



Thèse présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Louis Pasteur
Strasbourg I

Discipline : *Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie*
Spécialité : *Neurosciences*

par Alice Couégnas

*ETUDE MORPHOLOGIQUE ET
FONCTIONNELLE D'UN MODELE DE
DYSCONNEXION SYNAPTIQUE*

Soutenue publiquement le 4 février 2008

Membres du jury

Directeur de Thèse : *Nelly Boehm, PU/PH, Strasbourg*
Rapporteur Interne : *Christian Kelche, DR1, Strasbourg*
Rapporteur Externe : *Marie-Françoise Suaud-Chagny, CR1-HDR, Lyon*
Rapporteur Externe : *Claude-Alain Maurage, PU/PH, Lille*
Examineur : *Pierre Vidailhet, PU/PH, Strasbourg*

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier le Professeur Emérite **Claude Aron** dont les conseils ont guidé mes choix pour mes 5 dernières années d'études. C'est lui qui, en 1999 déjà, répondait à mon courrier de Rennes pour m'indiquer le seul laboratoire en France où l'on travaillait sur les interactions chimiques entre individus (*Ethologie et Psychobiologie Sensorielle*, CNRS, Benoist Schaal), et où j'ai réalisé mon DEA. C'est lui, encore, en 2002 à l'institut d'Histologie de la Faculté de Médecine de Strasbourg, qui me suggérait de contacter le Professeur Nelly Boehm, qui fut l'une de ses étudiantes, afin de poursuivre par une thèse plutôt chez l'animal que chez l'Homme. Je tiens non seulement à le remercier pour ses conseils, mais également pour ses livres qui ont nourri mon envie de faire de la recherche.

Je remercie le Professeur **Jean-Marie Danion**, pour m'avoir accueillie au sein de l'unité 666 *Psychopathologie Clinique et Expérimentale de la Schizophrénie*, malgré ma situation financière « particulière ». Il n'est pas courant d'avoir des étudiants qui ont refusé une allocation de recherche. J'assume ce choix et je remercie le Professeur Danion de m'avoir fait confiance. Je glisserai ici une phrase d'Alain Beretz, à la fin de *Biotechno2005* : « Comme disait Théodore Monod, l'essentiel est de savoir bien choisir son patron ! ».

J'adresse mes très sincères remerciements au Docteur **Astrid Nehlig** pour sa gentillesse et sa confiance. Je la remercie de s'être engagée pour le financement de ma thèse, qui m'a permis de vivre dans de bonnes conditions. Je la remercie aussi pour son soutien dans les moments difficiles et son encadrement pour une partie de ma thèse. Les échanges que nous avons eus m'ont toujours énormément apporté, que ce soit sur le plan scientifique ou humain.

Je remercie tout particulièrement le Professeur **Nelly Boehm**, pour avoir accepté de diriger ma thèse. Reprendre la recherche pour elle et la commencer pour moi, sur un sujet aussi nouveau, ne fut pas facile. Je lui suis très reconnaissante d'avoir trouvé le temps de m'encadrer malgré ses très nombreuses activités d'enseignement, cliniques et de recherche.

Je remercie les Membres du Jury, le Professeur **Christian Kelche**, le Docteur **Marie-Françoise Suaud-Chagny**, le Professeur **Claude-Alain Maurage** et le Professeur **Pierre Vidailhet**, d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je tiens à remercier tous les membres « permanents » de l'unité 666 avec lesquels j'ai été amenée à travailler, notamment le Docteur **Jack Foucher** (et son très interactif « Club Psychose » qui m'a permis une compréhension plus concrète de la schizophrénie...), **Arielle Ferrandon** (pour sa bonne humeur de tous les instants), **Estelle Koning** (pour son efficacité

et ses mails divertissants ;-), **Christine Keller**, **Audrey**, le Docteur **Anne Giersch**, le Professeur **Guy Sandner**, **Didier Pinaut**, le Docteur **Alain Louillot**. ainsi que tous ceux de l'Institut d'Histologie : le Docteur **Brigitte Samama** pour sa présence, ses conseils de tous les instants qui furent indispensables à l'aboutissement de mon travail et ses encouragements, le Professeur **Christiane Schaeffer**, **Jojo Descamps** pour son indéfectible présence, son soutien, ses blagues, notre collaboration et la qualité de son travail sans lequel ma première publication n'aurait pas la même allure, **Josiane Meder**, pour sa précision, sa patience, sa gentillesse et son soutien, **Patricia Bos**, pour son efficacité et surtout pour son amitié au-delà du travail, et **Roland Bury** pour avoir pris le temps (entre autres !) de me faire découvrir la microscopie électronique.

Je remercie tout particulièrement pour leur contribution essentielle à ma thèse : les statisticiens **Myriam et Frédéric Bertrand** pour leur savoir-faire en Statistiques, pour tous les moments qu'ils m'ont accordés (parfois très tard !) pour m'expliquer avec force pédagogie les bases statistiques, incontournables ; le Docteur **Philippe Choquet** pour m'avoir enseigné toutes les astuces de la densitométrie et pour sa sagesse (« On n'a pas de *bonnes* idées, on a des idées selon son vécu et son expérience. »).

Je remercie également le Professeur **Jean-Michel Scheftel**, pour m'avoir offert la possibilité d'être monitrice de travaux-pratiques (depuis le temps que je voulais faire de l'enseignement !) et pour sa bonne humeur constante ; **Abdel Ouagazzal** pour ses conseils d'avant thèse et sa sympathie ; **Yvan Peterschmitt** pour nos longs échanges en congrès et sa persévérance dans le travail ; **Basem Kasem**, **Walid Jalabi** et **Laura Harsan**, mes voisins de bureau, pour leur soutien, leurs conseils et leurs enseignements sur les techniques de travail.

J'adresse mes plus sincères remerciements à **Jennifer François** et **Alexandre Barratta**, collègues et amis thésards avec qui travailler est devenu une vraie partie de plaisir ; je ne les remercierai jamais assez pour nos « Brain stormings », la pertinence de leurs remarques, leur soutien permanent, leurs encouragements, leurs conseils et notre amitié que j'espère longue même si nos chemins devaient diverger.

Que mes amis de l'ADDAL reçoivent également mes remerciements, plus particulièrement **Cécile Frolet**, **Marjorie Jenny-Sidhoum**, **Benoit Meister**, **Olivier Joubert**, **Josselin Soyer**, **Stéphane Heitz** et **Renaud Thiebaut**. Je n'oublie pas tous leurs bons conseils et tous les efforts qu'ils font, parallèlement à leur thèse, pour améliorer le statut des jeunes chercheurs en France. Pour Cécile, tout particulièrement, je retiens la phrase, tellement vraie, de Marjorie : « Cécile déplace les montagnes ! ». Félicitations pour son investissement aux côtés des doctorants.

Je voudrais également remercier **Pascale Klein**, **Danièle Haug** et **Philippe Demuyter** qui m'ont écoutée et conseillée ces deux dernières années, alors que mes questionnements sur mon projet professionnel se faisaient de plus en plus préoccupants. Sans eux je n'aurais pas réussi à trouver la sérénité de maintenant, celle qui me permet de terminer ma thèse dans le meilleur état d'esprit possible.

Je tiens à remercier particulièrement le Professeur **Patrick Jago**, enseignant-chercheur de l'université de Rennes 1, qui a su me soutenir et m'encourager à divers moments de mon cursus universitaire, notamment lorsque j'ai fait le choix de renoncer à mon allocation de recherche. Qu'il soit assuré de ma plus profonde gratitude. Du Centre Européen des Sciences du Goût de Dijon, je remercie **Benoist Schaal** et **Luc Marlier** pour leur encadrement scientifique au cours de mon DEA, **Nicolas Pineau** pour m'avoir hébergée, écoutée, conseillée, **Maryse El Allam**, avec qui travailler fut particulièrement stimulant et pour son savoir-faire avec les nouveau-nés, mais également **Julie M**, **Julie L**, **Olivier**, **David**, **Delphine**, **Sébastien**, ainsi que tout le personnel très accueillant. De l'université de Rennes 1, je tiens à remercier mes binômes de travail **Marie Abiven**, **Caroline Badouel** et **Estelle Galois** ; sans elles je n'aurais pas pris autant de plaisir à faire des sciences.

Je n'oublie pas ceux et celles qui, au quotidien, ont eu à me « supporter » durant mes années universitaires et sans qui mes chances d'arriver jusqu'au bout auraient été bien maigres : mes parents **Françoise** et **Daniel**, qui m'ont toujours encouragée et soutenue à tous les plans, malgré les difficultés rencontrées (qui forgent le caractère), et grâce à la confiance qu'ils m'accordent depuis toujours ; **Morgane**, qui m'a poussée, encouragée sans hésitation, rassurée dans les moments les plus empreints de doutes, et qui m'a donné une grande confiance en moi ; **Barbara** pour son accueil à Strasbourg, qui sera toujours mon repère en Alsace, qui a eu la lourde tâche d'être à mes côtés pendant mon DEA mais qui a su écouter avec sagesse mes plaintes de l'époque ; **Marie**, pour son accompagnement de tous les instants, pour son expertise en infographie, pour ses encouragements, sans elle la fin de ma thèse aurait été encore plus difficile (sans bureau ! ;-).

Et enfin (mais pas des moindres), je tiens à remercier tous mes amis d'ici ou d'ailleurs, qui ont toujours trouvé le mot juste pour me remettre dans les rails lorsque je commençais à flancher : **Marjorie**, **Lisa**, **Alizée**, **Babeth**, **Anne**, **Anne-Sophie**, **Anthony**, **José** ; je remercie également tous les bénévoles de la Constantia sans lesquels je n'aurais pu poursuivre les projets sportifs à côté de ma thèse : **Marilyn**, **Didier**, **Elodie**, **Elise**, **Claudine**, **Isabelle**, **Sandrine** et tous ceux qui sont convaincus que nous irons loin ensemble et qui se sont déjà engagés avec nous !

LISTE DE PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS :

Kasem B, **Couégnas A**, Samama B, Schaeffer C, Job D, Schweitzer A, Andrieux A, Giersch A, Nehlig A., Boehm N. Dysregulation of peripheral olfactory neurogenesis in a schizophrenia-like mouse model. Soumis dans Journal of Neuroscience.

Couégnas A, Schweitzer A, Andrieux A, Ghandour M S, Boehm N. 2007. Expression pattern of STOP lacZ reporter gene in adult and developing mouse brain. Journal of Neuroscience Research 85(7):1515-1527.

COMMUNICATION ORALE :

Couégnas A, Boehm N. Une structure méconnue : l'organe voméronasal humain. IXème journées du Collège Universitaire et Hospitalier des Histologistes, Cytologistes, Embryologistes et Cytogénéticiens. Poitiers 2004.

COMMUNICATIONS AFFICHEES :

Couégnas A, Schweitzer A, Andrieux A, Boehm N. Are there structural abnormalities in the olfactory system of STOP mice? 5ème Forum Européen des Neurosciences. Vienne 2006.

Couégnas A, Schweitzer A, Andrieux A, Boehm N. Expression pattern of lacZ reporter gene in STOP null mice during development. 7ème Colloque de la Société des Neurosciences. Lille 2005.

Couégnas A, Boehm N. Early development of human vomeronasal organ. XVI ECRO Congress. Dijon 2004.

Marlier L, **Couégnas A**, Schaal B. The odour of human milk: conditions for stability of its attractiveness to newborns. XVI ECRO Congress. Dijon 2004.

Soutient financier :

Je remercie la **Région Alsace**, l'**Unité INSERM 666** et l'**Institut d'Histologie** pour m'avoir soutenue financièrement pendant plus de la moitié de ma thèse.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	2
Liste de publications et communications	5
Table des matières	6
Abréviations	7
Abréviations courantes, traductions, synonymes	7
Structures	8
Etat des Connaissances	9
Schizophrénie	9
Modèles animaux pour l'étude de la schizophrénie	20
Souris KO-STOP	24
Olfaction	33
Objectifs	43
Matériels et méthodes	44
Animaux	44
Expériences réalisées	45
Tests comportementaux	46
Techniques histologiques	50
Analyses d'images	60
Statistiques	63
Expression de protéine STOP dans le SNC de souris - recherche de corrélats fonctionnels	66
Introduction	66
Expression de protéines STOP et β -galactosidase	66
Recherche de corrélats fonctionnels	78
Discussion	82
Le système olfactif : modèle de système synaptique	90
Introduction	90
Expression prénatale de protéine STOP	90
Tentative d'examen d'une perturbation du renforcement synaptique	92
Le glomérule, siège de dysconnexions ?	99
Discussion	105
Discussion générale	111
Conclusion	121
Annexes	122
Bibliographie	147

ABREVIATIONS

Abréviations courantes, traductions, synonymes

+/+, WT	<i>wild-type</i>	« sauvage »
-/-	muté, homozygote pour la mutation	
+/-	hétérozygote pour la mutation	
STOP	<i>stable tubule only polypeptide</i>	
EIQ	étendue interquartile	
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>	réaction en chaîne par polymérase
Ig	immunoglobulines	
SNC	système nerveux central	
CS	<i>conditionned stimulus</i>	stimulus conditionnel
UCS	<i>unconditionned stimulus</i>	stimulus inconditionnel
DSM	<i>diagnostic and statistical manual of mental disorders</i>	manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux
CIM	classification internationale des maladies	
OMS	organisation mondiale de la santé	
MAP	<i>microtubule associated proteins</i>	protéines associées aux microtubules
NRG1	<i>neuregulin-1</i>	neuréguline
DTNBP1	<i>dysbindin</i>	dysbindine
RGS4	<i>regulator of G-protein signalling 4</i>	protéine régulatrice de la signalisation par les protéines G
COMT	<i>catechol-O-methyl transferase</i>	cathéchol-O-méthyltransférase
DISC1	<i>disrupted-in-schizophrenia 1</i>	
DAAO	<i>D-amino acid oxidase</i>	D-amino acide oxydase
PRODH	<i>proline dehydrogenase</i>	proline déshydrogénase
GRM3 ou mGluR3	<i>metabotropic glutamate receptor-3</i>	récepteur métabotrope du glutamate de type 3
PPP3CC	<i>γ isoform of catalytic subunit of calcineurin A</i>	isoforme γ de la sous-unité catalytique de la calcineurine A
Akt1	<i>protein kinase B</i>	protéine kinase B
NMDA	<i>N-methyl-d-aspartate</i>	
GABA	<i>γ-aminobutyric acid</i>	acide γ -aminobutyrique
5-HT	<i>5-hydroxytryptamine</i> ou <i>serotonin</i>	sérotonine
LI	<i>latent inhibition</i>	inhibition latente
PPI	<i>prepulse inhibition</i>	inhibition de la réaction de sursaut
PCP	phencyclidine	
TTX	<i>tetrodotoxin</i>	tétradotoxine
(M)ANOVA	<i>(multiple) analysis of variance</i>	analyse (multiple) de la variance
GFAP	<i>glial fibrillary acid protein</i>	protéine fibrillaire acide des cellules gliales
NFP	<i>neurofilament proteins</i>	protéines des neurofilaments
CSF	<i>cold-stabilizing factor</i>	facteur de stabilisation au froid
OMP	<i>olfactory marker protein</i>	protéine de marquage du système olfactif
IEG	<i>immediate early gene</i>	gène précocé
NO	monoxyde d'azote	

Structures

VII	Couche VII du cortex	LSV	Noyau septal latéral ventral
A	Amygdale	MD	Noyau thalamique médio-dorsal
aca	Commissure antérieure	Me	Noyau mésencéphalique
Acb	Noyau accumbens	MeA	Amygdale médiane
AOB	Bulbe olfactif accessoire	MHb	Habénula médiale
AON	Noyau olfactif antérieur	Mi	Couche des cellules mitrales
BST	Noyau du lit de la strie terminale	ml	Medial lemniscus
CA1	Partie 1 de la corne d'Ammon de l'hippocampe	ML	Couche moléculaire du cervelet
CA2	Partie 2 de la corne d'Ammon de l'hippocampe	mo	Couche moléculaire de l'indusium griseum
CA3	Partie 3 de la corne d'Ammon de l'hippocampe	mol	Couche moléculaire du gyrus denté
CC	Corps calleux	NC	Cavité nasale
cel	Couche cellulaire de l' <i>indusium griseum</i>	OE	Epithélium olfactif
Cg	Cortex cingulaire	ON	Nerf olfactif
Cl	<i>claustrum</i>	Pa	Noyau hypothalamique paraventriculaire
CM	Noyau thalamique centromédian	PAG	Noyau de la substance grise périacqueducal
Co	Noyau cortical amygdaloïde	PC	Noyau thalamique paracentral
CoA	Amygdale centrale	PuC	Couche des cellules de Purkinje du cervelet
cp	Pedoncule cérébral	Pir	Cortex piriforme
CPu	Noyau caudé-putamen	Pn	Noyau du pont
Den	Noyau endopiriforme dorsal	PT	Noyau prétectal
DG	Gyrus denté	PV	Noyau thalamique paraventriculaire
DLG	Noyau géniculé dorso-latéral	Rt	Noyau thalamique réticulaire
Ent	Cortex entorhinal	SC	Colliculus supérieur
Epl	Couche plexiforme externe	SCh	Noyau suprachiasmatique
fr	<i>fasciculus retroflexus</i>	SFO	Organe subformical
Gl	Couche glomérulaire	slm	<i>Stratum lacunosum moleculare</i> de l'hippocampe
GrO	Couche des grains	sm	Strie médulaire
gr	Couche granulaire du gyrus denté	SNC	Partie compacte de la substance noire
Hb	Habénula	SNR	Partie réticulée de la substance noire
IC	Colliculus inférieur	SO	Noyau hypothalamique supraoptique
ic	Capsule interne	so	<i>Stratum oriens</i> de l'hippocampe
IL	Cortex infralimbique	sp	<i>Stratum pyramidale</i> de l'hippocampe
IG	<i>indusium griseum</i>	sr	<i>Stratum radiatum</i> de l'hippocampe
IGL	Couche granulaire interne du cervelet	VA	Noyau thalamique ventral antérieur
Ipl	Couche plexiforme externe	VDB	Noyau du bras vertical de la bande diagonale de Broca
IP	Noyau interpédonculé	VL	Noyau thalamique ventral latéral
LHb	Habénula latérale	VLG	Noyau géniculé ventral latéral
lo	Tractus olfactif latéral	VN	Nerf voméronasal
LS	Septum latéral	VTA	Aire tegmentale ventrale
LSD	Noyau septal dorso-latéral	WM	Substance blanche
LSI	Noyau septal latéral intermédiaire	ZI	<i>zona incerta</i>

ETAT DES CONNAISSANCES

Schizophrénie

La schizophrénie est un trouble psychiatrique qui touche 0,5 à 1% de la population (Jablensky, 2000) et qui, en 1992, représentait 2% des coûts médicaux totaux en France (Rouillon et coll., 1997). C'est un vaste champ d'étude (plus de 79000 articles sur Pubmed¹ en mai 2007 pour *schizophreni**², dont plus de 8800 revues), en particulier depuis les années 1990 (notamment avec le développement des techniques d'imagerie fonctionnelle par résonance magnétique). Les résultats sont parfois contradictoires d'une étude à l'autre, rendant les conclusions difficiles à établir. Après avoir décrit sommairement les aspects cliniques, nous exposerons les données expérimentales les plus robustes (Tableau 1), à savoir les plus reproduites par différentes équipes de recherche et les plus spécifiques de la maladie (Tandon, 1999), avant de présenter les hypothèses étiologiques actuellement étudiées.

1. Aspects cliniques de la schizophrénie

a. Repères historiques

En 1860, le médecin français Benedict Augustin Morel (1809-1873) décrit, dans son *Traité des maladies mentales*, un trouble apparaissant au début de l'âge adulte où le fonctionnement intellectuel se détériore rapidement et qui, selon lui, pourrait aboutir à la mort. Il nomme ce trouble « démence précoce », mais ne réalise pas d'étude quantitative approfondie ni d'étude sur le long terme. C'est Emile Kraepelin (1856-1926) qui, en 1899 dans la 6^{ème} édition du *Lehrbuch der Psychiatrie* (traité de psychiatrie), va décrire méthodiquement un ensemble de troubles, bien distincts des troubles maniaco-dépressifs, qu'il regroupera sous « *dementia praecox* ». Observant que ces troubles n'aboutissent pas forcément à une démence, Eugène Bleuler (1857-1940), en 1911 dans son chapitre *Dementia praecox oder gruppe der schizophrenien* du *Handbuch der psychiatrie*, utilise pour la première fois le terme « schizophrénie » (Berrios et coll., 2003). Il introduit alors clairement la notion de **dissociation** (« *Spaltung* », division) correspondant à la perte d'unité de l'activité

¹ Pubmed est une base de données américaine (NIH), regroupant des articles scientifiques du domaine des sciences de la vie et de la santé, mise à disposition de la communauté scientifique mondiale.

² Le caractère « * » remplace tous les suffixes possibles pour un mot (ici, les résultats donnés seront ceux de *schizophrenia*, *schizophrenian*...)

psychique et fait l'hypothèse d'un processus central commun aux différentes formes de la maladie (pour revue voir Foucher, 2007).

<p>❖ Epidémiologie</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Prévalence <ul style="list-style-type: none"> • 0,6% dans le monde entier ➤ Age de début <ul style="list-style-type: none"> • Entre 16 et 30 ans pour les hommes • Entre 20 et 45 ans pour les femmes ➤ Différences liées au genre <ul style="list-style-type: none"> • Risque identique de développer la maladie • Début plus précoce chez les hommes • Rémission moins favorable chez les hommes ➤ Facteurs familiaux et génétiques <ul style="list-style-type: none"> • Accumulation de cas dans une même famille • Maladie en partie génétique • Hétérogénéité génétique ➤ Environnement <ul style="list-style-type: none"> • Rôle de l'environnement (psychologique et/ou social) • Risque de développer la maladie accru par les complications obstétricales ➤ Stress <ul style="list-style-type: none"> • Apparition du 1^{er} épisode plus fréquente à des périodes de stress psychologique ou physique • Probabilité de survenue des épisodes accrue par le stress et réduite par réduction de stress ➤ Saison de naissance <ul style="list-style-type: none"> • Petite augmentation des naissances de futurs patients en fin d'hiver et début printemps ➤ Variabilité <ul style="list-style-type: none"> • Très grande variabilité dans la plupart des mesures, tant sur l'évolution de la maladie que parmi les patients <p>❖ Description</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Signes cliniques <ul style="list-style-type: none"> • Association caractéristique de symptômes positifs et négatifs • Apparition caractéristique de problèmes cognitifs ➤ Décours temporel <ul style="list-style-type: none"> • Apparition de problèmes cognitifs et sociaux préalable aux symptômes positifs • Décours stabilisé après 3 à 5 ans • Présence chez certains patients d'un ou plusieurs épisodes puis retour à des fonctions quasi-normales • Présence chez d'autres patients d'une évolution graduelle ou intermittente avec une incapacité croissante à retrouver des fonctions normales ➤ Anomalies cérébrales <ul style="list-style-type: none"> ▪ Physiologie cérébrale <ul style="list-style-type: none"> • Anomalies caractéristiques du suivi oculaire • Anomalies caractéristiques du potentiel évoqué P50 ▪ Morphologie cérébrale <ul style="list-style-type: none"> • Elargissement caractéristique des ventricules latéraux • Réduction caractéristique du volume cortical temporal ▪ Neuropathologie <ul style="list-style-type: none"> • Absence de gliose caractéristique en post-mortem ▪ Neuropsychologie <ul style="list-style-type: none"> • Problèmes neuropsychologiques caractéristiques • Dysfonctions caractéristiques du langage et de la mémoire et notamment de la mémoire de travail • Quelques troubles cognitifs précèdent parfois le début des symptômes psychotiques ➤ Traitement pharmacologique <ul style="list-style-type: none"> • Efficacité des antipsychotiques ou neuroleptiques pour traiter la plupart des patients et prévenir les rechutes • Meilleure efficacité des neuroleptiques sur les symptômes positifs que sur les négatifs ; bien que présence d'une petite amélioration sur les symptômes négatifs

Tableau 1 : Résultats les plus probants mis en évidence par les études sur la schizophrénie. Adapté de Tandon, 1999.

b. Symptomatologie

On trouve dans les classifications internationales (DSM-IV et CIM-10) l'ensemble des symptômes de la schizophrénie. Ces symptômes peuvent être regroupés en 3 grandes catégories : symptômes positifs (ou « productifs »), négatifs (ou « déficitaires ») et troubles cognitifs. Parmi les symptômes positifs, on trouve des idées délirantes, des hallucinations (pouvant se retrouver dans toutes les modalités sensorielles) tandis que les symptômes négatifs correspondent à une pauvreté affective, de l'alogie, de l'avolition, une anhédonie et des difficultés d'attention (Andreasen et Olsen, 1982). Les troubles cognitifs touchent les fonctions exécutives, l'attention, la mémoire et le langage (Danion et coll., 1996 ; Kuperberg et Heckers, 2000). Ces signes apparaissent au cours du premier épisode psychotique qui a lieu en fin d'adolescence ou au début de l'âge adulte. Cependant certains troubles cognitifs peuvent apparaître avant le premier épisode psychotique.

2. *Etiologie de la schizophrénie*

Les causes de la schizophrénie demeurent inconnues à ce jour. Cependant, de nombreux arguments laissent supposer que la maladie résulte de la combinaison de facteurs génétiques et environnementaux. L'hypothèse, dite « *Two hit hypothesis* » (hypothèse en 2 coups), postule qu'une atteinte génétique initiale fragilisant des circuits neuronaux (*first hit*) va, si elle est associée à certains facteurs environnementaux aléatoires (*second hit*), déclencher la maladie (Bayer et coll., 1999). Nous développons ici les facteurs génétiques et environnementaux potentiels.

a. Facteurs génétiques potentiels

Le nombre élevé de cas de schizophrénie dans une même famille, la présence de troubles neuropathologiques chez les proches des patients (Boos et coll., 2007) ainsi que les études sur les jumeaux et celles sur les adoptions mènent à l'hypothèse que la schizophrénie serait héritée dans près de 80% des cas (Ingraham et Kety, 2000 ; Sullivan et coll., 2003). Par ailleurs, et contrairement aux résultats du rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) de 2001, il est possible que les hommes et certaines populations d'immigrants soient plus touchés (McGrath, 2007), impliquant là aussi peut-être un certain nombre de gènes. Aucun n'a pourtant encore pu être identifié de façon formelle comme étant à l'origine des troubles, probablement parce que la perturbation d'un gène unique et non associée à d'autres facteurs aura peu d'effets ou sera compensée. Cependant de nombreux gènes sont suspectés de jouer un rôle dans la maladie (Harrison et Weinberger, 2005a ; Ross et coll., 2006), parmi

lesquels certains sont des candidats particulièrement pertinents, notamment à cause de leur implication dans les système de neurotransmission (dopamine et glutamate), ou dans le développement neuronal. Voici les principaux :

- NRG1, la neuréguline (*neuregulin-1*) qui est un facteur de croissance issu d'un très grand gène du chromosome 8 dont proviennent de nombreux peptides jouant des rôles divers (fonctionnels, comme la régulation des récepteurs NMDA du glutamate, et structuraux) au niveau des neurones et des cellules gliales tant dans le système nerveux mature qu'au cours du développement. Des souris avec diverses mutations du gène NRG1 ou d'un de ses récepteurs présentent un phénotype intéressant pour l'étude de la schizophrénie (Falls, 2003 ; Harrison et Law, 2006).
- COMT, la cathécol-O-méthyltransférase (*cathechol-O-methyl transferase*) qui est une enzyme dont le gène est situé sur le chromosome 22q11. Elle joue un rôle dans le catabolisme des cathécholamines, comme la dopamine, qu'elle dégrade notamment dans le cortex préfrontal. Une mutation du gène de la COMT a été spécifiquement retrouvée chez les patients schizophrènes (Craddock et coll., 2006).
- DTNBP1, la dysbindine (*dysbindin*) qui est un des composants du complexe des protéines associées à la dystrophine dont le gène est localisé sur le chromosome 6. Elle est exprimée dans les neurones du système nerveux central en pré et post-synaptique, en particulier dans les neurones et les synapses glutamatergiques de l'hippocampe (Benson et coll., 2001 ; Benson et coll., 2004 ; Williams et coll., 2005).
- RGS4, une protéine régulatrice de la signalisation par les protéines G (*regulator of G-protein signalling 4*) qui est un membre d'une famille de protéines issues d'un gène situé sur le chromosome 1 dont le rôle est de moduler la durée et la qualité de la neurotransmission résultant de l'activation des récepteurs couplés aux protéines G. Une association entre la région chromosomique de son gène et la schizophrénie a été montrée, ainsi qu'une diminution de son ARNm et de son expression chez les patients schizophrènes (Buckholtz et coll., 2007 ; Levitt et coll., 2006).
- DISC1 (*disrupted-in-schizophrenia 1*) est une zone chromosomique du chromosome 1 codant pour une protéine multifonctionnelle qui pourrait interagir avec de nombreuses protéines du cytosquelette et notamment du centrosome. Une modification par translocation de cette zone serait liée à la schizophrénie (Ishizuka et coll., 2006 ; Matsuzaki et Tohyama, 2007).
- DAAO, la D-amino acide oxydase (*D-amino acid oxidase*), est une protéine dont le gène est localisé sur le chromosome 13. DAAO et son activateur G72, pour lesquels des

associations avec la schizophrénie ont été montrées, jouent un rôle important dans le métabolisme d'amino-acides comme la D-sérine, elle-même coagoniste des récepteurs NMDA du glutamate (Boks et coll., 2007).

b. Facteurs environnementaux potentiels

Un certain nombre de facteurs dits « environnementaux » sont potentiellement impliqués dans la schizophrénie (Bromet et Fennig, 1999 ; Jablensky, 2000 ; van Os et coll., 2005). Une corrélation a été faite entre des naissances en hiver/printemps et l'apparition ultérieure de schizophrénie, qui pourraient être liées à des facteurs météorologiques (comme la température ambiante) ou des infections au cours de la grossesse, variables selon les années (Tochigi et coll., 2004). De nombreuses complications obstétricales sont retrouvées dans l'histoire des patients schizophrènes, parmi lesquelles des retards de croissance fœtale, des complications pendant la grossesse (stress prénatal, malnutrition intra-utérine, infection prénatale) ou à l'accouchement (hypoxie périnatale) (Clarke et coll., 2006 ; Koenig et coll., 2002). La vie urbaine, dès la naissance, est le facteur environnemental le plus fortement corrélé à l'apparition de la maladie ; cependant les raisons restent inconnues puisque, par exemple, la proximité avec de grandes voies de circulation (où la pollution pourrait être plus forte) est faiblement corrélée avec la pathologie (Pedersen et Mortensen, 2006). La schizophrénie est plus fréquemment retrouvée parmi les minorités, notamment les populations migrantes de première et deuxième générations ; cela pourrait éventuellement être lié à l'urbanisation ou à des difficultés d'insertion sociale (Cantor-Graae et Selten, 2005). Enfin, la consommation de cannabis est également corrélée avec la schizophrénie mais ne serait ni nécessaire, ni suffisante ; ce serait simplement un facteur contribuant au déclenchement de la pathologie (Di Forti et coll., 2007).

3. *Perturbations*

Un certain nombre de dérégulations neurochimiques et neuroanatomiques ont été observées chez les patients schizophrènes.

a. Dérégulations neurochimiques

La première hypothèse neurochimique émise a été celle d'une hyper-dopaminergie, lorsqu'il a été mis en évidence que des neuroleptiques (ou antipsychotiques) classiques bloquent les récepteurs post-synaptiques non seulement de la noradrénaline et de la sérotonine

mais surtout de la dopamine. Preuves supplémentaires, les amphétamines¹ et la cocaïne, qui perturbent la recapture de dopamine dans la synapse, induisent des psychoses chez les sujets sains et aggravent les symptômes - notamment positifs - des patients schizophrènes (Seeman, 1987). L'hypothèse postule que les récepteurs D2 extra-synaptiques seraient mal contrôlés (Carlsson et Carlsson, 2006), mais elle n'explique pas tous les aspects de la schizophrénie, notamment les symptômes négatifs.

Une autre hypothèse neurochimique très étudiée est celle d'une hypo-glutamatergie et particulièrement d'une perturbation des récepteurs NMDA (*N-methyl-d-aspartate*) du glutamate (Coyle, 2006). Plusieurs éléments étayent cette hypothèse. D'abord, les antagonistes des récepteurs NMDA, comme la kétamine, la phencyclidine (PCP) ou le MK-801, induisent des symptômes psychotiques chez les patients en rémission. Ensuite, les gènes de susceptibilité de la schizophrénie ont pour la plupart un lien direct ou indirect avec ces récepteurs (Harrison et Owen, 2003). Enfin, plusieurs indices font suspecter que de potentielles perturbations de la fonction GABA (acide γ -aminobutyrique, *γ -aminobutyric acid*) chez les patients seraient la conséquence de dysfonctionnements au niveau des récepteurs NMDA (Lewis et Moghaddam, 2006).

Par ailleurs, l'hypothèse d'une interaction entre les récepteurs NMDA du glutamate et D1 de la dopamine a récemment été émise et s'appuie sur de nombreux éléments. Par exemple, l'administration de PCP ou MK-801 chez des primates non humains induit non seulement plusieurs signes assimilables aux symptômes des patients schizophrènes mais également une déplétion en dopamine au niveau du cortex préfrontal, région particulièrement riche en récepteurs D1 de la dopamine et fortement suspectée d'être impliquée dans la schizophrénie. Il est proposé que les dérégulations dopaminergiques dans la schizophrénie découlent du déficit de transmission glutamatergique (Castner et Williams, 2007).

D'autres hypothèses neurochimiques, un peu moins robustes, ont été soulevées. L'hypothèse d'une implication de la sérotonine (ou 5-HT), par exemple, n'est étayée que par des preuves indirectes. D'une part, les neuroleptiques de deuxième génération (ou antipsychotiques atypiques) ont un effet non seulement sur les symptômes positifs (action sur les récepteurs D2 de la dopamine) mais également sur les symptômes négatifs, effet qui serait attribué à leur action sur les récepteurs 5-HT_{2A} de la sérotonine (Lieberman et coll., 1998). D'autre part, impliquée dans le développement du système nerveux central (autorégulation des neurones à sérotonine et développement des tissus cibles), la sérotonine pourrait jouer un

¹ L'effet majeur de l'amphétamine est sa capacité à libérer les monoamines et en particulier la dopamine, en inversant le transporteur.

rôle important dans la mise en place de connexions synaptiques (van Kesteren et Spencer, 2003 ; Whitaker-Azmitia et coll., 1996).

Enfin, l'hypothèse d'une implication du système cholinergique et plus particulièrement muscarinique s'appuie, entre autres, sur plusieurs études montrant une densité réduite de sous-populations de récepteurs muscariniques chez les patients (Raedler et coll., 2007).

b. Perturbations neuroanatomiques

Il est important de noter qu'aucune des perturbations neuroanatomiques présentées ci-après ne pourrait constituer un diagnostic de schizophrénie, tant les résultats sont variables d'un individu à l'autre, et tant certains résultats sont parfois contradictoires malgré un grand nombre d'études menées.

- Morphométrie

Les travaux s'intéressant aux anomalies cérébrales chez les schizophrènes étant très nombreux, nous présentons ici une synthèse des principales découvertes (Harrison, 1999 ; Wong et Van Tol, 2003) permises par l'exploration post-mortem et l'imagerie (Shenton et coll., 2001) avec une attention particulière sur les anomalies détectées dès le premier épisode psychotique (Vita et coll., 2006). Outre le cortex, l'hippocampe est particulièrement étudié (Weinberger, 1999).

Une augmentation d'en moyenne 40% du volume ventriculaire ainsi qu'une diminution d'environ 3% du volume cérébral ont été clairement mises en évidence, et ce, dès le premier épisode psychotique. La diminution du volume cérébral serait liée à une réduction de la substance grise plutôt que de la substance blanche. D'autres régions présenteraient également un plus petit volume que chez les sujets sains : le lobe temporal, l'hippocampe (Heckers, 2001), le gyrus parahippocampique et l'amygdale.

Des modifications d'architecture neuronale dans le cortex entorhinal et l'hippocampe sont très controversées. Cependant, les patients schizophrènes pourraient présenter une distribution incorrecte des neurones issus de la sous-plaque corticale, qui se met en place très précocement (Kanold, 2004), et qui pourrait révéler un défaut de migration des neurones de la sous-plaque au cours du développement (Akbarian et coll., 1996 ; Eastwood et Harrison, 2005).

Le nombre de neurones et la densité neuronale dans l'hippocampe semblent inchangés (Weinberger, 1999), par contre une augmentation de la densité neuronale au niveau du cortex préfrontal dorsolatéral a été mise en évidence bien que le nombre de neurones ne semble pas modifié (Harrison, 1999). Une diminution du nombre de neurones dans le thalamus et plus

précisément dans le noyau dorso-médian semble exister chez les patients (Popken et coll., 2000) mais est controversée (Cullen et coll., 2003).

Une réduction de la taille des neurones est mise en évidence au niveau du cortex préfrontal et serait également trouvée au niveau de l'hippocampe ; aucun changement n'est observé pour les cellules gliales (Rajkowska et coll., 1998).

- Expressions de marqueurs de la synapse et de la glie

Parmi les très nombreux marqueurs étudiés, la synaptophysine, le GAP43, MAP2 et la GFAP ont fait l'objet de nombreuses études, parfois contradictoires entre elles. La synaptophysine est une glycoprotéine liant le calcium, retrouvée spécifiquement au niveau des membranes des vésicules synaptiques de la majorité des terminaisons axonales (Masliah et coll., 1990) et probablement impliquée dans l'exocytose (Valtorta et coll., 2004) bien que cela reste controversé (Evans et Cousin, 2005). Le GAP43 est une phosphoprotéine ancrée à la membrane des axones et de la terminaison présynaptique et qui peut lier la calmoduline ; elle joue un rôle dans la croissance axonale et module la formation de nouvelles connexions (Benowitz et Routtenberg, 1997). MAP2 est une protéine associée aux microtubules, retrouvée principalement dans les corps cellulaires et les dendrites des neurones (Dehmelt et Halpain, 2005). La GFAP, protéine fibrillaire acide des cellules gliales (*glial fibrillary acidic protein*), est une protéine de filaments intermédiaires particulièrement retrouvée dans les astrocytes matures qui serait impliquée dans leur morphologie et leur motilité ; elle est synthétisée en très grande quantité en cas d'astrogliose (Eng et coll., 2000).

Des résultats contradictoires ont été obtenus dans les régions corticales. Les expressions de synaptophysine et de GAP43 semblent ne pas être modifiées dans le cortex cingulaire des patients schizophrènes (Eastwood et Harrison, 2001). L'expression de GAP43 serait par ailleurs accrue dans les cortex visuel et frontal tandis que celle de la synaptophysine serait réduite (Perrone-Bizzozero et coll., 1996). Au niveau du cortex préfrontal dorsolatéral, aucune modification de l'expression de la synaptophysine ou du GAP43 n'est trouvée (Halim et coll., 2003) bien que la quantité d'ARNm du GAP43 semble moindre dans cette région (Weickert et coll., 2001). Les résultats pour le GAP43 sont en contradiction avec une étude antérieure décrivant une diminution de l'expression des deux marqueurs sans modification de leurs ARNm dans le cortex préfrontal (Karson et coll., 1999).

Au niveau de la formation hippocampique, les expressions de synaptophysine et GAP43 seraient réduites dans le gyrus denté (Chambers et coll., 2005), et pour le GAP43 plus spécifiquement dans la région du hile mais pas dans le reste de l'hippocampe (Tian et coll., 2007), contrairement à des résultats obtenus précédemment (Blennow et coll., 1999). La

quantité d'ARNm de synaptophysine semble réduite seulement en CA3 de l'hippocampe tandis que celle de GAP43 demeure inchangée (Webster et coll., 2001). L'expression de certaines MAP (Benitez-King et coll., 2007), comme MAP2, semble réduite dans la formation hippocampique et en particulier le subiculum mais ne reflèterait pas une modification générale du cytoskelette puisque l'expression d'autres marqueurs (Tau, tubuline...) n'est pas modifiée (Arnold et coll., 1991). Cependant ce résultat n'est pas toujours retrouvé (Cotter et coll., 1997). En effet, une augmentation de l'expression de MAP2 au niveau de l'arborisation dendritique a pu être mise en évidence (Cotter et coll., 2000).

Parmi les autres régions cérébrales étudiées, l'expression de synaptophysine pourrait être réduite au niveau du thalamus (Landen et coll., 1999), ainsi que son ARNm dans la couche des grains, mais pas dans celle des cellules de Purkinje, du cervelet (Eastwood et coll., 2001).

Notons également que les expressions de GAP43 et synaptophysine semblent inchangées au niveau des glomérules du bulbe olfactif des patients schizophrènes (Rioux et coll., 2005). Par contre, l'expression de MAP2 est réduite au niveau des glomérules du bulbe olfactif des patients (Rioux et coll., 2004).

Aucune différence d'expression de GFAP ne semble retrouvée chez les patients schizophrènes contrairement à ceux diagnostiqués comme étant atteints de la maladie d'Alzheimer (Arnold et coll., 1996) ou atteints de dépression majeure (Fatemi et coll., 2004). Ce résultat est répliqué dans de nombreuses études s'intéressant à diverses régions cérébrales comme par exemple le cortex préfrontal (Karson et coll., 1999) ou le cortex visuel et frontal (Perrone-Bizzozero et coll., 1996).

4. Hypothèses physiopathologiques

A l'examen de l'ensemble des données observées chez les patients, la première constatation consensuelle est que la schizophrénie est une maladie multifactorielle. De nombreuses hypothèses ont été élaborées pour tenter d'expliquer à la fois les causes et les mécanismes physiopathologiques de la schizophrénie. Si certaines sont moins étudiées que d'autres, les différentes hypothèses présentées ici ne sont pas forcément exclusives les unes des autres.

a. Hypothèses minoritaires

- Carence en vitamine D

Une carence potentielle en vitamine D, dont la synthèse est liée à l'ensoleillement, a été envisagée. En effet un plus grand taux de schizophrénie est retrouvé chez les populations immigrées de zones très ensoleillées vers des pays l'étant beaucoup moins et chez les individus dont la gestation s'est faite en hiver, période où l'ensoleillement est réduit (Mc Grath, 1999). Ajoutons qu'une famine en période hivernale pourrait avoir limité l'apport en vitamine D et être une des raisons du grand nombre de cas de schizophrénie qui peut en découler comme dans le cas de la famine de l'hiver 1944-1945 en Hollande (Susser et coll., 1998).

- Perturbation de l'axe hypothalamo-hypophysaire

L'axe hypothalamo-hypophysaire a été proposé comme pouvant être le siège de perturbations rendant les individus vulnérables à la maladie. Les arguments majeurs sont l'apparition des premiers signes au moment de l'adolescence, les corrélations entre la maladie et des complications obstétriques ainsi que le stress généré par la vie urbaine (Koenig, 2006).

b. Une hypothèse répandue : un trouble neurodéveloppemental...

Plusieurs arguments (Harrison, 2007) font privilégier une origine neurodéveloppementale (Murray et Lewis, 1987 ; Weinberger, 1987) plutôt que neurodégénérative de la maladie bien que les deux ne soient pas obligatoirement exclusives (Church et coll., 2002 ; Perez-Neri et coll., 2006) :

- L'âge d'apparition des premiers symptômes : tardivement à l'adolescence ou au début de l'âge adulte ;
- La corrélation avec de nombreux facteurs environnementaux qui interviennent en période périnatale, comme les complications obstétriques (Preti et coll., 2000) ;
- Les anomalies de développement neurologique, moteur, cognitif et comportemental pendant l'enfance (Niemi et coll., 2003) ;
- Les anomalies neuropathologiques (Harrison, 1999) présentes à différentes étapes de la pathologie (Pantelis et coll., 2005) et notamment dès le premier épisode psychotique (Steen et coll., 2006 ; Vita et coll., 2006). On note par exemple des anomalies au niveau de populations cellulaires qui se mettent en place au cours du 2^e semestre de gestation (Bloom, 1993) ;
- La rare présence de gliose (Arnold et coll., 1996)

La schizophrénie est donc considérée actuellement comme résultant d'un ou plusieurs défauts dans le développement et la maturation de la structure du cerveau (Lewis et Levitt, 2002 ; Rapoport et coll., 2005).

c. ... aboutissant à des perturbations de la connectivité ?

Ces perturbations neurodéveloppementales pourraient aboutir à une mauvaise connexion généralisée à l'ensemble du système nerveux central. Cette hypothèse de « dysconnexion »¹ est principalement soutenue par la découverte en imagerie fonctionnelle d'une mauvaise synchronisation de régions cérébrales (Shenton et coll., 2001) comme, par exemple, entre les régions frontale et temporale (Friston et Frith, 1995 ; Stephan et coll., 2006), ou entre régions corticales (Del Cul, 2005). Certains circuits cérébraux pourraient être plus particulièrement perturbés, comme le corps calleux (David, 1994), le circuit cortical parallèle préfrontal dorsolatéral (Bunney et Bunney, 2000) ou le circuit CCTCC (*cortico-cerebellar-thalamic-cortical circuit*) (Andreasen, 1999). Cependant, au lieu d'être focalisée sur certaines régions cérébrales, ces perturbations de la connexion entre régions pourraient toucher tout le cerveau (Foucher et Luck, 2006). La cause d'une telle dysconnexion fonctionnelle pourrait être une dysconnexion structurale, où la synapse serait au cœur du processus de dérégulation (Frankle et coll., 2003). En effet, (i) une diminution de la substance grise pourrait être liée à une diminution des extensions neuronales et des épines dendritiques puisque le nombre global de neurones semble normal (Glantz et Lewis, 2000) ; (ii) des études de microarray semblent montrer une diminution généralisée de l'activité synaptique (Mirnics et coll., 2001). La synapse glutamatergique semble être en ligne de mire dans l'hypothèse d'un dysfonctionnement synaptique (Owen et coll., 2005). En effet, de nombreux gènes potentiellement associés à la schizophrénie semblent présenter une implication, de près ou de moins près, avec la synapse glutamatergique (Harrison et Owen, 2003 ; Harrison et Weinberger, 2005b) et particulièrement son récepteur NMDA (Frankle et coll., 2003 ; Meador-Woodruff et Kleinman, 2002 ; Tsai et Coyle, 2002). Afin d'étudier plus avant cette hypothèse d'une dysconnexion synaptique généralisée à l'ensemble du cerveau, un modèle animal est requis.

¹ « Dysconnexion » plutôt que « disconnexion » comme proposé initialement par Friston, signifie plutôt mauvaise connexion (du grec « dys » qui signifie « mauvais » ou « malade ») qu'absence de connexion (du latin « dis » qui signifie « séparé »).

Modèles animaux pour l'étude de la schizophrénie

Ces hypothèses nécessitent des explorations expérimentales, impossibles chez l'Homme. Des modèles animaux sont requis qui, idéalement, modéliseraient à la fois l'étiologie et les symptômes de la maladie, et permettraient de tester de nouvelles thérapeutiques. Si ces modèles ne pourront jamais modéliser parfaitement *tous* les aspects de la schizophrénie, l'exploration de certains d'entre eux permet de renforcer ou non la pertinence des hypothèses neurochimiques et ainsi d'approcher les mécanismes physiopathologiques sous-tendant la schizophrénie (Dennis, 2005 ; van den Buuse et coll., 2005). Nous présentons ici les tests comportementaux utilisés dans la recherche de modèles animaux, ainsi que les modèles les plus robustes pour l'étude de la pathologie.

1. Tests comportementaux

Les causes de la pathologie restent inconnues à ce jour. Des modèles animaux ont donc été créés pour tenter de reproduire les symptômes des patients schizophrènes (symptômes psychotiques, stéréotypies, déficits cognitifs, troubles de la mémoire ou de l'attention... ; Tableau 2) tout en essayant de mimer certains signes neuropathologiques ou de modéliser certaines hypothèses étiologiques (Lipska et Weinberger, 2000). Les tests majoritairement utilisés dans la recherche de modèles animaux pour l'étude de la schizophrénie sont l'inhibition latente et l'inhibition du réflexe de sursaut qui permettent d'évaluer, dans diverses espèces, respectivement l'attention et le traitement de l'information, tous deux altérés chez les patients schizophrènes.

Découverte chez les animaux, l'inhibition latente (*latent inhibition*, LI) est la capacité à ignorer des stimuli non pertinents. En effet, lorsqu'un stimulus est préalablement rencontré sans conséquence particulière, il devient moins efficace, comparativement à un nouveau stimulus, à créer une association lors d'une nouvelle présentation (apprentissage conditionné). Plusieurs éléments attestent de l'intérêt de ce test. Non seulement l'inhibition latente est réduite en présence d'agonistes dopaminergiques et accrue en présence d'antagonistes dopaminergiques chez le sujet sain et le rat, mais surtout, elle est diminuée chez les patients schizophrènes. Au niveau neuronal, l'inhibition latente impliquerait le circuit mésolimbique dopaminergique, en particulier l'hippocampe et l'amygdale (Gray, 1998 ; Lubow, 2005).

Signes cliniques de la schizophrénie	Comportements des modèles animaux
symptômes psychotiques	hyperlocomotion induite par la dopamine
Stéréotypies	stéréotypies induites par la dopamine
Induction de symptômes psychotiques par administration d'antagonistes NMDA	locomotion induite par les antagonistes NMDA
vulnérabilité au stress	hyperlocomotion induite par un stress
déficits de traitement de l'information	déficit d'inhibition du réflexe de sursaut
troubles de l'attention	déficit d'inhibition latente
déficits cognitifs	performances réduites dans les tests de mémoire
retrait social	réduction des contacts avec des congénères non familiaux

Tableau 2 : Tentative de parallélisme entre certains signes cliniques de la schizophrénie et les perturbations comportementales observables chez les modèles animaux d'étude de la pathologie. Modifié de (Lipska et Weinberger, 2000).

Le réflexe de sursaut est considéré comme une réaction sensorimotrice de défense en réponse à un stimulus inattendu et relativement intense. Son inhibition (*prepulse inhibition*, PPI) correspond à l'absence de sursaut lorsqu'un stimulus inattendu et intense est précédé d'un stimulus plus faible. Il ne s'agit pas d'une forme de conditionnement, car l'inhibition a lieu dès la première exposition et ne diminue pas après plusieurs expositions. En plus d'être perturbé chez les schizophrènes, le PPI est réduit chez le rat en présence d'agonistes de la dopamine, effet qui est annulé par des antagonistes de la dopamine. Au niveau des systèmes neuronaux, le PPI implique la connexion de régions corticales limbiques avec des systèmes sous-corticaux dopaminergiques (Swerdlow et Geyer, 1998).

Bien que ces deux tests, pris indépendamment, soient retrouvés dans d'autres pathologies, leur utilisation, associée à d'autres indices (comportementaux, neurochimiques), est pertinente dans la validation de modèles animaux d'étude de la schizophrénie.

2. Modèle pharmacologique

Les modèles pharmacologiques dopaminergiques ne couvrant pas suffisamment d'aspects de la pathologie, comme les symptômes négatifs et les troubles cognitifs (Gainetdinov et coll., 2001), nous nous limitons ici à la présentation d'un modèle pharmacologique glutamatergique.

Le phencyclidine (PCP) est un agoniste des récepteurs NMDA glutamatergiques interagissant également avec des récepteurs de la dopamine et de la sérotonine. L'administration de PCP induit chez les sujets sains une grande partie des symptômes positifs, mais également des symptômes négatifs ainsi que des dysfonctions cognitives. Chez l'animal, les primates non humains en particulier, l'administration à long terme de PCP, plutôt qu'à court terme, semble bien mimer la pathologie notamment au niveau du cortex préfrontal, diminuant plus particulièrement des fonctions comme l'inhibition de réponse, le comportement social et la réponse locomotrice au stress sans pour autant affecter les fonctions motrices ou motivationnelles. L'administration de PCP à long terme induirait sur la fonction dopaminergique une augmentation mésolimbique ainsi qu'une réduction dans le cortex frontal, ce dernier point pouvant être en adéquation avec l'hypothèse actuelle, chez les schizophrènes, d'une hypofrontalité dopaminergique corrigée par l'administration de neuroleptiques. Ces dysfonctions sont partiellement diminuées lors de l'administration de certains neuroleptiques (clozapine plutôt qu'halopéridol). L'injection de PCP chez les primates non humains pourrait donc constituer un modèle intéressant d'étude de la schizophrénie (Jentsch et Roth, 1999).

3. Modèles lésionnels

Les modèles lésionnels les plus intéressants, notamment du fait qu'ils ne sont pas focalisés sur un seul système neurochimique, sont ceux qui étudient l'hypothèse neurodéveloppementale de la schizophrénie, comme le rat « Lipska-Weinberger » dont l'hippocampe ventral est expérimentalement lésé à la naissance. Avant la puberté, ces rats, bien qu'interagissant avec les congénères un peu moins que les témoins, se comportent normalement dans tous les tests comportementaux. Par contre, à l'âge adulte, ils présentent des changements comportementaux (réponse motrice au stress accrue, stéréotypies) probablement associés à une augmentation de la transmission dopaminergique mésolimbique et nigrostriatale. De plus, ils présentent une plus grande sensibilité aux antagonistes glutamatergiques, des déficits en PPI et LI, des comportements sociaux altérés et des problèmes de mémoire de travail. Plusieurs modifications neurochimiques sont associées à ce modèle, parmi lesquels une diminution de la libération de dopamine induite par le stress au niveau cortical et une diminution de l'expression d'un transporteur membranaire du glutamate. Ces perturbations sont partiellement annulées par les neuroleptiques (PPI corrigé par les neuroleptiques atypiques seulement) et l'hyperlocomotion est réduite par un

antagoniste glutamatergique. L'hypothèse soutenue par ce modèle est qu'une perturbation précoce de l'hippocampe, entraînant un mauvais développement du cortex préfrontal, serait un facteur clé de l'apparition de la maladie (Lipska, 2004).

4. Modèles transgéniques

Comme nous ne connaissons pas les gènes impliqués dans la schizophrénie, mais seulement des gènes *de susceptibilité*, et sachant qu'ils sont très probablement nombreux à intervenir, des souris transgéniques mutées pour un seul gène ne permettent pas d'étudier toute la composante génétique de la schizophrénie. Cependant, plusieurs modèles ont déjà été envisagés (Gainetdinov et coll., 2001 ; O'Tuathaigh et coll., 2007), parmi lesquels les souris NR1, DAT-KO et la souris KO-STOP sur laquelle nous avons travaillé.

La souris mutante NR1, qui n'exprime que 5 à 10% du taux normal de sous-unités NR1 du récepteur NMDA du glutamate (donc le même taux global de récepteurs NMDA) présente des troubles du comportement comme une hyperlocomotion (liée à la nouveauté), une augmentation des stéréotypies, un retrait social. Aucune perturbation du métabolisme dopaminergique n'est retrouvée dans le striatum. Ces troubles sont améliorés par l'administration de neuroleptiques classiques et atypiques (Mohn et coll., 1999).

La souris DAT-KO, qui n'exprime pas le transporteur de la dopamine permettant la recapture de la dopamine libérée dans l'espace synaptique, présente en permanence un taux de dopamine extracellulaire élevé. En conséquence, les récepteurs D1 et D2 sont moins nombreux. Ces souris, anormalement petites, sont hyperactives en réaction à la nouveauté (perturbation améliorée par les neuroleptiques), incapables d'allaiter et de s'occuper de leur progéniture pour les femelles, et présentent des difficultés dans les tests de mémoire spatiale et le PPI (restauré par les neuroleptiques). Par contre, aucun déficit d'interaction sociale n'est observé (Giros et coll., 1996).

La souris KO-STOP est une souris créée en 2002 dans laquelle l'expression d'une protéine du cytosquelette, associée aux microtubules et appelée « STOP » (*stable tubule only polypeptide*), a été annulée. Dans ce travail, nous nous focalisons sur la souris KO-STOP comme modèle expérimental d'étude de la schizophrénie, en nous appuyant sur plusieurs arguments dont voici les principaux.

Souris KO-STOP

La souris « STOP » a été créée par les chercheurs de l'équipe du *Laboratoire du cytosquelette* du Centre d'Énergie Atomique de Grenoble lorsqu'ils s'intéressaient aux fonctions de certaines protéines associées aux microtubules dans le cytosquelette. Privée de protéine STOP, ubiquitaire, la souris était suspectée de ne pas vivre longtemps, voire pas du tout. Il en fut autrement.

1. Protéine STOP et cytosquelette

a. Le cytosquelette neuronal

Le cytosquelette, littéralement *squelette de la cellule*, ne correspond pas seulement à l'architecture de la cellule, c'est aussi - et surtout - l'ensemble des éléments qui lui permettent d'assurer des processus dynamiques comme le transport intracellulaire, l'endo- et l'exocytose, ou encore la division cellulaire (Fernandez, 2004). C'est également ce qui permet aux cellules, au cours du développement, d'être en mouvement et de créer des connexions avec d'autres cellules. Par exemple, au niveau du cortex, le cytosquelette permet la répartition en couches au moment de la migration neuronale (Bielas et Gleeson, 2004). En outre, il joue un rôle central dans le guidage axonal puisqu'il modèle avec beaucoup de flexibilité le cône de croissance qui va permettre aux neurones d'explorer l'environnement, sélectionner un site et former l'axone à cet endroit (Tanaka et Sabry, 1995). Ces fonctions sont permises grâce aux composants fibrillaires du cytosquelette et aux protéines qui leurs sont associées. Dans les neurones, trois catégories de composants fibrillaires ont été identifiées : les microfilaments, les neurofilaments et les microtubules (pour revue voir Portier, 1992). Avant de nous focaliser sur les microtubules, voyons ce que sont les microfilaments et les neurofilaments.

- Les neurofilaments

Filaments intermédiaires des neurones, les neurofilaments ont un diamètre de 10 nm, compris entre celui des microfilaments et celui des microtubules, qui leur vaut ce nom (Cumming et Burgoyne, 1983). Ils sont composés d'un réseau de trois protéines NFP, protéines des neurofilaments (*neurofilament proteins*) de masses moléculaires différentes : NF-H, NF-M et NF-L (H pour *heavy* - lourd -, M pour *medium* - moyen -, L pour *low* - léger -). Leur rôle est le maintien du diamètre axonal, qui lui-même régule la vitesse de conduction de l'influx nerveux.

- Microfilaments

Les microfilaments, polymères polaires constitués d'actine, sont présents dans toutes les cellules eucaryotes. Ce sont des filaments de 5-7 nm de diamètre, présents dans tout le neurone, et plus particulièrement dans les neurites. Ils sont par exemple présents au niveau des épines dendritiques (Cumming et Burgoyne, 1983) et des cônes de croissance axonaux (Tanaka et Sabry, 1995). Ils se polymérisent par addition de sous-unités à leur pôle positif au niveau de la membrane à l'extrémité des filopodes du cône de croissance de l'axone, et se dépolymérisent à l'autre extrémité, vers l'intérieur de la cellule. Les microfilaments d'actine et les protéines associées sont non seulement impliqués dans la morphologie cellulaire mais surtout dans la poussée neuritique et l'exo- et l'endocytose.

b. Les microtubules

Tubes creux de 25 nm de diamètre, les microtubules sont l'association de 13 protofilaments, eux même issus de la polymérisation de dimères de tubulines (α et β). La tubuline représente 1/5^e de l'ensemble des protéines du cerveau. Les microtubules sont polarisés dans l'axone (mais pas dans les dendrites) : le pôle de croissance rapide (positif) est le plus éloigné du corps cellulaire et le pôle lent (négatif) en est le plus proche.

Les microtubules se renouvellent constamment et rapidement, par assemblage à l'extrémité positive, et désassemblage à l'extrémité négative de dimères de tubuline ; créant ainsi un « équilibre dynamique » (Portier, 1992). Du fait de leurs polymérisation et dépolymérisation très dynamiques, les microtubules sont très importants dans le choix de la direction de croissance (Tanaka et Sabry, 1995), dans le transport vésiculaire des protéines et des organites et dans la transduction du signal nerveux (Guzik et Goldstein, 2004).

Par contraste avec le grand dynamisme des microtubules au moment du choix de la direction de croissance de l'axone, les microtubules doivent être stabilisés au moment de la formation axonale. Cela est possible grâce à la famille des MAPs, les protéines associées aux microtubules (*microtubule-associated proteins*).

c. Les MAPs

Les protéines associées aux microtubules sont classées en 2 types principaux : (i) les protéines motrices qui produisent de la force et du mouvement le long des microtubules, et (ii) les protéines d'assemblage qui déterminent l'association et l'écartement des microtubules.

Les protéines motrices sont des triphosphatases nucléotidiques (ATP ou GTP) mécano-chimiques responsables du transport bidirectionnel des organites. Ce transport peut être

antérograde, grâce, par exemple à la protéine motrice kinésine, ou rétrograde, avec la dynéine (également appelée MAP1C).

Parmi les protéines d'assemblage, on trouve MAP1A et MAP1B (également appelée MAP5) qui sont exprimées à des moments différents du développement. L'expression de MAP1A augmente au cours du développement. A l'inverse, MAP1B, exprimée dans les neurones en différenciation, est très abondante dans le cerveau à la naissance puis diminue au cours du développement, excepté dans les cellules qui se renouvellent comme les neurones olfactifs. MAP1B est présente surtout dans les axones, et notamment sous forme phosphorylée, jouant alors un rôle majeur dans la poussée neuritique. Elle est également présente sous forme non phosphorylée dans les corps cellulaires et les dendrites, et dans les axones des neurones différenciés (Halpain et Dehmelt, 2006). MAP2 est retrouvée sous 3 formes qui s'expriment également différemment dans le temps : MAP2C est abondante dans le système nerveux immature (mais seulement dans les cellules gliales contrairement aux autres formes, exclusivement neuronales), l'expression de MAP2A augmente au cours du développement et celle de MAP2B demeure constante. Les MAP2 sont localisées dans les dendrites, tandis que la protéine Tau est présente principalement dans les axones. MAP2 et Tau ont pour rôle de stabiliser les microtubules et d'accroître leur rigidité (Dehmelt et Halpain, 2005). Enfin, la protéine STOP se lie très étroitement aux microtubules et empêche leur dépolymérisation *in vitro* sous l'influence d'une température basse, de calcium à une concentration millimolaire ou de drogues. C'est à cette dernière famille de protéines que nous nous intéressons plus particulièrement.

2. La protéine STOP

a. Découverte et fonctions

Dans les années 1980, alors que l'on sait que la majorité des microtubules sont labiles à basse température, les recherches montrent qu'il existe chez les rongeurs un facteur, initialement nommé CSF, facteur de stabilisation au froid (*cold-stabilizing factor*), qui empêche la dépolymérisation à 0-4°C d'une sous-population de microtubules (Webb et Wilson, 1980). Ce facteur est en fait une protéine de 145 kDa appelée STOP (dont l'analogue humain est MAP6), qui se lie aléatoirement aux microtubules et leur confère une très grande stabilité non seulement au froid mais également à des facteurs qui habituellement déstabilisent les microtubules comme le calcium en concentrations millimolaires, la calmoduline ou des drogues (Job et coll., 1981). La protéine STOP semble spécifiquement associée avec les

microtubules du fuseau mitotique excepté en interphase du cycle cellulaire (Margolis et coll., 1990) où il est proposé que son interaction avec les microtubules soit inactivée par phosphorylation (Denarier et coll., 1998b). Insérée par transfection de son ADNc dans des cellules qui ne possèdent pas la propriété de stabiliser les microtubules, la protéine STOP est suffisante pour le permettre (Bosc et coll., 1996). Cette liaison semble irréversible et les protéines STOP sont capables de glisser le long des microtubules (Pabion et coll., 1984). Elle est très spécifique puisque très peu de protéines STOP (1/233) sont nécessaires pour stabiliser un grand nombre de molécules de tubuline (Job et coll., 1982 ; Margolis et coll., 1986). Les microtubules stables sont retrouvés dans de nombreux organes comme le cerveau, les poumons, les reins, le foie (Pirollet et coll., 1989). Il existe plusieurs isoformes de STOP.

b. Isoformes

Deux isoformes neuronales, N-STOP et E-STOP, une forme fibroblastique, F-STOP, une forme astrocytaire, A-STOP, et une forme oligodendrocytaire, O-STOP, ont été trouvées (Figure 1), N-STOP étant la première à avoir été découverte, chez le Rat. Un même gène, appelé Mtap6 chez la Souris, est à l'origine de toutes les isoformes de STOP, qui les exprime par épissage alternatif (Denarier et coll., 1998a). Les isoformes N- et E-STOP de Souris partagent plus de 90% d'homologie avec la protéine N-STOP de Rat alors que chez l'Homme, le Poisson-zèbre ou le Poulet, cette homologie varie de 60 à 90% (Bosc et coll., 2003).

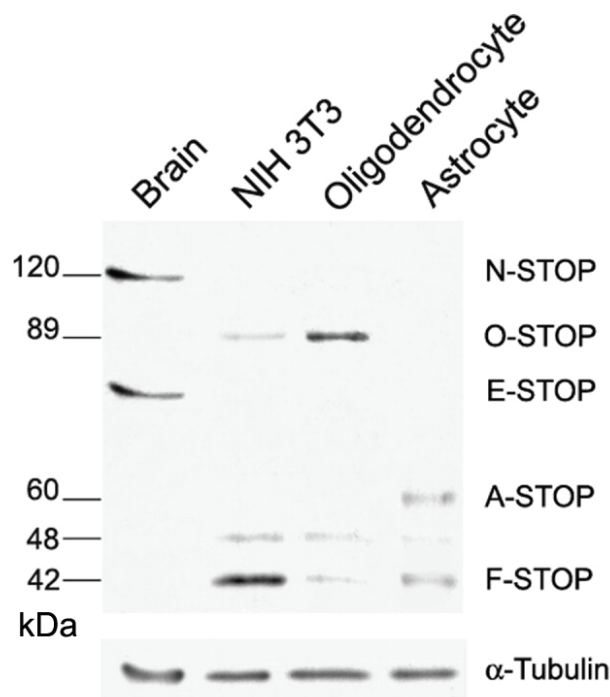


Figure 1 : Western blot des protéines totales d'extraits de cerveau de souris de 30j ("Brain"), de fibroblastes NIH 3T3, d'oligodendrocytes et d'astrocytes immunomarcqué avec un anticorps reconnaissant toutes les isoformes de STOP. Adapté de Galiano et coll., 2004.

La protéine N-STOP, de Rat (Bosc et coll., 1996) ou de Souris (Denarier et coll., 1998a), est une protéine neuronale d'environ 100 kDa (4 exons) possédant 2 domaines distincts à motifs répétés : une région centrale (exon 1) avec 4, 5 ou 6 (variable selon la souche et l'espèce) répétitions identiques en tandem et une région terminale (exon 4) de 28 répétitions imparfaites. Elle possède également 4 domaines de phosphorylation potentielle par la calmoduline-kinase et des domaines SH3¹ laissant supposer des interactions avec d'autres protéines.

E-STOP est un polypeptide de 84 kDa nommé « Early-STOP » parce qu'il a été mis en évidence dans des homogénats de cerveau de rat embryonnaire, où la N-STOP n'est pas retrouvée. E-STOP correspond à un variant tronqué (délétion de l'exon 4) auquel s'ajoutent 4 acides aminés de l'intron 3 non transcrits dans la N-STOP (Figure 2). E-STOP présente les mêmes activités d'interaction à la calmoduline et de stabilisation des microtubules que la N-STOP (Bosc et coll., 2003 ; Guillaud et coll., 1998).

La forme F-STOP (42 kDa) a été mise en évidence dans des cultures de fibroblastes NIH-3T3. Elle présente les mêmes fonctionnalités que les protéines STOP neuronales, mais elle est exprimée seulement à partir des 2 premiers exons avec quelques délétions dans l'exon 1 (Denarier et coll., 1998b). Précisons que le promoteur de la F-STOP présente la particularité d'être inclus dans des séquences (exon1) codant pour les protéines STOP neuronales (Aguezzoul et coll., 2003).

La protéine O-STOP, identifiée à partir de cerveau de souris nouveaux-nés et adultes, est une protéine de 89 kDa exprimée à tous les stades de maturation des oligodendrocytes (Galiano et coll., 2004).

Enfin, la protéine A-STOP, de 60 kDa a été trouvée dans les astrocytes à des niveaux assez faibles comparativement au niveau d'expression de la O-STOP dans les oligodendrocytes. Par ailleurs, la F-STOP a également été trouvée dans les astrocytes (Galiano et coll., 2004).

¹ Les domaines SH3 sont des séquences particulières d'acides aminés capables d'interagir avec d'autres séquences riches en proline.

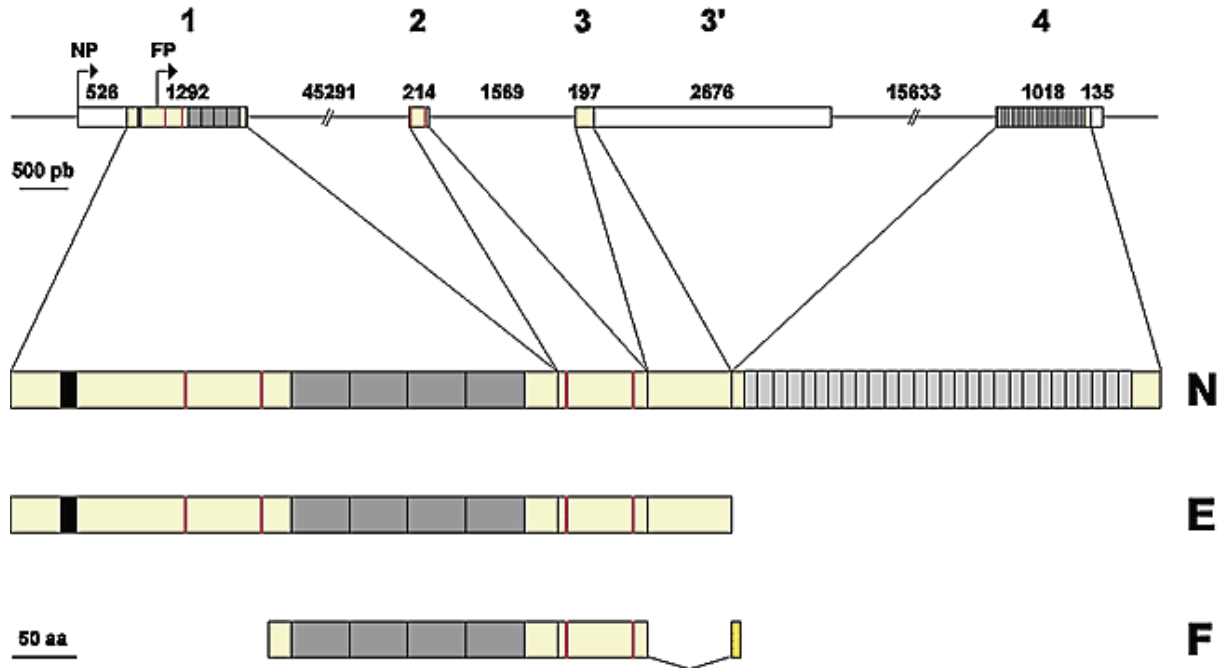


Figure 2 : Représentation schématique du gène Mtap6 et des protéines STOP pour lesquelles il code. Exons (boîtes) et introns (lignes) sont exprimés en paires de bases. L'exon 3', codant pour la partie C-terminale de la E-STOP (qui n'exprime donc pas l'exon 3), est en fait un intron de la N-STOP. NP est le promoteur des formes neuronales et FP celui de la forme fibroblastique. Notons que le domaine central répété (gris), issu de l'exon 1, est présent dans toutes les isoformes (d'après Bosc et coll., 2003).

3. La souris transgénique et ses comportements inattendus

Afin d'étudier plus en détail la fonction des protéines STOP, une souris transgénique n'exprimant plus aucune isoforme de la protéine STOP a été créée (Andrieux et coll., 2002) en supprimant l'exon 1, commun à toutes les formes de STOP (Figure 2).

a. Construction génétique

Les souris KO-STOP ont été générées sur un fond primaire (129 SvPas x 129 SvPas), également appelé « fond pur », par recombinaison homologe entre une cassette contenant le gène lacZ¹ associé au gène de résistance à la Neomycine et l'exon 1 du gène STOP, localisé sur le chromosome 7. Si elle est homozygote, la mutation ainsi induite engendre l'absence totale de protéine STOP (knock-out) et l'expression à sa place, sous le contrôle du promoteur endogène, de la β -galactosidase. En seconde génération, les souris sont croisées avec la souche BALBc, donnant ainsi naissance à des animaux sur fond hybride (BALBc x 129 SvPas) à partir desquels toutes les études sont réalisées (Andrieux et coll., 2002).

¹ LacZ est un gène retrouvé uniquement chez la bactérie *E coli*.

b. Comportements

Bien que les souris STOP $-/-$ soient parfaitement viables, elles se comportent de manière atypique. Elles présentent des phases d'hyperactivité, sans but apparent, accompagnées de fréquents retours à des activités classiques. Parfois, des crises d'une vingtaine de minutes sont observées, où les animaux tournent en rond continuellement. A d'autres moments, les animaux restent sur place en tremblant, et semblent insensibles à leur environnement. Comparativement aux souris « sauvages », les souris STOP $-/-$ passent plus de temps éveillées et actives, et passent moins de temps à manger et dormir. Leur activité semble désorganisée (Andrieux et coll., 2002). Des perturbations de l'intégration sensorimotrice pourraient expliquer ces comportements. En effet, les souris STOP $-/-$ présentent un déficit de leur réponse de PPI comparativement aux souris « sauvages » (Fradley et coll., 2005).

Lors du test *light-dark box*, les souris STOP $-/-$ passent tout leur temps dans le compartiment sombre alors que les souris « sauvages » font quelques incursions dans la partie éclairée. Ce comportement est classiquement interprété comme révélateur d'une grande anxiété chez l'animal. Les souris STOP $-/-$ ont été incapables de réaliser le test de reconnaissance d'objet, dans lequel elles doivent faire la différence entre un objet familier et non-familier. Cette incapacité pourrait révéler des difficultés d'apprentissage ou de mémoire à court terme. Au cours du test « résident – étranger », où un mâle non familier est introduit dans la cage d'un autre mâle, les souris STOP $-/-$ ne présentent ni agressivité, ni investigation sociale, des comportements pourtant observés chez les animaux « sauvages », révélant un sévère retrait social (Andrieux et coll., 2002).

La progéniture des souris STOP $+/-$ est viable et semble se développer normalement. Par contre, les petits issus de mâles STOP $+/-$ et de femelles STOP $-/-$ meurent sans être cannibalisés dans la période périnatale, quel que soit leur génotype, excepté dans le cas où ils sont adoptés par une mère « sauvage ». Cela n'est *a priori* pas dû à une incapacité à téter des petits, ni à un défaut, chez les mères, de lait, ou d'émission de stimuli olfactifs permettant de trouver les mamelles. Lors du test de rassemblement des petits au nid, les femelles STOP $-/-$ se montrent incapables de s'occuper de leur progéniture, contrairement aux souris « sauvages » ou STOP $+/-$. L'hypothèse d'une perturbation de la fonction olfactive qui les aurait empêchées de reconnaître leur progéniture a été écartée par Andrieux et ses collaborateurs. En effet, les souris STOP $-/-$ se révèlent aussi performantes que les « sauvages » au test de la nourriture cachée, impliquant principalement la modalité olfactive. Enfin, le défaut de maternage des femelles STOP $-/-$ est également retrouvé chez les mâles et les femelles vierges $-/-$, indiquant qu'il est indépendant du statut hormonal des animaux (Andrieux et coll., 2002).

Enfin, lorsque le comportement des souris STOP *-/-* juvéniles¹ est examiné, ces dernières ne présentent pas d'hyperlocomotion ni d'hypermotilité locomotrice liée à un stress d'intensité moyenne, contrairement aux comportements trouvés chez l'adulte. Par contre elles présentent une réactivité aux amphétamines similaire à celle des adultes (cf. ci-après). Ces résultats suggèrent une évolution croissante des troubles sensorimoteurs chez la souris STOP *-/-* au cours du développement (Begou et coll., 2007).

c. Aspects fonctionnels

La transmission dopaminergique a été explorée chez la souris STOP *-/-*. Comparée à la souris « sauvage » en condition basale ou de stress modéré, la souris STOP *-/-* présente une réactivité accrue aux amphétamines, suggérant une transmission dopaminergique accrue. Bien que les concentrations en dopamine basale dans le noyau accumbens et le striatum soient équivalentes à celles des souris « sauvages », l'efflux de dopamine induit par des stimulations électriques est fortement augmenté dans le noyau accumbens des souris STOP *-/-*. Ce résultat traduirait une augmentation de la libération de dopamine bien que les mécanismes de recapture et de rétrocontrôle de la dopamine semblent normaux. Au niveau du striatum, par contre, l'efflux de dopamine semble légèrement réduit (Brun et coll., 2005).

Le métabolisme du glutamate a également été étudié. La souris STOP *-/-* présente une perturbation, sur l'ensemble du cerveau exception faite du cervelet, du métabolisme de la glutamine astrocytaire et du glutamate des neurones au niveau cytosolique. Dans les deux cas des diminutions de métabolites sont observées (Brenner et coll., 2007).

d. Aspects structuraux

L'expression de STOP est très importante dans le bulbe olfactif, l'hippocampe et le cervelet. L'organisation des couches cellulaires dans ces régions semble normale. Andrieux et ses collaborateurs (2002) indiquent que la distribution de l'expression du gène lacZ, sous le contrôle du promoteur de la protéine STOP, est similaire à celle de la protéine STOP. C'est un point que nous étudierons en détail et discuterons dans cette thèse.

L'organisation morphologique du bulbe olfactif, étudiée par quantification du nombre de glomérules et mesure de leur diamètre, ne montre aucune modification chez les souris STOP *-/-*. L'organisation axonale et dendritique des fibres myélinisées de la région CA3 de l'hippocampe et celle des cellules de Purkinje du cervelet semble également préservée chez les souris mutées (Andrieux et coll., 2002).

¹ Les souris testées dans cette étude avaient 4 à 5 semaines.

La densité des vésicules synaptiques dans les terminaisons axonales du *stratum radiatum* de la région CA1 de l'hippocampe est réduite de moitié chez les souris STOP *-/-*. Le nombre de vésicules synaptiques dans les terminaisons des collatérales de Schaeffer semble également légèrement réduit. Aucune modification d'expression des protéines synaptiques, parmi lesquelles la synaptophysine et la PSD-95, n'a été mise en évidence dans cette même région dans les travaux initiaux (Andrieux et coll., 2002). Cependant, il semble que les quantités d'ARNm de protéines pré- et post- synaptiques (dont la synaptophysine et le GAP43) soient réduites dans l'hippocampe de la souris STOP *-/-* (Eastwood et coll., 2006). La transmission synaptique à l'état basal semble normale au niveau de la synapse entre collatérales de Schaeffer et cellules pyramidales de la CA1. Par contre, certaines formes de plasticité synaptique sont altérées chez les souris KO-STOP dans cette région ainsi qu'au niveau de la connexion entre les fibres myélinisées et les cellules pyramidales de la région CA3 de l'hippocampe (Andrieux et coll., 2002).

e. Effet des neuroleptiques

L'effet de différents neuroleptiques a été testé sur les souris STOP *-/-*. Injectés à la naissance ou juste après, ils n'ont permis aucune amélioration du comportement des souris STOP *-/-*. Par contre, les souris STOP *-/-* gestantes, traitées au moins 6 jours avant la naissance, ont présenté ensuite de meilleurs résultats lors des tests de maternage et de rassemblement des petits au nid, mais les petits n'ont pas pour autant survécu. Par ailleurs, un traitement à long terme (pendant 4 mois après le sevrage) avec des neuroleptiques typiques (combinaison d'halopéridol et de chlorpromazine) supprime chez les souris KO-STOP mâles l'hyperactivité locomotrice nocturne et l'hyper-réactivité locomotrice induite dans des conditions de stress léger (Brun et coll., 2005). Enfin, chez des animaux âgés de 7 à 9 mois, un traitement aigu avec un neuroleptique atypique (clozapine) supprime l'hyper-réactivité locomotrice induite dans des conditions de stress léger (Fradley et coll., 2005).

La souris STOP *-/-* présente donc des comportements désorganisés (phases d'hyperactivité associées à des phases de prostration), des troubles sensorimoteurs (déficit en PPI), une incapacité de maternage, une grande anxiété et un sévère retrait social. Certaines de ces perturbations n'apparaissent qu'en période post-pubertaire. Par ailleurs, la souris STOP *-/-* semble présenter une hyperdopaminergie au niveau du noyau accumbens en condition de stress, ainsi qu'une hypoglutamatergie. Bien que son cerveau ne présente pas d'anomalie morphologique évidente, notamment au niveau du bulbe olfactif, de l'hippocampe et du cervelet, où la protéine semble particulièrement exprimée, des perturbations synaptiques sont

mises en évidence. Une déplétion du pool vésiculaire, des modifications de quantités d'ARNm de protéines synaptiques, ainsi que des modifications de certaines formes de plasticité synaptique sont observées au niveau de l'hippocampe. L'incapacité de maternage et l'hyperlocomotion peuvent être réduites par l'administration de neuroleptiques. Sur la base de l'ensemble des perturbations de la souris KO-STOP, et des données cliniques et expérimentales de la schizophrénie, nous considérons que la souris STOP $-/-$ est un bon modèle animal pour l'étude de la pathologie, et en particulier pour l'étude de l'hypothèse d'une dysconnexion synaptique généralisée à l'ensemble du cerveau. En effet, puisque des perturbations synaptiques existent au niveau de l'hippocampe, il faut à présent rechercher si elles existent dans d'autres systèmes synaptiques. Le système olfactif, notamment, est particulièrement concerné puisqu'Andrieux et collègues (2002) ont montré que la protéine STOP est fortement exprimée au niveau du bulbe olfactif.

Olfaction

L'olfaction est une modalité sensorielle permettant à un organisme de percevoir les molécules odorantes de l'environnement. Elle est essentielle pour la mise en place de comportements variés tels que des comportements sociaux, de reproduction et alimentaires. L'olfaction représente un champ d'étude qui s'est particulièrement développé avec la découverte des gènes codant pour les récepteurs olfactifs par Buck et Axel en 1991 (plus de 27300 articles sur Pubmed en mai 2007 pour *olfact**). Cette découverte leur a valu le prix Nobel en 2004.

1. Organisation du système olfactif

a. Une organisation simple

Le système olfactif, chez la plupart des vertébrés (Ache et Young, 2005), s'organise de la façon suivante : l'information olfactive portée par les molécules odorantes est transmise par un premier neurone olfactif récepteur au premier relais central (le bulbe olfactif), puis transmise au reste du cerveau par un second neurone. On distingue généralement deux systèmes olfactifs (Meredith, 1991) : le système olfactif principal et le système olfactif accessoire ou voméronasal ou de Jacobson, du nom du chercheur l'ayant précisément décrit en 1811. Après une présentation générale de l'organisation de ces deux systèmes, nous

verrons qu'il existe d'autres structures potentiellement impliquées dans la chimioréception olfactive.

- Systèmes olfactifs principal et accessoire

Les neurones olfactifs récepteurs sont trouvés dans la muqueuse olfactive pour le système olfactif principal et dans l'organe voméronasal pour le système accessoire. La muqueuse olfactive est un épithélium pseudo-stratifié contenant 3 types cellulaires : les neurones récepteurs olfactifs, les cellules de soutien (ou cellules sustentaculaires) et les cellules basales (De Lorenzo, 1957). Au bout de la dendrite des neurones olfactifs se trouvent une dizaine de cils augmentant la surface d'interaction avec les molécules odorantes. Ces dernières se lient aux récepteurs olfactifs moléculaires, ancrés dans la membrane plasmique des cils, qui initieront ensuite la transduction du signal olfactif (Breer, 2003). L'organe voméronasal est un organe tubulaire en forme de cigare localisé à la base de la cloison nasale (ou septum), de part et d'autre de ce dernier. Chez les rongeurs il est fermé au niveau caudal et ouvert au niveau rostral, s'ouvrant ainsi directement dans la cavité nasale. Il est bordé d'un épithélium pseudostratifié très semblable à celui de la muqueuse olfactive. Cependant, les neurones récepteurs possèdent au pôle apical de leur dendrite des microvillosités plutôt que des cils (Keverne, 1999).

Ces neurones regroupent leurs axones en nerfs olfactifs ou nerfs voméronasaux qui traversent la lame criblée de l'ethmoïde et se projettent sur le bulbe principal ou accessoire, respectivement. Notons que les axones des neurones olfactifs du système principal présentent quelques caractéristiques originales : ils transportent des ARNm et au moins deux facteurs de transcriptions ; caractéristiques que l'on peut retrouver dans des axones en développement, mais très rarement dans des axones matures (Nedelec et coll., 2005). Le bulbe est le premier relais synaptique du système olfactif. Les neurones secondaires partent du bulbe et projettent leurs axones vers différentes parties du télencéphale, formant ainsi le tractus olfactif latéral dans le système principal et le tractus olfactif accessoire dans le système accessoire (Figure 3). Ces derniers se projettent vers différentes structures cérébrales (Tableau 3) (Brennan et Keverne, 1997).

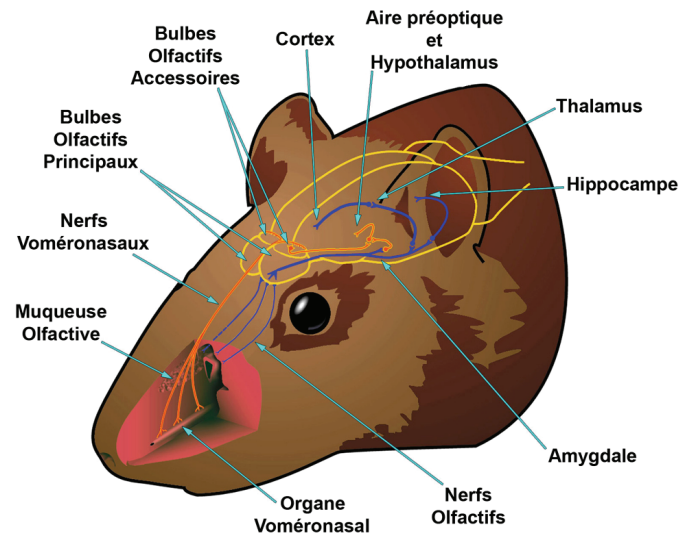


Figure 3 : Organisation synaptique générale des systèmes olfactif principal et accessoire de rongeur. Adapté du schéma du Professeur Meredith et l'Université de Floride (reproduit avec permission).

		Système olfactif	
		Principal	Accessoire
Projections à partir du bulbe	directes	Amygdale	
		• Noyau cortical postéro-latéral	• Noyau médian
		• Noyau cortical antérieur	• Noyau cortical postéro-médian
		Noyau olfactif antérieur	Noyau du tractus olfactif accessoire
		Tubercule olfactif	
	indirectes	Cortex pyriforme	
		Cortex Entorhinal	
		Noyau médiadorsal du thalamus	Noyau du lit de la strie terminale
		Hypothalamus latéral	Hypothalamus ventromédian
			Aire préoptique médiale
	Noyau péri-mammillaire		

Tableau 3 : Structures vers lesquelles les systèmes olfactif principal et accessoire se projettent.

Pour résumer, il est intéressant de remarquer que le système olfactif ne possède qu'un seul relais entre l'organe sensoriel et le cortex sensoriel olfactif, à savoir le bulbe olfactif. Il s'agit donc d'un système sensoriel où l'information issue de l'environnement est traitée directement par le système nerveux central (Stockhorst et Pietrowsky, 2004). Chez la souris, environ 1000 récepteurs moléculaires sont répartis dans plus de 2 millions de neurones récepteurs olfactifs, à raison d'un seul type par neurone (Buck et Axel, 1991). Tous les neurones olfactifs codant pour 1 type de récepteur moléculaire se projettent sur, en général, 2 des 1800 glomérules (Royet et coll., 1988), l'un sur la moitié médiane du bulbe et l'autre sur la moitié latérale. Ce phénomène est appelé convergence (Wachowiak et Shipley, 2006). Chaque molécule olfactive est codée au niveau du bulbe comme une combinaison de

glomérules activés, correspondant chacun à une facette de l'odeur (Malnic et coll., 1999 ; Mori et coll., 1999).

- Autres structures

Outre la distinction muqueuse olfactive/organe voméronasal, notons que l'olfaction englobe en réalité d'autres structures réceptrices très méconnues (Figure 3). En effet, l'organe septal (ou organe de Masera), par exemple, est un ensemble bien individualisé de cellules sensorielles situé dans la partie basale des cavités respiratoires, de chaque côté de la cloison nasale, au niveau du conduit naso-palatin dans une région pour le reste tapissée d'épithélium respiratoire. Il projette des axones vers le bulbe olfactif principal. Le ganglion de Grueneberg, quant à lui, est situé bilatéralement dans la partie antérieure de la cavité nasale, près des narines et projette également des axones vers le bulbe principal, mais plus précisément sa partie caudale (Breer et coll., 2006). Enfin, certains chercheurs considèrent que le nerf trigéminal et le nerf terminal, qui tous deux sont présents dans la cavité nasale, font également partie des structures impliquées dans la perception olfactive (Stockhorst et Pietrowsky, 2004).

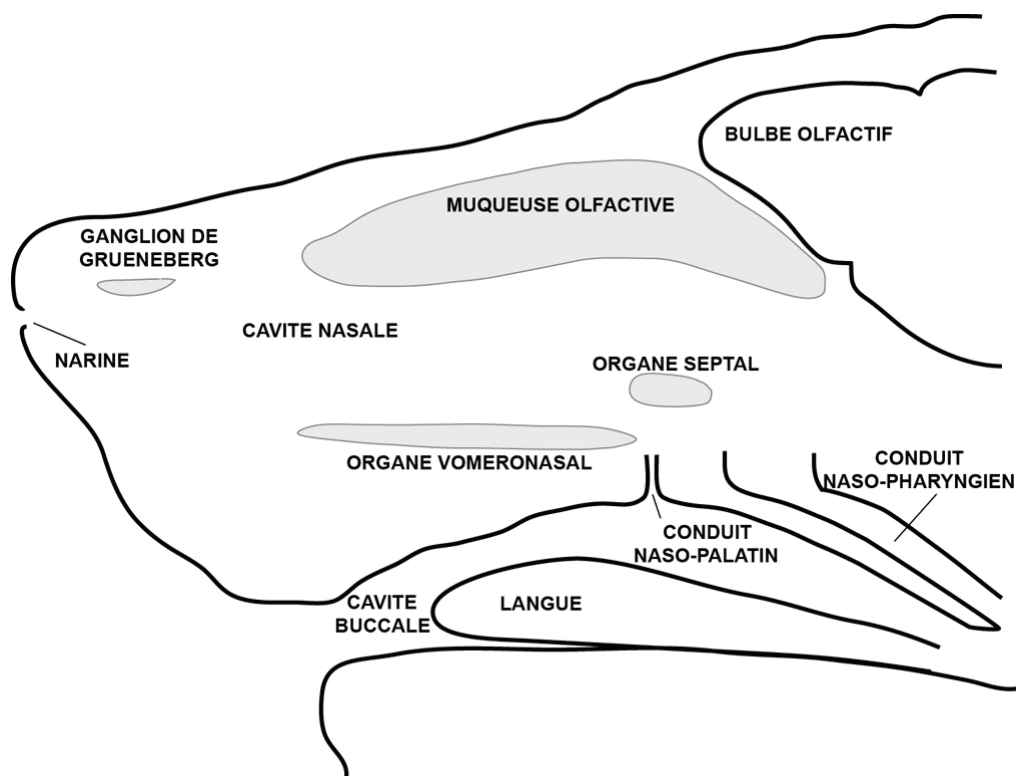


Figure 4 : Schéma de la localisation des différentes structures du système olfactif de rongeur.

b. Développement

- Développement prénatal

Toutes les structures olfactives périphériques proviennent de la placode olfactive (Francis-West et coll., 2002), qui s'invagine au 10^e jour post-conception chez la Souris (gestation de 21 jours) pour former une unique fosse nasale. A ce stade, quelques prolongements axoniques émergent de la base de l'épithélium bordant la fosse nasale. A 11 jours de gestation (13 pour le Rat, dont la gestation dure 23 jours), la cloison nasale est visible, divisant la fosse nasale en 2 cavités. Les premières cellules neurosensorielles forment l'épithélium olfactif présomptif qui s'épaissit dans la partie dorsale des cavités nasales et se réduit dans leur partie ventrale où un épithélium respiratoire (non sensoriel) sera majoritairement présent. Quelques dendrites apparaissent et les prolongements axoniques atteignent le bulbe olfactif en formation. Le primordium de l'organe voméronasal correspond à un bourgeon de cellules s'invaginant à la base de la cloison nasale. A 13 jours de gestation (15 pour le Rat), il est possible de distinguer les couches cellulaires dans l'épithélium olfactif. Une masse de cellules neurosensorielles, le futur organe septal, se distingue de l'épithélium olfactif présomptif dans sa partie la plus ventro-caudale. A 14 jours de gestation, la structure tubulaire de l'organe voméronasal est totalement fermée à l'exception de sa partie rostrale qui sera en communication avec les cavités nasales (Cuschieri et Bannister, 1975 ; Oikawa et coll., 2001). A 15 jours de gestation, le ganglion de Grueneberg est en place, suite à la migration dès le 13^e jour de cellules provenant de l'épithélium olfactif présomptif (Fleischer et coll., 2006 ; Fuss et coll., 2005). A 18 jours de gestation, les fosses nasales sont bien constituées, l'épithélium olfactif s'étend à la voûte des fosses sur la moitié environ de son étendue. Les nerfs olfactifs sont bien développés, ils traversent par petits paquets la lame criblée de l'ethmoïde et sont en connexion avec le bulbe olfactif. Notons que l'apparition du bulbe olfactif dépend de la connexion des nerfs olfactifs avec le télencéphale (Giroud et coll., 1965 ; Gong et Shipley, 1995).

- Développement postnatal

L'épithélium olfactif principal continue de se multiplier jusqu'à la fin de la vie de l'animal. Cette capacité de neurogenèse tout au long de la vie, commune à tous les vertébrés, est une des particularités du système olfactif (Murray et Calof, 1999). L'organe septal, qui continue de se développer considérablement durant la période d'allaitement (Breipohl et coll., 1989), cesse son développement à la maturité sexuelle chez le Rat (Weiler et Farbman, 2003). Le ganglion de Grueneberg semble poursuivre sa maturation après la naissance. En effet, l'agencement de ses cellules est différent chez les animaux nouveau-nés (agencement en

ganglion, comme durant la période prénatale) comparativement aux animaux plus âgés (agencement en une couche filiforme) (Fleischer et coll., 2006).

c. Rôles

Le système olfactif, en général, est impliqué dans la chimioréception, c'est-à-dire la détection et la discrimination des molécules chimiques. Ces dernières sont impliquées dans la mise en place de comportements variés comme l'établissement de liens sociaux, la prise alimentaire, la reproduction, la parentalité (Brennan, 2004 ; Del Cerro, 1998 ; Halpern et Martinez-Marcos, 2003 ; Keverne, 2005 ; Levy et coll., 2004 ; Meredith, 1991 ; Shipley et coll., 2004). Malgré des décennies d'investigation, les rôles respectifs des systèmes olfactifs principal et voméronasal restent difficiles à définir de manière claire. Classiquement, il est proposé que le système olfactif principal détecte les molécules odorantes en général, qui donnent les informations sur l'environnement, et que le système voméronasal détecte les phéromones (cf. encart), composés chimiques induisant une réponse physiologique et/ou comportementale stéréotypée envers un congénère. Si l'on admet, effectivement, que chez les rongeurs le système accessoire est impliqué dans les réponses comportementales et physiologiques aux phéromones, de nombreuses études montrent que malgré l'ablation de l'organe voméronasal, les animaux restent parfois sensibles aux phéromones (Eisthen, 1997). Inversement, alors qu'on associe habituellement le système olfactif accessoire à la fonction reproductive, l'altération de la voie principale de transduction du message olfactif peut perturber le comportement sexuel d'animaux qui pourtant présentent un organe voméronasal intact (Keverne, 2005). L'accumulation de données amène à penser que les deux systèmes interagissent pour permettre à un individu d'adopter le comportement adapté à chaque nouvelle situation (Restrepo et coll., 2004).

Phéromones

Inventé en 1959, le terme « phéromone » provient du grec *pherein* (transférer) et *horman* (exciter). Les phéromones ont été définies précisément en 1976 comme étant des composés uniques, spécifiques d'une espèce, déclenchant un comportement bien défini et indépendant de tout apprentissage (Beauchamp et coll., 1976).

Seules des hypothèses ont été émises pour l'organe septal et le ganglion de Grueneberg, dont on ne connaît pas les fonctions. Le premier pourrait permettre de détecter les aliments dangereux pour l'organisme vu sa proximité avec la cavité buccale, ou jouer un rôle dans

l'allaitement. Le second pourrait, vu sa localisation près des narines, permettre la détection de gaz, ou recevoir par contact des stimuli directs (Breer et coll., 2006).

Le système trigéminal perçoit la composante « tactile » (froid, âcre ou brûlant) des stimuli olfactifs, comme celle de la menthe, par exemple. Il est surtout impliqué dans les réflexes de protection, mais de nombreuses études montrent des interactions étroites entre le système trigéminal et le système olfactif principal (Brand, 2006). La fonction du nerf terminal est mal connue, mais il est possible qu'elle ait un lien avec les comportements de reproduction (Stockhorst et Pietrowsky, 2004). En effet, les neurones à GnRH¹ migrent le long des nerfs voméronasal et terminal (Tobet et Schwarting, 2006).

2. Le glomérule : zone synaptique

a. Le bulbe olfactif

Le bulbe olfactif est le premier relais central d'intégration de l'information olfactive (Shepherd, 1972). C'est une structure en 6 couches chez les rongeurs (Figure 5). La *couche des fibres*, la plus externe, est composée des axones amyéliniques des neurones récepteurs olfactifs dont le corps cellulaire est dans l'épithélium olfactif. La *couche des glomérules* est la zone synaptique entre les axones des neurones récepteurs et les dendrites des cellules mitrales ; on y trouve également des cellules périglomérulaires, des dendrites des cellules à panache et des neurones à axone court. La *couche plexiforme externe* contient les dendrites des cellules mitrales, les cellules à panaches et des prolongements de grains. Elle reçoit des projections du télencéphale. La *couche des cellules mitrales* contient les corps cellulaires des cellules mitrales. Ces cellules mitrales sont le second neurone obligatoire pour le transfert des informations olfactives vers le cortex olfactif, via le tractus olfactif latéral. La *couche plexiforme interne* est une couche dépourvue de corps cellulaires. Enfin, la *couche des grains* est la plus interne ; les grains sont les cellules les plus nombreuses du bulbe olfactif. Ces deux couches les plus internes contiennent des axones de cellules mitrales, de cellules à panaches et de cellules à axones courts, des fibres centrifuges en provenance du télencéphale.

¹ Notons qu'au cours du développement, les neurones à GnRH sont les seuls neurones à migrer de l'extérieur du cerveau vers l'intérieur de celui-ci.

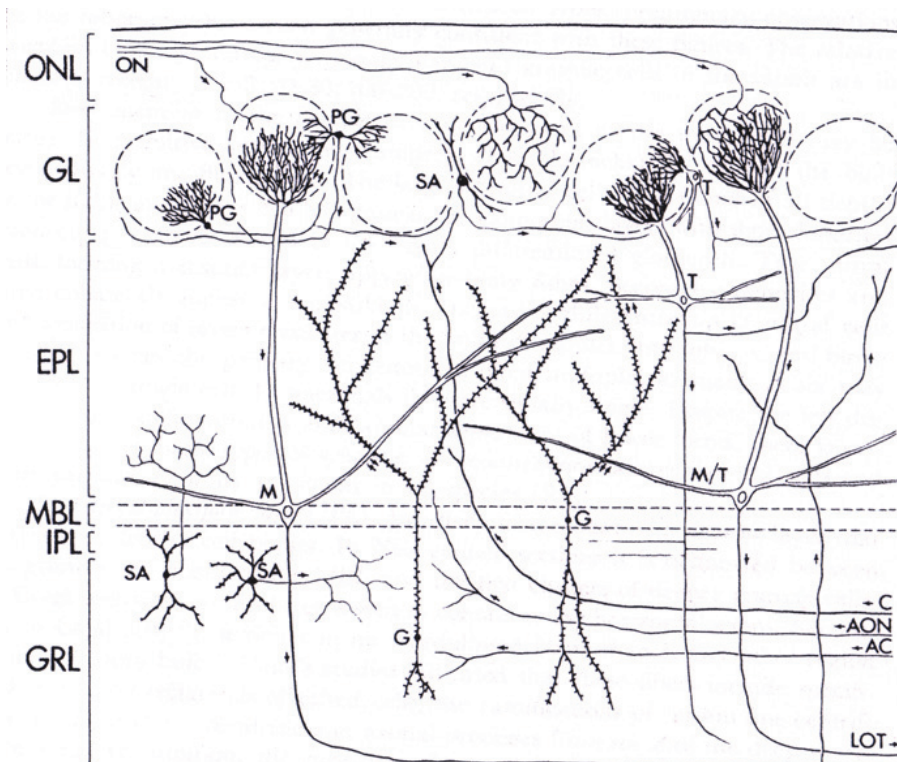


Figure 5 : Organisation des couches cellulaires du bulbe olfactif des mammifères. ONL, couche des nerfs olfactifs ; GL, couche des glomérules ; EPL, couche plexiforme externe ; MBL, couche des cellules mitrales ; IPL, couche plexiforme interne ; GRL, couche des grains ; ON, axones olfactifs ; PG, cellules périglomérulaires ; SA, neurones à axone court ; T, cellules à panaches ; M, cellules mitrales ; G, grains. C, fibres centrifuges en provenance du télencéphale ; AON, fibres du noyau olfactif antérieur ; AC, fibres provenant de la commissure antérieure ; LOT, tractus olfactif antérieur. Modifié de Shepherd, 1972.

b. Le glomérule

Le glomérule est une structure bien individualisée anatomiquement, dont le diamètre est de 100 à 200 μm . Il a tout d'abord été décrit de manière très simple (Shepherd, 1972) comme étant composé des terminaisons axonales des neurones récepteurs olfactifs faisant synapses avec diverses cellules, et des neurones dans la région périglomérulaire nommés « neurones juxtaglomérulaires ». Les neurones récepteurs olfactifs font synapse avec les cellules mitrales, et les neurones juxtaglomérulaires, parmi lesquels on trouve les cellules périglomérulaires, les cellules superficielles à panache et les neurones superficiels à axone court. Les neurones juxtaglomérulaires permettent l'interaction entre glomérules. Au niveau intraglomérulaire, aucune connexion entre neurones récepteurs olfactifs n'est trouvée, alors qu'au niveau dendritique, de nombreuses interconnexions existent. Il a été proposé que les dendrites des cellules mitrales et des cellules à panaches soient excitatrices pour les dendrites des cellules périglomérulaires, tandis que ces dernières seraient inhibitrices des dendrites des cellules mitrales et des cellules à panache. Notons qu'au microscope électronique, les axones des neurones olfactifs apparaissent denses aux électrons et leurs terminaisons remplies de

vésicules synaptiques. De ce fait, deux zones ont grossièrement été nommées « zone des fibres olfactives » (dense aux électrons) et « zone sans fibres olfactives » (perméable aux électrons). Cependant, malgré l'apparente simplicité de cette organisation cellulaire, de nombreuses sous-catégories cellulaires sont associées au glomérule rendant difficile leur identification par microscopie électronique. Par exemple, les prolongements de certains types de cellules périglomérulaires sont retrouvés dans les deux zones (Kosaka et Kosaka, 2005).

Au niveau fonctionnel, lorsqu'un stimulus olfactif est transmis au niveau du glomérule par l'axone d'un neurone récepteur olfactif, des potentiels postsynaptiques excitateurs glutamatergiques (Liu et coll., 1989 ; Sassoe-Pognetto et coll., 1993) dépolarisent les dendrites des cellules mitrales et des cellules à panache, par l'intermédiaire de récepteurs AMPA/kainate et NMDA. La présence de ces deux types de récepteurs du glutamate suggère que la réponse pourra être rapide ou lente respectivement, favorisant ainsi une certaine plasticité synaptique. Un rétrocontrôle est possible via des cellules périglomérulaires qui inhibent les axones des neurones récepteurs olfactifs par libération de GABA et dopamine. Des interactions réciproques entre les dendrites des cellules mitrales et des cellules à panache (excitatrices) avec les dendrites des cellules périglomérulaires (inhibitrices) semblent également avoir lieu (Chen et Shepherd, 2005 ; Keller et coll., 1998).

Le glomérule est donc le siège primaire de l'intégration olfactive. C'est un module cortical bien individualisé dont le rôle intégratif, grâce aux diverses interactions des cellules qui l'entourent et des prolongements qui le composent, pourrait être d'amplifier le rapport signal/bruit et ainsi de détecter spécifiquement un stimulus odorant parmi un environnement riche en stimulations olfactives (Chen et Shepherd, 2005).

3. Mémoire olfactive et apprentissage

Le cerveau présente la remarquable capacité de collecter et mémoriser à court ou long terme les informations de l'environnement afin de produire un comportement adapté à de nouvelles situations. Ces fonctions sont permises grâce à la plasticité des neurones (modifications des canaux ioniques, essentiels pour la propagation des potentiels d'action au sein même du neurone) et des synapses (modifications en présynaptique de la libération des neurotransmetteurs et/ou modifications des récepteurs postsynaptiques), c'est-à-dire leur aptitude à changer dans le temps leurs propriétés de traitement de l'information (Daoudal et Debanne, 2003). La perception olfactive est largement dépendante des mécanismes de mémorisation et d'apprentissage, grâce non seulement à la plasticité synaptique au niveau du

glomérule, mais également du cortex piriforme antérieur et du cortex sensoriel (Wilson et Stevenson, 2003). Il existe de nombreuses formes de mémoire et d'apprentissage olfactif qui permettent ou renforcent les liens sociaux entre individus. Par exemple, les interactions entre congénères, comme la reconnaissance mère-petit (Moriceau et Sullivan, 2005) ou la transmission des préférences alimentaires (Galef et coll., 1988). Il est proposé que la mémorisation d'une odeur soit liée à l'augmentation de libération de glutamate et de GABA au niveau du glomérule induite par une diminution du rétrocontrôle négatif normalement exercé par les grains sur les cellules mitrales, les grains étant eux-mêmes contrôlés par des projections d'autres structures centrales (Sanchez-Andrade et coll., 2005). Au cours du développement, lorsque les connexions synaptiques se mettent en place, il existe une période sensible où, notamment chez les rongeurs dont les autres sens sont peu développés¹ à la naissance (Tilney, 1933), l'olfaction joue un rôle critique. De nombreux paradigmes comportementaux, comme le conditionnement olfactif (qui associe à un stimulus inconditionnel [le lait maternel, des caresses mimant les léchages maternels ou un choc électrique] un stimulus conditionnel [ici une odeur]), ont permis de le montrer. Par exemple, l'association de l'odeur de menthe à des stimulations tactiles périgénitales induit chez des animaux conditionnés entre 1 et 8 jours postnatal (et pas si conditionnés entre 1 et 4 jours, 8 et 14 jours postnatal ou à l'âge adulte) une préférence olfactive pour l'odeur de menthe 19 jours après (Moriceau et Sullivan, 2005). La première semaine de vie postnatale semble donc cruciale, chez les rongeurs, pour l'apprentissage de leur environnement olfactif. De plus, l'attraction pour des odeurs artificielles consommées par la mère durant la gestation et après, chez les rats, croît du 1^{er} au 6^e jour postnatal et dès le 7^e jour, cette attraction diminue significativement (Duveau et Godinot, 1988). Le bulbe olfactif, dont le développement se poursuit en période postnatale est particulièrement important dans la mise en place de ces apprentissages précoces. En effet, à cette période, les structures qui seront impliquées à l'âge adulte dans la mémorisation (hippocampe, amygdale, cortex piriforme, périrhinal et orbitofrontal) ne sont pas encore matures (Sullivan et Wilson, 2003). Enfin, notons que l'activation des récepteurs NMDA (Weldon et coll., 1997) et la synthèse de NO (Samama et Boehm, 1999) sont requises pour un apprentissage olfactif précoce normal.

Ainsi, nous concluons que le glomérule olfactif, zone synaptique par excellence, et siège d'une grande plasticité synaptique au cours du développement, est une structure judicieuse pour l'étude d'une dysconnexion synaptique potentielle chez la souris KO-STOP.

¹ Chez les rats, les réponses à des stimulations auditives apparaissent vers 8 ou 9 jours postnatals et ils ouvrent leurs yeux vers le 13^e jour postnatal.

OBJECTIFS

La schizophrénie est un trouble psychiatrique majeur, aux formes multiples, dont il est urgent de trouver les causes afin de mettre en place des stratégies thérapeutiques adaptées. Dans cette démarche, l'utilisation d'animaux modélisant tout ou partie de la pathologie est une étape incontournable. L'hypothèse physiopathologique actuelle suppose des dysconnexions cortico-corticales, où la synapse serait l'élément principalement perturbé. La souris KO-STOP présente des anomalies synaptiques et des troubles comportementaux lui conférant un phénotype adapté à l'étude de la schizophrénie et en particulier de potentielles dysconnexions synaptiques. Ces anomalies synaptiques n'ayant été recherchées que dans l'hippocampe, nous avons émis l'hypothèse qu'elles seraient présentes dans l'ensemble des synapses du système nerveux central. Pour tester cette hypothèse, nous avons souhaité examiner une autre zone synaptique où les perturbations entraînées par l'absence de STOP auraient été les plus importantes possible, tant au niveau morphologique que fonctionnel.

Nous avons donc commencé par rechercher si la protéine STOP, ubiquitaire, est exprimée plus fortement dans certaines régions plutôt que d'autres et si les régions cérébrales activées au cours d'une situation comportementale simple pouvaient être corrélées à ces régions de plus forte expression. Une fois la région d'intérêt déterminée, à savoir la synapse principale du système olfactif, nous y avons recherché de potentielles perturbations synaptiques.

Sur le plan fonctionnel, nous avons tenté de mettre au point un test comportemental de renforcement synaptique (conditionnement olfactif positif précoce). Nous avons réalisé ce test en premier lieu chez le Rat, pour lequel ce type de comportement a déjà bien été mis en évidence, dans la perspective de l'utiliser ensuite chez la souris KO-STOP. Il faut noter que chez la souris, très peu d'études de conditionnement olfactif précoce ont été publiées. Ce test devant être réalisé chez le nouveau-né, nous avons préalablement recherché si la protéine STOP est exprimée dans le système olfactif au cours du développement. Sur le plan morphologique, nous avons examiné l'expression de marqueurs synaptiques pour tenter de détecter des modifications de la densité synaptique, de la pousse axonale, ou des interactions avec les cellules gliales au sein de cette synapse. L'examen ultrastructural a également été réalisé.

MATERIELS ET METHODES

Animaux

1. Hébergement

Les rats et souris utilisés dans les expériences sont hébergés dans l'Animalerie Centrale de la Faculté de Médecine de Strasbourg (agrément n°A67-482-8). La température de l'animalerie est maintenue à 22°C et le cycle photopériodique est de 12h de lumière puis 12h d'obscurité. La nourriture et l'eau sont disponibles *ad libitum*.

2. Rats

Des ratons Wistar ou Sprague-Dawley âgés de 6 à 12 jours postnatals ont été utilisés dans les expériences de comportement. Ils sont issus de femelles mises en reproduction après contrôle du proœstrus par frottis vaginaux. La gestation est confirmée le matin suivant la mise au mâle par l'observation de spermatozoïdes dans les frottis vaginaux. Les mâles reproducteurs et les femelles gestantes sont isolés.

3. Souris

a. Origine

Les souris adultes et les femelles gestantes STOP +/- sont fournies par l'unité INSERM 366 de Grenoble pour toutes nos études. La majeure partie d'entre elles sont issues d'un fond hybride (BALBc x 129 SvPas) et quelques unes sont issues d'un fond pur (129 SvPas x 129 SvPas). Les souris sont hébergées à 6 ou 8 par cage, exception faite des femelles gestantes qui sont isolées.

b. Génotypage

Le génotypage est effectué à Grenoble sur un fragment de queue en détectant l'allèle ciblé par PCR : l'oligo Neo et l'oligo1 STOP, et l'allèle « sauvage » en utilisant l'oligo 2 STOP et l'oligo 3 STOP (*cf.* Tableau 4). A 10 jours pré-natals, les fœtus sont trop petits et fragiles pour réaliser le prélèvement nécessaire. Ce sont donc les immunocytochimies contre lacZ ou STOP qui permettent d'en déterminer le génotype, respectivement homozygote pour

la mutation ou « sauvage », et hétérozygote pour la mutation si les deux antigènes sont retrouvés chez le même animal.

Neo	GGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTG
Oligo1 STOP	AGTCTCACCTGTAAGAGCTGCTTACTG
Oligo2 STOP	GGCTCCYCCAGCACCTCCGGGYCCCG
Oligo3 STOP	AGAGTCGGATGCAGTTGCCCGGGCAACA

Tableau 4 : Séquences oligonucléotidiques utilisées pour le génotypage par PCR.

Expériences réalisées

Voici les différentes expériences menées dans ce travail de thèse. Dans cette partie, nous présentons rapidement l'objectif de chaque expérience, ainsi que les animaux et les techniques utilisés. Les techniques, tant comportementales que d'analyse, sont détaillées dans la partie suivante.

1. Expressions de STOP et lacZ

Dans ces expériences, nous avons recherché les zones d'expression de la protéine STOP ainsi que celles de son gène rapporteur lacZ dans le système nerveux central de souris. Nous avons réalisé des immunocytochimies sur 39 souris adultes (2-6 mois) dont deux (1 +/-, 1 -/-) issues d'un fond pur. Parmi ces 39 animaux, 3 souris « sauvages » (+/+), 8 souris hétérozygotes pour la mutation (+/-) et 8 souris homozygotes pour la mutation (-/-) ont servi à l'étude de l'expression du gène rapporteur lacZ et 13 +/+, 7 -/- à l'étude de celle de la protéine STOP. Les niveaux d'expression de lacZ et les localisations de cette expression ont été estimés semi-quantitativement. Nous avons également examiné l'expression de lacZ par immunocytochimie chez des animaux quelques jours après la naissance. Pour cela, 9 souris gestantes ont été utilisées pour l'obtention d'animaux à différents stades du développement postnatal : à la naissance (P1 ; 2 +/+, 6 +/-, 2 -/- ; 3 portées), à 6 (P6 ; 3 +/+, 4 +/-, 3 -/- ; 4 portées) et 9 jours postnatals (P9 ; 2 +/+, 5 +/-, 2 -/- ; 2 portées).

2. Expression de Fos

Dans cette expérience, nous avons recherché les zones d'activité neuronale au cours d'un test comportemental simple : le rassemblement des petits au nid. Quarante-cinq (15 +/+ ; 15 +/- ; 15 -/-) souris mâles sur fond hybride de 2-3 mois et une centaine de petits âgés de 1 à 4 jours de parenté indifférente ont été impliqués dans ce test. L'examen du cerveau a été faite par immunocytochimie du produit du gène *c-fos* sur des sous-groupes de 7 souris +/+ et 9

souris *-/-*. Le dénombrement de cellules Fos positives a été réalisé par la méthode du comptage d'objets.

3. Expression prénatale de protéine STOP dans le système olfactif

Nous avons recherché l'expression de protéine STOP dans le système olfactif à différents stades de développement prénatal. Sept souris gestantes ont permis d'étudier par immunocytochimie le système olfactif à 10 (F10 ; 1 *+/+* ou *+/-*, 1 *-/-* ; 1 portée), 11 (F11 ; 1 *+/+*, 1 *-/-* ; 1 portée), 14 (F14 ; 2 *+/+*, 1 *-/-*), 15 (F15 ; 2 *+/+*, 2 *-/-* ; 2 portées) et 17 jours prénatals (F17 ; 2 *+/+*, 2 *-/-* ; 2 portées).

4. Mise au point du test de conditionnement olfactif

Nous avons tenté de mettre au point un test de conditionnement olfactif chez des rats afin de pouvoir l'utiliser ultérieurement chez la souris KO-STOP. Le conditionnement chez les rats Wistar ayant été particulièrement difficile à réaliser, une autre souche de rats a également été utilisée. Deux cent cinquante-deux rats, Wistar (71) ou Sprague-Dawley (181), de 6 à 12 jours postnatals ont été conditionnés. Le conditionnement a été vérifié à l'aide d'un test de double-choix. Afin de tester certains paramètres de ce paradigme, nous avons fait passer le test de double-choix à 44 rats Sprague-Dawley supplémentaires.

5. Analyse du glomérule olfactif

Afin de savoir si le glomérule olfactif de la souris KO-STOP est perturbé, nous avons réalisé des mesures morphologiques et des mesures de quantité d'expression par densitométrie de marqueurs donnés. Les bulbes olfactifs de souris âgées de 2-3 mois (11 *+/+*, 10 *-/-*) ou 1 an (8 *+/+*, 7 *-/-*) ont été analysés. Nous avons également examiné au microscope électronique les glomérules de 24 souris (12 *+/+*, 12 *-/-*), dont la moitié sur fond pur.

Tests comportementaux

1. Test de rassemblement des petits au nid

Ce test permet d'examiner la capacité d'animaux adultes à rassembler des petits dans un nid.

Un jour avant le test comportemental, on donne aux mâles ayant été isolés un morceau de coton pour qu'ils construisent un nid. Le lendemain, les animaux sont déplacés dans une

pièce d'expérimentation et laissés 10 min pour habitude à ce nouveau contexte. Chaque mâle est ensuite exposé pendant 45 minutes à 3 petits que l'on place dans 3 coins, éloignés du nid, de la cage. L'expérimentateur est ganté lorsqu'il manipule les petits. Le nombre de petits ramenés vivants au nid et le nombre de petits tués est comptabilisé pour chaque mâle.

Une fois les petits retirés, les mâles sont laissés 2h (délais d'activation du gène *c-fos*) dans la cage avant d'être sacrifiés. Leur cerveau est délicatement et entièrement prélevé puis pesé avant d'être congelé dans l'isopentane à -20°C et conservé à la même température, afin de pouvoir ultérieurement être coupé (Tableau 5), immunomarcqué (Cf. page 52) et analysé (Cf. page 61).

2. Conditionnement olfactif et inhibition latente

Le conditionnement est un apprentissage permettant de donner à un stimulus initialement neutre une valeur positive ou négative. Cet apprentissage est réalisé par association de ce stimulus neutre (ou stimulus conditionnel ; CS) avec un autre stimulus ayant une valeur renforçatrice en soi (ou stimulus inconditionnel ; UCS¹). Ce conditionnement peut être annulé lorsqu'il est précédé d'une exposition au CS non associée à l'UCS. On parle alors d'inhibition latente.

L'ensemble de la procédure se déroule en 2 ou 3 étapes espacées d'une durée équivalente (délai : 3 ou 24h) : la pré-exposition (lorsqu'il s'agit d'inhibition latente), le conditionnement et le test (Figure 6). Pour chaque expérience, les rats (mâles et femelles indifféremment) sont répartis aléatoirement dans les groupes et pesés à chaque étape afin de contrôler si leur croissance est normale.

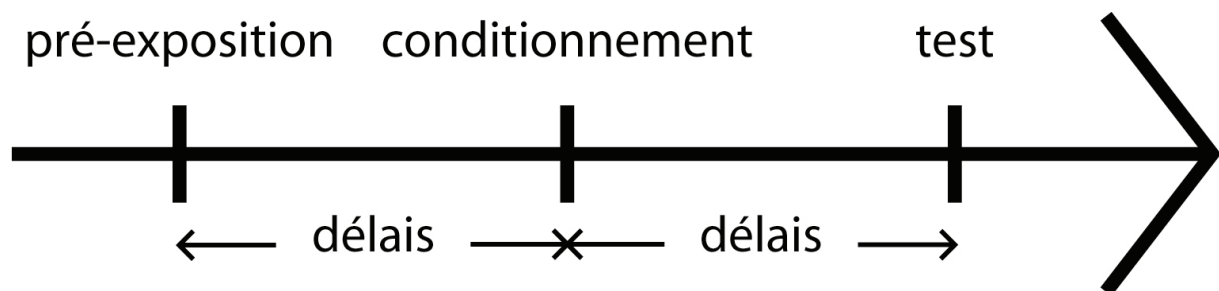


Figure 6 : Schéma de conditionnement des rats

- Conditionnement

Au cours du conditionnement, les rats sont placés sous une hotte dans un Büchner en porcelaine de 15 cm de diamètre (Figure 7). L'utilisation d'un Büchner en porcelaine permet un nettoyage aisé, afin notamment d'éviter la persistance des odeurs entre 2 animaux testés.

¹ Abréviation de l'expression anglaise « unconditioned stimulus » signifiant « stimulus inconditionnel ».

Dans son embouchure est inséré un coton odorisé qui correspond au CS : menthe (Pharmacie de la Tour, Strasbourg-Neudorf) diluée au ¼ dans de l'huile minérale ou citral (Sigma-Aldrich) pur mais en quantité variable. Ces odeurs ont été choisies car elles ont été utilisées au cours des premiers travaux sur le conditionnement chez le Rat (Sullivan et Leon, 1987 ; Sullivan et coll., 1994). La température de la pièce d'expérimentation est de 24°C. L'UCS (10 minutes), absent dans les groupes témoins, consiste en des stimulations tactiles au pinceau doux de la queue, des zones ano-génitales, du dos et des pattes arrière des petits, mimant ainsi les léchages maternels. Lors de ces stimulations, l'expérimentateur est derrière la vitre de la hotte, seuls ses avant-bras et ses mains, gantées, sont à proximité de l'animal. A la fin du conditionnement, les petits retournent dans la cage avec leur mère.



Figure 7 : Illustration de stimulations tactiles au pinceau du dos d'un raton de 6 jours lors de l'étape de conditionnement olfactif

- Pré-exposition

La pré-exposition consiste à mettre, avant le conditionnement, les animaux dans le même contexte que lors du conditionnement, mais sans UCS.

3. Test de double-choix olfactif

Le test, dit de « double-choix » olfactif, permet d'évaluer la valeur positive ou négative d'un stimulus olfactif. En effet, dans ce test, l'animal a le choix de passer du temps au-dessus d'un compartiment odorisé et/ou au-dessus d'un compartiment neutre (contenant de la litière propre). Le temps passé par l'animal au-dessus de ces compartiments, de même taille, permet de déterminer la valeur que le stimulus olfactif a pour lui (attractif, aversif ou neutre, respectivement). Le test se déroule dans une boîte de 210x200x180 mm dont le fond est constitué d'un compartiment amovible (unique ou double, dans ce cas séparé d'1 cm) contenant de la litière (odorisée ou non). Ce compartiment est glissé sous un grillage serré, évitant ainsi tout contact entre le raton et les stimuli olfactifs (Figure 8). Un pré-test de 2 minutes où le raton est placé au-dessus d'un compartiment unique avec de la litière intacte le familiarise avec la situation expérimentale. Il est suivi d'un test de 5 minutes durant lequel le petit explore les 2 compartiments, l'un où la litière contient le CS (odeur), l'autre où elle est intacte.

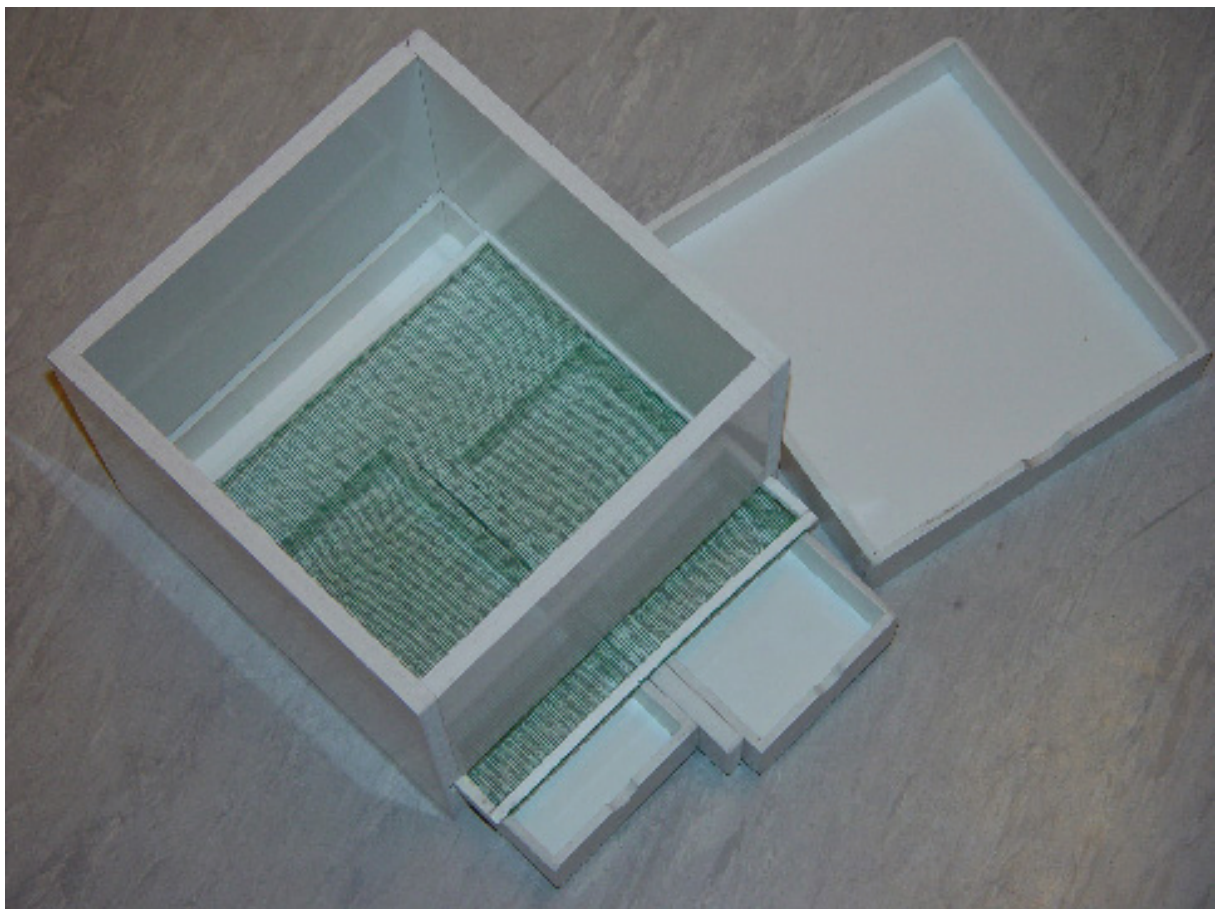


Figure 8 : Boîte de « double-choix ». Les deux compartiments (tiroirs) se glissent sous la grille sur laquelle le raton peut explorer les odeurs, sans avoir aucun contact tactile avec eux.

Une caméra analogique, placée au-dessus de la boîte d'expérimentation, enregistre l'ensemble du test (7 min). Les films du test de « double-choix » obtenus sont analysés en aveugle en mesurant le temps passé par les animaux avec le bout du museau au-dessus du compartiment contenant le CS.

Techniques histologiques

Afin de pouvoir analyser les cerveaux des animaux étudiés, les techniques histologiques ont été utilisées dans toutes nos expériences, excepté celles du conditionnement et test de double-choix olfactif, dont les résultats ne justifiaient pas une analyse plus poussée.

L'ordre de prélèvement des tissus, le choix des coupes ainsi que la place des lames dans les tubes Borel ou l'ordre de manipulation des coupes flottantes sont randomisés pour éviter tout biais.

1. Prélèvement de tissus

a. Pour la microscopie photonique

Les animaux sont anesthésiés par hypothermie sur de la glace (animaux au stade postnatal P1) ou par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (P6, P9 et adultes) et perfusés par injection transcardiaque de paraformaldéhyde 4% dans du tampon phosphate (PFA). Les cerveaux ou les foetus sont entièrement et délicatement prélevés et post-fixés dans le PFA ou dans le liquide de Bouin¹. Puis ils sont coupés au vibratome (postfixation PFA) ou au microtome (postfixation Bouin). Dans ce dernier cas, ils ont été préalablement déshydratés puis inclus dans la paraffine. Pour les détails voir l'encadré « Microscopie optique : prélèvement et préparation des tissus ».

b. Microscopie électronique

Pour l'étude en microscopie électronique, les animaux sont anesthésiés par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique puis perfusés par injection transcardiaque de glutaraldéhyde 5% dans du tampon cac. Les cerveaux sont entièrement et délicatement prélevés et les bulbes, après découpe en très petites régions, sont post-fixés dans la glutaraldéhyde, avant d'être préparés pour la microscopie électronique (coupes ultrafines de

¹ Ces fixateurs ont été choisis car ils donnent les meilleurs résultats lors des traitements immunocytochimiques ultérieurs.

moins de 90 nm). Pour les détails, voir les encadrés « Microscopie électronique : prélèvement et préparation des tissus ».

Microscopie optique : prélèvement et préparation des tissus

Produits

Sodium dihydrogénophosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$)
Di-sodium hydrogénophosphate dihydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$)
Chlorure de sodium (NaCl)
Pentobarbital sodique
Héparine
Isopentane (2-méthyl-butane)
Paraformaldéhyde (PFA)
Acétate de cuivre
Acide picrique
Formol 37%
Acide acétique
Alcool
Toluène
Paraffine avec DMSO

Solutions

SERUM PHYSIOLOGIQUE HEPARINE :
154 mM NaCl
0,2% Héparine

TAMPON PHOSPHATE (PB) 0,1 M :
81 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$
19 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$

PFA 4% :
4% paraformaldéhyde pur dans PB 0,1 M
Dissoudre à 70°C avec agitation
Dépolymériser totalement avec quelques gouttes de NaOH 2M si besoin

LIQUIDE DE BOUIN HOLLANDE :
2,5% acétate de cuivre
4% acide picrique
10% formol 37%
1,5% acide acétique

Protocoles de prélèvement des tissus

AVEC FIXATION :

A PN1, l'animal est anesthésié par hypothermie dans la glace

A PN6, 9 et à l'âge adulte (souris gestantes comprises), l'animal est anesthésié par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (90 mg/Kg)

On réalise une injection transcardiaque de 5 mL de sérum physiologique hépariné immédiatement suivie de 30 mL de PFA 4%

Le cerveau ou les fœtus sont délicatement prélevés et post-fixés pendant 24h dans le PFA 4% ou dans le liquide de Bouin (48 à 72h)

SANS FIXATION :

L'animal est sacrifié par overdose d'anesthésique

Le cerveau est prélevé délicatement

L'isopentane, préalablement placé à -80°C, est réchauffé jusqu'à -20°C

Le cerveau est placé dans l'isopentane pendant 1' puis conservé au congélateur à -20°C

Protocole d'inclusion

EN PARAFFINE (POUR COUPES AU MICROTOME) :

H_2O 24h

Alcool 70° 12h

Alcool 95° 2x1h

Alcool 100° 2x2h

Toluène 2x1h

Paraffine 12h

Conservation à température ambiante

DANS L'AGAROSE (POUR COUPES AU VIBRATOME) :

Chauffer jusqu'à ébullition une solution d'agarose à 0,2%

Appliquer sur la pièce à couper

Laisser refroidir et solidifier

Microscopie Electronique : prélèvement et préparation des tissus (1/2)

Produits

Pentobarbital sodique
Glutaraldéhyde (solution aqueuse à 25%)
Cacodylate de sodium trihydraté
Tétroxyde d'osmium (1g)
Oxyde de propylène
Milieu d'inclusion Epoxy
Durcisseur DDSA
Durcisseur MNA
Accélérateur DMP30
Bleu de toluidine
Tétraborate de sodium décahydraté
Acétate d'uranyl
Nitrate de plomb
Citrate de sodium

Solutions

TAMPON CACO 0,1 M :
100 mM de Cacodylate de sodium trihydraté
Ajuster le pH à 7,4 avec de l'acide chlorhydrique

SOLUTION DE PERFUSION :
5% glutaraldéhyde dans du tampon Caco 0,1 M

SOLUTION D'ACIDE OSMIQUE 1% :
Nettoyer une ampoule d'1g de Tétroxyde d'osmium
La faire éclater sous hotte avec une baguette
chauffée au rouge (cassure nette sans éclats) dans le
volume d' H_2O_d désiré
Laisser 48h dans H_2O_d

RESINE D'INCLUSION EPOXY (MELANGE
D'OXYDE DE PROPYLENE ET D'EPON) :
50% de milieu d'inclusion Epoxy
10% de durcisseur DDSA
40% de durcisseur MNA
Bien mélanger
2% d'accélérateur DMP30

SOLUTION DE BLEU DE TOLUIDINE :
1% de bleu de toluidine
1% de tétraborate de sodium décahydraté

SOLUTION D'ACETATE D'URANYL :
8% d'acétate d'uranyl dans de l'alcool à 50°
(saturation)

SOLUTION DE CITRATE DE PLOMB :
4,284% de nitrate de plomb
2,648% de citrate de sodium
Laisser reposer le précipité blanc 10' puis ajouter
16% de NaOH 1N
Centrifuger

Protocole de prélèvement et inclusion

Anesthésie de l'animal par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (90 mg/Kg)
Injection transcardiaque de 5 mL de sérum physiologique hépariné immédiatement suivie
de 30 mL de solution de perfusion
Prélèvement délicat du cerveau, découpe des bulbes olfactifs en très petites régions et
post-fixation pendant 1h dans la solution de perfusion
Lavage tampon Caco 2x15'
Acide osmique (fixe les lipides) 2h
Lavage tampon Caco 2x15'
Déshydratation à l'alcool à 50° (15'), 70° (15'), 80° (15'), 95° (15') et 100° (4x15')
Oxyde de propylène 3x10'
Résine d'inclusion EPOXY 24h à 4°C
Epon 12h à 4°C

Microscopie Electronique : prélèvement et préparation des tissus (2/2)

Protocole de préparation des coupes

Taille des blocs (TM60, Reichert, Autriche)

Coupes semi-fines (700 nm environ) au couteau diamant-histo (8 mm, 45°, Drukker, Harris Int. NY, USA, réf. 45H0692) pour ultramicrotome (Ultracut R, Leica Instruments, Allemagne).

Collage 70°C pendant 30'

Coloration à 70°C à la solution de bleu de toluidine (1 goutte pendant 2')

Rinçage et séchage 70°C

Choix des coupes et des zones intéressantes

Coupes ultrafines (60-90 nm) au couteau diamant (3mm, 45°, Drukker, Harris Int. NY, USA, réf. 452999) récupérées sur des grilles cuivre-rodhium (Grille Maxtaform, 2000 carrés, Euromedex, Strasbourg, France, réf. M200-CR)

Contrastage avec une solution d'acétate d'uranyl 10' au noir

Rinçage alcool 50°

Rinçage H₂O_d et séchage avec du papier filtre

Coloration avec une solution de citrate de plomb 1'

Rincer à l'H₂O_d

Laisser sécher

2. Immunocytochimie

Les coupes (Tableau 5) réalisées sont coronales, sauf dans le cas des fœtus où elles sont sagittales.

Appareil	Epaisseur	Immunocytochimies réalisées
Vibratome (VT1000S, Leica Instruments, Allemagne)	40 µm	lacZ [synaptophysine, GAP43, GFAP, OMP]
Microtome (Jung Autocut 2055, Leica Instruments, Allemagne)	5 µm	STOP
Cryostat (CM3050, Leica Instruments, Allemagne)	20 µm	c-fos

Tableau 5 : Appareils de coupes histologiques, leurs caractéristiques et le paramètre d'épaisseur utilisé pour chaque immunocytochimie.

Protocole de collage sur lames de coupes en paraffine

Produits

Gélatine en poudre : Merck, Darmstadt, Allemagne (réf. 4070.0500)
Alun de chrome : Prolabo, Paris, France (réf. 21090)
Lames : Star Frost (Knittel Glaser) 76x26 mm

Solutions

SOLUTION DE COLLAGE :
H₂O_d
0,25% gélatine
0,075% alun de chrome
55'' au micro-onde à 950 W
Refroidissement à l'eau courante

Protocole

Une grosse goutte de solution de collage est préparée sur chaque lame.
Les rubans sont délicatement déposés à plat sur la goutte.
Les lames sont placées sur plaque chauffante (à 58°C, point de fusion de la paraffine).
Quand la paraffine est bien étalée, la solution de collage est évacuée pour laisser adhérer la paraffine et les tissus sur la lame.
Les lames sont placées à l'étuve à 58°C quelques jours avant utilisation.

Les coupes (flottantes pour celles coupées aux vibratome ou préalablement collées sur lames pour celles coupées au cryostat ou au microtome ; voir encadré « Protocole de collage sur lame de coupes en paraffine ») sont incubées dans l'anticorps primaire (Tableau 6) toute la nuit à 4°C ou 2h à température ambiante. Après blocage des peroxydases endogènes avec de l'eau oxygénée, l'incubation dans un anticorps secondaire biotinylé (Tableau 6) est suivie d'une réaction d'amplification avec le complexe peroxydase-streptavidine ou avidine-biotine. La révélation par la 3,3'-diaminobenzidine, la DAB-Nickel ou le kit VIP, fait apparaître un précipité respectivement brun, noir ou rose lorsque l'antigène est présent (Figure 9). Pour les détails, voir les encadrés « Immunocytochimie ».

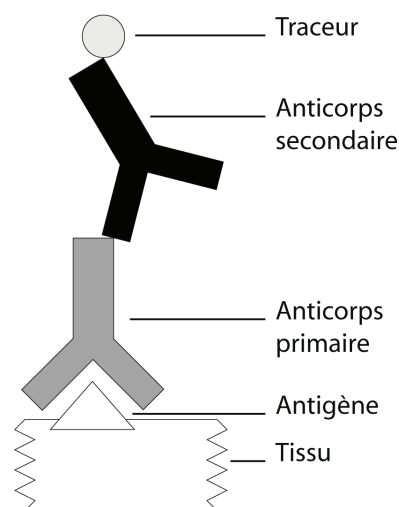


Figure 9 : Schéma de la réaction immunocytochimique. Dans nos expériences le traceur est enzymatique ou fluorescent

Pour les doubles-marquages, après incubation dans les deux anticorps primaires simultanément, la réaction est révélée par couplage avec des anticorps secondaires directement fluorescents (Tableau 7).

<u>Immunocytochimie (1/2)</u>	
<i>Produits</i>	<i>Solutions</i>
Sodium dihydrogénophosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$)	TAMPON PHOSPHATE (PB) 0,1 M :
Di-sodium hydrogénophosphate dihydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$)	81 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$
Sodium Chlorure (NaCl)	19 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$
Tween20	PBS-TRITON :
Triton X-100	10% de PB 0,1 M
Sérum Normal de Cheval	0,9% de NaCl
Dakopen	0,2% de Triton X-100
H_2O_2 30%	PBS-TWEEN :
Kit d'anticorps secondaires biotynilés	10% de PB 0,1 M
Streptavidine-Peroxydase (HorseRadish Peroxydase)	0,9% de NaCl
Kit Vectastain Avidine-Biotine	0,2% de Tween20
3,3'-diaminobenzidine (DAB)	H_2O_2 3% :
Nickel 0,5%	0,5% de H_2O_2 30%
VIP	SOLUTION BLOQUANTE :
Vert de méthyl	1,5% Sérum Normal de Cheval dans du PBS-Triton
Lamelles : 24x50 mm CML ou 24x40 mm Menzel-Glaser	DAB :
Toluène	1 pastille dans 10 mL d' H_2O_a
Eukitt	Activer juste avant utilisation avec 50 μL d' H_2O_2 3%
	DAB-Ni :
	DAB + 10 μL de Nickel 0,5%
 <i>Protocole pour coupes flottantes</i>	
PBS-Triton 3x10'	
[si l'anticorps primaire utilisé est un anticorps monoclonal de souris :	
Blocage 1h des immunoglobulines de souris (Ig)	
PBS-Triton 3x10']	
Ac I dilué dans la solution bloquante 16 à 19h (3h à T°C ambiante puis le reste à 4°C)	
PBS-Triton 3x10'	
H_2O_2 3% 30'	
PBS-Triton 3x10'	
Ac II-biotinylé dilué dans la solution bloquante 2,5 à 4h	
PBS-Triton 3x10'	
Complexe peroxidase-streptavidine (1/200 ^{ème}) 30' ou Kit avidine-biotine (1/50 ^{ème}) 45'	
PBS-Triton 3x10'	
DAB ou VIP 4 à 8'	
Contre-coloration du VIP au Vert de méthyl 1' (facultatif)	
Tampon phosphate 0,1 M (1 ou 2 jours maximum)	
Montage des coupes sur lames dans du tampon phosphate 0,01 M	
Séchage 30' sur plaque chauffante ou la nuit à température ambiante	

Immunocytochimie (2/2)

Protocole pour coupes sur lames

[*si les coupes sont en paraffine :*

Déparaffinage (10' x 2 Toluène ; 10' Alcool 100° ; 5' H₂O)

Démasquage (5'' x 2 Micro-onde dans Citrate de Na ; 20' refroidissement)]

H₂O 5'

Cerclage au DakoPen

PBS-Tween 5'

[Blocage 1h des immunoglobulines de souris (Ig)

PBS-Tween 5']

Ac I dilué dans la solution bloquante (14h à T°C ambiante ou 24 à 72h à 4°C)

PBS-Tween 5'

H₂O₂ 15'

PBS-Tween 5'

Ac II-biotine 1h

PBS-Tween 5'

Complexe peroxidase-streptavidine (1/200^{ème}) 30' ou Kit avidine-biotine (1/50^{ème}) 45'

PBS-Tween 5'

DAB ou DAB-Ni ou VIP 4 à 8'

H₂O 5'

Contre-coloration du VIP au Vert de méthyl 1' (facultatif)

Séchage 30' sur plaque chauffante ou la nuit à température ambiante

Toluène 3x5'

Montage des lamelles sur lames avec Eukitt (ou Aquamount *si fluorescence*) et annotations

Ag ciblé	Hôte	Type d'Ac	Fabricant	Dilution	Ag ciblé par l'Ac secondaire	Hôte	Fabricant	Dilution
neuN	Souris	Monoclonal	Chemicon International, Temecula CA, USA (réf. MAB377)	1/1000	Ig de souris			1/200
c-fos			Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA, USA (réf. SC52)	1/500				1/400
β -galactosidase ¹			Rockland, Gilbertsville PA USA (réf. 100.41.36)	1/5000				
STOP ²		Polyclonal	INSERM U366, CEA, Laboratoire du cytosquelette, Grenoble, France	1/5000				
Synaptophysine	Lapin		DakoCytomation, Glostrup, Danemark (réf. A0010)	1/1000	Ig de lapin	Chèvre	Vector Laboratories, Burlingame CA, USA	1/200
GFAP			DakoCytomation, Glostrup, Danemark (réf. Z0334)	1/5000				
Synaptophysine		Monoclonal	NeoMarkers, Fremont CA, USA (réf. RM-9111-SO)	1/400				
GAP43			G9264	1/5000				
OMP	Chèvre	Polyclonal	Wako Chemicals, Richmond VA, USA (réf. 54410001)	1/10000	Ig de chèvre	Cheval	Vector Laboratories, Burlingame CA, USA (réf. BA9500)	1/500

Tableau 6 : Spécifications des anticorps utilisés lors des immunocytochimies avec chromogène. Ag = antigène ; Ac = anticorps.

¹ Notons que la β -galactosidase est une enzyme qui se dégrade rapidement après prélèvement des tissus. Il est donc important de réaliser l'immunocytochimie moins de 24h après prélèvement.

² Deux anticorps (« 23N » et « 23C ») sont dirigés contre des peptides non chevauchants correspondant aux parties N-terminale et C-terminale respectivement de la région centrale (Denarier et coll., 1998b). Ils reconnaissent donc toutes les isoformes de STOP.

Antigène ciblé	Hôte	Type d'Ac	Référence	Fabricant	Dilution	Ag ciblé par l'Ac secondaire	Hôte	Fabricant	Dilution
β-galactosidase	Lapin	Polyclonal	100.41.36	Rockland, Gilbertsville PA, USA	1/200	Ig de lapin	Chèvre	Alexa fluor, Molecular Probes, Invitrogen, Cergy Pontoise, France	1/200
neuN	Souris	Monoclonal	MAB377	Chemicon International, Temecula CA, USA	1/100	Ig de souris	Chèvre	Alexa fluor, Molecular Probes, Invitrogen, Cergy Pontoise, France	1/200
Synaptophysine	Souris	Monoclonal	MAB368	Sigma-Aldrich, Saint-Louis MO, USA	1/100				
GAP43	Souris	Monoclonal	G9264	Sigma-Aldrich, Saint-Louis MO, USA	1/400				

Tableau 7 : Spécification des anticorps utilisés lors de l'immunocytochimie par fluorescence. Ag = antigène ; Ac = anticorps.

Analyses d'images

1. Analyse semi-quantitative de l'expression de β -galactosidase

Les images issues du microscope optique sont enregistrées avec une caméra digitale (DS-L1, Nikon), converties en niveaux de gris et ajustées (luminosité, contraste) à l'aide du logiciel ImageJ (NIH)¹. La délimitation générale des structures est basée sur l'atlas du cerveau de Souris de Franklin et Paxinos (1997) et celle des structures olfactives sur la description de Shipley et collaborateurs (2004) (Franklin et Paxinos, 1997 ; Shipley et coll., 2004). Pour chaque structure analysée, nous estimons (absence, faible, moyen, fort) la densité et/ou l'intensité du marquage.

2. Comptage d'objets - Dénombrement de cellules Fos positives

Le principe du comptage automatisé dit « d'objets » est de dénombrer les éléments d'intérêt dans une image. Pour cela, l'utilisateur doit définir un ensemble de paramètres (intensité, contraste, seuillages pour la lumière ; nombre de pixels, forme, taille des objets...) permettant au logiciel de repérer ces éléments dans l'image.

Dans ce travail, nous nous intéressons au nombre de cellule Fos positives. Ces cellules sont facilement repérables comme *objets* par le logiciel car leur noyau (marqué par la technique d'immunocytochimie) est très sombre comparativement au reste de la coupe (Figure 10).

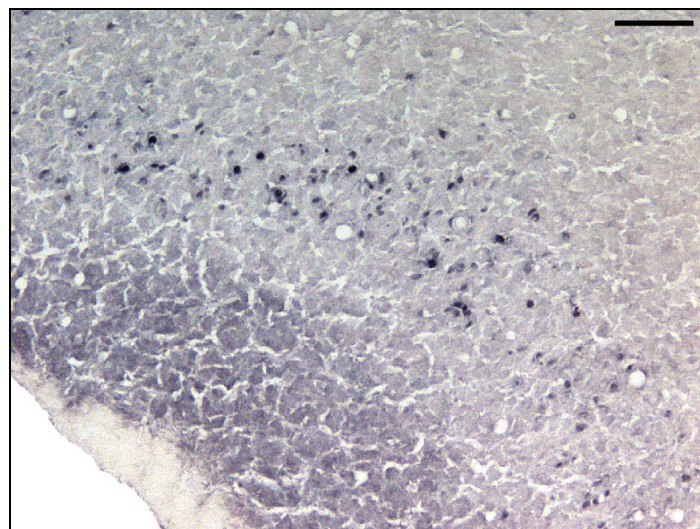


Figure 10 : Immunocytochimie de la protéine Fos d'une coupe de cerveau de souris au niveau du cortex piriforme. Echelle : 100 μ m.

¹ Logiciel gratuit et libre de droits à télécharger sur <http://rsb.info.nih.gov/ij/>

Le logiciel utilisé est MCID (MCID Analysis v7.0, Imaging Research, Canada). Il permet d'analyser des structures de très grande taille grâce à un module motorisé permettant de reconstituer des images à partir de plusieurs forts grossissements (x100). Le nombre d'objets est déterminé (i) par seuillage grâce aux paramètres colorimétriques (ici [225-279,84] de teinte, [0-1] de saturation et [0-0,608] de luminosité) limitant ainsi l'analyse aux parties de l'image correspondant à l'immunomarquage et (ii) par détermination des caractères morphologiques d'un objet moyen (ici 20 μm de taille moyenne et une aire comprise entre 8 et 50 μm^2). Le nombre d'objet est rapporté à une surface examinée ; les résultats sont donc exprimés en *densité cellulaire* (nombre de cellule par mm^2).

L'immunoréactivité Fos est examinée dans des régions impliquées dans l'agressivité et le comportement parental et des régions exprimant le gène rapporteur lacZ. Chaque structure analysée est localisée précisément à l'aide de l'atlas stéréotaxique de Souris de Franklin et Paxinos (1997) (Figure 19). Les mesures sont réalisées par structure et par animal sur 3 coupes distantes de 100 μm .

3. Mesures morphométriques

Les images issues du microscope optique sont enregistrées avec une caméra digitale (DS-L1, Nikon). Les mesures morphométriques sont réalisées avec le logiciel ImageJ préalablement calibré à l'aide d'une lame micrométrique. Les zones examinées sont détournées précisément puis mesurées.

4. Densité optique - Quantité d'expression de marqueurs dans le glomérule olfactif

La densité optique (ou densitométrie, ou absorbance) est la propriété d'une substance matérielle de diminuer l'intensité d'un faisceau lumineux qui la traverse. Nous avons choisi d'utiliser cette propriété pour évaluer quantitativement l'intensité d'expression d'une protéine donnée sur une coupe de tissu. En effet, lorsqu'une préparation est installée sur un microscope photonique, on observe des zones claires et foncées selon l'absorption plus ou moins grande par le tissu des rayons lumineux. Une coupe de tissu, sans chromogène, paraîtra quasiment transparente, laissant passer presque toute la lumière émise par le microscope. Le marquage sur une coupe, foncé, ne laissera passer que très peu de lumière. Nous partons du postulat que plus la protéine est exprimée, plus la quantité de chromogène sera grande, et moins nous aurons de lumière transmise. Comme la densité optique est le logarithme décimal inverse de la transmission (elle-même le rapport de l'intensité lumineuse transmise sur l'intensité

lumineuse incidente, cf. Équation 1), plus la protéine est exprimée, et plus la densité optique sera grande.

$$DO = - \log \frac{I_{transmise}}{I_{incidente}}$$

Équation 1 : Définition de la densité optique (DO). I = intensité lumineuse

Dans les expériences où la densité optique est utilisée, nous nous intéressons à la première synapse du système olfactif facilement repérable puisque située au niveau des glomérules. De ce fait, seules les coupes contenant les glomérules de plus grande taille, soit la région 600 à 2000 μm du bulbe olfactif en partant de l'extrémité rostrale (Royet et coll., 1988), sont incluses dans l'expérience, et ce pour 1 coupe tous les 120 μm environ pour chaque marqueur considéré.

Réglage de l'illumination du microscope selon la méthode de Köhler

1. Allumer la source lumineuse
2. Ouvrir le diaphragme de la source lumineuse autant que possible
3. Ouvrir le diaphragme du condensateur autant que possible
4. Placer le condensateur à 1-3 mm de la préparation
5. Ajuster la distance inter pupilles des oculaires
6. Ajuster la luminosité si elle est trop élevée
7. Faire la mise au point sur la préparation avec les vis macro- et micro- métriques
8. Fermer complètement le diaphragme de la source lumineuse et celui du condensateur
9. En déplaçant le condensateur de haut en bas, faire la mise au point (un hexagone apparaît)
10. Centrer l'image en utilisant les vis de centrage du condensateur
11. Ouvrir le diaphragme de la source lumineuse jusqu'à ce que le champ soit juste complètement illuminé (pas plus)
12. Retirer un oculaire et regarder le plan focal arrière de l'objectif
13. Ouvrir le diaphragme du condensateur jusqu'à ce que le champ soit juste aux bords de l'objectif
14. Replacer l'oculaire et ajuster la luminosité à un niveau confortable

Les photos de coupes de bulbe sont réalisées à l'aveugle dans une chambre noire après réglage de l'illumination du microscope (objectif x4) selon la méthode de Köhler (Voir encadré « Réglage de l'illumination du microscope selon la méthode de Köhler ») avec un appareil photo numérique (Coolpix 995, Nikon, Paris, France) en mode manuel (Annexe 3). Afin de paramétrer le logiciel d'analyse, une lame micrométrique est prise en photo, ainsi qu'une lame de calibrage de densité optique, contenant 11 filtres de densités neutres croissantes connues (0 ; 0,04 ; 0,24 ; 0,34 ; 0,44 ; 0,54 ; 0,64 ; 0,74 ; 0,84 ; 0,94 ; 1). La première permettra de calibrer en taille les mesures morphologiques effectuées et la seconde

permettra de convertir en densité absolue les mesures de niveaux de gris effectuées. Les données seront alors comparables à des densités obtenues dans les mêmes conditions dans d'autres laboratoires à condition qu'elles aient également été calibrées.

Une correction (« $I_{corrigée}$ », Équation 2) dite « par champ plat » (Ellenberger et Young, 2000) est appliquée à toutes les photos prises (« I_{objet} »). Elle permet de tenir compte des variations du système d'acquisition d'images provenant de la lampe du microscope et de l'appareil photo (apparition aléatoire de pixels blancs ou noirs). Pour cette correction, chaque série de photo est associée à la prise de 2 photos supplémentaires : une photo du champ du microscope sans lame (« I_{white} ») et une photo du champ sans lame ni lumière (microscope éteint ; « I_{black} »).

$$I_{corrigée} = \frac{I_{objet} - I_{black}}{I_{white} - I_{black}}$$

Équation 2 : Correction par champ plat des photos de densitométrie

Trois à 17 coupes de bulbe olfactif (1 mesure de densité optique absolue par coupe) par animal sont examinées avec le logiciel ImageJ que nous paramétrons préalablement avec les photos des lames micrométrique et de calibrage de densité optique (Annexe 4).

Statistiques

1. Statistiques descriptives

Les données issues de nos expériences sont synthétisées dans des graphiques mis en page avec Excel (Microsoft). Les effectifs y sont parfois précisés, sous la forme ($n;m;o$), avec n , m et o étant les effectifs de 3 (par exemple) groupes comparés.

Lorsque la distribution des données *suit une loi normale*, nous représentons les moyennes, ainsi que l'écart-type associé (ET). Les résultats sont exprimés sous la forme *moyenne ± ET*, convention adoptée en sciences expérimentales.

Lorsque la distribution des données *ne suit pas une loi normale*, nous représentons les médianes, ainsi que l'étendue interquartile ([quartile3 - médiane] et [médiane - quartile1] pour les barres d'erreur supérieure et inférieure, respectivement). Les résultats sont exprimés sous la forme *médiane(quartile1;quartile3)*.

2. Tests utilisés

Les données sont traitées avec le logiciel de statistique MINITAB (licence ULP). Pour tous les tests effectués, le seuil de significativité, noté α , est fixé à 5% suivant la "norme" adoptée par les statisticiens (Azaïs et Bardet, 2006). Lorsque la valeur de p est inférieure au seuil α , un astérisque est associé aux représentations graphiques. Après avoir vérifié l'homogénéité des variances avec le test de Levene pour données non paramétriques, nous testons la normalité des données avec le test de Ryan-Joiner¹, similaire au test de Shapiro-Wilk. Deux possibilités se présentent alors :

- Si la distribution des données suit une loi normale, nous vérifions l'homogénéité des variances avec le test F pour données paramétriques pour pouvoir utiliser un test paramétrique.
- Si la distribution des données ne suit pas une loi normale, nous utilisons le test non paramétrique correspondant.

La vérification des hypothèses pour toutes les expériences est synthétisée dans l'Annexe 5.

Dans les résultats, nous présentons la valeur de p ainsi que, dans la plupart des cas, la statistique de test (les abréviations utilisées sont recensées dans le Tableau 8 ; Kotz et coll., 2006).

Test	Abréviation
Ryan-Joiner	R
Test F (2 échantillons)	F
Bartlett (3 échantillons ou plus)	B
Levene	L
t de Student	t
Régression logistique	G
Test du signe	W
Mann-Whitney	U
Kruskal-Wallis	H
Friedmann	S
Wilks (MANOVA)	A

Tableau 8 : Abréviations utilisées pour les statistiques des différents tests utilisés.

En général, lorsqu'aucune différence statistiquement significative au seuil $\alpha=5\%$ n'existe (conclusion H_0), nous calculons la puissance des tests utilisés. Dans le cas des tests non paramétriques, la puissance est difficile à établir. En effet, par exemple dans le cas du test de Mann-Whitney, *un calcul grossier de la puissance est envisageable sous la condition que*

¹ Ryan et Joiner sont les créateurs de MINITAB.

la taille des échantillons soit « grande », c'est-à-dire que l'effectif de chaque échantillon soit supérieur à 25 (Pupion et Pupion, 1998). Dans nos expériences, le plus grand effectif d'un groupe étant de $n=15$, le calcul de la puissance des tests non paramétriques ne sera pas effectué.

EXPRESSION DE PROTEINE STOP DANS LE SNC DE SOURIS - RECHERCHE DE CORRELATS FONCTIONNELS

Introduction

La première étude de ce travail a consisté à rechercher les aires d'expression de la protéine STOP afin de concentrer les efforts ultérieurs sur des régions où elle est fortement exprimée. Pour cela nous avons deux possibilités en immunocytochimie : (i) examiner, chez des animaux « sauvage », l'expression de la protéine elle-même ; (ii) examiner, chez des animaux mutés, le produit du gène rapporteur lacZ, inséré à la place de la protéine. Dans ce deuxième cas, l'expression de β -galactosidase (β -gal) peut être étudiée soit par histochimie, soit par immunocytochimie. Nous avons choisi l'immunocytochimie parce qu'elle semble donner des résultats plus précis que l'histochimie (Mahony et coll., 2002 ; Pereira et coll., 2006).

Expression de protéines STOP et β -galactosidase

1. Expression de STOP

Les animaux jeunes et adultes homozygotes pour la mutation ne présentent aucun immunomarquage de protéine STOP, que ce soit dans le système nerveux central (Figure 11B) ou dans le système olfactif périphérique (Figure 12C, D), confirmant ainsi la délétion du gène. Les souris « sauvage » présentent un immunomarquage en protéine STOP dans le système nerveux central adulte (Figure 11A). Un marquage très intense est trouvé dans les fibres moussues de l'hippocampe ainsi que dans le hile du gyrus denté (Figure 11C-E). Notons que les corps cellulaires, des neurones du *stratum pyramidale* de CA3 (Figure 11D) ou des neurones de la couche granulaire du gyrus denté (Figure 11E), ne sont pas du tout marqués. Chez les animaux « sauvage », on trouve un marquage en protéine STOP diffus dans le reste du cerveau, majoritairement fibrillaire et difficilement assignable à des aires cérébrales bien définies.

Dans le système olfactif, les prolongements (dendrites, mais surtout regroupements d'axones) des neurones olfactifs principaux (Figure 12A, B, F), et accessoires (Figure 12E, G, H) sont fortement marqués. Nous avons trouvé cette expression depuis l'épithélium olfactif et l'organe voméronasal (Figure 12E, F-H) jusqu'aux bulbes olfactifs (ici les principaux : Figure

12A, B). Notons que les glomérules du bulbe olfactif ne sont cependant pas ou très peu marqués (Figure 12A, B).

2. Expression β -galactosidase

L'immunocytochimie du gène rapporteur lacZ, en revanche, donne une cartographie très précise d'aires cérébrales marquées.

a. Adulte

Les souris « sauvages » jeunes et adultes ne présentent aucun immunomarquage (Figure 13A). Les animaux homozygotes et hétérozygotes pour la mutation présentent des cartographies d'expression du gène rapporteur similaires, tant pour les animaux issus du fond hybride que pour ceux du fond pur¹. L'immunoréactivité de β -gal est synthétisée dans le Tableau 9 et illustrée sur les Figures 14 à 16. Deux types majeurs d'immunomarquage ont été mis en évidence : des corps cellulaires, et des marquages ponctiformes (« points »). Ces derniers ne colocalisent pas avec la synaptophysine ou le GAP43 comme nous le montrons dans l'hippocampe et le gyrus denté respectivement (Figure 13D-I) et sont présents à proximité des neurites (Figure 13B-C). Toutes les cellules β -gal positives expriment neuN comme montré dans le cortex (Figure 13J-L), exception faite des cellules mitrales du bulbe olfactif et des cellules de Purkinje du cervelet, qui n'expriment pas neuN comme cela a déjà été montré (Mullen et coll., 1992).

¹ Cette absence de différence entre les souris hétérozygotes et homozygotes révèle une activité du promoteur de la protéine STOP suffisamment forte pour permettre la détection du gène rapporteur dans les deux génotypes.

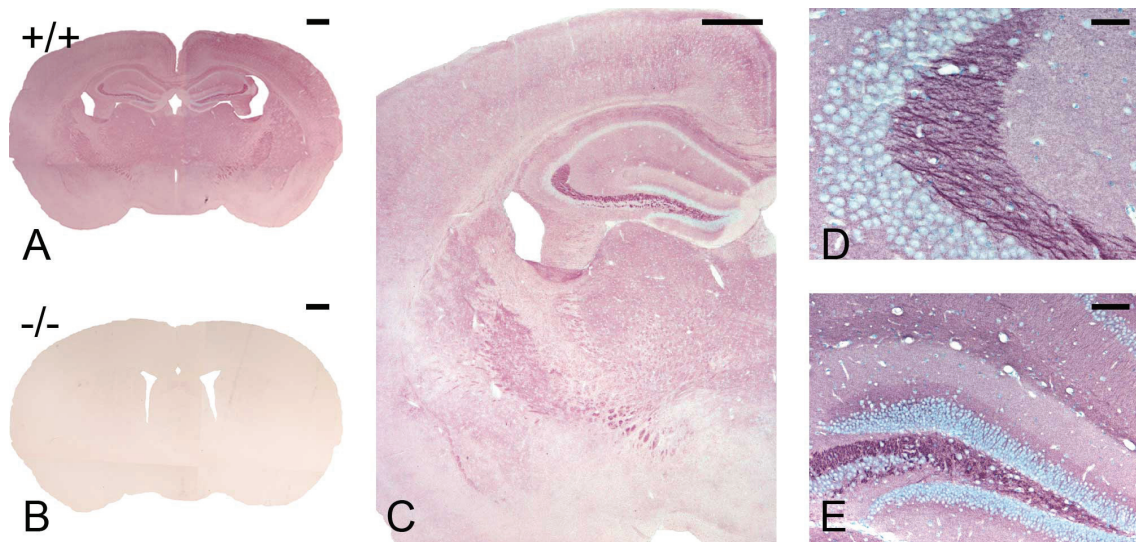


Figure 11 : Immunomarquages de protéine STOP (en rose, contre-coloré au vert de méthyle) de coupes coronales du système nerveux central de souris $+/+$ (A ; C-E) et STOP $-/-$ (B). Coupe au niveau de l'hippocampe (A, C), du striatum (B) et forts grossissements de l'hippocampe (D, E). Echelles : A-C 500 μm ; D 50 μm ; E 100 μm .

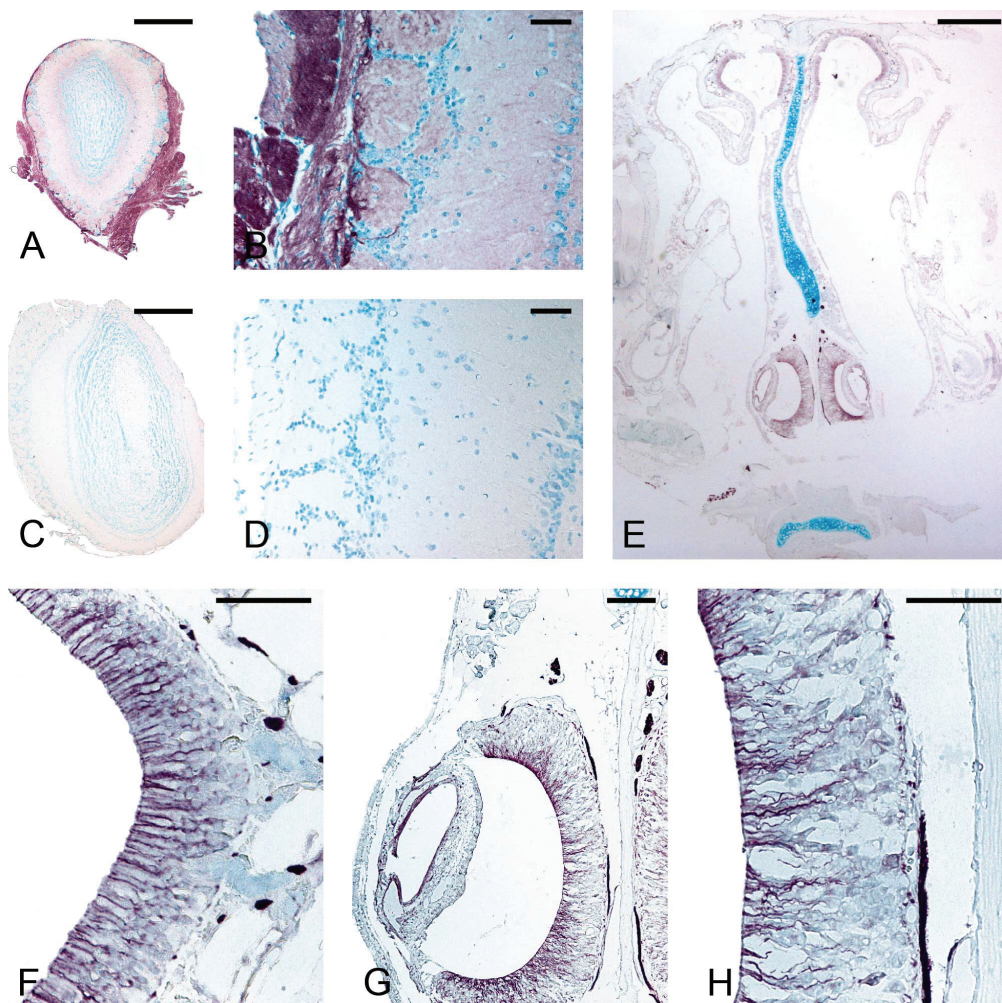


Figure 12 : Immunomarquages de protéine STOP (en rose, contre-coloré au vert de méthyle) de coupes coronales de souris $+/+$ (A, B, E-H) et STOP $-/-$ (C, D). Bulbe olfactif (A, C), fibres olfactives et glomérules (B, D). Muqueuse olfactive (E, F) et organe voméronasal (E, G, H). Echelles : A, C, E 500 μm ; B, D, F-H 50 μm .

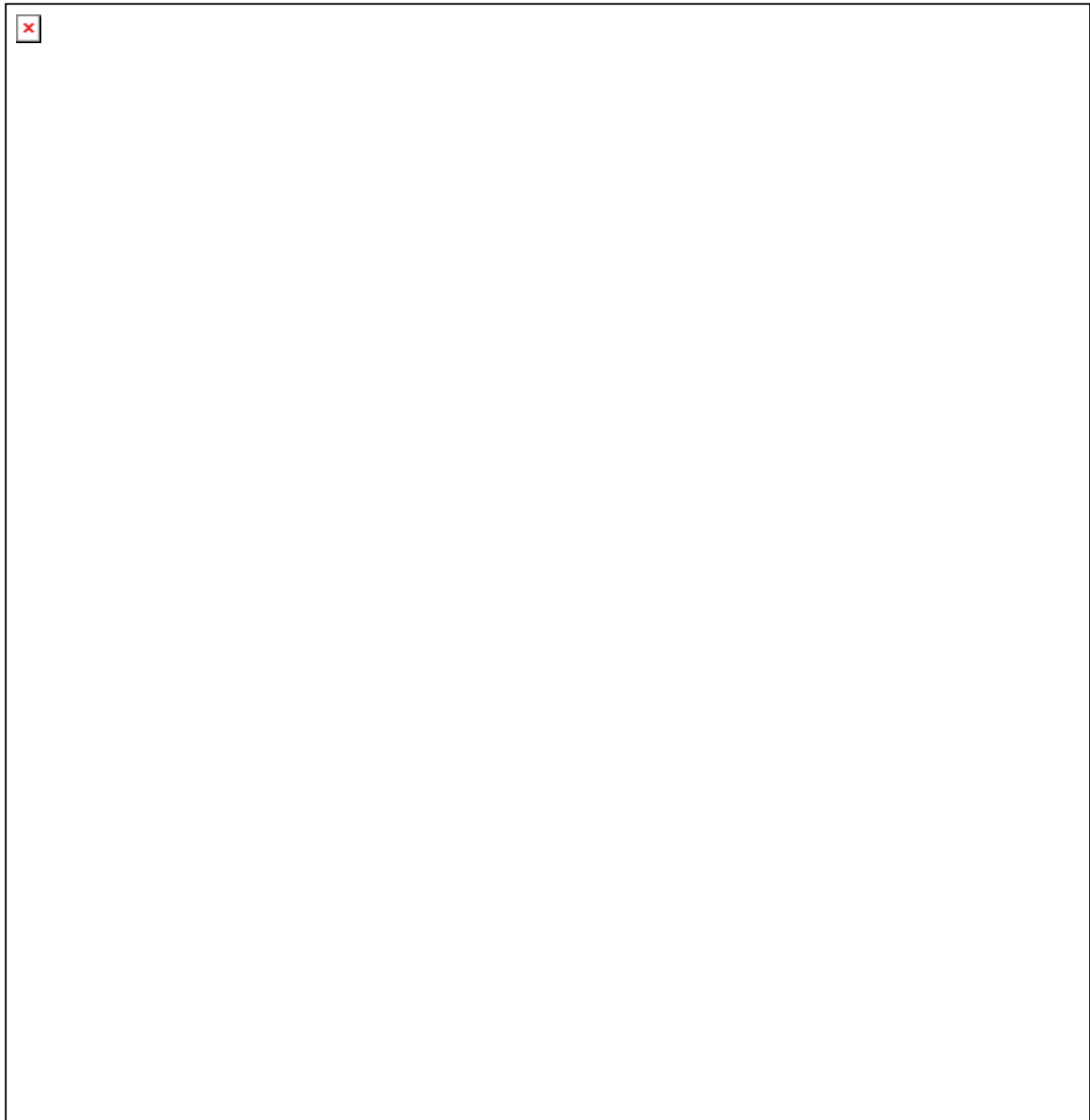


Figure 13 : Immunomarquages de β -gal sur des coupes coronales du système nerveux central de souris adultes « sauvages » (A) et STOP +/- (B, C) ; doubles marquages de β -GAL et synaptophysine (D-F), GAP43 (G-I) ou neuN (J-L) sur des coupes coronales de cerveau de souris STOP -/-. Aucun immunomarquage en β -gal chez les souris « sauvages » (Figure 56 de l'Atlas ; A). Forts grossissements du noyau endopiriforme (B) et du cervelet (C) chez des souris KO-STOP ; le marquage en β -gal se trouve dans des « points » (flèches fines) et les corps cellulaires (flèches larges). Doubles immunofluorescences de β -gal et synaptophysine dans CA1 de l'hippocampe (D-F), GAP43 dans le gyrus denté (G-I) et neuN dans le cortex (J-L) ; des cellules sont doublement marquées (flèches). Echelles : A, 1000 μ m ; B-F, 50 μ m, G-I, 100 μ m, J-L, 20 μ m.

La plus forte expression de β -gal s'observe dans la partie périphérique du système olfactif tant principal qu'accessoire : les neurones olfactifs récepteurs sont marqués depuis les dendrites olfactives du système olfactif principal et voméronasal jusqu'aux aires présynaptiques dans les glomérules principaux et accessoires (Figure 14A-D). Dans le bulbe olfactif, les corps cellulaires des cellules mitrales sont faiblement marqués et la couche des grains n'exprime pas du tout le gène rapporteur (Figure 14C, D). Les fibres se projetant sur le cortex olfactif sont négatives (Figure 14E). Le noyau olfactif antérieur (Figure 14E) et la couche II du cortex piriforme (Figure 14H), qui sont des aires de projection des cellules mitrales sur le bulbe olfactif principal, sont fortement marqués. Le noyau endopiriforme dorsal est très intensément β -gal positif (Figure 14E, H). L'*indusium griseum* (ou « continuation dorso-hippocampique ») se démarque très nettement du cortex cingulaire par un fort marquage de sa couche des corps cellulaires et sa couche moléculaire (Figure 14F, G).

Le marquage est retrouvé dans des cellules isolées et de nombreux points au niveau des noyaux accumbens et caudé-putamen (Figure 15A-C). Quelques cellules bipolaires fortement β -gal positives sont présentes dans la bande diagonale de Broca (Figure 15E).

L'organe subfornical exprime très intensément la β -gal (Figure 15B). Aucun autre organe circumventriculaire n'est marqué.

Dans le thalamus, le noyau paraventriculaire (Figure 15B) et l'habénula médiale (Figure 15C, D) sont les plus fortement positifs. De nombreuses autres aires thalamiques sont également marquées : les noyaux thalamiques antéro-dorsal, antéro-ventral et antéro-médian ; le noyau géniculé latéral, le noyau thalamique paracentral et la partie interne du noyau réticulé ; alors que les noyaux parataenial, ventral latéral et médiodorsal ne sont pas marqués (Figure 15D). La plupart des noyaux hypothalamiques expriment fortement le gène rapporteur : noyaux suprachiasmatique, supraoptique et paraventriculaire (Figure 15C, D). Les noyaux préoptique médian et périventriculaire, les aires hypothalamiques antérieures et postérieures présentent quelques cellules marquées.

Dans le cortex cérébral, peu de cellules sont β -gal positives dans les couches I, II et III alors que les couches IV, V et VI sont très marquées (Figure 16B, C). Les cortex cingulaire et infralimbique présentent le même type de marquage que les autres parties corticales (Figure 15F). Une expression remarquablement intense est visible juste au-dessus du corps calleux, dans la couche VII qui fusionne avec le noyau endopiriforme (Figure 15A-D, F ; Figure 16A, B, D-F, J). Cette couche est caractérisée par des cellules orientées horizontalement (Figure 16D).

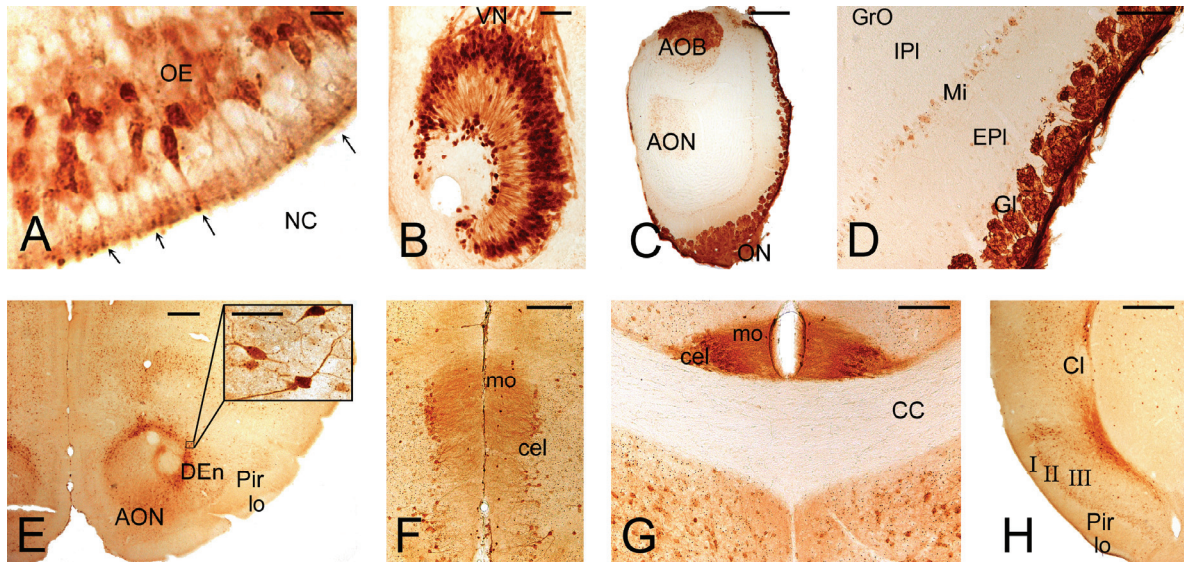


Figure 14 : Immunomarquages de β -GAL sur des coupes coronales du système olfactif de souris adultes STOP +/- (B, E-G) et -/- (A, C, D, H). Epithélium principal (A) et voméronasal (B) ; des vésicules olfactives sont visibles (flèches). Bulbes (Figure 3 de l'Atlas ; C) principal (C, D) et accessoire, fibres et glomérules olfactifs fortement marqués. Noyaux olfactif antérieur et endopiriforme dorsal avec en fort grossissement ses cellules très positives (Figure 14 de l'Atlas ; E) ; le tractus olfactif latéral est totalement négatif. Parties antérieure (F) et postérieure G) de l'*indusium griseum*. Cortex piriforme (H) et sa couche II très marquée. Echelles : A, 10 μ m ; B, fort grossissement de E, 50 μ m ; C, E, H, 500 μ m ; D, F, G, 150 μ m.

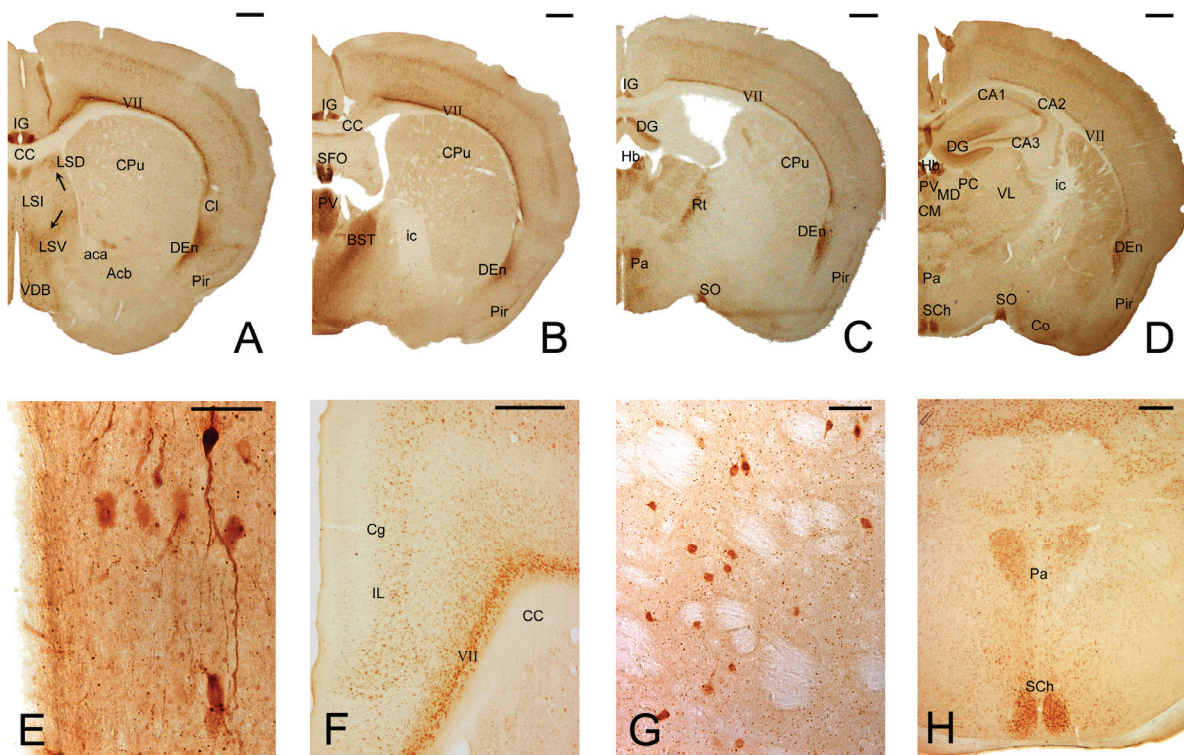


Figure 15 : Immunomarquages de β -GAL de coupes coronales du système nerveux central de souris adultes STOP +/- (A, D, E, H) et -/- (B, C, F, G). Hémi-sections (A-D) à différents niveaux du cerveau (Figures 23, 33, 39, 43 de l'Atlas respectivement). Marquages dans le septum (flèches), le noyau caudéputamen et le noyau du bras vertical de la bande diagonale de Broca (A ; fort grossissement en E). Régions thalamiques et hypothalamiques (B-D), négatives au niveau du noyau thalamique ventral latéral et très fortement marquées dans le noyau du lit de la strie terminale, l'organe subforinale, l'habénula et les noyaux supraoptiques et suprachiasmatiques (fort grossissement en H). Fort grossissement des cellules du striatum (G). Marquages dans les cortex cingulaire et infralimbique (F). Echelles : A-D, F, 500 μ m ; E, G, 50 μ m ; H, 200 μ m.

Dans la formation hippocampique, les cellules de la couche granulaire du gyrus denté (Figure 16J) et de la couche pyramidale, plus particulièrement dans la région CA2, sont fortement marquées (Figure 16A, E). Des cellules β -gal positives sont trouvées dans la couche II mais aucune dans la couche I du cortex entorhinal (Figure 16K). Dans le septum, les noyaux latéral et dorsal mais pas intermédiaire sont marqués (Figure 15A). La β -gal est exprimée dans le noyau cortical amygdaloïde antérieur et postéro-médian (Figure 16A), et de façon très intense dans l'aire de transition amygdalo-piriforme et dans le noyau du lit de la strie terminale (Figure 15B).

Concernant le cerveau médian, La partie compacte de la substance noire, le colliculus supérieur, l'aire tegmentale ventrale, le noyau interpedonculé ainsi que le noyau du pont sont marqués (Figure 16F-I). Dans le cervelet, les cellules de Purkinje et quelques cellules granulaire sont β -gal positives (Figure 16L). Les tractus de fibres sont négatifs pour la plupart, seul le *fasciculus retroflexus* est fortement marqué (Figure 16E).

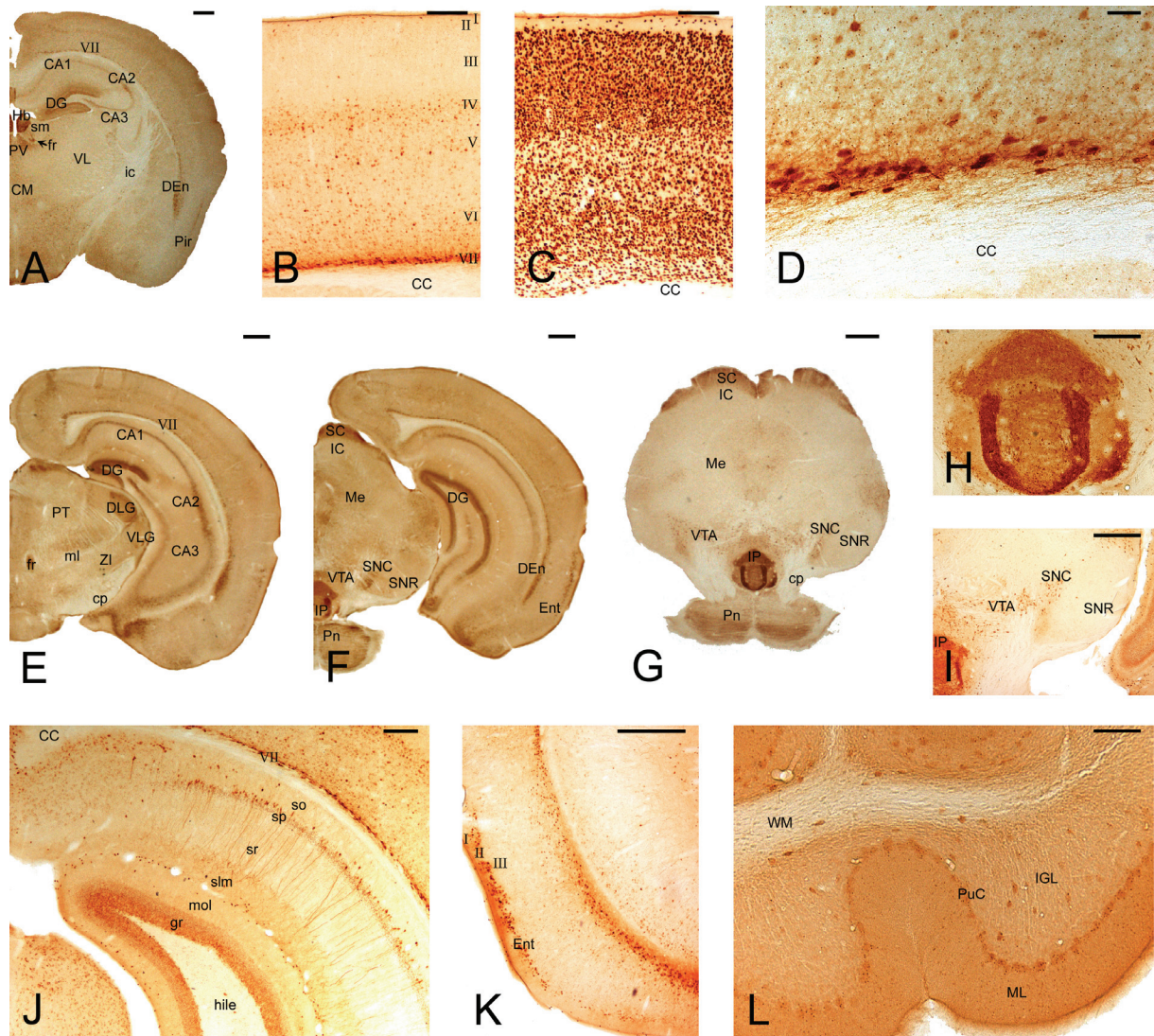


Figure 16 : Immunomarquages de β -GAL (A, B, D-L) et neuN (C) de coupes coronales du système nerveux central de souris adultes STOP +/- (A, E, G, H, J-L) et -/- (B-D, F, I). Hémisections au niveau de l'hippocampe dorsal (A ; Figure 48 de l'Atlas) et ventral (E, F ; Figures 53 et 62 de l'Atlas respectivement). Couches corticales (B-D) : très fort marquage de la couche VII (B, D) ; les différentes couches sont repérables grâce au marquage de neuN (C). Fort marquage de la couche des cellules pyramidales de l'hippocampe et de la couche granulaire du gyrus denté (J). Au niveau médian (G ; Figure 63 de l'Atlas), la partie compacte de la substance noire et l'aire tegmentale ventrale (I), le *fasciculus retroflexus* (E), le noyau interpedonculé (G ; fort grossissement en H), le noyau du pont et le colliculus supérieur (G) sont β -gal positifs. Marquage de la couche II du cortex entorhinal (K). Cellules de Purkinje positives dans le cervelet (L). Echelles : A, E-G, K, 500 μ m ; B, C, H, J, 200 μ m ; D, 50 μ m ; L, 100 μ m.

Structure	Cellules		Points densité	Fibres
	densité	intensité		
SYSTEME OLFACTIF				
Organes périphériques				
Epithélium olfactif	++	+++	+	-
Epithélium voméronasal	+++	+++	+	+++
Bulbe olfactif principal				
Nerf olfactif	-	-	-	+++
Couche glomérulaire	-	-	-	+++
Couche plexiforme externe	-	-	+	-
Couche des cellules mitrales	+	+	++	-
Couche plexiforme externe	-	-	-	-
Couche des grains	-	-	-	-
Bulbe olfactif accessoire				
Nerf voméronasal	-	-	-	+++
Couche glomérulaire	-	-	-	+++
Couche des cellules mitrales	++	++	++	-
Couche des grains	-	-	-	-
Cortex olfactif primaire				
Tractus latéral olfactif	-	-	-	-
Noyau olfactif antérieur				
Partie externe	++	++	++	-
Partie latérale	+	++	+++	-
Parties ventrales, dorsales et médianes	+	+	+++	-
Cortex olfactif médian				
<i>Taenia tecta</i>	+	+	++	-
<i>Indusium griseum</i>	++	++	+++	-
Ilots de Calleja	+	-	+	-
Tubercule olfactif	-	-	+	-
Cortex olfactif latéral				
Couche I du cortex piriforme	-	-	+	-
Couche II du cortex piriforme	++	+	++	-
Couche III du cortex piriforme	+	+	++	-
Noyau endopiriforme dorsal	++	+++	+	-
GANGLIONS DE LA BASE				
Noyau caudé-putamen (striatum)	+	++	++	-
Coeur du noyau accumbens	+	+	++	-
Coquille du noyau accumbens	+	+	+	-
Noyau du bras vertical de la bande diagonale de Broca	++	++	++	-
Noyau du bras horizontal de la bande diagonale de Broca	+	+++	++	-
<i>Globus pallidus</i> latéral	-	-	+	-
SEPTUM				
Partie intermédiaire du noyau septal latéral	-	-	++	-
Partie ventrale du noyau septal latéral	++	++	++	-
Partie dorsale du noyau septal latéral	+	++	++	-
Noyau septal médian	+	+	+	-

Tableau 9 (1/3) : Distribution de l'expression du gène rapporteur lacZ dans le SNC de souris adulte.
Estimation des immunomarquages : +++ , très fort à intense ; ++ , modéré à fort ; + , faible ; - non détectable.

THALAMUS				
Noyau thalamique antérieur	++	+	+	-
Noyau thalamique paraventriculaire	+++	++	+++	-
Noyau thalamique paracentral	++	+	++	-
Noyau géniculé dorso-latéral	++	++	++	-
Partie interne du noyau réticulé	++	++	+	-
Noyau thalamique médiodorsal	-	-	+	-
Habenula	++	+++	++	-
HYPOTHALAMUS				
Aire préoptique médiane	+	++	+	-
Noyau préoptique médian	++	++	++	-
Noyau suprachiasmatique	+++	++	++	-
Noyau hypothalamique périventriculaire	++	++	++	-
Aire hypothalamique antérieure	++	+	++	-
Aire hypothalamique postérieure	+	+	++	-
Noyau supraoptique	+++	++	+++	-
Noyau hypothalamique paraventriculaire	+++	+	+++	-
FORMATION HIPPOCAMPIQUE				
<i>Stratum lacunosum moleculare</i> de l'hippocampe	+	++	+	-
<i>Stratum radiatum</i> de l'hippocampe	-	-	++	-
<i>Stratum oriens</i> de l'hippocampe	-	-	+	-
CA1 du <i>stratum pyramidale</i> de l'hippocampe	++	++	+++	-
CA1 du <i>stratum radiatum</i> de l'hippocampe	-	-	++	-
CA2 du <i>stratum pyramidale</i> de l'hippocampe	+++	+++	+++	-
CA2 du <i>stratum radiatum</i> de l'hippocampe	-	-	+	-
CA3 du <i>stratum pyramidale</i> de l'hippocampe	++	+	++	-
CA3 du <i>stratum radiatum</i> de l'hippocampe	-	-	+++	-
Couche moléculaire du gyrus denté	+	++	++	-
Couche granulaire du gyrus denté	+++	++	+++	-
Couche polymorphe du gyrus denté	-	-	+	-
Couche I du cortex entorhinal	-	-	+	-
Couche II du cortex entorhinal	++	++	++	-
Couche III du cortex entorhinal	-	-	+++	-
CORTEX				
Couche I	+	++	++	-
Couche II	+	+	++	-
Couche III	-	-	+	-
Couche IV	+++	++	++	-
Couche V	++	++	++	-
Couche VI	+++	++	++	-
Couche VII	+++	+++	++	-
AMYGDALÉ ET STRUCTURES ASSOCIÉES				
Noyau amygdaloïde cortical antérieur	++	++	++	-
Noyau amygdaloïde cortical posteromédian	++	++	+++	-
Aire de transition amygdalopiriforme	+++	+++	+++	-
Noyau du lit de la strie terminale	+++	++	+++	-
ORGANES CIRCUMVENTRICULAIRES				
Organe subfornical	+++	+++	+++	-

Tableau 10 (2/3) : Distribution de l'expression du gène rapporteur lacZ dans le SNC de souris adulte.
Estimation des immunomarquages : +++, très fort à intense ; ++, modéré à fort ; +, faible ; - non détectable.

TRACTUS DE FIBRES				
Corps calleux	-	-	-	-
Commissure antérieure	-	-	-	-
Fornix	-	-	-	-
Strie médullaire	-	-	-	-
Capsule interne	-	-	-	-
<i>Fasciculus retroflexus</i>	-	-	-	+++
Tractus optique	-	-	-	+
Leminiscus médian	-	-	-	-
CERVEAU MEDIAN, PONT				
Colliculus supérieur	++	++	+	-
Colliculus inférieur	-	-	-	-
Noyau du pont	++	++	++	++
Noyau interpédonculé	+++	++	++	-
Aire tegmentaire ventrale	+	++	++	-
Partie réticulée de la substance noire	-	-	-	-
Partie compacte de la substance noire	++	++	++	-
Faisceau nigro-striatal	+	++	+	-
CERVELET				
Couche moléculaire	-	-	+	-
Couche des cellules de Purkinje	++	++	++	-
Couche granulaire	+	+	+	-
Substance blanche	-	-	-	-

Tableau 11 (3/3) : Distribution de l'expression du gène rapporteur lacZ dans le SNC de souris adulte. Estimation des immunomarquages : +++, très fort à intense ; ++, modéré à fort ; +, faible ; - non détectable.

b. Développement postnatal

Au cours du développement postnatal, ici étudié entre P1 et P9, la plupart des régions cérébrales présentent les mêmes expressions de β -gal que chez l'adulte, comme nous le montrons dans le cortex cérébral (Figure 17A, F), le système olfactif (Figure 17B, C) et la formation hippocampique (Figure 17D, F). A ces stades précoces, la couche I présente de nombreuses cellules positives, très probablement des cellules de Cajal-Retzius (Figure 17A).

Cependant, quelques régions présentent une expression singulière. Des amas de cellules marquées sont trouvés dans le noyau caudé-putamen ainsi que dans le *globus pallidus* (Figure 17E). Le thalamus est entièrement positif, avec une expression particulièrement forte dans le noyau ventral latéral (Figure 17F), qui ne persiste pas chez l'adulte.

Dans le cervelet, les cellules de Purkinje expriment de plus en plus intensément le gène rapporteur, tandis que la couche des grains n'apparaît positive que lorsque la plupart des cellules en migration ont atteint leur position finale (Figure 17G-I).

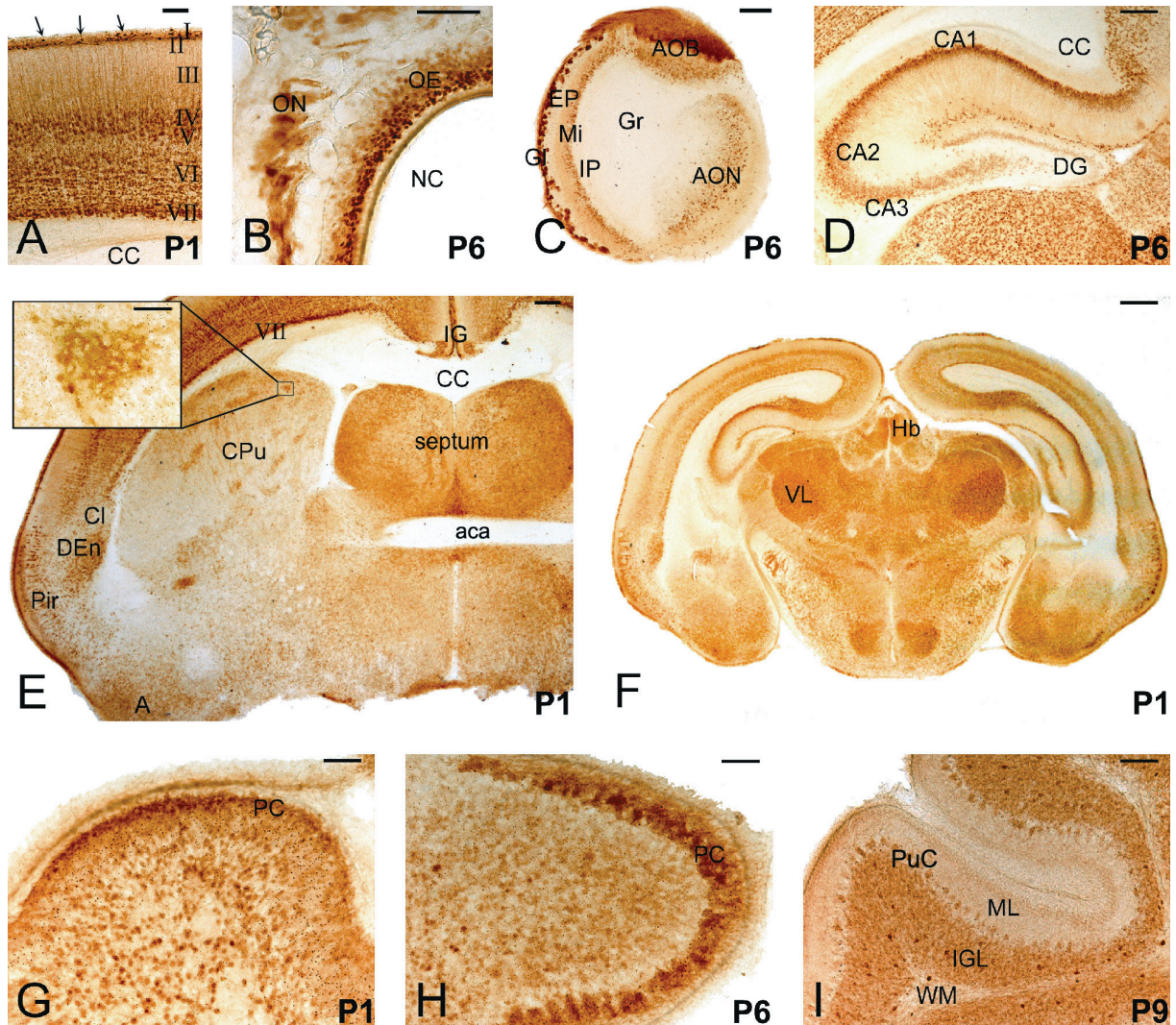


Figure 17 : Immunomarquages de β -GAL de coupes coronales du système nerveux central de jeunes (P1, P6, P9) souris STOP +/- (A, D, E) et -/- (B, C, F-I). Couches corticales (A) et les cellules de Cajal-Retzius dans la couche I (flèches). Système olfactif (B, C) avec le nerf olfactif très marqué (B) qui se projette sur le bulbe olfactif (C). Marquages similaires à l'adulte dans l'hippocampe, le gyrus denté et l'habénula (D, F). Organisation progressive des cellules de Purkinje β -gal positives dans le cervelet (G-I) ; la couche des grains est marquée à P9 (I). Echelles : A, C, I, 100 μ m ; B, D, E, 200 μ m ; F, 500 μ m ; G, H, grossissement de E, 50 μ m.

Recherche de corrélats fonctionnels

Une fois les zones de plus forte expression de la protéine STOP mises en évidence, nous avons souhaité rechercher si, au niveau fonctionnel, elles sont corrélées avec des zones de forte activité neuronale lors d'une tâche comportementale simple faisant intervenir l'olfaction (entre autres modalités sensorielles), puisque nous avons pu très clairement confirmer une expression intense de protéine STOP dans le système olfactif. Le test comportemental que nous avons choisi est le test de rassemblement des petits au nid, utilisé de nombreuses fois par Andrieux et collaborateurs (2002). Chez la souris STOP $-/-$, on observe une incapacité à rassembler les petits au nid, que ce soit par des femelles post-partum, des femelles vierges ou des mâles (Andrieux et coll., 2002). Afin d'examiner l'activité neuronale au cours de ce test, nous avons étudié l'expression du proto-oncogène *c-fos* par immunocytochimie. En effet, *c-fos* est un gène précoce (IEG, *immediate early gene*) dont l'induction, par divers stimuli externes (comme un stress social, par exemple) est rapide et transitoire (Herrera et Robertson, 1996 ; Martinez et coll., 2002). Enfin, nous avons choisi d'utiliser des mâles pour éviter une variabilité liée aux variations hormonales du cycle œstral.

1. Test de rassemblement des petits au nid

Au niveau comportemental, les mâles, tous génotypes confondus, se montrent très agressifs : 62,96% de petits sont tués. Les souris « sauvages » ne ramènent pas significativement plus de petits au nid que les souris mutées, qu'elles soient hétérozygotes [$G=0,40;p=0,69$] ou homozygotes [$G=1,80;p=0,07$] pour la mutation. En revanche, les mâles « sauvages » tuent significativement plus de petits que les mâles homozygotes pour la mutation [$G=2,18;p=0,03$], différence que nous ne retrouvons pas pour les mâles hétérozygotes [$G=1,26;p=0,21$] (Figure 18).

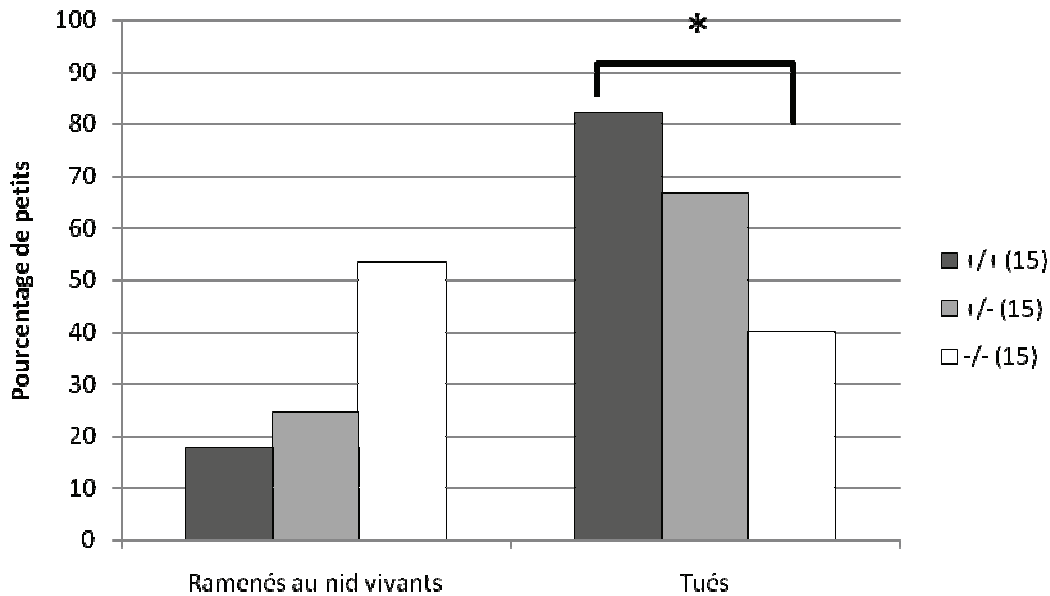


Figure 18 : Nombre de petits ramenés au nid vivants ou nombre de petits tués par les mâles +/+, +/- et -/-.
* : $p < 0,05$.

2. Expression de *c-fos*

Ne pouvant réaliser dans un délai raisonnable l'analyse de l'ensemble des animaux testés dans le paradigme comportemental, nous avons décidé de travailler sur 2 sous-populations présentant les comportements les plus extrêmes. Ainsi, 7 animaux « sauvages », ayant tué tous les petits, et 9 animaux homozygotes pour la mutation, n'en ayant tué aucun, ont été analysés.

Nous observons une grande variabilité de l'étendue interquartile (EIQ) des densités de cellules *c-fos*-positives pour toutes les structures analysées (Figure 19 et Figure 20), comparativement à la médiane (Tableau 10).

		AON	AOB	Pir	IL	Cg	LS	BST	VA	CM
+/+	Médiane	223,49	129,32	212,43	173,19	84,75	119,36	98,26	131,41	84,14
	EIQ	182,63	109,64	254,85	127,73	132,21	130,83	57,08	84,66	142,68
-/-	Médiane	177,73	117,18	262,13	133,39	59,25	231,15	85,22	331,96	173,60
	EIQ	175,38	374,83	149,22	177,63	120,92	109,76	83,23	561,11	179,09

		Pa	SO	CeA	MeA	LHb	MHb	CA1	CA3	PAG
+/+	Médiane	413,48	208,53	83,09	179,00	366,51	26,06	44,22	139,82	214,29
	EIQ	560,77	215,50	105,38	82,06	527,47	23,63	265,59	105,78	117,01
-/-	Médiane	684,63	341,52	101,23	241,02	310,74	45,68	28,04	93,85	215,11
	EIQ	546,95	358,69	52,40	203,34	571,40	70,21	23,08	60,61	146,55

Tableau 12 : Médiane et étendue interquartile (EIQ) des densités de cellules *c-fos* positives pour chaque structure pour les souris +/+ et -/-. Pour les abréviations voir page 10 ; pour CA1 et CA3, les mesures sont réalisées dans le *stratum pyramidale*.

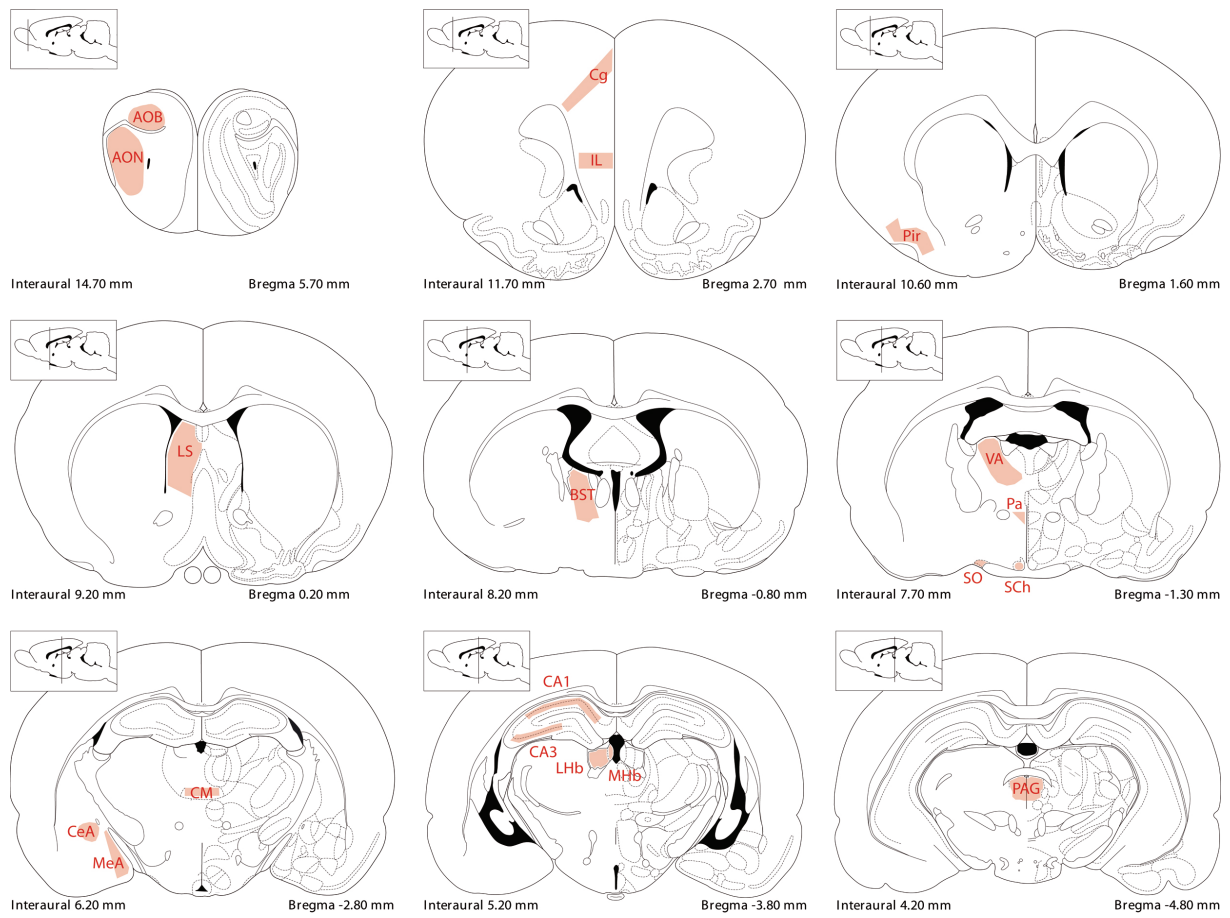


Figure 19 : Délimitation et coordonnées stéréotaxiques des structures analysées.

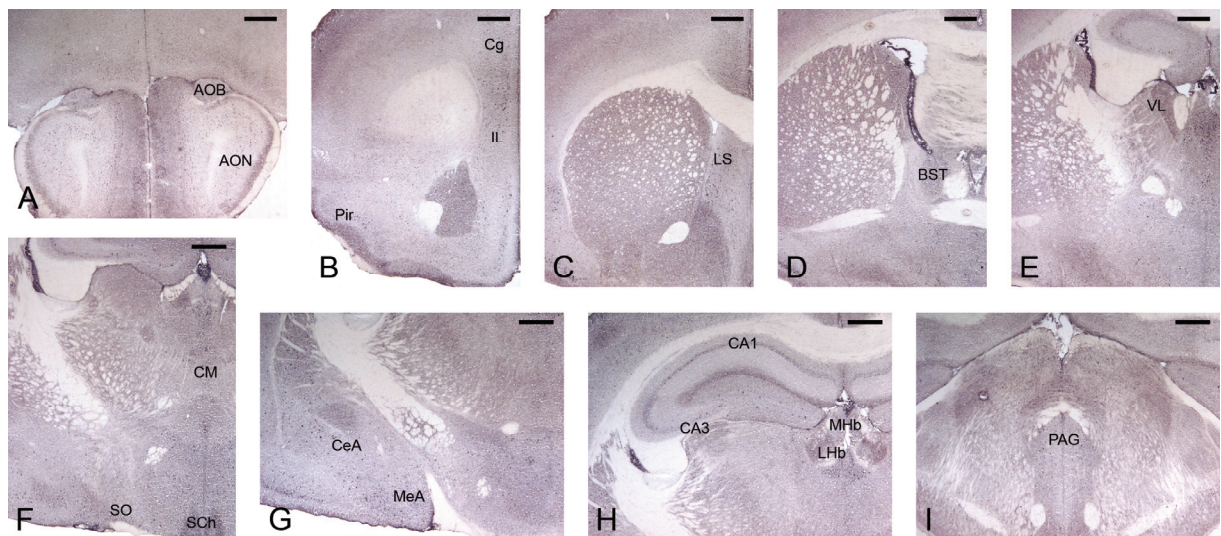


Figure 20 : Immunomarquages de c-fos des différentes aires analysées. Echelles : A-I : 500 μ m.

Les comparaisons des génotypes deux à deux pour chaque structure montrent qu'aucune différence significative au seuil $\alpha=5\%$ n'apparaît entre les souris « sauvages » et homozygotes pour la mutation (Figure 21), que les données suivent ou non une distribution normale (Tableau 11).

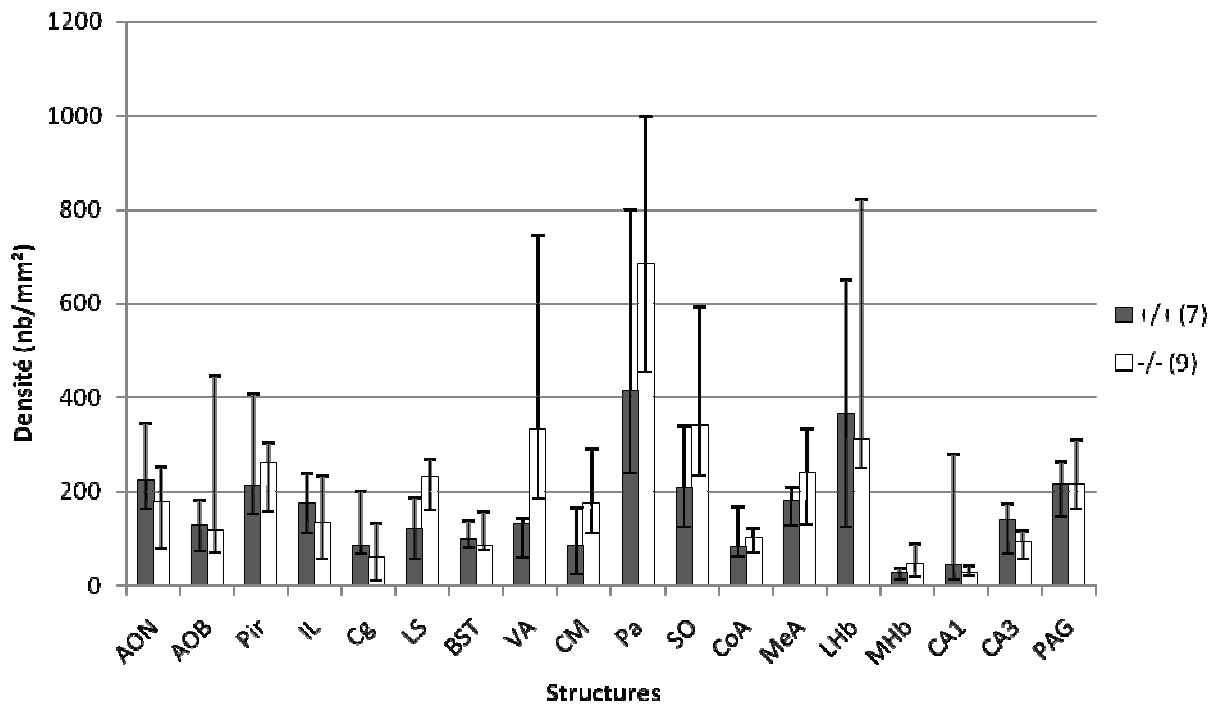


Figure 21 : Densité (médiane et quartiles) de cellules c-fos positives de souris +/+ et -/-. Pour les abréviations voir page 10 ; pour CA1 et CA3, les mesures sont réalisées dans le *stratum pyramidale*.

Structure	Test paramétrique de Student			Test non paramétrique de Mann-Whitney	
	Statistique	Valeur de p	Puissance ¹	Statistique	Valeur de p
AON	0,82	0,43	0,11		
AOB	0,67	0,51	0,09		
Pir	np	np	np	75,00	0,92
IL	0,82	0,42	0,05		
Cg	1,31	0,21	0,21		
LS	1,39	0,19	0,23		
BST	np	np	np	75,00	0,92
VA	1,87	0,08	0,37		
CM	1,33	0,21	0,29		
Pa	0,75	0,47	0,10		
SO	1,22	0,24	0,19		
CeA	0,65	0,53	0,08		
MeA	0,83	0,42	0,11	nr	nr
LHb	0,01	0,98	0,05	nr	nr
MHb	1,29	0,22	0,20	91,00	0,14
CA1	0,79	0,45	0,11	71,00	0,60
CA3	0,91	0,38	0,12	nr	nr
PAG	0,30	0,77	0,06	nr	nr

Tableau 13 : Statistique et valeur de p du test de Mann-Whitney et du test t de Student (ainsi que puissance) appliqués aux données de densité cellulaire brutes et normalisées respectivement. np = données non paramétriques et non normalisables. Pour les abréviations, voir page 7.

Discussion

1. Expression de protéine STOP et de son gène rapporteur

a. Localisation cellulaire

- Différences de localisation entre STOP et β -gal

Dans la toute première description de la souris KO-STOP, il a été montré que 3 zones principales, à savoir le bulbe olfactif, le cervelet et l'hippocampe, exprimaient la protéine STOP (Andrieux et coll., 2002). Plus précisément, et grâce à l'utilisation du substrat de la β -gal, Andrieux et collaborateurs proposent que les mêmes aires d'expression du gène rapporteur lacZ sont observées chez les souris mutées dans ces 3 zones. Si nos résultats confirment le fait que la protéine STOP est particulièrement présente dans le le bulbe olfactif et l'hippocampe, il semble y avoir quelques différences entre les aires d'expression de la protéine STOP elle-même et celles du gène rapporteur lacZ chez les souris mutées (Figure

¹ Vu les différences de moyennes entre les groupes par structure, pour obtenir une puissance de test de 80%, il aurait fallu entre 50 et 100 animaux par groupe, ce qui, d'un point de vue éthique et expérimental, est difficile à mettre en œuvre.

22). Elles apparaissaient déjà dans la première description (Andrieux et coll., 2002) comme nous le soulignons sur la Figure 22 (flèches) : dans le bulbe olfactif, la protéine STOP n'est trouvée que dans les fibres olfactives alors que la β -gal est présente également dans les glomérules ; dans la formation hippocampique, la protéine STOP n'est présente qu'au niveau du hile et des fibres moussues, alors que la β -gal est observée dans les neurones du *stratum pyramidale* et leurs axones et dans la couche granulaire du gyrus denté. L'hypothèse la plus probable pour expliquer ces différences est que la β -gal ne présente pas la même localisation cellulaire que la protéine STOP, cette dernière semblant être localisée plutôt au niveau des prolongements axoniques (axones des neurones olfactifs, axones des neurones de la couche granulaire qui font synapse avec les cellules pyramidales de la couche CA3 - fibres moussues -). La β -gal semble présente dans l'ensemble de la cellule possédant le promoteur de STOP, de la dendrite au corps cellulaire jusqu'à, parfois de manière variable, les axones. Cette hypothèse explique bien le fait qu'on la retrouve dans les glomérules olfactifs, alors que la STOP, comme certaines protéines associées aux microtubules comme Tau et MAP2 (Dehmelt et Halpain, 2005), ne serait présente que dans les extensions cellulaires (dendrites, et surtout axones), marquant chez la souris « sauvage » la plupart des fibres et donnant ainsi un marquage assez diffus présent dans l'ensemble du système nerveux central. Nous pensons donc qu'il est particulièrement pertinent d'examiner l'expression du gène rapporteur lacZ, qui révèle ainsi les aires cérébrales où le promoteur de STOP est le plus fortement activé, et où les plus grandes quantités d'ARNm de STOP sont produites. Nous ne pouvons pas aller plus loin en termes de protéine, puisque des modifications post-transcriptionnelles ont probablement lieu. Nous concluons que, même si la protéine STOP est présente dans l'ensemble du système nerveux central et probablement localisée dans les extensions neuronales seulement, son niveau d'expression est variable selon les régions. Nous tenterons de voir dans la discussion finale si les régions de plus forte activité du promoteur peuvent correspondre aux régions potentiellement impliquées dans la schizophrénie. Pour aller plus loin au niveau de l'étude d'une dysconnexion synaptique dans le modèle « souris STOP », il est donc pertinent de choisir une région avec, non seulement la présence de protéine STOP *per se*, mais également une activité du promoteur STOP la plus forte possible. C'est la raison pour laquelle, dans la suite de cette thèse, nous nous focaliserons plus particulièrement sur le système olfactif.

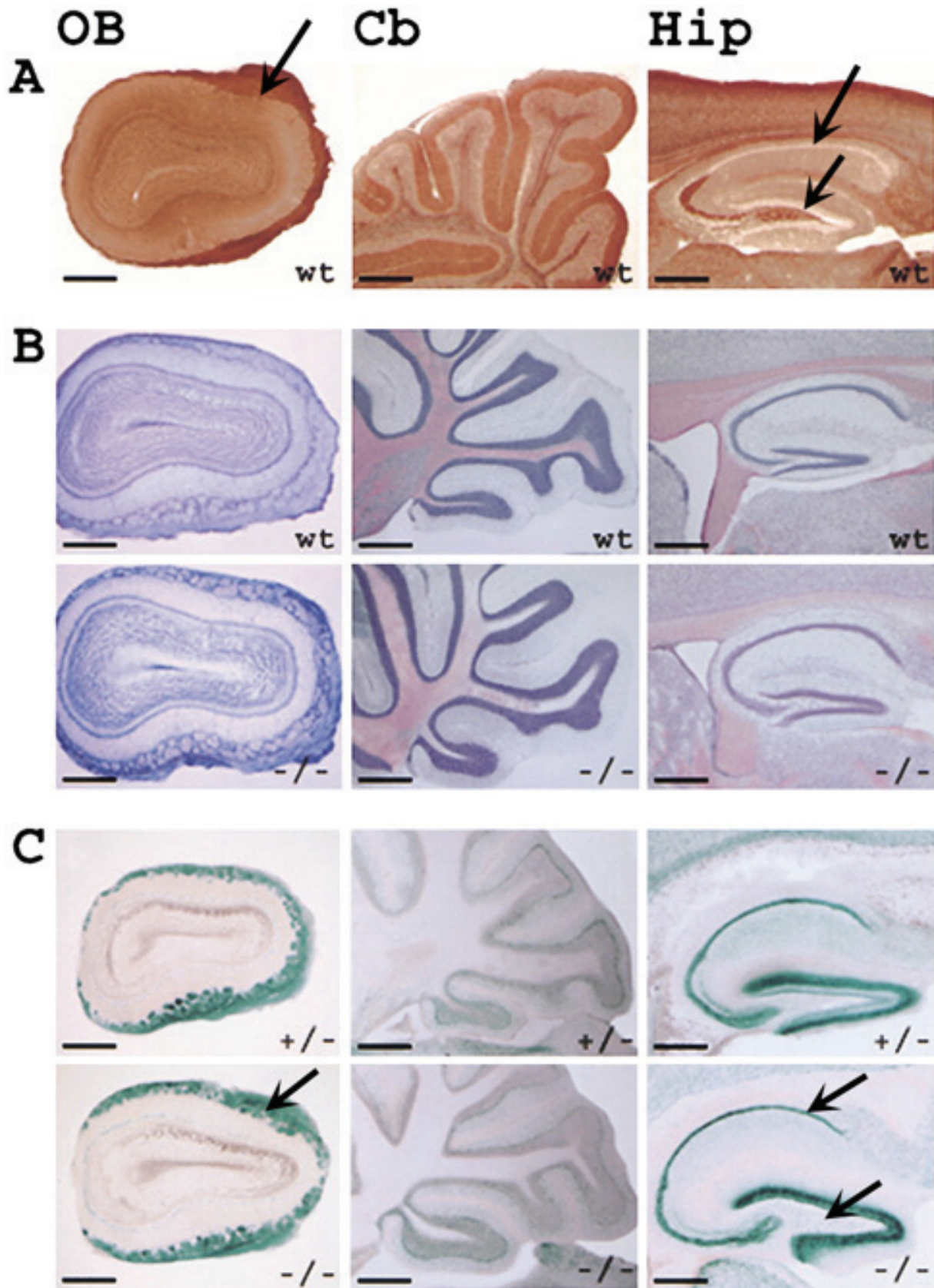


Figure 22 : Coupes coronales de bulbe olfactif (« OB »), cervelet (« Cb ») et hippocampe (« Hip ») de souris « sauvage » (« wt »), STOP hétérozygotes pour la mutation (« +/- ») et STOP homozygote pour la mutation (« -/- ») immunomarquées en protéine STOP (A), colorées au crésyl violet (B) et dont l'activité β -gal est révélée avec son substrat X-gal (C). Adapté de Andrieux et coll., 2002.

- Marquage ponctiforme de β -gal

Outre un marquage cellulaire de la β -gal, nous observons un marquage de type ponctiforme dans les cellules. Nous émettons l'hypothèse que ce marquage résulte de l'accumulation de β -gal sous forme d'agrégats, comme chez la souris transgénique NFH-lacZ (Eyer et Peterson, 1994). Ces agrégats pourraient empêcher le transport de β -gal dans les axones, comme c'est le cas chez la souris NFH-lacZ comparativement à la souris NFH-GFP (Letournel et coll., 2006), ce qui conforterait l'hypothèse selon laquelle les marquages de β -gal et STOP sont différents du fait de localisations cellulaires différentes.

b. Caractéristiques potentielles de la protéine STOP

Dans ce travail, nous ne mettons pas en évidence de différences qualitatives entre les souris homozygotes et hétérozygotes pour la mutation au niveau des aires d'expression du gène rapporteur lacZ, que ce soit en termes de localisation ou d'intensité de marquage. Bien que ce résultat reste à confirmer, notamment en termes de quantité de protéine traduite, il pourrait refléter plusieurs caractéristiques des protéines STOP.

- Rétrocontrôle ?

Des quantités similaires de β -gal exprimées par les +/- et -/- pourraient traduire l'existence d'un rétrocontrôle par la protéine STOP sur son promoteur. En effet, nous aurions pu nous attendre à ce qu'en présence d'un seul exemplaire de lacZ chez les souris +/-, la quantité de β -gal produite soit moins importante qu'en présence de deux exemplaires chez les souris -/-. Cela aurait pu aboutir à un marquage en β -gal plus important chez les souris homozygotes qu'hétérozygotes pour la mutation. Mais, en suivant ce raisonnement, la quantité de protéine STOP avec un seul allèle devrait également être plus faible. En conséquence, cette faible concentration de STOP pourrait jouer le rôle d'activateur du promoteur (à la fois de STOP et de lacZ) et ainsi faire produire aux cellules des quantités de STOP et de β -gal plus importantes, afin que la quantité de STOP soit équivalente au niveau requis dans une cellule intacte. Cette hypothèse pourrait être testée en comparant les quantités de β -gal chez les souris STOP hétérozygotes et homozygotes pour la mutation, ainsi que les quantités de protéine STOP chez les souris « sauvages » et chez les souris STOP hétérozygotes.

- Pas de rôle structural au cours du développement ?

La localisation identique des régions exprimant la β -gal chez les souris +/- et -/- pourrait refléter une absence d'influence de la protéine STOP dans la mise en place des tissus neuronaux. Nos résultats confirment l'observation initiale d'une absence de perturbation

morphologique macroscopique chez la souris KO-STOP (Andrieux et coll., 2002). En effet l'anatomie globale du SNC est normale tant chez les souris +/- que -/-. De plus la cartographie d'expression du gène rapporteur lacZ chez les souris STOP homozygotes pour la mutation, où la protéine STOP est totalement absente et ce dès les premiers stades de développement, est la même que chez les souris STOP hétérozygotes, où la protéine STOP est présente. Avant d'aller plus loin pour tenter d'expliquer ce résultat, il faut confirmer la colocalisation de protéine STOP et β -galactosidase en réalisant, par exemple, des doubles marquages STOP/ β -gal chez les souris hétérozygotes pour la mutation. Si le résultat est confirmé, trois hypothèses pourraient permettre d'expliquer cette absence de différence. (i) La protéine STOP n'a aucun rôle dans le développement, ni structural, ni fonctionnel ; (ii) la protéine STOP a un rôle neurodéveloppemental mais qui est sans influence sur la mise en place des tissus qui l'expriment ; (iii) la protéine STOP pourrait avoir un rôle dans cette mise en place, mais celui-ci serait compensé en son absence.

2. Comportement et corrélations fonctionnelles

a. Dysfonctionnement du système olfactif accessoire ?

Les résultats obtenus dans l'expérience de rassemblement des petits au nid sont très surprenants. En effet, ils sont très différents de ceux obtenus initialement (Andrieux et coll., 2002), puisque non seulement les animaux « sauvages », en principe tout à fait capables de s'occuper correctement de petits (plus de 80% de petits ramenés au nid dans les expériences d'Andrieux et collaborateurs), ne ramènent pas plus de petits que les animaux mutés, mais qu'en plus ils se montrent extrêmement agressifs. Ce résultat n'a jamais été mis en évidence par Andrieux et collaborateurs avec les mêmes animaux (communication personnelle). Pourtant, et bien que cela dépende des souches de Souris ou de l'expérience préalable (comme l'exposition prénatale aux hormones d'embryons voisins, la présence de congénères ou d'une femelle gestante), il semble que dans de nombreuses souches de souris, les mâles présentent spontanément un fort taux d'infanticide (Gatewood et coll., 2006 ; Lonstein et De Vries, 2000). Si l'on considère que la souche de souris que nous utilisons est à l'inverse plutôt de type biparentale (Wynne-Edwards et Timonin, 2007), une hypothèse majeure pour tenter d'expliquer l'agressivité des mâles serait que la pièce expérimentale utilisée pour le test comportemental n'était pas réservée uniquement aux Souris mais avait déjà été le lieu d'expérimentation de rats. Le Rat est un prédateur de la Souris, et la Souris est particulièrement sensible aux odeurs et notamment aux phéromones qui jouent un rôle

important dans l'établissement de liens sociaux (Halpern et Martinez-Marcos, 2003). De ce fait, nous pouvons imaginer que l'odeur des rats (même après plusieurs semaines d'absence et une bonne aération) aurait mis les souris dans un très grand état d'anxiété sans aucun lien avec la présence des petits, les amenant, non seulement à ne pas s'en occuper, mais en plus à les agresser. Concernant les animaux mutés, leur absence d'agressivité pourrait corroborer l'hypothèse précédente et révéler leur incapacité à traiter correctement l'information extérieure, comme par exemple ici l'odeur des rats. Dans ce cas cependant, nous aurions pu attendre de ces animaux qu'ils présentent le même comportement que celui trouvé par Andrieux et collaborateurs (2002), à savoir une incapacité à ramener les petits au nid (moins de 5% de petits ramenés). Or nous obtenons un score d'environ 50%, difficilement explicable.

Une autre hypothèse pourrait expliquer ces différences de comportement. Si l'on considère cette fois que la souche de souris utilisée n'est pas naturellement biparentale, et que, de ce fait, l'agressivité des mâles « sauvages » est normale, il serait possible que la perte d'agressivité chez les souris STOP $-/-$ provienne d'un défaut de la fonction olfactive. En effet, il a été montré, non seulement que, privés d'organe voméronasal, des rats mâles vierges présentent un taux d'infanticide moins élevé que des animaux intacts, mais également qu'ils sont plus susceptibles de développer des comportements parentaux comme le rassemblement des petits ou la construction de nid (Mennella et Moltz, 1988). Par ailleurs, des souris dont la transduction voméronasale a été altérée présentent une perte d'agressivité, et particulièrement dans le test « résident/étranger » (Stowers et coll., 2002). Ce test, qui consiste en l'introduction d'un animal étranger dans une cage familière à une souris testée, montre que les animaux « sauvages » sont agressifs envers l'animal étranger, alors que les souris STOP ne présentent aucune agressivité dans la même situation (Andrieux et coll., 2002). On trouve également une diminution de l'agressivité au cours de ce test lorsque c'est la voie de transduction principale qui est altérée (Mandiyani et coll., 2005). Cette hypothèse d'une perturbation de la fonction olfactive pourrait peut-être expliquer l'absence d'agressivité des souris KO-STOP, perturbation qui ne toucherait pas tous les comportements liés à l'olfaction puisque dans le test de nourriture cachée impliquant la fonction olfactive, les souris KO-STOP semblent aussi performantes que les souris « sauvages » (Andrieux et coll., 2002).

b. Activité neuronale

Ayant précédemment pu mettre en évidence des aires cérébrales exprimant très spécifiquement le gène rapporteur lacZ, nous nous sommes demandés si des corrélations entre ces aires exprimant lacZ et les aires activées au cours du test de rassemblement de petits au

nid pouvaient exister. Pour cela, nous avons examiné les aires cérébrales activées lors de ce test comportemental, et nous avons recherché d'éventuelles différences entre les souris « sauvages » et mutées. En effet, puisque nous avons principalement mis en évidence une différence d'agressivité entre les souris « sauvages » et mutées, nous aurions pu attendre des différences d'activité neuronale comme dans le cas des souris sélectionnées pour leur latence (courte ou longue) à présenter des comportements d'attaque (SAL ou LAL : *short* ou *long latency attack*). Chez ces animaux, on observe des différences d'activité neuronale, traduites par le nombre de cellules *c-fos* positives, au niveau des aires suivantes, considérées comme les aires impliquées dans l'agressivité : septum latéral, noyau du lit de la strie terminale, amygdale médiale et centrale, noyau paraventriculaire de l'hypothalamus, noyau hypothalamique antérieur, noyau de la substance grise périaqueducale et locus cœruleus (Haller et coll., 2006). Dans notre travail, malgré une plus grande agressivité des souris « sauvages » comparativement aux souris STOP *-/-*, nous n'avons observé aucune différence dans le nombre de cellules *c-fos* positives pour ces structures entre les souris « sauvages » et mutées. Vu la très grande dispersion des données obtenues, il est possible que des différences potentielles aient été masquées. De plus, si l'hypothèse d'une anxiété des animaux liée à l'odeur résiduelle de Rat est juste, nous pourrions imaginer que le stress provoqué chez les animaux ait induit cette grande dispersion des données, rendant plus difficile la mise en évidence de potentielles différences. Par ailleurs, l'étude de comportements sociaux par *c-fos* pourrait être dépendante de l'espèce, puisque lorsque l'on compare des mâles ayant subi une défaite et des mâles contrôles, très peu de différences sont trouvées chez les Souris comparativement à d'autres espèces, comme le Rat ou le Hamster (Martinez et coll., 2002).

Pour conclure, bien que la grande dispersion de nos données fasse relativiser ce résultat, nous proposons que, testées pour leur capacité à présenter un comportement paternel, les souris STOP *-/-* ne présentent pas de différence dans l'activation d'aires cérébrales impliquées dans l'agressivité, comparativement aux souris témoins, et ce malgré l'existence de différences dans leur comportement.

3. Conclusions

La souris KO-STOP, privée de protéine STOP, présente un panel de comportements mimant certains aspects de la schizophrénie. La protéine STOP, exprimée dans l'ensemble du cerveau, possède un promoteur dont l'activité est particulièrement forte dans plusieurs aires cérébrales telles que la couche VII, l'hippocampe, l'hypothalamus, le cervelet, l'habénula, le

fasciculus retroflexus, le noyau interpedonculé et l'ensemble des aires du système olfactif. Nous verrons dans la discussion générale que ces régions ont pour la plupart déjà été corrélées, plus ou moins fortement, à la pathologie humaine.

De plus, placée dans une situation de rassemblement des petits au nid, la souris KO-STOP se comporte différemment de la souris « sauvage », présentant un taux d'infanticide beaucoup plus faible, et ramenant un nombre non négligeable de petits au nid. Ces comportements sont spécifiquement retrouvés chez des rongeurs dont la fonction olfactive est altérée.

L'étude de l'hypothèse selon laquelle la schizophrénie résulte d'un défaut de connectivité où la synapse serait l'élément perturbé nécessite d'examiner en détail les synapses des modèles animaux de la pathologie. Chez la souris KO-STOP, des perturbations synaptiques ont déjà été mises en évidence dans l'hippocampe, telles qu'une diminution de la densité de vésicules synaptiques et une altération de certaines formes de plasticité synaptique. Afin de savoir si ces perturbations synaptiques sont étendues à d'autres zones synaptiques, l'examen d'autres synapses est nécessaire. En effet, l'existence de perturbations synaptiques dans d'autres régions que l'hippocampe permettrait de conforter ce modèle de souris KO-STOP comme un bon modèle d'étude de l'hypothèse de dysconnexion de la schizophrénie.

Nous avons choisi cette autre zone synaptique dans une région où la protéine STOP est fortement exprimée. Pour cela, nos résultats, comme ceux d'Andrieux et collègues (Andrieux et coll., 2002) qui ont montré une forte expression de protéine STOP au niveau de l'hippocampe, du cervelet et du bulbe olfactif, nous ont amenés à nous focaliser sur le système olfactif et plus particulièrement sa première synapse : la synapse du glomérule du bulbe olfactif. En effet, cette région est intéressante à la fois d'un point de vue structurel mais également fonctionnel. L'organisation synaptique du bulbe olfactif étant bien décrite dans la littérature (Shepherd, 1972), son étude s'en trouve facilitée. De plus, le système olfactif est très impliqué dans l'établissement de comportements sociaux, comportements qui sont altérés chez les patients schizophrènes.

LE SYSTEME OLFACTIF : MODELE DE SYSTEME SYNAPTIQUE

Introduction

Le système olfactif est un système dont l'organisation synaptique est relativement simple, comparativement à d'autres systèmes sensoriels. L'information olfactive est captée par un premier neurone qui se projette directement sur la première structure centrale : le bulbe olfactif. Un second neurone relaie l'information jusqu'à des structures secondaires, corticales ou limbiques. La synapse principale entre ces deux neurones, localisée dans le glomérule du bulbe olfactif, est facilement identifiable. Au cours du développement, elle se met en place au moment où les paquets d'axones en croissance dans la placode olfactive atteignent le télencéphale (Gong et Shipley, 1995). Nous savons que, chez les rongeurs en particulier, les premiers jours de développement postnatals sont essentiels à mise en place des liens sociaux, tels que l'attachement à la mère, et notamment grâce à la voie olfactive et à sa grande plasticité (Moriceau et Sullivan, 2005). Nous avons pu vérifier précédemment que la protéine STOP est très fortement exprimée dans le système olfactif périphérique, et notamment les neurones récepteurs. Nous avons donc d'abord recherché à partir de quand, au cours du développement du système olfactif chez la souris « sauvage », la protéine STOP était exprimée. Ensuite, nous avons souhaité savoir si la mise en place d'apprentissages précoces se faisait normalement chez la souris KO-STOP. Pour cela, nous avons choisi de mettre en place, d'abord chez le Rat où de nombreuses expériences du même type ont déjà été réalisées, un test de conditionnement olfactif dans les premiers jours après la naissance. Ce type de test permet de vérifier si un animal peut apprendre à donner à un stimulus initialement neutre une valence positive ou négative selon le type de conditionnement. Enfin, nous avons étudié la morphologie de la synapse glomérulaire afin de tenter d'y repérer d'éventuelles perturbations synaptiques.

Expression prénatale de protéine STOP

Ayant constaté une expression intense de STOP chez l'adulte ainsi que du produit du gène rapporteur chez le petit dès la naissance, nous avons recherché à partir de quel stade de développement pré-natal la protéine STOP était exprimée dans le système olfactif. Pour cela

nous avons étudié son expression chez des fœtus aux stades 10, 11, 14, 15 et 17 jours prénatals (Figure 23A-J).

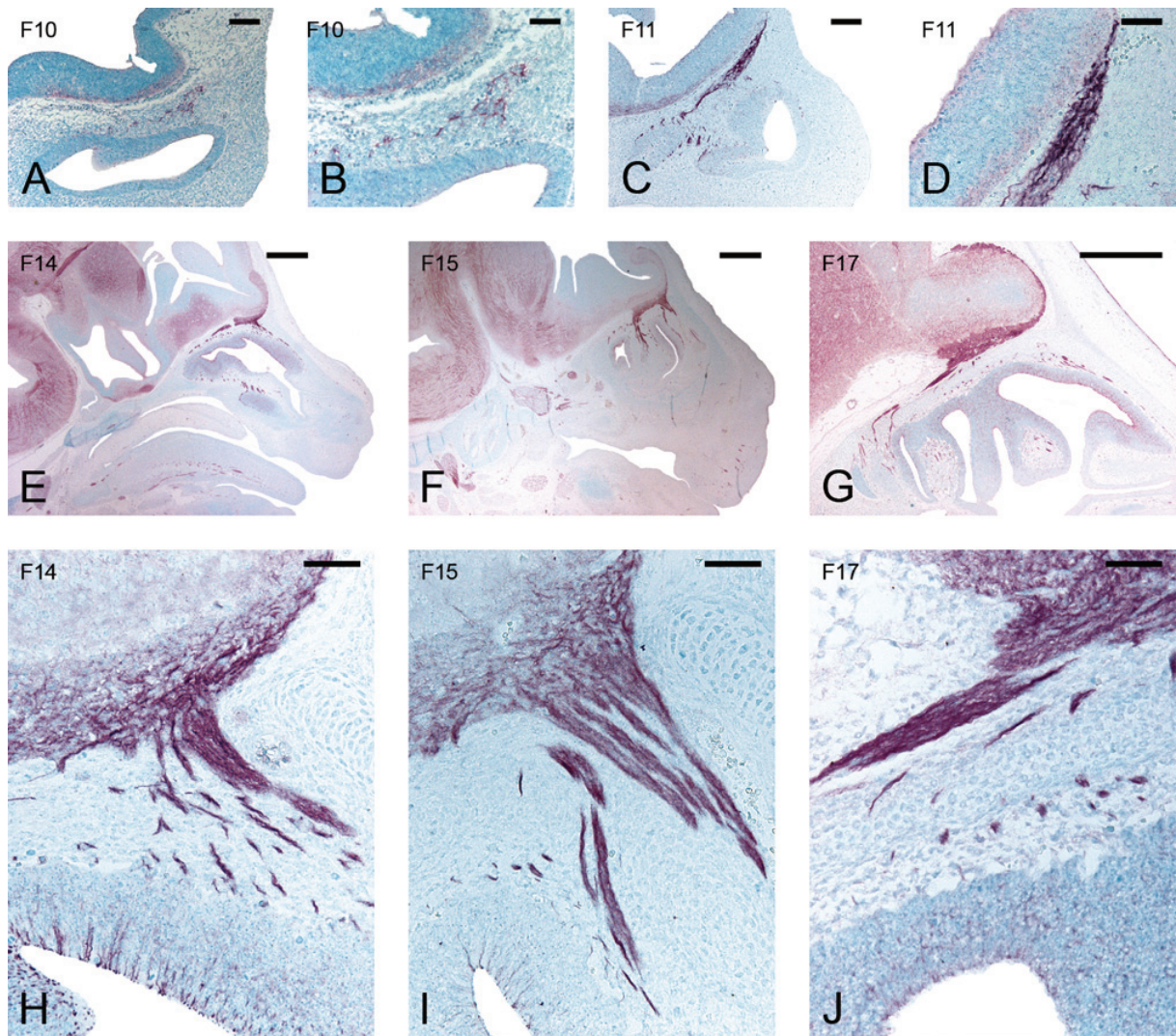


Figure 23 : Immunomarquages de protéine STOP sur des coupes sagittales au niveau du système olfactif de fœtus de souris « sauvages » au cours du développement prénatal (A-J). Stades 10 (A, B), 11 (C, D), 14 (E, H), 15 (F, I) et 17 (G, J) jours prénatals. Echelles : A, C 100 μm ; B, D, H-J 50 μm ; E-G 500 μm.

A F10, au moment où la placode olfactive s'invagine en une unique fosse nasale, les prolongements axoniques et les cellules migratrices émergeant de la base de l'épithélium sont STOP positifs (Figure 23A, B). A F11, les fibres et les cellules qui migraient vers le télencéphale et qui atteignent le primordium de bulbe olfactif expriment également la protéine STOP (Figure 23C, D). A F14, F15 et F17, les axones des neurones olfactifs qui se projettent sur le bulbe olfactif et leurs dendrites expriment la protéine STOP (Figure 23E-J). On note à F14 que les axones des neurones de l'organe voméronasal sont également marqués (Figure 23E).

Nous concluons donc que la protéine STOP est exprimée par le système olfactif dès sa mise en place, très précocement au cours du développement. Nous avons émis l'hypothèse que les mécanismes de plasticité synaptique au niveau de la voie olfactive chez les souris KO-STOP pourraient être perturbés du fait de l'absence de protéine STOP. Pour tenter de le vérifier, nous avons souhaité mettre en place un test simple de renforcement synaptique impliquant la voie olfactive, comme le test de conditionnement olfactif largement utilisé chez le rat.

Tentative d'examen d'une perturbation du renforcement synaptique

Nous avons réalisé un grand nombre d'expériences, chez le rat, afin de tenter de reproduire le test de conditionnement olfactif et de mettre en place un test d'inhibition latente comme cela a déjà été réalisé pour de l'aversion olfactive conditionnée (Peterschmitt et coll., 2007). Rappelons que l'inhibition latente est un des tests classiques utilisés pour l'étude de modèles animaux de schizophrénie (Lubow, 2005). Pour réaliser ces expériences, nous avons utilisé le test de double-choix olfactif en nous basant sur des expériences réalisées par Sullivan et ses collaborateurs. Un conditionnement associant une odeur (menthe ou citral) avec un stimulus conditionnel (caresses au pinceau ou lait maternel) montre une préférence du raton le jour suivant pour cette odeur (Sullivan et Leon, 1987 ; Sullivan et coll., 1994). Face à l'impossibilité de conditionner les animaux, nous avons répété les expériences en faisant varier certains paramètres qui auraient pu être mal contrôlés.

1. Effet du conditionnement

Contrairement aux résultats publiés dans la très abondante littérature concernant le test comportemental de conditionnement, dans toutes nos expériences¹⁸ de conditionnement positif (association CS+UCS), les animaux « conditionnés » (CS+UCS) ne passent jamais significativement plus de temps au-dessus du compartiment contenant le stimulus conditionnel que les animaux non conditionnés (CS seul), et même s'ils ont été conditionnés pendant 4 jours précédant le test (Figure 24).

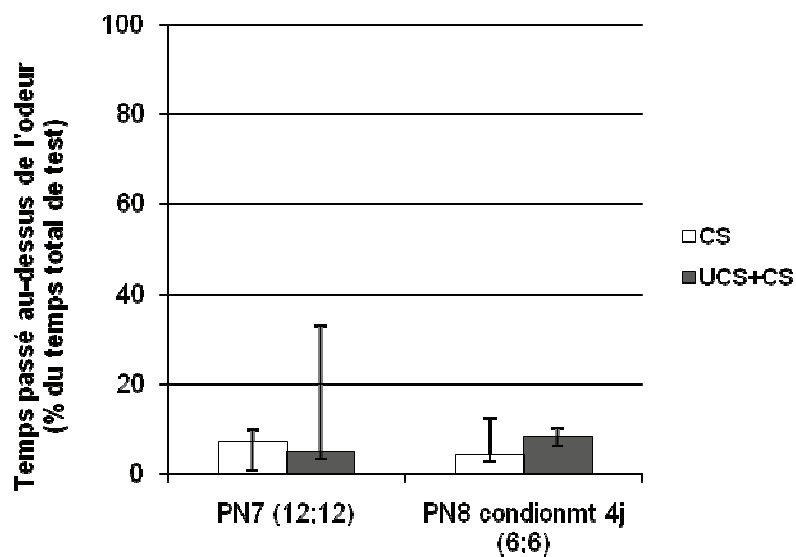


Figure 24 : Proportion (médiane et quartiles) de temps passé au-dessus de l'odeur par des rats Wistars (PN7 ou PN8 au moment du test) conditionnés la veille ou les 4 jours précédents (association de caresses au pinceau et d'odeur de menthe).

Nous n'avons pas non plus trouvé de différence statistiquement significative lorsqu'un groupe a été pré-exposé (CS puis CS+UCS) par comparaison avec un groupe non pré-exposé mais conditionné (CS+UCS) (Figure 25).

¹⁸ L'ensemble des résultats des tests effectués pour évaluer l'effet du conditionnement sont regroupés dans le Tableau 14.

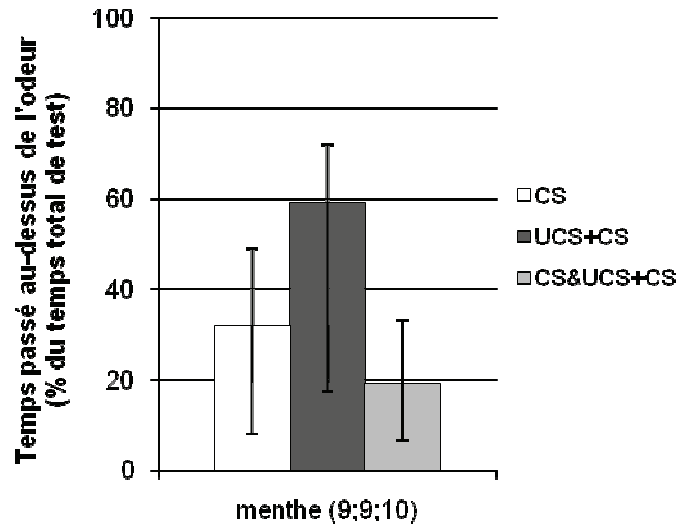


Figure 25 : Proportion (médiane et quartiles) de temps passé au-dessus de l'odeur par des rats Sprague-Dawley (PN8 au moment du test) pré-exposés au stimulus conditionnel l'avant-veille et conditionnés la veille (association de caresses au pinceau et d'odeur de menthe).

Diverses expériences supplémentaires ont été réalisées pour tenter de résoudre ce problème et corriger l'approche expérimentale. Nous avons fait varier de nombreux facteurs pour essayer d'obtenir des animaux passant plus de temps au-dessus du stimulus conditionnel après conditionnement (Tableau 12). Dans aucun des cas nous ne trouvons d'effet significatif du conditionnement sur le comportement des rats. Par exemple, que nous fassions varier l'âge des rats (Figure 26), l'expérimentateur (Figure 27), ou la quantité de stimulus conditionnel (Figure 28) nous ne montrons aucun conditionnement des animaux. Notons qu'excepté lorsque nous avons testé le facteur « expérimentateur », l'ensemble des expériences a été réalisée par 1 seule et même personne.

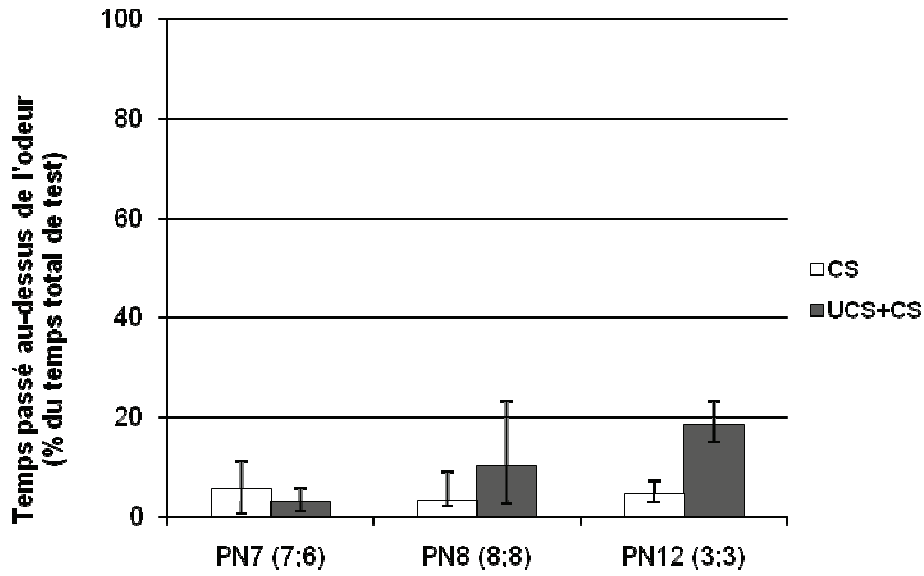


Figure 26 : Proportion (médiane et quartiles) de temps passé au-dessus de l'odeur par des rats Wistars (PN7, PN8 ou PN12 au moment du test) conditionnés la veille (association de caresses au pinceau et d'odeur de menthe).

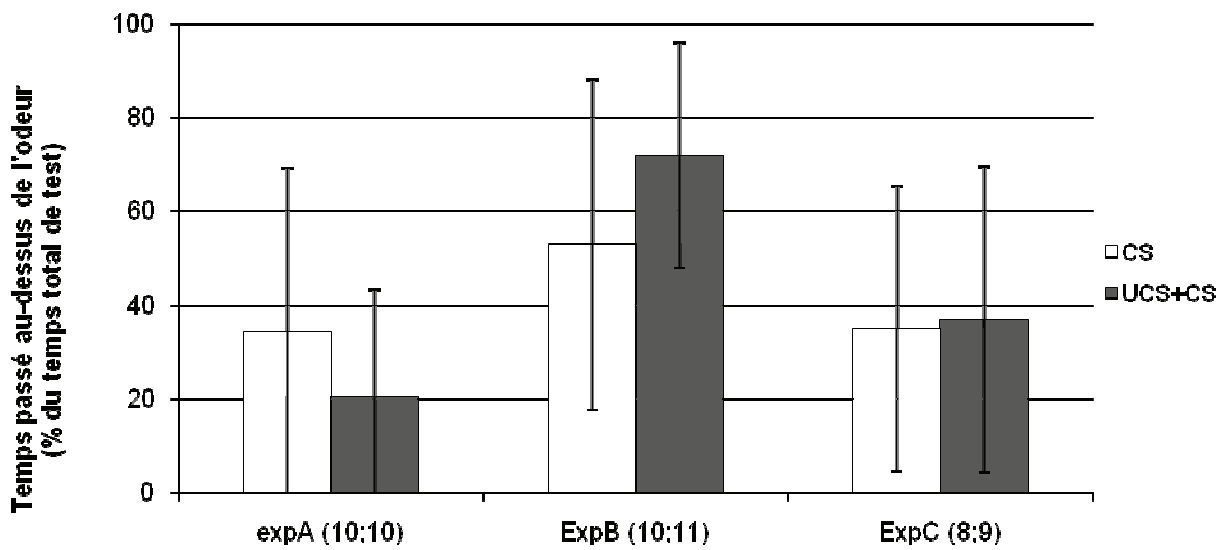


Figure 27 : Proportion (moyennes et écart-types) de temps passé au-dessus de l'odeur par des rats Sprague-Dawley (PN7 au moment du test) conditionnés par l'expérimentateur A, B ou C la veille (association de caresses au pinceau et d'odeur de menthe).

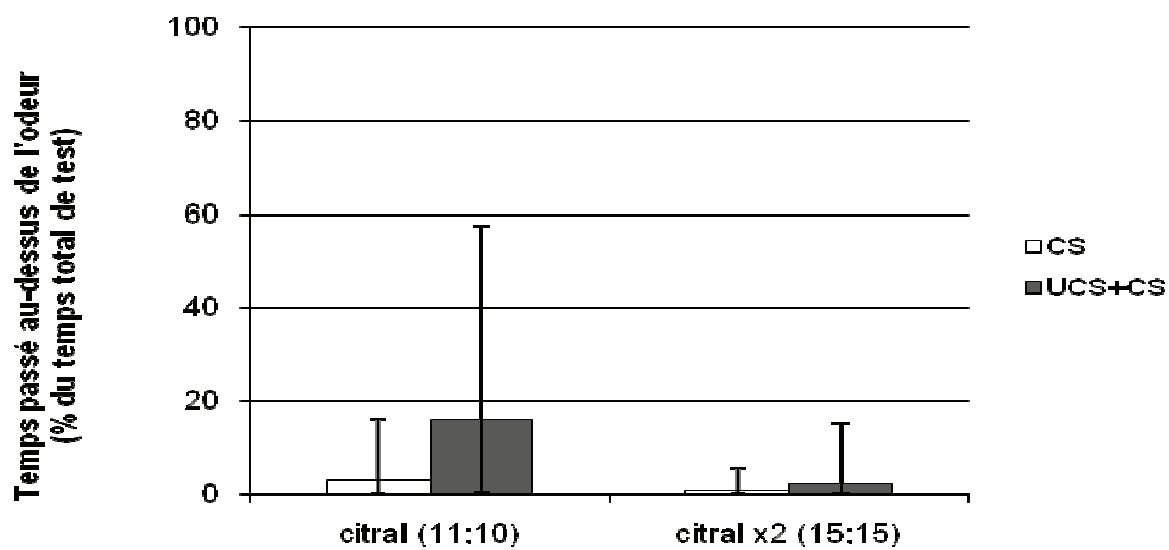


Figure 28 : Proportion (médiane et quartiles) de temps passé au-dessus de l'odeur par des rats Sprague-Dawley (PN7 au moment du test) conditionnés la veille (association de caresses au pinceau et d'odeur de citral ou de citral en quantité 2 fois supérieure).

Numéro d'expérience	Souche Rat (W : wistar ; S : sprague)	Délais (h)	Odeur	Jour conditionnement	Jour test	Jour préexposition	Expérimentateur	Animaux CS&UCS+CS		Animaux UCS+CS		Animaux CS		Statistique et valeur de <i>p</i>
								<i>n</i>	Médiane (Q1;Q3)	<i>n</i>	Médiane (Q1;Q3)	<i>n</i>	Médiane (Q1;Q3)	
I	W	24	Menthe	PN6	PN7	-	A	-	4,83(3,25;3,33)	12	7,00(0,58;9,92)	[U=143,00;p=0,71]		
II	W	24	Menthe	PN1&5&6&7	PN8	-	A	-	8,17(6,25;10,08)	6	4,17(2,83;12,50)	[U=33,00;p=0,38]		
III	W	3	Menthe	PN7	PN7	-	A	-	3,00(1,00;5,67)	7	5,50(0,50;11,00)	[U=44,00;p=0,83]		
IV	W	3	Menthe	PN8	PN8	-	A	-	10,33(2,67;23,33)	8	3,17(2,00;9,08)	[U=58,50;p=0,34]		
V	W	3	Menthe	PN12	PN12	-	A	-	18,33(15,00;23,33)	3	4,67(2,83;7,17)	[t=2,63;p=0,06]		
VI	S	24	Menthe	PN7	PN8	PN6	A	10	19,21(6,75;33,31)	9	59,02(17,50;72,08)	[t=0,88;P=0,43]		
VII	S	24	Menthe x4	PN6	PN7	-	A	-	11,33(2,50;38,67)	10	28,83(2,33;62)	[t=1,06;p=0,30]		
VIII	S	24	Menthe x4	PN6	PN7	-	B	-	82,33(62,35;85,65)	11	45,17(28,50;86,53)	[t=1,46;p=0,16]		
IX	S	24	Menthe x4	PN6	PN7	-	C	-	19,33(18,33;66,67)	9	21,67(13,67;64,58)	[t=0,13;p=0,90]		
X	S	24	Citral	PN7	PN8	-	A	-	16,00(0,33;57,67)	11	3,00(0,17;16,00)	[U=97,00;p=0,38]		
XI	S	24	Citral x2	PN7	PN8	-	A	-	2,00(0,17;15,17)	15	0,67(0,00;5,67)	[U=212,00;p=0,41]		

Tableau 14 : Expériences de conditionnement réalisées, leurs résultats, statistiques et valeurs de *p*.

2. Effet de l'odeur

L'odeur, stimulus particulièrement important dans notre paradigme, a été testée indépendamment dans un test de double-choix sans conditionnement. Comparativement à ce que nous aurions pu attendre si le comportement des animaux était dû au hasard (temps passé au-dessus de l'odeur = 50%), le citral pur se révèle significativement aversif [$p=0,01$], alors que la menthe diluée au $\frac{1}{4}$ ne présente pas de valence hédonique [$p=0,75$]. En effet, le temps passé par les rats au-dessus de l'odeur de menthe est significativement plus grand que celui passé au-dessus du citral [$U=139,50;p=0,04$] (Figure 29).

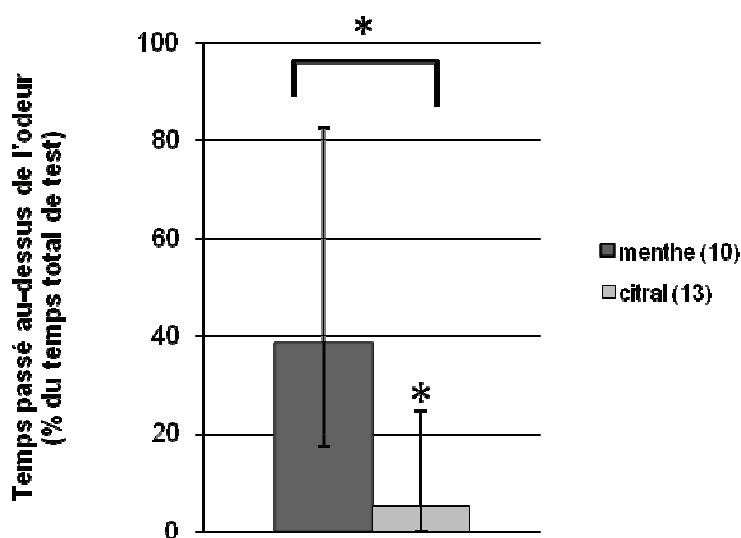


Figure 29 : Pourcentage (médiane et quartiles) de temps passé au-dessus de l'odeur de menthe ou citral par des rats (PN8) Sprague-Dawley naïfs. * : $p<0,05$.

3. Effets de la concentration de l'odeur et de l'âge des rats

Les effets de la concentration en citral et de l'âge des rats sur l'exploration des différents compartiments (odorisé ou non) ont été testés (Figure 30). Aucun effet statistiquement significatif de la concentration [$A=1,09;p=0,39$] n'est trouvé ; la puissance de ce test est de 0,37¹⁹. En revanche, un effet de l'âge, statistiquement significatif au seuil $\alpha=5\%$, est trouvé [$A=5,66;p=0,01$] : les animaux passent moins de temps [$p=0,01$] au-dessus de l'odeur lorsqu'ils sont âgés de 6 jours postnatals [$22,06\pm 15,34$] comparativement à 8 jours postnatals [$37,22\pm 18,90$]. Cette différence n'apparaît pas si l'on compare leur comportement entre 6 et 7 jours [$p=1$] ou entre 7 et 8 jours postnatals [$p=0,39$].

¹⁹ Une bonne puissance est aux alentours de 0,80. Il aurait fallu augmenter le nombre d'animaux pour augmenter la puissance mais comme nous l'avons déjà souligné, c'est éthiquement et expérimentalement difficile.

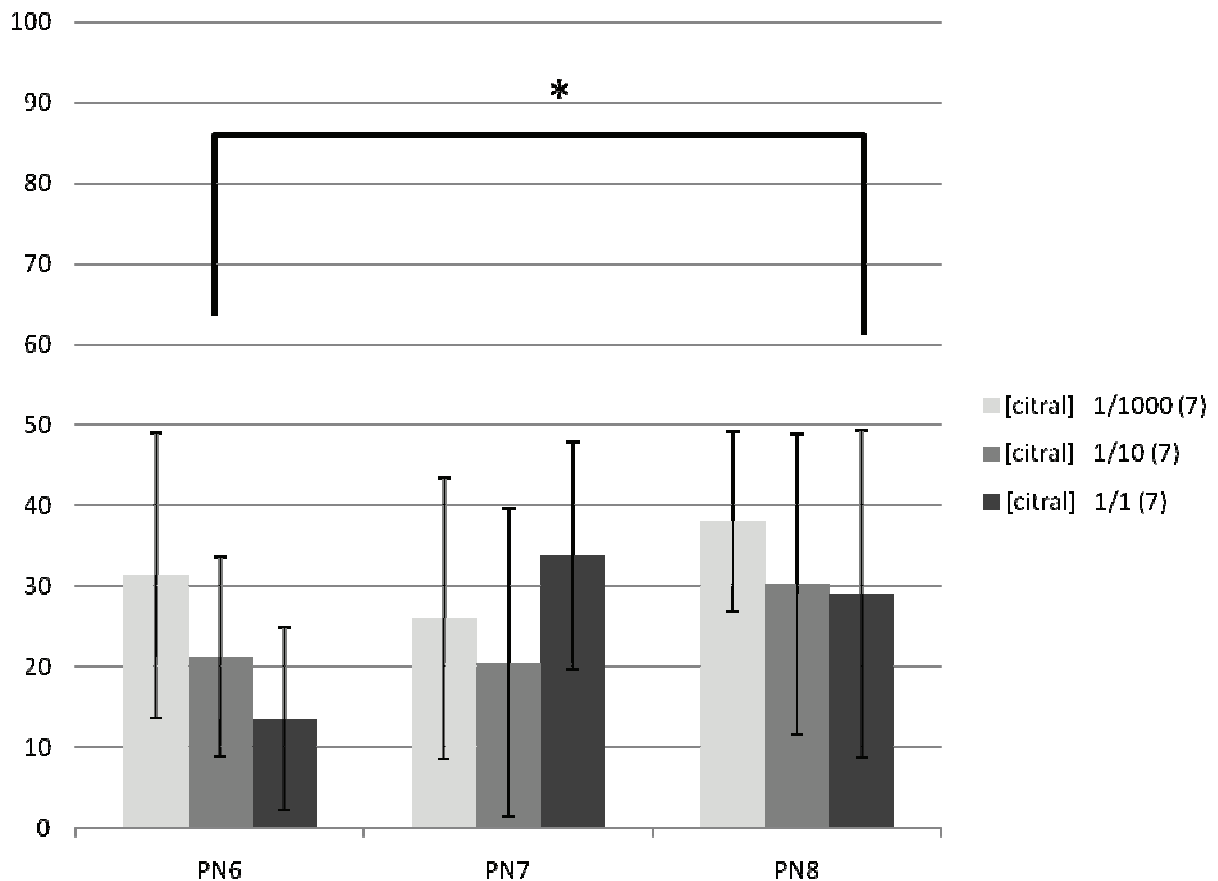


Figure 30 : Pourcentage (moyennes et écarts-types) de temps passé par les rats ($n=7$ par groupe) au dessus d'un compartiment contenant ou non l'odeur de citral à différentes concentrations ($1/1000^e$, $1/10^e$, 1) et au cours du temps (6, 7 et 8 jours postnatals).

Pour conclure, n'ayant pas réussi à mettre au point le test comportemental de conditionnement olfactif chez le Rat alors qu'il avait déjà été réussi au laboratoire il y a quelques années, nous avons décidé de ne pas poursuivre l'étude chez la Souris.

Le glomérule, siège de dysconnexions ?

Nous nous intéressons au glomérule du bulbe olfactif pour plusieurs raisons. D'abord, c'est le premier relais d'intégration de l'information olfactive, zone synaptique par excellence, où pourraient avoir lieu des dysfonctionnements chez la souris KO-STOP, comme c'est le cas au niveau de l'hippocampe. Ensuite, c'est une structure anatomiquement très facile à repérer. Enfin, la protéine STOP est très fortement exprimée dans les axones des neurones olfactifs qui font synapse avec les dendrites des cellules mitrales.

Nous avons décidé d'étudier l'expression de plusieurs molécules synaptiques classiquement étudiées dans la schizophrénie (cf. page 18). La synaptophysine nous permet d'estimer la densité des vésicules synaptiques. Le GAP43 nous donnera des informations sur

les neurones en croissance. La GFAP sera un indicateur d'astroglie potentielle. L'OMP, protéine de marquage du système olfactif (*olfactory marker protein*), est une protéine de 20 kDa retrouvée spécifiquement dans les neurones olfactifs matures (Margolis, 1972).

Nous examinons 2 lots de souris, jeunes (3 mois) et âgées de 1 an. Préalablement à l'étude des marqueurs, un certain nombre de mesures morphologiques ont été réalisées.

1. Morphologie

Nous avons souhaité vérifier, au niveau des glomérules du bulbe olfactif, que les souris KO-STOP ne présentent pas de différence anatomique majeure, comparativement aux souris « sauvages », comme cela a été proposé par Andrieux et collaborateurs (Andrieux et coll., 2002). Pour cela nous avons mesuré le poids des animaux, la surface moyenne des bulbes olfactifs ainsi que celle des glomérules sur les groupes de souris utilisés ensuite dans l'étude du glomérule.

a. Poids des animaux

A 3 mois et à 1 an (Figure 31), les souris « sauvages » et les souris homozygotes pour la mutation présentent un poids semblable ($[t=1,75;p=0,11]$ et $[t=0,17;p=0,88]$, respectivement).

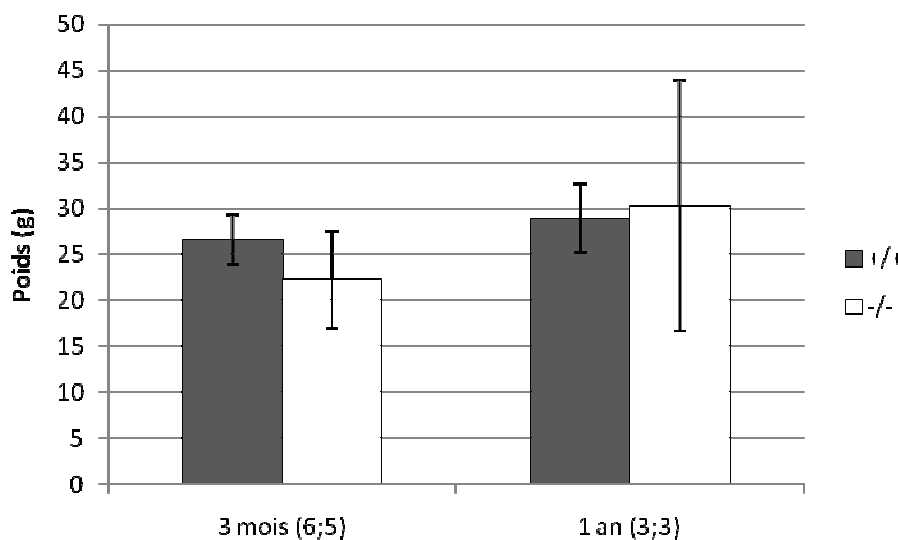


Figure 31 : Poids (moyennes et écart-types) de souris « sauvages » (+/+) et homozygotes pour la mutation STOP (-/-) à 3 mois et 1 an.

b. Surfaces

- Surfaces des bulbes olfactifs

A 3 mois, aucune différence statistiquement significative n'est trouvée entre les surfaces des bulbes olfactifs de souris « sauvages » et homozygotes pour la mutation STOP

[$U=38;p=0,78$]. A 1 an (Figure 32), comparativement aux souris « sauvages » [$5,13\pm 0,26$ mm²], les souris homozygotes pour la mutation [$3,92\pm 0,21$ mm²] présentent une surface moyenne des bulbes olfactifs plus petite [$t=6,21;p<0,01$].

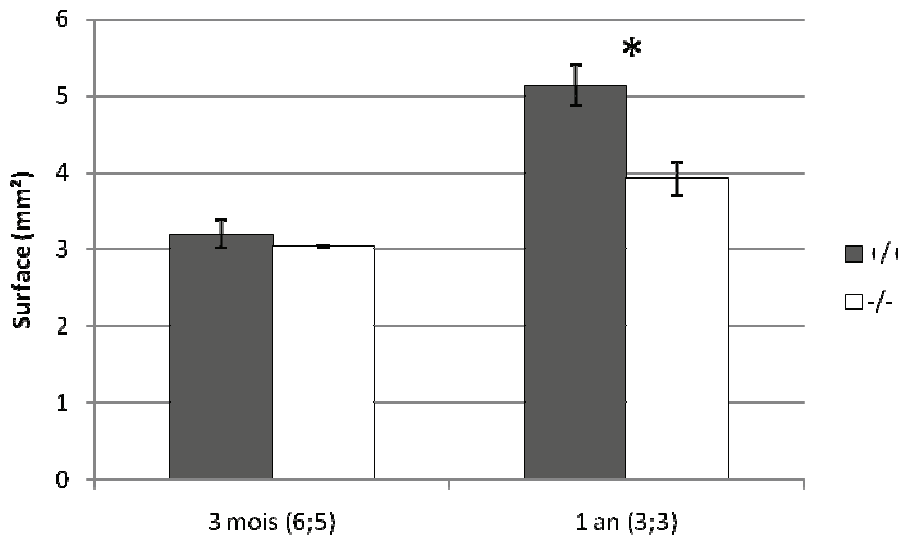


Figure 32 : Surface moyenne de bulbes olfactifs de souris « sauvages » (+/+) et homozygotes pour la mutation STOP (-/-) à 3 mois (médianes et quartiles) et 1 an (moyennes et écart-types). * : $p<0,05$.

- Surfaces des glomérules

Compte tenu des différences de surface moyenne des bulbes olfactifs, nous avons examiné la surface moyenne des glomérules en la rapportant à celle des bulbes. A 3 mois et 1 an, aucune différence ([$t=0,39;p=0,71$] et [$t=1,25;p=0,28$], respectivement) de surface des glomérules n'est trouvée entre les souris « sauvages » et mutées pour la protéine STOP (Figure 33).

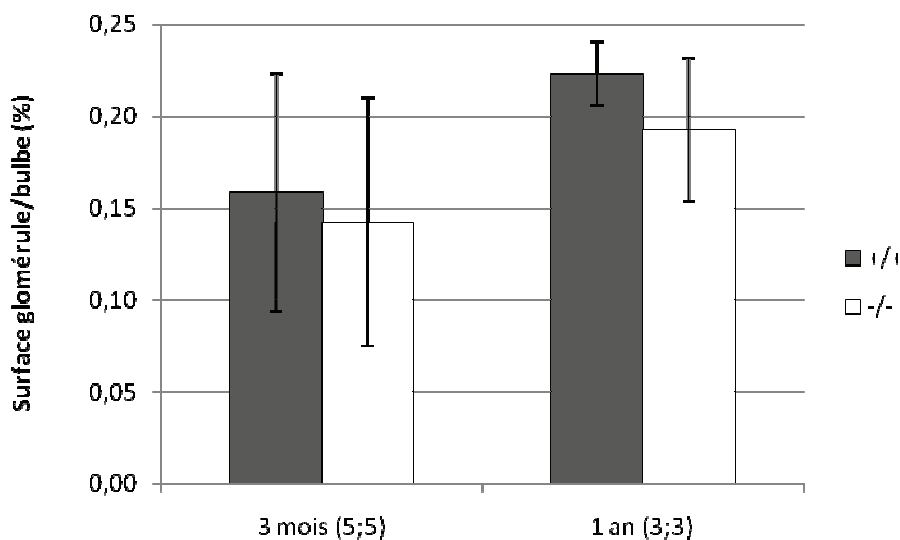


Figure 33 : Pourcentage de surface de glomérule par rapport à la surface du bulbe (moyennes et écart-types) de glomérules de souris +/+ et -/- de 3 mois et 1 an.

c. Surface des axones des neurones olfactifs à 1 an

Sachant qu'à 1 an, les bulbes des souris mutées pour la protéine STOP sont plus petits que ceux des souris « sauvages », nous avons souhaité vérifier qu'il n'y avait pas de différence dans la quantité de fibres olfactives arrivant de la muqueuse jusqu'au glomérule. En effet, nous nous intéresserons tout particulièrement à ces terminaisons pré-synaptiques dans la suite du travail. Nous avons donc mesuré la surface des fibres OMP-positives pour chaque génotype en la rapportant à la surface des glomérules (Figure 34). L'OMP marque spécifiquement les neurones olfactifs et donc leurs axones dans les glomérules. Chez les souris mutées, à 1 an, ce rapport n'est pas significativement différent de celui obtenu pour les souris « sauvages » [$t=1,93;p=0,13$]. La puissance de ce test est de $0,32^{20}$.

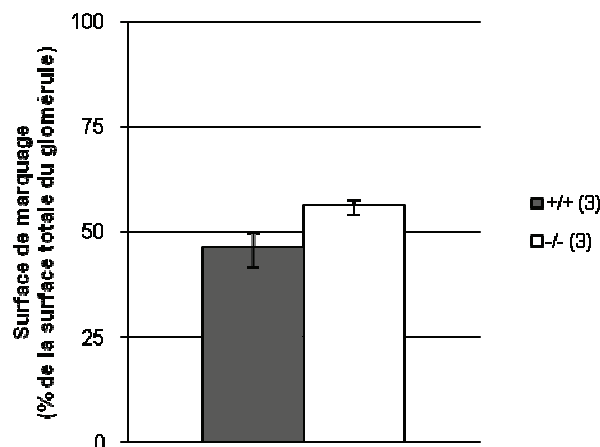


Figure 34 : Surfaces (médiane et quartiles) des fibres OMP positive rapportée à la surface des glomérules chez des souris +/+ et -/- de 1 an

2. Etude de l'expression de marqueurs

Pour tous les antigènes choisis (synaptophysine, GFAP, GAP43, OMP), l'observation en microscopie photonique, du seul point de vue qualitatif, ne permet pas de déceler de différence d'intensités de marquage (Figure 35).

²⁰ Dans ce cas précis, des groupes de 8 animaux devraient permettre d'obtenir une puissance de 0,80.

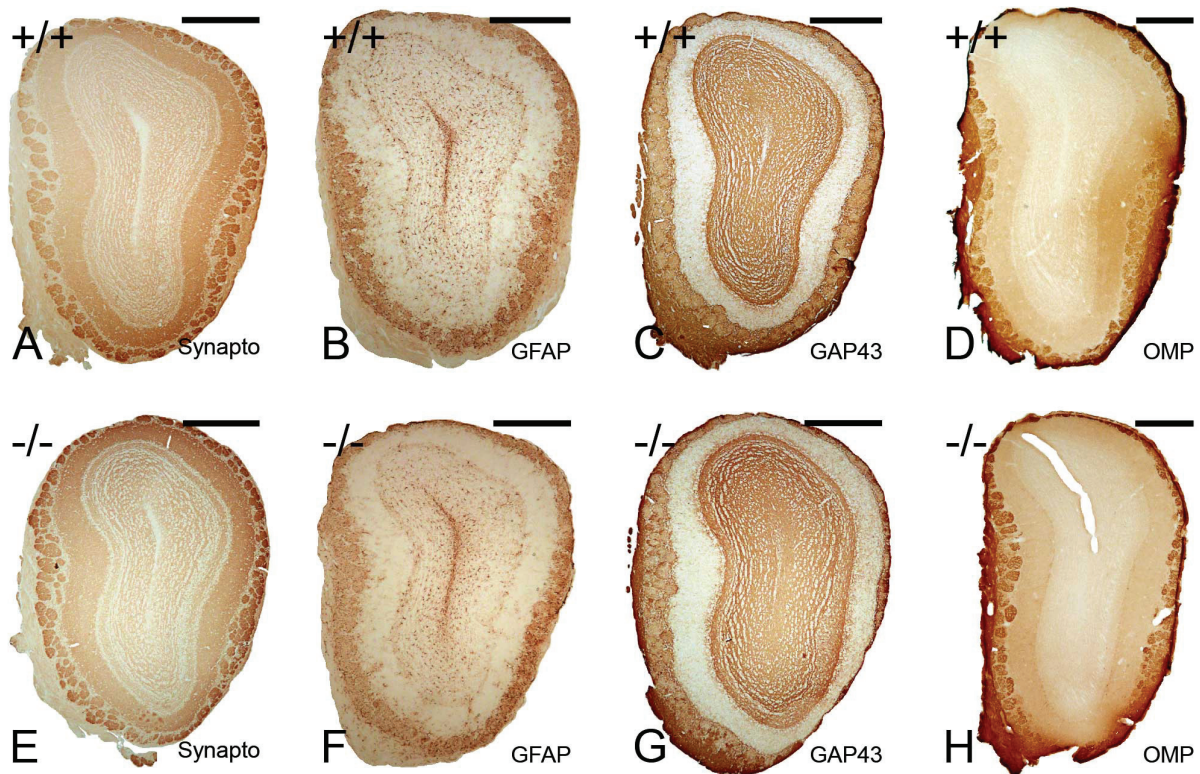


Figure 35 : Immunomarquages en synaptophysine (A, E), GFAP (B, F), GAP43 (C, G) et OMP (D, H) de coupes coronales de bulbe olfactif de souris +/+ (A-D) et -/- (E-H). Echelles : A-H 500 μ m.

Nous avons donc choisi d'estimer semi-quantitativement l'expression de ces marqueurs grâce à la technique de densité optique absolue. Cette technique nécessite les précautions méthodologiques décrites dans la section « Matériel et méthodes ».

a. Souris jeunes

A 3 mois, aucune variation significative (Figure 36) de densité optique absolue moyenne de synaptophysine [$t=0,92;p=0,39$] ni GFAP [$t=0,56;p=0,60$] n'est mise en évidence dans les groupes de souris homozygotes (-/-) pour la mutation comparativement aux souris « sauvages » (+/+). Notons que la puissance de ces tests est de 12 et 7% pour la synaptophysine et le GFAP, respectivement²¹. Pour le GAP43, nous observons une diminution statistiquement significative [$t=3,06;p=0,01$] de la densité optique absolue chez les souris -/- [$0,257\pm 0,005$] comparativement aux souris +/+ [$0,265\pm 0,004$].

²¹ Là encore, seule l'utilisation de deux groupes de 50 animaux chacun aurait permis d'atteindre une puissance de 80%.

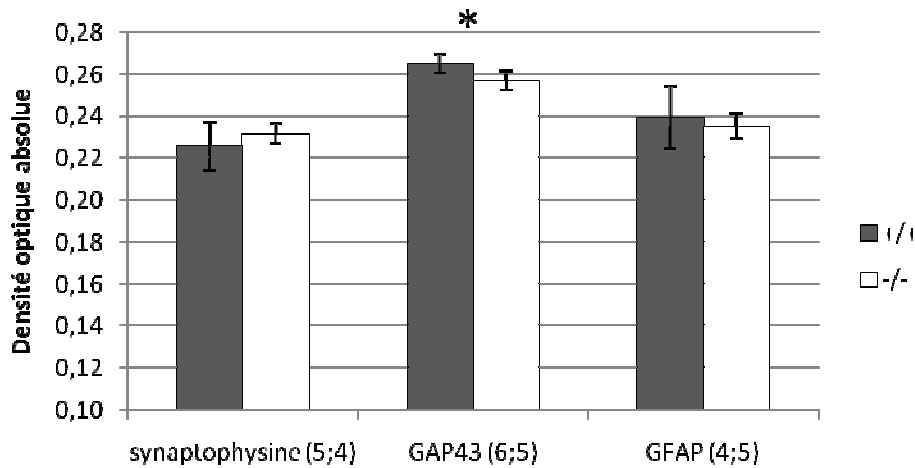
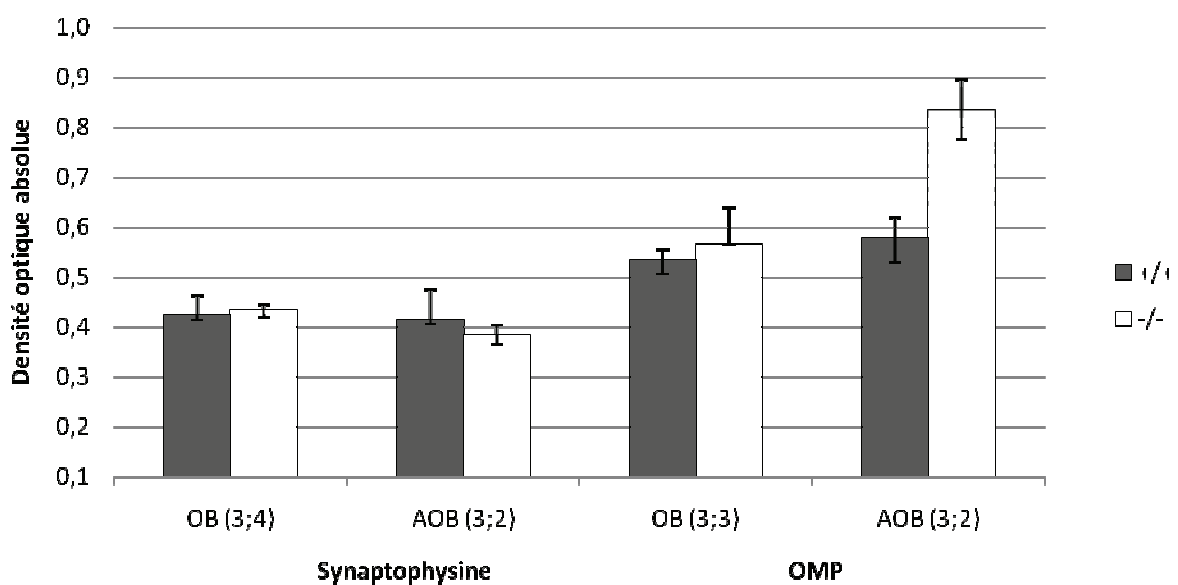


Figure 36 : Densité optique absolue (moyennes et écarts-types) de synaptophysine, GAP43 et GFAP dans la couche glomérulaire du bulbe olfactif principal de souris +/+ et -/- âgées de 3 mois. $p < 0,05$.

b. Souris âgées

A 1 an, les souris homozygotes pour la mutation ne semblent pas présenter de différence significative de densité optique absolue en synaptophysine ni OMP (Figure 37) comparativement aux souris « sauvages ». Cela est vrai, que nous considérons le bulbe olfactif principal ($[t=0,47; p=0,66]$ pour la synaptophysine - puissance 6% -, et $[t=1,49; p=0,21]$ pour l'OMP - puissance 21%²² -) ou le bulbe accessoire ($[U=5,00; p=0,77]$ et $[U=9,00; p=0,15]$, respectivement), bien que la densité optique en OMP dans cette dernière structure semble plus élevée chez les souris -/- $[0,835(0,775; 0,895)]$ que chez les souris +/+ $[0,578(0,529; 0,619)]$.



²² Dans ce cas précis, des groupes de 12 animaux devraient permettre d'obtenir une puissance de test de 80%.

Figure 37 : Densité optique absolue (médiane et quartiles) de synaptophysine et OMP dans la couche glomérulaire des bulbes olfactifs principal (OB) et accessoire (AOB) de souris +/+ et -/- âgées de 1 an.

3. Ultrastructure

Nous montrons de manière spécifique chez la souris mutée des anomalies des terminaisons axonales des neurones olfactifs sous la forme de dilatations (Figure 38) contenant des réseaux vésiculo-tubulaires (Figure 38C-D) et/ou des enroulements myéliniques (Figure 38B, D). Les enroulements myéliniques sont différents des grains de lipofuscine, qu'on trouve dans les corps cellulaires des neurones des souris « sauvages » et mutées, et surtout chez les animaux les plus âgés. Ces anomalies ne se retrouvent pas dans la fibre olfactive elle-même ni dans d'autres régions du bulbe (couche plexiforme, couche des grains).

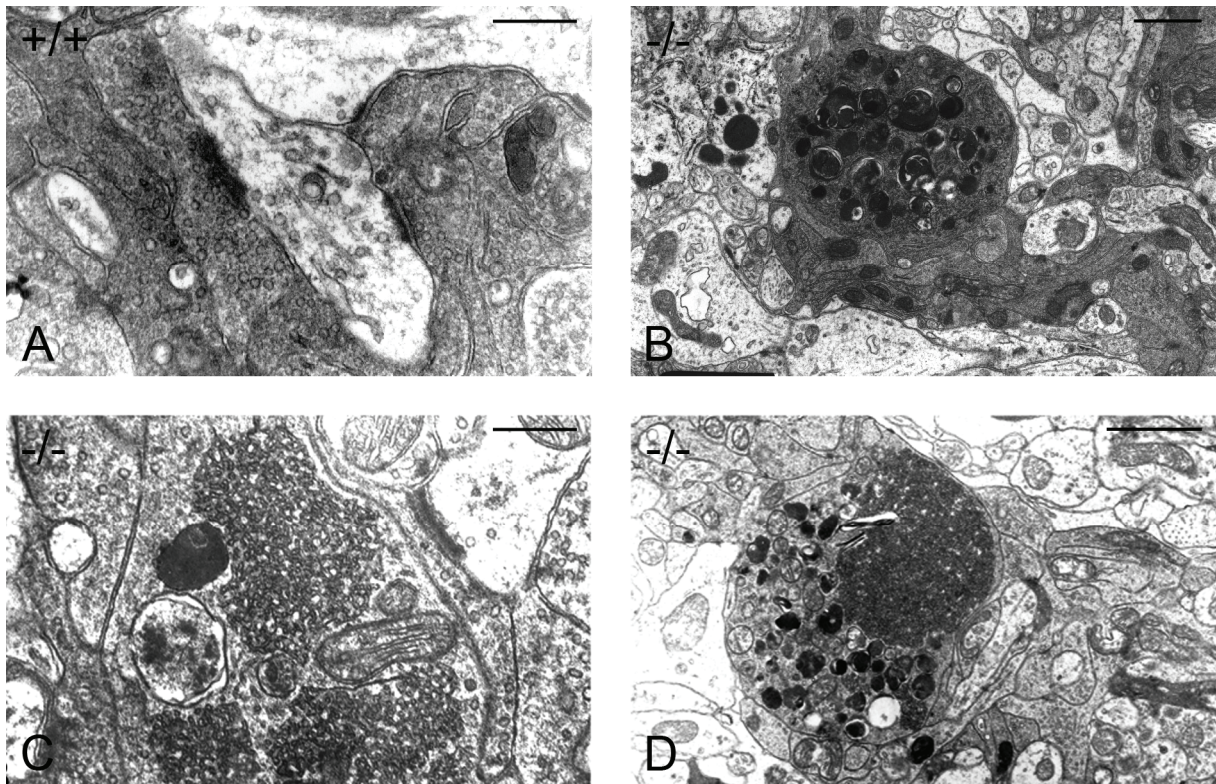


Figure 38 : Photographies au microscope électronique du glomérule olfactif de souris +/+ (A) et STOP -/- où les terminaisons axonales des neurones olfactifs, denses aux électrons, sont remplies d'enroulements myéliniques(B), de réseaux vésiculo-tubulaires (C) ou des deux (D). Echelles : A, C, 0,5 μ m ; B, D, 1 μ m.

Discussion

1. Expression prénatale de protéine STOP

Nous avons pu mettre en évidence que la protéine STOP est exprimée dans le système olfactif de Souris dès les tout premiers stades de développement, à 10 jours prénatals, et fort probablement en continu jusqu'à l'âge adulte, puisqu'on la retrouve chez les animaux adultes,

et que son promoteur présente une forte activité aux stades postpartum. Chez le rat, la protéine STOP avait déjà été trouvée dans les ganglions spinaux d'embryons de 14 jours (Guillaud et coll., 1998), confirmant son expression très précoce au cours du développement du système nerveux chez les rongeurs.

2. Tentative d'examen d'une perturbation du renforcement synaptique

L'étude au niveau du système olfactif d'une potentielle perturbation du renforcement synaptique chez la souris KO-STOP n'a pas pu être menée à terme. En effet, nous n'avons pas pu reproduire de conditionnement olfactif chez le raton. Pourtant, plusieurs expériences de conditionnement précoce sont décrites dans la littérature, non seulement chez le rat, mais également chez l'Homme. Ces expériences ont montré, par exemple, que les nouveau-nés humains s'orientent préférentiellement vers l'odeur corporelle de leur mère plutôt que vers celle d'une mère non familière (Macfarlane, 1975 ; Cernoch et Porter, 1985 ; Schaal et coll., 1986). De plus, on sait que les nouveau-nés dont les mères ont consommé un aliment particulier (anis, carotte) pendant la grossesse expriment une préférence pour cette odeur, contrairement aux enfants dont la mère n'en a pas consommé (Schaal et coll., 2000 ; Mennella et coll., 2001, respectivement). Enfin, il a très récemment été montré que les nouveau-nés, exposés dès la naissance à l'odeur de camomille lors de la tétée, présentent une préférence pour cette odeur dès l'âge de 3-4 jours, préférence qu'on ne retrouve pas chez les enfants n'ayant pas été exposés à cette odeur (Delaunay-El Allam et coll., 2007).

Le conditionnement olfactif chez le Rat ayant été préalablement mis en place au laboratoire (Samama et Boehm, 1999), nous restons persuadés qu'une erreur méthodologique s'est glissée dans nos expériences que nous n'avons pourtant pas réussi à identifier. En effet, malgré un changement de souche de Rat, nous n'avons pas pu mettre en place de conditionnement. Bien que des différences de réactivité aux odeurs aient déjà pu être montrées entre les ratons Sprague-Dawley et Wistar, ces derniers présentent peut-être une immaturité locomotrice qui pourrait poser problème pour l'interprétation de tests (Cornwell-Jones et Sobrian, 1977). Concernant des variations dans la durée de conditionnement ou l'âge de test des petits, qui n'ont pas changé les résultats obtenus, de nombreux protocoles expérimentaux différents sont observés dans la littérature qui, tous, fonctionnent. Pour ne citer que quelques études : un conditionnement les 8 premiers jours postnatals permet la rétention d'une odeur par des ratons âgés de 19 jours (Woo et Leon, 1987) ; un conditionnement pendant 18 jours après la naissance induit une préférence pour l'odeur au 20^e jour (Sullivan et

coll., 1989) ; conditionnés au jour 6 postpartum, les rats de 7 jours passent plus de temps au-dessus de l'odeur (Sullivan et coll., 1991 ; Weldon et coll., 1997) ; conditionnés au jour 7, les rats montrent une préférence pour l'odeur au jour 8 (McLean et coll., 1993) ; conditionnés les 11 premiers jours après la naissance, les rats montrent une préférence olfactive au 12^e jour (Samama et Boehm, 1999). Par ailleurs, nous ne montrons pas d'effet de la concentration de l'odeur, bien qu'elle puisse avoir une influence au cours du conditionnement sur son attractivité ultérieure, sans pour autant empêcher l'apprentissage olfactif (Carmi et Leon, 1991). L'hypothèse la plus probable pour expliquer l'inefficacité de notre conditionnement est, d'après Régina M. Sullivan (communication personnelle), que nous n'avons pas dû suffisamment respecter la période d'habituation précédant le conditionnement. Elle est en effet fondamentale, si l'on considère qu'au moment où on place les rats dans la situation expérimentale de conditionnement, de nombreux stimuli leur arrivent simultanément. Pourquoi associeraient-ils alors aux stimulations tactiles l'odeur plutôt qu'une autre odeur également présente dans cet environnement, ou la température du support ? Il est possible que nous ayons négligé ces aspects par une période d'habituation trop courte ne permettant pas aux rats de négliger les informations propres à la situation de conditionnement au profit de l'association claire stimulations tactiles - odeur. Notons cependant que nous trouvons un effet de l'âge sur la réactivité aux odeurs dans le test de double-choix. Les animaux passent moins de temps au-dessus de l'odeur de citral à 6 qu'à 8 jours postnatals. Ceci pourrait s'expliquer de deux façons : (i) l'odeur de citral a la même valence aux 2 âges mais une différence de motricité ne permet pas aux rats de 6 jours de passer autant de temps au-dessus de l'odeur ; (ii) l'odeur de citral n'a pas la même valence aux 2 âges, c'est-à-dire que les rats de 6 jours identifient l'odeur comme plus aversive que les rats de 8 jours. Il a été montré que l'odeur de citron est globalement aversive pour des rats Sprague-Dawley (27% de temps passé au-dessus de l'odeur), ce que nous retrouvons, mais que la réactivité à l'odeur de citron ne change pas avec l'âge (Cornwell-Jones et Sobrian, 1977). Les auteurs concluent que les petits Sprague-Dawley ont une locomotion qui leur permet très tôt de montrer une aversion olfactive. Pour expliquer notre résultat, l'hypothèse d'une modification du traitement de l'information olfactive en fonction de l'âge est à privilégier, et notamment au cours de la première semaine postnatale (Cornwell-Jones et Sobrian, 1977). En effet, chez les mammifères, il est proposé que la période néonatale constitue une fenêtre spéciale, une période sensible, pour l'acquisition de dimensions sensorielles particulières de l'environnement constitué ou fourni par la mère (Hudson, 1993 ; Moriceau et Sullivan, 2005). Ces expériences sensorielles sont durablement mémorisées pour

servir de référence lorsque surviennent les situations autonomes de choix vitaux alimentaires ou sociaux. Cette notion de période sensible pour l'acquisition olfactive a été particulièrement bien étudiée chez le raton (Woo & Leon, 1987 ; Sullivan et Wilson, 2003).

3. Etude du glomérule

a. Morphologie

Dans nos études, les souris KO-STOP d'1 an, malgré un poids similaire, présentent des bulbes olfactifs plus petits que les souris « sauvages ». Ce résultat confirme les mesures faites chez les souris KO-STOP en IRMN qui montrent une diminution de 20% du volume cérébral total (Annie Andrieux, communication personnelle). La plus petite taille du cerveau des souris KO-STOP pourrait être due à une diminution de substance blanche, un plus petit nombre de neurones et/ou une perte synaptique.

b. Perturbation synaptique ?

Une absence de différence a été trouvée pour l'expression de GFAP, indiquant une absence de gliose réactionnelle au niveau des astrocytes présents dans la couche glomérulaire chez la souris KO-STOP (Eng et coll., 2000).

Nous avons étudié le glomérule à l'aide de plusieurs marqueurs de la synapse. Nous ne trouvons pas de différence d'expression de synaptophysine. Cela pourrait révéler une absence de différence dans les pools vésiculaires entre les souris KO-STOP et « sauvages » (Valtorta et coll., 2004), contrairement à la déplétion du pool vésiculaire (Andrieux et coll., 2002) et à la diminution d'ARNm de synaptophysine (Eastwood et coll., 2006) trouvées au niveau de l'hippocampe. Cependant, la technique de densité optique n'est peut-être pas suffisamment sensible pour pouvoir affirmer que le pool vésiculaire est intact. Notons, pourtant, que la technique que nous utilisons a été décrite comme étant une bonne alternative, dans l'étude de la densité synaptique, à une quantification des synapses par microscopie électronique ou une quantification immunochimique dans des homogénats de cerveau (Masliah et coll., 1990). Le glomérule étant une structure dense en interneurones et en connexions synaptiques (Kosaka et Kosaka, 2005), nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une modification potentielle de la densité en synaptophysine au niveau de la synapse entre le neurone olfactif et la cellule mitrale a pu ne pas être repérée. En effet, l'examen ultrastructural du glomérule nous a permis de découvrir des perturbations spécifiquement retrouvées au niveau de cette synapse chez la souris STOP -/-.

Nous trouvons une réduction d'expression de GAP43 au niveau des glomérules du bulbe, qui pourrait traduire une diminution du nombre d'axones en croissance qui atteignent le bulbe (Benowitz et Routtenberg, 1997). Rappelons ici que nous montrons également que la surface occupée dans les glomérules par les axones des neurones olfactifs matures est inchangée chez les souris mutées. Ceci est cohérent puisque le GAP43 n'est exprimé que dans les neurones en croissance tandis que l'OMP n'est exprimée que dans les neurones matures ; ces deux molécules n'étant jamais coexprimées (Verhaagen et coll., 1989). Nous émettons donc l'hypothèse que le renouvellement des neurones olfactifs de l'épithélium ou leur capacité à atteindre le bulbe sont perturbés chez la souris KO-STOP. Cela pourrait être examiné par dénombrement cellulaire, et par examen de la capacité de ces neurones à se régénérer après lésion de l'épithélium olfactif (Astic et Saucier, 2001). Il serait intéressant, par ailleurs, d'étudier la synapse en postsynaptique. En effet, au niveau de l'hippocampe, une diminution de transcription d'ARNm de MAP2, indicateur de la densité postsynaptique, a été trouvée (Eastwood et coll., 2006).

Sur le petit groupe d'animaux de 1 an dont nous avons tenté de tirer parti en examinant l'expression de synaptophysine et d'OMP, aucune différence statistiquement significative n'est trouvée, indiquant probablement que la densité vésiculaire à cet âge n'est pas modifiée (sous réserve des mêmes éléments de discussion que précédemment) et que le niveau d'expression d'OMP dans les neurones matures n'est pas modifié. Ces résultats sont bien évidemment à reproduire avec des groupes d'animaux plus grands, et le bulbe accessoire devra être également examiné afin d'y rechercher de potentielles modifications.

Ces perturbations au niveau du glomérule pourraient avoir des répercussions au niveau du bulbe ou du système olfactif périphérique. En effet, le bulbe olfactif est une des rares structures du système nerveux central des mammifères à se renouveler continuellement (Carleton et coll., 2002). Cette neurogenèse est un flux de cellules progénitrices en provenance de la zone sous-ventriculaire qui donnent naissance à de nouveaux grains et de nouvelles cellules périglomérulaires (Carleton et coll., 2002). Suite aux perturbations synaptiques dans le glomérule, comme une mauvaise connexion potentielle entre neurones olfactifs et cellules périglomérulaires, la neurogénèse dans le bulbe pourrait être modifiée chez les souris KO-STOP. Par ailleurs, de mauvaises connexions des neurones olfactifs avec leurs cibles dans le glomérule pourraient avoir un impact sur le renouvellement cellulaire ou l'apoptose au niveau de l'épithélium. En effet les neurones olfactifs ont la particularité de se renouveler tout au long de la vie (Murray et Calof, 1999). Dans le laboratoire, ces questions ont commencé à être étudiées. Il semble ne pas y avoir pas de perturbation du flux migratoire

rostral dans le bulbe. Par contre, au niveau de l'épithélium olfactif, une augmentation de la prolifération et de l'apoptose semblent avoir lieu chez les souris STOP -/- (Couégnas et coll., en préparation).

DISCUSSION GENERALE

1. Patron d'activité du promoteur de la STOP

Les aires de fortes activités du promoteur de la protéine STOP nous ont permis de dresser un patron des régions où la STOP serait susceptible d'être plus impliquée qu'ailleurs. Nous tentons d'établir ici des corrélations entre ces régions et les régions potentiellement impliquées dans la schizophrénie.

a. Couche corticale VII

Chez les souris KO-STOP, le promoteur de STOP présente une très forte activité dans les neurones de la couche VII du cortex, ainsi que dans sa continuation rostro-ventrale, le noyau endopiriforme (Behan et Haberly, 1999 ; Fu et coll., 2004). La couche VII est la plus profonde des couches corticales, parfois appelée *couche VIIb*. Elle est composée d'une fine couche de cellules de la sous-plaque (Arias et coll., 2002), que l'on retrouve spécifiquement chez les rongeurs (Reep, 2000).

Au cours du développement cortical, les premiers neurones de la plaque corticale quittent la pré-plaque pour former une couche marginale superficielle et une couche profonde qui sera la sous-plaque (Allendoerfer et Shatz, 1994). A cette période, la sous-plaque reçoit des afférences des neurones thalamiques en attente de leur connexion ultérieure avec les neurones de la couche corticale IV (Catalano et coll., 1996). Chez le chat, il a été montré que l'ablation des neurones de la couche VII, au moment de la mise en place des afférences thalamiques impliquées dans le système visuel, empêche l'établissement de connexions thalamo-corticales fonctionnelles (Ghosh et Shatz, 1992). Nous pourrions imaginer, chez la souris KO-STOP, qu'une perturbation au niveau de la couche VII pose problème pour la mise en place des connexions thalamo-corticales.

Chez l'Homme, les neurones interstitiels de la substance blanche sont considérés comme des vestiges de la sous-plaque (Kostovic et Rakic, 1980). Chez les patients schizophrènes, une augmentation du nombre de ces neurones ainsi qu'une mauvaise distribution a été observée dans la substance blanche préfrontale (Akbarian et coll., 1996). Les facteurs de risque périnataux comme l'hypoxie-ischémie sont suspectés d'accroître le risque de déclencher une schizophrénie (Verdoux et Sutter, 2002). De nombreux modèles d'hypoxie-ischémie ont montré un fort taux de mort neuronale dans la sous-plaque, associé à des troubles

neurologiques (McQuillen et coll., 2003). Cependant une recherche de symptômes de type schizophréniques n'a jamais été effectuée dans ces modèles.

b. Formation hippocampique

Nous avons pu mettre en évidence au niveau des couches pyramidale de l'hippocampe et granulaire du gyrus denté une forte activité du promoteur de la protéine STOP chez les souris mutées, qui confirme le résultat obtenu par Andrieux et collaborateurs (2002) avec X-gal. La densité synaptique vésiculaire est diminuée au niveau de la synapse entre les collatérales de Schaeffer et les cellules pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe, et différentes formes de plasticité à court et long terme sont perturbées chez la souris KO-STOP (Andrieux et coll., 2002). Dans la schizophrénie, la taille de l'hippocampe et le niveau de N-acétyl aspartate sont réduits, et des perturbations de l'activité métabolique ainsi que des récepteurs ionotropiques du glutamate, nicotiques et sérotoninergiques ont été trouvées (Harrison, 1999, 2004 ; Heckers, 2001). Par ailleurs, la couche granulaire du gyrus denté est une des rares régions où la neurogénèse se poursuit à l'âge adulte, et il a récemment été montré que le nombre de neurones nouvellement formés dans l'hippocampe antérieur était réduit chez les patients schizophrènes (Reif et coll., 2006). Il pourrait être intéressant de rechercher si la prolifération dans cette zone n'est pas modifiée chez la souris KO-STOP.

c. Cervelet

Au cours du développement postnatal et chez l'adulte, le promoteur de la STOP est particulièrement actif dans les cellules de Purkinje. Le cervelet adulte a toujours été considéré comme le centre primaire de coordination motrice du système nerveux central (Chizhikov et Millen, 2003). Cependant, il a récemment été montré que le cervelet pourrait être impliqué dans la régulation des émotions (Schutter et van Honk, 2005). Bien que les souris déficientes en protéine STOP présentent une réactivité accrue à des stress modérés (Brun et coll., 2005), leur activité motrice est globalement normale. Il a récemment été montré que des anomalies morphologiques du cervelet pouvaient être corrélées à la schizophrénie et à des signes neurologiques discrets (Bottmer et coll., 2005).

d. Thalamus

De nombreux noyaux du thalamus dorsal présentent une intense activité du promoteur de STOP, à l'exception de quelques uns comme le noyau médiodorsal (MD). Le thalamus dorsal est traditionnellement considéré comme la structure relais permettant la transmission

d'informations (externes et internes) vers le cortex cérébral (Groenewegen et Witter, 2004). Le MD est un nœud important dans ce circuit, liant le cortex préfrontal, le thalamus et le cervelet (Andreasen, 1999). Bien que controversées, des anomalies ont été trouvées chez les schizophrènes, comme, par exemple, une diminution du volume thalamique et du nombre de neurones spécifiquement dans les noyaux médiadors et antéroventral (Clinton et Meador-Woodruff, 2004 ; Danos et coll., 2002 ; Gilbert et coll., 2001 ; Hazlett et coll., 2004 ; Popken et coll., 2000). Selon la théorie de la disconnectivité de la schizophrénie (Friston et Frith, 1995), les symptômes cliniques pourraient être issus de connexions corticales aberrantes où le MD pourrait jouer un rôle central. Bien que les neurones du MD ne présentent qu'une faible activité du promoteur de STOP chez la souris KO-STOP, il n'est pas exclu que des afférences en provenance de régions STOP positives puissent perturber la transmission des informations vers le cortex.

e. Axe habénulaire

Une forte activité du promoteur est retrouvée chez la souris KO-STOP dans l'habénula, le noyau interpedonculé et leur connexion : le *fasciculus retroflexus*. Il a été proposé que cet axe soit un réseau à fonctions multiples, impliqué dans la nociception, l'apprentissage et la mémoire, l'activité motrice, les comportements sexuels et parentaux, le stress, le sommeil et les comportements alimentaires (Klemm, 2004). Lorsque ce lien entre le prosencéphale et le mésencéphale est altéré, les performances cognitives et attentionnelles sont perturbées chez le Rat (Lecourtier et coll., 2004). Chez la souris KO-STOP, il a été montré que le temps passé à manger et dormir est réduit, que les animaux présentent des changements comportementaux plus fréquents et une activité désorganisée (Andrieux et coll., 2002). Sachant que le promoteur de STOP est exprimé dans le noyau suprachiasmatique, ces changements pourraient refléter une dysfonction du rythme circadien. Il est intéressant de noter que les patients schizophrènes âgés présentent des cycles de veille/sommeil perturbés ainsi qu'une activité nocturne plus importante que les sujets sains du même âge (Martin et coll., 2005).

f. Ganglions de la base

Des amas de cellules, où l'on trouve une activité du promoteur de STOP, ont été mises en évidence chez les jeunes animaux, alors que chez l'adulte, seules quelques cellules éparses présentent une forte activité du promoteur. Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce changement : (i) les amas de cellules présentent une activité du promoteur de STOP transitoire au cours du développement, comme l'est, par exemple, la reelin dans le

striatum (Nishikawa et coll., 1999) ; ou (ii) ces cellules présentent une activité du promoteur de STOP toute la vie de l'animal mais se dispersent à l'âge adulte. Dans le striatum, plus de 90% des neurones sont des neurones moyens épineux (Gerfen, 1992, 2004). Peu de cellules présentent une activité du promoteur de la STOP dans le striatum, ce qui nous fait penser que ces cellules sont probablement des interneurons (Kawaguchi et coll., 1995).

La souris KO-STOP présente une activité motrice basale accrue pendant la nuit, associée à une activité sans but apparent et désorganisée, des changements fréquents de comportement (Andrieux et coll., 2002 ; Brun et coll., 2005). Ces souris présentent également une réactivité exagérée à des stress environnementaux ou pharmacologiques d'intensité moyenne, suggérant une hyperdopaminergie. Brun et collaborateurs (2005) ont trouvé une libération accrue de dopamine dans le noyau accumbens après une stimulation électrique mimant des stimuli physiologiques. Dans la schizophrénie, une hypothèse majeure est celle d'une hyperdopaminergie (Sesack et Carr, 2002). Nous observons une forte activité du promoteur de la STOP au niveau de l'aire tegmentale ventrale, qui envoie des influx dopaminergiques au noyau accumbens. Ce résultat pourrait conforter les observations faites par Brun et collaborateurs (2005), bien que le substrat cellulaire à l'origine d'une libération accrue de dopamine reste à découvrir.

g. Conclusion

De nombreuses structures cérébrales fortement suspectées de jouer un rôle dans la schizophrénie présentent une forte activité du promoteur de STOP chez les souris KO-STOP.

2. Le système olfactif : un outil pour l'étude de la schizophrénie

a. Forte expression de protéine STOP

Un résultat intéressant de notre travail est la très forte expression de protéine STOP dans l'ensemble du système olfactif de souris « sauvage » dès la mise en place du système olfactif, ainsi que la très forte activité du promoteur de STOP chez la souris déficiente en STOP. Ce résultat confirme la première observation faite par Andrieux et collaborateurs (2002) de l'expression de STOP dans le bulbe olfactif, et l'étend très largement. Notons que même l'*induseum griseum*, une structure méconnue et appartenant au système olfactif (Shipley et coll., 2004), présente une intense activité du promoteur de STOP. Comment, au vu de ces résultats, envisager que les troubles comportementaux présentés par les souris KO-STOP soient sans lien avec le système olfactif ? Surtout lorsque l'on sait le grand nombre de

comportements différents, en particulier chez les rongeurs, qui sont médiés par l'olfaction (Halpern et Martinez-Marcos, 2003). Pourtant il ne semble pas y avoir de déficit majeur de détection des odeurs, puisque les souris KO-STOP sont capables de retrouver de la nourriture cachée (Andrieux et coll., 2002). Les dommages olfactifs liés à l'absence de protéine STOP sont peut être plus discrets. En effet, la perte d'agressivité ainsi que le développement d'une certaine forme de paternité chez les mâles pourrait plaider en faveur d'un dysfonctionnement du système olfactif principal ou/et accessoire. Si nos résultats sur la capacité des mâles à s'occuper des petits sont en contradiction avec ceux de la première étude, la diminution d'agressivité, par rapport aux souris « sauvages », avait déjà été notée par Andrieux et collaborateurs (2002). Bien que nous n'ayons pu mener à terme nos expériences de conditionnement olfactif chez le rat, l'objectif final de tester, chez la souris KO-STOP, si l'apprentissage olfactif n'est pas altéré et si l'inhibition latente est fonctionnelle, reste d'un intérêt certain. Même si cela a été très peu exploré, le conditionnement olfactif chez la souris nouveau-né est possible. En effet, avec un protocole adapté, il a été montré que les souriceaux passent plus de temps au-dessus d'une odeur à laquelle des stimulations tactiles ont été préalablement associées, mais seulement immédiatement après le conditionnement, aucune préférence n'étant trouvée 5 ou 24h après (Bousslama et coll., 2005). Cette étude nécessite des réplifications, mais comme on peut le voir, les paramètres exigent d'être bien ajustés, la souris ne se comportant peut-être pas tout à fait comme le rat.

b. L'olfaction des patients schizophrènes

L'étude du système olfactif dans la schizophrénie est d'autant plus intéressante que plusieurs études ont montré des déficits de la fonction olfactive chez les patients indépendamment de leur sexe, du fait qu'ils fument ou non, ou de leur médication (Moberg et coll., 1999). On notera que ces troubles ne sont pas spécifiques de la schizophrénie et que des perturbations peuvent être également trouvées dans d'autres pathologies comme la maladie d'Alzheimer (Peters et coll., 2003). Les patients schizophrènes présentent des déficits d'identification des odeurs, de détection des odeurs, de niveau de sensibilité et de mémoire olfactive (Moberg et Turetsky, 2003). Le volume de leurs bulbes olfactifs est réduit de 23% (Turetsky et coll., 2000). Nous mettons en évidence une réduction de la taille des bulbes chez les souris KO-STOP âgées de 1 an.

c. Le glomérule olfactif

Nous ne mettons pas en évidence de modification de l'expression de synaptophysine ni de GFAP. Par contre nous montrons que des perturbations synaptiques existent au niveau du glomérule olfactif : une diminution du niveau d'expression du GAP43 ainsi que des anomalies ultrastructurales au niveau de la terminaison synaptique. Chez les patients schizophrènes, il a déjà été montré au niveau des neurones de l'épithélium olfactif des dendrites dystrophiques (Smutzer et coll., 1998) et une densité en GAP43 accrue (Arnold et coll., 2001). Ce dernier résultat a été interprété comme pouvant refléter des problèmes dans l'établissement de connexions synaptiques saines au niveau du bulbe olfactif, induisant ainsi un plus fort taux de renouvellement des neurones olfactifs au niveau de l'épithélium. Cela n'est pas forcément en contradiction avec notre résultat si l'on considère que les connexions ne se font pas ou pas correctement au niveau du glomérule. En effet, après ablation d'un bulbe chez le rat, les neurones immatures de l'épithélium olfactif (qui expriment le GAP43) se multiplient plus mais ont également une durée de vie plus courte qui pourrait être liée à l'absence de connexions synaptiques avec le bulbe olfactif (Schwob et coll., 1992). De plus, cette perturbation potentielle dans la mise en place des connexions au niveau du bulbe chez la souris KO-STOP pourrait être liée aux enroulements de membranes trouvés spécifiquement au niveau de la terminaison axonale. Cependant, il faut noter que, dans une étude non répliquée à ce jour mais très détaillée d'un point de vue méthodologique, au niveau du bulbe olfactif des patients schizophrènes, aucune différence dans la densité d'OMP, GAP43 ou synaptophysine n'a été mise en évidence (Rioux et coll., 2005), bien que celle de MAP2 soit réduite (Rioux et coll., 2004).

Le glomérule est la première structure de réception, de modulation et d'intégration des informations sensorielles olfactives. C'est à ce niveau que le premier tri est fait entre les informations olfactives pertinentes pour l'animal et celles qui ne constitueront que le fond de la scène olfactive. En tant que système de dissociation signal/bruit (Chen et Shepherd, 2005), le glomérule pourrait représenter un excellent outil d'étude de la schizophrénie. En effet, les patients présentent un déficit attentionnel qui ne leur permet pas de traiter correctement les informations extérieures (Boucart et coll., 1999). C'est d'ailleurs le même déficit qui est examiné au cours du test d'inhibition latente (Lubow, 2005). Outre de potentielles perturbations synaptiques, les interactions neuronales dans le glomérule sont également permises grâce aux synapses chimiques ou *gap junctions*, qui pourraient jouer un rôle dans la synchronisation de l'activité neuronale (Kosaka et Kosaka, 2005) et qu'il serait peut-être intéressant d'étudier.

d. Conclusion

Le système olfactif est étroitement lié à des régions cérébrales impliquées dans la régulation des émotions (amygdale), la mémoire (hippocampe, dont la voie d'entrée est le cortex entorhinal) qui sont perturbées chez les patients schizophrènes. Les rongeurs utilisant majoritairement ce sens pour exécuter des tâches cognitives complexes, des tests de performance cognitive chez les rongeurs fondés sur l'olfaction devraient permettre d'étudier plus avant les troubles cognitifs caractéristiques de la schizophrénie (Robertson et coll., 2006).

3. La souris KO-STOP comme modèle d'étude de la schizophrénie

L'étude des mécanismes physiopathologiques à l'origine de la schizophrénie passe obligatoirement par l'étude de modèles animaux. Ils sont indispensables pour le développement de nouvelles thérapeutiques. Il existe plusieurs critères de validation des modèles animaux (Geyer et Markou, 1995). La *validité d'aspect* correspond à l'adéquation entre le phénotype présenté par le modèle animal et les symptômes de la maladie. La *validité prédictive* est la capacité du modèle à répondre comme chez l'Homme lors d'un test, comme par exemple, lorsque la réponse aux médicaments chez l'animal est similaire à celle chez l'Homme. La *validité étiologique* est la capacité du modèle à reproduire les causes de la maladie.

La validité d'aspect de la souris KO-STOP est particulièrement pertinente pour plusieurs raisons. Les troubles comportementaux (hyperactivité locomotrice, diminution des interactions sociales) et cognitifs (mémoire de travail et mémoire spatiale) sont reproduits (Andrieux et coll., 2002 , 2006 ; Begou et coll., 2007 ; Brun et coll., 2005 ; Fradley et coll., 2005). La souris KO-STOP présente des perturbations en faveur des principales anomalies neurochimiques suspectées dans la schizophrénie : hyperdopaminergie mésolimbique (Brun et coll., 2005), perturbations du métabolisme glutamatergique (Brenner et coll., 2007).

La souris KO-STOP a une bonne validité prédictive pour la schizophrénie, puisque les troubles comportementaux sont diminués par l'administration de neuroleptiques (Andrieux et coll., 2002 ; Brun et coll., 2005 ; Fradley et coll., 2005). De plus, elle a déjà permis de tester une nouvelle molécule à potentiel thérapeutique, stabilisateur du cytosquelette, qui améliore non seulement les troubles comportementaux des souris KO-STOP, mais également les perturbations synaptiques et de plasticité à court et long termes (Andrieux et coll., 2006).

Enfin, la validité étiologique est beaucoup plus difficile à attester, puisqu'on ne connaît pas les causes de la schizophrénie.

a. Dysfonctionnement du cytosquelette ?

La souris KO-STOP est déficiente en protéine STOP, protéine impliquée dans la stabilité des microtubules. Comme nous l'avons indiqué ci-dessus, les troubles des souris KO-STOP sont améliorés par l'administration d'épothiloneD, un stabilisateur du cytosquelette (Andrieux et coll., 2006). Il est possible que des perturbations du cytosquelette soient impliquées dans la physiopathologie de la schizophrénie. En effet, l'hypothèse d'une perturbation synaptique généralisée pourrait reposer sur un défaut dans l'architecture des cellules neuronales, puisque le cytosquelette - les microtubules en particulier -, permet un remodelage permanent des neurones ainsi que de leurs connexions (Andrieux et coll., 2004).

Certains résultats (comme par exemple une diminution d'expression de protéines associées aux microtubules chez les schizophrènes et un effet des neuroleptiques sur la polymérisation des microtubules *in vitro*) et hypothèses (la diminution du volume cérébral serait liée à des diminutions de prolongements neuronaux plutôt qu'à une réduction de la glie ou du nombre de neurones, par exemple) renforcent l'idée que la schizophrénie pourrait être directement ou indirectement liée à un problème au niveau du cytosquelette. Des microtubules neuronaux instables pourraient par exemple jouer un rôle important dans la perturbation de la plasticité synaptique et la connectivité (Benitez-King et coll., 2004). Une telle hypothèse avait été proposée au début des années 1990 lorsqu'un parallélisme avait été fait entre l'effet perturbateur de drogues hallucinogènes¹, qui induisent des perturbations cognitives, et celui de la colchicine, un inhibiteur des microtubules, sur le cytosquelette (van Woerkom, 1990).

Par ailleurs, les travaux menés sur DISC1 renforcent cette hypothèse. Notons que la région DISC1 a été mise en évidence au cours d'une étude sur une famille écossaise dont plusieurs membres présentaient des troubles schizophréniques (Millar et coll., 2004). Bien que le rôle exact de DISC1 reste encore à étudier, il a été montré que la protéine issue de cette région chromosomique est impliquée dans l'organisation et la stabilité du cytosquelette (Camargo et coll., 2007), plus particulièrement au niveau du centrosome (Morris et coll., 2004). De plus, une souris génétiquement modifiée pour cette région DISC1 présente un élargissement des ventricules, un déficit en PPI, une légère hyperlocomotion et des troubles de la fonction olfactive (Hikida et coll., 2007 ; Ishizuka et coll., 2006).

¹ Lysergic acid diethylamide (LSD) et phényléthylamine.

Enfin, une étude qui reste à confirmer trouve plusieurs corrélations entre la présence de MAP6, analogue humain de la protéine STOP des rongeurs, et la schizophrénie (Shimizu et coll., 2006).

b. Modèle neurodéveloppemental ?

Il est suggéré que le système olfactif, en particulier l'épithélium olfactif, est un bon modèle pour l'étude de l'hypothèse neurodéveloppementale de la schizophrénie (Cascella et coll., 2007). En effet, outre les anomalies des patients schizophrènes dans l'identification, la détection et la mémorisation des odeurs (Moberg et Turetsky, 2003), des études récentes montrent des anomalies au niveau de l'épithélium olfactif des patients comme, par exemple, de possibles perturbations de la prolifération et de la mort cellulaire (McCurdy et coll., 2006). Il est important de rappeler que l'épithélium olfactif a la capacité de se régénérer tout au long de la vie (Murray et Calof, 1999). Cette particularité du système olfactif pourrait permettre de modéliser, chez l'animal adulte, l'hypothèse neurodéveloppementale de la schizophrénie (Robertson et coll., 2006). Sachant que la protéine STOP est très fortement exprimée dans l'ensemble du système olfactif, il serait intéressant de rechercher si la souris KO-STOP présente des perturbations du renouvellement cellulaire au niveau de l'épithélium olfactif. Si c'est le cas, cela pourrait suggérer un rôle de la protéine STOP dans la mise en place de l'épithélium olfactif et, par extension, peut-être un rôle au cours du développement.

Cette dernière hypothèse est d'autant plus plausible que nous avons pu montrer que la protéine STOP est exprimée au cours de la gestation dans le système nerveux central (le système olfactif en particulier mais pas seulement). Dans le cas où le phénotype de la souris KO-STOP serait la conséquence d'une perturbation du développement, ce résultat doit pousser les recherches ultérieures à étudier systématiquement la souris KO-STOP à la fois au cours du développement et à l'âge adulte. Une étude récente du comportement suggère une évolution croissante des troubles sensorimoteurs chez la souris KO-STOP au cours du développement (Begou et coll., 2007).

c. Modèle de dysconnexion ?

Bien que l'étude de la synapse principale du bulbe olfactif n'ait pas été réalisée avec les mêmes techniques que l'étude synaptique initiale au niveau de l'hippocampe (Andrieux et coll., 2002), notre travail, qui montre des perturbations des synapses au niveau du glomérule, renforce la pertinence de l'utilisation de la souris KO-STOP comme modèle pour l'étude de l'hypothèse d'une dysconnexion synaptique généralisée dans la schizophrénie. Le GAP43

pourrait jouer un rôle dans ces perturbations. En effet, il a été montré que le GAP43, outre son rôle de modulation de la mise en place de nouvelles connexions (Benowitz et Routtenberg, 1997), pourrait avoir un rôle clé dans les processus mnésiques, comme en témoignent les souris GAP43 +/- qui présentent de profonds troubles de mémoire (Rekart et coll., 2005) et celles où le GAP43 est surexprimé qui présentent des capacités mnésiques plus importantes (Routtenberg et coll., 2000). Chez la souris KO-STOP, la diminution du niveau d'expression du GAP43 dans le glomérule et celle de son ARNm au niveau de l'hippocampe (Eastwood et coll., 2006) pourraient être liées, directement ou non, à l'altération d'un mécanisme synaptique global, à l'origine de ses troubles cognitifs.

Il est important de se poser la question du rôle de la protéine STOP dans les perturbations synaptiques observées au niveau du glomérule. En effet, bien que nous n'ayons pas pu mettre en évidence de différence de densité en synaptophysine, il n'est pas exclu qu'une perturbation du renouvellement des vésicules synaptiques existe et soit liée à l'absence de protéine STOP. En effet, STOP est importante pour le transport des vésicules dans l'axone puisqu'elle interagit avec les microtubules (Guillaud et coll., 1998). Par ailleurs, la protéine STOP, sous forme phosphorylée, interagit avec les microfilaments d'actine et non avec les microtubules (Baratier et coll., 2006). Sachant que le glomérule est une structure particulièrement riche en microfilaments d'actine (Rossler et coll., 2002), nous pouvons émettre l'hypothèse que la protéine STOP phosphorylée pourrait interagir avec ces microfilaments au niveau du glomérule olfactif.

CONCLUSION

Dans ce travail, nous montrons non seulement que la protéine STOP est susceptible d'être exprimée dans des régions fortement corrélées avec la schizophrénie, mais également que des anomalies synaptiques existent au niveau de la synapse principale du système olfactif. Notre travail renforce donc la pertinence de l'utilisation de la souris KO-STOP comme modèle animal d'étude de la schizophrénie, et particulièrement de l'hypothèse de dysconnexion synaptique, puisque des perturbations existent au moins au niveau de deux zones synaptiques, dans l'hippocampe et le bulbe olfactif. Un examen poussé d'autres micro-circuits synaptiques, par exemple au niveau du cervelet, puis de circuits corticaux plus complexes, permettrait de confirmer cette hypothèse. Notre travail montre également que, chez la souris KO-STOP, le système olfactif est un circuit neuronal qui doit être étudié de manière approfondie. En effet, il peut permettre de comprendre les mécanismes physiopathologiques sous-tendant des perturbations synaptiques dont l'origine pourrait être neurodéveloppementale d'une part et, d'autre part, il offre la possibilité de tester de nouvelles pistes thérapeutiques qui pourraient ultérieurement être mises en place chez les patients schizophrènes. Nos résultats renforcent l'hypothèse, proposée récemment, selon laquelle le système olfactif pourrait être un modèle alternatif intéressant pour l'étude de la schizophrénie (Cascella et coll., 2007).

ANNEXES

(ANNEXE 1 :) Expression Pattern of STOP lacZ Reporter Gene in Adult and Developing Mouse Brain

Alice Couégnas, Annie Schweitzer, Annie Andrieux, M. Said Ghandour, Nelly Boehm
Journal of Neuroscience Research, 2007, Vol. 85, Pages 1515-1527

Pages 123-135 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'ULP peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1002/jnr.21278>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

Annexe 2 : Réglage de l'illumination du microscope selon la méthode de Köhler

1. Allumer la source lumineuse
2. Ouvrir le diaphragme de la source lumineuse autant que possible
3. Ouvrir le diaphragme du condensateur autant que possible
4. Placer le condensateur à 1-3 mm de la préparation
5. Ajuster la distance inter pupilles des oculaires
6. Ajuster la luminosité si elle est trop élevée
7. Faire la mise au point sur la préparation avec les vis macro- et micro- métriques
8. Fermer complètement le diaphragme de la source lumineuse et celui du condensateur
9. En déplaçant le condensateur de haut en bas, faire la mise au point (un hexagone apparaît)
10. Centrer l'image en utilisant les vis de centrage du condensateur
11. Ouvrir le diaphragme de la source lumineuse jusqu'à ce que le champ soit juste complètement illuminé (pas plus)
12. Retirer un oculaire et regarder le plan focal arrière de l'objectif
13. Ouvrir le diaphragme du condensateur jusqu'à ce que le champ soit juste aux bords de l'objectif
14. Replacer l'oculaire et ajuster la luminosité à un niveau confortable

Annexe 3 : Réglage de l'appareil photo numérique Coolpix 995 de Nikon en mode entièrement manuel (références aux pages du manuel).

Réglage de la mise au point manuelle 81

Un appui simultané sur « M-FOCUS » et tour de molette permettent de choisir la distance. « Autofocus » est désactivé. La distance entre la lame et l'objectif de l'appareil photo est d'environ 0,35 m

→ 0,35 m

Réglage de la qualité de l'image 58

Plusieurs appuis sur « QUAL » permet d'enregistrer des photos dans le format désiré. Pour nous, le format « .tiff », c'est à dire sans aucune compression (et donc aucune modification de l'image « réelle ») est nécessaire.

→ jusqu'à l'apparition de « HI » sur l'écran

Réglage de la taille de l'image 59

Un appui simultané sur « QUAL » et tour de molette permettent de choisir la taille désirée. Pour nous, la plus grande qualité possible est préférable (ici 2048x1536).

→ jusqu'à rien à l'écran

Réglage de la sensibilité 72

Un appui simultané sur « ISO » et tour de molette permettent de choisir la sensibilité.

→ 100

Réglage de la balance des blancs 95

La lumière émise par le soleil ou une lampe à incandescence étant appelée lumière blanche, c'est le choix que nous faisons pour ce réglage.

→ « MENU », « ⇒ », « LUMIÈRE DU JOUR »

Réglage du système de mesure 97

Le système recommandé est le système « matriciel » (définition : « Détermine la mesure d'exposition en divisant l'image en 256 éléments distincts et en créant un calcul d'exposition approprié selon l'équilibre particulier entre le sujet et l'arrière-plan »)

→ « MENU », « ↓ », « ⇒ », « MATRICIELLE »

Réglage de la correction d'image (luminosité et contraste) 104

Nous choisissons « normal » (définition : « L'appareil exécute le même ajustement standard de contraste et luminosité pour toutes les images »)

→ « MENU », « ↓ »x2, « ⇒ », « NORMAL »

Réglage de contrôle saturation 105

Nous choisissons « normal ».

→ « MENU », « ↓ »x3, « ⇒ », « NORMAL »

Réglage de la netteté 114

On désactive la fonction automatique d'ajustement de la netteté.

→ « MENU », « ← », « ↓ », « ⇒ », « ↓ »x3, « ⇒ », « DESACTIVE »

Réglage du zoom 132

On désactive le zoom numérique.

→ « MENU », « ← », « ↓ »x2, « ⇒ », « ↓ »x3, « ⇒ »x2, « DESACTIVE »

On active l'option diaphragme constant²⁴.

→ « MENU », « ← », « ↓ »x2, « ⇒ », « ↓ »x3, « ⇒ », « ↓ »x2, « ⇒ », « ACTIVE »

On choisit de faire revenir le zoom toujours à la dernière position²⁵ avant l'extinction (« Lorsque vous allumez l'appareil, l'objectif se déplace vers la position de zoom de l'appareil au moment où il a été éteint pour la dernière fois »).

→ MENU », « ← », « ↓ »x2, « ⇒ », « ↓ »x3, « ⇒ », « ↓ », « ⇒ », « DERNIERE »

Réglage de l'exposition 109

Il ne doit pas y avoir de correction d'exposition.

→ MENU », « ← », « ↓ », « ⇒ », « ↓ », « ⇒ », « ↓ », « ⇒ », « 0 »

Le choix des paramètres d'exposition (vitesse d'obturation et ouverture « F ») se fait en appuyant sur « MODE », et lorsque la vitesse d'obturation ou l'ouverture devient de couleur verte, on peut la faire varier en tournant la molette. **64-68**

→ jusqu'à 1/2000 et F6,3

Afin que les paramètres soient identiques pour toutes les photos, on va bloquer l'exposition automatique (Automatic Exposition Locked **AE-L**) et la balance des blancs (White Balance Locked **WB-L**).

→ MENU », « ← », « ↓ », « ⇒ », « ↓ », « ⇒ »x2, « ACTIVE »

Si l'appareil est éteint au cours de série de prises de vues

Au rallumage, déverrouiller AE-L et WB-L afin de réajuster la vitesse d'obturation et l'ouverture si elles ont été modifiées par l'appareil. Verrouiller à nouveau et poursuivre. En aucun cas ne toucher au zoom.

²⁴ A « Diaphragme constant », il faut travailler avec une ouverture de F5 à 7

²⁵ Le meilleur rapport image obtenue sur angle photographié correspond à une position du zoom où les bords du microscope ne se voient juste plus. Cependant toucher même un tout petit peu la position du zoom pendant les prises de vue modifie complètement les paramètres d'exposition.

Annexe 4 : Mesure de la densité optique absolue (ou « niveau de gris calibré ») avec ImageJ

Calibrage de la densité optique

La première étape du calibrage est de réaliser, avec le calibrage par défaut d'ImageJ, des mesures de chaque photo (préalablement corrigée par champ plat) de filtre de densité neutre en cochant « Mean Gray Value » dans « Analyze/Set Measurements... ». Une fois toutes les mesures réalisées - et en ayant ouvert une image à mesurer -, il faut faire « Analyse\Calibrate », associer aux valeurs mesurées les valeurs de DO connues et préciser « Rodbard » dans « Function » et « D.O. » dans « Unit », sans oublier de cocher « Global Calibration » ni d'enregistrer le calibrage pour ne pas avoir à recommencer ces manipulations. Après validation, le logiciel trace une courbe (Figure 40) associant à chaque valeur de pixel mesuré une valeur de densité optique absolue, courbe référence qui annulera toute éventuelle non linéarité (ce qui est notre cas, puisque malgré l'échelonnage régulier des filtres, la courbe non calibrée par défaut d'ImageJ n'est pas linéaire ; Figure 39) de la chaîne optique d'acquisition d'image.

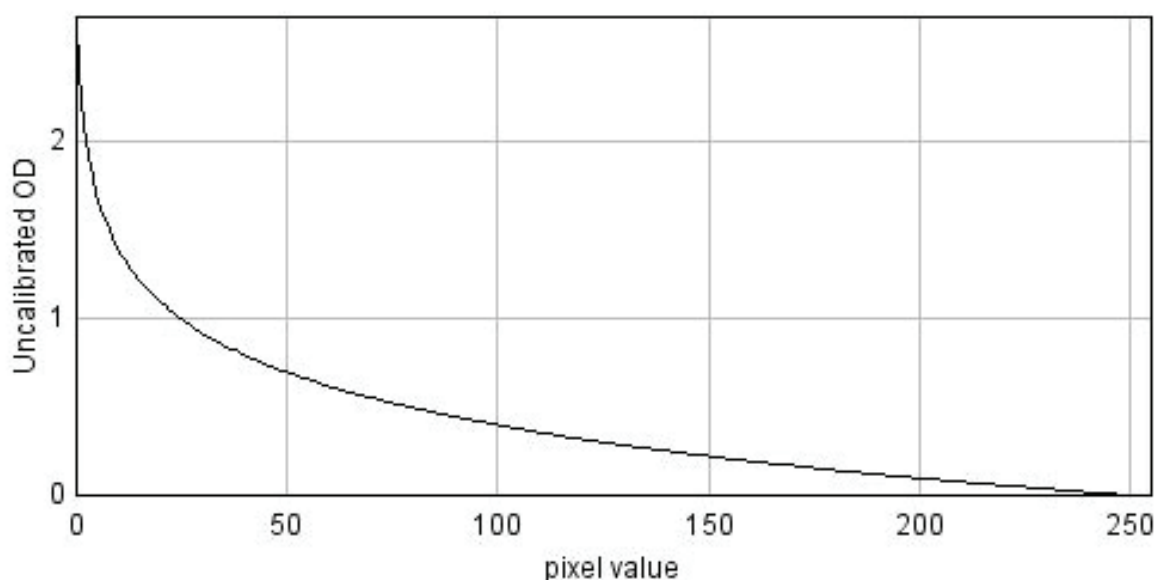


Figure 39 : Courbe de calibration par défaut d'ImageJ

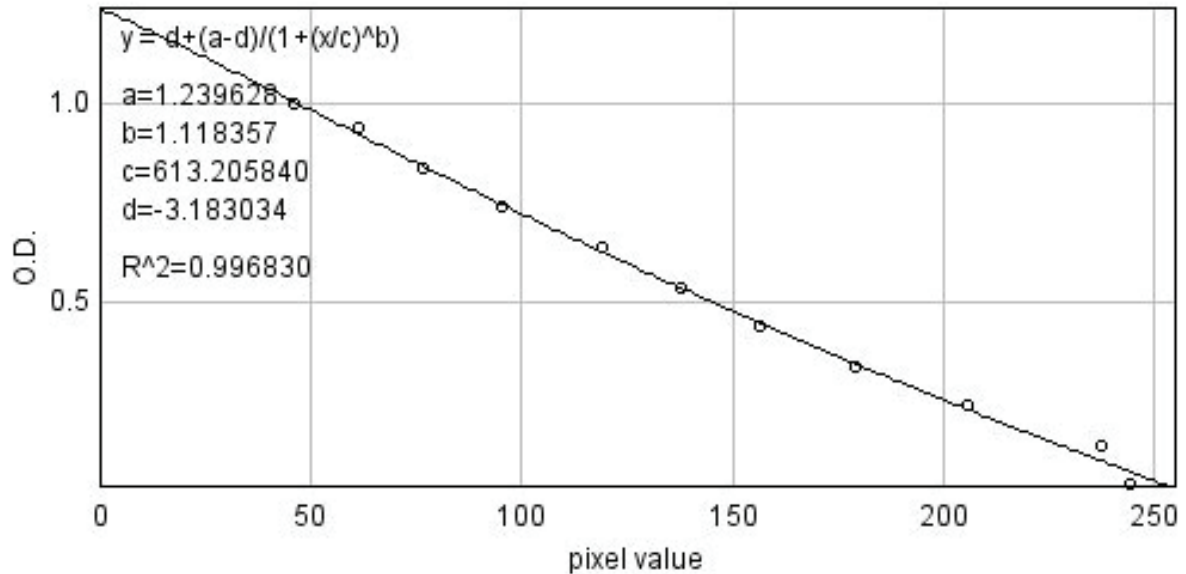


Figure 40 : Courbe de calibration de la chaîne optique pour les mesures de densitométrie

Calibrage micrométrique

Afin que les mesures effectuées puissent être associées à une unité de mesure internationale, la photo de la lame micrométrique va permettre de mesurer (en pixel) une distance de longueur réelle connue. Lorsque la mesure est faite (utiliser l'outil « Trait »), aller dans « Analyse\Set Scale », indiquer la longueur réelle dans « Known Distance », l'unité de mesure et valider, sans oublier de cocher « Global ».

Mesures comparatives des intensités d'expression des marqueurs

- Sélectionner la zone de la photo (préalablement corrigée par champ plat) à analyser.
- Réaliser un seuillage (« Image\Adjust\Threshold... ») afin d'éliminer le bruit lié à la technique d'immunocytochimie et dû à (i) du marquage aspécifique (« bruit de fond » du fait d'une plus ou moins bonne spécificité des anticorps) et à (ii) l'accrochage du produit de révélation (zones intensément colorées où des artefacts retiennent le chromogène : poussière, décollement).
- Mesurer la DO absolue moyenne des pixels ainsi sélectionnés en sélectionnant les variables à mesurer préalablement (« Analyse\Set Measurements... », cocher « Limit to Threshold » et « Mean Gray Value » plus les autres variables souhaitées) puis en faisant « Analyse\Measure ».

Annexe 5 : Statistiques

1. Expression de c-fos

a. Rassemblement des petits au nid

Nous testons l'hypothèse nulle H_0 « Le nombre de petits ramenés au nid est indépendant du génotype » contre l'hypothèse alternative H_1 « Le nombre de petits ramenés au nid dépend du génotype ». Nous testons également l'hypothèse nulle H_0 « Le nombre de petits tués est indépendant du génotype » contre l'hypothèse alternative H_1 « Le nombre de petits tués dépend du génotype ». Pour ces deux tests, nous utilisons un modèle de régression logistique.

b. Activation d'aires cérébrales

Nous testons l'hypothèse nulle H_0 « Les aires immunomarquées en c-fos sont activées indépendamment du génotype » contre l'hypothèse alternative H_1 « L'activation des aires immunomarquées en c-fos dépend du génotype ». La distribution des données brutes suit une loi normale dans le cas des structures IL, Cg, LS, Pa, CeA, MeA, LHb, CA3 et PAG (Tableau 13), qui seront donc analysées avec le test t de Student. Pour les autres structures, la transformation de données brutes ($y=x^{1/8}$; Figure 41), permet leur normalisation excepté dans les cas de Pir et BST (Tableau 13). Ces 2 structures seront donc testées avec un test non paramétrique de Mann-Whitney tandis que les autres structures seront testées avec un test t de Student appliqué aux données transformées.

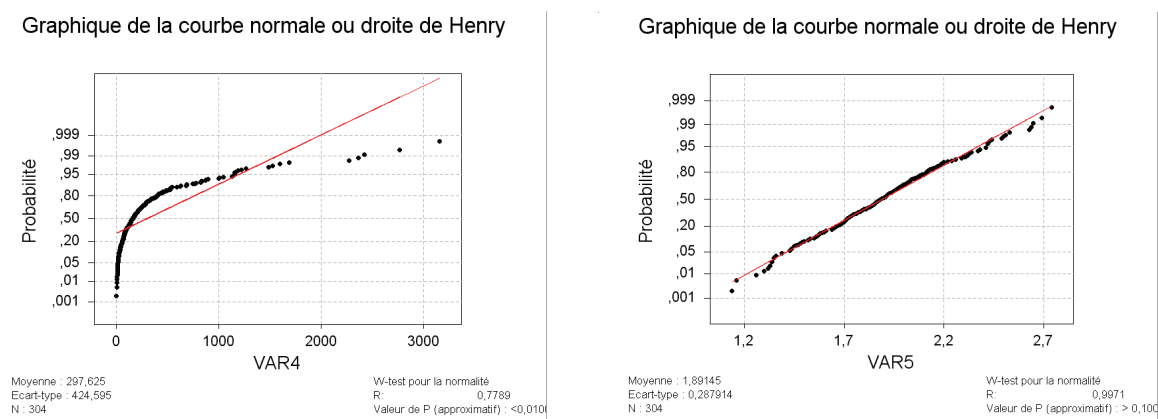


Figure 41 : Graphiques de la courbe normale avant et après transformation des données ($y=x^{1/8}$) dans l'expérience d'analyse de l'expression de c-fos chez des mâles ayant été testés dans leur aptitude à ramener des petits au nid.

Structure	Données brutes			Données transformées ($y=x^{1/8}$)		
	Test de normalité		Test d'égalité des Variances	Test de normalité		Test d'égalité des Variances
	+/+	-/-		+/+	-/-	
AON	[R=0,98;p>0,10] ²⁶	[R=0,88;p=0,02]	[L=0,23;p=0,63]	[R=0,99;p>0,10]	[R=0,99;p>0,10]	[F=2,14;p=0,37]
AOB	[R=0,90;p=0,05]	[R=0,87;p=0,01]	[L=1,74;p=0,21]	[R=0,97;p>0,10]	[R=0,96;p>0,10]	[F=3,54;p=0,14]
Pir*	[R=0,85;p=0,01]	[R=0,99;p>0,10]	[L=1,32;p=0,27]	[R=0,97;p>0,10]	[R=0,89;p=0,02]	[L=0,22;p=0,64]
IL	[R=0,96;p>0,10]	[R=0,96;p>0,10]	[F=1,09;p=0,95]	nr	nr	nr
Cg	[R=0,91;p=0,06]	[R=0,95;p>0,10]	[F=0,23;p=0,06]	nr	nr	nr
LS	[R=0,97;p>0,10]	[R=0,98;p>0,10]	[F=1,54;p=0,62]	nr	nr	nr
BST*	[R=0,96;p>0,10]	[R=0,84;p<0,01]	[L=1,53;p=0,24]	[R=0,97;p>0,10]	[R=0,94;p>0,10]	[F=8,52;p=0,02] [L=1,79;p=0,21]
VA	[R=0,77;p<0,01]	[R=0,93;p>0,10]	[L=1,43;p=0,25]	[R=0,96;p>0,10]	[R=0,98;p>0,10]	[F=0,82;p=0,77]
CM	[R=0,87;p=0,02]	[R=0,71;p<0,01]	[L=0,58;p=0,46]	[R=0,98;p>0,10]	[R=0,95;p>0,10]	[F=1,21;p=0,84]
Pa	[R=0,92;p>0,10]	[R=0,98;p>0,10]	[F=0,55;p=0,42]	nr	nr	nr
SO	[R=0,89;p=0,04]	[R=0,85;p<0,01]	[L=0,42;p=0,53]	[R=0,98;p>0,10]	[R=0,97;p>0,10]	[F=0,95;p=0,92]
CeA	[R=0,94;p>0,01]	[R=0,98;p>0,01]	[F=0,51;p=0,38]	nr	nr	nr
MeA	[R=0,93;p>0,10]	[R=0,96;p>0,10]	[F=2,13;p=0,37]	nr	nr	nr
LHb	[R=0,96;p>0,10]	[R=0,93;p>0,10]	[F=0,70;p=0,62]	nr	nr	nr
MHb	[R=0,75;p<0,01]	[R=0,75;p<0,01]	[L=0,71;p=0,41]	[R=0,93;p>0,10]	[R=0,95;p>0,10]	[F=1,55;p=0,61]
CA1	[R=0,91;p=0,07]	[R=0,88;p=0,02]	[L=4,25;p=0,06]	[R=0,95;p>0,10]	[R=0,99;p>0,10]	[F=0,33;p=0,15]
CA3	[R=0,91;p=0,08]	[R=0,95;p>0,10]	[F=0,26;p=0,08]	nr	nr	nr
PAG	[R=0,94;p>0,10]	[R=0,95;p>0,10]	[F=1,40;p=0,70]	nr	nr	nr

Tableau 15 : Test de normalité et d'égalité des variances pour chaque groupe à comparer dans l'étude de l'expression de c-fos. nr = non requis (les données brutes sont normales). * : Structures dont la comparaison des données nécessite l'utilisation de tests non paramétriques.

2. Conditionnement olfactif

a. Effet du conditionnement

L'hypothèse nulle H_0 « Il n'y a pas de différence entre les différents types de conditionnement sur le comportement des rats » est testée contre l'hypothèse alternative H_1 « Au moins un des conditionnements déclenche un comportement des rats différent ». Nous utilisons le test paramétrique t de Student ou celui, non paramétrique, de Mann-Whitney lorsque les données sont, respectivement, normales ou non normales (Tableau 14). Dans le cas où il y a 3 modalités de conditionnement (expérience VI), nous réalisons une analyse de la variance (ANOVA).

²⁶ $p>0,10$ signifie que nous n'avons pas la valeur exacte de p mais seulement l'information qu'elle est supérieure à 0,10.

Expé.	Test de normalité			Test d'égalité des variances
	Type de conditionnement			
	CS	UCS+CS	CS&UCS+CS	
I*	[R=0,74;p<0,01]	[R=0,84;p<0,01]		[L=1,03;p=0,32]
II*	[R=0,76;p<0,01]	[R=0,92;p>0,10]		[L=0,93;p=0,36]
III*	[R=0,79;p<0,01]	[R=0,91;p=0,10]		[L=1,42;p=0,26]
IV*	[R=0,92;p=0,08]	[R=0,84;p<0,01]		[L=2,30;p=0,15]
V	[R>0,99;p>0,10]	[R=0,99;p>0,10]		[F=0,27;p=0,42]
VI	[R=0,97;p>0,10]	[R=0,95;p>0,10]	[R=0,92;p=0,06]	[B=0,31;p=0,86] ²⁷
VII	[R=0,93;p=0,10]	[R=0,92;p=0,06]		[F=2,32;p=0,23]
VIII	[R=0,95;p>0,10]	[R=0,93;p=0,06]		[F=2,14;p=0,25]
IX	[R=0,94;p>0,10]	[R=0,91;p=0,05]		[F=0,88;p=0,87]
X*	[R=0,86;p<0,01]	[R=0,93;p=0,06]		[L=5,27;p=0,03]
XI*	[R=0,75;p<0,01]	[R=0,83;p<0,01]		[L=0,05;p=0,83]

Tableau 16 : Tests de normalité et d'égalité des variances sur les différents groupes testés en conditionnement. * : Données nécessitant l'utilisation de tests non paramétriques.

b. Effet de la qualité de l'odeur

Dans cette expérience, nous recherchons si le type d'odeur (menthe et citral) a un effet sur le comportement des rats. Nous testons l'hypothèse nulle H_0 « L'odeur n'a pas d'effet sur le comportement des rats » contre l'hypothèse alternative H_1 « L'odeur a un effet sur le comportement des rats ». Les variances sont homogènes [$L=1,39;p=0,25$]. La distribution des données d'un des groupes comparés n'est pas normale ($[R=0,90;p<0,01]$ pour les animaux exposés au citral et $[R=0,96;p>0,10]$ pour ceux exposés à la menthe). Nous utilisons donc le test non paramétrique du signe. Nous testons l'hypothèse nulle H_0 « Le temps passé au-dessus de l'odeur de menthe n'est pas différent de celui passé au-dessus du citral » contre l'hypothèse alternative H_1 « Le temps passé au-dessus de l'odeur de menthe est différent de celui passé au-dessus du citral » avec le test non paramétrique de Mann-Whitney.

c. Effet de la quantité d'odeur et de l'âge des rats

Dans cette expérience, nous comparons à la fois l'effet de la concentration de l'odeur et l'effet de l'âge des rats sur le comportement des animaux dans le test de double-choix. La concentration est une variable indépendante (les animaux testés sont différents pour chaque concentration) qui possède 3 modalités ($1/1000^e$, $1/10^e$ et $1/1$). L'âge est une variable dépendante à mesures répétées (les mêmes animaux sont testés aux différents âges) qui possède également 3 modalités (6, 7 et 8 jours postnatal). L'hypothèse nulle H_0 « Le comportement des rats, quel que soit leur âge, ne dépend pas de la concentration de l'odeur » est testée contre l'hypothèse alternative H_1 « Le comportement des rats, quel que

²⁷ L'homogénéité des variances est contrôlée sur les résidus de l'ANOVA. La normalité sur ces résidus donne [$R=0,98;p>0,10$].

soit leur âge, dépend de la concentration de l'odeur » avec une analyse multiple de la variance (MANOVA). Les hypothèses de normalité et d'égalité des variances sont testées en suivant la procédure décrite par Christensen (Christensen, 1991). Nous testons donc l'hypothèse nulle H_0 « Le comportement des rats ne dépend pas de l'âge ni de l'interaction de l'âge et de la concentration » contre l'hypothèse alternative H_1 « Le comportement des rats dépend de l'âge ou de l'interaction de l'âge et de la concentration » à l'aide d'une ANOVA à mesures répétées²⁸. Les hypothèses de normalité (Annexe 5, Tableau 15) et d'égalité des variances (Tableau 16 et Tableau 17) sont vérifiées. Les analyses post-hoc sont réalisées avec le test de Bonferroni.

Variable : âge	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistique	ddl	Signification	Statistique	ddl	Signification
Résidu pour 6j	0,135	21	0,200(*)	0,921	21	0,090
Résidu pour 7j	0,125	21	0,200(*)	0,952	21	0,378
Résidu pour 8j	0,131	21	0,200(*)	0,969	21	0,708

Tableau 17 : Tests de normalité pour l'ANOVA sur mesures répétées (expérience testant l'effet de l'âge des rats sur leur comportement dans le test de double-choix). (*) Il s'agit d'une borne inférieure de la signification réelle.

M de Box	15,372
F	0,963
ddl1	12
ddl2	1570,154
Signification	0,483

Tableau 18 : Test d'égalité des matrices de covariance-variance de Box pour l'ANOVA sur mesures répétées (expérience testant l'effet de l'âge des rats sur leur comportement dans le test de double-choix).

âge	F	ddl1	ddl2	Signification
6j	0,971	2	18	0,398
7j	0,693	2	18	0,513
8j	2,686	2	18	0,095

Tableau 19 : Test d'égalité des variances des erreurs de Levene pour l'ANOVA sur mesures répétées (expérience testant l'effet de l'âge des rats sur leur comportement dans le test de double-choix).

3. Etude du glomérule olfactif

a. Mesures morphologiques

Nous testons l'hypothèse nulle H_0 « Les mesures morphologiques ne dépendent pas du génotype » contre l'hypothèse alternative H_1 « Les mesures morphologiques dépendent du génotype ». Pour ces tests, nous utilisons le test paramétrique t de student puisque la

²⁸ Cette analyse, impossible avec MINITAB, est réalisée par Frédéric Bertrand et Myriam Maumy-Bertrand avec le logiciel de statistique SPSS.

distribution des données suit une loi normale et que les variances sont homogènes (Tableau 18).

Mesure effectuée	Test de normalité		Test d'égalité des variances
	+/+	-/-	
Poids 3 mois	[R=0,89;p>0,06]	[R=0,94;p>0,10]	[F=3,92;p=0,17]
Poids 1 an	[R=0,91;p>0,10]	[R=0,88;p=0,07]	[F=13,23;p=0,14]
Bulbes olfactifs 3 mois*	[R=0,96;p>0,10]	[R>0,80;p<0,01]	[L=0,69;p=0,43]
Bulbes olfactifs 1 an	[R=0,94;p>0,10]	[R=0,99;p>0,10]	[F=0,66;p=0,80]
Surface glomérule 3 mois	[R=0,95;p>0,10]	[R=0,93;p>0,10]	[F=1,10;p=0,93]
Surface glomérule 1 an	[R=0,88;p=0,06]	[R=0,97;p>0,10]	[F=5,10;p=0,33]
Surfaces fibres 1 an	[R=0,98;p>0,10]	[R=0,99;p>0,10]	[F=0,18;p=0,30]

Tableau 20 : Tests de normalité et d'égalité des variances sur différents groupes d'animaux dont on examine certaines mesures morphologiques. * : Expériences dont la comparaison des données nécessite l'utilisation de tests non paramétriques.

b. Expressions à 3 mois

La distribution des données en densité optique à 3 mois est normale et les variances sont égales (Tableau 19). Nous avons testé l'hypothèse nulle H_0 « La densité optique d'un antigène donné ne dépend pas du génotype » contre l'hypothèse alternative H_1 « La densité optique d'un antigène donné dépend du génotype » avec le test t de Student puisque nous comparons 2 génotypes : « sauvage » et homozygote pour la mutation.

Anticorps	Test de normalité		Test d'égalité des variances
	+/+	-/-	
synaptophysine	[R=0,96;p>0,10]	[R=0,91;p>0,10]	[F=0,26;p=0,23]
GAP43	[R=0,82;p=0,05]	[R=0,94;p>0,10]	[F=1,32;p=0,75]
GFAP	[R=0,99;p>0,10]	[R=0,89;p=0,08]	[F=0,18;p=0,13]

Tableau 21 : Tests de normalité et d'égalité des variances sur les différents groupes d'animaux jeunes testés en densité optique.

c. Expressions à 1 an

A 1 an, la distribution des données de densité optique est normale mais les effectifs sont parfois trop réduits pour envisager des tests paramétriques (cas de l'étude de la structure AOB²⁹). Nous avons donc testé l'hypothèse nulle H_0 « La densité optique ne dépend pas du génotype » contre l'hypothèse alternative H_1 « La densité optique dépend du génotype » avec le test paramétrique t de Student ou non paramétrique de Mann-Whitney selon les cas (Tableau 20).

²⁹ Les coupes contenant cette structure, très petite, sont peu nombreuses, et sont facilement perdues au cours de l'immunocytochimie sur coupes flottantes.

Anticorps	Détail	Test de normalité		Test d'égalité des variances
		+/+	-/-	
Synaptophysine	OB	[$R=0,97;p>0,10$]	[$R=0,94;p>0,10$]	[$F=0,35;p=0,41$]
	AOB*	[$R=0,91;p>0,10$]	nr	[$L=0,04;p=0,86$]
OMP	OB	[$R>0,99;p>0,10$]	[$R=0,88;p=0,07$]	[$F=3,26;p=0,47$]
	AOB*	[$R>0,99;p>0,10$]	nr	[$L=2,38;p=0,22$]

Tableau 22 : Tests de normalité et d'égalité des variances sur les différents groupes d'animaux d'1 an testés en densité optique. nr = non réalisable (effectifs insuffisants : $n=2$). * : Expériences dont la comparaison des données nécessite l'utilisation de tests non paramétriques.

BIBLIOGRAPHIE

- Ache BW et Young JM. 2005. Olfaction: diverse species, conserved principles. *Neuron* 48(3):417-430.
- Aguezzoul M, Andrieux A et Denarier E. 2003. Overlap of promoter and coding sequences in the mouse STOP gene (Mtap6). *Genomics* 81(6):623-627.
- Akbarian S, Kim JJ, Potkin SG, Hetrick WP, Bunney WE, Jr. et Jones EG. 1996. Maldistribution of interstitial neurons in prefrontal white matter of the brains of schizophrenic patients. *Arch Gen Psychiatry* 53(5):425-436.
- Allendoerfer KL et Shatz CJ. 1994. The subplate, a transient neocortical structure: its role in the development of connections between thalamus and cortex. *Annu Rev Neurosci* 17:185-218.
- Andreasen NC. 1999. A unitary model of schizophrenia: Bleuler's "fragmented phrene" as schizencephaly. *Arch Gen Psychiatry* 56(9):781-787.
- Andreasen NC et Olsen S. 1982. Negative v positive schizophrenia. Definition and validation. *Arch Gen Psychiatry* 39(7):789-794.
- Andrieux A, Salin P, Schweitzer A, Begou M, Pachoud B, Brun P, Gory-Faure S, Kujala P, Suaud-Chagny MF, Hofle G et Job D. 2006. Microtubule stabilizer ameliorates synaptic function and behavior in a mouse model for schizophrenia. *Biol Psychiatry* 60(11):1224-1230.
- Andrieux A, Salin PA et Job D. 2004. [A role for microtubules in mental diseases?]. *Pathol Biol (Paris)* 52(2):89-92.
- Andrieux A, Salin PA, Vernet M, Kujala P, Baratier J, Gory-Faure S, Bosc C, Pointu H, Proietto D, Schweitzer A, Denarier E, Klumperman J et Job D. 2002. The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. *Genes Dev* 16(18):2350-2364.
- Arias MS, Baratta J, Yu J et Robertson RT. 2002. Absence of selectivity in the loss of neurons from the developing cortical subplate of the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 139(2):331-335.
- Arnold SE, Franz BR, Trojanowski JQ, Moberg PJ et Gur RE. 1996. Glial fibrillary acidic protein-immunoreactive astrocytosis in elderly patients with schizophrenia and dementia. *Acta Neuropathol (Berl)* 91(3):269-277.
- Arnold SE, Han LY, Moberg PJ, Turetsky BI, Gur RE, Trojanowski JQ et Hahn CG. 2001. Dysregulation of olfactory receptor neuron lineage in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 58(9):829-835.
- Arnold SE, Lee VM, Gur RE et Trojanowski JQ. 1991. Abnormal expression of two microtubule-associated proteins (MAP2 and MAP5) in specific subfields of the hippocampal formation in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(23):10850-10854.
- Astic L et Saucier D. 2001. Neuronal plasticity and regeneration in the olfactory system of mammals: morphological and functional recovery following olfactory bulb deafferentation. *Cell Mol Life Sci* 58(4):538-545.
- Azaïs JM et Bardet JM. 2006. Intermède métastatistique: pour une théorie pratique des tests. Dans: Dunod, editor. *Le Modèle Linéaire par l'exemple: régression, analyse de la variance et plan d'expériences illustrés avec R, SAS et Splus*. Paris.

- Baratier J, Peris L, Brocard J, Gory-Faure S, Dufour F, Bosc C, Fourest-Lieuvin A, Blanchoin L, Salin P, Job D et Andrieux A. 2006. Phosphorylation of microtubule-associated protein STOP by calmodulin kinase II. *J Biol Chem* 281(28):19561-19569.
- Bayer TA, Falkai P et Maier W. 1999. Genetic and non-genetic vulnerability factors in schizophrenia: the basis of the "two hit hypothesis". *J Psychiatr Res* 33(6):543-548.
- Beauchamp GK, Doty RL, Moulton DG et Mugford RA. 1976. The pheromone concept in mammalian chemical communication: a critique. Dans: Doty RL, editor. *Mammalian Olfaction, Reproductive Processes and Behaviour*. New-York: Accademic Press. p 143-160.
- Begou M, Brun P, Bertrand JB, Job D, Schweitzer A, D'Amato T, Saoud M, Andrieux A et Suaud-Chagny MF. 2007. Post-pubertal emergence of alterations in locomotor activity in stop null mice. *Synapse* 61(9):689-697.
- Behan M et Haberly LB. 1999. Intrinsic and efferent connections of the endopiriform nucleus in rat. *J Comp Neurol* 408(4):532-548.
- Benitez-King G, Ramirez-Rodriguez G et Ortiz L. 2007. Altered Microtubule Associated Proteins in Schizophrenia. *NeuroQuantology* 5(1):58-61.
- Benitez-King G, Ramirez-Rodriguez G, Ortiz L et Meza I. 2004. The neuronal cytoskeleton as a potential therapeutical target in neurodegenerative diseases and schizophrenia. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 3(6):515-533.
- Benowitz LI et Routtenberg A. 1997. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci* 20(2):84-91.
- Benson MA, Newey SE, Martin-Rendon E, Hawkes R et Blake DJ. 2001. Dysbindin, a novel coiled-coil-containing protein that interacts with the dystrobrevins in muscle and brain. *J Biol Chem* 276(26):24232-24241.
- Benson MA, Sillitoe RV et Blake DJ. 2004. Schizophrenia genetics: dysbindin under the microscope. *Trends Neurosci* 27(9):516-519.
- Berrios GE, Luque R et Villagrán JM. 2003. Schizophrenia: A Conceptual History. *International Journal of Psychology and Psychological Therapy* 3(2):111-140.
- Bielas SL et Gleeson JG. 2004. Cytoskeletal-associated proteins in the migration of cortical neurons. *J Neurobiol* 58(1):149-159.
- Blennow K, Bogdanovic N, Gottfries CG et Davidsson P. 1999. The growth-associated protein GAP-43 is increased in the hippocampus and in the gyrus cinguli in schizophrenia. *J Mol Neurosci* 13(1-2):101-109.
- Bloom FE. 1993. Advancing a neurodevelopmental origin for schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 50(3):224-227.
- Boks MP, Rietkerk T, van de Beek MH, Sommer IE, de Koning TJ et Kahn RS. 2007. Reviewing the role of the genes G72 and DAOA in glutamate neurotransmission in schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol* 17(9):567-572.
- Boos HB, Aleman A, Cahn W, Pol HH et Kahn RS. 2007. Brain volumes in relatives of patients with schizophrenia: a meta-analysis. *Arch Gen Psychiatry* 64(3):297-304.
- Bosc C, Andrieux A et Job D. 2003. STOP proteins. *Biochemistry* 42(42):12125-12132.
- Bosc C, Cronk JD, Pirollet F, Watterson DM, Haiech J, Job D et Margolis RL. 1996. Cloning, expression, and properties of the microtubule-stabilizing protein STOP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(5):2125-2130.
- Bottmer C, Bachmann S, Pantel J, Essig M, Amann M, Schad LR, Magnotta V et Schroder J. 2005. Reduced cerebellar volume and neurological soft signs in first-episode schizophrenia. *Psychiatry Res* 140(3):239-250.
- Boucart M, Mobarek N, Cuervo C et Danion JM. 1999. What is the nature of increased Stroop interference in schizophrenia? *Acta Psychol (Amst)* 101(1):3-25.

- Bouslama M, Durand E, Chauviere L, Van den Bergh O et Gallego J. 2005. Olfactory classical conditioning in newborn mice. *Behav Brain Res* 161(1):102-106.
- Brand G. 2006. Olfactory/trigeminal interactions in nasal chemoreception. *Neurosci Biobehav Rev* 30(7):908-917.
- Breer H. 2003. Sense of smell: recognition and transduction of olfactory signals. *Biochem Soc Trans* 31(Pt 1):113-116.
- Breer H, Fleischer J et Strotmann J. 2006. The sense of smell: multiple olfactory subsystems. *Cell Mol Life Sci* 63(13):1465-1475.
- Breipohl W, Naguro T et Walker DG. 1989. The postnatal development of Masera's organ in the rat. *Chem Senses* 14:649-662.
- Brennan PA. 2004. The nose knows who's who: chemosensory individuality and mate recognition in mice. *Horm Behav* 46(3):231-240.
- Brennan PA et Keverne EB. 1997. Neural mechanisms of mammalian olfactory learning. *Prog Neurobiol* 51(4):457-481.
- Brenner E, Sonnewald U, Schweitzer A, Andrieux A et Nehlig A. 2007. Hypoglutamatergic activity in the STOP knockout mouse: A potential model for chronic untreated schizophrenia. *J Neurosci Res* 85(1):3487-93.
- Bromet EJ et Fennig S. 1999. Epidemiology and natural history of schizophrenia. *Biological Psychiatry* 46(7):871-881.
- Brun P, Begou M, Andrieux A, Mouly-Badina L, Clerget M, Schweitzer A, Scarna H, Renaud B, Job D et Suaud-Chagny MF. 2005. Dopaminergic transmission in STOP null mice. *J Neurochem* 94(1):63-73.
- Buck L et Axel R. 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65(1):175-187.
- Buckholtz JW, Meyer-Lindenberg A, Honea RA, Straub RE, Pezawas L, Egan MF, Vakkalanka R, Kolachana B, Verchinski BA, Sust S, Mattay VS, Weinberger DR et Callicott JH. 2007. Allelic variation in RGS4 impacts functional and structural connectivity in the human brain. *J Neurosci* 27(7):1584-1593.
- Bunney WE et Bunney BG. 2000. Evidence for a compromised dorsolateral prefrontal cortical parallel circuit in schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev* 31(2-3):138-146.
- Camargo LM, Collura V, Rain JC, Mizuguchi K, Hermjakob H, Kerrien S, Bonnert TP, Whiting PJ, Brandon NJ. 2007. Disrupted in Schizophrenia 1 Interactome: evidence for the close connectivity of risk genes and a potential synaptic basis for schizophrenia. *Mol Psychiatry* 12(1):74-86.
- Cantor-Graae E et Selten JP. 2005. Schizophrenia and migration: a meta-analysis and review. *Am J Psychiatry* 162(1):12-24.
- Carleton A, Rochefort C, Morante-Oria J, Desmairons D, Vincent JD, Gheusi G et Lledo PM. 2002. Making scents of olfactory neurogenesis. *J Physiol Paris* 96(1-2):115-122.
- Carlsson A et Carlsson ML. 2006. A dopaminergic deficit hypothesis of schizophrenia: the path to discovery. *Dialogues Clin Neurosci* 8(1):137-142.
- Carmi O et Leon M. 1991. Neurobehavioral responses of neonatal rats to previously experienced odors of different concentrations. *Brain Res Dev Brain Res* 64(1-2):43-46.
- Cascella NG, Takaki M, Lin S et Sawa A. 2007. Neurodevelopmental involvement in schizophrenia: the olfactory epithelium as an alternative model for research. *J Neurochem* 102(3):587-594.
- Castner SA et Williams GV. 2007. Tuning the engine of cognition: a focus on NMDA/D1 receptor interactions in prefrontal cortex. *Brain Cogn* 63(2):94-122.

- Catalano SM, Robertson RT et Killackey HP. 1996. Individual axon morphology and thalamocortical topography in developing rat somatosensory cortex. *J Comp Neurol* 367(1):36-53.
- Cernoch JM et Porter RH. 1985. Recognition of maternal axillary odors by infants. *Child Dev* 56(6):1593-1998.
- Chambers JS, Thomas D, Saland L, Neve RL et Perrone-Bizzozero NI. 2005. Growth-associated protein 43 (GAP-43) and synaptophysin alterations in the dentate gyrus of patients with schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29(2):283-290.
- Chen WR et Shepherd GM. 2005. The olfactory glomerulus: a cortical module with specific functions. *J Neurocytol* 34(3-5):353-360.
- Chizhikov V et Millen KJ. 2003. Development and malformations of the cerebellum in mice. *Mol Genet Metab* 80(1-2):54-65.
- Christensen R. 1991. *Linear Models for Multivariate, Time Series, and Spatial Data*: Springer Verlag.
- Church SM, Cotter D, Bramon E et Murray RM. 2002. Does schizophrenia result from developmental or degenerative processes? *J Neural Transm Suppl*(63):129-147.
- Clarke MC, Harley M et Cannon M. 2006. The role of obstetric events in schizophrenia. *Schizophr Bull* 32(1):3-8.
- Clinton SM et Meador-Woodruff JH. 2004. Thalamic dysfunction in schizophrenia: neurochemical, neuropathological, and in vivo imaging abnormalities. *Schizophr Res* 69(2-3):237-253.
- Cornwell-Jones C et Sobrian SK. 1977. Development of odor-guided behavior in Wistar and Sprague-Dawley rat pups. *Physiol Behav* 19(5):685-688.
- Cotter D, Kerwin R, Doshi B, Martin CS et Everall IP. 1997. Alterations in hippocampal non-phosphorylated MAP2 protein expression in schizophrenia. *Brain Res* 765(2):238-246.
- Cotter D, Wilson S, Roberts E, Kerwin R et Everall IP. 2000. Increased dendritic MAP2 expression in the hippocampus in schizophrenia. *Schizophr Res* 41(2):313-323.
- Coyle JT. 2006. Glutamate and schizophrenia: beyond the dopamine hypothesis. *Cell Mol Neurobiol* 26(4-6):365-384.
- Craddock N, Owen MJ et O'Donovan MC. 2006. The catechol-O-methyl transferase (COMT) gene as a candidate for psychiatric phenotypes: evidence and lessons. *Mol Psychiatry* 11(5):446-458.
- Cullen TJ, Walker MA, Parkinson N, Craven R, Crow TJ, Esiri MM et Harrison PJ. 2003. A postmortem study of the mediodorsal nucleus of the thalamus in schizophrenia. *Schizophr Res* 60(2-3):157-166.
- Cumming R et Burgoyne RD. 1983. Compartmentalization of neuronal cytoskeletal proteins. Review. *Biosci Rep* 3(11):997-1006.
- Cuschieri A et Bannister LH. 1975. The development of the olfactory mucosa in the mouse: light microscopy. *J Anat* 119(Pt 2):277-286.
- Danion JM, Weingartner H et Singer L. 1996. Is cognitive psychopathology plausible? Illustrations from memory research. *Can J Psychiatry* 41(7 Suppl 1):S5-13.
- Danos P, Baumann B, Bernstein HG, Stauch R, Krell D, Falkai P et Bogerts B. 2002. The ventral lateral posterior nucleus of the thalamus in schizophrenia: a post-mortem study. *Psychiatry Res* 114(1):1-9.
- Daoudal G et Debanne D. 2003. Long-term plasticity of intrinsic excitability: learning rules and mechanisms. *Learn Mem* 10(6):456-465.
- David AS. 1994. Schizophrenia and the corpus callosum: developmental, structural and functional relationships. *Behav Brain Res* 64(1-2):203-211.

- Delaunay-El Allam M, Marlier L et Schaal B. 2006. Learning at the breast: preference formation for an artificial scent and its attraction against the odor of maternal milk. *Infant Behav Dev* 29(3):308-321.
- De Lorenzo AJ. 1957. Electron microscopic observations of the olfactory mucosa and olfactory nerve. *J Biophys Biochem Cytol* 3(6):839-850.
- Dehmelt L et Halpain S. 2005. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 6(1):204.
- Del Cerro MC. 1998. Role of the vomeronasal input in maternal behavior. *Psychoneuroendocrinology* 23(8):905-926.
- Del Cul A. 2005. Schizophrénie: les données de l'imagerie cérébrale. *Médecine & enfance* 25(10):657-661.
- Denarier E, Aguezzoul M, Jolly C, Vourc'h C, Roure A, Andrieux A, Bosc C et Job D. 1998a. Genomic structure and chromosomal mapping of the mouse STOP gene (Mtap6). *Biochem Biophys Res Commun* 243(3):791-796.
- Denarier E, Fourest-Lieuvin A, Bosc C, Pirollet F, Chapel A, Margolis RL et Job D. 1998b. Nonneuronal isoforms of STOP protein are responsible for microtubule cold stability in mammalian fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(11):6055-6060.
- Dennis C. 2005. Psychiatric disease: all in the mind of a mouse. *Nature* 438(7065):151-152.
- Di Forti M, Morrison PD, Butt A et Murray RM. 2007. Cannabis use and psychiatric and cognitive disorders: the chicken or the egg? *Curr Opin Psychiatry* 20(3):228-234.
- Duveau A et Godinot F. 1988. Influence of the odorization of the rearing environment on the development of odor-guided behavior in rat pups. *Physiol Behav* 42(3):265-270.
- Eastwood SL, Cotter D et Harrison PJ. 2001. Cerebellar synaptic protein expression in schizophrenia. *Neuroscience* 105(1):219-229.
- Eastwood SL et Harrison PJ. 2005. Interstitial white matter neuron density in the dorsolateral prefrontal cortex and parahippocampal gyrus in schizophrenia. *Schizophr Res* 79(2-3):181-188.
- Eastwood SL et Harrison PJ. 2001. Synaptic pathology in the anterior cingulate cortex in schizophrenia and mood disorders. A review and a Western blot study of synaptophysin, GAP-43 and the complexins. *Brain Res Bull* 55(5):569-578.
- Eastwood SL, Lyon L, George L, Andrieux A, Job D et Harrison PJ. 2007. Altered expression of synaptic protein mRNAs in STOP (MAP6) mutant mice. *J Psychopharmacol* 21(6):635-44.
- Eisthen HL. 1997. Evolution of vertebrate olfactory systems. *Brain Behav Evol* 50(4):222-233.
- Ellenberger SL et Young IT. 2000. Microscope image acquisition. Dans: Baldock R, Graham J, editors. *Image Processing and Analysis, A Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press. p 1-36.
- Eng LF, Ghirnikar RS et Lee YL. 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* 25(9-10):1439-1451.
- Evans GJ et Cousin MA. 2005. Tyrosine phosphorylation of synaptophysin in synaptic vesicle recycling. *Biochem Soc Trans* 33(Pt 6):1350-1353.
- Eyer J et Peterson A. 1994. Neurofilament-deficient axons and perikaryal aggregates in viable transgenic mice expressing a neurofilament-beta-galactosidase fusion protein. *Neuron* 12(2):389-405.
- Falls DL. 2003. Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res* 284(1):14-30.
- Fatemi SH, Laurence JA, Araghi-Niknam M, Sary JM, Schulz SC, Lee S et Gottesman, II. 2004. Glial fibrillary acidic protein is reduced in cerebellum of subjects with major depression, but not schizophrenia. *Schizophr Res* 69(2-3):317-323.

- Fernandez BG. 2004. The cytoskeleton in vivo. *PLoS Biol* 2(4):E100.
- Fleischer J, Hass N, Schwarzenbacher K, Besser S et Breer H. 2006. A novel population of neuronal cells expressing the olfactory marker protein (OMP) in the anterior/dorsal region of the nasal cavity. *Histochem Cell Biol* 125(4):337-349.
- Foucher JR. 2007. L'intégration fonctionnelle cérébrale dans la schizophrénie [Thèse de doctorat]. Strasbourg: Université Louis Pasteur.
- Foucher JR et Luck D. 2006. Psychosis related to neurological conditions: pro and cons of the dis- / mis-connectivity models of schizophrenia. *Dialogues Clin Neurosci* 8(1):17-27.
- Fradley RL, O'Meara GF, Newman RJ, Andrieux A, Job D et Reynolds DS. 2005. STOP knockout and NMDA NR1 hypomorphic mice exhibit deficits in sensorimotor gating. *Behav Brain Res* 163(2):257-264.
- Francis-West PH, Ladher RK et Schoenwolf GC. 2002. Development of the sensory organs. *Sci Prog* 85(Pt 2):151-173.
- Frankle WG, Lerma J et Laruelle M. 2003. The synaptic hypothesis of schizophrenia. *Neuron* 39(2):205-216.
- Franklin KBJ et Paxinos G. 1997. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. New-York: Academic Press, Inc.
- Friston KJ et Frith CD. 1995. Schizophrenia: a disconnection syndrome? *Clin Neurosci* 3(2):89-97.
- Fu W, Sugai T, Yoshimura H et Onoda N. 2004. Convergence of olfactory and gustatory connections onto the endopiriform nucleus in the rat. *Neuroscience* 126(4):1033-1041.
- Fuss SH, Omura M et Mombaerts P. 2005. The Grueneberg ganglion of the mouse projects axons to glomeruli in the olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 22(10):2649-2654.
- Gainetdinov RR, Mohn AR et Caron MG. 2001. Genetic animal models: focus on schizophrenia. *Trends Neurosci* 24(9):527-533.
- Galef BG, Jr., Mason JR, Preti G et Bean NJ. 1988. Carbon disulfide: a semiochemical mediating socially-induced diet choice in rats. *Physiol Behav* 42(2):119-124.
- Galiano MR, Bosc C, Schweitzer A, Andrieux A, Job D et Hallak ME. 2004. Astrocytes and oligodendrocytes express different STOP protein isoforms. *J Neurosci Res* 78(3):329-337.
- Gatewood JD, Wills A, Shetty S, Xu J, Arnold AP, Burgoyne PS et Rissman EF. 2006. Sex chromosome complement and gonadal sex influence aggressive and parental behaviors in mice. *J Neurosci* 26(8):2335-2342.
- Gerfen CR. 1992. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Annu Rev Neurosci* 15:285-320.
- Gerfen CR. 2004. Basal Ganglia. Dans: Paxinos G, editor. *The Rat Nervous System*. Third edition ed. San Diego: Elsevier, Inc. p 455-508.
- Geyer MA et Markou A. 1995. Animal models of psychiatric disorders. *Psychopharmacology: the fourth generation of progress* Raven Press, New York:787.
- Ghosh A et Shatz CJ. 1992. Involvement of subplate neurons in the formation of ocular dominance columns. *Science* 255(5050):1441-1443.
- Gilbert AR, Rosenberg DR, Harenski K, Spencer S, Sweeney JA et Keshavan MS. 2001. Thalamic volumes in patients with first-episode schizophrenia. *Am J Psychiatry* 158(4):618-624.
- Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM et Caron MG. 1996. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 379(6566):606-612.
- Giroud A, Martinet M et Deluchat C. 1965. [Mechanism of development of the olfactory bulb]. *Arch Anat Histol Embryol* 48(1):203-217.

- Glantz LA et Lewis DA. 2000. Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 57(1):65-73.
- Gong Q et Shipley MT. 1995. Evidence that pioneer olfactory axons regulate telencephalon cell cycle kinetics to induce the formation of the olfactory bulb. *Neuron* 14(1):91-101.
- Gray JA. 1998. Integrating schizophrenia. *Schizophr Bull* 24(2):249-266.
- Groenewegen HJ et Witter MP. 2004. Thalamus. Dans: Paxinos G, editor. *The Rat Nervous System*. Third edition ed. San Diego: Elsevier, Inc. p 407-453.
- Guillaud L, Bosc C, Fourest-Lieuvin A, Denarier E, Pirollet F, Lafanechere L et Job D. 1998. STOP proteins are responsible for the high degree of microtubule stabilization observed in neuronal cells. *J Cell Biol* 142(1):167-179.
- Guzik BW et Goldstein LS. 2004. Microtubule-dependent transport in neurons: steps towards an understanding of regulation, function and dysfunction. *Curr Opin Cell Biol* 16(4):443-450.
- Halim ND, Weickert CS, McClintock BW, Hyde TM, Weinberger DR, Kleinman JE et Lipska BK. 2003. Presynaptic proteins in the prefrontal cortex of patients with schizophrenia and rats with abnormal prefrontal development. *Mol Psychiatry* 8(9):797-810.
- Haller J, Toth M, Halasz J et De Boer SF. 2006. Patterns of violent aggression-induced brain c-fos expression in male mice selected for aggressiveness. *Physiol Behav* 88(1-2):173-182.
- Halpain S et Dehmelt L. 2006. The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 7(6):224.
- Halpern M et Martinez-Marcos A. 2003. Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Prog Neurobiol* 70(3):245-318.
- Harrison PJ. 1999. The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain* 122 (Pt 4):593-624.
- Harrison PJ. 2004. The hippocampus in schizophrenia: a review of the neuropathological evidence and its pathophysiological implications. *Psychopharmacology (Berl)* 174(1):151-162.
- Harrison PJ. 2007. Schizophrenia susceptibility genes and neurodevelopment. *Biol Psychiatry* 61(10):1119-1120.
- Harrison PJ et Law AJ. 2006. Neuregulin 1 and schizophrenia: genetics, gene expression, and neurobiology. *Biol Psychiatry* 60(2):132-140.
- Harrison PJ et Owen MJ. 2003. Genes for schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications. *The Lancet* 361(9355):417-419.
- Harrison PJ et Weinberger DR. 2005a. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Molecular Psychiatry* 10(1):40-68.
- Harrison PJ et Weinberger DR. 2005b. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry* 10(1):40-68; image 45.
- Hazlett EA, Buchsbaum MS, Kemether E, Bloom R, Platholi J, Brickman AM, Shihabuddin L, Tang C et Byne W. 2004. Abnormal glucose metabolism in the mediodorsal nucleus of the thalamus in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 161(2):305-314.
- Heckers S. 2001. Neuroimaging studies of the hippocampus in schizophrenia. *Hippocampus* 11(5):520-528.
- Herrera DG et Robertson HA. 1996. Activation of c-fos in the brain. *Prog Neurobiol* 50(2-3):83-107.
- Hikida T, Jaaro-Peled H, Seshadri S, Oishi K, Hookway C, Kong S, Wu D, Xue R, Andradé M, Tankou S, Mori S, Gallagher M, Ishizuka K, Pletnikov M, Kida S, Sawa A. 2007.

- Dominant-negative DISC1 transgenic mice display schizophrenia-associated phenotypes detected by measures translatable to humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(36):14501-6
- Hudson R. 1993. Olfactory imprinting. *Curr Opin Neurobiology* 3(4):548-552.
- Ingraham LJ et Kety SS. 2000. Adoption Studies of Schizophrenia. *AMERICAN JOURNAL OF MEDICAL GENETICS (SEMIN MED GENET)* 97:18-22.
- Ishizuka K, Paek M, Kamiya A et Sawa A. 2006. A review of Disrupted-In-Schizophrenia-1 (DISC1): neurodevelopment, cognition, and mental conditions. *Biol Psychiatry* 59(12):1189-1197.
- Jablensky A. 2000. Epidemiology of schizophrenia: the global burden of disease and disability. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 250(6):274-285.
- Jentsch JD et Roth RH. 1999. The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 20(3):201-225.
- Job D, Fischer EH et Margolis RL. 1981. Rapid disassembly of cold-stable microtubules by calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(8):4679-4682.
- Job D, Rauch CT, Fischer EH et Margolis RL. 1982. Recycling of cold-stable microtubules: evidence that cold stability is due to substoichiometric polymer blocks. *Biochemistry* 21(3):509-515.
- Kanold PO. 2004. Transient microcircuits formed by subplate neurons and their role in functional development of thalamocortical connections. *Neuroreport* 15(14):2149-2153.
- Karson CN, Mrak RE, Schluterman KO, Sturner WQ, Sheng JG et Griffin WS. 1999. Alterations in synaptic proteins and their encoding mRNAs in prefrontal cortex in schizophrenia: a possible neurochemical basis for 'hypofrontality'. *Mol Psychiatry* 4(1):39-45.
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ et Emson PC. 1995. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci* 18(12):527-535.
- Keller A, Yagodin S, Aroniadou-Anderjaska V, Zimmer LA, Ennis M, Sheppard NF, Jr. et Shipley MT. 1998. Functional organization of rat olfactory bulb glomeruli revealed by optical imaging. *J Neurosci* 18(7):2602-2612.
- Keverne EB. 1999. The vomeronasal organ. *Science* 286(5440):716-720.
- Keverne EB. 2005. Odor here, odor there: chemosensation and reproductive function. *Nat Neurosci* 8(12):1637-1638.
- Klemm WR. 2004. Habenular and interpeduncularis nuclei: shared components in multiple-function networks. *Med Sci Monit* 10(11):RA261-273.
- Koenig JI. 2006. Schizophrenia: A unique translational opportunity in behavioral neuroendocrinology. *Horm Behav* 50(4):602-11.
- Koenig JI, Kirkpatrick B et Lee P. 2002. Glucocorticoid hormones and early brain development in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 27(2):309-318.
- Kosaka K et Kosaka T. 2005. synaptic organization of the glomerulus in the main olfactory bulb: compartments of the glomerulus and heterogeneity of the periglomerular cells. *Anat Sci Int* 80(2):80-90.
- Kostovic I et Rakic P. 1980. Cytology and time of origin of interstitial neurons in the white matter in infant and adult human and monkey telencephalon. *J Neurocytol* 9(2):219-242.
- Kotz S, Balakrishnan N, Read CB, Vidakovic B et Johnson NL. 2006. *Encyclopedia of Statistical Sciences*. New-Jersey: Wiley-Interscience.

- Kuperberg G et Heckers S. 2000. Schizophrenia and cognitive function. *Curr Opin Neurobiol* 10(2):205-210.
- Landen M, Davidsson P, Gottfries CG, Grenfeldt B, Stridsberg M et Blennow K. 1999. Reduction of the small synaptic vesicle protein synaptophysin but not the large dense core chromogranins in the left thalamus of subjects with schizophrenia. *Biol Psychiatry* 46(12):1698-1702.
- Lecourtier L, Neijt HC et Kelly PH. 2004. Habenula lesions cause impaired cognitive performance in rats: implications for schizophrenia. *Eur J Neurosci* 19(9):2551-2560.
- Letournel F, Bocquet A, Perrot R, Dechaume A, Guinut F, Eyer J et Barthelaix A. 2006. Neurofilament high molecular weight-green fluorescent protein fusion is normally expressed in neurons and transported in axons: a neuronal marker to investigate the biology of neurofilaments. *Neuroscience* 137(1):103-111.
- Levitt P, Ebert P, Mirnics K, Nimgaonkar VL et Lewis DA. 2006. Making the case for a candidate vulnerability gene in schizophrenia: Convergent evidence for regulator of G-protein signaling 4 (RGS4). *Biol Psychiatry* 60(6):534-537.
- Levy F, Keller M et Poindron P. 2004. Olfactory regulation of maternal behavior in mammals. *Horm Behav* 46(3):284-302.
- Lewis DA et Levitt P. 2002. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu Rev Neurosci* 25:409-432.
- Lewis DA et Moghaddam B. 2006. Cognitive dysfunction in schizophrenia: convergence of gamma-aminobutyric acid and glutamate alterations. *Arch Neurol* 63(10):1372-1376.
- Lieberman JA, Mailman RB, Duncan G, Sikich L, Chakos M, Nichols DE et Kraus JE. 1998. Serotonergic basis of antipsychotic drug effects in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 44(11):1099-1117.
- Lipska BK. 2004. Using animal models to test a neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *J Psychiatry Neurosci* 29(4):282-286.
- Lipska BK et Weinberger DR. 2000. To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology* 23(3):223-239.
- Liu CJ, Grandes P, Matute C, Cuenod M et Streit P. 1989. Glutamate-like immunoreactivity revealed in rat olfactory bulb, hippocampus and cerebellum by monoclonal antibody and sensitive staining method. *Histochemistry* 90(6):427-445.
- Lonstein JS et De Vries GJ. 2000. Sex differences in the parental behavior of rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 24(6):669-686.
- Lubow RE. 2005. Construct validity of the animal latent inhibition model of selective attention deficits in schizophrenia. *Schizophr Bull* 31(1):139-153.
- Macfarlane A. 1975. Olfaction in the development of social preferences in the human neonate. *Ciba Found Symp* 33:103-107.
- Mahony D, Karunaratne S et Rothnagel JA. 2002. Improved detection of lacZ reporter gene expression in transgenic epithelia by immunofluorescence microscopy. *Exp Dermatol* 11(2):153-158.
- Malnic B, Hirono J, Sato T et Buck LB. 1999. Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* 96(5):713-723.
- Mandiyani VS, Coats JK et Shah NM. 2005. Deficits in sexual and aggressive behaviors in *Cnga2* mutant mice. *Nat Neurosci* 8(12):1660-1662.
- Margolis FL. 1972. A brain protein unique to the olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69(5):1221-1224.
- Margolis RL, Rauch CT et Job D. 1986. Purification and assay of a 145-kDa protein (STOP145) with microtubule-stabilizing and motility behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(3):639-643.

- Margolis RL, Rauch CT, Pirollet F et Job D. 1990. Specific association of STOP protein with microtubules in vitro and with stable microtubules in mitotic spindles of cultured cells. *Embo J* 9(12):4095-4102.
- Martin JL, Jeste DV et Ancoli-Israel S. 2005. Older schizophrenia patients have more disrupted sleep and circadian rhythms than age-matched comparison subjects. *J Psychiatr Res* 39(3):251-259.
- Martinez M, Calvo-Torrent A et Herbert J. 2002. Mapping brain response to social stress in rodents with c-fos expression: a review. *Stress* 5(1):3-13.
- Masliah E, Terry RD, Alford M et DeTeresa R. 1990. Quantitative immunohistochemistry of synaptophysin in human neocortex: an alternative method to estimate density of presynaptic terminals in paraffin sections. *J Histochem Cytochem* 38(6):837-844.
- Matsuzaki S et Tohyama M. 2007. Molecular mechanism of schizophrenia with reference to disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1). *Neurochem Int* 51(2-4):165-172.
- McCurdy RD, Feron F, Perry C, Chant DC, McLean D, Matigian N, Hayward NK, McGrath JJ et Mackay-Sim A. 2006. Cell cycle alterations in biopsied olfactory neuroepithelium in schizophrenia and bipolar I disorder using cell culture and gene expression analyses. *Schizophr Res* 82(2-3):163-173.
- McGrath JJ. 2007. The Surprisingly Rich Contours of Schizophrenia Epidemiology. *Archives of General Psychiatry* 64(1):14.
- McGrath J. 1999. Hypothesis: is low prenatal vitamin D a risk-modifying factor for schizophrenia? *Schizophr Res* 40(3):173-7.
- McLean JH, Darby-King A, Sullivan RM et King SR. 1993. Serotonergic influence on olfactory learning in the neonate rat. *Behav Neural Biol* 60(2):152-162.
- McQuillen PS, Sheldon RA, Shatz CJ et Ferriero DM. 2003. Selective vulnerability of subplate neurons after early neonatal hypoxia-ischemia. *J Neurosci* 23(8):3308-3315.
- Meador-Woodruff JH et Kleinman JE. 2002. Neurochemistry of schizophrenia: glutamatergic abnormalities. Dans: Braff DL, Freedman R, Davis KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C, editors. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*: Lippincott, Williams & Wilkins. p 717-728.
- Mennella JA et Moltz H. 1988. Infanticide in the male rat: the role of the vomeronasal organ. *Physiol Behav* 42(3):303-306.
- Mennella JA, Jagnow CP et Beauchamp GK. 2001. Prenatal and postnatal flavor learning by human infants. *Pediatrics* 107(6):E88.
- Meredith M. 1991. Sensory processing in the main and accessory olfactory systems: comparisons and contrasts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 39(4B):601-614.
- Millar JK, James R, Brandon NJ, Thomson PA. 2004. DISC1 and DISC2: discovering and dissecting molecular mechanisms underlying psychiatric illness. *Ann Med* 35(5):367-78
- Mirnic K, Middleton FA, Lewis DA et Levitt P. 2001. Analysis of complex brain disorders with gene expression microarrays: schizophrenia as a disease of the synapse. *Trends Neurosci* 24(8):479-486.
- Moberg PJ, Agrin R, Gur RE, Gur RC, Turetsky BI et Doty RL. 1999. Olfactory dysfunction in schizophrenia: a qualitative and quantitative review. *Neuropsychopharmacology* 21(3):325-340.
- Moberg PJ et Turetsky BI. 2003. Scent of a disorder: olfactory functioning in schizophrenia. *Curr Psychiatry Rep* 5(4):311-319.
- Mohn AR, Gainetdinov RR, Caron MG et Koller BH. 1999. Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell* 98(4):427-436.
- Mori K, Nagao H et Yoshihara Y. 1999. The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. *Science* 286(5440):711-715.

- Morris JA, Kandpal G, Ma L, Ausin CP. 2003. DISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia 1) is a centrosome-associated protein that interacts with MaP1A, MIPT3, ATF4/5 and NUDEL: regulation and loss of interaction with mutation. *Hum Mol Genet* 12(13):1591-608
- Moriceau S et Sullivan RM. 2005. Neurobiology of infant attachment. *Dev Psychobiol* 47(3):230-242.
- Mullen RJ, Buck CR et Smith AM. 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116(1):201-211.
- Murray RC et Calof AL. 1999. Neuronal regeneration: lessons from the olfactory system. *Semin Cell Dev Biol* 10(4):421-431.
- Murray RM et Lewis SW. 1987. Is schizophrenia a neurodevelopmental disorder? *Br Med J (Clin Res Ed)* 295(6600):681-682.
- Nedelec S, Dubacq C et Trembleau A. 2005. Morphological and molecular features of the mammalian olfactory sensory neuron axons: What makes these axons so special? *J Neurocytol* 34(1-2):49-64.
- Niemi LT, Suvisaari JM, Tuulio-Henriksson A et Lonnqvist JK. 2003. Childhood developmental abnormalities in schizophrenia: evidence from high-risk studies. *Schizophr Res* 60(2-3):239-258.
- Nishikawa S, Goto S, Hamasaki T, Ogawa M et Ushio Y. 1999. Transient and compartmental expression of the reeler gene product reelin in the developing rat striatum. *Brain Res* 850(1-2):244-248.
- O'Tuathaigh CM, Babovic D, O'Meara G, Clifford JJ, Croke DT et Waddington JL. 2007. Susceptibility genes for schizophrenia: characterisation of mutant mouse models at the level of phenotypic behaviour. *Neurosci Biobehav Rev* 31(1):60-78.
- Oikawa T, Saito H, Taniguchi K et Taniguchi K. 2001. Immunohistochemical studies on the differential maturation of three types of olfactory organs in the rats. *J Vet Med Sci* 63(7):759-765.
- Owen MJ, O'Donovan MC et Harrison PJ. 2005. Schizophrenia: a genetic disorder of the synapse? *Bmj* 330(7484):158-159.
- Pabion M, Job D et Margolis RL. 1984. Sliding of STOP proteins on microtubules. *Biochemistry* 23(26):6642-6648.
- Pantelis C, Yucel M, Wood SJ, Velakoulis D, Sun D, Berger G, Stuart GW, Yung A, Phillips L et McGorry PD. 2005. Structural brain imaging evidence for multiple pathological processes at different stages of brain development in schizophrenia. *Schizophr Bull* 31(3):672-696.
- Pedersen CB et Mortensen PB. 2006. Urbanization and traffic related exposures as risk factors for schizophrenia. *BMC Psychiatry* 6:2.
- Pereira C, Maamar-Tayeb M, Burke A, Perez-Polo R, Herndon DN et Jeschke MG. 2006. Immunohistochemical staining of transgenic beta-galactosidase in burned skin is a better indicator of transfection efficiency than histochemical techniques. *J Immunol Methods* 315(1-2):75-79.
- Perez-Neri I, Ramirez-Bermudez J, Montes S et Rios C. 2006. Possible mechanisms of neurodegeneration in schizophrenia. *Neurochem Res* 31(10):1279-1294.
- Perrone-Bizzozero NI, Sower AC, Bird ED, Benowitz LI, Ivins KJ et Neve RL. 1996. Levels of the growth-associated protein GAP-43 are selectively increased in association cortices in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(24):14182-14187.
- Peters JM, Hummel T, Kratzsch T, Lotsch J, Skarke C et Frolich L. 2003. Olfactory function in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: an investigation using psychophysical and electrophysiological techniques. *Am J Psychiatry* 160(11):1995-2002.

- Peterschmitt Y, Meyer F et Louilot A. 2007. Neonatal functional blockade of the entorhinal cortex results in disruption of accumbal dopaminergic responses observed in latent inhibition paradigm in adult rats. *Eur J Neurosci* 25(8):2504-2513.
- Pirollet F, Rauch CT, Job D et Margolis RL. 1989. Monoclonal antibody to microtubule-associated STOP protein: affinity purification of neuronal STOP activity and comparison of antigen with activity in neuronal and nonneuronal cell extracts. *Biochemistry* 28(2):835-842.
- Popken GJ, Bunney WE, Jr., Potkin SG et Jones EG. 2000. Subnucleus-specific loss of neurons in medial thalamus of schizophrenics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(16):9276-9280.
- Portier MM. 1992. [Neuronal cytoskeleton: structural, functional and dynamic aspects]. *Rev Neurol (Paris)* 148(1):1-19.
- Preti A, Cardascia L, Zen T, Marchetti M, Favaretto G et Miotto P. 2000. Risk for obstetric complications and schizophrenia. *Psychiatry Res* 96(2):127-139.
- Pupion G et Pupion PC. 1998. Tests non paramétriques avec applications à l'économie et à la gestion. *Economica*, Paris, 211 p.
- Raedler TJ, Bymaster FP, Tandon R, Copolov D et Dean B. 2007. Towards a muscarinic hypothesis of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 12(3):232-246.
- Rajkowska G, Selemon LD et Goldman-Rakic PS. 1998. Neuronal and glial somal size in the prefrontal cortex: a postmortem morphometric study of schizophrenia and Huntington disease. *Arch Gen Psychiatry* 55(3):215-224.
- Rapoport JL, Addington AM, Frangou S et Psych MR. 2005. The neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2005. *Mol Psychiatry* 10(5):434-449.
- Reep RL. 2000. Cortical layer VII and persistent subplate cells in mammalian brains. *Brain Behav Evol* 56(4):212-234.
- Reif A, Fritzen S, Finger M, Strobel A, Lauer M, Schmitt A et Lesch KP. 2006. Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression. *Mol Psychiatry* 11(5):514-22.
- Rekart JL, Meiri K et Routtenberg A. 2005. Hippocampal-dependent memory is impaired in heterozygous GAP-43 knockout mice. *Hippocampus* 15(1):1-7.
- Restrepo D, Arellano J, Oliva AM, Schaefer ML et Lin W. 2004. Emerging views on the distinct but related roles of the main and accessory olfactory systems in responsiveness to chemosensory signals in mice. *Horm Behav* 46(3):247-256.
- Rioux L, Gelber EI, Parand L, Kazi HA, Yeh J, Wintering R, Bilker W et Arnold SE. 2005. Characterization of olfactory bulb glomeruli in schizophrenia. *Schizophr Res* 77(2-3):229-239.
- Rioux L, Ruschinsky D et Arnold SE. 2004. Microtubule-associated protein MAP2 expression in olfactory bulb in schizophrenia. *Psychiatry Res* 128(1):1-7.
- Robertson GS, Hori SE et Powell KJ. 2006. Schizophrenia: an integrative approach to modelling a complex disorder. *J Psychiatry Neurosci* 31(3):157-167.
- Ross CA, Margolis RL, Reading SAJ, Pletnikov M et Coyle JT. 2006. Neurobiology of Schizophrenia. *Neuron* 52(1):139-153.
- Rosler W, Kuduz J, Schurmann FW et Schild D. 2002. Aggregation of f-actin in olfactory glomeruli: a common feature of glomeruli across phyla. *Chem Senses* 27(9):803-810.
- Rouillon F, Toumi M, Dansette GY, Benyaya J et Auquier P. 1997. Some aspects of the cost of schizophrenia in France. *Pharmacoeconomics* 11(6):578-594.
- Routtenberg A, Cantalops I, Zaffuto S, Serrano P et Namgung U. 2000. Enhanced learning after genetic overexpression of a brain growth protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(13):7657-7662.

- Royet JP, Souchier C, Jourdan F et Ploye H. 1988. Morphometric study of the glomerular population in the mouse olfactory bulb: numerical density and size distribution along the rostrocaudal axis. *J Comp Neurol* 270(4):559-568.
- Samama B et Boehm N. 1999. Inhibition of nitric oxide synthase impairs early olfactory associative learning in newborn rats. *Neurobiol Learn Mem* 71(2):219-231.
- Sanchez-Andrade G, James BM et Kendrick KM. 2005. Neural encoding of olfactory recognition memory. *J Reprod Dev* 51(5):547-558.
- Sassoe-Pognetto M, Cantino D, Panzanelli P, Verdun di Cantogno L, Giustetto M, Margolis FL, De Biasi S et Fasolo A. 1993. Presynaptic co-localization of carnosine and glutamate in olfactory neurones. *Neuroreport* 5(1):7-10.
- Schutter DJ et van Honk J. 2005. The cerebellum on the rise in human emotion. *Cerebellum* 4(4):290-294.
- Schwob JE, Szumowski KE et Stasky AA. 1992. Olfactory sensory neurons are trophically dependent on the olfactory bulb for their prolonged survival. *J Neurosci* 12(10):3896-3919.
- Seeman P. 1987. Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Synapse* 1(2):133-152.
- Sesack SR et Carr DB. 2002. Selective prefrontal cortex inputs to dopamine cells: implications for schizophrenia. *Physiol Behav* 77(4-5):513-517.
- Schaal B. 1986. Presumed olfactory exchanges between mother and neonate in humans. Dans Le Camus J & Conier, editors. *Ethology and psychology*. Privat-IEC, Toulouse. p 101-110.
- Schaal B, Marlier L et Soussignan R. 2000. Human fetuses learn odours from their pregnant mother's diet. *Chem Senses* 25(6):729-737.
- Shenton ME, Dickey CC, Frumin M et McCarley RW. 2001. A review of MRI findings in schizophrenia. *Schizophr Res* 49(1-2):1-52.
- Shepherd GM. 1972. Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb. *Physiol Rev* 52(4):864-917.
- Shimizu H, Iwayama Y, Yamada K, Toyota T, Minabe Y, Nakamura K, Nakajima M, Hattori E, Mori N, Osumi N et Yoshikawa T. 2006. Genetic and expression analyses of the STOP (MAP6) gene in schizophrenia. *Schizophr Res* 84(2-3):244-252.
- Shipley MT, Ennis M et Puche AC. 2004. Olfactory System. Dans: Paxinos G, editor. *The Rat Nervous System*. Third edition ed. San Diego: Elsevier, Inc. p 923-964.
- Smutzer G, Lee VM, Trojanowski JQ et Arnold SE. 1998. Human olfactory mucosa in schizophrenia. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 107(4):349-355.
- Steen RG, Mull C, McClure R, Hamer RM et Lieberman JA. 2006. Brain volume in first-episode schizophrenia: systematic review and meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Br J Psychiatry* 188:510-518.
- Stephan KE, Baldeweg T et Friston KJ. 2006. Synaptic plasticity and dysconnection in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 59(10):929-939.
- Stockhorst U et Pietrowsky R. 2004. Olfactory perception, communication, and the nose-to-brain pathway. *Physiol Behav* 83(1):3-11.
- Stowers L, Holy TE, Meister M, Dulac C et Koentges G. 2002. Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science* 295(5559):1493-1500.
- Sullivan PF, Kendler KS et Neale MC. 2003. Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Arch Gen Psychiatry* 60(12):1187-92.
- Sullivan RM, McGaugh JL et Leon M. 1991. Norepinephrine-induced plasticity and one-trial olfactory learning in neonatal rats. *Brain Res Dev Brain Res* 60(2):219-228.
- Sullivan RM et Wilson DA. 2003. Molecular biology of early olfactory memory. *Learn Mem* 10(1):1-4.

- Sullivan RM, Wilson DA et Leon M. 1989. Norepinephrine and learning-induced plasticity in infant rat olfactory system. *J Neurosci* 9(11):3998-4006.
- Sullivan RM, Leon M. 1987. One-trial olfactory learning enhances olfactory bulb responses to an appetitive conditioned odor in 7-day-old rats. *Brain Res.* 432(2):307-11.
- Sullivan RM, Wilson DA, Lemon C, Gerhardt GA. 1994. Bilateral 6-OHDA lesions of the locus coeruleus impair associative olfactory learning in newborn rats. *Brain Res.* 643(1-2):306-9.
- Susser E, Hoek HW et Brown A. 1998. Neurodevelopmental disorders after prenatal famine: The story of the Dutch Famine Study. *Am J Epidemiol* 147(3):213-216.
- Swerdlow NR et Geyer MA. 1998. Using an animal model of deficient sensorimotor gating to study the pathophysiology and new treatments of schizophrenia. *Schizophr Bull* 24(2):285-301.
- Tanaka E et Sabry J. 1995. Making the connection: cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance. *Cell* 83(2):171-176.
- Tandon R. 1999. Moving beyond findings: concepts and model-building in schizophrenia. *J Psychiatr Res* 33(6):467-471.
- Tian SY, Wang JF, Bezchlibnyk YB et Young LT. 2007. Immunoreactivity of 43 kDa growth-associated protein is decreased in post mortem hippocampus of bipolar disorder and schizophrenia. *Neurosci Lett* 411(2):123-127.
- Tilney F. 1933. Behavior in its relation to the development of the brain. Part II. Correlation between the development of the brain and behavior in the albino rat from embryonic states to maturity. *Bulletin of the Neurological Institute of New York* 3:252-358.
- Tobet SA et Schwarting GA. 2006. Minireview: recent progress in gonadotropin-releasing hormone neuronal migration. *Endocrinology* 147(3):1159-1165.
- Tochigi M, Okazaki Y, Kato N et Sasaki T. 2004. What causes seasonality of birth in schizophrenia? *Neurosci Res* 48(1):1-11.
- Tsai G et Coyle JT. 2002. Glutamatergic mechanisms in schizophrenia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42:165-179.
- Turetsky BI, Moberg PJ, Yousem DM, Doty RL, Arnold SE et Gur RE. 2000. Reduced olfactory bulb volume in patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 157(5):828-830.
- Valtorta F, Pennuto M, Bonanomi D et Benfenati F. 2004. Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *Bioessays* 26(4):445-453.
- van den Buuse M, Garner B, Gogos A et Kusljic S. 2005. Importance of animal models in schizophrenia research. *Aust N Z J Psychiatry* 39(7):550-557.
- van Kesteren RE et Spencer GE. 2003. The role of neurotransmitters in neurite outgrowth and synapse formation. *Rev Neurosci* 14(3):217-231.
- van Os J, Krabbendam L, Myin-Germeys I et Delespaul P. 2005. The schizophrenia envirome. *Curr Opin Psychiatry* 18(2):141-145.
- van Woerkom AE. 1990. The major hallucinogens and the central cytoskeleton: an association beyond coincidence? Towards sub-cellular mechanisms in schizophrenia. *Med Hypotheses* 31(1):7-15.
- Verdoux H et Sutter AL. 2002. Perinatal risk factors for schizophrenia: diagnostic specificity and relationships with maternal psychopathology. *Am J Med Genet* 114(8):898-905.
- Verhaagen J, Oestreicher AB, Gispen WH et Margolis FL. 1989. The expression of the growth associated protein B50/GAP43 in the olfactory system of neonatal and adult rats. *J Neurosci* 9(2):683-691.
- Vita A, De Peri L, Silenzi C et Dieci M. 2006. Brain morphology in first-episode schizophrenia: a meta-analysis of quantitative magnetic resonance imaging studies. *Schizophr Res* 82(1):75-88.

- Wachowiak M et Shipley MT. 2006. Coding and synaptic processing of sensory information in the glomerular layer of the olfactory bulb. *Semin Cell Dev Biol* 17(4):411-423.
- Webb BC et Wilson L. 1980. Cold-stable microtubules from brain. *Biochemistry* 19(9):1993-2001.
- Webster MJ, Shannon Weickert C, Herman MM, Hyde TM et Kleinman JE. 2001. Synaptophysin and GAP-43 mRNA levels in the hippocampus of subjects with schizophrenia. *Schizophr Res* 49(1-2):89-98.
- Weickert CS, Webster MJ, Hyde TM, Herman MM, Bachus SE, Bali G, Weinberger DR et Kleinman JE. 2001. Reduced GAP-43 mRNA in dorsolateral prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Cereb Cortex* 11(2):136-147.
- Weiler E et Farbman AI. 2003. The septal organ of the rat during postnatal development. *Chem Senses* 28(7):581-593.
- Weinberger DR. 1987. Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 44(7):660-669.
- Weinberger DR. 1999. Cell biology of the hippocampal formation in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 45(4):395-402.
- Weldon DA, Fedorcik GG, LoRusso CM, Tiburzi MJ et Lenoci JM. 1997. Olfactory conditioning impairment following posttraining NMDA receptor blockade in neonatal rats. *Neurobiol Learn Mem* 67(1):34-42.
- Whitaker-Azmitia PM, Druse M, Walker P et Lauder JM. 1996. Serotonin as a developmental signal. *Behav Brain Res* 73(1-2):19-29.
- Williams NM, O'Donovan MC et Owen MJ. 2005. Is the dysbindin gene (DTNBP1) a susceptibility gene for schizophrenia? *Schizophr Bull* 31(4):800-805.
- Wilson DA et Stevenson RJ. 2003. The fundamental role of memory in olfactory perception. *Trends Neurosci* 26(5):243-247.
- Wong AH et Van Tol HH. 2003. Schizophrenia: from phenomenology to neurobiology. *Neurosci Biobehav Rev* 27(3):269-306.
- Woo CC et Leon M. 1987. Sensitive period for neural and behavioral response development to learned odors. *Brain Res* 433(2):309-313.
- Wynne-Edwards KE et Timonin ME. 2007. Paternal care in rodents: weakening support for hormonal regulation of the transition to behavioral fatherhood in rodent animal models of biparental care. *Horm Behav* 52(1):114-121.