100) = 3,46$; $p = 0,011$). En effet, lorsque les groupes sont séparés, seul le groupe « anti-sAPP β » montre une augmentation significative du nombre d'appuis renforcés par tranche de 5 mn ($F(2,32) = 11,33$; $p = 0,0002$). Le groupe « anti-sAPP α » n'atteint pas le niveau de significativité ($F(2,36) = 2,76$; $p = 0,077$) et le groupe IgG, quant à lui, ne fait que maintenir son bon niveau de performance au cours de la séance ($F(2,32) = 0,08$; $p = 0,922$). Les souris du groupe « IgG » sont, en effet, celles qui ont effectué le plus grand nombre d'appuis en début de séance. Il est possible que ces animaux soient arrivés plus rapidement à satiété que ceux des autres groupes, ce qui expliquerait l'absence d'augmentation du niveau de performance au cours de la séance de rétention. Ceci est conforté par l'absence de différence entre les 3 groupes en terme de nombre total d'appuis renforcés effectués sur l'ensemble des 15 mn de la séance de rétention (*groupe* : $F(2,50) = 1,08$; $p = 0,348$).

L'amélioration spontanée des performances a été évaluée en comparant le nombre d'appuis renforcés effectués pendant les 5 dernières minutes de la séance d'acquisition à celui effectué pendant les 5 premières minutes de la séance de rétention (voir **figure 30, B**). Les groupes traités aux anticorps « anti-sAPP α » et « anti-sAPP β » semblent avoir des performances plus faibles que celles du groupe témoin « IgG ». L'ANOVA à mesures répétées révèle une amélioration globale des performances entre la fin de l'acquisition et le début de la rétention ($F(1,50) = 16,97$; $p = 0,0001$). Bien que l'interaction période x groupe ne soit pas significative ($F(2,50) = 2,24$; $p = 0,117$), il semble que les performances des 3 groupes n'évoluent pas de la même façon. Lorsqu'on analyse séparément les performances de chaque groupe, on constate que l'amélioration de performance n'est pas significative pour le groupe « anti-sAPP α » (*effet de la période* : $F(1,18) = 1,59$; $p = 0,223$), alors qu'elle l'est pour les deux autres groupes, « anti-sAPP β » et « IgG » (*effet de la période* : respectivement $F(1,16) = 8,58$; $p = 0,010$ et $F(1,16) = 6,63$; $p = 0,020$).

d. Conclusion

Contrairement aux souris des groupes « IgG » et « anti-sAPP β », seules les souris du groupe « anti-sAPP α » n'ont pas montré d'amélioration de performance entre les séances d'acquisition et de rétention. Le blocage des sAPP endogènes et spécifiquement les sAPP α ,

issus de l'activité α -sécrétase, semble donc affecter les processus mnésiques chez ces souris. Ce résultat va dans le sens de l'hypothèse d'un rôle déterminant du sAPP α lors de la mémorisation d'informations. Puisque les anticorps ont été administrés 3 minutes après l'apprentissage, les sAPP α endogènes pourraient intervenir plus particulièrement lors des processus de consolidation de l'information acquise. Malgré le délai de 24 h entre l'injection d'anticorps et la séance de rétention, on ne peut exclure un effet des anticorps sur les processus de rappel de l'information.

VI. Discussion du chapitre

Les travaux présentés dans ce deuxième chapitre visaient 1) à vérifier l'effet promnésiant d'une injection post-apprentissage de sAPP₆₉₅ exogène dans la tâche de reconnaissance d'objet et déterminer le gradient temporel d'efficacité du sAPP₆₉₅ exogène dans cette tâche, puis 2) à évaluer les effets du sAPP₆₉₅ exogène sur une forme de mémoire spatiale en utilisant la tâche de reconnaissance spatiale, et, enfin, 3) à vérifier l'implication des sAPP endogènes dans la formation de la mémoire dans une tâche d'apprentissage opérant en boîte de Skinner.

1. L'action des sAPP sur les performances de mémoire

L'ensemble de mes résultats obtenus dans les tâches de reconnaissance d'objet ou de reconnaissance spatiale et dans un apprentissage opérant en boîte de Skinner confirme les effets promnésiants du sAPP₆₉₅. Cette protéine a amélioré les performances de rétention dans chacune de ces tâches. Ces effets ont été obtenus à des doses de sAPP aussi faibles que celles utilisées dans les précédents travaux de Meziane et collaborateurs (1998). Les effets du sAPP₆₉₅ sont tout à fait comparables à ceux du sAPP₇₅₁ dans l'apprentissage opérant. Donc, à ce jour, les deux isoformes de sAPP testés ont des effets similaires. Enfin, dans ce travail, les effets promnésiants des sAPP ont été généralisés à une tâche de mémoire spatiale (reconnaissance spatiale). L'ensemble de ces données suggère que les sAPP ont des propriétés promnésiantes très intéressantes, tant sur le plan de la dose (faible), que sur celui de la variété des performances mnésiques améliorées.

Les données recueillies dans les tâches de reconnaissance d'objet ou de reconnaissance spatiale ont montré que le sAPP₆₉₅ agit sur les performances de reconnaissance même lorsqu'il est administré après la séance d'acquisition. Des résultats comparables ont été obtenus par Meziane et collaborateurs (1998) avec une administration post-apprentissage de sAPP₇₅₁ après l'acquisition d'une tâche de discrimination visuelle (Go / no go) et après l'acquisition d'une tâche d'apprentissage opérant en boîte de Skinner. Mes résultats sont donc tout à fait en accord avec l'hypothèse émise par Meziane et collaborateurs (1998) selon laquelle les sAPP agissent sur les processus de consolidation de la mémoire qui interviennent après la séance d'acquisition des informations (forme des objets, configuration spatiale des objets). Les travaux présentés dans ce chapitre ont également permis de préciser la fenêtre temporelle d'action du sAPP₆₉₅ sur les processus de consolidation. En effet,

l'obtention d'un effet promnésiant lorsque la protéine est administrée 5 mn, mais pas 1 h, 3 h ou 6 h après la séance d'acquisition m'a permis d'étayer l'hypothèse que le sAPP₆₉₅ agit sur des mécanismes très précoces du traitement de l'information. Ceci avait déjà été suggéré par les travaux de Meziane et collaborateurs en 1998, montrant que l'action promnésiante du sAPP₆₉₅ pouvait se dérouler dans les 3 h après la séance d'acquisition. Dans leur étude, l'administration de sAPP₆₉₅ avait, en effet, bloqué les déficits de performances induit par une administration conjointe de scopolamine et évalués 3 heures seulement après la séance d'acquisition. Mes travaux permettent de réduire la fenêtre d'action du sAPP₆₉₅ à moins d'une heure après la séance d'acquisition. Notons cependant que ces travaux ne permettent pas d'exclure une action complémentaire des sAPP sur les processus d'acquisition, ainsi qu'une action possible sur les processus de rappel de l'information. L'hypothèse d'une action sur les processus de rappel doit cependant être spécifiquement testée en administrant le sAPP juste avant la séance de rétention. En effet, les sAPP ne semblent pas être actifs s'ils sont administrés trop longtemps avant la séance de rétention. En effet, dans la deuxième expérience de ce chapitre, un groupe de souris a reçu une injection de sAPP 6h après la séance d'acquisition. Le délai de rétention étant de 24 h, le sAPP a donc été administré à ce groupe 18h avant la séance de rappel et ceci n'a eu aucun effet significatif sur les performances de rétention.

Les effets promnésiants des sAPP dans les tâches de reconnaissance suggèrent que ces protéines pourraient favoriser les mécanismes permettant la conservation de représentations internes des caractéristiques d'un objet et/ou des relations spatiales entre des objets pour détecter une nouveauté dans leur environnement. Ces représentations sont également appelées traces mnésiques (Ennaceur et Delacour, 1988 ; Rouillet et coll., 1998). Les sAPP pourraient donc **prolonger la durée de la trace mnésique** en agissant sur des mécanismes précoces du traitement de l'information permettant/facilitant sa conservation à long terme (consolidation mnésique). En effet, les processus de traitement de l'information mis en jeu dans les deux types de tâches de reconnaissance utilisées dans ce travail sont vraisemblablement courts, étant donné que les performances d'animaux témoins décroissent rapidement dans les heures qui suivent la séance d'acquisition. Il serait donc intéressant d'évaluer l'efficacité des sAPP avec des délais de rétention plus longs pour déterminer la durée de la prolongation de la trace mnésique. De plus, il serait intéressant d'éprouver les effets des sAPP dans des tâches de mémoire à plus long terme, telles que la tâche de discrimination visuelle (Go / no go) pour

laquelle on sait que les performances de rétention sont encore bonnes après 7 jours (H. Meziane, thèse de doctorat, 1993). Par ailleurs, le sAPP₆₉₅ a montré, comme le sAPP₇₅₁, des effets promnésiants dans la tâche d'apprentissage opérant en boîte de Skinner. Or cette tâche est caractérisée par une amélioration spontanée des performances entre les séances d'acquisition et de rétention (Destrade et Cardo, 1974 ; Mathis et coll., 1996). Ces variations spontanées des performances de rétention au cours du temps ont été interprétées jusqu'à ce jour comme reflétant l'existence de processus de réorganisation de la trace mnésique après acquisition partielle d'une tâche ; cette réorganisation permettrait le stockage à long terme des informations (Gisquet-Verrier et Alexinsky, 1990). Puisque les sAPP facilitent les processus qui sous-tendent l'amélioration spontanée des performances de rétention, ce résultat confirme l'hypothèse d'une action des sAPP dans la consolidation / maturation de la trace mnésique.

2. Implication des sAPP endogènes dans la mémorisation de l'apprentissage

Les travaux de Doyle et collaborateurs (1990) ont montré qu'une injection i.c.v. d'anticorps anti-APP (bloquant à la fois les APP membranaires et les sAPP), juste avant ou bien 2,5 h après l'acquisition d'une tâche d'évitement actif pouvait induire un déficit de rétention chez le Rat. Ces déficits ne sont cependant plus détectés lorsque l'injection est effectuée 4 h ou 6 h après l'acquisition. Ces résultats suggèrent l'implication relativement précoce des **APP endogènes** dans les processus de consolidation de la trace mnésique, sans préciser toutefois les rôles respectifs des APP membranaires et des sAPP. Par le même type d'approche, les travaux de Huber et collaborateurs (1993) ont eux aussi suggéré une implication de l'APP (membranaire ou soluble) dans la mémorisation, et en particulier de l'APP₆₉₅. Récemment, les travaux de Mileusnic et collaborateurs (2000) ont mis en évidence l'implication de l'APP dans les phases précoces des processus de consolidation mnésique. Le blocage de l'APP (mAPP ou sAPP) par un anticorps dirigé contre le fragment N-terminal de l'APP administré une demi-heure avant l'acquisition d'une tâche d'évitement passif, a en effet provoqué des déficits de mémoire chez des poulets testés à un délai de rétention de seulement 30 mn. De la même façon, des déficits de mémoire ont été provoqués par la diminution de l'expression de l'APP par l'administration d'un ARN antisens 6 à 12 h avant l'acquisition de la tâche.

L'utilisation de deux types d'anticorps, chacun spécifiquement dirigé contre les sAPP α ou contre les sAPP β , m'a permis de préciser la forme de l'APP vraisemblablement impliqué dans les processus de mémoire. En effet, seul le blocage des sAPP α endogènes provoque des déficits de rétention, puisque seul le groupe de souris traitées avec l'anticorps anti-sAPP α ne montre aucune amélioration spontanée des performances. Ainsi, il semblerait que le sAPP α soit spécifiquement impliqué dans les processus de consolidation mnésique. On peut donc déduire de l'ensemble des expériences présentées dans ce chapitre, ainsi que des données de la littérature, que l'administration de sAPP α exogène humain a probablement renforcé les effets des sAPP α endogènes murins naturellement impliqués au cours des tâches de mémoire, et ainsi favorisé leur action sur les processus de consolidation mnésique. Cette hypothèse comporte un corollaire, à savoir qu'il existe vraisemblablement une libération naturelle de sAPP α endogènes murines au cours des tâches de mémoire. Nous avons déjà signalé plus haut que la vérification de cette hypothèse était l'un des objectifs initiaux de mon travail de thèse.

Les effets de ces anticorps spécifiquement dirigés contre les sAPP restent néanmoins à confirmer. Ne disposant que d'une quantité faible de ces anticorps récemment fabriqués, je n'ai en effet pu tester qu'une dose d'anticorps et les effets observés sont restés relativement discrets. Il serait judicieux de répliquer cette expérience avec une dose d'anticorps plus importante. En outre, certaines données récentes de nos collaborateurs semblent indiquer que l'affinité de l'anticorps anti-sAPP β pour le sAPP β serait moins importante que l'affinité de l'anticorps anti-sAPP α pour le sAPP α (communication personnelle de J.-C. Dodart). Il est donc nécessaire d'effectuer des expériences complémentaires dans cette voie avant de réévaluer les effets de ces anticorps sur les performances mnésiques. Enfin, on ne peut exclure un effet de ces anticorps sur les processus de rappel de l'information.

3. Modes d'action possibles des sAPP sur les processus mnésiques

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour rendre compte des effets des sAPP sur les processus cellulaires liés à la mémorisation. Il est probable que les sAPP soient impliqués dans la plasticité synaptique, de par leurs propriétés neurotrophiques et neuromodulatrices. En effet, le sAPP module les phénomènes de plasticité dans l'hippocampe, comme la potentialisation à long terme (PLT), considérée comme un modèle clé des mécanismes

cellulaires sous-tendant les processus mnésiques (Ishida et coll., 1997). L'APP peut également agir comme un récepteur membranaire de la cellule et réguler la transduction du signal vers l'intérieur de la cellule (Brouillet et coll., 1999 ; Okamoto et coll., 1995). De plus, le sAPP peut réguler les concentrations de calcium intracellulaire (Barger et Mattson, 1996) et promouvoir la croissance des neurites (Morimoto et coll., 1998 ; Roch et coll., 1994 ; Wallace et coll., 1997). Enfin, des données très récentes ont mis en évidence la capacité du sAPP à réguler la neurogenèse chez le rat adulte (Caillé et coll., 2004). L'ensemble de ces propriétés pourrait rendre compte de l'effet modulateur de la protéine sur la plasticité neuronale et, par conséquent, de ses propriétés promnésiantes.

L'existence d'un rôle déterminant du sAPP dans les processus de mémoire est également corroborée par les études examinant le rôle du système cholinergique dans la détection de la nouveauté et le traitement des informations spatiales ainsi que par les études démontrant une relation étroite entre le système cholinergique et le métabolisme de l'APP. Des études de microdialyse, réalisées chez le Rat, ont montré que les niveaux d'acétylcholine dans les structures corticales et hippocampiques étaient augmentés après une exposition à la nouveauté ou pendant un apprentissage dans un labyrinthe radial (Miranda et coll., 2000 ; Thiel et coll., 1998 ; Stancampiano et coll., 1999). Or, les sAPP bloquent les déficits mnésiques induits par la scopolamine, un antagoniste cholinergique muscarinique, dans un apprentissage opérant en boîte de Skinner, dans une tâche de discrimination visuelle et dans l'épreuve de réactivité à la nouveauté d'objet (Meziane et coll., 1998 ; Dodart et coll., 1997). L'une des hypothèses avancées pour expliquer cet effet, est que l'administration de sAPP exogène pourrait compenser la baisse de sécrétion de sAPP endogène induite par l'administration de scopolamine. Cette compensation des taux de sAPP permettrait de rétablir un niveau normal de performance.

De plus, un dysfonctionnement cholinergique, induit par des composés anti-cholinergiques ou par des lésions des fibres cholinergiques afférentes à l'hippocampe ou au cortex, peut provoquer des déficits de mémoire spatiale (Collerton, 1986 ; McGaughy et coll., 2000 ; Wrenn & Wiley, 1998). La sécrétion de sAPP au niveau cortical ou hippocampique pourrait également être contrôlée par la voie cholinergique provenant de la base du cerveau antérieur, probablement à travers les récepteurs muscariniques M1 et/ou M3 (Lin et coll., 1999 ; Muller et coll., 1998 ; Rossner et coll., 1997). En outre, des lésions cholinergiques provoquent une augmentation importante des niveaux d'APP membranaire dans l'hippocampe

et le cortex (Leanza, 1998 ; Lin et coll., 1999 ; Wallace et coll., 1993). Les afférences cholinergiques de l'hippocampe et du cortex pourraient donc jouer un rôle essentiel dans l'implication des sAPP dans les processus mnésiques. Les tâches de reconnaissance que j'ai utilisées impliquent l'hippocampe et/ou des régions spécifiques du cortex cérébral (Steckler et coll., 1998). D'après les données actuelles, la tâche de reconnaissance spatiale implique notamment l'hippocampe et le cortex pariétal (Thinus-Blanc et coll., 1996), alors que la tâche de reconnaissance d'objet dépend essentiellement de structures corticales, telles que le cortex périrhinal, mais ne semble pas impliquer l'hippocampe (Wan et coll., 1999). Le sAPP injecté a donc pu agir sur une ou plusieurs de ces structures pour favoriser le traitement de l'information au cours des deux tâches de mémoire de reconnaissance. Chez l'animal intact, les voies cholinergiques basalo-corticales et septo-hippocampiques pourraient être impliquées dans une libération de sAPP endogène, ce qui contribuerait à la mise en place de la trace mnésique dans ces tâches. Bien que ces deux voies soient probablement impliquées de façon différentielle dans ces deux tâches, elles pourraient toutes deux réguler, lors de leur activation, une sécrétion de sAPP dans les structures cibles.

4. Un effet (indirect ?) du sAPP₆₉₅ sur le comportement exploratoire 24 h après la séance d'acquisition dans la tâche de reconnaissance spatiale

En plus de la nette réexploration des objets déplacés, les animaux traités avec du sAPP ont également présenté une réexploration modérée, mais significative des objets non déplacés lors de la rétention de la tâche de reconnaissance spatiale. Puisque l'injection de sAPP, effectuée 20 mn avant l'apprentissage, n'a pas eu d'effet sur l'exploration des objets durant la séance d'acquisition, ce phénomène de réexploration des objets non déplacés est probablement plus une conséquence de la détection de la nouveauté spatiale, et du délai important entre acquisition et rétention. Poucet et collaborateurs (1986) ont montré que des hamsters, soumis à deux sessions d'acquisition de 15 mn, étaient capables en l'absence de tout traitement, de détecter un changement de configuration spatiale après un délai de 8 à 14h. Lorsque le changement de configuration impliquait une modification de la structure géométrique formée par les objets, une réexploration modérée des objets non déplacés accompagnait la réexploration marquée des objets déplacés. Ces données pourraient expliquer l'augmentation globale d'exploration chez les souris traitées avec du sAPP, testées 24h après une séance d'acquisition de 15 mn, étant donné qu'une modification importante de la

configuration spatiale formée par les objets accompagne également notre changement de configuration. Il se pourrait que la détection d'un changement profond de la configuration spatiale après un délai prolongé (le cas de nos souris traitées avec du sAPP₆₉₅) induise une augmentation du comportement exploratoire des souris. Il serait intéressant de vérifier, en augmentant la durée de la séance d'acquisition pour obtenir de bonnes performances de rétention à 24 h, ce que la détection du changement spatial induit chez des souris intactes. Ces animaux pourraient alors modérément réexplorer les objets non déplacés, en plus d'une réexploration importante des objets déplacés. Cette réexploration globale, qui permet à l'animal d'intégrer les nouvelles informations, peut être considérée comme le reflet de la réactualisation d'une ancienne représentation spatiale de l'environnement (Poucet, 1993).

5. Effet propre des injections i.c.v. post-apprentissage sur la performance de reconnaissance d'objet

Dans la première expérience de ce chapitre, les souris ayant subi une injection i.c.v. de NaCl 5 mn après la séance d'acquisition montraient un indice de reconnaissance supérieur au niveau du hasard au délai de rétention de 24 h, contrairement à des souris intactes, qui ne présentaient aucune reconnaissance d'objet. Ce léger effet promnésiant de l'injection i.c.v. de NaCl a été répliqué dans la seconde expérience, et ceci aux 4 délais d'injection du NaCl (5 mn, 1 h, 3 h et 6 h après la séance d'acquisition). Ces résultats montrent que la procédure d'injection i.c.v. est loin d'être anodine pour l'animal, notamment dans des tâches basées sur le comportement spontané comme les tâches de reconnaissance. La contention modérée nécessaire à la procédure d'injection a pu interférer avec la mémorisation des informations acquises durant l'acquisition de la tâche, puisqu'elle est survenue dans les 6 heures suivant la séance d'acquisition (Pereira et coll., 1988), et ce de façon d'autant plus marquée que la contention est perçue comme désagréable (Izquierdo, 1989). La procédure d'injection, effectuée 5 mn, 1 h, 3 h ou 6 h après l'acquisition de la tâche, a pu déclencher chez nos animaux la libération d'hormones telles l'adrénaline ou la corticostérone, connues pour améliorer les performances de mémoire lorsqu'elles sont injectées de façon systémique après apprentissage (McGaugh et coll., 1996 ; Roozendaal, 2002).

6. Effet de la scopolamine sur l'état de santé des souris testées dans un apprentissage opérant en boîte de Skinner

Au cours de cette expérience utilisant la tâche d'apprentissage opérant en boîte de Skinner, j'ai été surprise par le nombre de souris ayant mal supporté le traitement à la scopolamine. En effet, aucun problème particulier n'avait été rencontré par Meziane et collaborateurs en 1998, qui avaient utilisé la même souche de souris (OF1) et la même dose de scopolamine (3 mg/kg).

En recherchant la cause de ce phénomène inattendu, j'ai tout d'abord pensé que la scopolamine pouvait modifier le comportement alimentaire des souris remises dans leur cage après la séance d'acquisition. Etant donné que la scopolamine provoque un assèchement des muqueuses et que la nourriture des souris est sous forme de boulettes déshydratées, les souris auraient pu différer leur prise alimentaire de quelques heures. Comme les souris sont maintenues en restriction alimentaire et nourries quotidiennement une heure après la séance d'acquisition (et donc après l'administration des traitements), le fait que des souris traitées à la scopolamine diffèrent (encore plus) leur prise de nourriture aurait pu conduire à un trop fort affaiblissement de leur condition physique. La gestion de la restriction alimentaire (maintien des animaux à 85% de leur poids *ad libitum*) reste en effet délicate chez la Souris : la prise de quelques grammes suffit à faire disparaître la motivation pour la tâche appétitive et une perte excessive de poids rend l'animal inapte à la tâche.

C'est en effectuant des recherches sur d'autres effets périphériques possibles de la scopolamine que j'ai découvert les travaux d'Enginar et collaborateurs (1997, 1999 et 2003). Cette équipe a mis en évidence que des souris de lignée BALB/c, en privation alimentaire depuis 48 h et traitées avec de la scopolamine (3 mg/kg), développaient des convulsions cloniques dans les 15 à 20 secondes après un accès à de la nourriture, et ceci 30 mn après le traitement à la scopolamine (Enginar et coll., 1997). La scopolamine possède des propriétés anticonvulsivantes par sa capacité à bloquer les récepteurs muscariniques post-synaptiques et réduit ainsi l'augmentation de la transmission cholinergique provoquée par des anticholinestérasiques ou des agonistes muscariniques (par exemple la pilocarpine). Mais la scopolamine, en agissant sur les récepteurs muscariniques présynaptiques, peut aussi augmenter la libération d'acétylcholine et l'hyperactivité cholinergique pourrait dans ces conditions déclencher des convulsions. Les auteurs proposent que l'accès à la nourriture, en

provoquant des changements neurochimiques et/ou endocrines rapides chez l'animal traité à la scopolamine, pourrait conduire à l'apparition des convulsions. Des agents réduisant la neurotransmission glutamatergique (par exemple le MK-801, antagoniste non-compétitif des récepteurs NMDA au glutamate) ou dopaminergique (par exemple la chlorpromazine, antagoniste des récepteurs D₂ à la dopamine) peuvent réduire l'apparition de ces crises convulsives chez des souris en privation alimentaire traitées à la scopolamine (Enginar et coll., 1997 et 1999). Il semblerait que les systèmes glutamatergique et dopaminergiques soient donc impliqués dans l'apparition des convulsions (Enginar et coll., 2003).

Bien que je n'aie noté aucun comportement anormal chez mes souris, deux d'entre elles sont effectivement mortes en mangeant leur croquette dans les minutes qui ont suivi la distribution de nourriture (1 h après la séance d'acquisition). De même, plusieurs autres souris trop affaiblies n'ont pas pu participer à la séance de rétention du lendemain. Dans mon expérience, il est possible que les souris OF1 aient pu développer le même genre de crises convulsives. Dans ce cas, il serait alors logique que les groupes de souris traités à la scopolamine présentent les plus mauvaises performances de mémoire. Néanmoins, il se trouve que le groupe de souris traitées avec le sAPP₆₉₅ en plus de la scopolamine montre de bonnes performances. Ainsi on pourrait penser que bien que les souris traitées à la scopolamine ont pu présenter des crises convulsives, l'administration de sAPP a permis de limiter l'apparition de ces crises lors de la distribution de nourriture 1 h après le traitement. Ceci va encore dans le sens de l'hypothèse, formulée précédemment, d'une interaction entre le sAPP et le système cholinergique.

Je tiens à préciser qu'au cours des travaux effectués par Meziane et collaborateurs (avec le sAPP₇₅₁), aucun problème particulier n'avait été signalé. On peut remarquer, en comparant les groupes témoins des deux expériences, que les performances de nos souris sont moins bonnes que celles des souris utilisées par Meziane et collaborateurs. Rappelons que les souris OF1 que j'ai utilisées provenaient de l'élevage Iffa Credo et ont été hébergées dans la salle V3 à forte ventilation. Meziane et collaborateurs ont utilisé, quant à eux, des souris OF1 élevées au laboratoire et hébergées dans les salles peu ventilées (extracteurs d'air « Vortice » aux niveau des fenêtres) et donc peu bruyantes du pavillon du bâtiment. On peut supposer que ces différences de conditions d'hébergement ont pu influencer le niveau de stress des animaux, leurs performances aux tests de mémoire et leurs réactions aux différents traitements (Mizoguchi et coll., 2001). Pour conclure sur ce point, il serait certainement souhaitable

d'utiliser des doses de scopolamine beaucoup plus faibles dans des tâches associées à une restriction alimentaire, telle que l'apprentissage opérant. Une observation plus attentive des souris serait également nécessaire au moment de la distribution de nourriture pour vérifier l'absence ou la présence de crises d'épilepsie. Par manque de temps, cette expérience n'a pas été répliquée, mais lorsque j'ai commencé à utiliser la souche CD1, j'ai vérifié que la dose de 1mg/kg de scopolamine suffisait à induire des déficits d'apprentissage opérant, sans apparemment induire de crises d'épilepsie au moment de la distribution de nourriture.

Contribution expérimentale : chapitre III

**Implication de différentes isoformes de
l'apolipoprotéine E humaine (apoE3 et apoE4)
dans les processus mnésiques**

I. Caractérisation comportementale de souris âgées transgéniques pour le gène de l'apoE

1. Introduction

Afin d'évaluer chez l'animal l'influence des différentes isoformes humaines de l'apoE sur le déclin cognitif lié à l'âge, j'ai évalué les performances de souris transgéniques « âgées », portant à la place de leur apoE murine, les allèles humains $\epsilon 3$ ou $\epsilon 4$. Les souris transgéniques apoE4 pourraient en effet se révéler être un bon modèle d'étude des déficits cognitifs liés au vieillissement étant donné que plusieurs études ont révélé que les souris exprimant l'apoE4 humaine montraient des performances altérées par rapport aux souris exprimant l'apoE3 humaine (Raber et coll., 1998 ; Veinbergs et coll., 1999 ; Raber et coll., 2000 ; Hartman et coll., 2001).

L'originalité de notre étude repose sur le fait que nos souris transgéniques pour le gène de l'apoE ont été créées par remplacement ciblé du gène murin par le gène humain. A la différence des souris transgéniques utilisées dans les précédentes études citées, dont le niveau d'expression du transgène était contrôlé soit par le promoteur humain, soit par un promoteur de la NSE (*neuron specific enolase*) ou de la GFAP (*glia fibrillary acidic protein*), nos souris expriment un niveau physiologique de l'apoE car le promoteur murin est conservé intact. Chez nos souris, l'apoE humaine a une expression et une distribution comparable à l'apoE murine des animaux sains (Knouff et coll., 1999 ; Sullivan et coll., 1997 et 2004). Il est donc intéressant de déterminer si ces souris « knock-in » présentent également des déficits mnésiques et si ceux-ci sont « fonction » de l'âge. A ce propos, un point mérite d'être discuté. En effet, nous n'avons pas réalisé de caractérisation comportementale « en fonction » de l'âge *per se*, car celle-ci s'est limitée à deux âges : une cohorte d'individus « jeunes » de 4-5 mois et une cohorte d'individus « âgés » de 14-15 mois. En effet, nous avons préféré favoriser une caractérisation des deux sexes (environ 8 animaux/sexe/lignée) et multiplier les tests comportementaux à partir du nombre d'animaux que nous étions en mesure de produire. En conséquence, nous sommes bien conscients que si un déficit est observé chez les souris âgées, mais pas chez les souris jeunes, celui-ci ne sera qu'un indice relatif du déficit mnésique lié à l'âge et non une certitude absolue.

Les travaux de Raber et collaborateurs en 1998 et 2000 ont montré que des souris transgéniques NSE-apoE3 ou NSE-apoE4 (transgène sous contrôle du promoteur de la NSE) exprimaient déjà des déficits de mémoire spatiale à l'âge de 6 mois. Nous avons donc choisi de tester notre cohorte « âgée » de souris transgéniques apoE3 et apoE4 (transgène sous contrôle du promoteur de l'apoE murine) à l'âge de 14-15 mois, âge correspondant chez la Souris à celui auquel apparaissent les déficits cognitifs chez l'Homme (50-60 ans). Ce choix nous permettait également de nous situer à un moment où une certaine restauration fonctionnelle par administration d'un promnésiant (dans notre étude, le sAPP₆₉₅) pourrait être encore initiée.

Plusieurs autres particularités et limites de notre étude méritent d'être précisées et discutées avant de présenter les données obtenues sur la cohorte de souris « jeunes ». Tout d'abord, indépendamment du but initial de cette étude visant à comparer l'impact des allèles $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$ sur les performances cognitives, nous avons décidé d'inclure deux autres lignées : la lignée B6 représentant le fond génétique de nos souris transgéniques, ainsi que des souris apoE-KO (sur même fond génétique) pour évaluer l'impact d'une déficience totale en apoE dans la batterie de tests utilisée pour nos souris transgéniques. Cette batterie de tests a d'ailleurs été soigneusement étudiée et mise au point de façon à comporter des tests de mémoire spatiale et des tests d'évitement conditionné adaptés aux souris du fond génétique B6 (voir la partie « matériels et méthodes » au sujet concernant le fond génétique).

Dans la maladie d'Alzheimer, une structure cérébrale affectée très précocement et très clairement est l'hippocampe (West et coll., 1994 ; Chetelat et Baron, 2003 ; Almkvist et coll., 1996). Cette structure est connue pour être impliquée dans la mémoire spatiale et la mémoire épisodique (mémoire des événements associés à un contexte spatio-temporel bien précis ; Braak et Braak, 1996 ; Giannakopoulos et coll., 2000). La possession de l'allèle $\epsilon 4$ est justement associée chez l'Homme à l'apparition d'une atrophie de l'hippocampe et de l'amygdale, que les individus soient déjà ou non atteints de démence (den Heijer et coll., 2002 ; Lehtovirta et coll., 1995 ; Cohen et coll., 2001). Il semblerait également que les souris transgéniques apoE4 présentent une activité synaptique et une croissance dendritique réduites dans l'amygdale par rapport aux souris apoE3 (observations préliminaires de Sullivan et collaborateurs) ; on peut donc supposer que les souris de ces deux lignées peuvent présenter une réactivité émotionnelle différente.

Il nous est donc paru important de pouvoir évaluer les performances des souris de ces deux lignées dans des tâches impliquant le rappel de souvenirs d'ordre spatiaux (tâche de reconnaissance spatiale et piscine de Morris) ainsi que dans des tâches impliquant le rappel d'évènements « désagréables » survenus dans un contexte spatio-temporel donné (tâches d'évitement actif et passif).

Par ailleurs, nous choisis, en toute connaissance de cause, d'élever les souris transgéniques au laboratoire. En effet, le stress peut induire des modifications du fonctionnement cérébral, par exemple en augmentant la perméabilité au calcium (Kim et Yoon, 1998) ou en augmentant la production d'oxyde nitrique (Olivenza et coll. 2000 ; Abidin et coll., 2004). Or, de nombreux travaux mettent en évidence un rôle de l'apoE dans les mécanismes de survie des neurones à des atteintes cytotoxiques (LaDu et coll., 2001 ; Brown et coll., 2002 ; Jordan et coll., 1998 ; Law et coll., 2003). De plus, il semble que les performances mnésiques des souris apoE-KO sont particulièrement sensibles aux expériences stressantes (Grootendorst et coll., 2001 ; de Kloet et coll., 2002 ; Lominska et coll., 2001 ; Zhou et coll., 1998). Nous avons donc choisi d'élever les 4 lignées de souris au sein du laboratoire pour leur éviter l'expérience, très probablement stressante, d'un voyage intercontinental. Enfin, nous n'avons étudié que les souris transgéniques pour les allèles $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$, pas celle transgénique pour $\epsilon 2$. En effet, cette dernière n'était pas disponible au moment de l'étude à la suite de difficulté de maintien de cette lignée par notre collaborateur, le Dr. Patrick Sullivan.

Dans notre laboratoire, le Dr. Jeannette Grootendorst a effectué la caractérisation comportementale de la cohorte « jeune » (4-5 mois) des deux lignées de souris « knock-in » apoE3 et apoE4. Au cours de cette étude (Grootendorst, Bour et coll., sous presse), les souris femelles apoE4 ont montré des déficits de performance dans la tâche de reconnaissance spatiale et dans le test de rétention de la tâche de mémoire spatiale de référence dans la piscine de Morris, comparées aux femelles apoE3. Les deux lignées de souris « knock-in » ont également montré des difficultés dans une tâche d'appariement différé dans la piscine de Morris. Dans une tâche d'évitement actif dans le labyrinthe en Y, les souris apoE3 ont montré une altération modérée de leurs performances. Dans une tâche d'évitement passif, les deux lignées ont eu de bonnes performances.

Afin d'étudier le maintien et/ou l'accentuation de ces déficits mnésiques chez les souris âgées, j'ai effectué la caractérisation comportementale de la cohorte « âgées » de souris apoE3 et apoE4 à partir de la même batterie de tests utilisée précédemment pour la cohorte « jeune ».

2. Batterie de tests comportementaux

La batterie de tests que nous avons utilisée permet d'évaluer les performances des souris apoE3, apoE4, apoE-KO (témoin absence d'apoE) et B6 (témoin apoE murine) successivement dans plusieurs tâches impliquant la mémoire spatiale et les capacités d'évitement. La séquence des tests est organisée de façon à débiter la batterie avec le test le plus sensible aux expériences antérieures (reconnaissance spatiale) et à terminer avec les tests les plus stressants par l'application de chocs électriques (évitement actif et passif) (McIlwain et coll., 2001 ; Voikar et coll., 2004). Ainsi les souris ont été soumises dans l'ordre à :

- la tâche de **reconnaissance spatiale** (1 j),
- la tâche de **mémoire de référence** dans la piscine de Morris (4 j) suivie d'un **test de rétention** (*probe trial*) le lendemain du dernier jour d'apprentissage (1 j),
- la tâche d'**appariement différé** (DMP pour *delayed matching-to-place*) dans la piscine de Morris (4 j),
- l'épreuve de la **plate-forme visible** dans la piscine de Morris (1 j),
- la tâche d'**évitement actif** dans un labyrinthe en Y (2 j),
- la tâche d'**évitement passif** (2 j)

Après la fin des tests comportementaux, le seuil de réactivité aux chocs électriques délivrés dans les pattes a été déterminé pour chaque souris.

3. Différents groupes de souris utilisés

Les mâles et les femelles ont été testés séparément à 6 semaines d'intervalle (d'abord les mâles, puis les femelles) afin de limiter l'influence possible, sur les souris d'un sexe donné, des traces olfactives laissées par les souris de l'autre sexe. En effet, des traces olfactives pourraient subsister dans les appareils de test même après nettoyage.

De nombreuses souris ont développé, avec l'âge, une alopecie (perte de poils) localisée. Deux mâles apoE-KO et une femelle apoE3 ont également présenté des lésions cutanées importantes (dues au grattage). Ces trois souris ont donc été exclues des analyses

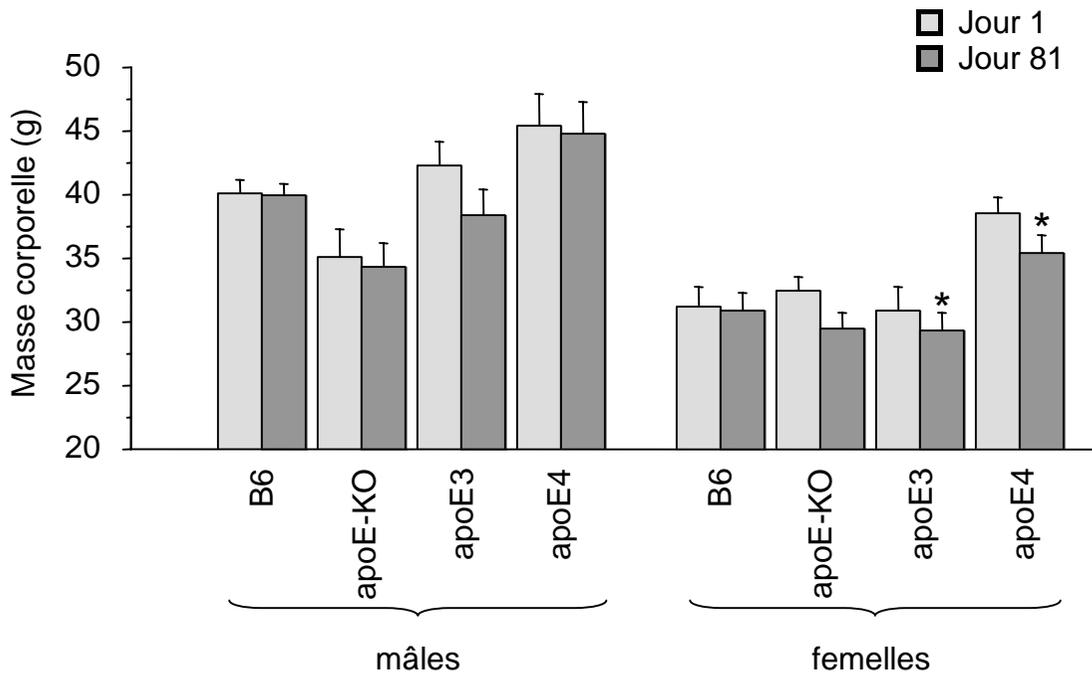


Figure 31 : Evolution de la masse corporelle des souris entre le début et la fin de la période expérimentale

Le poids des animaux des 4 lignées entre le 1er jour (date d'isolement des souris) et le 81ème jour (date du sacrifice) est indiqué en moyenne + erreur-type.

* = Différent du jour 1 à $p < 0,05$.

statistiques, pour les tâches ultérieures à la tâche de reconnaissance spatiale en raison de leurs difficultés à nager dans la piscine de Morris du fait des lésions cutanées devenues trop importantes.

Les effectifs des différents groupes de souris étaient :

- souris **B6** : 8 mâles et 8 femelles
- souris **apoE-KO** : 6 mâles (reconnaissance spatiale : 8 mâles) et 8 femelles
- souris **apoE3** : 8 mâles et 7 femelles (reconnaissance spatiale : 8 femelles)
- souris **apoE4** : 8 mâles et 8 femelles

4. Evolution de la masse corporelle des souris

Lors de l'isolement des souris avant les tests comportementaux, la masse corporelle moyenne des souris (14-15 mois) était différente selon la lignée de souris considérée (*génotype* : $F(3,53) = 8,68$; $p < 0,0001$), les souris apoE4 ayant une masse corporelle plus importante que celle des souris des trois autres lignées (*test de Fischer* : *apoE4 vs les trois autres lignées* : $p \leq 0,004$). Par ailleurs, les femelles étaient globalement moins lourdes que les mâles (*sexe* : $F(1,53) = 39,06$; $p < 0,0001$; *sexe x génotype* : $F(3,53) = 2,30$; $p = 0,087$; voir **figure 31**). Chez les femelles, les souris apoE4 ont une masse plus importante que les souris des trois autres lignées (*génotype* : $F(3,27) = 6,31$; $p = 0,002$; *test de Fisher* : *apoE4 vs les trois autres lignées* : $p \leq 0,005$). Chez les mâles, la masse corporelle des souris apoE4 est également la plus importante, mais celle-ci ne diffère significativement que de celle des souris apoE-KO (*génotype* : $F(3,26) = 4,62$; $p = 0,010$; *test de Fisher* : *apoE-KO vs apoE3 et apoE4* : $p \leq 0,018$).

L'ensemble des souris semble maintenir son poids au cours des 81 jours d'isolement durant lesquels se sont déroulés les tests comportementaux. Néanmoins, l'analyse statistique montre une légère perte de poids (de seulement $1,7 \pm 0,5$ g en moyenne ; *jour* : $F(1,53) = 12,10$; $p = 0,001$), et ceci de manière équivalente dans chaque lignée de souris (*pas d'interaction avec le sexe et/ou le génotype*). Au niveau de chaque groupe (sexes et génotypes séparés, voir **figure 31**), cette perte de poids n'est significative que pour les femelles apoE3 et apoE4 (voir tableau ci-après).

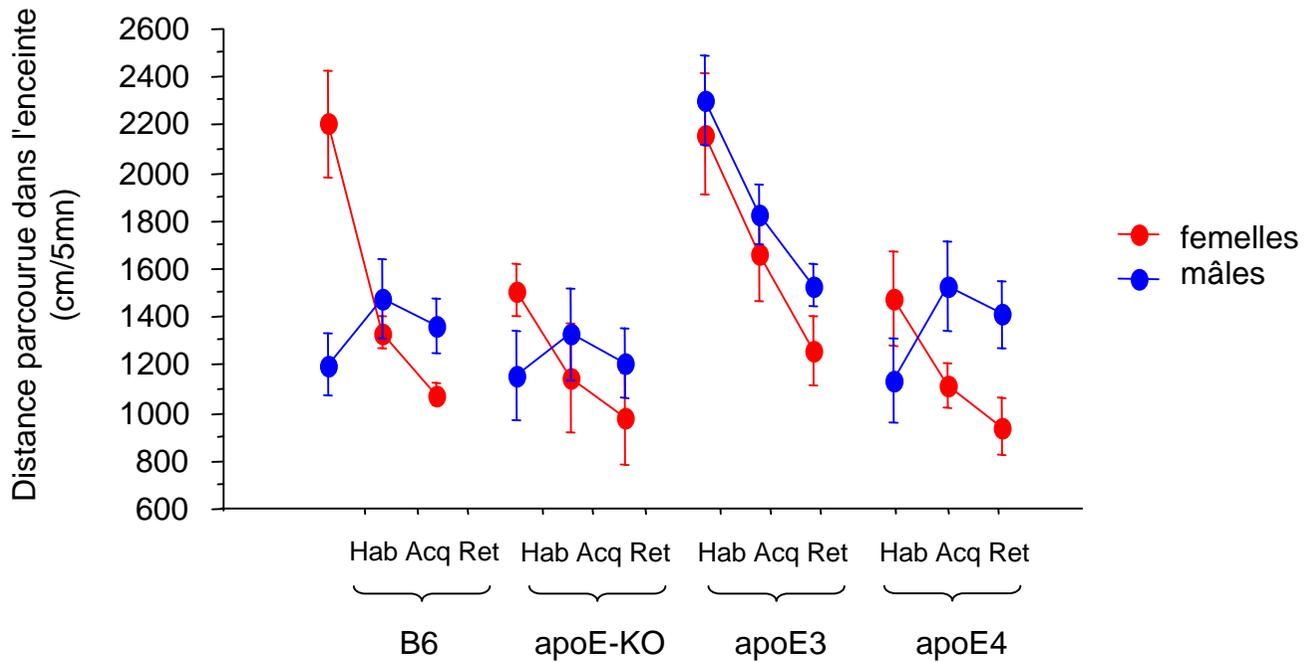


Figure 32 : Activité locomotrice dans l'enceinte de test pendant la tâche de reconnaissance spatiale

On peut noter une plus forte activité locomotrice 1) des souris mâles par rapport aux souris femelles, et 2) des souris apoE3 par rapport aux souris des autres lignées.

La distance parcourue dans l'enceinte de test pendant les séances d'habituation (Hab), d'acquisition (Acq) et de rétention (Ret) de la tâche de reconnaissance spatiale est indiquée en moyenne \pm erreur-type par période de 5 mn.

		Perte de poids entre le jour 1 et le jour 81 (ANOVA à mesures répétées)			
lignée sexe	B6	apoE-KO	apoE3	apoE4	
	sexes confondus	p=0,7033	p=0,0630	p=0,0234	p=0,0908
mâles	p=0,8559	p=0,5235	p=0,0854	p=0,6954	
femelles	p=0,7478	p=0,0884	p=0,0485	p=0,0475	

5. Reconnaissance spatiale

a. Déroulement de l'expérience

Le protocole utilisé pour la caractérisation des performances des 4 lignées est constitué d'une séance d'habituation de 5 mn, d'une séance d'acquisition de 15 mn et d'une séance de rétention de 15 mn, chaque séance étant séparée l'une de l'autre par un délai de 5 mn. La performance a été évaluée en comparant l'exploration des objets déplacés et non déplacés sur l'ensemble des 15 mn de la séance de rétention.

b. Résultats

Activité locomotrice

La **figure 32** montre l'évolution de l'activité locomotrice des 4 lignées de souris au cours des différentes séances dans l'enceinte de test. Afin de pouvoir comparer les valeurs d'activité locomotrice lors de la séance d'habituation de 5 mn à celles obtenues lors des séances d'acquisition et de rétention de 15 mn chacune, les valeurs représentées pour ces deux dernières séances sont les distances moyennes par période de 5 mn.

Lors de la séance d'habituation de 5 mn, les souris apoE3 ont été globalement plus actives que celles des autres lignées (*effet génotype sur la distance parcourue* : $F(3,56) = 10,89$; $p < 0,0001$; *test de Fisher* : apoE3 vs les 3 autres lignées : $p \leq 0,006$). Cet effet a été mis en évidence dans les deux sexes (*mâles* : $(F(3,28) = 11,49$; $p < 0,0001$; *test de Fisher* : apoE3 vs les 3 autres lignées : $p < 0,0001$; *femelles* : $F(3,28) = 3,93$; $p = 0,018$; *test de Fisher* : apoE3 vs apoE-KO et apoE4 : $p \leq 0,029$). Les femelles ont, dans leur ensemble, été plus actives que les mâles (*sexe* : $F(1,56) = 8,78$; $p = 0,004$; *génotype x sexe* : $F(3,56) = 3,22$; $p = 0,029$), mais cette différence n'est significative que pour la lignée B6 (*sexe* : B6 : $F(1,14) = 15,69$; $p = 0,001$; apoE-KO, apoE3 et apoE4 : $F(1,14) \leq 2,79$; $p \geq 0,117$). L'analyse restreinte aux souris « knock-in » confirme que les souris apoE3 sont plus

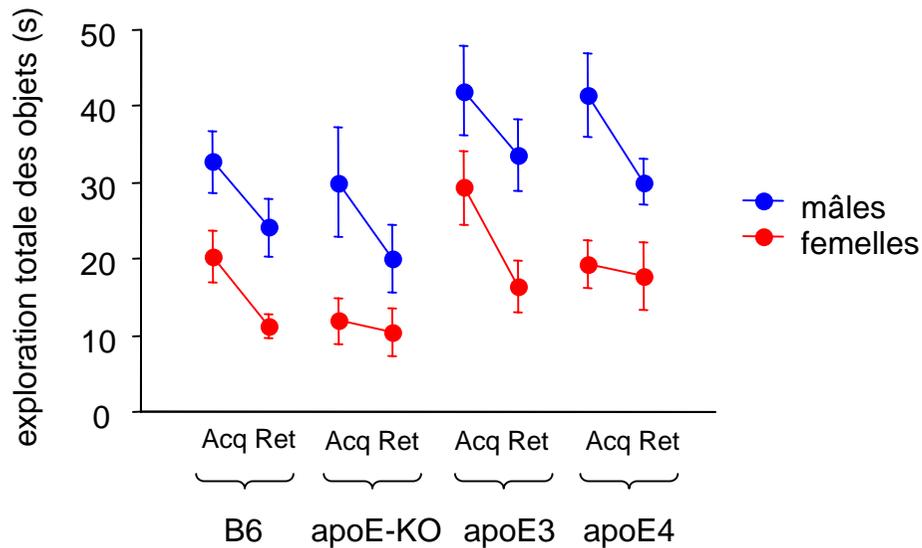


Figure 33 : Exploration totale des objets pendant la tâche de reconnaissance spatiale

On peut constater que les mâles explorent plus les objets que les femelles. Aucune différence n'a été montrée entre les souris apoE3 et apoE4.

La durée totale d'exploration des objets pendant les séances d'acquisition (Acq) et de rétention (Ret) est indiquée en moyenne \pm erreur-type.

actives que les souris apoE4, indépendamment du sexe des animaux (*génotype* : $F(1,28) = 20,66$; $p < 0,0001$; *sexe* : $F(1,28) = 0,24$; $p = 0,629$; *sexe x génotype* : $F(1,28) = 1,45$; $p = 0,239$).

Lors de la séance d'acquisition de 15 mn, les souris apoE3 ont encore montré une activité locomotrice plus importante que celle des autres lignées ($F(1,28) = 7,44$; $p = 0,017$; *test de Fisher* : apoE3 vs les 3 autres lignées : $p \leq 0,042$). Les femelles ont montré une tendance à être moins actives que les mâles ($F(1,56) = 3,78$; $p = 0,057$) indépendamment du génotype (*sexe x génotype* : $F(3,56) = 0,29$; $p = 0,831$). La comparaison des souris apoE3 et apoE4 confirme que les souris apoE3 sont plus actives que les souris apoE4, les femelles ayant tendance à être moins actives que les mâles (*génotype* : $F(1,28) = 7,44$; $p = 0,011$; *sexe* : $F(1,28) = 3,41$; $p = 0,075$; *sexe x génotype* : $F(1,28) = 0,64$; $p = 0,431$).

Lors de la séance de rétention de 15 mn, l'activité locomotrice des souris apoE3 a paru plus importante que celle des autres lignées, mais cette fois l'effet du génotype n'a pas atteint la significativité ($F(3,56) = 1,93$; $p = 0,135$). Indépendamment du génotype, les souris femelles ont été moins actives que les souris mâles (*sexe* : $F(1,56) = 11,45$; $p = 0,001$; *sexe x génotype* : $F(3,56) = 0,35$; $p = 0,792$). L'analyse limitée aux souris apoE3 et apoE4 confirme ces résultats (*sexe* : $F(1,28) = 8,81$; $p = 0,006$; *génotype* : $F(1,28) = 3,08$; $p = 0,090$; *sexe x génotype* : $F(1,28) = 0,65$; $p = 0,427$).

En résumé, les souris apoE3 sont, dans l'ensemble, plus actives dans cette épreuve que les souris des autres lignées ; les mâles étant plus actifs que les femelles lors des séances réalisées en présence d'objets.

Exploration totale des objets durant les séances d'acquisition et de rétention

Au cours de ces deux séances (**voir figure 33**), les souris femelles explorent moins l'ensemble des objets que les mâles et ceci, indépendamment du génotype (*séance d'acquisition* : *sexe* : $F(1,56) = 23,12$; $p < 0,0001$; *sexe x génotype* : $F(3,56) = 0,48$; $p = 0,696$; *séance de rétention* : *sexe* : $F(1,56) = 25,13$; $p < 0,0001$; *sexe x génotype* : $F(3,56) = 0,37$; $p = 0,777$). L'analyse restreinte aux souris apoE3 et apoE4 confirme ce résultat sur les deux séances (*acquisition* : *sexe* : $F(1,28) = 12,46$; $p = 0,001$; *sexe x génotype* : $F(1,28) = 0,94$; $p = 0,341$; *rétention* : *sexe* : $F(1,28) = 13,82$; $p = 0,0009$; *sexe x génotype* : $F(1,28) = 0,40$; $p = 0,531$).

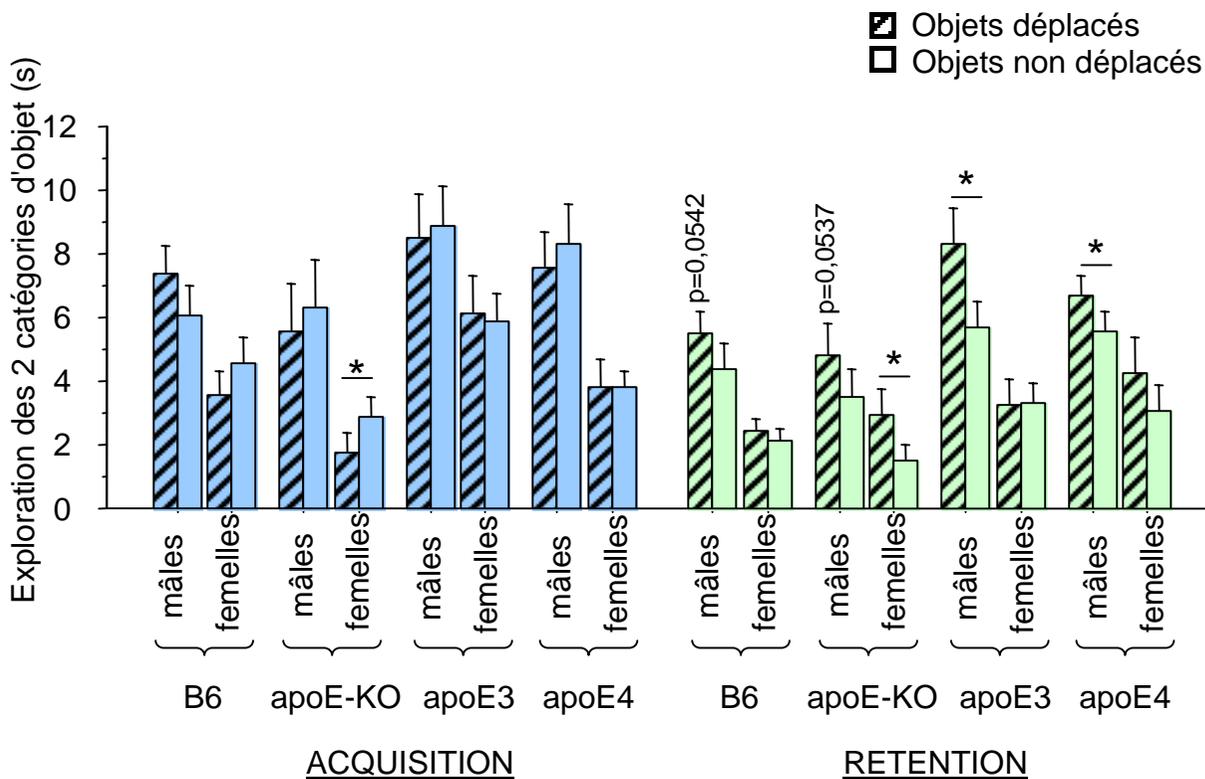


Figure 34 : Exploration des objets déplacés et non déplacés lors des séances d'acquisition et de rétention de la tâche de reconnaissance spatiale

Durant la séance d'acquisition, les deux catégories d'objets ont globalement été explorés de la même façon. Durant la séance de rétention, les mâles ont montré de relativement bonnes performances de reconnaissance spatiale, contrairement aux femelles (sauf pour les femelles apoE-KO).

La valeur d'exploration des deux catégories d'objets est exprimée en moyenne + erreur-type calculées sur les 15 mn de chaque séance (acquisition et rétention).

* = Différence entre objets déplacés et non déplacés à $p < 0,05$

Un effet du génotype est mis en évidence au cours des deux séances (*acquisition* : $F(3,56) = 3,34$; $p = 0,026$; *réretention* : $F(3,56) = 3,33$; $p = 0,026$). Les souris apoE3 explorent plus les objets que les souris apoE-KO à la séance d'acquisition (*test de Fisher* : *apoE3 vs apoE-KO* : $p = 0,003$; *autres comparaisons* : $p \geq 0,054$), et les souris apoE3 et apoE4 ont plus exploré les objets que les souris B6 et apoE-KO à la séance de réretention (*test de Fisher* : *apoE3 vs B6 et apoE3 vs apoE-KO* : $p \leq 0,049$; *apoE4 vs apoE-KO* : $p = 0,022$; *autres comparaisons* : $p \geq 0,094$). L'analyse restreinte aux souris apoE3 et apoE4 ne montre pas de différence entre les deux lignées (*acquisition* : *génotype* : $F(1,28) = 1,14$; $p = 0,295$; *réretention* : *génotype* : $F(1,28) = 0,08$; $p = 0,781$).

En résumé, les souris mâles explorent davantage les objets par rapport aux souris femelles. Les souris apoE3, et dans une moindre mesure les souris apoE4, explorent plus les objets que les souris apoE-KO.

Performance de reconnaissance

Au cours de la séance d'acquisition, l'ensemble des souris des 4 lignées a exploré les deux catégories d'objets (déplacés et non déplacés) de la même façon (*catégorie d'objet* : $F(1,56) = 1,60$; $p = 0,211$; *pas d'interactions ni avec le sexe, ni avec le génotype*). Néanmoins, lorsque l'analyse est réalisée pour chaque sexe et chaque génotype (**voir figure 34, partie bleue**), les mâles B6 ont montré une tendance à préférer la catégorie des objets déplacés (*catégorie d'objet* : $F(1,7) = 4,83$; $p = 0,064$) et les femelles apoE-KO ont significativement préféré la catégorie des objets non déplacés (*catégorie d'objet* : $F(1,7) = 14,04$; $p = 0,007$). Tous les autres groupes ont exploré les deux catégories d'objets de la même façon ($F(1,7) \leq 1,60$; $p \geq 0,247$).

L'analyse restreinte aux souris apoE3 et apoE4 n'a montré aucune différence entre les deux lignées, qui ont exploré les deux catégories d'objets de la même façon (pas d'effet de la catégorie d'objet, ni d'interactions avec d'autres facteurs).

Durant la séance de réretention, l'ensemble des souris (4 lignées confondues) a préféré les objets déplacés aux objets non déplacés (*catégorie d'objet* : $F(1,56) = 49,41$; $p < 0,0001$; *catégorie d'objet x génotype* : $F(3,56) = 0,81$; $p = 0,492$). La performance des mâles a été meilleure que celle des femelles (*catégorie d'objet x sexe* : $F(1,56) = 6,52$; $p = 0,013$). De

plus, leur performance a été dépendante du génotype contrairement à celle des femelles (*catégorie d'objet x sexe x génotype* : $F(3,56) = 4,27$; $p = 0,009$; *catégorie d'objet x génotype* : pour les mâles : $F(3,28) = 3,02$; $p = 0,046$; pour les femelles : $F(3,28) = 2,16$; $p = 0,115$).

D'un côté, même si l'ensemble des femelles montre une préférence pour les objets déplacés (*catégorie d'objet* : femelles : $F(1,28) = 9,01$; $p = 0,006$), celle-ci apparaît très faible sauf pour les femelles apoE-KO (*catégorie d'objet* : femelles B6 : $F(1,7) = 0,63$; $p = 0,453$; femelles apoE-KO : $F(1,7) = 12,76$; $p = 0,009$; femelles apoE3 : $F(1,7) = 0,01$; $p = 0,906$; femelles apoE4 : $F(1,7) = 4,05$; $p = 0,084$; voir figure 34, partie verte). D'un autre côté, les mâles montrent dans leur ensemble de bonnes performances de reconnaissance spatiale (*catégorie d'objet* : mâles : $F(1,28) = 51,68$; $p < 0,0001$), mais celle-ci est plus marquée pour les mâles apoE3 et apoE4 que pour les mâles apoE-KO et B6 (*catégorie d'objet* : mâles B6 : $F(1,7) = 5,34$; $p = 0,054$; mâles apoE-KO : $F(1,7) = 5,37$; $p = 0,054$; mâles apoE3 : $F(1,7) = 45,62$; $p = 0,0003$; mâles apoE4 : $F(1,7) = 25,31$; $p = 0,001$).

La comparaison des souris apoE3 et apoE4 confirme que seules les souris de sexe mâle montrent de bonnes performances (*catégorie d'objet x sexe* : $F(1,28) = 9,12$; $p = 0,005$; *catégorie d'objet pour les mâles* : $F(1,14) = 69,93$; $p < 0,0001$; *catégorie d'objet pour les femelles* : $F(1,14) = 2,08$; $p = 0,171$).

En résumé, les mâles ont globalement montré de bonnes performances de reconnaissance spatiale, en particulier ceux des deux lignées « knock-in ». Par contre, les femelles ont globalement montré des performances relativement faibles, excepté les femelles apoE-KO.

Lors de la séance de rétention, l'exploration des objets et l'activité locomotrice des femelles étaient systématiquement plus faibles que celles des mâles quelle que soit la lignée (voir figure 32). De plus, le test de corrélation de Spearman a effectivement montré que l'exploration totale des objets était liée au niveau d'activité locomotrice au cours de la séance d'acquisition ($p < 0,05$) et au cours de la séance de rétention ($p < 0,05$). Il est possible que la comparaison des temps d'exploration des deux catégories d'objets ne soit pas adaptée pour évaluer une performance de reconnaissance chez des souris femelles explorant peu. Nous avons également analysé les données en calculant un indice de reconnaissance spatiale

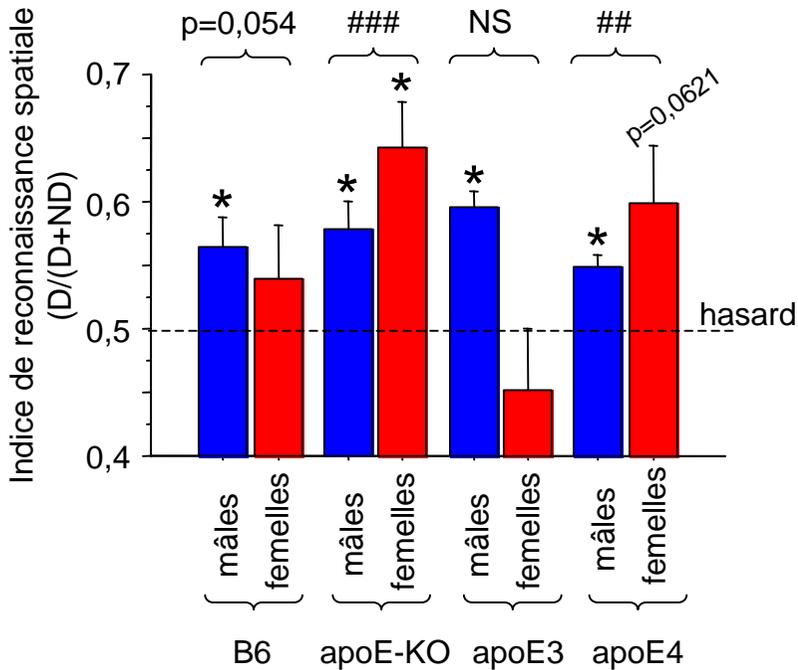


Figure 35 : Indice de reconnaissance spatiale

Les mâles présentent tous de bonnes performances (valeur de l'indice significativement supérieure au hasard), alors que seules les femelles apoE-KO montrent de bonnes performances.

L'indice de reconnaissance (moyenne + erreur-type), est calculé en divisant l'exploration moyenne des objets déplacés (D) par la somme des moyennes des explorations des objets déplacés et non déplacés (D+ND).

* = Différent du hasard à $p < 0,05$ (sexes séparés)

et ### = Différent du hasard respectivement à $p < 0,01$ et $p < 0,001$ (sexes confondus)

NS = non significatif

($D/(D+ND)$), ce qui permet de s'affranchir des différences de niveau d'exploration totale des objets dans l'évaluation de la performance. Comme nous l'avions supposé, l'effet lié au facteur sexe n'apparaît pas lorsque les données sont analysées en terme d'indice de reconnaissance (*sexe* : $F(1,56) = 0,37$; $p = 0,546$). Par contre, nous constatons que l'effet du génotype est proche de la significativité (*génotype* : $F(3,56) = 2,41$; $p = 0,076$). Or, comme l'indique la **figure 35**, l'effet du génotype varie nettement en fonction du sexe (*sexe x génotype* : $F(3,56) = 4,08$; $p = 0,011$). Les mâles des 4 lignées ne diffèrent pas entre eux (*génotype* : $F(3,28) = 1,28$; $p = 0,299$) et présentent des indices de reconnaissance supérieurs au hasard (*test de Student* : $p \leq 0,038$ pour les 4 lignées). Par contre, dans les groupes de souris femelles, seules les souris apoE-KO ont obtenu un indice de reconnaissance significativement différent du hasard (*génotype* : $F(3,28) = 3,58$; $p = 0,026$; *test de Student* : $B6$: $p = 0,405$; *apoE-KO* : $p = 0,007$; *apoE3* : $p = 0,350$; *apoE4* : $p = 0,062$).

L'analyse restreinte aux souris « knock-in » montre uniquement une interaction sexe x génotype ($F(1,28) = 8,24$; $p = 0,008$). En effet, les mâles apoE3 ont en moyenne un meilleur indice de reconnaissance que les femelles apoE3 (*sexe : apoE3* : $F(1,14) = 8,26$; $p = 0,012$), alors que les indices des mâles et des femelles apoE4 ne diffèrent pas significativement entre eux (*sexe : apoE4* : $F(1,14) = 1,21$; $p = 0,290$).

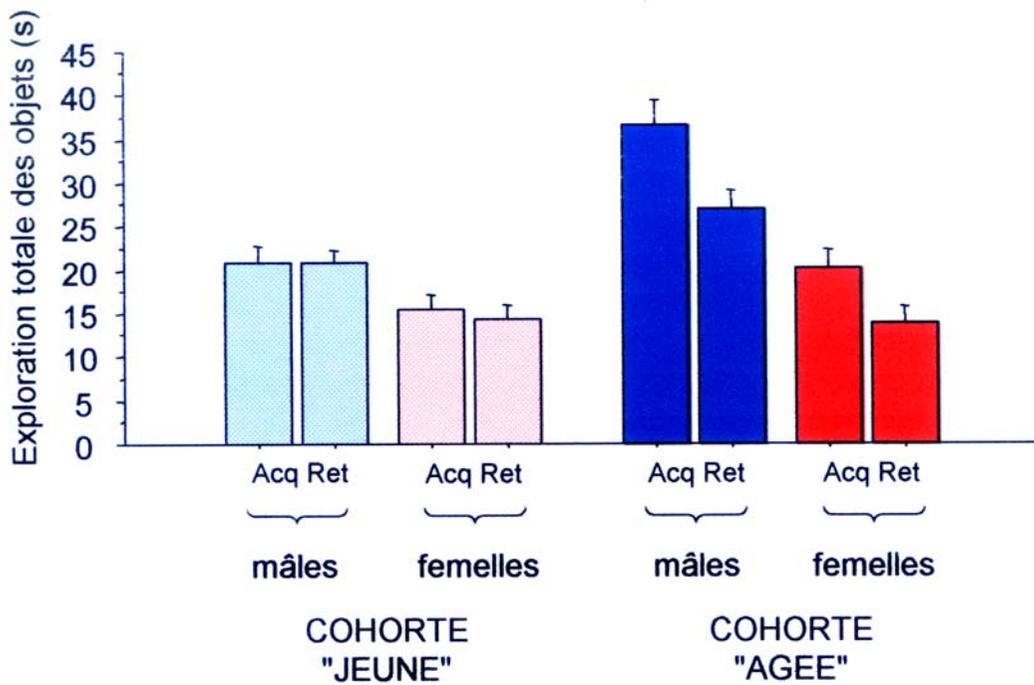
REMARQUE : la très faible valeur de l'indice de reconnaissance chez les souris femelles apoE3 (d'après la figure 34, l'indice devrait approcher 0,5) vient du fait qu'une souris apoE3 femelle a très peu exploré les objets déplacés lors de la séance de rétention. Les valeurs très faibles d'exploration obtenues pour cette souris (objets déplacés = 0,415 s et objets non déplacés = 2,067 s) ont abouti à un indice de reconnaissance de 0,167.

En résumé, l'analyse des résultats en terme d'indice de reconnaissance spatiale confirme les bonnes performances des mâles des 4 lignées et des femelles apoE-KO, ainsi que les performances relativement faibles des autres lignées de souris femelles.

Comparaison avec la cohorte des souris « jeunes »

Bien que les deux cohortes n'aient pas été testées au même moment, il nous a paru intéressant de comparer les résultats obtenus entre la cohorte de souris « jeunes » et celle des souris « âgées ».

A.



B.

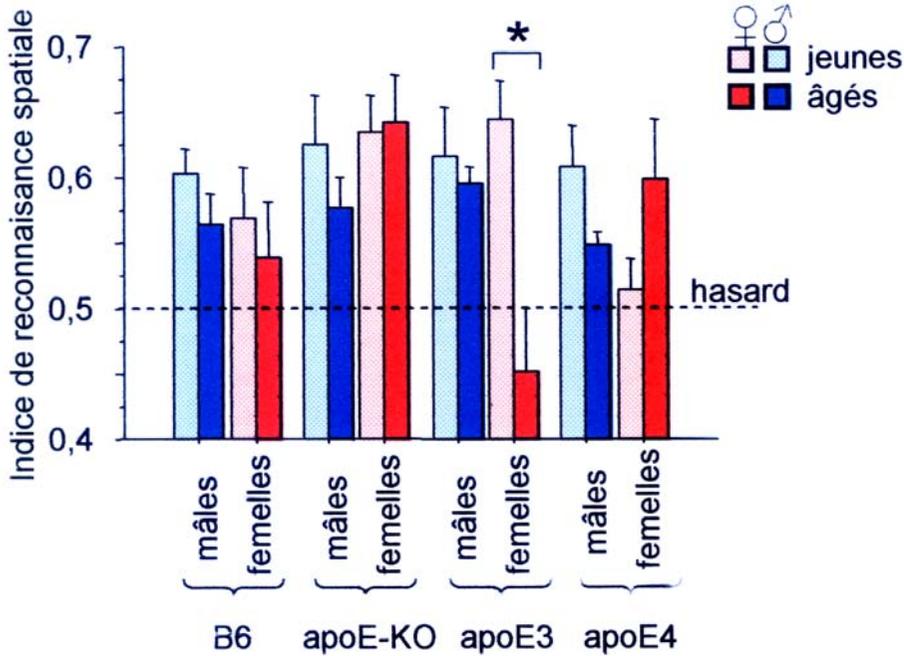


Figure 36 : Comparaison des performances de reconnaissance spatiale des cohortes "jeune" et "âgée"

A. L'exploration totale des objets est indiquée par la moyenne + erreur-type pendant les séances d'acquisition (Acq) et de rétention (Ret). On constate que les souris "âgées" explorent davantage les objets par rapport aux souris "jeunes".

B. L'indice de reconnaissance à la séance de rétention est indiqué en moyennes + erreur-type. La performance semble globalement diminuer avec l'âge.

* = Différent des souris "jeunes" à p<0,05.

Sur la **partie A de la figure 36**, on constate que les souris de la cohorte « âgée » ont exploré davantage les objets par rapport aux souris de la cohorte « jeune » pendant la séance d'acquisition uniquement (*âge : acquisition : $F(1,113) = 23,63 ; p < 0,0001$; rétention : $F(1,113) = 2,88 ; p = 0,092$). Cette augmentation de l'exploration des objets avec l'âge durant la séance d'acquisition semble être plus marquée chez les mâles que chez les femelles (*âge x sexe : $F(1,113) = 6,80 ; p = 0,010$; effet de l'âge pour les mâles : $F(1,57) = 21,77 ; p < 0,0001$; pour les femelles : $F(1,56) = 3,58 ; p = 0,064$). Aucun autre effet (ou interaction) n'a été mis en évidence lors des séances d'acquisition ou de rétention (non représenté).**

Concernant les performances en terme d'indice de reconnaissance spatiale (voir **figure 36, B**), nous constatons que celles des souris « âgées » sont globalement plus faibles que celles des souris « jeunes » (*âge : $F(1,113) = 5,32 ; p = 0,023$; âge x sexe x génotype : $F(3,113) = 4,31 ; p = 0,006$). En effet, les performances semblent diminuer avec l'âge, en particulier pour les souris femelles apoE3 et, dans une moindre mesure, pour les souris mâles apoE4 (*femelles apoE3 : $F(1,14) = 11,68 ; p = 0,004$; mâles apoE4 : $F(1,14) = 3,58 ; p = 0,079$; autres groupes : $F(1,14-15) \leq 2,85 ; p \geq 0,114$).**

6. Test de la piscine de Morris

a. Vitesse de nage

Durant l'essai de « nage libre » (avant le protocole de mémoire de référence), les vitesses de nage ont été calculées et présentées dans le tableau ci-après. L'analyse révèle que les souris apoE3 ont eu tendance à nager moins vite que les souris apoE4 et B6, (*génotype : $F(3,53) = 2,70 ; p = 0,055$) indépendamment du sexe des animaux (*sexe : $F(1,53) = 2,48 ; p = 0,121$; sexe x génotype : $F(3,53) = 1,20 ; p = 0,319$). L'analyse limitée aux deux lignées transgéniques apoE4 et apoE3 confirme que les souris apoE3 ont nagé moins vite que les souris apoE4 (*génotype : $F(1,27) = 4,70 ; p = 0,039$; sexe : $F(1,27) = 2,21 ; p = 0,149$; sexe x génotype : $F(1,27) = 1,88 ; p = 0,181$).***

Puisque toutes les souris n'ont pas nagé à la même vitesse, nous avons préférentiellement analysé les performances d'apprentissage en terme de distance parcourue jusqu'à la plate-forme, plutôt qu'en terme de latence d'atteinte de la plate-forme.

Durant le test de rétention (après le protocole de mémoire de référence), les vitesses de nage ont également été calculées (voir tableau ci-après). Lors de cet essai, les souris de

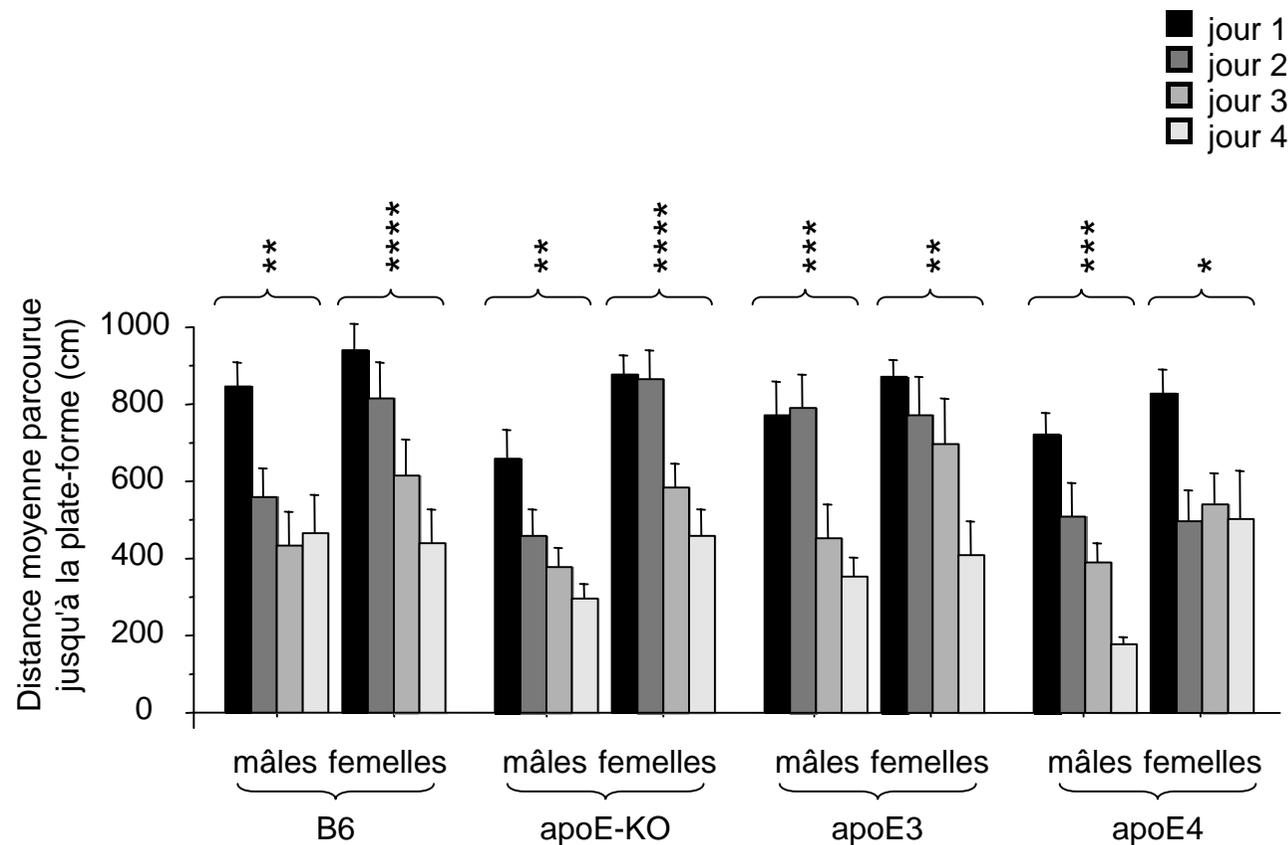


Figure 37 : Performances d'apprentissage de la tâche de mémoire de référence dans la piscine de Morris (4j)

Les performances sont exprimées en terme de distance parcourue pour rejoindre la plate-forme (moyenne + erreurs-type des distances parcourues au cours des 4 essais d'un jour donné).

ANOVA : Effet du jour d'apprentissage à * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$

chaque lignée ont montré la même vitesse de nage (*génotype* : $F(3,53) = 2,46$; $p = 0,072$; *sexe* : $F(1,53) = 0,49$; $p = 0,487$; *sexe x génotype* : $F(3,53) = 0,65$; $p = 0,588$). Aucune différence n'a été mise en évidence entre les souris apoE3 et apoE4 lors du test de rétention ($F(1,27) \leq 1,08$; $p \geq 0,308$).

Vitesse de nage à l'essai de « nage libre » (moyenne en cm/s ± erreur standard)				
lignée sexe	B6	apoE-KO	apoE3	apoE4
mâles	17,2 ± 0,8	15,3 ± 0,3	15,9 ± 0,8	16,6 ± 0,9
femelles	15,9 ± 0,7	15,6 ± 0,5	13,5 ± 0,8	16,5 ± 0,8
Vitesse de nage au test de rétention (<i>probe trial</i>) (moyenne en cm/s ± erreur standard)				
lignée sexe	B6	apoE-KO	apoE3	apoE4
mâles	19,1 ± 0,6	18,0 ± 1,2	18,0 ± 0,8	19,0 ± 0,7
femelles	20,4 ± 0,6	16,9 ± 0,9	18,8 ± 1,4	19,8 ± 0,6

b. Tâche de mémoire de référence (4j)

Dans la tâche de mémoire de référence, la plate-forme invisible est localisée au centre du quadrant Ouest (=quadrant cible). Les souris sont déposées dans le bassin à partir de 4 points de lâcher différents, chacun des 4 points de lâcher étant utilisé quotidiennement. Les performances sont analysées en terme de moyenne des 4 essais pour un même jour. L'analyse des performances du premier jour montre que les 4 lignées de souris présentent un niveau de base semblable (*génotype* : $F(3,53) = 1,67$; $p = 0,185$), les mâles étant meilleurs que les femelles (*sexe* : $F(1,53) = 8,42$; $p = 0,005$; *sexe x génotype* : $F(3,53) = 0,41$; $p = 0,747$). La comparaison des souris apoE3 et apoE4 ne montre aucune différence entre les deux lignées (*génotype* : $F(1,27) = 0,55$; $p = 0,466$; *sexe* : $F(1,27) = 2,68$; $p = 0,113$; *sexe x génotype* : $F(1,27) = 0,01$; $p = 0,945$).

Globalement, les souris réduisent la distance parcourue pour rejoindre la plate-forme au cours des 4 jours d'apprentissage (*jour* : $F(3,159) = 53,75$; $p < 0,0001$). Sur la **figure 37**, on peut voir que les mâles ont été plus performants que les femelles (*sexe* : $F(1,53) = 20,10$; $p < 0,0001$). Les souris apoE4 ont été globalement plus performantes que les souris apoE3 et

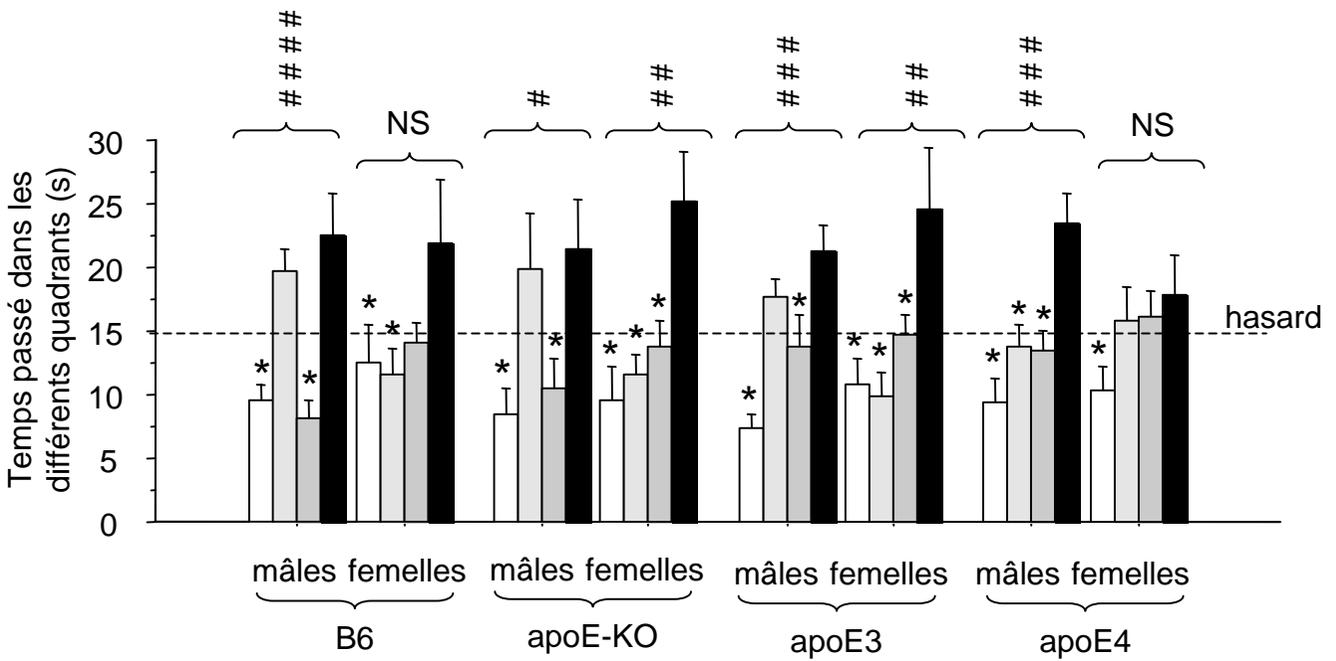


Figure 38 : Performances des différentes lignées lors du test de rétention

Le temps passé dans les différents quadrants est indiqué par la moyenne + erreur-type lors du test de rétention (60s sans plate-forme).

#, ##, ###, #### = Effet quadrant respectivement à $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$ et $p < 0,0001$.

* = Différent du quadrant cible à $p < 0,05$

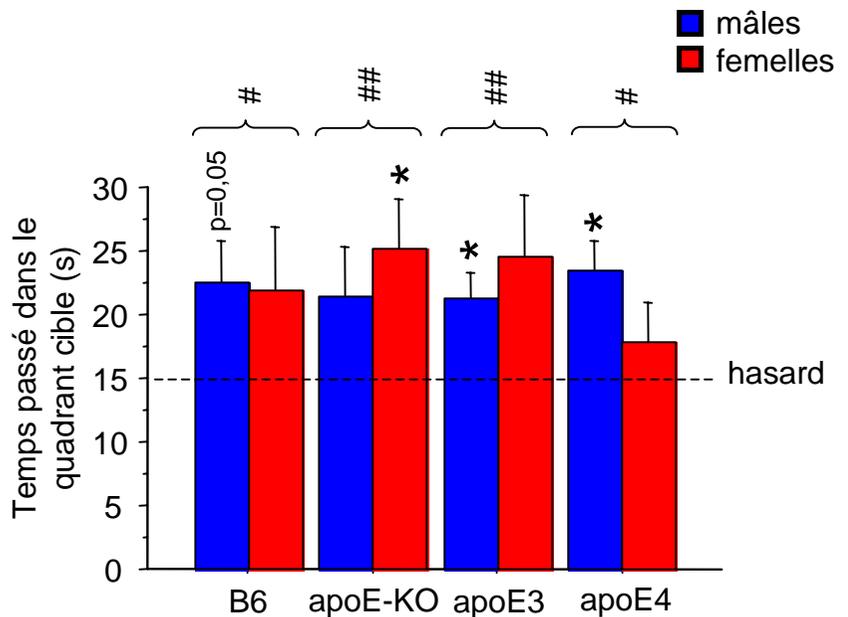
- Quadrant Est
- Quadrant Sud
- Quadrant Nord
- Quadrant Ouest (cible)

Figure 39 : Temps passé dans le quadrant cible lors du test de rétention

Le temps passé dans le quadrant cible est indiqué par la moyenne + erreur-type.

#, ## = Différent du hasard respectivement à $p < 0,05$ et $p < 0,01$ (test de Student, sexes confondus)

* = Différent du hasard à $p < 0,05$ (test de Student, sexes séparés)



B6 (*génotype* : $F(3,53) = 2,93$; $p = 0,042$; *génotype x sexe* : $F(3,53) = 0,91$; $p = 0,441$; *génotype x jour* : $F(9,159) = 1,05$; $p = 0,404$; *génotype x sexe x jour* : $F(9,159) = 1,80$; $p = 0,071$; *test de Fisher* : apoE4 vs B6 et apoE3 : respectivement $p = 0,017$ et $p = 0,023$). L'amélioration de la performance au cours de l'apprentissage a été confirmée pour chaque groupe pris individuellement (*effet jour* : $F(3,15 \text{ à } 21) \geq 3,28$; $p \leq 0,041$). La comparaison des souris apoE3 et apoE4 a confirmé la meilleure performance des souris apoE4 par rapport aux souris apoE3 et des mâles par rapport aux femelles (*sexe* : $F(1,27) = 6,41$; $p = 0,017$; *génotype* : $F(1,27) = 6,37$; $p = 0,018$; *sexe x génotype* : $F(1,27) = 0,27$; $p = 0,607$).

L'analyse des performances du dernier jour montre que les 4 lignées de souris ont atteint un niveau de performance similaire (*génotype* : $F(3,53) = 0,70$; $p = 0,554$), bien que celui des mâles reste meilleur que celui des femelles (*sexe* : $F(1,53) = 5,23$; $p = 0,026$; *sexe x génotype* : $F(3,53) = 1,84$; $p = 0,151$). La comparaison des lignées apoE3 et apoE4 donne le même type de résultats (*génotype* : $F(1,27) = 0,24$; $p = 0,625$; *sexe* : $F(1,27) = 5,78$; $p = 0,023$; *sexe x génotype* : $F(1,27) = 3,02$; $p = 0,093$).

En résumé, on peut dire que toutes les lignées ont amélioré de la même façon leur capacité à retrouver la plate-forme invisible au cours de l'apprentissage. Les mâles des 4 lignées ont présenté de meilleures performances que les femelles.

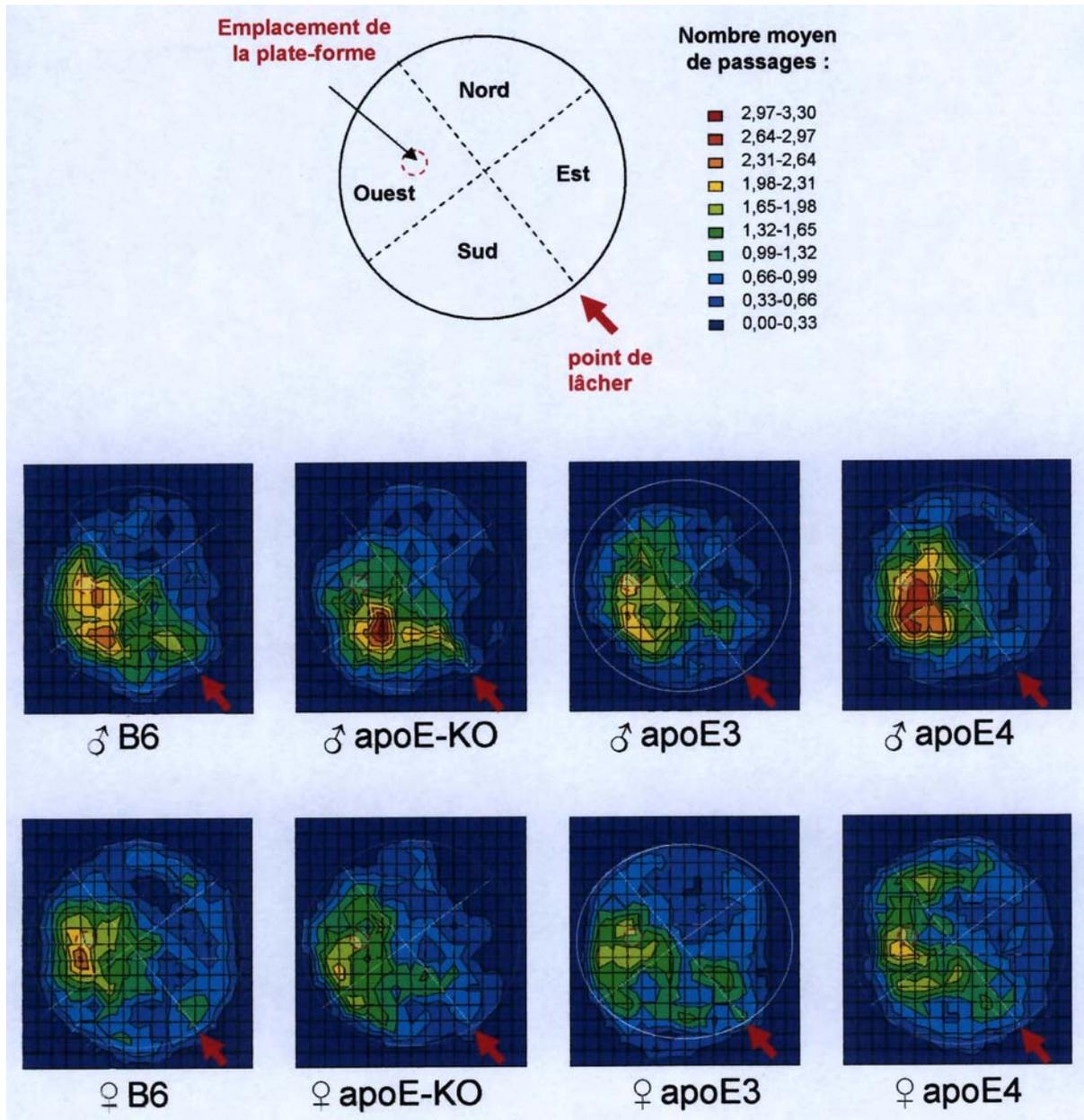
c. Test de rétention (probe trial, 1 j)

Lors du test de rétention 24 h après la fin de l'apprentissage, la plate-forme est retirée et les souris nagent librement dans le bassin pendant 60 secondes. On évalue la performance par le temps passé dans le quadrant cible qui contenait la plate-forme pendant l'apprentissage (ici le quadrant Ouest).

L'ANOVA montre que toutes les souris ont globalement préféré le quadrant cible aux trois autres quadrants (*quadrant* : $F(3,212) = 34,08$; $p < 0,0001$; *test de Fisher* : *quadrant cible vs les 3 autres quadrants* : $p < 0,0001$). On peut voir sur la **figure 38** que les quatre lignées ont globalement montré de bonnes performances (*quadrant x génotype* : $F(9,212) = 0,62$; $p = 0,780$; *quadrant x génotype x sexe* : $F(9,212) = 1,31$; $p = 0,231$), bien qu'il existe une interaction *quadrant x sexe* ($F(3,212) = 4,53$; $p = 0,004$). Les souris des deux sexes ont préféré le quadrant cible (*test de Fisher* : *quadrant cible vs les 3 autres quadrants* : *femelles* : $p \leq 0,002$; *mâles* : $p \leq 0,004$), bien que chez les mâles, le temps passé dans le quadrant Sud,

Figure 40 : Fréquentation du bassin durant le test de rétention

Pour les huit groupes de souris (mâles et femelles des lignées B6, apoE-KO, apoE3 et apoE4), la fréquentation du bassin est indiquée par un code couleur. Les couleurs "froides" (bleu) indiquent les zones du bassin les moins fréquentées et les couleurs "chaudes" (jaune à rouge) les zones du bassin les plus fréquentées. La plate-forme, absente lors de ce test de rétention, était située dans le quadrant Ouest (en haut sur la figure). Le point de lâcher des souris est indiqué par la flèche rouge.



adjacent au quadrant cible, ait été important (*test de Fisher : quadrant Sud vs quadrant Nord et Est : $p \leq 0,0002$*).

La comparaison des performances des souris apoE3 et apoE4 permet de mettre clairement en évidence la très faible performance des souris apoE4 femelles (voir **figure 38**). En effet, l'ANOVA souligne une interaction sexe x génotype x quadrant ($F(3,108) = 2,93 ; p = 0,037$), car les souris apoE4 femelles sont les seules qui aient exploré tous les quadrants de la même façon (*effet du quadrant : apoE3 mâles : $F(3,28) = 10,23 ; p = 0,0001$; apoE3 femelles : $F(3,24) = 5,39 ; p = 0,006$; apoE4 mâles : $F(3,28) = 9,80 ; p = 0,0001$; apoE4 femelles : $F(3,28) = 1,78 ; p = 0,174$*).

Le temps passé dans le quadrant cible a été supérieur au niveau du hasard pour chacune des 4 lignées de souris. Néanmoins, la performance de chaque groupe pris individuellement (génotypes et sexes séparés) est restée relativement faible (voir **figure 39**): la fréquentation du quadrant cible n'a que rarement atteint une valeur significativement supérieure au hasard (test de Student, sexes confondus et sexes séparés : voir tableau ci-après).

		Probabilité que le temps passé dans le quadrant cible ne soit pas supérieur au niveau du hasard (test de Student)			
		B6	apoE-KO	apoE3	apoE4
lignée	sexe				
sexes confondus		<u>p=0,0233</u>	<u>p=0,0089</u>	<u>p=0,0060</u>	<u>p=0,0130</u>
mâles		p=0,0503	p=0,1782	<u>p=0,0143</u>	<u>p=0,0088</u>
femelles		p=0,2094	<u>p=0,0357</u>	p=0,0945	p=0,3857

La représentation de la fréquentation du bassin par les différents groupes de souris (voir **figure 40**) illustre le déficit des souris apoE4 femelles qui semblent présenter une recherche de la plate-forme moins précise que celle des autres groupes. En effet, la fréquentation du bassin par les souris apoE4 femelles semble « s'étaler » sur les quadrants Nord, Ouest et Sud, au lieu de se focaliser sur le quadrant cible Ouest, comme pour les souris des autres groupes.

En résumé, on peut dire que les 4 lignées de souris (sexes confondus) ont montré de bonnes performances lors de cet essai-test. Par contre, la comparaison des deux lignées apoE3 et apoE4 a clairement mis en évidence un déficit de performance chez les souris femelles apoE4.

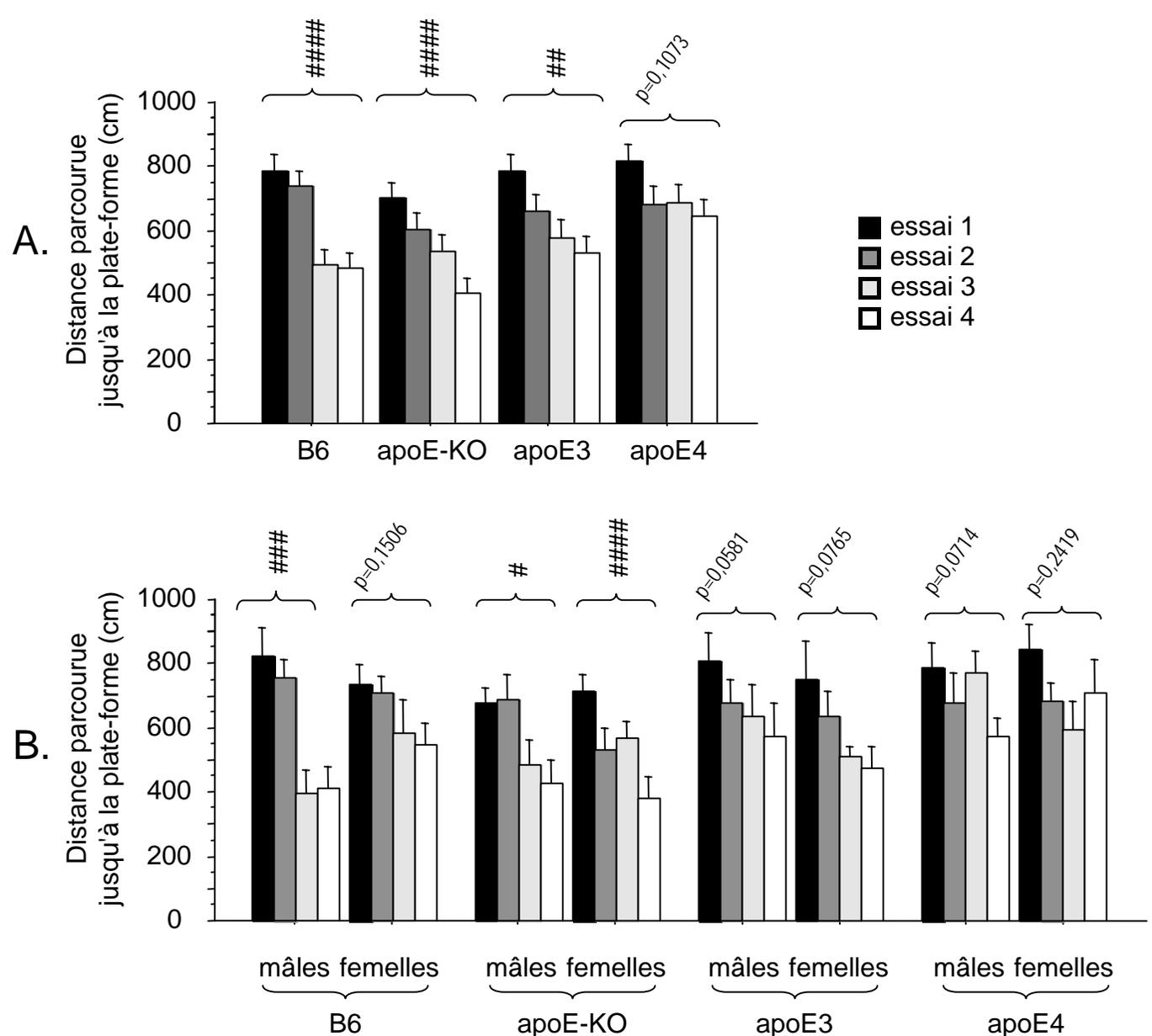


Figure 41 : Distance parcourue pour rejoindre la plate-forme dans le protocole d'appariement différé (DMP) du test de la piscine de Morris

Les résultats sont exprimés en moyenne + erreur-type des distances (en cm) parcourues au cours des 4 essais, sur les 4 jours d'apprentissage.

A. Sexes confondus : contrairement aux trois autres lignées, les souris apoE4 n'améliorent pas leur performance au cours des 4 essais.

B. Sexes séparés : l'amélioration des performances des souris apoE3 et des souris apoE4 n'atteint pas le seuil de significativité lorsque les deux sexes sont considérés séparément.

#, ##, ###, ##### = Amélioration significative au cours des 4 essais respectivement à $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$; et $p < 0,0001$.

d. Tâche d'appariement différé (delayed matching-to-place task – 4j)

Dans la tâche d'appariement différé, l'emplacement de la plate-forme est modifié d'un jour à l'autre, mais reste constant au cours des 4 essais d'un même jour. La **figure 41** (partie A : sexes séparés ; partie B : sexes confondus) indiquent les résultats obtenus lors de cette tâche, en terme de distance parcourue jusqu'à la plate-forme lors de chaque essai.

Au premier essai, c'est-à-dire à chaque fois que la plate-forme se trouvait à un nouvel emplacement, les 4 lignées de souris ont toutes parcouru des distances comparables (*génotype* : $F(3,53) = 0,73$; $p = 0,539$; *sexe* : $F(1,53) = 0,03$; $p = 0,851$; *sexe x génotype* : $F(3,53) = 0,39$; $p = 0,759$).

Entre le premier et le deuxième essai, séparés par un délai d'une heure, les souris (4 lignées confondues) améliorent toutes leurs performances ($F(1,53) = 11,05$; $p = 0,002$), et aucun autre effet (sexe, génotype, interactions) n'a été mis en évidence. Néanmoins, on peut remarquer que l'amélioration des performances entre ces deux essais séparés d'une heure est relativement modeste (voir tableau ci-après). Lorsque les génotypes sont séparés (voir **figure 41, A**), seule la lignée apoE3 montre une amélioration significative de ses performances entre les essais 1 et 2 ; et lorsque les sexes et les génotypes sont séparés (voir **figure 41, B**), seul le groupe des femelles apoE-KO montre une amélioration significative de ses performances entre les essais 1 et 2.

Amélioration (diminution des distances parcourues) <u>entre les essais 1 et 2</u>				
lignée \ sexe	B6	apoE-KO	apoE3	apoE4
sexes confondus	p=0,4292	p=0,1174	<u>p=0,0440</u>	p=0,0635
mâles	p=0,5139	p=0,8844	p=0,0787	p=0,2353
femelles	p=0,6760	<u>p=0,0249</u>	p=0,2614	p=0,1668

Les 3 derniers essais (essais 2, 3 et 4) étaient séparés chacun par un délai de 5 minutes. Tous les groupes de souris ont parcouru la même distance jusqu'à la plate-forme lors de l'essai 2 (*génotype* : $F(3,53) = 0,97$; $p = 0,412$; *sexe* : $F(1,53) = 1,38$; $p = 0,246$; *sexe x génotype* : $F(3,53) = 0,42$; $p = 0,738$). L'ensemble des souris (4 lignées confondues) a amélioré ses performances entre les essais 2 et 4 (*essai* : $F(1,53) = 26,23$; $p < 0,0001$). Il

semble néanmoins que toutes les lignées n'aient pas clairement exprimé cette amélioration (*essai x génotype* : $F(3,53) = 2,42$; $p = 0,077$). En effet, lorsque les lignées sont séparées (voir tableau ci-après), seules les souris apoE4 (sexes confondus) n'ont pas diminué leurs distances parcourues jusqu'à la plate-forme, à la différence des souris apoE-KO, B6 et apoE3 dans une moindre mesure. Bien qu'aucune interaction *essai x génotype x sexe* n'ait été mise en évidence, on peut remarquer que, lorsque les performances des groupes de souris sont analysées par génotype et par sexe (voir tableau ci-après), la diminution de la distance parcourue jusqu'à la plate-forme entre les essais 2 et 4 n'est significative que pour les groupes de souris B6 ou apoE-KO des deux sexes (voir tableau ci-après et **figure 41, B**).

Amélioration (diminution des distances parcourues) <u>entre les essais 2 et 4</u>				
lignée sexe	B6	apoE-KO	apoE3	apoE4
sexes confondus	<u>p=0,0004</u>	<u>p=0,0005</u>	p=0,0598	p=0,6101
mâles	<u>p=0,0055</u>	<u>p=0,0131</u>	p=0,2928	p=0,2321
femelles	<u>p=0,0435</u>	<u>p=0,0283</u>	p=0,1234	p=0,8378

Cette absence d'amélioration des souris apoE4 au cours des essais est également mise en évidence lorsque l'analyse porte sur la totalité des 4 essais. En effet, toutes les souris améliorent globalement leurs performances au cours des 4 essais (*essai* : $F(3,159) = 23,54$; $p < 0,0001$). Néanmoins, une tendance à un effet global du génotype ($F(3,53) = 2,38$; $p = 0,080$) suggère que la progression des performances n'est pas équivalente pour toutes les lignées. En effet, lorsqu'on analyse séparément les performances des différentes lignées (voir **figure 41, A**), les souris de la lignée apoE4 sont les seules à ne pas montrer d'amélioration au cours des 4 essais à la différence des lignées apoE3, apoE-KO et B6 (voir tableau ci-après). Lorsque les performances sont analysées par groupe et par sexe (voir **figure 41, B**), seuls les mâles apoE-KO, les mâles B6 et les femelles apoE-KO améliorent significativement leurs performances entre les essais 1 et 4 (voir tableau ci-après).

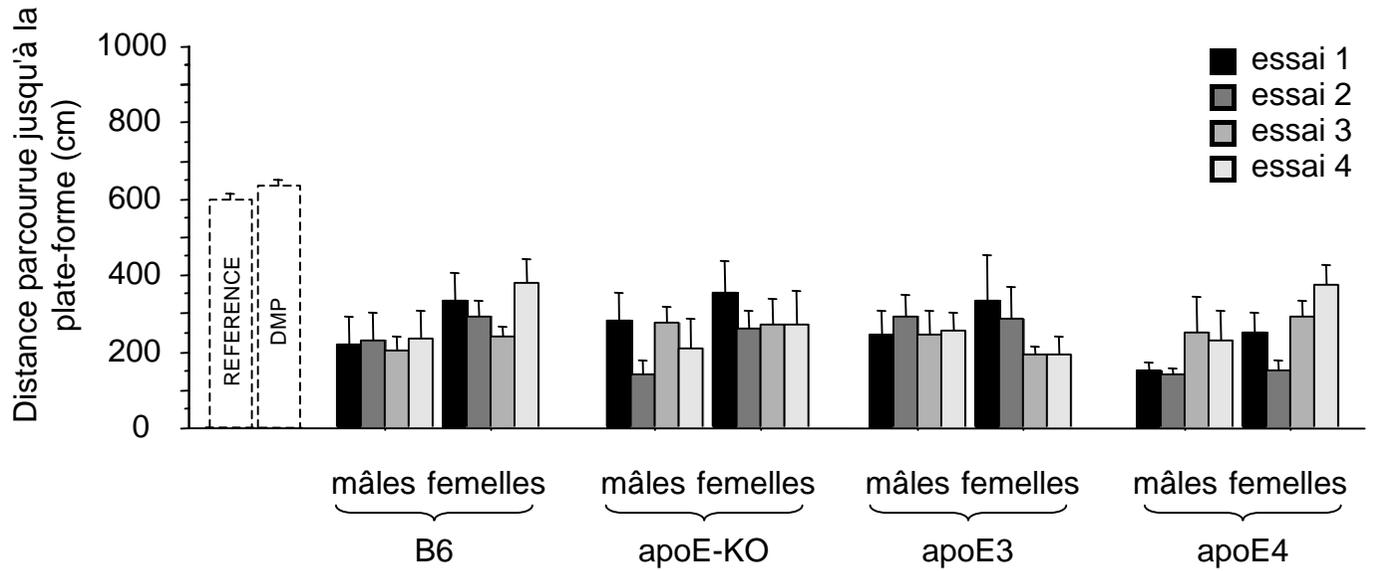


Figure 42 : Distance parcourue pour rejoindre la plate-forme visible

Tous les groupes de souris ont montré de bonnes performances au cours des 4 essais avec plate-forme visible. La distance parcourue est exprimée par la moyenne + erreur-type. Les deux premières barres en pointillés indiquent (pour mémoire) la distance moyenne parcourue par essai lors des protocoles de mémoire de référence (REFERENCE) et d'appariement différé (DMP) avec plate-forme invisible.

Amélioration (diminution des distances parcourues) <u>entre les essais 1 et 4</u>				
lignée Sexe	B6	apoE-KO	apoE3	apoE4
sexes confondus	<u>p<0,0001</u>	<u>p<0,0001</u>	<u>p=0,0028</u>	p=0,1073
mâles	<u>p=0,0002</u>	<u>p=0,0140</u>	p=0,0581	p=0,0714
femelles	p=0,1506	<u>p<0,0001</u>	p=0,0765	p=0,2419

Les différentes lignées de souris n'ont donc pas atteint le même niveau de performance lors du dernier essai (*génotype* : $F(3,53) = 3,05$; $p = 0,036$; *sexe* : $F(1,53) = 0,32$; $p = 0,573$; *sexe x génotype* : $F(3,53) = 1,19$; $p = 0,322$). En effet, les souris apoE4 ont été moins performantes au dernier essai que les souris B6 et apoE-KO (*test de Fisher* : respectivement $p = 0,043$ et $p = 0,004$).

e. Plate-forme visible (1 j)

Au lendemain du protocole d'appariement différé, les souris doivent au cours de 4 essais rejoindre la plate-forme rendue visible (intervalle inter-essais de 5 mn) et ceci, afin de tester l'absence de déficits visuo-moteurs des souris expérimentales. Le point de lâcher et l'emplacement de la plate-forme changent d'un essai à l'autre.

Au cours de ces 4 essais (voir **figure 42**), tous les groupes de souris ont rapidement rejoint la plate-forme visible (distance moyenne parcourue par essai = 248 ± 10 cm par opposition aux 593 ± 13 cm dans le protocole de mémoire de référence et aux 631 ± 13 cm dans le protocole DMP). Aucun effet du sexe ni du génotype n'a été mis en évidence (*génotype* : $F(3,53) = 0,34$; $p = 0,796$; *sexe* : $F(1,53) = 3,66$; $p = 0,061$; *sexe x génotype* : $F(3,53) = 0,57$; $p = 0,635$), ni d'effet de l'essai ($F(3,159) = 1,27$; $p = 0,288$; pas d'interaction avec d'autres facteurs), toutes les souris ayant obtenu de très bonnes performances.

7. Labyrinthe en Y

a. Voltage des chocs électriques

Pour l'apprentissage du labyrinthe en Y, le niveau des chocs électriques délivrés a été ajusté pour chaque souris lors des 2-3 premiers essais de la séance d'acquisition, de manière à

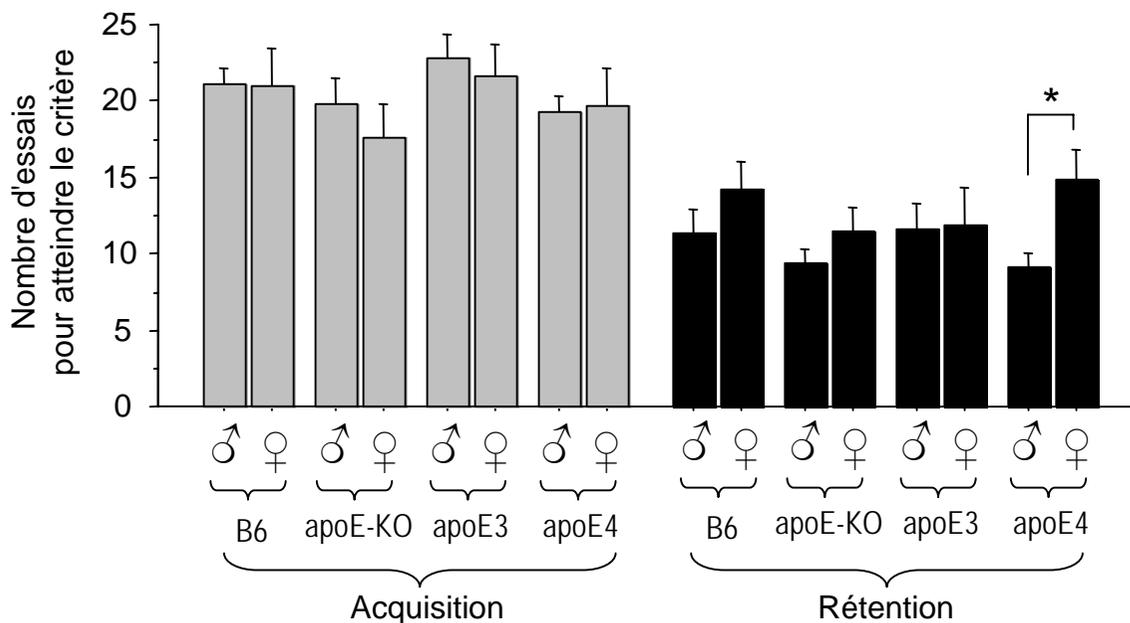


Figure 43 : Essais nécessaires pour atteindre le critère dans la tâche d'évitement actif dans le labyrinthe en Y

Les essais nécessaires aux différents groupes de souris pour atteindre le critère de 7 essais corrects sur 8 essais consécutifs sont indiqués par la moyenne + erreur-type.

* = Différence entre les mâles et les femelles à $p < 0,05$

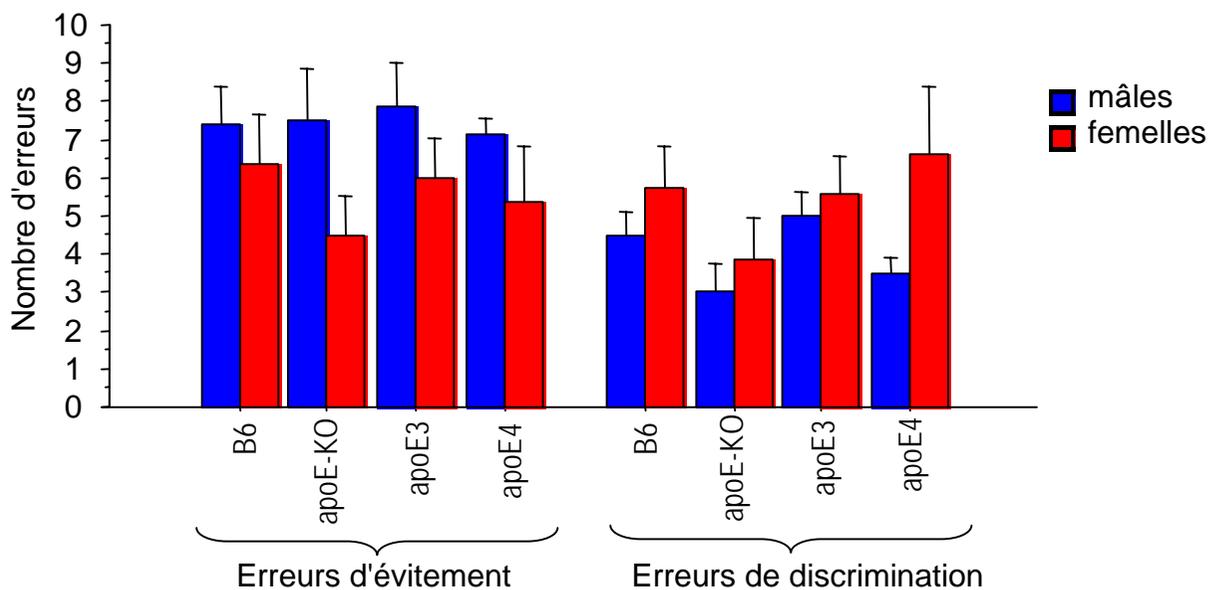


Figure 44 : Erreurs commises durant la séance d'acquisition de la tâche d'évitement actif dans le labyrinthe en Y

Les erreurs d'évitement ou de discrimination sont indiquées par la moyenne + erreur-type.

ce que l'animal lève immédiatement une ou deux pattes lors du choc (maximum 40V en courant alternatif). Les niveaux ainsi établis sont différents selon les groupes de souris (*génotype* : $F(3,53) = 6,48$; $p = 0,0008$; *sexe* : $F(1,53) = 0,14$; $p = 0,714$; *sexe x génotype* : $F(3,53) = 6,84$; $p = 0,0006$). Aucune différence du niveau de choc n'a été mise en évidence chez les femelles (*génotype* : $F(3,27) = 0,12$; $p = 0,950$), alors que chez les mâles, le niveau des chocs a été plus faible pour les souris apoE-KO que pour les souris des autres lignées (*génotype* : $F(3,26) = 8,96$; $p = 0,0003$; *test de Fisher* : apoE-KO vs B6, apoE3 et apoE4 : respectivement $p < 0,0001$; $p = 0,0001$ et $p = 0,001$). Lorsque l'analyse était restreinte aux souris apoE3 et apoE4, aucune différence dans le niveau de choc nécessaire n'a été mis en évidence entre les deux génotypes (*génotype* : $F(1,27) = 1,27$; $p = 0,270$; *sexe x génotype* : $F(1,27) = 0,13$; $p = 0,724$), mais le niveau de choc attribué aux mâles a été plus important que celui attribué aux femelles (*sexe* : $F(1,27) = 4,45$; $p = 0,044$).

Voltage des chocs électriques (moyenne \pm erreur-type)				
lignée sexe	B6	apoE-KO	apoE3	apoE4
Mâles	46,5 \pm 1,4V	37,5 \pm 2,1V	46,0 \pm 0,5V	44,6 \pm 1,0V
Femelles	43,2 \pm 0,7V	43,5 \pm 0,8V	43,7 \pm 0,5V	43,0 \pm 1,2V

Chez les souris « jeunes », le voltage était corrélé de façon significative au poids des animaux sur la population globale. Ce n'est pas le cas pour la cohorte de souris « âgées » ($z = 1,80$; $p = 0,072$).

b. Séance d'acquisition dans la tâche du labyrinthe en Y

Lors de la séance d'acquisition de la tâche, tous les groupes de souris ont présenté un nombre comparable d'essais pour atteindre le critère de 7 essais corrects sur 8 essais consécutifs (*sexe* : $F(1,53) = 0,33$; $p = 0,567$; *génotype* : $F(3,53) = 1,26$; $p = 0,296$; *sexe x génotype* : $F(3,53) = 0,17$; $p = 0,914$; voir **figure 43, barres grises**). De même, l'analyse restreinte aux souris apoE3 et apoE4 ne montre aucune différence entre les deux lignées (*sexe* : $F(1,27) = 0,04$; $p = 0,832$; *génotype* : $F(1,27) = 2,09$; $p = 0,160$; *sexe x génotype* : $F(1,27) = 0,17$; $p = 0,683$).

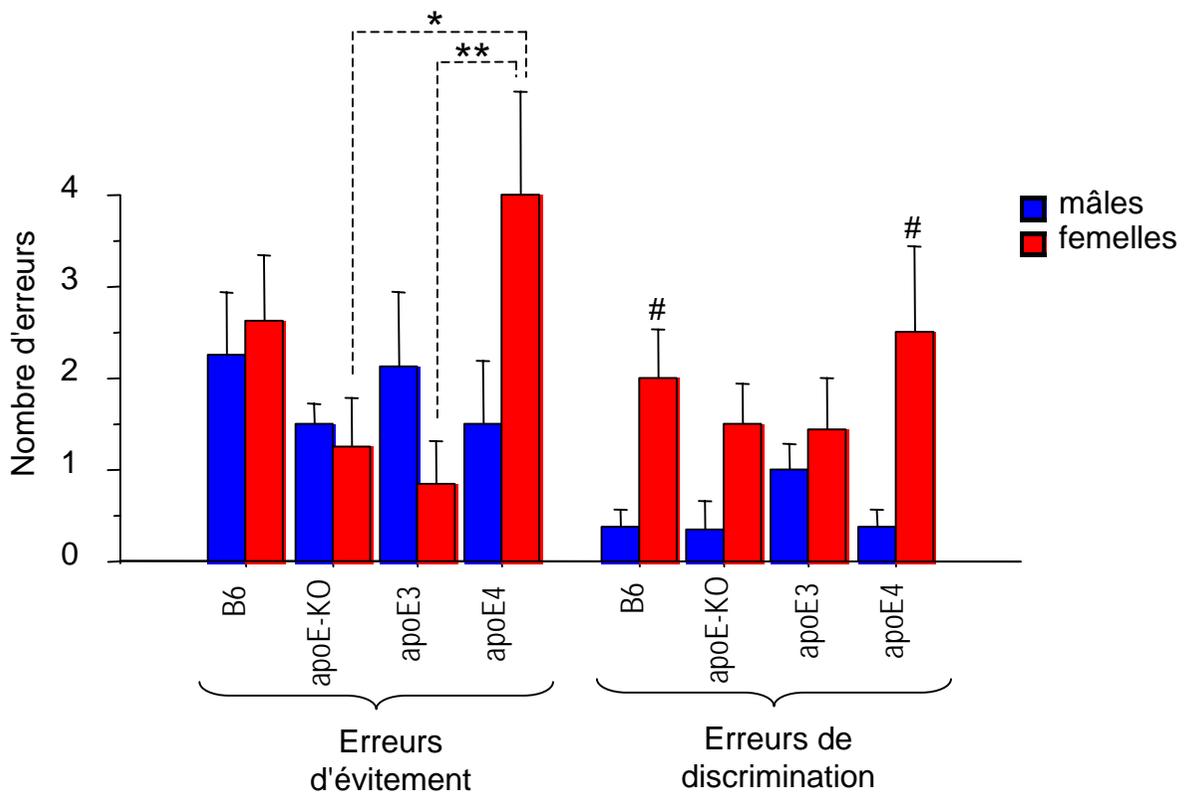


Figure 45 : Erreurs commises durant la séance de rétention de la tâche d'évitement actif dans le labyrinthe en Y

Les erreurs commises sont indiquées par la moyenne + erreur-type.

*, ** = Différence entre génotypes respectivement à $p < 0,05$ et $p < 0,01$

= Différences entre les mâles et les femelles à $p < 0,05$.

Le nombre d'erreurs d'évitement (voir **figure 44, partie gauche**) a été globalement plus important chez les mâles que chez les femelles (*sexe* : $F(1,53) = 5,76$; $p = 0,020$; *génotype* : $F(3,53) = 0,33$; $p = 0,802$; *sexe x génotype* : $F(3,53) = 0,26$; $p = 0,853$). Néanmoins, cet effet disparaît lorsque les lignées sont analysées séparément (*souris B6* : $F(1,14) = 0,38$; $p = 0,548$; *souris apoE-KO* : $F(1,12) = 3,26$; $p = 0,096$; *souris apoE3* : $F(1,13) = 1,48$; $p = 0,245$; *souris apoE4* : $F(1,14) = 1,33$; $p = 0,268$). Le nombre d'erreurs de discrimination (voir **figure 44, partie droite**) a été, par contre, globalement plus important chez les femelles que chez les mâles (*sexe* : $F(1,53) = 4,095$; $p = 0,0481$; *génotype* : $F(3,53) = 1,353$; $p = 0,2671$; *sexe x génotype* : $F(3,53) = 0,656$; $p = 0,5828$). Cet effet disparaît également lorsque les lignées sont analysées séparément (*souris B6* : $F(1,14) = 1,02$; $p = 0,329$; *souris apoE-KO* : $F(1,12) = 0,38$; $p = 0,549$; *souris apoE3* : $F(1,13) = 0,26$; $p = 0,621$; *souris apoE4* : $F(1,14) = 2,97$; $p = 0,107$).

En résumé, les différentes lignées ont acquis la tâche de la même façon, les seules différences mises en évidence étant liées au sexe des animaux. Les mâles commettent plus d'erreurs d'évitement que les femelles, alors que ces dernières commettent plus d'erreurs de discrimination que les mâles.

c. Séance de rétention dans la tâche du labyrinthe en Y

Lors de la séance de rétention de la tâche, les souris mâles ont globalement mis moins d'essais que les femelles pour atteindre le critère de 7 essais corrects sur 8 essais consécutifs (*sexe* : $F(1,53) = 5,55$; $p = 0,022$; *génotype* : $F(3,53) = 0,70$; $p = 0,557$; *sexe x génotype* : $F(3,53) = 0,98$; $p = 0,409$; voir **figure 43, barres noires**). L'analyse restreinte aux souris apoE3 et apoE4 ne montre aucun effet significatif (*sexe* : $F(1,27) = 2,84$; $p = 0,103$; *génotype* : $F(1,27) = 0,02$; $p = 0,885$; *sexe x génotype* : $F(1,27) = 2,42$; $p = 0,132$). Néanmoins, on peut remarquer que les souris femelles apoE4 ont mis plus d'essais à atteindre le critère que les souris apoE4 mâles ($F(1,14) = 7,79$; $p = 0,014$), alors que ceci n'est pas observé chez les souris apoE3 ($F(1,13) = 0,01$; $p = 0,938$).

Le nombre d'erreurs d'évitement (voir **figure 45, partie gauche**) n'a pas été influencé par le sexe des animaux (*sexe* : $F(1,53) = 0,42$; $p = 0,518$; *génotype* : $F(3,53) = 1,71$; $p = 0,175$) mais l'ANOVA a révélé une tendance à l'interaction sexe x génotype ($F(3,53) = 2,39$; $p = 0,079$). En effet, l'effet du génotype n'est significatif que chez les femelles (*mâles* :

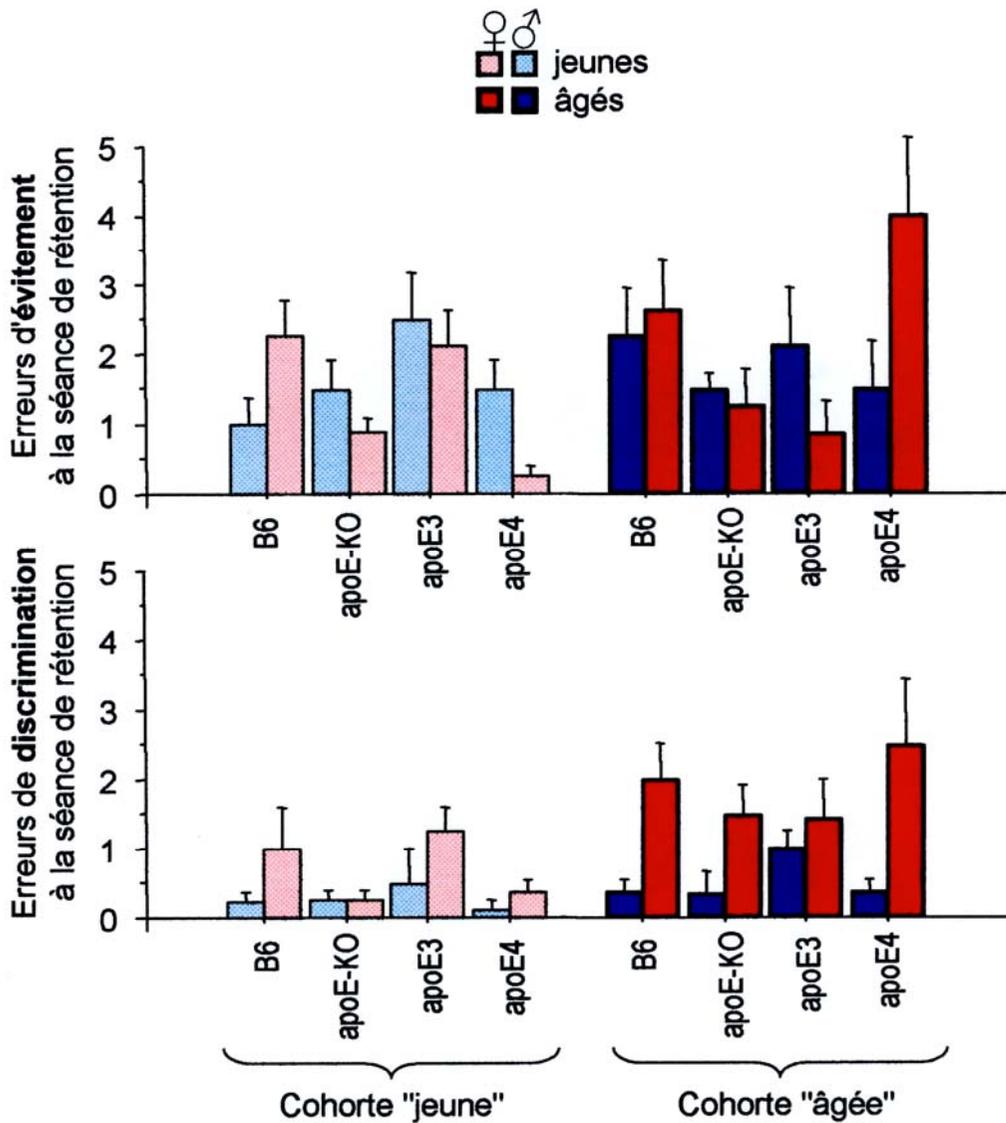


Figure 46 : Comparaison des performances de rétention des cohortes "jeune" et "âgée" dans la tâche d'évitement actif

Les erreurs d'évitement et de discrimination sont indiquées par la moyenne + erreur-type.

$F(3,26) = 0,34 ; p = 0,797 ;$ femelles : $F(3,27) = 3,36 ; p = 0,033$, au sein desquelles les souris apoE4 commettent plus d'erreurs que les femelles apoE-KO et apoE3 (*test de Fischer : apoE4 vs apoE-KO : $p = 0,017 ; apoE4 vs apoE3 : p = 0,009$*). L'analyse restreinte aux souris apoE3 et apoE4 confirme ce plus fort nombre d'erreurs d'évitement chez les femelles apoE4 par rapport aux femelles apoE3 au cours de la séance de rétention (*sexe x génotype : $F(1,27) = 5,15 ; p = 0,031 ;$ effet du génotype chez les mâles : $F(1,14) = 0,35 ; p = 0,565 ;$ chez les femelles : $F(1,13) = 5,93 ; p = 0,030$*).

Le nombre d'erreurs de discrimination (voir **figure 45, partie droite**) est similaire entre génotypes sur l'ensemble des analyses effectuées. En revanche, un effet du sexe apparaît à différents niveaux d'analyse. En effet, les femelles commettent plus d'erreurs de discrimination que les mâles sur l'ensemble de la population « âgée » (*sexe : $F(1,53) = 14,47 ; p = 0,0004 ;$ génotype : $F(3,53) = 0,36 ; p = 0,783 ;$ sexe x génotype : $F(3,53) = 1,07 ; p = 0,369$*), sur l'ensemble des souris apoE3 et apoE4 (*sexe : $F(1,27) = 5,03 ; p = 0,033 ;$ génotype : $F(1,27) = 0,15 ; p = 0,698 ;$ sexe x génotype : $F(1,27) = 2,22 ; p = 0,148$*), ainsi que chez les souris B6 et apoE4 (*effet du sexe : souris B6 : $F(1,14) = 8,27 ; p = 0,012 ;$ souris apoE-KO : $F(1,12) = 4,20 ; p = 0,063 ;$ souris apoE3 : $F(1,13) = 0,50 ; p = 0,491 ;$ souris apoE4 : $F(1,14) = 5,07 ; p = 0,041$*).

En résumé, durant la séance de rétention, les femelles ont globalement mis plus d'essais pour atteindre le critère et ont commis plus d'erreurs de discrimination que les mâles. En considérant séparément chaque lignée, cet effet a été significatif chez les souris apoE4 mais pas chez les souris apoE3. Les souris femelles apoE4 ont également commis plus d'erreurs d'évitement que les femelles apoE3 et apoE-KO (voir figure 45).

d. Comparaison des performances des souris « jeunes » et « âgées »

La **figure 46** illustre les performances des cohortes de souris « jeunes » et « âgées » lors de la séance de rétention. On constate que le déficit des souris apoE4, faisant plus d'erreurs d'évitement, pourrait être lié à l'âge (*âge x génotype x sexe : $F(3,110) = 3,41 ; p = 0,020$*). Seules les souris femelles présentent une baisse de performances avec l'âge, dépendante du génotype (*âge : $F(1,55) = 3,51 ; p = 0,066 ;$ âge x génotype : $F(3,55) = 5,94 ; p = 0,001$*) à la différence des mâles (*âge : $F(1,55) = 0,28 ; p = 0,601 ;$ âge x génotype : $F(3,55) = 0,78 ; p = 0,512$*). Cette baisse de performances avec l'âge n'est significative que

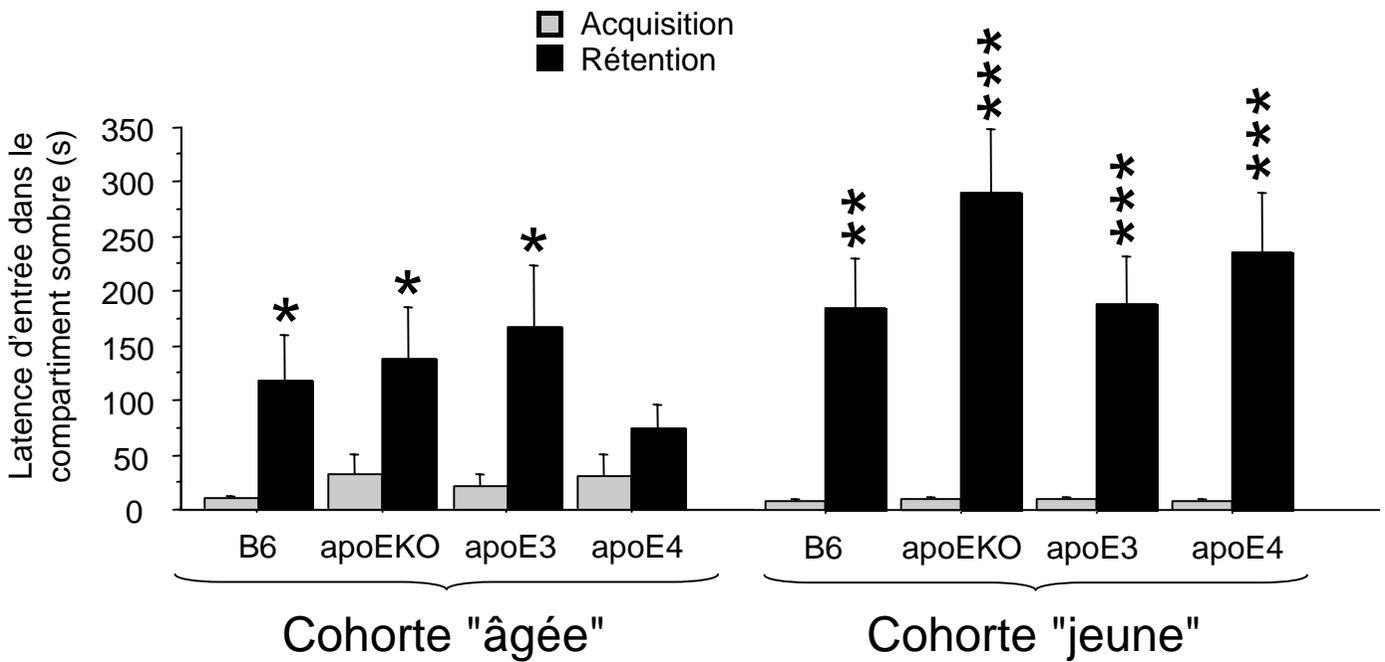


Figure 47 : Performances des différentes lignées dans la tâche d'évitement passif (sexes confondus)

La latence d'entrée dans le compartiment sombre est indiquée par la moyenne + erreur-type.

A la différence des autres lignées âgées et des souris jeunes, les souris apoE4 âgées montrent de mauvaises performances de rétention.

*, **, *** = Différent de l'acquisition respectivement à $p < 0,05$; $p < 0,01$ et $p < 0,001$

pour les souris femelles apoE4 ($F(1,14) = 10,71$; $p = 0,006$) et pas pour les autres groupes de souris ($F \leq 3,29$; $p \geq 0,093$). Globalement, les souris « âgées » ont également commis plus d'erreurs de discrimination que l'ensemble des souris « jeunes » (*âge* : $F(1,110) = 11,18$; $p = 0,001$; *sexe* : $F(1,110) = 18,48$; $p < 0,0001$; *âge x sexe* : $F(1,110) = 4,64$; $p = 0,033$; *pas d'interaction avec le génotype*). Cette altération des performances avec l'âge semble spécifique aux femelles (*effet de l'âge : femelles* : $F(1,55) = 9,45$; $p = 0,003$; *mâles* : $F(1,55) = 1,79$; $p = 0,186$).

8. Evitement passif

a. Acquisition de la tâche

Lors de la séance d'acquisition de la tâche, toutes les lignées sont rapidement entrées dans le compartiment sombre (*génotype* : $F(3,53) = 0,55$; $p = 0,651$; *sexe* : $F(1,53) = 3,06$; $p = 0,086$; *sexe x génotype* : $F(3,53) = 0,36$; $p = 0,779$) (voir **figure 47, cohorte « âgée », barres grises**). Les 4 lignées de souris ont montré des comportements similaires d'approche du compartiment sombre durant cette séance d'acquisition : elles ont mis le même temps pour dépasser la moitié de la longueur du compartiment éclairé ($F \leq 0,84$; $p \geq 0,476$; *non représenté*).

b. Rétention de la tâche

Lors de la séance de rétention 24 h plus tard, le nombre de transitions entre les compartiments sombre et éclairé a été identique pour tous les groupes de souris ($F \leq 1,66$; $p \geq 0,186$), ainsi que le temps passé dans chaque compartiment (*sombre* : $F \leq 1,40$; $p \geq 0,252$; *éclairé* : $F \leq 1,43$; $p \geq 0,245$; *non représenté*). Durant cette séance de rétention (voir **figure 47, cohorte « âgée », barres noires**), tous les groupes de souris ont augmenté la latence à pénétrer dans le compartiment sombre par rapport à la séance d'acquisition (*séance* : $F(1,53) = 26,37$; $p < 0,0001$; *séance x génotype* : $F(3,53) = 1,21$; $p = 0,315$; *séance x sexe* : $F(1,53) = 1,74$; $p = 0,193$; *séance x sexe x génotype* : $F(3,53) = 1,61$; $p = 0,197$). Néanmoins, lorsque les lignées sont analysées séparément, cette augmentation de la latence d'entrée dans le compartiment sombre n'est pas significative chez les souris apoE4 (*effet séance chez les B6* : $F(1,14) = 6,06$; $p = 0,027$; *chez les apoE-KO* : $F(1,12) = 17,09$; $p = 0,001$; *chez les apoE3* : $F(1,13) = 7,85$; $p = 0,015$; *chez les apoE4* : $F(1,14) = 1,92$; $p =$

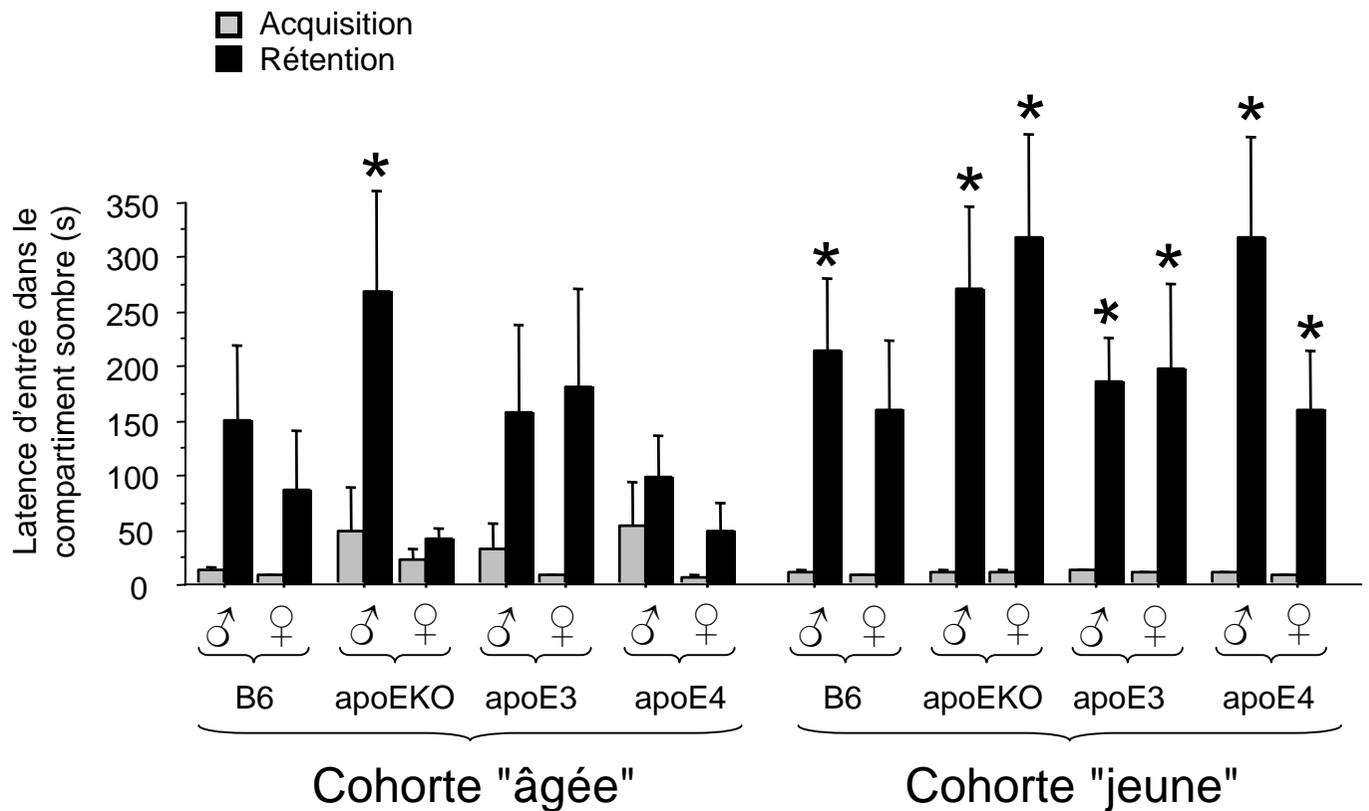


Figure 48 : Performances des différentes lignées dans la tâche d'évitement passif (sexes séparés)

Les performances des souris de la cohorte "âgée" sont globalement moins bonnes que celles des souris de la cohorte "jeune".

La latence d'entrée dans le compartiment sombre est indiquée par la moyenne + erreur-type.

* = Différent de l'acquisition à $p < 0,05$.

0,187). Lorsque l'analyse est poussée au niveau des groupes de sexe et génotype, seul le groupe de souris mâles apoE-KO montre encore une augmentation significative de la latence d'entrée dans le compartiment sombre (voir **figure 48**, cohorte « âgée »).

c. Comparaison des performances des souris « jeunes » et « âgées »

Les résultats obtenus dans la cohorte de souris « jeunes » sont indiqués à droite sur les **figures 47 et 48** (cohorte « jeune »). On peut remarquer que les performances des souris âgées sont globalement moins bonnes que celles des souris « jeunes » (*séance x âge* : $F(1,110) = 11,48$; $p < 0,0001$). Néanmoins, lorsque les lignées sont analysées séparément, on observe que la baisse de performance liée à l'âge n'est significative que pour les lignées apoE-KO et apoE4 (voir tableau ci-après). Lorsque l'analyse est poussée au niveau des groupes de sexe et génotype, la baisse de performance n'apparaît plus que chez les souris femelles apoE-KO, ainsi que chez les mâles et les femelles apoE4.

		Baisse de la performance liée à l'âge (interactions âge x séance)			
		B6	apoE-KO	apoE3	apoE4
lignée sexe	Sexes confondus	p = 0,2909	<u>p = 0,0292</u>	p = 0,6532	<u>p = 0,0055</u>
	Mâles	p = 0,5009	p = 0,7223	p = 0,5325	<u>p = 0,0291</u>
	Femelles	p = 0,4097	<u>p = 0,0089</u>	p = 0,8991	<u>p = 0,0887</u>

En résumé, les souris apoE4 ont présenté de mauvaises performances de rétention de la tâche d'évitement passif, contrairement aux autres lignées. Lorsque l'analyse est poussée au niveau des groupes de sexe et génotype, l'augmentation de la latence d'entrée dans le compartiment sombre n'est pas significative, excepté pour le groupe des mâles apoE-KO. La comparaison des performances entre la cohorte des souris « âgées » et la cohorte des souris « jeunes » montre que ces performances semblent se détériorer avec l'âge, en particulier pour les mâles et les femelles apoE4 ainsi que pour les femelles apoE-KO.

9. Seuil de réactivité aux chocs électriques

Le seuil de réactivité aux chocs électriques n'a pas varié en fonction du génotype (non représenté). Le voltage nécessaire pour déclencher une réaction de fuite (*flight response*) est identique pour les souris des 4 lignées (*génotype* : $F(3,53) = 0,61$; $p = 0,608$; *génotype x sexe* : $F(3,53) = 1,50$; $p = 0,224$), les femelles réagissant à un voltage plus faible que les mâles (*sexe* : $F(1,53) = 23,14$; $p < 0,0001$). Le voltage utilisé lors de l'acquisition de la tâche du labyrinthe en Y était globalement corrélé avec ce seuil de réactivité aux chocs électriques déterminé après la tâche d'évitement passif ($z = 2,02$; $p = 0,044$).

II. Effets du sAPP₆₉₅ chez la souris femelle âgée apoE4 dans la tâche de mémoire de référence de la piscine de Morris

1. Introduction

L'existence d'un déclin cognitif de la population au cours du vieillissement (Park et coll., 2002 ; DeCarli, 2003), et le vieillissement global de la population mondiale, sont à l'origine de nombreux travaux visant, d'une part, à comprendre les mécanismes neurobiologiques qui sous-tendent l'apparition de ce déclin cognitif lié à l'âge, et d'autre part, à établir des stratégies de restauration des performances pour améliorer les conditions de vie des individus âgés, souffrant ou non d'un vieillissement pathologique. Une des stratégies de restauration des performances est l'administration de substances destinées à favoriser la mémoire. Les travaux déjà effectués dans l'équipe ont montré que le sAPP pouvait avoir des effets promnésiants très puissants : il agit à une dose très faible (0,5 pg / 4µL / souris) et peut améliorer les performances dans diverses tâches d'apprentissage et de mémoire (Meziane et coll., 1998 ; et chapitre 2). Il se trouve que les niveaux de sAPP sont réduits chez des rats « âgés » (mesure effectuée dans le liquide céphalo-rachidien) qui présentent des déficits de mémoire spatiale dans la tâche de la piscine de Morris (Anderson et coll., 1999). Un des objectifs de ma thèse était de tester les effets du sAPP dans un modèle de vieillissement, potentiellement lié à la maladie d'Alzheimer.

Or, dans l'étude décrite précédemment, les souris femelles porteuses de l'allèle humain $\epsilon 4$ ont montré un déficit de performance lors du test de rétention de la tâche de mémoire de référence dans la piscine de Morris. Compte tenu des résultats précédents, ces souris apoE4 semblent constituer un bon modèle de déficit cognitif lié au vieillissement. Il paraissait donc tout à fait intéressant d'éprouver les effets promnésiants du sAPP₆₉₅, sur les performances de mémoire spatiale de ces souris femelles apoE4. La protéine étant administrée par voie i.c.v. nous avons préféré limiter le nombre d'injection pour éviter une atteinte des tissus voisins du site d'injection. Par ailleurs, comme le sAPP semble favoriser les processus de consolidation de l'information mnésique, nous avons choisi d'éprouver ses effets sur les performances mises en jeu lors de l'essai de rétention. Enfin, les données de la littérature suggèrent que la mémoire spatiale dans la tâche de mémoire de référence du test de la piscine de Morris se consolide extrêmement vite (Bohbot et coll., 1996). Afin de nous placer dans les

meilleures conditions pour obtenir des effets promnésiants du sAPP₆₉₅ dans cette tâche, nous avons choisi d'administrer le sAPP₆₉₅ 20 mn avant les 4 derniers essais de l'apprentissage.

Cette expérience visait donc 1) à évaluer les effets d'une injection de sAPP sur la restauration des performances chez ces souris apoE4 déficientes, et 2) à vérifier que les souris femelles apoE4 présentaient un déficit de rétention dans la tâche de mémoire spatiale de référence de la piscine de Morris. Nous avons donc ajouté un groupe de souris femelles B6 comme contrôle du niveau de performance du fond génétique. Il ne nous a pas été possible d'ajouter un groupe de femelles apoE3 puisque le maintien de cette lignée dans notre laboratoire a été suspendu par manque de reproducteur effectif (stérilité des couples reproducteurs) et pour éviter une dérive génétique puisque nous atteignons les trois générations dans notre élevage.

2. Déroulement de l'expérience

J'ai utilisé pour cette expérience un protocole en tous points similaire à celui utilisé lors de la caractérisation comportementale des souris apoE3 et apoE4. Le lendemain d'un essai de « nage libre », les souris ont été entraînées à localiser la plate-forme invisible dans le quadrant cible (Ouest) au cours de 4 jours d'apprentissage de la tâche de mémoire de référence. Vingt minutes avant les essais du quatrième jour, les souris reçoivent une injection i.c.v. soit de NaCl, soit de sAPP. Le test de rétention (les souris nagent librement dans le bassin sans plate-forme pendant 60 s) s'est déroulé 24 h après la fin de l'apprentissage. Le lendemain, les souris effectuent 4 essais durant lesquels elles peuvent rejoindre la plate-forme visible, dont l'emplacement change d'un essai à l'autre.

Les différents groupes de souris (13 à 19 mois) sont :

- des souris femelles apoE4 avec une injection i.c.v. de NaCl (0,9 %) (groupe « **apoE4-NaCl** », n = 11)
- des souris femelles apoE4 avec une injection i.c.v. de sAPP à la dose de 0,5 pg/4µL/souris (groupe « **apoE4-sAPP** », n = 9)
- des souris femelles de lignée B6 avec une injection de NaCl (0,9 %) (groupe « **B6-NaCl** », n = 18).

Ce dernier groupe « B6-NaCl » sert en quelque sorte de contrôle du niveau de performance du fond génétique, puisque les souris B6 devraient apprendre correctement la tâche, par rapport aux souris apoE4.

La dose de 0,5 pg de sAPP₆₉₅ a été sélectionnée puisque celle-ci avait permis d'améliorer les performances de rétention des souris dans la tâche de reconnaissance spatiale (voir deuxième chapitre).

3. Résultats

a. Vitesse de nage

Durant l'essai de « nage libre » (avant le protocole de mémoire de référence), les vitesses de nage ont été calculées par le logiciel de suivi vidéo. Les souris des trois groupes ont toutes nagé à la même vitesse (*groupe* : $F(2,35) = 0,95$; $p = 0,394$). Durant le test de rétention, les souris de chaque groupe ont montré la même vitesse de nage (*groupe* : $F(2,35) = 0,42$; $p = 0,661$). Aucune différence de vitesse de nage n'a été mise en évidence lors du test de rétention entre les souris apoE4 traitées au NaCl et les souris apoE4 traitées au sAPP ($F(1,18) = 0,10$; $p = 0,760$).

		Vitesse de nage à l'essai de « nage libre » et au test de rétention (probe trial) (moyenne en cm/s ± erreur standard)		
groupe		B6-NaCl	apoE4-NaCl	apoE4-sAPP
essai				
« nage libre »		17,1 ± 0,6	18,1 ± 0,4	18,4 ± 1,0
test de rétention		20,3 ± 0,6	20,9 ± 0,5	21,2 ± 0,8

Même si les souris des trois groupes ont nagé à la même vitesse, nous avons préférentiellement analysé les performances d'apprentissage en terme de distance parcourue jusqu'à la plate-forme, pour pouvoir comparer nos résultats à ceux des expériences présentées précédemment.

b. Tâche de mémoire de référence (4j)

L'analyse des performances du premier jour montre que les trois groupes de souris présentent un même niveau de base de performance (*groupe* : $F(2,35) = 2,15$; $p = 0,131$). La comparaison des groupes apoE4-NaCl et apoE4-sAPP (dont les souris n'ont encore reçu aucun traitement) ne montre aucune différence entre les deux groupes (*traitement* : $F(1,18) = 0,56$; $p = 0,463$).

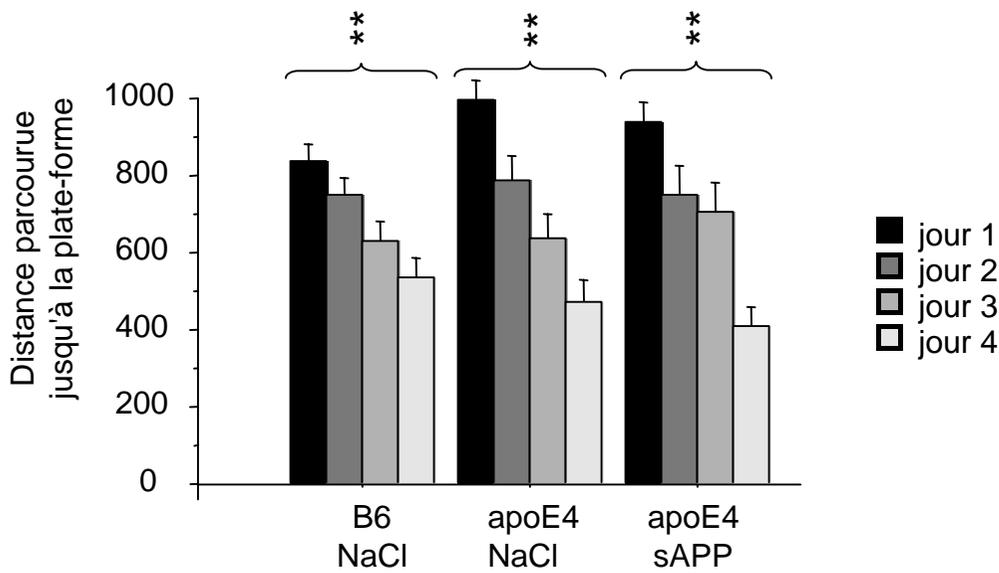


Figure 49 : Performances d'apprentissage de la tâche de mémoire de référence dans le test de la piscine de Morris (4j)

La performance est exprimée par la moyenne (+ erreur-type) des distances parcourues pour rejoindre la plate-forme à chaque jour d'apprentissage (moyennes des 4 essais d'un jour donné).

ANOVA : Effet du jour d'apprentissage à ** = $p < 0,01$.

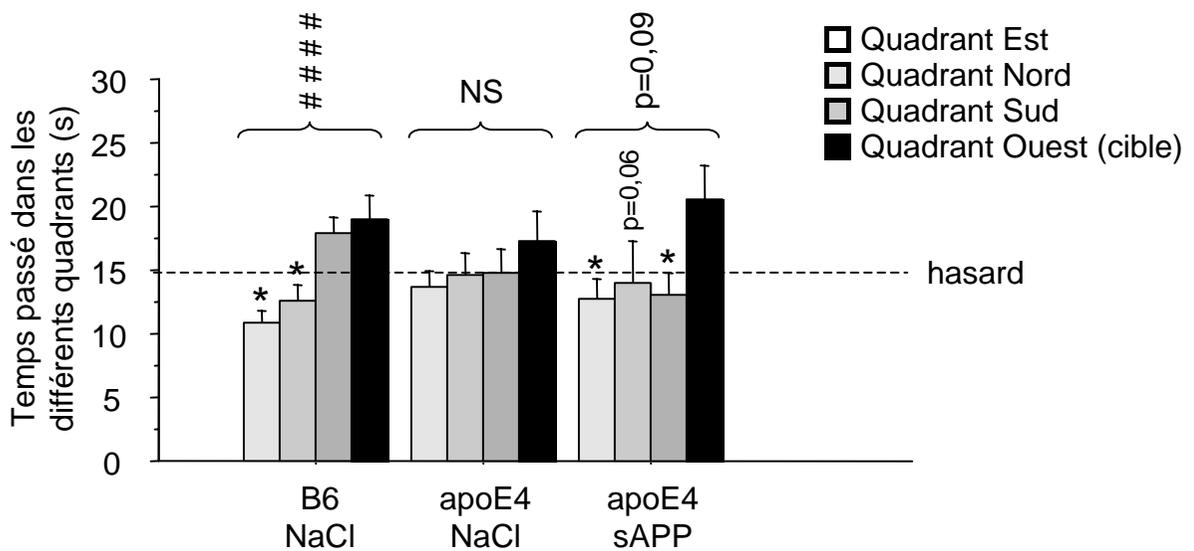


Figure 50 : Performances des différents groupes lors du test de rétention

La performance est exprimée en moyenne (+ erreur-type) du temps passé dans les différents quadrants lors du test de rétention (60s sans plate-forme).

ANOVA: Effet quadrant à ##### = $p < 0,0001$ (NS = non significatif).

* = Différent du quadrant cible à $p < 0,05$.

Globalement, les souris ont réduit la distance parcourue pour rejoindre la plate-forme au cours des 4 jours d'apprentissage ($jour : F(3,105) = 25,92 ; p < 0,0001$). Sur la **figure 49**, on constate que les trois groupes de souris ont montré des performances similaires sur les 4 jours d'apprentissage ($groupe : F(2,35) = 0,20 ; p = 0,821 ; jours \times groupe : F(6,105) = 1,01 ; p = 0,422$). De même, l'analyse restreinte aux deux groupes apoE4-NaCl et apoE4-sAPP ne montre aucune différence entre ces deux groupes ($traitement : F(1,18) = 0,13 ; p = 0,725 ; jours \times traitement : F(3,54) = 0,42 ; p = 0,742$). L'amélioration de la performance au cours des 4 jours d'apprentissage a été confirmée pour chaque groupe pris individuellement ($B6-NaCl : F(3,51) = 6,48 ; p = 0,0008 ; apoE4-NaCl : F(3,30) = 14,56 ; p < 0,0001 ; F(3,24) = 7,19 ; p = 0,001$).

L'ensemble des souris ont reçu le 4^{ème} jour une injection de traitement (NaCl ou sAPP), 20 mn avant les 4 derniers essais de l'apprentissage. Les trois groupes ont atteint le même niveau de performances lors des essais de ce 4^{ème} jour d'apprentissage ($groupe : F(2,35) = 0,85 ; p = 0,437$). De même, l'analyse restreinte aux souris apoE4-NaCl et apoE4-sAPP n'a montré aucune différence de performances entre ces deux groupes ($traitement : F(1,18) = 0,44 ; p = 0,514$).

En résumé, on peut dire que les trois groupes de souris ont amélioré de la même façon leurs performances au cours de l'apprentissage. Le traitement au sAPP n'a pas modifié les performances aux 4 essais du dernier jour d'apprentissage.

c. Test de rétention (probe trial, 1 j)

L'ANOVA montre que toutes les souris ont globalement préféré le quadrant cible aux autres quadrants ($quadrant : F(3,140) = 7,24 ; p = 0,0002 ; test de Fisher : quadrant cible vs les 3 autres quadrants : p \leq 0,032$). Néanmoins, on peut voir sur la **figure 50** que les trois groupes de souris n'ont pas tous montré de bonnes performances. Même si l'interaction quadrant x groupe n'atteint pas le niveau de significativité ($F(6,140) = 1,31 ; p = 0,256$), l'analyse des performances de chaque groupe montre que les souris apoE4-NaCl ne montrent pas de préférence significative pour le quadrant cible ($F(3,40) = 0,71 ; p = 0,550$), contrairement aux souris B6-NaCl ($F(3,68) = 8,73 ; p < 0,0001 ; test de Fisher : quadrant Ouest vs quadrants Nord et Est : p \leq 0,002$) et aux souris apoE4 traitées au sAPP qui ont

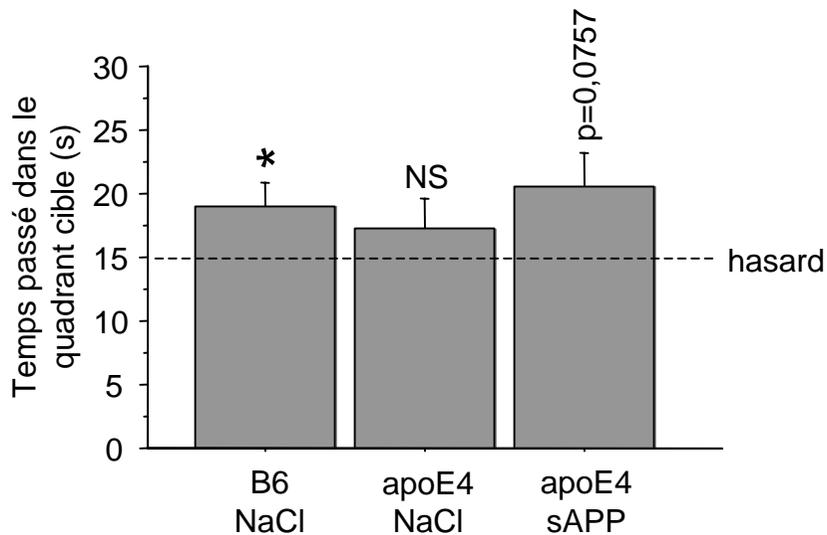


Figure 51 : Temps passé dans le quadrant cible durant le test de rétention

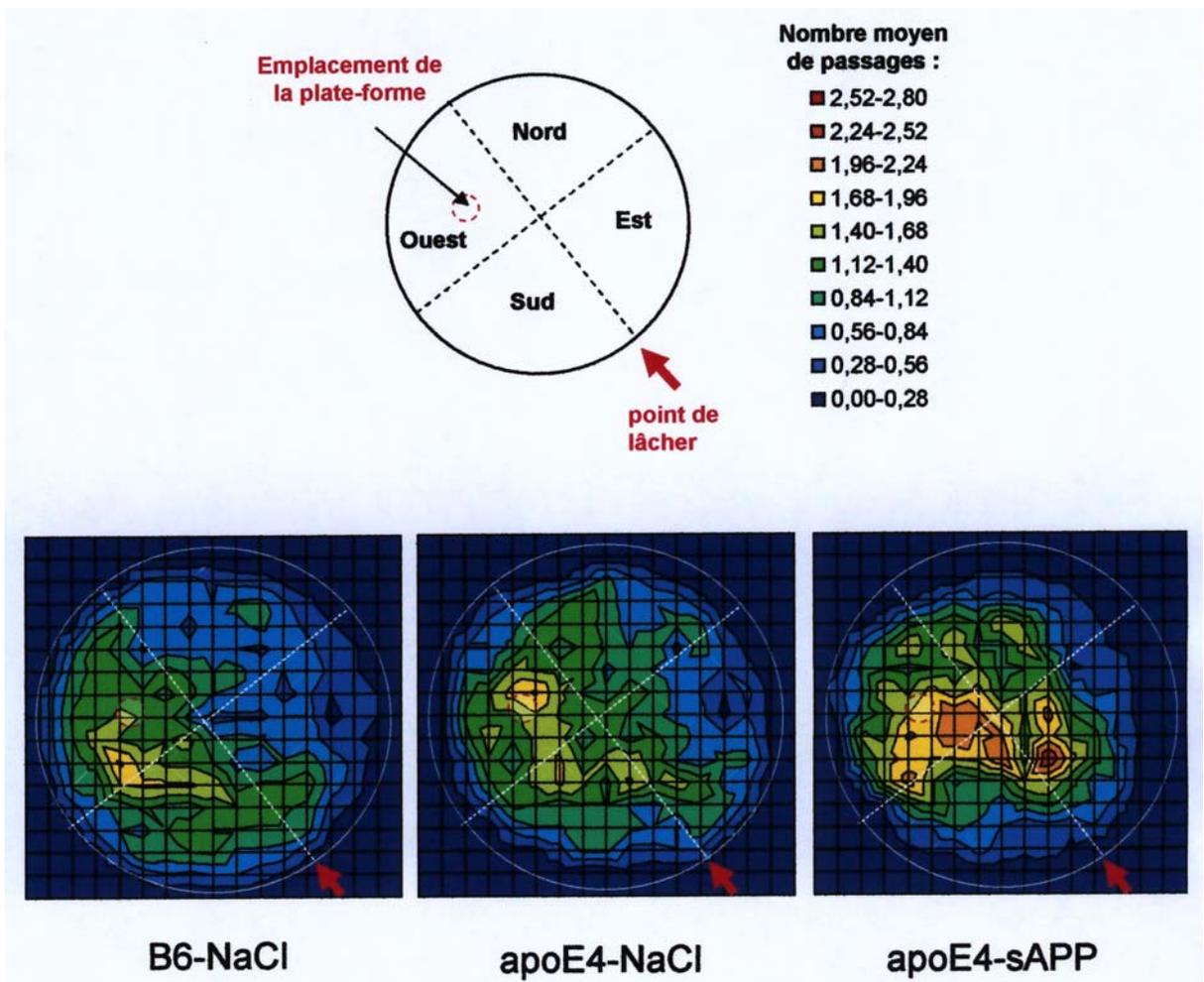
Le temps passé dans le quadrant cible est indiqué par la moyenne + erreur-type.

* = Différent du hasard à $p < 0,05$ (test de Student)

NS = non significatif

Figure 52 : Fréquentation du bassin durant le test de rétention

Pour les trois groupes de souris (B6-NaCl, apoE4-NaCl et apoE4-sAPP), la fréquentation du bassin est indiquée par un code couleur. Les couleurs "froides" (bleu) indiquent les zones du bassin les moins fréquentées et les couleurs "chaudes" (jaune à rouge) les zones du bassin les plus fréquentées. La plateforme, absente lors de ce test de rétention, était située dans le quadrant Ouest (en haut sur la figure). Le point de lâcher des souris est indiqué par la flèche rouge.



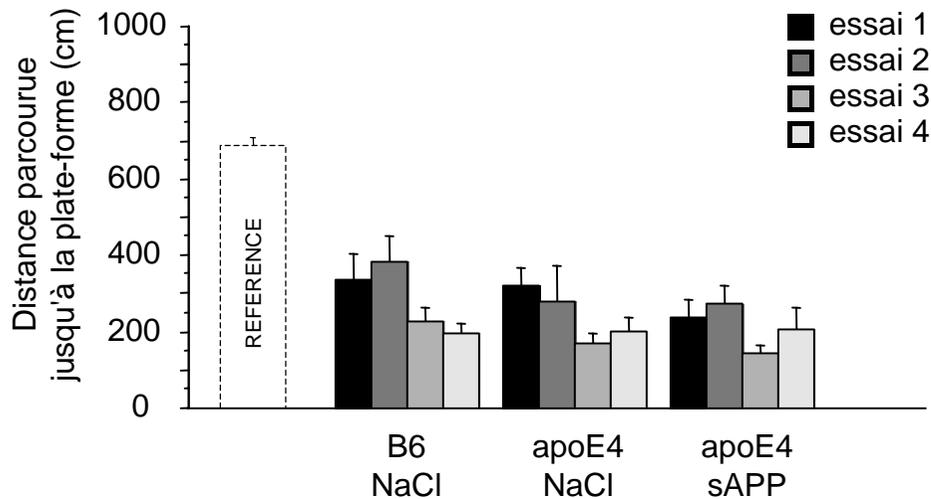


Figure 53 : Distances parcourues pour rejoindre la plate-forme visible

Tous les groupes de souris ont montré de bonnes performances au cours des 4 essais avec plate-forme visible.

La distance parcourue par les souris des différents groupes jusqu'à la plate-forme est exprimée par la moyenne + erreur-type. La première barre en pointillés indique la distance moyenne parcourue par essai lors du protocole de mémoire de référence (REFERENCE).

montré une tendance à préférer le quadrant cible ($F(3,32) = 2,32 ; p = 0,094 ; \text{test de Fisher} : \text{quadrant Ouest vs quadrants Est et Sud} : \text{respectivement } p \leq 0,035$).

Le temps passé dans le quadrant cible (voir **figure 51**) a été supérieur au niveau du hasard pour le groupe de souris B6-NaCl ($\text{test de Student} : p = 0,040$). Les souris apoE4 traitées avec du NaCl n'ont pas préféré le quadrant cible ($\text{test de Student} : p = 0,353$) alors que les souris apoE4 traitées avec du sAPP ont montré une forte tendance à préférer le quadrant cible ($\text{test de Student} : p = 0,076$).

Sur la représentation de la fréquentation du bassin par les différents groupes de souris (voir **figure 52**), on peut voir que les souris du groupe B6-NaCl montrent une préférence pour le quadrant cible Ouest, et présentent un biais pour le quadrant adjacent Sud situé entre le point de lâcher et l'emplacement de la plate-forme. Les souris du groupe apoE4-NaCl présentent une fréquentation du bassin plus étalée, répartie sur les 4 quadrants. En comparaison, les souris du groupe apoE4-sAPP semblent présenter une recherche plus focalisée de la plate-forme.

d. Plate-forme visible (1 j)

Au cours des 4 essais avec plate-forme visible (voir **figure 53**), les trois groupes de souris ont rapidement rejoint la plate-forme (distance moyenne parcourue par essai = 253 ± 16 cm par opposition aux 688 ± 17 cm dans le protocole de mémoire de référence). Aucun effet du groupe n'a été mis en évidence ($F(2,35) = 1,24 ; p = 0,302$), les trois groupes de souris améliorant de façon similaire leurs performances au cours des 4 essais successifs ($\text{essai} : F(3,105) = 4,67 ; p = 0,004 ; \text{essai} \times \text{groupe} : F(6,105) = 0,46 ; p = 0,836$).

		apoE3 vs apoE4	B6 vs « knock-in »	B6 vs apoE-KO
Effets non mnésiques	Poids à l'isolement	apoE4 plus lourdes que les apoE3	apoE4 plus lourdes que les B6	-
	Maintien du poids	-	♀ apoE3 et ♀ apoE4 perdent du poids	-
	Activité locomotrice (Habituation)	apoE3 plus actives que les apoE4	apoE3 plus actives que les B6	-
	Exploration totale des objets (Rétention)	-	Les apoE3 explorent plus les objets que les B6	-
	Vitesse de nage à l'essai de nage libre	apoE3 moins rapides que les apoE4	apoE3 moins rapides que les B6	-
Piscine de Morris	Test de rétention Piscine de Morris	♀ apoE4 mauvaises	♀ apoE4 mauvaises	-
	Appariement différé (amélioration entre les essais 1 et 2)	apoE4 moins bonnes que les apoE3 (sexes confondus)	B6 et apoE4 moins bonnes que les apoE3 (sexes confondus)	B6 et apoE-KO mauvaises (sauf ♀ apoE-KO)
	Appariement différé (amélioration sur les 4 essais)	♀ apoE4 mauvaises	♀ apoE4 et ♀ B6 mauvaises	-
labyrinthe en Y	Voltage labyrinthe en Y	-	-	♂ apoE-KO réagissent à un voltage plus faible que les ♂ B6
	Nombre d'essais pour atteindre le critère (rétention)	apoE4 seulement: ♀ moins bonnes que ♂	-	-
	Erreurs d'évitement (rétention)	♀ apoE4 moins bonnes que ♀ apoE3	-	-
	Erreurs de discrimination (rétention)	Chez les apoE4 : les ♀ font plus d'erreurs que les ♂.	-	-
Evitement passif	Evitement passif	Déficit des apoE4	-	-
sAPP₆₉₅ - Piscine de Morris	Effets du sAPP sur les souris ♀ apoE4 (probetrial)	Le traitement au sAPP améliore les performances des souris apoE4 ♀	Déficit des ♀ apoE4-NaCl par rapport aux ♀ B6-NaCl.	

Figure 54 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus lors de la caractérisation comportementale des souris transgéniques apoE3 et apoE4.

Ne sont indiqués que les résultats ayant montré des différences significatives entre les lignées, pour des comparaisons entre les souris apoE3 et apoE4, pour des comparaisons entre les souris apoE3 ou apoE4 et les souris B6, et enfin pour des comparaisons entre les souris B6 et les souris apoE-KO.

III. Discussion du chapitre

Dans ce chapitre, j'ai exposé les résultats de la caractérisation comportementale d'une cohorte « âgée » de souris transgéniques « *knock-in* » portant l'allèle $\epsilon 3$ ou l'allèle $\epsilon 4$ de l'apoE humaine à la place de leur gène d'apoE murine.

Lors de cette étude, plusieurs effets dépendants de l'isoforme d'apoE (apoE3 ou apoE4) ont été mis en évidence sur des variables telles que le poids corporel ou l'activité locomotrice ainsi que sur les mesures des capacités d'apprentissage et de mémoire (voir **figure 54** : tableau récapitulatif). Certains effets sont dépendants du sexe, et les femelles apoE4 semblent être les plus affectées. Les souris B6, représentant le fond génétique des souris apoE3 et apoE4, ont parfois montré des différences avec l'une ou l'autre des deux lignées « knock-in », et parfois même avec les deux lignées à la fois.

1. Effets mnésiques des allèles humains chez les souris

D'après mes résultats, les souris « âgées » apoE4 ont montré des déficits par rapport aux souris « âgées » apoE3 dans plusieurs tâches faisant intervenir la mémoire spatiale. Bien que toutes les lignées aient montré un apprentissage comparable de la tâche de mémoire de référence dans le dispositif de la piscine de Morris, les femelles apoE4 « âgées » ont montré un déficit de performance lors de l'essai de rétention sans plate-forme. Il est à noter que nous avons déjà mis en évidence un déficit des performances de rétention des souris apoE4 jeunes dans cette tâche. Cependant, l'effet n'était détectable que lorsque les souris mâles et femelles étaient « regroupées » pour l'analyse, ce qui suggère que le déficit était moindre à l'âge de 4-5 mois. Un déficit dans la tâche de mémoire de référence dans le test de la piscine de Morris avait déjà été observé par Raber et collaborateurs (2000) chez des souris de 18 mois exprimant l'apoE4 sous contrôle du promoteur de la NSE. Néanmoins, le déficit des souris NSE-apoE4 apparaissait à la fois au cours des 4 jours d'acquisition de la tâche et au cours du test de rétention. Le déficit des souris NSE-apoE4 paraît donc plus étendu que celui de nos souris « knock-in ». Cette différence pourrait être liée à la surexpression d'apoE4 chez les souris NSE-apoE4 alors que les souris « knock-in » expriment des niveaux physiologiques d'apoE4. Par ailleurs, les mâles NSE-apoE4 de 18 mois avaient montré de bonnes performances. De la même façon, les mâles apoE4 « âgés » ont présenté de bonnes

performances dans notre étude. Il semble donc que le déficit de mémoire spatiale des souris transgéniques pour l'apoE4 se manifeste de façon prédominante chez les femelles.

Dans le protocole d'appariement différé, les souris devaient apprendre quotidiennement un nouvel emplacement de la plate-forme au cours d'une session quotidienne de 4 essais. Les deux premiers essais sont séparés d'un délai de 1 h. Si les souris ont appris la nouvelle localisation de la plate-forme, on s'attend à obtenir une amélioration des performances entre l'essai 1 et l'essai 2. Or, nos souris « âgées », toutes lignées confondues, ont présenté de mauvaises performances dans cette première partie de la tâche. Dans ces conditions, il était impossible de mettre en évidence un éventuel effet du génotype. Nous n'avons donc pas été en mesure de confirmer les déficits de performance d'appariement différé des souris apoE3 et apoE4 obtenus dans l'étude de la cohorte « jeune ». En réduisant le délai entre les essais 1 et 2, nous pourrions peut-être améliorer les performances globales des souris âgées (notamment les B6) et tester à nouveau les performances d'appariement différé des souris apoE4 et apoE3 « âgées ».

Dans le protocole d'appariement différé, les essais 2, 3 et 4 sont séparés par un délai de 5 mn. Dans cette deuxième partie de la session quotidienne, nous avons pu mettre en évidence un déficit isoforme-dépendant chez les souris « knock-in ». En effet, les souris « âgées » apoE4 femelles n'ont pas été capables d'améliorer leurs performances au cours des 3 essais, à la différence des souris apoE3. Il semblerait donc que la deuxième partie de la tâche d'appariement différé ait été assez sensible pour mettre en évidence un déficit de mémoire spatiale chez les souris femelles apoE4, mais pas chez les souris femelles apoE3. Notons que, par rapport aux résultats obtenus dans la cohorte « jeune », les performances des souris femelles apoE4 de 14-15 mois se sont dégradées puisque les individus de 4-5 mois présentaient un déficit entre l'essai 1 et l'essai 2, mais pas entre les essais 2 et 4.

L'ensemble de ces données obtenues dans la tâche de la piscine de Morris suggère que chez les souris « âgées », les femelles apoE4 présentent des performances de mémoire spatiale inférieures à celles des femelles apoE3. Ces déficits ne sont vraisemblablement pas liés à une altération des capacités sensori-motrices car toutes les lignées montrent de bonnes performances dans la tâche de plate-forme visible. Ceci avait déjà été suggéré par les études utilisant d'autres souris transgéniques pour l'apoE (Raber et coll., 1998 ; Hartman et coll., 2001 ; Raber et coll., 2000). La nature du déficit des souris apoE4 concerne très probablement les processus de consolidation de la mémoire puisque ce sont les performances de rétention

qui sont les plus touchées. Les différentes représentations cartographiques de la fréquentation du bassin lors du test de rétention suggèrent que la précision de la stratégie de recherche des souris apoE4 est plus faible que celle des autres lignées. De plus, ces souris ne parviennent pas à améliorer leurs performances d'un essai à l'autre dans la deuxième partie de la tâche d'appariement différé : il se pourrait qu'elles aient des difficultés à assimiler la masse d'informations qui doivent être quotidiennement mises à jour et qui sont acquises en très peu d'essais (4 essais seulement pour une position donnée de la plate-forme). Cette tâche où la plate-forme change de position tous les jours semble donc être plus adaptée pour mettre en évidence des déficits mnésiques chez nos souris apoE4 « âgées », par rapport à la tâche de mémoire de référence, qui permet à l'animal d'apprendre les mêmes informations sur un très grand nombre d'essais : 4 essais par jour pendant 4 jours avec la même position de plate-forme. Il aurait été intéressant de confirmer le déficit de mémoire spatiale des femelles apoE4 « âgées » dans la tâche de reconnaissance spatiale, comme cela a été observé chez les femelles apoE4 « jeunes », mais les performances de toutes les femelles (exceptées celles des apoE-KO) étaient trop médiocres pour mettre en évidence un effet du génotype dans cette tâche.

Les souris femelles apoE4 « âgées » ont également montré des déficits de performance de rétention dans les deux tâches d'évitement. En effet, les souris femelles apoE4 ont effectué plus d'erreurs d'évitement lors de la séance de rétention de la tâche d'évitement actif dans le labyrinthe en Y que les souris femelles apoE3. De plus, lors de cette séance, les performances des femelles apoE4 sont plus faibles que celles des mâles apoE4 en terme de nombre d'essais pour atteindre le critère d'apprentissage. Le déficit des souris femelles apoE4 sur la composante d'évitement est particulièrement intéressant puisque c'est justement sur cette composante que l'on observe le phénomène de « réminiscence » caractérisé par une amélioration spontanée des performances de rétention. Je rappelle que ce phénomène est considéré comme reflétant des processus de réorganisation de la trace mnésique faisant partie intégrante du processus de consolidation. Mes résultats vont dans le sens de l'hypothèse d'une mauvaise consolidation de l'information mnésique chez les souris femelles apoE4 âgées, puisque cette amélioration spontanée des performances normalement observée dans cette tâche lors de la séance de rétention est spécifiquement altérée. En effet, les performances de discrimination ne sont pas différentes de celles des femelles des autres lignées. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les souris apoE4 de la cohorte « jeune » ne présentaient aucun

déficit dans la tâche en labyrinthe en Y. Il est donc probable que ce déficit soit lié à l'âge dans cette lignée.

Les souris apoE4 « âgées » ont également montré un déficit de performance dans la tâche d'évitement passif. Dans cette tâche, nous n'avons pas mis en évidence de différence entre les lignées de la cohorte jeune. Dans les travaux de Raber et collaborateurs (1998), les souris de 6 mois, NSE-apoE4, NSE-apoE3, apoE-KO ou B6, n'avaient pas non plus montré de déficit. Malheureusement, ces auteurs n'avaient pas testé d'animaux plus âgés dans cette tâche. En effet, dans notre étude, on note une diminution de performance des 4 lignées de souris « âgées » par rapport aux souris « jeunes ». De plus, ce sont les performances des souris apoE4 qui sont les plus affectées par le vieillissement, et cette fois ceci concerne également les mâles. Il semble donc que l'utilisation de tâches particulièrement sensibles aux effets du vieillissement permette de mettre en évidence, en plus des déficits des souris femelles apoE4, des déficits chez les souris mâles apoE4.

2. Effets non mnésiques des allèles humains chez les souris

Dans la tâche de reconnaissance spatiale, les souris apoE3 « âgées » ont montré un niveau d'activité exploratoire plus important que celui des souris des trois autres lignées, en terme d'activité locomotrice ou en terme de durée d'exploration des objets. Au premier essai de nage libre dans la piscine de Morris, les souris apoE3 « âgées » ont nagé moins vite que les souris apoE4 et B6, mais cette différence n'a plus été mise en évidence lors du test de rétention après apprentissage. Dans la cohorte jeune, nous avons également noté une augmentation de l'activité exploratoire chez les souris apoE3. De plus, ces souris présentaient quelques déficits dans les tâches de la piscine de Morris (pas d'amélioration des performances dans les deux tâches de plate-forme invisible) et du labyrinthe en Y (difficulté à acquérir la composante d'évitement) qui évoquait une certaine lenteur à éviter les situations désagréables (nage forcée ou chocs électriques ; Grootendorst, Bour et coll., sous presse). Ces comportements particuliers suggèrent que les souris apoE3 pourraient avoir une réactivité émotionnelle différente de celle des autres lignées, impliquant notamment des différences de comportement face à la nouveauté.

Une expérience préliminaire, menée dans notre laboratoire avec des souris femelles « jeunes » des lignées B6, apoE-KO et apoE3 dans un paradigme d'exploration libre (Griebel et coll., 1993), utilise la tâche de réaction à la nouveauté (cage à 6 compartiments). Les

animaux sont placés pendant 24 h dans la cage, ayant accès à seulement 3 compartiments sur les 6. Le jour du test, ils peuvent accéder en plus aux trois nouveaux compartiments contigus. Aucune différence de comportement entre les souris B6 et les souris apoE3 n'a été mise en évidence en terme de nombre de tentatives d'entrées dans les compartiments nouveaux ou de temps passé dans ces compartiments nouveaux. Or, ces deux mesures caractérisent la composante néotique de la tâche, liée au niveau d'anxiété des animaux. Néanmoins, les souris apoE3 ont été significativement plus actives que les souris apoE-KO, mais pas significativement plus que les souris B6. Il reste donc à explorer les raisons de cette différence comportementale des souris apoE3 avec les autres lignées. L'absence d'effet sur les composantes néotiques du test d'exploration libre doit être confirmé par d'autres épreuves connues pour être sensibles au niveau d'anxiété, par exemple le test des cages claire/obscur ou le test du labyrinthe en croix surélevé. En effet, Il semblerait que selon le type d'épreuve utilisée, on ne teste pas toujours le même type d'anxiété chez l'animal (Misslin et Cigrang, 1986 ; Lister, 1990 ; Griebel et coll., 1993). Par ailleurs, il serait intéressant de caractériser d'autres fonctions, telles que la motivation ou la locomotion, qui auraient pu influencer les performances exploratoires et de natatoires des souris apoE3 « jeunes » et « âgées ».

L'allèle $\epsilon 3$ semble donc avoir des effets isoforme-spécifiques lorsqu'il est présent chez la Souris et est loin d'être équivalent à l'apoE murine. Les données concernant l'évolution du poids des animaux va également dans le sens de cette hypothèse. En effet, en dehors du fait que les souris apoE4 sont plus lourdes que les souris apoE3, on peut remarquer que les deux lignées de souris « knock-in » n'ont pas réussi, comme les souris B6 et apoE-KO, à maintenir leur poids au cours de la période d'expérimentation. Or, les souris B6, apoE3 et apoE4 ont des niveaux différents de lipoprotéines et d'apoE plasmatiques (Sullivan et coll., 1997 ; Knouff et coll., 1999 ; Sullivan et coll., 2004) et des tendances différentes à l'athérosclérose et l'hypercholestérolémie en réponse à une alimentation plus riche en lipides. Parallèlement à nos résultats, ces données suggèrent que l'apoE humaine (E3 ou E4) n'est pas capable de réguler le métabolisme lipidique aussi efficacement que ne le ferait l'apoE murine chez la Souris. Ce phénomène pourrait être du au fait que les différentes isoformes de l'apoE n'auraient pas la même affinité pour les récepteurs à l'apoE (Holtzman et coll., 1995 ; Veinbergs et coll., 2002 ; Fagan et coll., 1996).

3. Effets du sAPP₆₉₅ sur les performances des souris femelles apoE4 âgées

L'ensemble de nos résultats indique que les souris apoE4, mais pas les souris apoE3, présentent une altération de leurs performances mnésiques au cours du vieillissement. Les souris apoE4 semblent donc représenter un bon modèle de déclin cognitif lié à l'âge. Il nous a semblé intéressant de tester dans ce modèle les effets du sAPP₆₉₅. La dernière expérience présentée dans ce chapitre avait donc pour but d'évaluer les effets d'une injection de sAPP sur les performances de mémoire spatiale des souris lors du test de rétention 24 h après la fin de l'apprentissage.

En premier lieu, les résultats de cette expérience ont pu confirmer les déficits des souris apoE4 femelles « âgées » lors de l'essai de rétention. Notons que cette expérience ne nous permet pas de confirmer *sensu stricto* un effet isoforme-dépendant de l'apoE humaine puisque nous n'avons pas testé conjointement des souris femelles apoE3. Néanmoins, les souris femelles apoE4 ont montré de mauvaises performances de rétention comme c'était déjà le cas durant la caractérisation comportementale de la cohorte « âgée » des souris « knock-in ». Comparées à des souris femelles B6 « âgées » traitées avec du NaCl, qui ont passé plus de temps dans le quadrant cible, les souris femelles apoE4 « âgées » traitées au NaCl ont passé autant de temps dans les 4 quadrants, signant une rétention mnésique perturbée de l'emplacement de la plate-forme. L'injection de sAPP 20 mn avant les 4 derniers essais de l'apprentissage du protocole de mémoire de référence a permis, lors du test de rétention 24 h plus tard, de rehausser les performances des souris femelles apoE4 « âgées » à un niveau comparable à celui des souris B6 « âgées ».

Bien que nous ne puissions exclure une telle hypothèse, le sAPP ne semble pas avoir affecté les processus d'acquisition puisque l'injection de la protéine n'a pas eu d'influence sur les performances mesurées lors des 4 derniers essais de l'apprentissage. Ce résultat va dans le sens des hypothèses exposées dans le deuxième chapitre qui supposent que le sAPP agirait plutôt sur les processus précoces de consolidation de l'information. Une telle action était possible puisque le sAPP était injecté 20 mn avant les 4 derniers essais. En effet, les travaux de Bohbot et collaborateurs (1996) ont montré que les processus de consolidation mnésique dans une tâche de mémoire de travail en piscine de Morris pouvaient être très rapides, car des électrochocs altèrent la mémorisation de l'emplacement de la plate-forme lorsqu'ils sont administrés à des rats immédiatement ou 15 secondes après le premier essai, mais plus

lorsqu'ils sont administrés 30 ou 45 secondes après ce premier essai. Les déficits des souris « âgées » apoE4 sur les trois derniers essais séparés par 5 mn pourraient être donc bien être dus à un déficit dans la consolidation très rapide de la mémoire spatiale. L'influence du traitement au sAPP, qui améliore les processus de consolidation à court terme, va dans le sens de cette hypothèse.

Si nos résultats paraissent tout à fait cohérents avec notre hypothèse d'une action bénéfique des sAPP sur les déficits cognitifs liés à l'âge et avec celle d'une action délétère de l'apoE4 sur les capacités mnésiques des souris âgées, il n'en reste pas moins que les bases neurobiologiques et neurochimiques de l'effet du sAPP sur les déficits mnésiques des souris femelles apoE4 demeurent obscures. Il existe pourtant de nombreuses études mettant en évidence des interactions entre l'APP et l'apoE. Les travaux de Vincent et Smith (2001) ont montré que la quantité de sAPP α libérée par des neurones mutants portant la mutation suédoise hAPP_{695sw} et surexprimant cet APP muté pouvait varier en fonction du génotype apoE des astrocytes cultivés avec ces neurones. En effet, les neurones cultivés en présence d'astrocytes surexprimant l'apoE4 sécrètent moins de sAPP α qu'en présence d'astrocytes surexprimant l'apoE2, les valeurs étant intermédiaires pour les neurones cultivés en présence d'astrocytes surexprimant l'apoE3. De plus, il a été montré chez l'Homme que les niveaux de sAPP α dans le liquide céphalo-rachidien étaient moins importants chez les individus portant l'allèle ϵ 4 de l'apoE, suggérant que l'apoE exerce un effet sur le métabolisme de l'APP ou bien sur la clairance du sAPP α (Olsson et coll., 2003). Les résultats de Ezra et collaborateurs (2003) vont également dans le sens de cette hypothèse d'effets isoforme-dépendant de l'apoE sur le métabolisme de l'APP, puisque les niveaux de sAPP hippocampiques étaient diminués après un traumatisme crânien chez des souris transgéniques apoE4, mais pas chez des souris apoE3. A un niveau moléculaire, l'apolipoprotéine E semble pouvoir interagir directement avec le sAPP (Barger et Mattson, 1997) et les deux protéines peuvent interagir avec le récepteur LRP (Kounnas et coll., 1995). Enfin, Barger et Mattson (1997) ont montré que l'apoE pouvait potentialiser les effets du sAPP sur la régulation des niveaux de calcium intracellulaires, et que l'isoforme apoE4 était moins efficace que l'isoforme apoE3.

Il se pourrait donc que les niveaux de sAPP soient diminués chez nos souris apoE4 et que ce déficit s'accroisse avec l'âge. L'administration de sAPP₆₉₅ exogène pourrait restaurer

un niveau normal de sAPP dans le cerveau et ainsi rétablir les performances mnésiques des femelles apoE4 « âgées ».

4. Evaluation des effets du vieillissement : l'avantage d'une batterie de tests.

Les différentes lignées que nous avons testées semblent donc être différemment affectées par le vieillissement, les souris apoE4, en particulier les femelles, semblant montrer le déclin cognitif le plus marqué. Néanmoins, nous avons pu observer une baisse globale des performances dans certaines des tâches utilisées et pas dans d'autres.

Les souris « âgées » des 4 lignées ont montré des performances de reconnaissance spatiale modestes par rapport aux souris « jeunes », ce qui est en accord avec les données de la littérature indiquant, chez le Rat, une altération des performances de reconnaissance spatiale avec l'âge (Cavoy et Delacour, 1993 ; Luparini et coll., 2000 ; Shukitt-Hale et coll., 2001). De plus, même dans la cohorte jeune, les performances des jeunes souris femelles étaient nettement moins performantes que les jeunes mâles. Or, au début de notre étude des souris « knock-in » apoE, la batterie de tests comportementaux avait été mise au point et testée uniquement sur des souris mâles B6 et apoE-KO. Il semblerait donc que cette tâche soit particulièrement sensible au genre et à l'âge des souris. Cette « hypersensibilité » des tâches de reconnaissance aux conditions expérimentales (voir le premier chapitre) et aux facteurs génotypiques (sexe, lignée) se révèle une fois de plus et confirme les observations d'autres auteurs (Frick et Gresack, 2003 ; Dodart et coll., 2000 ; Luine, 2002 ; Anderson et coll., 2004 ; Beck et Luine, 1999). Il n'est d'ailleurs pas exclu que nos souris B6 et/ou nos souris génétiquement modifiées aient subi l'influence du fort bruit de ventilation régnant dans la salle d'expérience V3. Quoiqu'il en soit, si cette tâche devait être à nouveau utilisée pour mettre en évidence des perturbations de la mémoire de reconnaissance spatiale, il serait souhaitable d'adapter la tâche aux souris B6 femelles d'une part, et aux souris mâles et femelles « âgées » d'autre part. Nous avons généralement obtenu de meilleures performances de reconnaissance en augmentant la durée de la séance d'acquisition. Ceci permet une meilleure familiarisation des sujets à la configuration des objets (ou à l'objet dans le cas de la tâche de reconnaissance d'objet).

Dans le test de la piscine de Morris, les performances de mémoire de référence des souris « âgées » étaient globalement comparables à celles des souris « jeunes » dans trois des

quatre lignées (sauf déficit des « jeunes » femelles apoE3 non confirmé chez les « âgées »). En effet, plusieurs études ont montré que les souris B6 même très « âgées » (24 à 26 mois) étaient capables d'apprendre correctement cette tâche sans déficit majeur par rapport aux souris « jeunes » (Frick et coll., 2000 ; Magnusson et coll., 2003 ; Magnusson, 1998). Il semblerait donc qu'avec cette tâche, relativement robuste car les souris sont entraînées avec une position de plateforme fixe au cours de 4 essais par jour pendant 4 jours, on peine à révéler les effets du vieillissement. Notons que le déficit de mémoire spatiale des souris femelles apoE4 « âgées », non détecté pendant l'apprentissage, ne s'est révélé que lors du test de rétention. En effet, la plate-forme est absente lors de ce test et l'analyse des performances en terme de temps passé dans le quadrant cible permet de mettre en exergue le manque de précision dans la recherche de la plate-forme chez les souris femelles apoE4 « âgées ». Le test de rétention apparaît donc peu sensible au effet du vieillissement jusqu'à l'âge de 14-15 mois chez les souris de fond génétique B6 (Frick et coll., 2000 ; Magnusson et coll., 2003 ; Magnusson, 1998), mais il semble plus sensible que la phase d'apprentissage à des perturbations de la mémoire spatiale.

Dans la tâche d'appariement différé, les souris B6 et apoE-KO « âgées » n'ont pas amélioré leurs performances entre les essais 1 et 2 séparés par un délai de 1 h contrairement aux souris jeunes de même lignée. Cette tâche, qui demande aux souris d'apprendre chaque jour une nouvelle localisation de la plate-forme en peu d'essais, est plus ardue à maîtriser et semble mieux adaptée pour mettre en évidence des déficits liés au vieillissement. De plus, les performances d'appariement différé étaient déjà affectées chez les souris femelles « knock-in » de la cohorte jeune. Il semble donc que cette tâche (essais 1 et 2 séparés par un délai de 1 h) puisse révéler des déficits légers de performance, comme chez nos souris « knock-in », qui n'apparaissent pas dans d'autres protocoles. La deuxième partie de la tâche d'appariement différé, où les essais ne sont séparés que de 5 mn, semble moins ardue que la première partie. En effet, toutes les lignées de souris, jeunes ou âgées, ont amélioré leurs performances, sauf les souris femelles apoE4 « âgées ». La sensibilité de cette phase de la tâche d'appariement différé semble donc proche de celle du test de rétention de la tâche de mémoire de référence. D'une façon générale, ce type de tâche d'appariement différé (souvent appelé protocole de mémoire de travail) semble particulièrement efficace pour mettre en évidence des effets délétères du vieillissement ou des manipulations génétiques chez la Souris (Magnusson et coll., 2003 ; Chen et coll., 2000).

Les effets du vieillissement ont également pu être mis en évidence dans les deux tâches d'évitement. Au cours de la séance de rétention dans la tâche d'évitement actif dans le labyrinthe en Y, nous avons observé plus d'erreurs de discrimination chez les femelles « âgées » que chez les femelles « jeunes ». Les jeunes femelles étaient déjà moins performantes que les mâles dans cette composante spatiale de la tâche : il semble donc que ce déficit s'accroît avec l'âge. La tâche d'évitement passif a mis en évidence une détérioration globale des performances avec l'âge chez les 4 lignées de souris. Les performances des souris B6 sont connues pour baisser en fonction de l'âge dans cette tâche (Fagioli et coll., 1992). Néanmoins, cette détérioration n'a pas altéré la sensibilité de la tâche, puisqu'elle a permis de mettre en évidence un déficit spécifique pour les souris de la lignée apoE4. Les deux tâches d'évitement sont donc sensibles aux effets du vieillissement, la composante de discrimination du labyrinthe en Y pour les femelles, et l'évitement passif pour l'ensemble des souris de 14-15 mois.

En conclusion, l'utilisation de différents protocoles dans un même contexte expérimental (ici la piscine de Morris) permet de faire varier la demande mnésique en évitant les variations comportementales liées aux changements d'environnement et aux apprentissages secondaires à la tâche proprement dite (explorer la piscine, monter sur la plateforme, etc.). Les déficits mnésiques discrets peuvent alors être mis en évidence lorsque la demande mnésique s'accroît (Granon et Poucet, 1995 ; Buhot et coll., 2003). L'ensemble des résultats obtenus avec nos 4 lignées de souris confirme cette idée dans la mesure où les déficits mnésiques des femelles apoE4 « âgées » ne sont apparus que lorsque la plateforme était ôtée (test de rétention après un délai de 24 h) ou bien lorsque sa localisation variait d'un jour à l'autre (l'animal ne pouvant apprendre le nouvel emplacement qu'au cours de 4 essais seulement). Par ailleurs, la multiplication des paradigmes et des tâches au sein d'une batterie de tests comportementaux en vue de caractériser une lignée de souris génétiquement modifiée est souvent critiquée car il est vrai que l'on ne maîtrise pas l'influence de la passation d'un test sur les résultats du test suivant. Néanmoins, ces batteries de tests permettent, dans une première approximation, de préciser la caractérisation comportementale d'une lignée avec un nombre limité d'individus (dont l'obtention est souvent problématique et/ou limitée). Notons à ce propos que le déficit des souris femelles apoE4 dans le test de rétention de la piscine de Morris détecté à ce moment-là a été pleinement confirmé dans l'étude des effets du sAPP sur ce déficit. A cet égard, notre étude montre les avantages de l'utilisation d'une batterie de tests

où l'on peut appréhender de plusieurs manières l'une ou l'autre fonction cognitive (mémoire spatiale et conditionnement émotionnel). Par ailleurs la multiplicité des tests accroît les chances de trouver une épreuve adaptée aux capacités cognitives des animaux témoins (effet du genre et de l'âge) et à celles des souris génétiquement modifiées (interaction avec l'âge et le genre). Il est bien entendu que chaque effet, significatif ou non, devra être confirmé ultérieurement dans des expériences dédiées.

5. Différences de performances mnésiques entre mâles et femelles

Durant notre étude, plusieurs différences de performance liées au sexe ont pu être mises en évidence. En premier lieu, il semble que les souris femelles aient montré de moins bonnes performances que les mâles dans des tâches impliquant la prise en compte d'une information spatiale. En effet, les souris femelles « âgées » (à la différence des souris « jeunes ») montrent de moins bonnes performances de reconnaissance spatiale que les mâles. Elles sont aussi légèrement moins performantes que les mâles au cours de l'apprentissage de la tâche de mémoire de référence dans la piscine de Morris. Néanmoins, les femelles ont montré d'aussi bonnes performances que les mâles lors du test de rétention 24 h plus tard (excepté pour les femelles apoE4 bien sûr). Aucune différence de performances n'a été mise en évidence entre mâles et femelles lors de la tâche d'appariement différé ou lors de la tâche avec plate-forme visible. Dans le labyrinthe en Y, les femelles « jeunes » ou « âgées » ont commis plus d'erreurs de discrimination que les mâles.

L'ensemble de ces différences de performance liées au sexe ne sont pas étonnantes dans la mesure où de nombreuses études mettent en évidence que les femelles montrent de moins bonnes performances que les mâles dans les tâches de mémoire spatiale, chez l'animal ou chez l'Homme (Bimonte et coll., 2000 ; Dabbs et coll., 1998). Ces différences ont pu être mises en évidence chez la souris B6 dans une tâche utilisant un labyrinthe radial aquatique ou une tâche de reconnaissance spatiale (Gresack et Frick, 2003 ; Frick et Gresack, 2003) ou chez la souris CD1 dans un labyrinthe radial (LaBuda et coll., 2002). Néanmoins, il faut noter que cette « capacité » des mâles par rapport aux femelles dans les tâches de mémoire spatiale reste controversée chez l'animal comme chez l'Homme (Duff et Hampson, 2001 ; Lacreuse et coll., 1999 ; Bucci et coll., 1995 ; Perrot-Sinal et coll., 1996 ; Roof et Stein, 1999).

En deuxième lieu, les femelles ont présenté une réactivité différente des mâles durant la tâche de reconnaissance spatiale. Par rapport aux mâles, les femelles sont en effet plus

actives dans l'enceinte de test durant la séance d'habituation, mais sont moins actives durant les séances d'acquisition et de rétention (en présence des objets). Les femelles explorent par contre moins les objets que les mâles durant ces deux dernières séances. Ces résultats ont été obtenus à la fois pour la cohorte « jeune » et pour la cohorte « âgée ». Ces résultats en accord avec ceux de la littérature, montrent une activité locomotrice plus importante chez les femelles que chez des mâles lors de la confrontation à un nouvel environnement (Archer, 1975) et une moindre exploration des objets par les femelles par rapport aux mâles (Beck et Luine, 2002).

Les souris apoE4 ont présenté les plus grandes différences comportementales entre mâles et femelles. La protéine apoE pourrait en effet interagir avec les systèmes hormonaux stéroïdiens. L'apoE peut en outre interagir avec les oestrogènes chez l'animal et chez l'humain (Srivastava et coll., 1997 ; Teter et coll., 1999 ; Stone et coll., 1998). Les travaux de Raber et collaborateurs (2002) posent l'hypothèse que l'apoE4 pourrait réduire le nombre de récepteurs cérébraux aux androgènes, ce qui pourrait contribuer au déclin cognitif. L'administration d'androgènes exogènes (testostérone et dihydrotestostérone) permet effectivement de restaurer de bonnes performances de mémoire spatiale chez des souris femelles apoE4 (Raber et coll., 2002). Des études ultérieures sur les interactions entre ces systèmes hormonaux, l'apoE et les processus mnésiques seront nécessaires pour mieux comprendre l'effet sexe-dépendant de l'apoE4 sur la mémoire.

6. Absence d'apoE murine vs présence d'apoE humaine

Lors de notre étude, les souris apoE-KO ont globalement présenté de bonnes performances. L'absence d'apoE n'ayant pas de réel impact sur les performances des animaux dans notre batterie de tests, on peut avancer que les perturbations comportementales observées chez les souris apoE3 et apoE4 sont donc bien dues à des effets spécifiques de l'isoforme humaine de l'apoE et pas simplement à une compensation plus ou moins complète de l'apoE murine absente par l'apoE humaine, comme l'ont suggéré Veinbergs et collaborateurs (1999).

Ces bonnes performances des souris apoE-KO sont néanmoins surprenantes étant donné que de nombreuses études ont mis en évidence des déficits mnésiques chez cette lignée de souris (Oitzl et coll., 1997 ; Gordon et coll., 1995 ; Masliah et coll., 1997 ; Zhou et coll., 1998 ; Raber et coll., 1998 ; Veinbergs et coll., 1999). Néanmoins, d'autres études contradictoires de la littérature n'ont montré aucune différence de performances entre cette

lignée et les souris témoins B6 (Anderson et coll., 1998 ; Hartman et coll., 2001). Des différences de protocole, de conditions d'élevage et d'expérimentation ou de fond génétique des souris pourraient expliquer ces différences (Champagne et coll., 2002 ; de Kloet et coll., 2002 ; Lominska et coll., 2001). Par ailleurs, les travaux de Grootendorst et collaborateurs (2001) ont mis en évidence que des souris apoE-KO soumises à un stress chronique montrent une amélioration de leurs performances de mémoire dans la piscine de Morris. Ceci pourrait expliquer l'absence de déficits observée dans notre étude chez les souris apoE-KO, puisque les deux cohortes « jeune » et « âgée » de souris des 4 lignées ont été hébergées dans la salle V3. Le séjour dans une salle fortement ventilée (donc bruyante) pendant toute la durée des expérimentations a pu influencer le niveau de corticostérone des souris, et il est connu que ce dernier peut influencer les performances de mémoire (de Kloet et coll., 2002). Les résultats de la dernière expérience (visant à évaluer les effets du sAPP sur les souris femelles apoE4 « âgées ») semblent aller dans le sens de cette hypothèse, puisque les souris B6 femelles « âgées », hébergées dans la salle V1 (faiblement ventilée et peu bruyante), ont montré de meilleures performances que lors de la caractérisation comportementale des 4 lignées de souris. Les souris apoE4, quant à elles, ont toujours montré des déficits de mémoire spatiale. On peut ainsi se demander si les différences obtenues entre les souris apoE3 et apoE4 lors de la caractérisation comportementale des deux lignées « knock-in » ne pourraient pas être encore plus marquées si l'expérience était répliquée en hébergeant les souris dans une pièce faiblement ventilée. D'une façon générale, il serait intéressant d'étudier l'impact d'un stress chronique lié à l'environnement sur les performances des souris « knock-in ».

Conclusions

L'un des deux grands objectifs de cette thèse était de caractériser les performances mnésiques des souris « knock-in » apoE3 et apoE4. Les résultats présentés dans le troisième chapitre ont permis de montrer que les souris apoE4, en particulier les femelles, montrent des déficits de mémoire dans des tâches de mémoire spatiale et dans des tâches testant une forme de mémoire épisodique. De la même façon, chez l'humain, les individus âgés porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ de l'apoE (non déments) sont plus enclins à présenter des déficits de mémoire (Wilson et coll., 2002 ; Bartres-Faz et coll., 1999 ; Bondi et coll., 1995 ; Baxter et coll., 2003 ; Helkala et coll., 1995). L'étude de Bartres-Faz et collaborateurs (2002) ainsi que celle de Mortensen et Høgh (2001) montrent que cet effet de l'apoE4 est plus marqué chez les individus de sexe féminin.

Notre travail confirme l'hypothèse d'un effet délétère de l'apoE4 par rapport à l'apoE3 sur les processus cognitifs de la Souris « âgée ». De plus, le déclin cognitif des souris apoE4 a été relativement discret dans notre étude. Or, dans les populations humaines, l'effet de l'allèle $\epsilon 4$ est souvent à la limite de la détection statistique (Bartres-Faz et coll., 2002 ; Bondi et coll., 1995 ; Mortensen et Høgh, 2001). Les souris transgéniques apoE4 apparaissent donc comme un bon modèle de déclin cognitif lié à l'âge. Néanmoins, pour toute étude ultérieure visant à caractériser plus finement le modèle ou à l'utiliser pour tester des thérapies, il sera nécessaire d'augmenter les effectifs des groupes d'animaux utilisés. De plus, il serait intéressant d'utiliser des souris encore plus âgées (par exemple âgées de plus de 20 mois) pour obtenir éventuellement un déclin cognitif plus marqué. En effet, les effets de l'allèle $\epsilon 4$ ne sont souvent mis en évidence chez l'Homme qu'avec un effectif important de patients et les effets demeurent discrets jusqu'à un âge avancé (Bartres-Faz et coll., 2002 ; Mortensen et Høgh, 2001 ; Feskens et coll., 1994).

Ce modèle de souris transgéniques pourrait également être utile pour approfondir nos connaissances sur le développement précoce de la maladie d'Alzheimer. En effet, rappelons que la possession de l'allèle $\epsilon 4$ est connue comme un facteur de risque important dans le développement possible de la MA (Saunders et coll., 1993 ; Corder et coll., 1993). De plus, les individus atteints de troubles cognitifs modérés mais non déments (MCI pour *mild cognitive impairment*) sont le plus souvent porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ (Wang et coll., 2002 ; Traykov et coll., 2002). Or, une proportion non négligeable de ces patients atteints de MCI

développent ensuite une MA (Morris et coll., 2001 ; Caselli et coll., 2004 ; Almkvist et coll., 1998). Certains auteurs considèrent même que ces patients sont en fait atteints de MA à un stade très précoce (Machulda et coll., 2003 ; Rinaldi et coll., 2003). Néanmoins, la possession de l'allèle $\epsilon 4$ de l'apoE ne reste qu'un facteur de risque dans l'apparition d'un déclin cognitif puisque l'apparition de déficits mnésiques n'intervient pas de façon systématique chez ces individus (Henderson et coll., 1995). Ceci explique, en partie au moins, la difficulté à mettre en évidence les déficits cognitifs des individus porteurs de l'allèle $\epsilon 4$.

Le deuxième grand objectif de mon travail était de poursuivre la caractérisation des effets bénéfiques du sAPP sur les processus de consolidation de la mémoire et d'éprouver ses effets dans un modèle de déficit cognitif lié à l'âge. Au cours du deuxième chapitre de cette thèse, j'ai confirmé les effets promnésiants du sAPP₆₉₅, en particulier dans une tâche de mémoire spatiale impliquant une forme de mémoire épisodique. Il serait intéressant de poursuivre la caractérisation des effets du sAPP₆₉₅ sur les performances mnésiques dans d'autres tâches et protocoles concernant la mémoire spatiale, mais aussi dans d'autres tâches concernant la mémoire épisodique (Ergorul et Eichenbaum, 2004). En effet, ces deux formes de mémoire sont connues pour être touchées très précocement dans la maladie d'Alzheimer chez l'Homme (Fujimori et coll., 1997 ; Kalman et coll., 1995, Almkvist, 1996 ; Keri et coll., 2001).

Par ailleurs, la mise en évidence de déficits mnésiques induits par les anticorps anti-sAPP α m'a permis d'étayer l'hypothèse d'un effet du sAPP₆₉₅ sur les processus de consolidation de l'information mnésique. Ces données, comme d'autres de la littérature (Doyle et coll., 1990 ; Huber et coll., 1993 ; Mileusnic et coll., 2000), sont très importantes car elles suggèrent un rôle déterminant des formes sécrétées endogènes dans ces processus de consolidation. Comme cela était initialement prévu dans mon travail de thèse, il serait maintenant indispensable de mettre en évidence une éventuelle sécrétion de sAPP lors de la mémorisation d'informations afin de confirmer notre hypothèse de départ. L'étape suivante serait de démontrer une baisse de cette sécrétion chez les souris âgées ou des souris apoE4 dans une tâche mettant en évidence leurs déficits mnésiques. L'altération de la dynamique de sécrétion du sAPP, lors du vieillissement ou au cours d'une maladie neurodégénérative comme la MA, pourrait alors être considérée comme l'un des événements clés menant à

l'apparition de perturbations mnésiques. Les travaux d'Anderson et collaborateurs (1999) ont en effet montré que les déficits de mémoire spatiale chez des rats âgés pouvaient être liés aux niveaux de sAPP mesurés dans le liquide céphalo-rachidien. Chez l'Homme, de nombreuses études montrent que les niveaux de sAPP dans le liquide céphalo-rachidien sont diminués chez les patients atteints de MA et inversement corrélés avec la sévérité de la démence (Van Nostrand et coll., 1992 ; Almkvist et coll., 1997 ; Sennvik et coll., 2000 ; Csernansky et coll., 2002). L'étude d'Olsson et collaborateurs (2003) apporte en outre un élément déterminant : cette baisse de niveau de sAPP chez les patients atteints de MA ne surviendrait que pour les patients Alzheimer porteurs de l'allèle e4 de l'apoE. Ce résultat vient à nouveau renforcer l'hypothèse d'un effet de l'apoE4 sur le métabolisme et/ou la clairance du sAPP.

La restauration des performances de mémoire spatiale des souris apoE4 âgées par l'administration i.c.v. de sAPP₆₉₅ suggère que la modulation des niveaux de sAPP α cérébraux permet de traiter les déficits cognitifs liés à l'âge. Il reste cependant encore beaucoup à apprendre sur les modes d'action des sAPP α sur les processus de consolidation de la mémoire. Il faudrait déterminer, en fonction des interactions isoforme-dépendantes possibles avec l'apoE, les cibles d'action ou récepteurs des sAPP α au niveau du cerveau. Il serait intéressant alors de préciser les domaines d'interaction (séquence de la protéine) avec cette/ces cible(s). A cet égard, une autre approche consisterait à déterminer les effets du pentapeptide « RERMS » et sa séquence « RER » dans nos tâches, pour vérifier si les effets promnésiants mis en évidence dans nos travaux pourraient être dus à ces domaines neurotrophiques de l'APP (Ninomiya et coll., 1993 ; Mileusnic et coll., 2004). Par ailleurs, une caractérisation approfondie des voies de régulation du métabolisme des sAPP α et de leur sécrétion donnerait l'alternative de moduler les niveaux endogènes de sAPP α . En conclusion, l'ensemble de mon travail de thèse suggèrent qu'une meilleure connaissance des sAPP α et de leurs effets sur la mémoire devrait permettre d'initier de nouvelles orientations thérapeutiques dans le traitement des déficits cognitifs associés au vieillissement en général, et à la maladie d'Alzheimer en particulier.

Bibliographie

- Abidin I, Yargicoglu P, Agar A, Gumuslu S, Aydin S, Ozturk O, & Sahin E** (2004) The effect of chronic restraint stress on spatial learning and memory: relation to oxidant stress *Int J Neurosci* 114 (5) : 683-699
- Adams B, Fitch T, Chaney S, & Gerlai R** (2002) Altered performance characteristics in cognitive tasks: comparison of the albino ICR and CD1 mouse strains *Behav Brain Res* 133 (2) : 351-361
- Adelstein TB, Kesner RP, & Strassberg DS** (1992) Spatial recognition and spatial order memory in patients with dementia of the Alzheimer's type *Neuropsychologia* 30 (1) : 59-67
- Adriani W, Felici A, Sargolini F, Roullet P, Usiello A, Oliverio A, & Mele A** (1998) N-methyl-D-aspartate and dopamine receptor involvement in the modulation of locomotor activity and memory processes *Exp Brain Res* 123 (1-2) : 52-59
- Adriani W, Sargolini F, Coccorello R, Oliverio A, & Mele A** (2000) Role of dopaminergic system in reactivity to spatial and non-spatial changes in mice *Psychopharmacology (Berl)* 150 (1) : 67-76
- Almkvist O** (1996) Neuropsychological features of early Alzheimer's disease: preclinical and clinical stages *Acta Neurol Scand Suppl* 165 63-71
- Almkvist O, Basun H, Wagner SL, Rowe BA, Wahlund LO, & Lannfelt L** (1997) Cerebrospinal fluid levels of alpha-secretase-cleaved soluble amyloid precursor protein mirror cognition in a Swedish family with Alzheimer disease and a gene mutation *Arch Neurol* 54 (5) : 641-644
- Almkvist O, Basun H, Backman L, Herlitz A, Lannfelt L, Small B, Viitanen M, Wahlund LO, & Winblad B** (1998) Mild cognitive impairment--an early stage of Alzheimer's disease? *J Neural Transm Suppl* 54 21-29
- Ammassari-Teule M, Tozzi A, Rossi-Arnaud C, Save E, & Thinus-Blanc C** (1995) Reactions to spatial and nonspatial change in two inbred strains of mice: Further evidence supporting the hippocampal dysfunction hypothesis in the DBA/2 strain *Psychobiology* 23 (4) : 284-289
- Anderson JJ, Holtz G, Baskin PP, Wang R, Mazzei L, Wagner SL, & Menzaghi F** (1999) Reduced cerebrospinal fluid levels of alpha-secretase-cleaved amyloid precursor protein in aged rats: correlation with spatial memory deficits *Neuroscience* 93 (4) : 1409-1420
- Anderson MJ, Barnes GW, Briggs JF, Ashton KM, Moody EW, Joynes RL, & Riccio DC** (2004) Effects of ontogeny on performance of rats in a novel object-recognition task *Psychol Rep* 94 (2) : 437-443
- Anderson R & Higgins GA** (1997) Absence of central cholinergic deficits in ApoE knockout mice *Psychopharmacology (Berl)* 132 (2) : 135-144
- Anderson R, Barnes JC, Bliss TV, Cain DP, Cambon K, Davies HA, Errington ML, Fellows LA, Gray RA, Hoh T, Stewart M, Large CH, & Higgins GA** (1998) Behavioural, physiological and morphological analysis of a line of apolipoprotein E knockout mouse *Neuroscience* 85 (1) : 93-110
- Apelt J, Schliebs R, Beck M, Rossner S, & Bigl V** (1997) Expression of amyloid precursor protein mRNA isoforms in rat brain is differentially regulated during postnatal maturation and by cholinergic activity *Int J Dev Neurosci* 15 (1) : 95-112
- Archer J** (1975) Rodent sex differences in emotional and related behavior *Behav Biol* 14 (4) : 451-479
- Bales KR, Verina T, Cummins DJ, Du Y, Dodel RC, Saura J, Fishman CE, DeLong CA, Piccardo P, Petegnief V, Ghetti B, & Paul SM** (1999) Apolipoprotein E is essential for amyloid deposition in the APP(V717F) transgenic mouse model of Alzheimer's disease *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (26) : 15233-15238
- Bales KR, Dodart JC, DeMattos RB, Holtzman DM, & Paul SM** (2002) Apolipoprotein E, amyloid, and Alzheimer disease *Mol Interv* 2 (6) : 363-75, 339
- Barger SW & Mattson MP** (1996) Induction of neuroprotective kappa B-dependent transcription by secreted forms of the Alzheimer's beta-amyloid precursor *Brain Res Mol Brain Res* 40 (1) : 116-126

- Barger SW and Mattson MP** (1997) Isoform-specific modulation by apolipoprotein E of the activities of secreted beta-amyloid precursor protein *J Neurochem* 69 (1) : 60-67
- Bartres-Faz D, Junque C, Lopez A, Valveny N, Moral P, Galvez E, Lopez T, Moya A, Navarro JL, & Clemente I** (1999) Apo E influences declarative and procedural learning in age-associated memory impairment *Neuroreport* 10 (14) : 2923-2927
- Bartres-Faz D, Junque C, Moral P, Lopez-Alomar A, Sanchez-Aldeguer J, & Clemente IC** (2002) Apolipoprotein E gender effects on cognitive performance in age-associated memory impairment *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 14 (1) : 80-83
- Baxter LC, Caselli RJ, Johnson SC, Reiman E, & Osborne D** (2003) Apolipoprotein E epsilon 4 affects new learning in cognitively normal individuals at risk for Alzheimer's disease *Neurobiol Aging* 24 (7) : 947-952
- Beck KD & Luine VN** (1999) Food deprivation modulates chronic stress effects on object recognition in male rats: role of monoamines and amino acids *Brain Res* 830 (1) : 56-71
- Beck KD & Luine VN** (2002) Sex differences in behavioral and neurochemical profiles after chronic stress: role of housing conditions *Physiol Behav* 75 (5) : 661-673
- Bellosta S, Nathan BP, Orth M, Dong LM, Mahley RW, & Pitas RE** (1995) Stable expression and secretion of apolipoproteins E3 and E4 in mouse neuroblastoma cells produces differential effects on neurite outgrowth *J Biol Chem* 270 (45) : 27063-27071
- Benzi G & Moretti A** (1995) Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? *Neurobiol Aging* 16 (4) : 661-674
- Bimonte HA, Hyde LA, Hoplight BJ, & Denenberg VH** (2000) In two species, females exhibit superior working memory and inferior reference memory on the water radial-arm maze *Physiol Behav* 70 (3-4) : 311-317
- Bohbot V, Otahal P, Liu Z, Nadel L, & Bures J** (1996) Electroconvulsive shock and lidocaine reveal rapid consolidation of spatial working memory in the water maze *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (9) : 4016-4019
- Bolanos-Garcia VM and Miguel RN** (2003) On the structure and function of apolipoproteins: more than a family of lipid-binding proteins *Prog Biophys Mol Biol* 83 (1) : 47-68
- Bondi MW, Salmon DP, Monsch AU, Galasko D, Butters N, Klauber MR, Thal LJ, & Saitoh T** (1995) Episodic memory changes are associated with the APOE-epsilon 4 allele in nondemented older adults *Neurology* 45 (12) : 2203-2206
- Bour A, Little S, Dodart JC, Kelche C, & Mathis C** (2004) A secreted form of the beta-amyloid precursor protein (sAPP₆₉₅) improves spatial recognition memory in OF1 mice *Neurobiol Learn Mem* 81 (1) : 27-38
- Bouron A, Mbebi C, Loeffler JP, & De Waard M** (2004) The beta-amyloid precursor protein controls a store-operated Ca entry in cortical neurons *Eur J Neurosci* 20 (8) : 2071-2078
- Bouwknicht JA and Paylor R** (2002) Behavioral and physiological mouse assays for anxiety: a survey in nine mouse strains *Behav Brain Res* 136 (2) : 489-501
- Braak H & Braak E** (1996) Evolution of the neuropathology of Alzheimer's disease *Acta Neurol Scand Suppl* 165 3-12
- Breitner JC** (1996) Inflammatory processes and antiinflammatory drugs in Alzheimer's disease: a current appraisal *Neurobiol Aging* 17 (5) : 789-794
- Brouillet E, Trembleau A, Galanaud D, Volovitch M, Bouillot C, Valenza C, Prochiantz A, & Allinquant B** (1999) The amyloid precursor protein interacts with Go heterotrimeric protein within a cell compartment specialized in signal transduction *J Neurosci* 19 (5) : 1717-1727
- Brown CM, Wright E, Colton CA, Sullivan PM, Laskowitz DT, & Vitek MP** (2002) Apolipoprotein E isoform mediated regulation of nitric oxide release *Free Radic Biol Med* 32 (11) : 1071-1075

- Bucci DJ, Chiba AA, & Gallagher M** (1995) Spatial learning in male and female Long-Evans rats *Behav Neurosci* 109 (1) : 180-183
- Buhot MC, Wolff M, Benhassine N, Costet P, Hen R, & Segu L** (2003) Spatial learning in the 5-HT1B receptor knockout mouse: selective facilitation/impairment depending on the cognitive demand *Learn Mem* 10 (6) : 466-477
- Bush AI, Pettingell WH Jr., de Paradis M, Tanzi RE & Wasco W** (1994) The amyloid beta-protein precursor and its mammalian homologues. Evidence for a zinc-modulated heparin-binding superfamily *J Biol Chem* 269 (43) : 26619-26621
- Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, Slack JL, Stocking KL, Peschon JJ, Johnson RS, Castner BJ, Cerretti DP, & Black RA** (1998) Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor *J Biol Chem* 273 (43) : 27765-27767
- Cai H, Wang Y, McCarthy D, Wen H, Borchelt DR, Price DL, & Wong PC** (2001) BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons *Nat Neurosci* 4 (3) : 233-234
- Caille I, Allinquant B, Dupont E, Bouillot C, Langer A, Muller U, & Prochiantz A** (2004) Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone *Development* 131 (9) : 2173-2181
- Capell A, Grunberg J, Pesold B, Diehlmann A, Citron M, Nixon R, Beyreuther K, Selkoe DJ, & Haass C** (1998) The proteolytic fragments of the Alzheimer's disease-associated presenilin-1 form heterodimers and occur as a 100-150-kDa molecular mass complex *J Biol Chem* 273 (6) : 3205-3211
- Caselli RJ, Reiman EM, Osborne D, Hentz JG, Baxter LC, Hernandez JL, & Alexander GG** (2004) Longitudinal changes in cognition and behavior in asymptomatic carriers of the APOE e4 allele *Neurology* 62 (11) : 1990-1995
- Cavoy A & Delacour J** (1993) Spatial but not object recognition is impaired by aging in rats *Physiol Behav* 53 (3) : 527-530
- Champagne D, Dupuy JB, Rochford J, & Poirier J** (2002) Apolipoprotein E knockout mice display procedural deficits in the Morris water maze: analysis of learning strategies in three versions of the task *Neuroscience* 114 (3) : 641-654
- Chartier-Harlin MC, Parfitt M, Legrain S, Perez-Tur J, Brousseau T, Evans A, Berr C, Vidal O, Roques P, & Gourlet V** (1994) Apolipoprotein E, epsilon 4 allele as a major risk factor for sporadic early and late-onset forms of Alzheimer's disease: analysis of the 19q13.2 chromosomal region *Hum Mol Genet* 3 (4) : 569-574
- Chartier-Harlin MC, Araria-Goumidi L, & Lambert JC** (2002) Les formes tardives de la maladie d'Alzheimer : de la génétique à la biologie *Médecine/Sciences* 18 (6-7) : 709-716
- Checler F, Alves da Costa C, Dumanchin-Njock C, Lopez-Perez E, Marambaud P, Paitel E, Petit A, & Vincent B** (2002) Métabolisme du précurseur du peptide amyloïde et présénilines *Médecine/Sciences* 18 (6-7) : 717-724
- Chen G, Chen KS, Knox J, Inglis J, Bernard A, Martin SJ, Justice A, McConlogue L, Games D, Freedman SB, & Morris RG** (2000) A learning deficit related to age and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease.[In Process Citation] *Nature* 408 (6815) : 975-979
- Chen Y, Lomnitski L, Michaelson DM, & Shohami E** (1997) Motor and cognitive deficits in apolipoprotein E-deficient mice after closed head injury *Neuroscience* 80 (4) : 1255-1262
- Chetelat G & Baron JC** (2003) Early diagnosis of Alzheimer's disease: contribution of structural neuroimaging *Neuroimage* 18 (2) : 525-541
- Coccorello R, Adriani W, Oliverio A, & Mele A** (2000) Effect of intra-accumbens dopamine receptor agents on reactivity to spatial and non-spatial changes in mice *Psychopharmacology (Berl)* 152 (2) : 189-199
- Cohen RM, Small C, Lalonde F, Friz J, & Sunderland T** (2001) Effect of apolipoprotein E genotype on hippocampal volume loss in aging healthy women *Neurology* 57 (12) : 2223-2228

- Collerton D** (1986) Cholinergic function and intellectual decline in alzheimer's disease *Neuroscience* 19 1-28
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, & Pericak-Vance MA** (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families [see comments] *Science* 261 (5123) : 921-923
- Costanzi M, Battaglia M, Populin R, Cestari V, & Castellano C** (2003) Anandamide and memory in CD1 mice: Effects of immobilization stress and of prior experience *Neurobiol Learn Mem* 79 (3) : 204-211
- Coulson EJ, Paliga K, Beyreuther K, & Masters CL** (2000) What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function *Neurochem Int* 36 (3) : 175-184
- Crawley J & Goodwin FK** (1980) Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines *Pharmacol Biochem Behav* 13 (2) : 167-170
- Csernansky JG, Miller JP, McKeel D, & Morris JC** (2002) Relationships among cerebrospinal fluid biomarkers in dementia of the Alzheimer type *Alzheimer Dis Assoc Disord* 16 (3) : 144-149
- Cummings BJ, Pike CJ, Shankle R, & Cotman CW** (1996) Beta-amyloid deposition and other measures of neuropathology predict cognitive status in Alzheimer's disease *Neurobiol Aging* 17 (6) : 921-933
- D'Hooge R & De Deyn PP** (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory *Brain Research Reviews* 36 (1) : 60-90
- Dabbs JM, Chang E, Strong RA, & Milun R** (1997) Spatial ability, navigation strategy, and geographic knowledge among men and women *Evol Hum Behav* 19 89-98
- Daigle I & Li C** (1993) apl-1, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (24) : 12045-12049
- Dartigues JF, Berr C, Helmer C, & Letenneur L** (2002) Epidémiologie de la maladie d'Alzheimer *Médecine/Sciences* 18 (6-7) : 737-743
- Davis DG, Schmitt FA, Wekstein DR, & Markesbery WR** (1999) Alzheimer neuropathologic alterations in aged cognitively normal subjects *J Neuropathol Exp Neurol* 58 (4) : 376-388
- de Kloet ER, Grootendorst J, Karssen AM, & Oitzl MS** (2002) Gene x environment interaction and cognitive performance: animal studies on the role of corticosterone *Neurobiol Learn Mem* 78 (3) : 570-577
- De Strooper B and Annaert W** (2000) Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein *J Cell Sci* 113 (Pt 11) 1857-1870
- De Strooper B** (2003) Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex *Neuron* 38 (1) : 9-12
- DeCarli C** (2003) Mild cognitive impairment: prevalence, prognosis, aetiology, and treatment *Lancet Neurol* 2 (1) : 15-21
- Delacourte A, David JP, Sergeant N, Buee L, Wattez A, Vermersch P, Ghazali F, Fallet-Bianco C, Pasquier F, Lebert F, Petit H, & Di Menza C** (1999) The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease *Neurology* 52 (6) : 1158-1165
- den Heijer T, Oudkerk M, Launer LJ, van Duijn CM, Hofman A, & Breteler MM** (2002) Hippocampal, amygdalar, and global brain atrophy in different apolipoprotein E genotypes *Neurology* 59 (5) : 746-748
- Destrade C & Cardo B** (1974) Effects of post-trial hippocampal stimulation on time-dependent improvement of performance in mice *Brain Res* 78 (3) : 447-454
- Dodart JC, Mathis C, & Ungerer A** (1997) Scopolamine-induced deficits in a two-trial object recognition task in mice *Neuroreport* 8 (5) : 1173-1178

- Dodart JC** (1999) Rôles du précurseur de la protéine beta-amyloïde et de ses dérivés dans les processus mnésiques et dans la pathologie de type Alzheimer : études chez des souris Swiss et des souris génétiquement modifiées. *Thèse de l'Université Louis Pasteur Strasbourg I*
- Dodart JC, Mathis C, & Ungerer A** (2000) The beta-amyloid precursor protein and its derivatives: from biology to learning and memory processes *Rev Neurosci* 11 (2-3) : 75-93
- Dodart JC, Mathis C, Bales KR, & Paul SM** (2002) Does my mouse have Alzheimer's disease? *Genes, Brain and Behavior* 1 142-155
- Doyle E, Bruce MT, Breen KC, Smith DC, Anderton B, & Regan CM** (1990) Intraventricular infusions of antibodies to amyloid-beta-protein precursor impair the acquisition of a passive avoidance response in the rat *Neurosci Lett* 115 (1) : 97-102
- Dubois B, Tounsi H, Michon H, & Deweer B** (1997) Les déficits cognitifs dans la maladie d'Alzheimer *Symposium en hommage à Yvon Lamour De la neuropsychologie à la maladie d'Alzheimer* 183-197
- Duff SJ & Hampson E** (2001) A sex difference on a novel spatial working memory task in humans *Brain Cogn* 47 (3) : 470-493
- Durschlag M, Wurbel H, Stauffacher M, & Von Holst D** (1996) Repeated blood collection in the laboratory mouse by tail incision--modification of an old technique *Physiol Behav* 60 (6) : 1565-1568
- Engelhart MJ, Geerlings MI, Ruitenbergh A, Van Swieten JC, Hofman A, Wittman JC, & Breteler MM** (2002) Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease *JAMA* 287 (24) : 3223-3229
- Enginar N, Nurten A, Yamanturk P, & Koyuncuoglu H** (1997) Scopolamine-induced convulsions in food given fasted mice: effects of physostigmine and MK-801 *Epilepsy Res* 28 (2) : 137-142
- Enginar N, Yamanturk P, Nurten A, Nurten R, & Koyuncuoglu H** (2003) Scopolamine-induced convulsions in fasted mice after food intake: determination of blood glucose levels, [3H]glutamate binding kinetics and antidopaminergic drug effects *Neuropharmacology* 44 (2) : 199-205
- Ennaceur A & Delacour J** (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data *Behav Brain Res* 31 (1) : 47-59
- Ergorul C & Eichenbaum H** (2004) The hippocampus and memory for "what," "where," and "when" *Learn Mem* 11 (4) : 397-405
- Ezra Y, Oron L, Moskovich L, Roses AD, Beni SM, Shohami E, & Michaelson DM** (2003) Apolipoprotein E4 decreases whereas apolipoprotein E3 increases the level of secreted amyloid precursor protein after closed head injury *Neuroscience* 121 (2) : 315-325
- Fagan AM, Bu G, Sun Y, Daugherty A, & Holtzman DM** (1996) Apolipoprotein E-containing high density lipoprotein promotes neurite outgrowth and is a ligand for the low density lipoprotein receptor-related protein *J Biol Chem* 271 (47) : 30121-30125
- Fagioli S, Ammassari-Teule M, Rossi-Arnaud C, & Castellano C** (1992) Age-dependent learning performance during development and aging in C57BL/6 mice *Dementia* 3 247-250
- Fazeli MS, Breen K, Errington ML, & Bliss TV** (1994) Increase in extracellular NCAM and amyloid precursor protein following induction of long-term potentiation in the dentate gyrus of anaesthetized rats *Neurosci Lett* 169 (1-2) : 77-80
- Feskens EJ, Havekes LM, Kalmijn S, de Knijff P, Launer LJ, & Kromhout D** (1994) Apolipoprotein e4 allele and cognitive decline in elderly men *BMJ* 309 (6963) : 1202-1206

- Forette F, Seux ML, Staessen JA, Thijs L, Birkenhager WH, Babarskiene MR, Babeanu S, Bossini A, Gil-Extremera B, Girerd X, Laks T, Lilov E, Moissejev V, Tuomilehto J, Vanhanen H, Webster J, Yodfat Y, & Fagard R** (1998) Prevention of dementia in randomised double-blind placebo-controlled Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) trial *Lancet* 352 (9137) : 1347-1351
- Francis PT, Palmer AM, Snape M, & Wilcock GK** (1999) The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66 (2) : 137-147
- Frick KM, Burlingame LA, Arters JA, & Berger-Sweeney J** (2000) Reference memory, anxiety and estrous cyclicity in C57BL/6NIA mice are affected by age and sex *Neuroscience* 95 (1) : 293-307
- Frick KM & Gresack JE** (2003) Sex differences in the behavioral response to spatial and object novelty in adult C57BL/6 mice *Behav Neurosci* 117 (6) : 1283-1291
- Fujimori M, Imamura T, Yamashita H, Hirono N, & Mori E** (1997) The disturbances of object vision and spatial vision in Alzheimer's disease *Dement Geriatr Cogn Disord* 8 (4) : 228-231
- Giannakopoulos P, Gold G, Duc M, Michel JP, Hof PR, & Bouras C** (2000) Neural substrates of spatial and temporal disorientation in Alzheimer's disease *Acta Neuropathol (Berl)* 100 (2) : 189-195
- Gilliam AM, McFarlane I, Lucy FM, Overly C, McConlogue L, & Breen KC** (1997) Individual isoforms of the amyloid beta precursor protein demonstrate differential adhesive potentials to constituents of the extracellular matrix *J Neurosci Res* 49 (2) : 154-160
- Gisquet-Verrier P & Alexinsky T** (1990) Long-term spontaneous improvement of performance is related to the strength of the initial training: theoretical implications *Behav Neural Biol* 53 (2) : 298-304
- Gordon I, Grauer E, Genis I, Shayek E, & Michaelson DM** (1995) Memory deficits and cholinergic impairments in apolipoprotein E-deficient mice *Neurosci Lett* 199 (1) : 1-4
- Granon S & Poucet B** (1995) Medial prefrontal lesions in the rat and spatial navigation: evidence for impaired planning *Behav Neurosci* 109 (3) : 474-484
- Gresack JE & Frick KM** (2003) Male mice exhibit better spatial working and reference memory than females in a water-escape radial arm maze task *Brain Res* 982 (1) : 98-107
- Griebel G, Belzung C, Misslin R, & Vogel E** (1993) The free-exploratory paradigm: an effective method for measuring neophobic behaviour in mice and testing potential neophobia-reducing drugs *Behav Pharmacol* 4 (6) : 637-644
- Grootendorst J, Bour A, Vogel E, Kelche C, Sullivan MP, Dodart JC, Bales K, & Mathis C** Human apoE targeted replacement mouse lines: h-apoE4 and h-apoE3 mice differ on spatial memory performance and avoidance behavior *Behav Brain Res* (sous presse)
- Grootendorst J** (2001) Stress effects on cognitive performance of apolipoprotein E knockout mice - Implications for Alzheimer's disease *Thèse de l'Université de Leiden (Pays-Bas)*
- Grootendorst J, de Kloet ER, Vossen C, Dalm S, & Oitzl MS** (2001) Repeated exposure to rats has persistent genotype-dependent effects on learning and locomotor activity of apolipoprotein E knockout and C57Bl/6 mice *Behav Brain Res* 125 (1-2) : 249-259
- Grootendorst J, Oitzl MS, Dalm S, Enthoven L, Schachner M, de Kloet ER, & Sandi C** (2001) Stress alleviates reduced expression of cell adhesion molecules (NCAM, L1), and deficits in learning and corticosterone regulation of apolipoprotein E knockout mice *Eur J Neurosci* 14 (9) : 1505-1514
- Grootendorst J, de Kloet ER, Dalm S, & Oitzl MS** (2001) Reversal of cognitive deficit of apolipoprotein E knockout mice after repeated exposure to a common environmental experience *Neuroscience* 108 (2) : 237-247
- Hardy J, Duff K, Hardy KG, Perez-Tur J, & Hutton M** (1998) Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau *Nat Neurosci* 1 (5) : 355-358

- Hartman RE, Wozniak DF, Nardi A, Olney JW, Sartorius L, & Holtzman DM** (2001) Behavioral phenotyping of GFAP-apoE3 and -apoE4 transgenic mice: apoE4 mice show profound working memory impairments in the absence of Alzheimer's-like neuropathology *Exp Neurol* 170 (2) : 326-344
- Heber S, Herms J, Gajic V, Hainfellner J, Aguzzi A, Rulicke T, von Kretschmar H, von Koch C, Sisodia S, Tremml P, Lipp HP, Wolfer DP, & Muller U** (2000) Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members *J Neurosci* 20 (21) : 7951-7963
- Hebert LE, Scherr PAS, Bienias JLS, Bennett DAM, & Evans DAM** (2003) Alzheimer Disease in the US Population: Prevalence Estimates Using the 2000 Census. *Arch Neurol* 60 (8) : 1119-1122
- Helkala EL, Koivisto K, Hanninen T, Vanhanen M, Kervinen K, Kuusisto J, Mykkanen L, Kesaniemi YA, Laakso M, & Riekkinen P, Sr.** (1995) The association of apolipoprotein E polymorphism with memory: a population based study *Neurosci Lett* 191 (3) : 141-144
- Henderson AS, Eastel S, Jorm AF, Mackinnon AJ, Korten AE, Christensen H, Croft L, & Jacomb PA** (1995) Apolipoprotein E allele epsilon 4, dementia, and cognitive decline in a population sample *Lancet* 346 (8987) : 1387-1390
- Hofman A, Ott A, Breteler MM, Bots ML, Slooter AJ, van Harskamp F, van Duijn CN, Van Broeckhoven C, & Grobbee DE** (1997) Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study *Lancet* 349 (9046) : 151-154
- Holtzman DM, Pitas RE, Kilbridge J, Nathan B, Mahley RW, Bu G, & Schwartz AL** (1995) Low density lipoprotein receptor-related protein mediates apolipoprotein E-dependent neurite outgrowth in a central nervous system-derived neuronal cell line *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (21) : 9480-9484
- Holtzman DM, Fagan AM, Mackey B, Tenkova T, Sartorius L, Paul SM, Bales K, Ashe KH, Irizarry MC, & Hyman BT** (2000) Apolipoprotein E facilitates neuritic and cerebrovascular plaque formation in an Alzheimer's disease model *Ann Neurol* 47 (6) : 739-747
- Horejsi B & Ceska R** (2000) Apolipoproteins and atherosclerosis. Apolipoprotein E and apolipoprotein(a) as candidate genes of premature development of atherosclerosis *Physiol Res* 49 Suppl 1 S63-S69
- Hotchkiss AK, Pyter LM, Neigh GN, & Nelson RJ** (2004) Nycthemeral differences in response to restraint stress in CD-1 and C57BL/6 mice *Physiol Behav* 80 (4) : 441-447
- Huber G, Martin JR, Loffler J, & Moreau JL** (1993) Involvement of amyloid precursor protein in memory formation in the rat: an indirect antibody approach *Brain Res* 603 (2) : 348-352
- Ignatius MJ, Gebicke-Harter PJ, Skene JH, Schilling JW, Weisgraber KH, Mahley RW, & Shooter EM** (1986) Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (4) : 1125-1129
- Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Zaidi T, Merz PA, Wen GY, Shaikh SS, Wisniewski HM, Alafuzoff I, & Winblad B** (1986) Defective brain microtubule assembly in Alzheimer's disease *Lancet* 2 (8504) : 421-426
- Iacson O, Seo H, Lin L, Albeck D, & Granholm AC** (2002) Alzheimer's disease and Down's syndrome: roles of APP, trophic factors and ACh *Trends Neurosci* 25 (2) : 79-84
- Ishida A, Furukawa K, Keller JN, & Mattson MP** (1997) Secreted form of beta-amyloid precursor protein shifts the frequency dependency for induction of LTD, and enhances LTP in hippocampal slices *Neuroreport* 8 (9-10) : 2133-2137
- Ishiguro M, Ohsawa I, Takamura C, Morimoto T, & Kohsaka S** (1998) Secreted form of beta-amyloid precursor protein activates protein kinase C and phospholipase Cgamma in cultured embryonic rat neocortical cells *Brain Res Mol Brain Res* 53 (1-2) : 24-32

- Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N & Ihara Y** (1994) Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43) *Neuron* 13 (1) : 45-53
- Izquierdo I** (1989) Different forms of post-training memory processing *Behav Neural Biol* 51 (2) : 171-202
- Jaffard R, Destrade C, Soumireu-Mourat B, Cardo B** (1974) Time-dependent improvement of performance on appetitive tasks in mice *Behav Biol* 11 (1) : 89-100
- Jordan J, Galindo MF, Miller RJ, Reardon CA, Getz GS, & LaDu MJ** (1998) Isoform-specific effect of apolipoprotein E on cell survival and beta-amyloid-induced toxicity in rat hippocampal pyramidal neuronal cultures *J Neurosci* 18 (1) : 195-204
- Joseph J, Shukitt-Hale B, Denisova NA, Martin A, Perry G, & Smith MA** (2001) Copernicus revisited: amyloid beta in Alzheimer's disease *Neurobiol Aging* 22 (1) : 131-146
- Kalman J, Magloczky E, & Janka Z** (1995) Disturbed visuo-spatial orientation in the early stage of Alzheimer's dementia *Arch Gerontol Geriatr* 21 27-34
- Kawas C, Resnick S, Morrison A, Brookmeyer R, Corrada M, Zonderman A, Bacal C, Lingle DD, & Metter E** (1997) A prospective study of estrogen replacement therapy and the risk of developing Alzheimer's disease: the Baltimore Longitudinal Study of Aging *Neurology* 48 (6) : 1517-1521
- Keithley EM, Canto C, Zheng QY, Fischel-Ghodsian N, & Johnson KR** (2004) Age-related hearing loss and the ahl locus in mice *Hear Res* 188 (1-2) : 21-28
- Keri S & Janka Z** (2001) Mémoire et apprentissage dans la maladie d'Alzheimer *Alzheimer Actualités* 159 6-11
- Kidd M** (1963) Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease *Nature* 197 192-193
- Kim JJ and Yoon KS** (1998) Stress: metaplastic effects in the hippocampus *Trends Neurosci* 21 (12) : 505-509
- Kitagawa K, Matsumoto M, Kuwabara K, Takasawa K, Tanaka S, Sasaki T, Matsushita K, Ohtsuki T, Yanagihara T, & Hori M** (2002) Protective effect of apolipoprotein E against ischemic neuronal injury is mediated through antioxidant action *J Neurosci Res* 68 (2) : 226-232
- Knouff C, Hinsdale ME, Mezdour H, Altenburg MK, Watanabe M, Quarfordt SH, Sullivan PM, & Maeda N** (1999) Apo E structure determines VLDL clearance and atherosclerosis risk in mice *J Clin Invest* 103 (11) : 1579-1586
- Kounnas MZ, Moir RD, Rebeck GW, Bush AI, Argraves WS, Tanzi RE, Hyman BT, & Strickland DK** (1995) LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation *Cell* 82 (2) : 331-340
- Krzywkowski P, Ghribi O, Gagne J, Chabot C, Kar S, Rochford J, Massicotte G, & Poirier J** (1999) Cholinergic systems and long-term potentiation in memory-impaired apolipoprotein E-deficient mice *Neuroscience* 92 (4) : 1273-1286
- Kurt MA, Davies DC, Kidd M, Duff K, & Howlett DR** (2003) Hyperphosphorylated tau and paired helical filament-like structures in the brains of mice carrying mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin-1 transgenes *Neurobiol Dis* 14 (1) : 89-97
- LaBuda CJ, Mellgren RL, & Hale RL** (2002) Sex differences in the acquisition of a radial maze task in the CD-1 mouse *Physiol Behav* 76 (2) : 213-217
- Lacresse A, Herndon JG, Killiany RJ, Rosene DL, & Moss MB** (1999) Spatial cognition in rhesus monkeys: male superiority declines with age *Horm Behav* 36 (1) : 70-76
- LaDu MJ, Shah JA, Reardon CA, Getz GS, Bu G, Hu J, Guo L, & Van Eldik LJ** (2001) Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors modulate A beta-induced glial neuroinflammatory responses *Neurochem Int* 39 (5-6) : 427-434

- Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, & Fahrenholz F** (1999) Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (7) : 3922-3927
- Law A, Gauthier S, & Quirion R** (2003) Alteration of nitric oxide synthase activity in young and aged apolipoprotein E-deficient mice *Neurobiol Aging* 24 (1) : 187-190
- Leanza G** (1998) Chronic elevation of amyloid precursor protein expression in the neocortex and hippocampus of rats with selective cholinergic lesions *Neurosci Lett* 257 (1) : 53-56
- LeBlanc AC, Chen HY, Autilio-Gambetti L, & Gambetti P** (1991) Differential APP gene expression in rat cerebral cortex, meninges, and primary astroglial, microglial and neuronal cultures *FEBS Lett* 292 (1-2) : 171-178
- Lehtovirta M, Laakso MP, Soininen H, Helisalmi S, Mannermaa A, Helkala EL, Partanen K, Ryyanen M, Vainio P, & Hartikainen P** (1995) Volumes of hippocampus, amygdala and frontal lobe in Alzheimer patients with different apolipoprotein E genotypes *Neuroscience* 67 (1) : 65-72
- Letenneur L, Gilleron V, Commenges D, Helmer C, Orgogozo JM, & Dartigues JF** (1999) Are sex and educational level independent predictors of dementia and Alzheimer's disease? Incidence data from the PAQUID project *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66 (2) : 177-183
- Lin L, Georgievska B, Mattsson A, & Isacson O** (1999) Cognitive changes and modified processing of amyloid precursor protein in the cortical and hippocampal system after cholinergic synapse loss and muscarinic receptor activation *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (21) : 12108-12113
- Linton MF, Gish R, Hubl ST, Butler E, Esquivel C, Bry WI, Boyles JK, Wardell MR, & Young SG** (1991) Phenotypes of apolipoprotein B and apolipoprotein E after liver transplantation *J Clin Invest* 88 (1) : 270-281
- Lister RG** (1990) Ethologically-based animal models of anxiety disorders *Pharmacol Ther* 46 (3) : 321-340
- Lominska C, Levin JA, Wang J, Sikes J, Kao C, & Smith JD** (2001) Apolipoprotein E deficiency effects on learning in mice are dependent upon the background strain *Behav Brain Res* 120 (1) : 23-34
- Lomnitski L, Kohen R, Chen Y, Shohami E, Trembovler V, Vogel T, & Michaelson DM** (1997) Reduced levels of antioxidants in brains of apolipoprotein E-deficient mice following closed head injury *Pharmacol Biochem Behav* 56 (4) : 669-673
- Luine V** (2002) Sex differences in chronic stress effects on memory in rats *Stress* 5 (3) : 205-216
- Luo Y, Bolon B, Kahn S, Bennett BD, Babu-Khan S, Denis P, Fan W, Kha H, Zhang J, Gong Y, Martin L, Louis JC, Yan Q, Richards WG, Citron M, & Vassar R** (2001) Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation *Nat Neurosci* 4 (3) : 231-232
- Luparini MR, Del Vecchio A, Barillari G, Magnani M, & Prosdocimi M** (2000) Cognitive impairment in old rats: a comparison of object displacement, object recognition and water maze *Aging (Milano)* 12 (4) : 264-273
- Maccioni RB, Munoz JP, & Barbeito L** (2001) The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders *Arch Med Res* 32 (5) : 367-381
- Machulda MM, Ward HA, Borowski B, Gunter JL, Cha RH, O'Brien PC, Petersen RC, Boeve BF, Knopman D, Tang-Wai DF, Ivnik RJ, Smith GE, Tangalos EG, & Jack CR, Jr.** (2003) Comparison of memory fMRI response among normal, MCI, and Alzheimer's patients *Neurology* 61 (4) : 500-506
- Magnusson KR** (1998) Aging of glutamate receptors: correlations between binding and spatial memory performance in mice *Mech Ageing Dev* 104 (3) : 227-248

- Magnusson KR, Scruggs B, Aniya J, Wright KC, Ontl T, Xing Y, & Bai L** (2003) Age-related deficits in mice performing working memory tasks in a water maze *Behav Neurosci* 117 (3) : 485-495
- Mahley RW & Rall SC, Jr.** (2000) Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein *Annu Rev Genomics Hum Genet* 1 507-537
- Mandelkow EM and Mandelkow E** (1998) Tau in Alzheimer's disease *Trends Cell Biol* 8 (11) : 425-427
- Masliah E, Samuel W, Veinbergs I, Mallory M, Mante M, & Saitoh T** (1997) Neurodegeneration and cognitive impairment in apoE-deficient mice is ameliorated by infusion of recombinant apoE *Brain Res* 751 (2) : 307-314
- Mathis C, Vogel E, Cagniard B, Criscuolo F, & Ungerer A** (1996) The neurosteroid pregnenolone sulfate blocks deficits induced by a competitive NMDA antagonist in active avoidance and lever-press learning tasks in mice *Neuropharmacology* 35 (8) : 1057-1064
- Mattson MP, Barger SW, Furukawa K, Bruce AJ, Wyss-Coray T, Mark RJ, Mucke L** (1997) Cellular signaling roles of TGF beta, TNF alpha and beta APP in brain injury responses and Alzheimer's disease *Brain Res Rev* 23 (1-2) : 47-61
- Maurer K, Volk S, & Gerbaldo H** (1997) Auguste D and Alzheimer's disease *Lancet* 349 (9064) : 1546-1549
- McGaugh JL, Cahill L, & Roozendaal B** (1996) Involvement of the amygdala in memory storage: interaction with other brain systems *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (24) : 13508-13514
- McGaughy J, Everitt BJ, Robbins TW, & Sarter M** (2000) The role of cortical cholinergic afferent projections in cognition: impact of new selective immunotoxins *Behav Brain Res* 115 (2) : 251-263
- McIlwain KL, Merriweather MY, Yuva-Paylor LA, & Paylor R** (2001) The use of behavioral test batteries: effects of training history *Physiol Behav* 73 (5) : 705-717
- Messier C, Durkin T, Mrabet O, & Destrade C** (1990) Memory-improving action of glucose: indirect evidence for a facilitation of hippocampal acetylcholine synthesis *Behav Brain Res* 39 (2) : 135-143
- Meziane H** (1993) Amnésies diencephaliques expérimentales chez la Souris. Implication de la cholecystokinine (CCK) thalamo-cingulaire dans les processus mnésiques : approche comportementale, pharmacologique et immunohistochimique. *Thèse de l'Université de Provence Aix-Marseille I*
- Meziane H, Dodart JC, Mathis C, Little S, Clemens J, Paul SM, & Ungerer A** (1998) Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (21) : 12683-12688
- Mileusnic R, Lancashire CL, Johnston AN, & Rose SP** (2000) APP is required during an early phase of memory formation *Eur J Neurosci* 12 (12) : 4487-4495
- Mileusnic R, Lancashire CL, & Rose SP** (2004) The peptide sequence Arg-Glu-Arg, present in the amyloid precursor protein, protects against memory loss caused by A beta and acts as a cognitive enhancer *Eur J Neurosci* 19 (7) : 1933-1938
- Mills J & Reiner PB** (1999) Regulation of amyloid precursor protein cleavage *J Neurochem* 72 (2) : 443-460
- Miranda MI, Ramirez-Lugo L, & Bermudez-Rattoni F** (2000) Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus [In Process Citation] *Brain Res* 882 (1-2) : 230-235
- Misslin R & Cigrang M** (1986) Does neophobia necessarily imply fear or anxiety? *Behav Process* 12 45-50
- Miyata M & Smith JD** (1996) Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides *Nat Genet* 14 (1) : 55-61
- Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Sasaki H, & Tabira T** (2001) Effect of chronic stress on cholinergic transmission in rat hippocampus *Brain Res* 915 (1) : 108-111

- Morimoto T, Ohsawa I, Takamura C, Ishiguro M, & Kohsaka S** (1998) Involvement of amyloid precursor protein in functional synapse formation in cultured hippocampal neurons *J Neurosci Res* 51 (2) : 185-195
- Morris JC, Storandt M, Miller JP, McKeel DW, Price JL, Rubin EH, & Berg L** (2001) Mild cognitive impairment represents early-stage Alzheimer disease *Arch Neurol* 58 (3) : 397-405
- Morris R** (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat *J Neurosci Methods* 11 (1) : 47-60
- Mortensen EL & Hogg P** (2001) A gender difference in the association between APOE genotype and age-related cognitive decline *Neurology* 57 (1) : 89-95
- Mukaetova-Ladinska EB, Harrington CR, Roth M, & Wischik CM** (1996) Alterations in tau protein metabolism during normal aging *Dementia* 7 (2) : 95-103
- Muller D, Wiegmann H, Langer U, Moltzen-Lenz S, & Nitsch RM** (1998) Lu 25-109, a combined m1 agonist and m2 antagonist, modulates regulated processing of the amyloid precursor protein of Alzheimer's disease *J Neural Transm* 105 (8-9) : 1029-1043
- Naidu A, Xu Q, Catalano R, & Cordell B** (2002) Secretion of apolipoprotein E by brain glia requires protein prenylation and is suppressed by statins *Brain Res* 958 (1) : 100-111
- Nathan BP, Bellosta S, Sanan DA, Weisgraber KH, Mahley RW, & Pitas RE** (1994) Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro *Science* 264 (5160) : 850-852
- Nathan BP, Jiang Y, Wong GK, Shen F, Brewer GJ, & Struble RG** (2002) Apolipoprotein E4 inhibits, and apolipoprotein E3 promotes neurite outgrowth in cultured adult mouse cortical neurons through the low-density lipoprotein receptor-related protein *Brain Res* 928 (1-2) : 96-105
- Ninomiya H, Roch JM, Sundsmo MP, Otero DA, & Saitoh T** (1993) Amino acid sequence RERMS represents the active domain of amyloid beta/A4 protein precursor that promotes fibroblast growth *J Cell Biol* 121 (4) : 879-886
- Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, & LaFerla FM** (2003) Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease *Neurobiol Aging* 24 (8) : 1063-1070
- Oitzl MS, Mulder M, Lucassen PJ, Havekes LM, Grootendorst J, & de Kloet ER** (1997) Severe learning deficits in apolipoprotein E-knockout mice in a water maze task *Brain Res* 752 (1-2) : 189-196
- Okamoto T, Takeda S, Murayama Y, Ogata E, & Nishimoto I** (1995) Ligand-dependent G protein coupling function of amyloid transmembrane precursor *J Biol Chem* 270 (9) : 4205-4208
- Olivenza R, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Fernandez AP, Rodrigo J, Bosca L, & Leza JC** (2000) Chronic stress induces the expression of inducible nitric oxide synthase in rat brain cortex *J Neurochem* 74 (2) : 785-791
- Olsson A, Hoggund K, Sjogren M, Andreasen N, Minthon L, Lannfelt L, Buerger K, Moller HJ, Hampel H, Davidsson P, & Blennow K** (2003) Measurement of alpha- and beta-secretase cleaved amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid from Alzheimer patients *Exp Neurol* 183 (1) : 74-80
- Park DC, Lautenschlager G, Hedden T, Davidson NS, Smith AD, & Smith PK** (2002) Models of visuospatial and verbal memory across the adult life span *Psychol Aging* 17 (2) : 299-320
- Pereira ME, Dalmaz C, Rosat RM, & Izquierdo I** (1988) Diazepam blocks the interfering effect of post-training behavioral manipulations on retention of a shuttle avoidance task *Psychopharmacology (Berl)* 94 (3) : 402-404
- Perrot-Sinal TS, Kostenuik MA, Ossenkopp KP, Kavaliers M** (1996) Sex differences in performance in the Morris water maze and the effects of initial nonstationary hidden platform training *Behav Neurosci* 110 (6) : 1309-1320

- Perry G, Taddeo MA, Nunomura A, Zhu X, Zenteno-Savin T, Drew KL, Shimohama S, Avila J, Castellani RJ, & Smith MA** (2002) Comparative biology and pathology of oxidative stress in Alzheimer and other neurodegenerative diseases: beyond damage and response *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 133 (4) : 507-513
- Poirier J, Hess M, May PC, Finch CE** (1991) Astrocytic apolipoprotein E mRNA and GFAP mRNA in hippocampus after entorhinal cortex lesioning *Mol Brain Res* 11 (2) : 97-106
- Poucet B, Chapuis N, Durup M, & Thinus-Blanc C** (1986) A study of exploratory behavior as an index of spatial knowledge in hamsters *Anim Learn Behav* 14 (1) : 93-100
- Poucet B** (1993) Spatial cognitive maps in animals - new hypotheses on their structure and neural mechanisms *Psychological Review* 100 (2) : 163-182
- Prosen CA, Dore DJ, & May BJ** (2003) The functional age of hearing loss in a mouse model of presbycusis. I. Behavioral assessments *Hear Res* 183 (1-2) : 44-56
- Puolivali J, Miettinen R, Pradier L, & Riekkinen P, Jr.** (2000) Apolipoprotein E-deficient mice are not more susceptible to the biochemical and memory deficits induced by nucleus basalis lesion *Neuroscience* 96 (2) : 291-297
- Puttfarcken PS, Manelli AM, Falduto MT, Getz GS, & LaDu MJ** (1997) Effect of apolipoprotein E on neurite outgrowth and beta-amyloid-induced toxicity in developing rat primary hippocampal cultures *J Neurochem* 68 (2) : 760-769
- Qiao X, Cummins DJ, & Paul SM** (2001) Neuroinflammation-induced acceleration of amyloid deposition in the APPV717F transgenic mouse *Eur J Neurosci* 14 (3) : 474-482
- Qiu WQ, Ferreira A, Miller C, Koo EH, & Selkoe DJ** (1995) Cell-surface beta-amyloid precursor protein stimulates neurite outgrowth of hippocampal neurons in an isoform-dependent manner *J Neurosci* 15 (3 Pt 2) : 2157-2167
- Raber J, Wong D, Buttini M, Orth M, Bellosta S, Pitas RE, Mahley RW, & Mucke L** (1998) Isoform-specific effects of human apolipoprotein E on brain function revealed in ApoE knockout mice: increased susceptibility of females *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (18) : 10914-10919
- Raber J, Wong D, Yu GQ, Buttini M, Mahley RW, Pitas RE, & Mucke L** (2000) Apolipoprotein E and cognitive performance *Nature* 404 (6776) : 352-354
- Raber J, Bongers G, LeFevour A, Buttini M, Mucke L** (2002) Androgens protect against apolipoprotein E4-induced cognitive deficits *J Neurosci* 22 (12) : 5204-5209
- Reed T, Carmelli D, Swan GE, Breitner JC, Welsh KA, Jarvik GP, Deeb S, & Auwerx J** (1994) Lower cognitive performance in normal older adult male twins carrying the apolipoprotein E epsilon 4 allele *Arch Neurol* 51 (12) : 1189-1192
- Rigaud AS & Forette F** (2002) Maladie d'Alzheimer : vision d'ensemble, aspects cliniques, facteurs de risque et prévention *Médecine/Sciences* 18 (6-7) : 689-696
- Rinaldi P, Polidori MC, Metastasio A, Mariani E, Mattioli P, Cherubini A, Catani M, Cecchetti R, Senin U, & Mecocci P** (2003) Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease *Neurobiol Aging* 24 (7) : 915-919
- Roch JM, Masliah E, Roch-Leveq AC, Sundsmo MP, Otero DA, Veinbergs I, & Saitoh T** (1994) Increase of synaptic density and memory retention by a peptide representing the trophic domain of the amyloid beta/A4 protein precursor *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (16) : 7450-7454
- Rohan de Silva HA, Jen A, Wickenden C, Jen LS, Wilkinson SL, & Patel AJ** (1997) Cell-specific expression of beta-amyloid precursor protein isoform mRNAs and proteins in neurons and astrocytes *Brain Res Mol Brain Res* 47 (1-2) : 147-156
- Roof RL & Stein DG** (1999) Gender differences in Morris water maze performance depend on task parameters *Physiol Behav* 68 (1-2) : 81-86

- Roosendaal B** (2002) Stress and memory: opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval *Neurobiol Learn Mem* 78 (3) : 578-595
- Roses AD** (1998) Alzheimer diseases: a model of gene mutations and susceptibility polymorphisms for complex psychiatric diseases *Am J Med Genet* 81 (1) : 49-57
- Rossner S, Ueberham U, Yu J, Kirazov L, Schliebs R, Perez-Polo JR, & Bigl V** (1997) In vivo regulation of amyloid precursor protein secretion in rat neocortex by cholinergic activity *Eur J Neurosci* 9 (10) : 2125-2134
- Rossner S, Ueberham U, Schliebs R, Perez-Polo JR, & Bigl V** (1998) The regulation of amyloid precursor protein metabolism by cholinergic mechanisms and neurotrophin receptor signaling *Prog Neurobiol* 56 (5) : 541-569
- Roullet P, Mele A, & Ammassari-Teule M** (1996) Involvement of glutamatergic and dopaminergic systems in the reactivity of mice to spatial and non-spatial change *Psychopharmacology (Berl)* 126 (1) : 55-61
- Roullet P, Bozec G, & Carton N** (1998) Detection of object orientation and spatial changes by mice: importance of local views *Physiol Behav* 64 (2) : 203-207
- Roullet P, Sargolini F, Oliverio A, & Mele A** (2001) NMDA and AMPA antagonist infusions into the ventral striatum impair different steps of spatial information processing in a nonassociative task in mice *J Neurosci* 21 (6) : 2143-2149
- Russo C, Angelini G, Dapino D, Piccini A, Piombo G, Schettini G, Chen S, Teller JK, Zaccheo D, Gambetti P, & Tabaton M** (1998) Opposite roles of apolipoprotein E in normal brains and in Alzheimer's disease *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (26) : 15598-15602
- Sargolini F, Roullet P, Oliverio A, & Mele A** (2003) Effects of intra-accumbens focal administrations of glutamate antagonists on object recognition memory in mice *Behav Brain Res* 138 (2) : 153-163
- Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ, Hulette C, Crain B, Goldgaber D, & Roses AD** (1993) Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease *Neurology* 43 (8) : 1467-1472
- Save E, Poucet B, Foreman N, & Buhot MC** (1992) Object exploration and reactions to spatial and nonspatial changes in hooded rats following damage to parietal cortex or hippocampal formation *Behav Neurosci* 106 (3) : 447-456
- Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D, & Roses AD** (1993) Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (20) : 9649-9653
- Schmidt H, Schmidt R, Fazekas F, Semmler J, Kapeller P, Reinhart B, & Kostner GM** (1996) Apolipoprotein E e4 allele in the normal elderly: neuropsychologic and brain MRI correlates *Clin Genet* 50 (5) : 293-299
- Selkoe DJ** (1998) The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease *Trends Cell Biol* 8 (11) : 447-453
- Selkoe DJ** (2002) Deciphering the genesis and fate of amyloid beta-protein yields novel therapies for Alzheimer disease *J Clin Invest* 110 (10) : 1375-1381
- Selkoe DJ** (2004) Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies *Ann Intern Med* 140 (8) : 627-638
- Sennvik K, Fastbom J, Blomberg M, Wahlund LO, Winblad B, & Benedikz E** (2000) Levels of alpha- and beta-secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients *Neurosci Lett* 278 (3) : 169-172

- Shukitt-Hale B, Casadesus G, Cantuti-Castelvetri I, & Joseph JA** (2001) Effect of age on object exploration, habituation, and response to spatial and nonspatial change *Behav Neurosci* 115 (5) : 1059-1064
- Sik A, van Nieuwehuyzen P, Prickaerts J, & Blokland A** (2003) Performance of different mouse strains in an object recognition task *Behav Brain Res* 147 (1-2) : 49-54
- Small BJ, Basun H, & Backman L** (1998) Three-year changes in cognitive performance as a function of apolipoprotein E genotype: evidence from very old adults without dementia *Psychol Aging* 13 (1) : 80-87
- Smith MA, Drew KL, Nunomura A, Takeda A, Hirai K, Zhu X, Atwood CS, Raina AK, Rottkamp CA, Sayre LM, Friedland RP, & Perry G** (2002) Amyloid-beta, tau alterations and mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease: the chickens or the eggs? *Neurochem Int* 40 (6) : 527-531
- Srivastava RA, Srivastava N, Aversa M, Lin RC, Korach KS, Lubahn DB, & Schonfeld G** (1997) Estrogen up-regulates apolipoprotein E (ApoE) gene expression by increasing ApoE mRNA in the translating pool via the estrogen receptor alpha-mediated pathway *J Biol Chem* 272 (52) : 33360-33366
- Stancampiano R, Cocco S, Cugusi C, Sarais L, & Fadda F** (1999) Serotonin and acetylcholine release response in the rat hippocampus during a spatial memory task *Neuroscience* 89 (4) : 1135-1143
- Steckler T, Drinkenburg WH, Sahgal A, & Aggleton JP** (1998) Recognition memory in rats--II. Neuroanatomical substrates *Prog Neurobiol* 54 (3) : 313-332
- Stone DJ, Rozovsky I, Morgan TE, Anderson CP, & Finch CE** (1998) Increased synaptic sprouting in response to estrogen via an apolipoprotein E-dependent mechanism: implications for Alzheimer's disease *J Neurosci* 18 (9) : 3180-3185
- Storey E, Beyreuther K, & Masters CL** (1996) Alzheimer's disease amyloid precursor protein on the surface of cortical neurons in primary culture co-localizes with adhesion patch components *Brain Res* 735 (2) : 217-231
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, & Roses AD** (1993) Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (5) : 1977-1981
- Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong LM, Salvesen GS, Pericak-Vance M, Schmechel D, Saunders AM, Goldgaber D, & Roses AD** (1993) Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (17) : 8098-8102
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Goedert M, Weisgraber KH, Dong LM, Jakes R, Huang DY, Pericak-Vance M, Schmechel D, & Roses AD** (1994) Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau: implications for Alzheimer disease *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (23) : 11183-11186
- Sullivan PM, Mezdour H, Aratani Y, Knouff C, Najib J, Reddick RL, Quarfordt SH, & Maeda N** (1997) Targeted replacement of the mouse apolipoprotein E gene with the common human APOE3 allele enhances diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis *J Biol Chem* 272 (29) : 17972-17980
- Sullivan PM, Mace BE, Maeda N, & Schmechel DE** (2004) Marked regional differences of brain human apolipoprotein e expression in targeted replacement mice *Neuroscience* 124 (4) : 725-733
- Tabata H, Kitamura T, & Nagamatsu N** (1998) Comparison of effects of restraint, cage transportation, anaesthesia and repeated bleeding on plasma glucose levels between mice and rats *Lab Anim* 32 (2) : 143-148
- Tanzi RE, Kovacs DM, Kim TW, Moir RD, Guenette SY, & Wasco W** (1996) The gene defects responsible for familial Alzheimer's disease *Neurobiol Dis* 3 (3) : 159-168
- Teter B, Harris-White ME, Frautschy SA, & Cole GM** (1999) Role of apolipoprotein E and estrogen in mossy fiber sprouting in hippocampal slice cultures *Neuroscience* 91 (3) : 1009-1016

- Thiel CM, Huston JP, & Schwarting RK** (1998) Cholinergic activation in frontal cortex and nucleus accumbens related to basic behavioral manipulations: handling, and the role of post-handling experience *Brain Res* 812 (1-2) : 121-132
- Thinus-Blanc C, Save E, Rossi-Arnaud C, Tozzi A, & Ammassari-Teule M** (1996) The differences shown by C57BL/6 and DBA/2 inbred mice in detecting spatial novelty are subserved by a different hippocampal and parietal cortex interplay *Behav Brain Res* 80 (1-2) : 33-40
- Traykov L, Rigaud AS, Baudic S, Smaghe A, Boller F, & Forette F** (2002) Apolipoprotein E epsilon 4 allele frequency in demented and cognitively impaired patients with and without cerebrovascular disease *J Neurol Sci* 203-204 : 177-181
- Turner PR, O'Connor K, Tate WP, & Abraham WC** (2003) Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory *Prog Neurobiol* 70 (1) : 1-32
- Ungerer A, Mathis C, Melan C, & de Barry J** (1991) The NMDA receptor antagonists, CPP and gamma-L-glutamyl-L-aspartate, selectively block post-training improvement of performance in a Y-maze avoidance learning task *Brain Res* 549 (1) : 59-65
- Ungerer A, Melan C, & de Barry J** (1993) Strain-dependent effects of gamma-L-glutamyl-L-aspartate, a NMDA antagonist, on retention of a Y-maze avoidance learning task in mice *Behav Brain Res* 55 (1) : 69-75
- van den Hurk WH, Bloemen M, & Martens GJ** (2001) Expression of the gene encoding the beta-amyloid precursor protein APP in *Xenopus laevis* *Brain Res Mol Brain Res* 97 (1) : 13-20
- Van Gassen G, Annaert W, & Van Broeckhoven C** (2000) Binding partners of Alzheimer's disease proteins: are they physiologically relevant? *Neurobiol Dis* 7 (3) : 135-151
- Van Nostrand WE, Wagner SL, Shankle WR, Farrow JS, Dick M, Rozemuller JM, Kuiper MA, Wolters EC, Zimmerman J, & Cotman CW** (1992) Decreased levels of soluble amyloid beta-protein precursor in cerebrospinal fluid of live Alzheimer disease patients *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (7) : 2551-2555
- Vassar R** (2002) beta-Secretase (BACE) as a drug target for Alzheimer's disease *Adv Drug Deliv Rev* 54 (12) : 1589-1602
- Veinbergs I, Mallory M, Mante M, Rockenstein E, Gilbert JR, & Masliah E** (1999) Differential neurotrophic effects of apolipoprotein E in aged transgenic mice *Neurosci Lett* 265 (3) : 218-222
- Veinbergs I, Mallory M, Sagara Y, Masliah E** (2000) Vitamin E supplementation prevents spatial learning deficits and dendritic alterations in aged apolipoprotein E-deficient mice *Eur J Neurosci* 12 (12) : 4541-4546
- Veinbergs I, Everson A, Sagara Y, & Masliah E** (2002) Neurotoxic effects of apolipoprotein E4 are mediated via dysregulation of calcium homeostasis *J Neurosci Res* 67 (3) : 379-387
- Vina J, Lloret A, Orti R, & Alonso D** (2004) Molecular bases of the treatment of Alzheimer's disease with antioxidants: prevention of oxidative stress *Mol Aspects Med* 25 (1-2) : 117-123
- Vincent B & Smith JD** (2001) Astrocytes down-regulate neuronal beta-amyloid precursor protein expression and modify its processing in an apolipoprotein E isoform-specific manner *Eur J Neurosci* 14 (2) : 256-266
- Voikar V, Vasar E, & Rauvala H** (2004) Behavioral alterations induced by repeated testing in C57BL/6J and 129S2/Sv mice: implications for phenotyping screens *Genes Brain Behav* 3 (1) : 27-38
- von Koch CS, Zheng H, Chen H, Trumbauer M, Thinakaran G, Van der Ploeg LH, Price DL, & Sisodia SS** (1997) Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice *Neurobiol Aging* 18 (6) : 661-669

- Wallace W, Ahlers ST, Gotlib J, Bragin V, Sugar J, Gluck R, Shea PA, Davis KL, & Haroutunian V** (1993) Amyloid precursor protein in the cerebral cortex is rapidly and persistently induced by loss of subcortical innervation *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (18) : 8712-8716
- Wallace WC, Akar CA, & Lyons WE** (1997) Amyloid precursor protein potentiates the neurotrophic activity of NGF *Brain Res Mol Brain Res* 52 (2) : 201-212
- Wallace WC, Akar CA, Lyons WE, Kole HK, Egan JM, & Wolozin B** (1997) Amyloid precursor protein requires the insulin signaling pathway for neurotrophic activity *Brain Res Mol Brain Res* 52 (2) : 213-227
- Wan H, Aggleton JP, & Brown MW** (1999) Different contributions of the hippocampus and perirhinal cortex to recognition memory *J Neurosci* 19 (3) : 1142-1148
- Wang QS, Tian L, Huang YL, Qin S, He LQ, & Zhou JN** (2002) Olfactory identification and apolipoprotein E epsilon 4 allele in mild cognitive impairment *Brain Res* 951 (1) : 77-81
- Wavrant-DeVrieze F, Perez-Tur J, Lambert JC, Frigard B, Pasquier F, Delacourte A, Amouyel P, Hardy J, & Chartier-Harlin MC** (1997) Association between the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) and Alzheimer's disease *Neurosci Lett* 227 (1) : 68-70
- Weisgraber KH & Mahley RW** (1996) Human apolipoprotein E: the Alzheimer's disease connection *FASEB J* 10 (13) : 1485-1494
- West MJ, Coleman PD, Flood DG, & Troncoso JC** (1994) Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease *Lancet* 344 (8925) : 769-772
- White F, Nicoll JA, & Horsburgh K** (2001) Alterations in ApoE and ApoJ in relation to degeneration and regeneration in a mouse model of entorhinal cortex lesion *Exp Neurol* 169 (2) : 307-318
- Willott JF & Turner JG** (1999) Prolonged exposure to an augmented acoustic environment ameliorates age-related auditory changes in C57BL/6J and DBA/2J mice *Hear Res* 135 (1-2) : 78-88
- Wilson RS, Schneider JA, Barnes LL, Beckett LA, Aggarwal NT, Cochran EJ, Berry-Kravis E, Bach J, Fox JH, Evans DA, & Bennett DA** (2002) The apolipoprotein E epsilon 4 allele and decline in different cognitive systems during a 6-year period *Arch Neurol* 59 (7) : 1154-1160
- Wrenn CC & Wiley RG** (1998) The behavioral functions of the cholinergic basal forebrain: lessons from 192 IgG-saporin *Int J Dev Neurosci* 16 (7-8) : 595-602
- Zhou Y, Elkins PD, Howell LA, Ryan DH, & Harris RB** (1998) Apolipoprotein-E deficiency results in an altered stress responsiveness in addition to an impaired spatial memory in young mice *Brain Res* 788 (1-2) : 151-159

Implication d'un dérivé sécrété du précurseur de la protéine beta-amyloïde (sAPP₆₉₅) et de différentes isoformes de l'apolipoprotéine E humaine (apoE3 et apoE4) dans les processus mnésiques chez la Souris.

Une perturbation du métabolisme du précurseur de la protéine beta-amyloïde (APP) est associée à la maladie d'Alzheimer (MA) et à l'apparition de troubles mnésiques liés à l'âge. Cette perturbation semble affecter le niveau cérébral de son dérivé soluble, le sAPP, qui possède des propriétés promnésiantes. D'autre part, l'allèle epsilon 4, mais pas l'allèle epsilon 3, du gène de l'apolipoprotéine E (apoE) est un facteur de risque génétique de la MA et des troubles mnésiques liés à l'âge. En outre, l'apoE semble influencer le métabolisme de l'APP.

Les effets d'une administration intracérébroventriculaire de sAPP exogène à des souris lors de tâches de reconnaissance d'objet ou spatiale et d'apprentissage opérant indiquent qu'il favorise les mécanismes très précoces de formation de la mémoire. De plus, le blocage des sAPP endogènes par des anticorps affecte les performances mnésiques, ce qui confirme leur rôle dans les processus de consolidation de la mémoire. Parallèlement à cette étude, nous avons mis en évidence une influence néfaste du système de ventilation des salles d'hébergement affectant les performances mnésiques des souris.

Les performances de souris transgéniques apoE3 et apoE4 (respectivement porteuses homozygotes de l'allèle humain epsilon 3 et epsilon 4) « âgées » (14-15 mois), ont été évaluées dans des tâches de reconnaissance spatiale et de mémoire spatiale dans la piscine de Morris, ainsi que des tâches d'évitement actif et passif. Les souris apoE4 femelles, en particulier, présentent de faibles performances de mémoire et apparaissent donc comme un bon modèle d'étude des troubles mnésiques liés à l'âge. Enfin, l'administration de sAPP a permis de restaurer les performances de mémoire spatiale des souris apoE4 femelles « âgées » dans la piscine de Morris.

L'ensemble de ces résultats suggère que la modulation des niveaux de sAPP cérébraux pourrait permettre de traiter les déficits cognitifs liés au vieillissement en général, et à la MA en particulier.

Implication of a secreted form of the beta-amyloid precursor protein (sAPP₆₉₅) and of different isoforms of human apolipoprotein E (apoE3 and apoE4) in mice memory processes.

An alteration of the beta-amyloid precursor protein (APP) metabolism is associated with Alzheimer's disease (AD) as well as age-related memory impairments. This alteration seems to affect cerebral level of sAPP, a promnesic and soluble form of APP. On the other hand, the epsilon 4 allele, but not the epsilon 3 allele, of apolipoprotein E (apoE) gene is a genetic risk factor for AD and for age-related memory impairments. Moreover, APP metabolism seems to be influenced by apoE.

First, the effects of exogenous sAPP administration in mice were evaluated in object recognition, spatial recognition and bar-press learning tasks. According to the results, sAPP seems to promote early memory processes. The post-training blockade of endogenous sAPPs with specific antibodies induced memory deficits suggesting a central role of sAPPs in memory consolidation mechanisms. Besides this study, we showed the deleterious effect of the new ventilation system of some animal housing rooms on mice memory performance.

Then, the memory performance of "aged" (14-15 months) apoE3 and apoE4 transgenic mice (homozygous carriers of the human apoE allele epsilon 3 and epsilon 4, respectively) were evaluated in spatial memory tasks (spatial recognition and Morris water maze) and active and passive avoidance memory tasks. Compared to apoE3 mice, apoE4 mice, especially females, showed more severe memory deficits. Thus, apoE4 female mice appear as a good model for the study of age-related memory deficits. In a last experiment using the Morris water maze task, the administration of sAPP restored a good level of spatial memory performance in "aged" female apoE4 mice.

Altogether, our results suggest that the modulation of cerebral sAPP levels must be considered as a potential therapeutic approach in the treatment of age-related memory deficits in general, or those associated with AD in peculiar.