



Thèse de Doctorat de l'Université de Strasbourg
en Neurosciences

Présentée par **Alexis Koutseff** pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Strasbourg

**Étude de l'interaction entre stress chronique et polymorphisme de
l'apolipoprotéine E dans les processus émotionnels et cognitifs
chez la souris : implications dans la maladie d'Alzheimer ?**

Thèse soutenue publiquement le 29 septembre 2011

À l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire

Devant la commission d'examen :

Pr Johan AUWERX	Directeur de Thèse, Strasbourg
Dr Hamid MEZIANE	Codirecteur, ICS Strasbourg
Pr Jean-Christophe CASSEL	Président du jury, rapporteur interne, Strasbourg
Pr Rémi GERVAIS	Rapporteur externe, Lyon I
Dr Françoise MUSCATELLI	Rapporteur externe, Marseille
Dr Chantal MATHIS	Examineur, Strasbourg

Remerciements

Il est très amusant de constater à quel point on peut se sentir seul dans les derniers jours de rédaction de la thèse... Cependant, force est de constater, qu'au moment d'entamer les remerciements, on peut s'apercevoir à quel point ce sentiment est usurpé et à quel point on a toujours été incroyablement entouré durant toutes ces années ! Tant de monde à remercier, j'espère n'oublier personne...

J'aimerais commencer par remercier le professeur Johan Auwerx qui m'a accueilli au sein de l'ICS, et m'a offert la possibilité de pouvoir effectuer cette thèse dans les meilleures conditions.

J'aimerais remercier les docteurs Chantal Mathis et Françoise Muscatelli, ainsi que les professeurs Jean-Christophe Cassel et Rémi Gervais de l'honneur qu'ils me font d'avoir si gentiment accepté de juger la qualité de mon travail.

Merci à Hamid, de m'avoir accompagné durant ces années de thèse. J'ai beaucoup appris à tes côtés, tu as su me guider dans les méandres du comportement murin. Merci à toi pour tous tes conseils techniques et toute cette valeur ajoutée que tu as su m'apporter,

Ce travail n'aurait jamais pu exister sans toutes ces souris avec qui j'ai travaillé. Merci donc à vous, mes petites souris ApoE, pour tous ces moments passés ensemble au fond des salles de manip', acceptant sans rechigner d'accomplir les tâches que je vous demandais, et pour avoir toujours su me surprendre par vos capacités insoupçonnées ! Merci à tous les membres de l'animalerie, et plus particulièrement Claire, Abdel, Chaouki et Raphaël, pour tous les bons soins que vous avez su prodiguer à nos petites protégées afin qu'on puisse tous travailler dans les meilleurs conditions. Un énorme merci à Hahn, qui t'es si bien occupée de mes souris mais aussi de nous tous, par ta gentillesse et ta délicieuse cuisine vietnamienne ! Merci aussi à Karim, Thierry et tout le service génotypage, pour votre aide si précieuse !

Merci aux « anciens » (et non pas « vieux »), Élodie, Lydie, Olivia, Abdel, Laurent, Michel, Raymond et Wocjtek, qui, souvent autour d'un café, ont su me conseiller et me communiquer leur expérience. Merci à Gaëlle, Frédéric, Jean-Sébastien, Stéphane, pour leur apport et ce qu'il nous reste à accomplir encore ensemble !

Des milliers de merci à ma « seconde famille », l'équipe comportement, pour tous ces moments partagés ensemble dans et en dehors du travail, pour tout ce que vous avez su m'apporter et m'apprendre, tous ces litres de café échangés et surtout, pour avoir supporté toutes mes blagues (pour ce dernier point, bravo !) ! Je vous dois tellement de choses, que j'ai préféré piocher au hasard, une chose pour laquelle chacun vous remercier ! Alors, merci Aline pour ta tempérance, Aurélia pour tes gaffes, Celia pour ton tic naso-digital, Élodie pour ton concombre, Khadija pour ta douceur dans ce labo de brutes, Lucie pour tes séries Z, Marina pour tes découpages, Muriel pour ta belgitude, Valérie pour être Valoche, Benoît pour ta technophilie exacerbée, Chris pour être Mich', David pour ta « fonzie » attitude, Fab & Céline, indissociables, pour m'avoir fait sortir du labo et Malik pour ta chevelure flamboyante.

Merci à toutes les équipes limitrophes, avec qui j'ai si souvent échangé. Merci donc aux cardios, qui m'ont fait une petite place où déposer mon bureau. Merci Alain pour tes conseils botaniques, Julien pour nos trajets, Papy Lahcen pour nos débats politiques et Roy pour être notre Régis anglais.

Merci aux métabos d'avoir su égayer tous ces trajets dans les couloirs : Aurélie pour ton Edgar record, Christelle pour tes couleurs, Elise pour ta candeur, Isabelle pour ton sourire ravageur, Benjamin pour ton sac, Grég pour tes talents de bricoleur, Laurent pour tes bières belges, Stéphane pour ta « geekitude » et Xavier pour tes 80%.

Merci aux « geeks » du service informatique, pour avoir non seulement su relancer ces machines qu'on croyait mortes, mais aussi mon goût pour la restauration rapide (dois-je vraiment vous remercier pour ça ?). Merci Agathe pour être la seule fille au milieu de ces machos, Alexis pour ton chouette prénom, Grég pour ton parfum, Lolo pour tes mails, Stéphane pour tes leçons de squash et Youry, pour l'ensemble de ton œuvre et nos SMS !

Merci aux histos, Anne pour ta gentillesse, Zaza pour ta « minimoy » attitude, Thomas pour tes revendications et Patoche pour parvenir à me faire croire que je cours vite.

Merci à la bande de pharma, pour tous ces repas partagés au RU et auxquels nous avons ensemble survécu : Carole pour ton alter-ego Marie, Laura pour ton parisianisme, Simona pour ton accent Bulgare, Gilles pour nos bières/rugby, Laurent pour tes lunettes de John Lennon, Manu pour tes petites jambes, Mathieu pour nos matchs endiablés et Pek pour la Nouvelle Zélande.

Merci aux « polonais », Agnieszka et ta voix suave, Aurore et tes petits rires, Monika et ton Krupnik et Guillaume et ton rock du Groenland.

Merci à « ceux du troisième », Carolina pour avoir tenté d'améliorer mon espagnol, Lauren pour être Fadgète, Pauline pour ton superbe autoportrait, Olivier pour être Paquète, Paulo pour ta zénitude, Pierre Eric pour tes questions pertinentes, Raphaël pour ta brosse impeccable et Sercan pour être un voisin discret.

Merci aux NEMO de Lyon, avec qui j'ai beaucoup appris avant d'arriver à Strasbourg. Merci Anne-Marie, Barbara, Claire, Julie, Marie, Nadine, Nadège, Fabrice, Jean-Luc, Nicolas, Régis, Rémi, Yannick, tout ce que vous m'avez appris et communiquer, mais aussi tous ces excellents moments passés avec vous durant ces deux années à l'ISC.

Merci à tous ces vieux potes éparpillés partout dans le monde, qui prouvent chaque jour que la proximité n'est pas qu'une question de kilomètres et qui n'ont eu de cesse de m'encourager: Berra, Clarisse, Laetitia, Vali, Fanou, Francky, Guigui, Gromath, GroHulk, Jacko, John, Piaz, Ketchup, Stouf, Séb. Faites gaffe, vous risquez de me voir débarquer maintenant !

Merci aussi à ces professeurs qui durant ma scolarité ont su me donner le goût des sciences de la vie et de la langue française : Mme Gollentz, Mr Mourre, Mme Bartissol et le Dr Boris Cyrulnik.

Et en vrac, merci à mon ordinateur d'avoir bien voulu tenir le coup et à tous ces artistes qui ont accompagné son bruit de ventilation : Dave Grohl & Foo Fighters, SOD, Samuel Barber, Slash, Metallica, Pink Floyd, Eddie Vedder & Pearl Jam, Pawel Blaszczak, Trent Reznor & NIN, Layne Staley & Alice In Chains, Django Reinhardt...

Et surtout, un grand merci à mon « extraordinaire » Ondine. Merci pour ton immense patience et pour avoir su me supporter (dans tous les sens du terme) durant ces dernières semaines, cela valait le coup ! Merci pour tes lectures, relectures, re-relectures, tes conseils, ton aide... Merci à toi de m'avoir fait une place dans ta vie et d'être entrée dans la mienne...

Enfin, j'aimerais dédier cette thèse à mon grand-père. Strasbourg fut ton refuge et t'offrit la possibilité de reconstruire une famille décimée par la guerre ; conclure mes études dans cette ville qui a su tant te donner est quelque chose de spécial, j'aurais aimé que tu puisses voir cela. À mon vieux Stéph, qui est parti bien trop tôt. J'aimerais aussi la dédier à ma famille, soutien

de toujours, qui fut derrière moi durant ces longues années : mes parents, Tatie Marie Claire, Vanou, Renaud et les monstres, Augustin & Malo. Merci à tous d'avoir cru en moi !

SOMMAIRE

Étude de l'interaction entre stress chronique et polymorphisme de l'apolipoprotéine E dans les processus émotionnels et cognitifs chez la souris : implications dans la maladie d'Alzheimer ?

INTRODUCTION.....	1
PRÉAMBULE	2
A. De la mémoire et du comportement	3
I. Mémoire et apprentissage	3
1. Généralités	3
2. Les différentes formes de mémoire.....	4
a. La conception temporelle: du court au long terme.....	6
b. Mémoires déclarative et non déclarative selon Squire	6
i. Les composantes de la mémoire déclarative	7
ii. Les composantes de la mémoire non déclarative	7
3. Les localisations de la mémoire	9
a. Henry Gustav Molaison : l'importance de l'hippocampe	9
b. Des structures interconnectées	10
4. Le cerveau, un ensemble plastique en constante évolution	11
a. La plasticité neuronale	11
b. La neurogénèse.....	12

5.	Les troubles de la mémoire	13
II.	L'étude du comportement	13
1.	Généralités et définitions	13
2.	L'étude du comportement en laboratoire chez la souris	14
B.	La maladie d'Alzheimer et l'Apolipoprotéine E	15
I.	Des prémices et premières descriptions de la maladie	15
1.	Aloïs Alzheimer et Oskar Fischer, « pères » de la maladie	15
2.	Des troubles cognitifs et physiologiques	17
3.	... engendrés par des dérèglements cellulaires.	20
a.	Les protéines Tau s'accumulent dans les neurones, les microtubules se polymérisent... ..	21
b.	... et les neurones excrètent massivement une protéine : le bêta amyloïde	22
II.	... aux dernières avancées cellulaires et génétiques	23
1.	Les pistes génétiques.....	23
a.	La protéine précurseur du Bêta Amyloïde, ou APP	24
b.	Les présénilines	25
c.	Le polymorphisme nucléotidique (SNPs)	26
d.	L'apolipoprotéine E.....	26
i.	L'ApoE et les lipides	28
ii.	L'ApoE et le système nerveux.....	28
iii.	L'ApoE et la maladie d'Alzheimer	29

iv. L'ApoE et le système cholinergique	30
v. L'ApoE, la cognition et le comportement	30
2. Les facteurs non génétiques	31
3. Les modèles animaux.....	32
C. Objectifs de la thèse.....	35
MATERIELS ET METHODES	38
A. Animaux	39
I. Construction des souris génétiquement modifiées	39
II. Mise en évidence du génotype	39
III. Conditions d'élevage	41
B. Procédures comportementales	41
I. Évaluation clinique, capacités sensori-motrices et analyse de l'activité nycthémérale... ..	41
1. Mesure de l'activité circadienne	41
2. Observations cliniques, ou SHIRPA modifié	43
3. Test d'agrippement	43
4. Test de réflexe de traction, ou string test	44
5. Test du cylindre rotatif, ou rotarod	44
6. Tests nociceptifs.....	45
7. Susceptibilité aux crises épileptiques.....	46

II.	Évaluation de la réactivité des souris dans différentes situations anxiogènes et de stress aigu	47
1.	Test des cages claire/obscur	47
2.	Test du labyrinthe en croix surélevé	47
3.	Test du champ ouvert ou open-field	48
4.	Test de suspension caudale	49
5.	Test de la nage forcée, ou test de Porsolt.....	50
III.	Évaluation de la performance dans différentes tâches d'apprentissage et de mémorisation, et du filtrage sensorimoteur.....	50
1.	Test d'alternance spontanée dans un labyrinthe en Y	50
2.	Test de peur conditionnée	51
3.	Test de reconnaissance d'objets	53
4.	Test du labyrinthe aquatique ou piscine de Morris	55
5.	Filtrage sensorimoteur : test du réflexe de sursaut (RS) et d'inhibition du réflexe de sursaut (IRS).....	58
C.	Protocole de stress chronique et imprévisible	60
D.	Protocole d'évaluation de la neurogénèse par cytométrie de flux.....	60
E.	Analyses Statistiques.....	61
	RÉSULTATS	62
	Première partie : Phénotypage comportemental des souris ApoE2, ApoE3 et ApoE4	64
A.	Phénotypage comportemental des souris ApoE2 mâles et femelles adultes	65

I.	Effets de la mutation ApoE2-KI sur l'état général, l'activité circadienne et les capacités sensorimotrices	65
1.	Activité circadienne	65
2.	Évaluation de l'état général et des fonctions sensori-motrices :	71
II.	Effets de la mutation ApoE2-KI sur la réactivité émotionnelle dans différentes situations anxiogènes et de stress aigu	75
1.	Test du champ ouvert ou open-field	75
2.	Test du labyrinthe en croix surélevé	77
3.	Test des cages claire/obscur	79
4.	Test de suspension caudale	79
III.	Effets de la mutation ApoE2-KI sur les fonctions cognitives.....	81
1.	Filtrage sensorimoteur : RS et IRS	81
2.	Mémoire de travail : test d'alternances spontanées dans un labyrinthe en Y	81
3.	Mémoire associative émotionnelle : test de peur conditionnée	83
IV.	Effets de la mutation ApoE2-KI sur la susceptibilité aux crises épileptiques	87
B.	Phénotypage comportemental des souris ApoE3 mâles et femelles adultes	90
I.	Effets de la mutation ApoE3-KI sur l'état général, l'activité circadienne et les capacités sensorimotrices	90
1.	Activité circadienne	90
2.	Évaluation de l'état général et des fonctions sensori-motrices :	92

II.	Effets de la mutation ApoE3-KI sur la réactivité émotionnelle dans différentes situations anxiogènes et de stress aigu	96
1.	Test du champ ouvert ou open-field	96
2.	Test du labyrinthe en croix surélevé	96
3.	Test des cages claire/obscur	99
4.	Test de suspension caudale	102
III.	Effets de la mutation ApoE3-KI sur les fonctions cognitives.....	102
1.	Filtrage sensorimoteur : RS et IRS	102
2.	Mémoire de travail : test d'alternances spontanées dans un labyrinthe en Y	104
3.	Mémoire associative émotionnelle : test de peur conditionnée	104
IV.	Effets de la mutation ApoE3-KI sur la susceptibilité aux crises épileptiques	105
	Phénotypage comportemental des souris ApoE4 mâles et femelles.....	108
A.	Effets de la mutation ApoE4-KI sur les performances comportementales chez les souris mâles et femelles adultes.....	108
I.	Effets de la mutation ApoE4-KI sur l'état général, l'activité circadienne et les capacités sensorimotrices	108
1.	Activité circadienne	108
2.	Évaluation de l'état général et des fonctions sensori-motrices	112
II.	Effets de la mutation ApoE4-KI sur la réactivité émotionnelle dans différentes situations anxiogènes et de stress aigu	114
1.	Test du champ ouvert ou open-field	114

2.	Test du labyrinthe en croix surélevé	114
3.	Test de la cage claire/obscur	116
4.	Test de la suspension caudale	116
III.	Effets de la mutation ApoE4-KI sur les fonctions cognitives.....	119
1.	Filtrage sensorimoteur : RS et IRS	119
2.	Test du labyrinthe en Y	119
3.	Test de la piscine de Morris	119
4.	Test du conditionnement de peur	121
IV.	Effets de la mutation ApoE4-KI sur la sensibilité épileptique.....	123
B.	Étude comportementale des effets du vieillissement sur les souris ApoE4 mâles et femelles.....	126
I.	Effets de la mutation ApoE4-KI sur l'état général, l'activité circadienne et les capacités sensorimotrices.....	126
1.	Activité circadienne	126
2.	Évaluation de l'état général et des fonctions sensori-motrices	128
II.	Effets de la mutation ApoE4-KI sur la réactivité émotionnelle dans différentes situations anxiogènes et de stress aigu	132
1.	Test du champ ouvert ou open-field	132
2.	Test de la cage claire/obscur	135
3.	Test de la suspension caudale	135
III.	Effets de la mutation ApoE4-KI sur les fonctions cognitives.....	135

1. Filtrage sensorimoteur : RS et IRS	135
2. Test du labyrinthe en Y	137
3. Test de reconnaissance d'objet	137
4. Test de la piscine de Morris	140
5. Test du conditionnement de peur	140
IV. Effets de la mutation apoE4-KI sur la sensibilité épileptique.....	142
Deuxième partie : Impact combiné d'un stress chronique et du polymorphisme de l'ApoE sur les comportements émotionnels et capacités cognitives chez la souris âgée.....	146
Troisième partie : Étude de l'effet du polymorphisme de l'ApoE sur un facteur particulier de plasticité cérébrale : la neurogénèse	212
DISCUSSION GÉNÉRALE	244
BIBLIOGRAPHIE	254

Liste des abréviations:

Ach : Acétylcholine

ApoE2 : Apolipoprotéine E 2

ApoE3 : Apolipoprotéine E 3

ApoE4 : Apolipoprotéine E 4

BrdU : Bromodésoxyuridine

e.g. : par exemple (*exempli gratia*, locution latine)

i.e. : c'est à dire (*id est*, locution latine)

i.p. : intrapéritonéal

IRS : Inhibition du Réflexe de Sursaut

MA : Maladie d'Alzheimer

PTZ : pentylentétrazole

RS : Réflexe de Sursaut

SC: Stimulus conditionnel

SI : Stimulus inconditionnel

Souris WT : souris Wild Type, porteuse de l'allèle murin et de l'allèle humain de l'ApoE

Souris ApoE2 : souris KI homozygote pour l'ApoE2

Souris ApoE2 +/- : souris KI hétérozygote pour l'ApoE2 et l'ApoE murine

Souris ApoE3 : souris KI homozygote pour l'ApoE3

Souris ApoE3+/- : souris KI hétérozygote pour l'ApoE3 et l'ApoE murine

Souris ApoE4 : souris KI homozygote pour l'ApoE4

Souris ApoE4 +/- : souris KI hétérozygote pour l'ApoE4 et l'ApoE murine

tpm : tours par minute

Liste des figures

Introduction

Figure 1 : Représentation des différentes mémoires selon la durée de conservation des souvenirs.

Figure 2 : Organisation de la mémoire en fonction des domaines de référence.

Figure 3 : Coupes du cerveau d'Auguste D. effectuées par A. Alzheimer.

Figure 4 : Test de Folstein ou Mini Mental State Examination.

Figure 5 : A. Représentation schématique de la différence entre les trois isoformes de l'ApoE au niveau des acides aminés en positions 112 et 158. B. Schématisation des principaux rôles de l'ApoE.

Tableau 1 : Liste des principaux modèles de souris pour la maladie d'Alzheimer.

Matériels et Méthodes

Figure 6 : Représentation schématique des séquences d'ADN avec l'allèle sauvage (murin) pour l'ApoE et l'allèle humain en aval de la néomycine et résultat obtenu lors du génotypage.

Figure 7 : Schéma représentant le positionnement des objets durant le test de reconnaissance d'objet pour les phases d'acquisition et de rétention.

Résultats

Première Partie : Phénotypage comportemental des souris ApoE2, ApoE3 et ApoE4

- **Phénotypage comportemental des souris ApoE2 mâles et femelles adultes**

Figure 8: Activité locomotrice lors d'un cycle complet chez les souris ApoE2 mâles.

Figure 9: Activité verticale lors d'un cycle complet chez les souris ApoE2 mâles.

Figure 10: Activité locomotrice et nombre de redressements chez les souris ApoE2 femelles.

Figure 11: Consommation d'eau et de nourriture chez les souris ApoE2 mâles et femelles.

Tableau 2: État général et capacités motrices chez les souris ApoE2 mâles et femelles.

Tableau 3: Sensibilité à la douleur chez les souris ApoE2 mâles et femelles.

Figure 12: Activité locomotrice, nombre de redressements, et pourcentage de temps passé dans le centre de l'open-field chez les souris ApoE2 mâles et femelles

Tableau 4: Nombre d'entrées dans le centre de l'open-field chez les souris ApoE2 mâles et femelles.

Figure 13: Pourcentage d'entrées dans les bras ouverts et nombre d'explorations du vide dans le test du labyrinthe en croix surélevé. Pourcentage de temps passé dans la cage éclairée dans le test des cages claire/obscur chez les souris ApoE2 mâles et femelles.

Figure 14: Durée d'immobilité et latence de la première immobilisation dans le test de suspension caudale chez les souris ApoE2 mâles et femelles.

Figure 15: Réactivité de sursaut acoustique et pourcentage d'inhibition du réflexe de sursaut chez les souris ApoE2 mâles et femelles.

Figure 16: Pourcentage d'alternances spontanées dans le test du labyrinthe en Y chez les souris ApoE2 mâles et femelles.

Figure 17: Activité lors de l'habituation aux cages de conditionnement et lors du test au contexte, et pourcentage de suppression d'activité (freezing) lors du test au contexte chez les souris ApoE2 mâles et femelles.

Figure 18: Activité dans le nouveau contexte et pourcentage de suppression d'activité lors de la présentation des SC chez les souris ApoE2 mâles et femelles.

Figure 19: Susceptibilité aux crises épileptiques induites par le pentylentétrazole chez les souris ApoE2 mâles et femelles.

- **Phénotypage comportemental des souris ApoE3 mâles et femelles adultes**

Figure 20: Activité locomotrice et nombre de redressements chez les souris ApoE3 mâles.

Figure 21: Consommation d'eau et de nourriture chez les souris ApoE3 mâles et femelles.

Tableau 5: État général et capacités motrices chez les souris ApoE3 mâles et femelles

Tableau 6: Sensibilité à la douleur chez les souris ApoE3 mâles et femelles.

Figure 22: Activité locomotrice, nombre de redressements, et pourcentage de temps passé dans le centre de l'open-field chez les souris ApoE3 mâles et femelles.

Tableau 7: Nombre d'entrées dans le centre de l'open-field chez les souris ApoE3 mâles et femelles.

Figure 23: Pourcentage d'entrées dans les bras ouverts et nombre d'explorations du vide dans le test du labyrinthe en croix surélevé, et pourcentage de temps passé dans la cage éclairée dans le test des cages claire/obscur chez les souris ApoE3 mâles et femelles.

Figure 24: Durée d'immobilité et latence de la première immobilisation dans le test de suspension caudale chez les souris ApoE3 mâles et femelles.

Figure 25: Réactivité de sursaut acoustique et pourcentage d'inhibition du réflexe de sursaut chez les souris ApoE3 mâles et femelles.

Figure 26: Pourcentage d'alternances spontanées dans le test du labyrinthe en Y chez les souris ApoE3 mâles et femelles

Figure 27: Activité lors de l'habituation aux cages de conditionnement et lors du test au contexte, et pourcentage de suppression d'activité lors du test au contexte chez les souris ApoE3 mâles et femelles).

- **Phénotypage comportemental des souris ApoE4 mâles et femelles adultes**

Figure 28: Activité locomotrice et nombre de redressements chez les souris ApoE4 mâles adultes.

Figure 29: Activité locomotrice et nombre de redressements chez les souris ApoE4 femelles adultes.

Tableau 8: État général et capacités motrices chez les ApoE4 mâles et femelles adultes.

Tableau 9: Sensibilité à la douleur chez les souris ApoE4 mâles et femelles adultes.

Figure 30: Activité locomotrice, nombre de redressements, et pourcentage de temps passé dans le centre de l'open-field chez les souris ApoE4 mâles et femelles adultes.

Tableau 10: Nombre d'entrées dans le centre de l'open-field chez les souris ApoE4 mâles et femelles adultes.

Figure 31: Pourcentage d'entrées et pourcentage de temps dans les bras ouverts dans le test du labyrinthe en croix surélevé. Pourcentage de temps passé dans la cage éclairée et latence d'entrée dans le test des cages claire/obscur chez les souris ApoE4 mâles et femelles adultes.

Figure 32: Pourcentage d'inhibition du réflexe de sursaut chez les souris ApoE4 mâles et femelles adultes.

Figure 33: Pourcentage d'alternance spontanées dans le test du labyrinthe en Y chez les souris ApoE4 mâles et femelles adultes.

Figure 34 : Évolution des latences pour atteindre la plateforme cachée lors de l'apprentissage dans le test de la piscine chez les souris ApoE4. Pourcentage de temps passé dans chacun des

quadrants de la piscine lors de l'essai test. Nombre de passages lors de l'essai test à l'emplacement où se trouvait la plateforme lors de l'apprentissage.

Figure 35: Pourcentage de suppression d'activité lors du test au contexte et lors de la présentation des indices chez les souris ApoE4 mâles et femelles adultes.

- **Phénotypage comportemental des souris ApoE3 mâles et femelles adultes**

Figure 36: Activité locomotrice et nombre de redressements chez les souris ApoE4 mâles âgées.

Figure 37: Activité locomotrice et nombre de redressements chez les souris ApoE4 femelles âgées.

Tableau 11: État général et capacités motrices chez les ApoE4 mâles et femelles âgées.

Figure 38: Activité locomotrice, nombre de redressements, et pourcentage de temps passé dans le centre de l'open-field chez les souris ApoE4 mâles et femelles âgées.

Figure 39: Pourcentage de temps dans la cage éclairée, latence d'entrée dans la cage éclairée, et nombre de transitions de la cage éclairée vers la cage obscure chez les souris apoE4 mâles et femelles âgées.

Figure 40: Durée d'immobilité et latence de la première immobilisation dans le test de suspension caudale chez les souris ApoE4 mâles et femelles âgées.

Figure 41: Réactivité de sursaut acoustique et pourcentage d'inhibition du réflexe de sursaut chez les souris ApoE4 mâles et femelles âgées.

Figure 42: Pourcentage d'alternances spontanées dans le test du labyrinthe en Y chez les souris ApoE4 mâles et femelles âgées.

Figure 43: Indice de reconnaissance (A) et durée d'exploration des objets (B) lors de l'essai de rétention chez les souris ApoE4 mâles âgées.

Figure 44: Pourcentage de temps passé dans chacun des quadrants de la piscine lors de l'essai test et nombre de passage lors de l'essai tests à l'emplacement où se trouvait la plateforme lors de l'apprentissage chez les souris ApoE4 mâles et femelles âgées.

Figure 45: Pourcentage de suppression d'activité lors du test au contexte et lors de la présentation des indices chez les souris ApoE4 âgées d'un an et demi.

Tableau 12 : Résumé des principaux effets des différentes mutations ApoE humaines chez la souris sur la cognition, les émotions et l'état général.

- **Deuxième partie : Impact combiné d'un stress chronique et du polymorphisme de l'ApoE sur les comportements émotionnels et capacités cognitives chez la souris âgée 2**

Tableau 13 : Résumé des principaux effets du stress lié aux différentes mutations ApoE humaines chez la souris sur la cognition et les émotions.

- **Troisième partie : Étude de l'effet du polymorphisme de l'ApoE sur un facteur particulier de plasticité cérébrale : la neurogénèse**

Tableau 14 : Résumé des principaux effets liés aux différentes mutations ApoE humaines et à l'âge chez la souris sur la neurogénèse (prolifération cellulaire).

INTRODUCTION

PRÉAMBULE

Le travail de cette thèse s'articule autour du polymorphisme de l'Apolipoprotéine E (ApoE) et de son lien avec la maladie d'Alzheimer (MA). La MA est une maladie neurodégénérative entraînant entre autres symptômes de graves troubles mnésiques et conduisant inévitablement au décès du patient. Cette maladie comporte ainsi des changements aussi bien à l'échelle cellulaire qu'à l'échelle comportementale. Le travail qui vous est présenté ici est axé principalement autour du comportement, de la mémoire et de leurs troubles ainsi que d'études à l'échelle cellulaire. Dans une première partie, je vais tout d'abord vous parler de la mémoire et du comportement, dont les altérations sont majeures chez les patients atteints de la MA. Dans un deuxième temps, nous nous intéresserons plus précisément à la maladie d'Alzheimer : nous verrons ainsi ses causes probables, ses mécanismes pathologiques, les données existantes et surtout l'impact du polymorphisme de l'ApoE dans cette maladie, afin de déterminer l'axe de recherche que nous avons suivi. Bonne lecture !

A. De la mémoire et du comportement

« La mémoire est, par essence, un fait biologique ; par accident, un fait psychologique »

Théodule Ribot, 1881

I. Mémoire et apprentissage

1. Généralités

Lorsqu'on évoque le terme de mémoire, on conçoit généralement cette capacité nous permettant d'apprendre à parler, lire, écrire, reconnaître et différencier gens, lieux, objets, etc... Plus prosaïquement, la mémoire est donc cet outil de l'esprit nous permettant d'appréhender présent et futur grâce à ce qui a été acquis dans le passé. À la fin du XIX^{ème} siècle, Théodule Ribot précisait que la mémoire « *comprend trois choses: la conservation de certains états, leur reproduction et leur localisation dans le passé* », ce qu'il qualifiait alors de « *mémoire parfaite* » (Ribot, 1881).

Les termes "emmagasiner" et "restituer" font appel à deux notions essentielles à l'existence de cette mémoire qui sont respectivement l'apprentissage et le rappel (« *la conservation de certains états* » et « *leur reproduction* » selon Ribot) auxquelles nous nous devons d'ajouter la notion à ne pas omettre mais qui en reste une composante essentielle, l'oubli (Chapouthier, 2006).

L'**apprentissage** peut ainsi être défini comme la capacité à acquérir et enregistrer des informations, souvent liées à l'environnement, et qui peuvent ainsi façonner les comportements en adaptant les réponses aux situations et signaux. En psychologie, ces informations stockées sont nommées des souvenirs.

Le **rappel** est quant à lui la capacité à restituer ces informations lorsque cela est nécessaire, *i.e.* en réponse à un ou plusieurs stimuli (ou signaux). Le rappel est aussi souvent lié à la notion de consolidation de la mémoire qui correspond à un renforcement de l'information afin d'en appuyer sa trace mnésique. Cette notion de rappel est opposée à celle de l'**oubli** qui peut quant à elle être définie par la disparition ou l'occultation de l'information, et ainsi l'empêchement d'un retour de celle-ci au premier plan. Ce processus obligatoire, notamment pour libérer de l'espace de stockage et éliminer le superflu, peut cependant s'avérer pathologique suite à certaines maladies (syndrome de Korsakoff, maladie d'Alzheimer, ...) ou suite à des traumatismes physiques ou psychiques. Si l'apprentissage et le rappel sont deux processus actifs, le débat reste encore très vif sur les mécanismes de l'oubli, même s'il semble que le phénomène soit plutôt passif (Mensink & Raaijmakers, 1988; Anderson & Green, 2001; Dudai, 2004; Eisenberg & Dudai, 2004; Wixted, 2004; Geraerts & McNally, 2008).

L'apprentissage, le rappel et l'oubli, qualifient à eux trois ce qu'est la mémoire.

2. Les différentes formes de mémoire

Depuis le début du XIXème siècle, mémoire, cognition et apprentissage ont été étudiés à travers la philosophie, la psychologie et plus récemment la biologie (Squire et al., 1993). Au fur et à mesure de l'évolution des connaissances au travers de ces différentes disciplines, il a ainsi été admis de ne pas devoir parler de la mémoire mais des mémoires (Squire, 2004). Ribot évoquait déjà cette pluralité de la mémoire, en différenciant la « *mémoire organique* » et « *la mémoire psychologique* », considérant alors la seconde comme un cas particulier de la première (Ribot, 1881). Ainsi, la mémoire est décomposée selon des critères objectifs tels que ses durées ou ses domaines d'expression : il est ainsi communément admis deux grands ordres

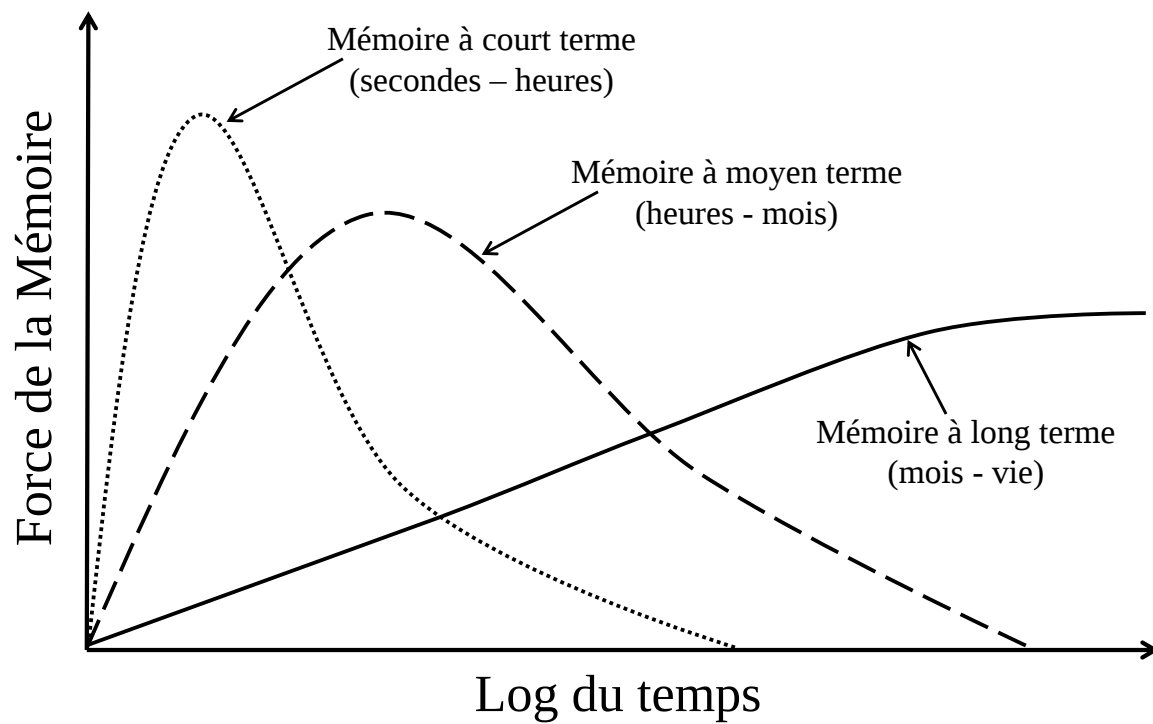


Figure 1 : Représentation des différentes mémoires selon la durée de conservation des souvenirs (d'après McGaugh 2000)

de classifications, appelées encore taxonomies de la mémoire, en hommage au suisse Augustin Pyrame de Candolle (créateur du terme taxon dans son ouvrage *Théorie élémentaire de la botanique* paru en 1813). Ces classifications ne sont pas exhaustives mais restent néanmoins les plus usitées.

a. La conception temporelle: du court au long terme

Classer la mémoire selon sa durée est à première vue la méthode de classification la plus simple. En effet, tout le monde a pu constater que certains souvenirs perdurent dans le temps, parfois toute une vie, alors que d'autres possèdent une espérance de vie plus courte, de quelques secondes à quelques minutes. Cette notion de temps est ainsi découpée en trois catégories de mémoires (Figure 1) :

- Court terme : de quelques secondes à quelques heures
- Moyen terme : de quelques heures à quelques mois
- Long terme : de quelques mois à toute une vie

La force des mémoires est fonction de leur durée et des types de mémoires (cf. paragraphe suivant). De plus, l'utilisation d'une telle classification de la mémoire peut porter à confusion selon les modèles (le long terme pour un insecte n'est pas le même que pour un primate) et les auteurs, les gammes de temps pouvant varier de l'un à l'autre (McGaugh & Izquierdo, 2000; Chapouthier, 2006; Jonides et al., 2008; Squire, 2009). Une autre taxonomie reposant sur les domaines d'expression de la mémoire a ainsi vu le jour.

b. Mémoires déclarative et non déclarative selon Squire

Cette autre conception a vu le jour au milieu du siècle précédent, reposant tout d'abord sur une dichotomie elle aussi en premier lieu d'apparence simple : la mémoire déclarative, *i.e.*

explicite, opposée à la mémoire non déclarative, *i.e.* implicite. La mémoire déclarative correspondrait à la « *mémoire psychologique* » de Ribot, celle-là même qui nous permet par exemple de nous exprimer alors que la mémoire non déclarative serait sa « *mémoire organique* », comme peut l'être l'apprentissage de la montée d'un escalier. Mais au fur et à mesure des avancées en neurosciences notamment dans les années 80 et 90, cette dichotomie s'est complexifiée en sous-groupes afin de répertorier et classifier leurs différentes formes, comme on peut le voir sur la Figure 2 (Knowlton & Squire, 1993; Squire et al., 1993; Zola-Morgan & Squire, 1993; Squire & Zola, 1998; Squire, 2004; Chapouthier, 2006; Squire, 2009).

i. Les composantes de la mémoire déclarative

La mémoire déclarative regroupe tout ce qui peut être exprimé d'une manière verbale ou assimilée. Cependant, il a été défini de la décomposer en deux entités bien distinctes.

D'une part **la mémoire épisodique**, *i.e.* la capacité à acquérir et rappeler un événement qui s'est déroulé à un moment précis, et d'autre part **la mémoire sémantique**, *i.e.* la capacité à donner des significations, telles que pour des choses ou des faits bien précis pouvant être spatiaux, concrets et/ou abstraits (Tulving & Markowitsch, 1998; Broadbent et al., 2004; Squire, 2004; Chapouthier, 2006).

i. Les composantes de la mémoire non déclarative

La mémoire non déclarative est plus complexe à décomposer. En effet, cette mémoire peut être définie comme étant la capacité à mettre en évidence un apprentissage sans cependant en avoir conscience. Cette mémoire non déclarative est décomposée en quatre sous-catégories, selon leurs domaines d'expression ou de référence, même si actuellement aucun réel

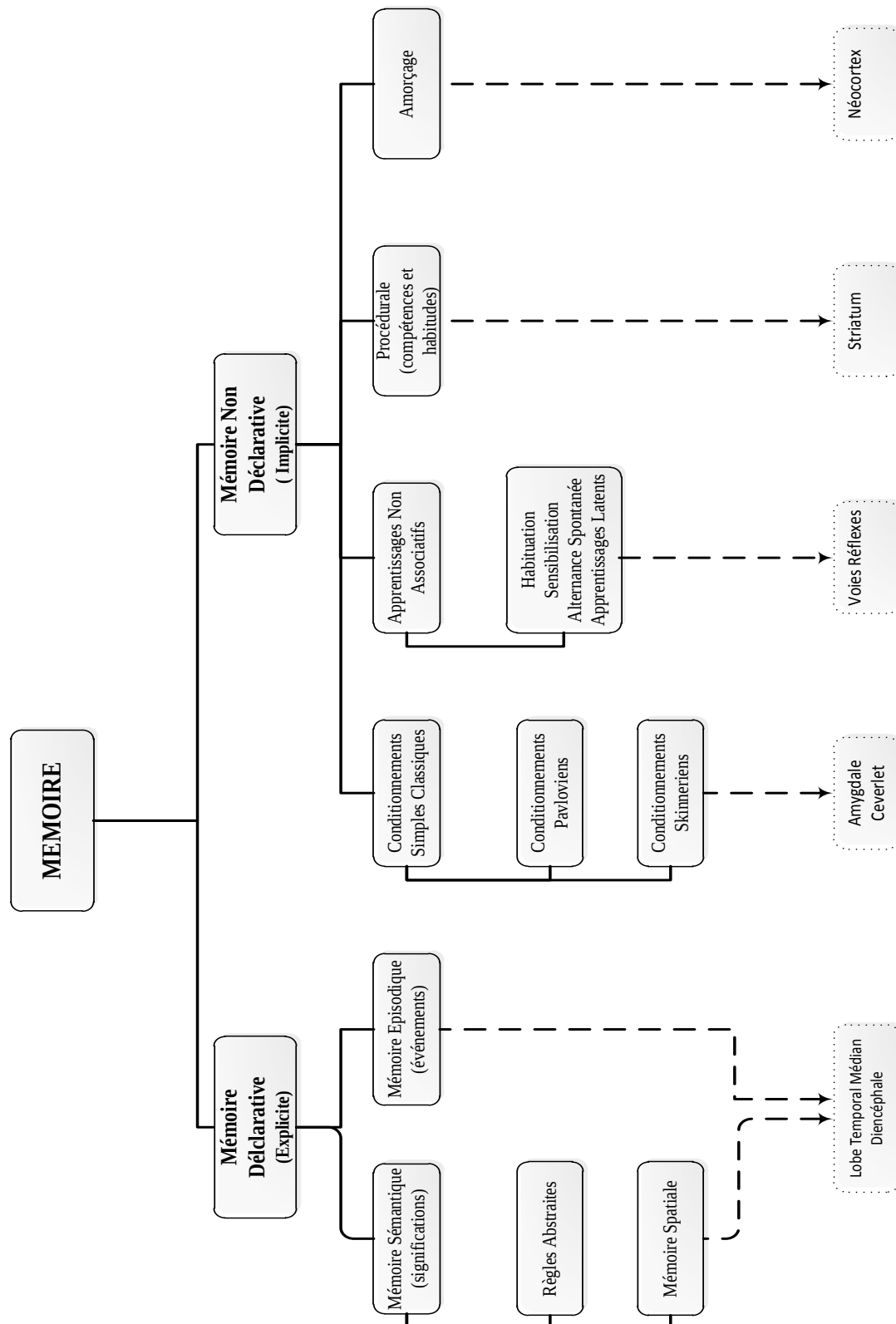


Figure 2 : Organisation de la mémoire en fonction des domaines de référence (adapté de Squire 2004 et Chapouthier 2006)

consensus ne régit encore correctement tout ceci. Ainsi, **la mémoire procédurale** regroupe cette capacité à savoir exécuter des gestes et les répéter de manière habituelle, ainsi que le savoir-faire, *e.g.* la dextérité au couteau d'un boucher ou savoir faire du vélo. **L'amorçage** est la capacité inconsciente d'un événement (ou amorce) à influencer la performance de traitement d'un autre événement consécutif, généralement en le facilitant, *e.g.* la réaction face à un visage familier ou à un objet (clé-serrure). Enfin, on peut distinguer deux sortes d'apprentissages au sein de cette mémoire non déclarative : **l'apprentissage non-associatif**, *e.g.* l'habituation, et **les conditionnements simples classiques** (ou apprentissages associatifs), tels que les conditionnements pavloviens (réponse comportementale à un stimulus) ou skinneriens (ou conditionnement opérant : renforcement d'un comportement associé à une action précise) (Squire et al., 1993; Squire, 2004; Chapouthier, 2006).

3. Les localisations de la mémoire

a. Henry Gustav Molaison : l'importance de l'hippocampe

Le cas qui révolutionna les neurosciences et l'étude de la mémoire, fut celui communément appelé HM. Le jeune Henry Gustav Molaison souffrait dans son enfance de crises d'épilepsie pharmacorésistantes. Après identification des foyers épileptiques, il fut entrepris une solution chirurgicale via l'ablation bilatérale de l'hippocampe ainsi que de quelques parties corticales limitrophes (cortex périrhinal). Suite à cette opération, le jeune Henry Molaison fut atteint d'une légère amnésie rétrograde (oubli des dix-neuf mois précédant sa chirurgie) ainsi que d'une amnésie antérograde presque totale, *i.e.* la perte de la capacité d'emmagasiner de nouveaux souvenirs (Scoville & Milner, 1957, 2000). HM fit faire un bond considérable à la compréhension de la mémoire : son cas montra tout d'abord clairement que l'acquisition et le

rappel d'informations mettaient en jeu des voies différentes, mais aussi démontra l'impact colossal d'une structure primordiale dans la mémoire : l'hippocampe (Milner, 1972).

La voie était ouverte, et l'hippocampe devint ainsi le sujet majeur d'étude dans la formation de la mémoire, montrant son rôle central dans l'acquisition de différentes mémoires (spatiales, temporelles, sémantiques...) de par son rôle de carrefour dans le tri des informations sensorielles (Squire, 1993; Zola-Morgan & Squire, 1993; Tulving & Markowitsch, 1998; Aggleton & Brown, 1999; Eichenbaum & Harris, 2000; Ergorul & Eichenbaum, 2004; Squire, 2004). L'hippocampe fait ainsi partie des premières structures touchées dans la maladie d'Alzheimer, expliquant les troubles de la mémoire observés chez les patients atteints (Roses, 1996a).

b. Des structures interconnectées

Il serait cependant réducteur de limiter la mémoire à l'hippocampe et à quelques structures très spécialisées. Au milieu du siècle précédent, Donald Hebb avançait deux hypothèses : le renforcement de liens synaptiques entre deux cellules résultant de l'activation concurrente de la cellule pré-synaptique A et de la cellule post synaptique B d'une part, et le concept d'assemblées neuronales d'autre part, qu'il décrivait comme des réseaux de neurones capables de s'associer pour interagir ensemble lors de processus de représentations mentales (Hebb, 1967; Cooper, 2005).

Dans le cadre d'apprentissages olfactifs par exemple, il a été mis en évidence chez le rongeur le rôle de différentes structures autres que celles purement olfactives tels que les bulbes olfactifs (Slotnick, 2001; Davis, 2004). Cependant, les réseaux activés sont aussi fonction des types d'apprentissages. Dans un premier temps, il a été démontré que la force d'un réseau d'apprentissage va être fonction de la force de l'apprentissage (Mouly et al., 2001; Mouly &

Gervais, 2002; Martin et al., 2004b). Ainsi, dans le cadre d'apprentissages olfactifs aversifs, il a été démontré l'activation de réseaux via la synchronisation de leurs rythmes, mettant en jeu les bulbes olfactifs, l'amygdale basolatérale et les cortex piriforme et orbitofrontal (Chapuis et al., 2009) et dans le cadre d'un apprentissage de discrimination olfactive l'activation des bulbes olfactifs et des cortex piriforme et entorhinal (Martin et al., 2004a). De manière générale, en fonction des types d'apprentissages, différentes structures vont entrer ou non en jeu, et leur rôle dans ces apprentissages pourra de plus être différent.

Il est ainsi réducteur de chercher à définir les structures cérébrales par un simple rôle dans un mécanisme mnésique, et plus logique de concevoir chaque structure comme une pièce d'un puzzle pouvant jouer un rôle à différents moments dans les processus mnésiques. Cependant, en fonction des formes de mémoires déclaratives et non déclaratives mises en jeu, on retrouve l'activation de certaines grandes voies comme on peut l'observer sur la figure 2 (Zola-Morgan & Squire, 1993; Squire, 2004; Chapouthier, 2006).

4. Le cerveau, un ensemble plastique en constante évolution

a. La plasticité neuronale

Comme l'avancait Hebb, les réseaux mis en jeu dans les différents mécanismes cérébraux sont capables d'évoluer en fonction des différentes activations aussi bien en amont qu'en aval. Ainsi, on nomme plasticité neuronale (ou plasticité cérébrale) cette capacité qu'a le cerveau de pouvoir modifier et adapter ses réseaux neuronaux en fonction des expériences et apprentissages, durant toute la vie d'un individu, formant un ensemble malléable et dynamique en perpétuelle reconfiguration (Daoudal & Debanne, 2003).

On peut retrouver par exemple ce principe de plasticité dans le cadre d'adaptation sensorielle chez le rat ; en effet, le cortex somesthésique des rats dédié aux vibrisses est capable de se modifier et de s'adapter en fonction des expériences positives ou négatives subies, telles qu'enrichissements ou appauvrissements de l'environnement, ou encore la coupe des vibrisses (Diamond et al., 1993; Coq & Xerri, 1998; Rema et al., 2003). De la même manière, dans le cadre de reconsolidation d'un apprentissage, les réseaux neuronaux sont capables de renforcer la force de celui-ci : lors du rappel, la mémoire peut redevenir labile et nécessite alors une nouvelle étape de stabilisation (la reconsolidation) pour persister (Dudai, 2004; Eisenberg & Dudai, 2004).

b. La neurogénèse

Cependant, si ce système est capable de s'adapter en modifiant ses réseaux d'axones et de dendrites, il est aussi capable d'évoluer grâce à l'intégration de neurones nouvellement formés, et ceci même à l'âge adulte : c'est la neurogénèse. Ramón y Cajal avait posé comme dogme le fait que le cerveau adulte disposait d'un nombre de neurones définis à la naissance, celui-ci diminuant constamment durant la vie. Cependant, cette idée disparut en milieu de siècle précédent lorsqu'Altman mis en évidence la formation de nouveaux neurones dans le cerveau de rat adulte (Altman & Das, 1965; Altman, 1966). Ces nouveaux neurones naissent au niveau des zones subventriculaires des ventricules latéraux antérieurs et de la zone subgranulaire du gyrus denté (Das & Altman, 1970; Corotto et al., 1993; Luskin, 1993; Taupin & Gage, 2002), migrant ensuite selon un axe rostro-caudal vers les bulbes olfactifs pour les neurones issus des zones subventriculaires et vers les couches granulaires pour ceux issus du gyrus denté (Zigova et al., 1996; Peretto et al., 1999).

Cette neurogénèse peut être réduite dans le cadre de stress chroniques par exemple (Gould et al., 1997; Bilsland et al., 2006) ou au contraire augmentée sous l'effets d'antidépresseurs (Santarelli et al., 2003; Bilsland et al., 2006). De la même manière, certaines maladies neurodégénératives telle que la maladie d'Alzheimer altèrent grandement cette capacité à former de nouveaux neurones (Kuhn et al., 1996; Mattson & Magnus, 2006; Phillips et al., 2006; Thompson et al., 2008; Crews et al., 2010; Simpson et al., 2010).

Ainsi, cet ensemble de réseaux malléables et dynamiques fait du cerveau une structure capable de grandes adaptations. Néanmoins, il reste un système dont l'équilibre peut être brisé, et ses capacités fortement altérées.

5. Les troubles de la mémoire

Les troubles de la mémoire peuvent être à multiples facettes. Il suffit qu'une partie de la boucle entre l'intégration et le rappel des informations soit altérée, et la mémoire est perturbée. Ainsi, les troubles de la mémoire peuvent toucher aussi bien l'acquisition que le rappel des informations et spécifiquement différentes formes de mémoires, et ainsi avoir des origines pouvant être diverses telles que des traumatismes physiques ou psychiques, ou encore des pathologies telles que le syndrome de Korsakoff (Heindel et al., 1989; Chertkow & Bub, 1990; Pillon et al., 1996; Dubois & Pillon, 1997). Certains facteurs environnementaux, tels que le stress, peuvent aussi perturber la mémoire et les états émotionnels (anxiété, dépression), altérant les performances mnésiques et entraînant des effets anxiogéniques et dépressifs (Porsolt, 2000; Roozendaal et al., 2009; Tagliari et al., 2011).

II. L'étude du comportement

1. Généralités et définitions

Les comportements, aussi variés soient-ils, sont dictés par les acquis, l'expérience et l'environnement. Ainsi, les différentes mémoires que nous avons vues précédemment vont contribuer à modifier les comportements en fonction des situations et du vécu. Dans son ouvrage « La science du comportement », Klaus Thews nous démontre à quel point les comportements peuvent être variés et soumis à de nombreux facteurs (Thews, 1977). Ainsi, un comportement peut être ancré dans les gènes, tel qu'on peut l'observer chez les chenilles processionnaires suivant à la queue-leu-leu l'animal de tête qui les mènera à leur pitance, ou au contraire être totalement conditionné comme les chiens de Pavlov répondant au son de la cloche par une montée de salive. Mais ils peuvent être aussi adaptatifs et plus complexes, comme la douve dont la larve « squatte » plusieurs hôtes différents, étant même capable de « prendre le contrôle » de fourmis afin de faciliter leur ingestion par leur hôte principal, ovidé ou bovidé.

L'étude du comportement est quelque chose de passionnant et sans fin. Néanmoins, on peut l'effectuer de deux manières : en milieu naturel, en n'agissant pas (ou le moins possible) sur l'environnement et les sujets d'étude (on parle alors d'éthologie), ou en milieu contrôlé, afin de se concentrer sur tel ou tel autre comportement particulier, comme ce fut le cas dans la cadre de notre travail.

2. L'étude du comportement en laboratoire chez la souris

L'étude du comportement en laboratoire permet d'être très ciblé et de se focaliser sur un ou plusieurs comportements en particulier. Dans le cadre de notre travail, nous évoluons donc dans un milieu contrôlé, souvent fort différent d'un milieu naturel avec pour modèle d'étude la souris. La souris est un animal ayant plutôt un cycle nocturne, craintif, social et curieux. Elle est capable d'apprentissages complexes, tels que des apprentissages instrumentaux ou

spatiaux, ainsi que d'effectuer des réponses à des situations diverses. Dans le cadre de mon travail, nous avons étudié l'état général des souris, testé leurs réactions face à des situations anxiogènes et de stress, et enfin évalué leurs capacités cognitives. Tous ces tests sont décrits dans la partie « Matériels et Méthodes », que ce soit aussi bien leur fonctionnement que leurs domaines d'investigation.

B. La maladie d'Alzheimer et l'Apolipoprotéine E

« On commence à vieillir quand on finit d'apprendre »

Proverbe Japonais

I. Des prémices et premières descriptions de la maladie ...

1. Aloïs Alzheimer et Oskar Fischer, « pères » de la maladie

La maladie d'Alzheimer doit son nom au Dr Aloïs Alzheimer, qui la décrivit pour la première fois en 1906. Il décrivit le cas d'Auguste Deter, patiente qu'il reçut en 1901 présentant une perte progressive de la mémoire, des symptômes focaux (déficiences nerveuses), des délires et des hallucinations. Il la suivit jusqu'à sa mort, cinq années plus tard, constatant l'aggravation progressive de ses symptômes cognitifs. Après son décès, il procéda à l'autopsie et effectua des coupes histologiques sur son cerveau en effectuant une coloration argentique, technique mise au point quatre années plus tôt par Max Bielschowsky. Grâce à cette technique, il mit en évidence deux sortes de lésions. Il remarqua, plus spécifiquement dans les parties corticales supérieures, des amas particuliers autour de nombreux neurones qu'il nomma plaques séniles (Figure 3 a,b). Ce genre de plaques ayant déjà été décrit chez des patients âgés épileptiques par Paul Blocq et Georges Marinesco quatorze années auparavant, ce fut sa seconde découverte qui fut inédite. Alzheimer mit ainsi en évidence, au cœur de certains neurones, des

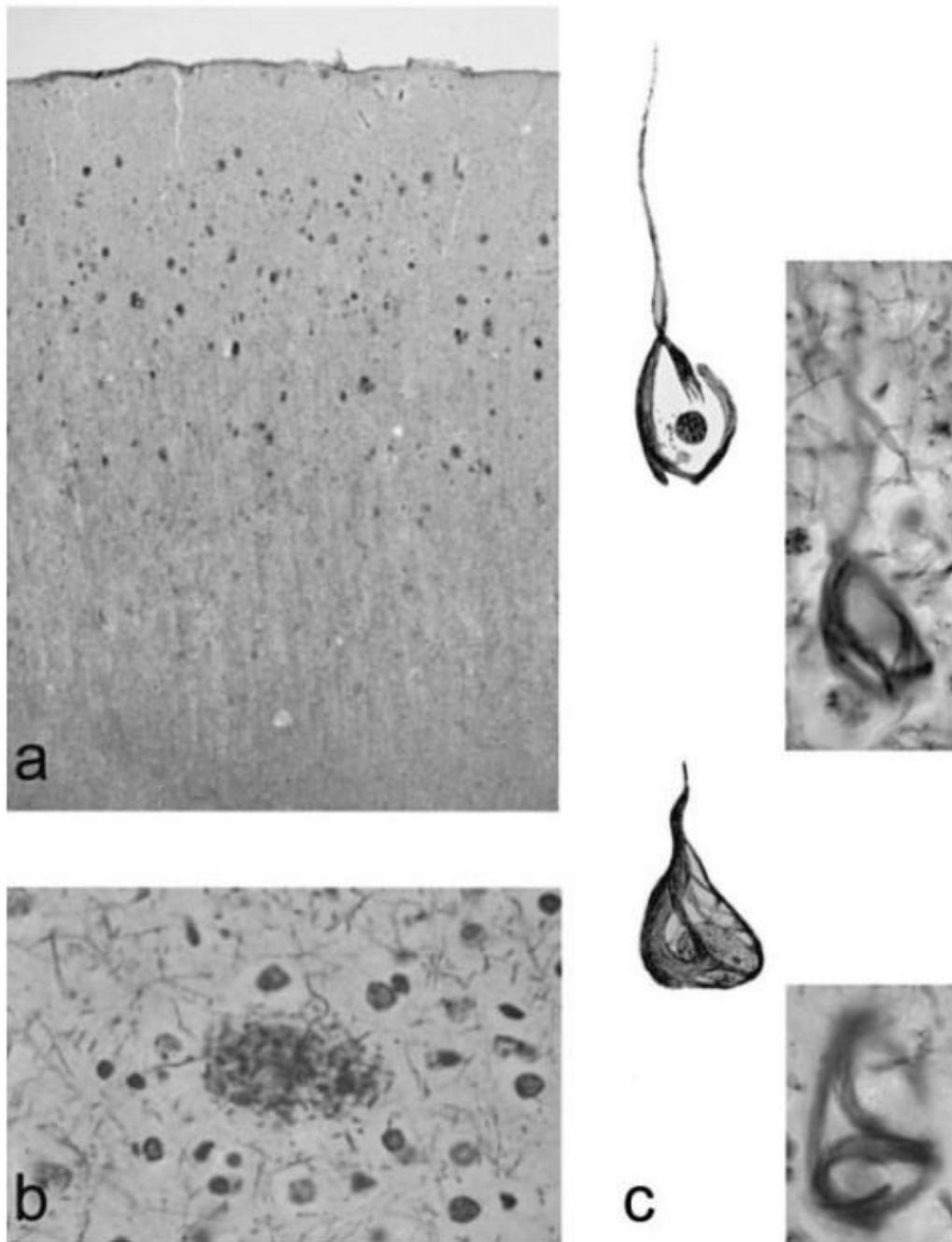


Figure 3 : Coupes du cerveau d'Auguste Deter effectuées par A. Alzheimer, présentant les plaques séniles (a, b) et les dégénérescences neurofibrillaires (c) au niveau du cortex cérébral. Coloration par imprégnation argentique de Bielschowsky. Grossissements : x 5 (a) et x 100 (b, c) (d'après Graeber et Mehraein, 1999)

dégénérescences neurofibrillaires (DNF), constatant des amas de fibres enchevêtrés au cœur des neurones (Figure 3 c). Un second cas quelques années plus tard, Johann Feigl, présentant le même type de symptômes et de lésions (souvent considéré comme le premier « vrai cas certifié » de la maladie) confirma ses données. La MA, nom donné en hommage par Emil Kraepelin suite à la conférence d'Alzheimer en 1911, venait d'être décrite pour la première fois et ainsi clairement séparée des autres démences séniles (Graeber & Mehraein, 1999; Goedert & Ghetti, 2007). Des travaux complémentaires de l'époque, effectués notamment par Oskar Fischer, vinrent ainsi confirmer ces données, faisant naître un débat quant aux origines et constituants de ces lésions que Max Bielschowsky détermina comme étant causées par une même substance inconnue (Goedert, 2009). Leur véritable structure ne fut élucidée que bien plus tard.

Enfin, deux formes de la maladie furent mises en évidence : une tardive ou sporadique, et une précoce. La forme précoce concerne une population entre 30 et 65 ans, représentant moins de 10% des cas. La forme sporadique touche elle au-delà des 65 ans sans montrer de lien familial tandis que la majorité des formes précoces est d'origine familiale et génétique, *i.e.* occasionnée par des mutations génétiques autosomales dominantes (Mayeux, 2006; Bekris et al., 2010).

2. Des troubles cognitifs et physiologiques ...

La MA est ce que l'on nomme une démence. Une démence, souvent associée au terme folie, est en réalité un terme médical employé pour définir des maladies neurologiques dont les lésions ont pour conséquences des troubles cognitifs et comportementaux entraînant une perte d'autonomie. Les altérations qui caractérisent une démence évoluent ainsi progressivement en

Mini Mental State Examination (MMSE) (Version consensuelle du GRECO)

Orientation

/ 10

Je vais vous poser quelques questions pour apprécier comment fonctionne votre mémoire.
Les unes sont très simples, les autres un peu moins. Vous devez répondre du mieux que vous pouvez.
Quelle est la date complète d'aujourd'hui ? _____

Si la réponse est incorrecte ou incomplète, posez les questions restées sans réponse, dans l'ordre suivant :

1. En quelle année sommes-nous ?
2. En quelle saison ?
3. En quel mois ?
4. Quel jour du mois ?
5. Quel jour de la semaine ?

☐
☐
☐
☐
☐

Je vais vous poser maintenant quelques questions sur l'endroit où nous trouvons.

6. Quel est le nom de l'hôpital où nous sommes ?*
7. Dans quelle ville se trouve-t-il ?
8. Quel est le nom du département dans lequel est située cette ville ?**
9. Dans quelle province ou région est située ce département ?
10. A quel étage sommes-nous ?

☐
☐
☐
☐
☐

Apprentissage

/ 3

Je vais vous dire trois mots ; je vous voudrais que vous me les répétiez et que vous essayiez de les retenir car je vous les redemanderai tout à l'heure.

- | | | | | |
|------------|----|--------|----|----------|
| 11. Cigare | | Citron | | Fauteuil |
| 12. Fleur | ou | Clé | ou | Tulipe |
| 13. Porte | | Ballon | | Canard |

☐
☐
☐

Répéter les 3 mots.

Attention et calcul

/ 5

Voulez-vous compter à partir de 100 en retirant 7 à chaque fois ?*

- | | | |
|-----|----|--------------------------|
| 14. | 93 | ☐ |
| 15. | 86 | ☐ |
| 16. | 79 | ☐ |
| 17. | 72 | ☐ |
| 18. | 65 | ☐ |

Pour tous les sujets, même pour ceux qui ont obtenu le maximum de points, demander :
Voulez-vous épeler le mot MONDE à l'envers ?**

Rappel

/ 3

Pouvez-vous me dire quels étaient les 3 mots que je vous ai demandés de répéter et de retenir tout à l'heure ?

- | | | | | |
|------------|----|--------|----|----------|
| 11. Cigare | | Citron | | Fauteuil |
| 12. Fleur | ou | Clé | ou | Tulipe |
| 13. Porte | | Ballon | | Canard |

☐
☐
☐

Langage

/ 8

- | | | |
|---|--------------------------------------|--------------------------|
| Montrer un crayon. | 22. Quel est le nom de cet objet ?* | ☐ |
| Montrer votre montre. | 23. Quel est le nom de cet objet ?** | ☐ |
| 24. Ecoutez bien et répétez après moi : « PAS DE MAIS, DE SI, NI DE ET »*** | | ☐ |

Poser une feuille de papier sur le bureau, la montrer au sujet en lui disant : « Ecoutez bien et faites ce que je vais vous dire :

25. Prenez cette feuille de papier avec votre main droite,
26. Pliez-la en deux,
27. Et jetez-la par terre. »****

☐
☐
☐

Tendre au sujet une feuille de papier sur laquelle est écrit en gros caractère : « FERMEZ LES YEUX » et dire au sujet :
28. « Faites ce qui est écrit ».

☐

Tendre au sujet une feuille de papier et un stylo, en disant :

29. « Voulez-vous m'écrire une phrase, ce que vous voulez, mais une phrase entière. »*****

☐

Praxies constructives

/ 1

Tendre au sujet une feuille de papier et lui demander : 30. « Voulez-vous recopier ce dessin ? »

☐

Figure 4 : Test de Folstein ou Mini Mental State Examination. À l'issue des 30 questions un score inférieur ou égal à 24 points évoque un état de conscience altéré et une possible démence (Reed Elsevier[®])

touchant au moins une des fonctions suivantes : langage, attention, calcul, jugement et raisonnement, pensée abstraite, gestes, reconnaissance, humeur et personnalité (Croisile, 2007). Lorsque cette démence est liée à l'âge, on parle alors de démence sénile, ce qui concerne directement la MA, dans sa forme sporadique et tardive.

Afin de bien différencier la MA de toute autre démence, des critères ont été définis par le NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke - Alzheimer's Disease and Related Disorders Association) au milieu des années 80, revisités plus tard avec le DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) (Dubois et al., 2007; Castellani et al., 2010).

Les premiers signes cliniques de la maladie sont tout d'abord d'ordre cognitif. Ainsi, les symptômes, pouvant être variés, touchent :

- La mémoire : troubles dans l'acquisition de nouveaux souvenirs et le rappel de souvenirs récents
- Au moins une des fonctions cognitives suivantes : aphasie (perte partielle ou totale du langage), apraxie (perte partielle ou totale de la capacité à effectuer des tâches motrices complexes), agnosie (perte partielle ou totale de la capacité à reconnaître des objets), perte de la capacité à planifier le quotidien.

Une évaluation cognitive de la maladie consiste ainsi à faire un test mental dit de Folstein (ou Mini Mental State Examination (MMSE)), évaluant en trente questions les capacités d'orientation dans le temps et dans l'espace, d'apprentissage et de transcription des informations, d'attention et de calcul, de rappel des informations et de rétention mnésique, de

langage et d'identification, et enfin, de praxie constructive (cf. Figure 4); un score inférieur ou égal à 24 indique un possible état de démence (Folstein et al., 1975).

Cependant, la seule présence de ces troubles cognitifs ne suffit pas à définir la démence comme étant bien la MA. C'est pour cela que d'autres critères ont été ajoutés, prenant en compte l'âge du patient, ses antécédents personnels et familiaux, l'absence de toute autre maladie (chorée de Huntington, maladie de Parkinson, ...), et des examens cliniques (IRM, biopsie, ...). Le bon diagnostic de la maladie permet d'effectuer un bon suivi du malade et de donner les soins adéquats.

La MA est un problème majeur de santé publique : elle constitue actuellement 50% des démences séniles, touchant près de 24 millions de personnes dans le monde. De par le vieillissement de la population et l'augmentation du risque d'apparition de la maladie avec l'âge (de 1% par an entre 60 et 70 ans à 6 à 8% après 85 ans), l'enjeu économique et social lié est primordial.

Néanmoins, aucun marqueur fiable de la maladie n'a pour l'instant été mis en évidence, rendant le diagnostic de la maladie certain que lors de l'étude du cerveau *post-mortem*. Ceci explique l'importance d'enjeux tels que la recherche de facteurs génétiques ou autres marqueurs de la maladie permettant d'anticiper et de prévenir son éventuelle apparition, celle-ci étant déjà bien installée lors de l'apparition des premiers troubles cognitifs.

3. ... engendrés par des dérèglements cellulaires.

Aloïs Alzheimer avait décrit, en plus des troubles cognitifs, deux altérations principales dont les origines restaient à identifier : les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires.

Ce n'est que bien des années après leurs premières descriptions que leurs composition et structure furent élucidées.

a. Les protéines Tau s'accumulent dans les neurones, les microtubules se polymérisent...

La première description des DNF en microscopie électronique date de 1963 par Kidd (Kidd, 1963). Il les décrivit ainsi : « des faisceaux en double hélice (...) consistant en deux filaments de 100 Å distants de 150 Å de centre à centre, et effectuant un tour complet de 1600 Å. Leur aspect variait selon les plans de coupe (...) mais amenait à conclure à une hélice uniforme comme seule forme possible. (...) Il est probable que ce sont des neurofilaments en quantité grandement accrue et associés en paire (...), chaque filament de la paire semblant plus dense que des neurofilaments individuels. ». Il se doutait ainsi déjà à l'époque de l'origine de ces filaments. La même année, Robert D. Terry décrivait lui aussi des filaments dont l'origine et la structure précises restaient à déterminer (Terry, 1963). Suite aux travaux d'Iqbal & al. en 1984 qui relança l'étude des DNF en développant une technique pour les isoler, il fallut attendre 1986, et les travaux conjugués de plusieurs équipes pour que leur composition soit enfin mise à jour (Iqbal et al., 1984; Grundke-Iqbal et al., 1986a; Grundke-Iqbal et al., 1986b; Kosik et al., 1986; Montejo de Garcini et al., 1986).

Ces filaments sont donc le fruit de la polymérisation massive de la protéine Tau (τ), un des principaux constituants des microtubules formant le cytosquelette qu'on nomme « protéine associée aux microtubules ». Celle-ci est primordiale dans la structure et la stabilité du cytosquelette, en assurant la cohésion entre les molécules de tubulines. Elle est principalement localisée dans le cytosol, mais aussi associée à la membrane cellulaire et au niveau des axones où elle joue un rôle dans le transport antérograde de différentes molécules (Lee et al., 2005;

Johnson, 2006). Dans sa forme hyperphosphorylée, cette protéine τ , dorénavant incapable de stabiliser ce réseau de microtubules, s'accumule alors sous forme de filaments paires hélicoïdale, rendant l'architecture du neurone instable et compromettant les transports de substance dans les axones et pouvant mener les cellules à l'apoptose (Delacourte et al., 1999; Johnson & Hartigan, 1999; Avila, 2006; Goedert et al., 2006). Un mécanisme probable serait que la protéine τ altérerait les filaments d'actine et compromettrait ainsi la structure neuronale (Gallo, 2007). Un tel mécanisme est observable aussi dans d'autres types de troubles tels que certaines démences frontotemporales ou certaines formes de la maladie de Parkinson (Brandt et al., 2005). L'origine de ce dérèglement de la phosphorylation de la protéine τ est encore beaucoup discutée, même si l'impact d'un stress oxydatif semble y jouer un rôle prépondérant (Perry et al., 2002; Kuret et al., 2005; Castellani et al., 2008).

b. ... et les neurones excrètent massivement une protéine : le bêta amyloïde

La composition des plaques séniles fut mise en évidence pour la première fois par Glenner & Wong, en 1984 (Glenner & Wong, 1984; Avila, 2006). On les retrouve principalement sous forme de dépôts extracellulaires, généralement circulaires et localisés au niveau de l'hippocampe, de l'amygdale et des cortex entorhinal et cingulaire ainsi que les couches II et III du néocortex. On retrouve au niveau de ces plaques séniles une petite protéine d'une longueur variant de 39 à 43 acides aminés appelée bêta-amyloïde ou $A\beta$, et dont les formes de 40 ($A\beta_{1-40}$) et 42 ($A\beta_{1-42}$) acides aminés composent ces plaques (Selkoe, 2004; Wetzel et al., 2007). La principale différence entre ces deux formes de $A\beta$ réside dans leur capacité d'agrégation, $A\beta_{1-42}$ s'agrégeant en plaques diffuses alors que $A\beta_{1-40}$ s'agrége moins, formant des plaques dites neuritiques dont l'impact sur les capacités cognitives serait plus important (Roses, 1996a; Stalder et al., 1999; Walsh et al., 1999; Naslund et al., 2000; Wetzel et al., 2007). Les plaques neuritiques, pouvant être mises en évidence par des techniques

histologiques telles que le rouge congo, la thioflavine S ou encore des anticorps anti- $A\beta$, sont aussi localisées au niveau de prolongements nerveux anormaux ainsi qu'au niveau des astrocytes et des cellules microgliales et sont aussi composées d'autres constituants tels que l'apolipoprotéine E (ApoE), l'héparane sulfate protéoglycane (HSPG), l' α -synucléine, l' α 1-anti-chymotrypsine et des protéines du complément (Dickson, 1997; Dickson & Vickers, 2001).

De plus, il a été mis en évidence que les dépôts en $A\beta_{1-42}$ et $A\beta_{1-40}$ étaient intrinsèquement liés à l'évolution des déclin cognitifs de manière plus précoce que les altérations liées à la protéine τ , $A\beta_{1-42}$ semblant posséder un rôle plus prépondérant dans la MA (Naslund et al., 2000; Steinerman et al., 2008).

Ainsi, la majorité des études actuelles consistent à essayer de comprendre d'une part quelles peuvent être les origines et les mécanismes entraînant l'apparition de ces DNF et plaques de $A\beta$ et d'en comprendre leurs chronologies afin de pouvoir retarder voire enrayer leur apparition, et d'autre part à mettre en évidence les différents facteurs, aussi bien génétiques qu'environnementaux, pouvant être à l'origine ou faciliter ces mécanismes.

II. ... aux dernières avancées cellulaires et génétiques

1. Les pistes génétiques

Comme évoqué plus haut, il existe deux grandes formes de la MA, familiales et sporadiques. Les études épidémiologiques ont pu mettre en avant, notamment grâce aux formes familiales deux grandes pistes génétiques : des facteurs que je nommerai « obligatoires » et des facteurs de risques. Les facteurs obligatoires, sont des mutations autosomales dont les porteurs développeront forcément la forme précoce de la MA et touchent les gènes de la protéine

précurseur de l'A β (ou Amyloid Precursor Protein, APP) sur le chromosome 21 et des Présénilines 1 (PS1) et 2 (PS2) respectivement sur les chromosomes 14 et 1 ; ces formes sont, pour rappel, rares et représentent moins de 10% des cas de MA. Les facteurs de risques augmentent quant à eux la probabilité de développer une forme tardive de la MA ; leur nombre augmente chaque année, et nous pouvons citer pour les plus connus les polymorphismes de l'apolipoprotéine E (chromosome 19) et nucléotidique (ou SNPs pour Single Nucleotide Polymorphism) (Selkoe, 2001; Mayeux, 2006; Bekris et al., 2010; Eisenstein, 2011; Sherva et al., 2011). L'étude de ces facteurs génétiques permet de mieux élucider les mécanismes sous-jacents à la MA.

a. La protéine précurseur du Bêta Amyloïde, ou APP

L'APP est une glycoprotéine transmembranaire codée par le gène situé sur le chromosome 21 dont on peut retenir trois isoformes principales, APP695, APP751 et APP770, différant par la longueur de leur séquence d'acides aminés. On trouve majoritairement la forme APP695 au niveau des neurones, alors que les deux autres formes APP751 et APP770 sont elles plus retrouvées au niveau des cellules gliales et des tissus périphériques (Rossner et al., 1998; Selkoe, 1998; Zhang et al., 2011).

L'APP membranaire va être clivée au niveau de la région A β par trois enzymes différentes (les α , β et γ -secrétases) au niveau de trois sites endoprotéolytiques et pouvoir emprunter deux voies de sécrétion différentes : une première dite amyloïdogénique, à l'origine de la production d'A β , et une seconde non amyloïdogénique. La voie amyloïdogénique fait intervenir deux clivages par les β - et γ -secrétases, qui vont couper l'APP membranaire de manière à former d'une part de l'A β (A β ₁₋₄₀ serait clivée au niveau de l'appareil de Golgi et A β ₁₋₄₂ serait clivée au niveau du réticulum endoplasmique) et d'autre part une forme réduite

d'APP appelée sAPP β qui seront libérés dans l'espace extracellulaire. La voie non amyloïdogénique, quant à elle, met en jeu un clivage par α -secrétase libérant une forme d'APP appelée sAPP α qui sera libérée dans l'espace extracellulaire ; cette coupure se faisant au milieu de la séquence de A β , cette voie ne libère donc pas de A β (Gandy et al., 1994; Tang, 2005). Dans des conditions normales, la production de A β est tellement faible que cela n'entraîne aucune conséquence pathologique. En revanche, lorsque le système commence à se dérégler et que sa production augmente considérablement, le A β s'accumule alors en amas insolubles : les plaques séniles. Les mutations de l'APP représentent ainsi environ 10% des cas de forme familiale de la MA.

La mise en évidence de la voie amyloïdogénique dans la libération d'A β a ainsi permis de mettre en avant une piste thérapeutique en se concentrant sur les enzymes responsables de son clivage en forme pathologique : les β et γ -secrétases. Il a ainsi par exemple été identifié deux formes de β -secrétases (BACE-1 et BACE-2, pour β -site APP Cleaving Enzyme) dont on cherche à réduire voire supprimer l'activité afin d'entraver la production d'A β (Murphy et al., 2001; Cheng et al., 2007). Ainsi, des souris BACE-1-KO ne produisent pas d'A β (Luo et al., 2001) alors que d'autres souris surexprimant BACE vont au contraire en produire massivement (Mohajeri et al., 2004).

b. Les présénilines

Les présénilines sont elles aussi des protéines membranaires possédant de nombreux rôles différents. Elles sont notamment impliquées dans le clivage du récepteur Notch (rôle de facteur de transcription, important dans la différenciation cellulaire) ou encore, dans le cadre qui nous intéresse, dans le clivage de l'APP en jouant un rôle de catalyseur au sein du complexe enzymatique de la γ -secrétase (Selkoe, 1998; Parks & Curtis, 2007). Il existe plus

d'une centaine de mutations liées à PS1 et une dizaine liées à PS2, représentant ainsi environ les deux tiers des formes familiales de la MA (Hannequin et al., 1998; Mayeux, 2006).

c. Le polymorphisme nucléotidique (SNPs)

On nomme polymorphisme nucléotidique (ou SNPs) la variation d'une paire de base isolée au sein du génome d'un individu, touchant environ une base sur mille chez l'homme ce qui en fait un événement fréquent. Ces variations du génome peuvent affecter de manière importante les sensibilités face à des maladies ou des agents variés (agents pathogènes, médicaments, etc., ...). Par un travail de screening génétique massif, il a été mis en évidence des centaines de SNPs possiblement impliquées dans la MA, dont l'étude est actuellement en plein essor (Emahazion et al., 2001; Huang et al., 2007; Sherva et al., 2011).

d. L'apolipoprotéine E

L'apolipoprotéine E, ou ApoE est une lipoprotéine, *i.e.* une protéine possédant une surface hydrophile lui permettant de circuler dans le sang et un cœur hydrophobe afin de pouvoir jouer son rôle dans le transport des lipides et autres molécules hydrophobes, tels que les chylomicrons, triglycérides, ou le cholestérol dans et en dehors des cellules (Mahley, 1988). Il existe ainsi chez l'homme diverses formes d'apolipoprotéines (A, B, C, D et J) et trois isoformes d'ApoE, dont les allèles, notés ϵ , sont codés sur le chromosome 19. L'ApoE est une protéine composée de 299 acides aminés, dont la différence entre ses trois isoformes se situe en positions 112 et 158 (Figure 5 A) : l'ApoE2 retrouvée chez environ 5-10% de la population (Cys en positions 112 et 158), l'ApoE3 la plus fréquente retrouvée chez environ 75-80% de la population (Cys en position 112 et Arg en position 158) et enfin l'ApoE4 retrouvée chez environ 15-20% de la population (Arg en positions 112 et 158) (Utermann et al., 1980; Olaisen et al., 1982; Weisgraber, 1994). L'ApoE possède de nombreux rôles, dont je vais

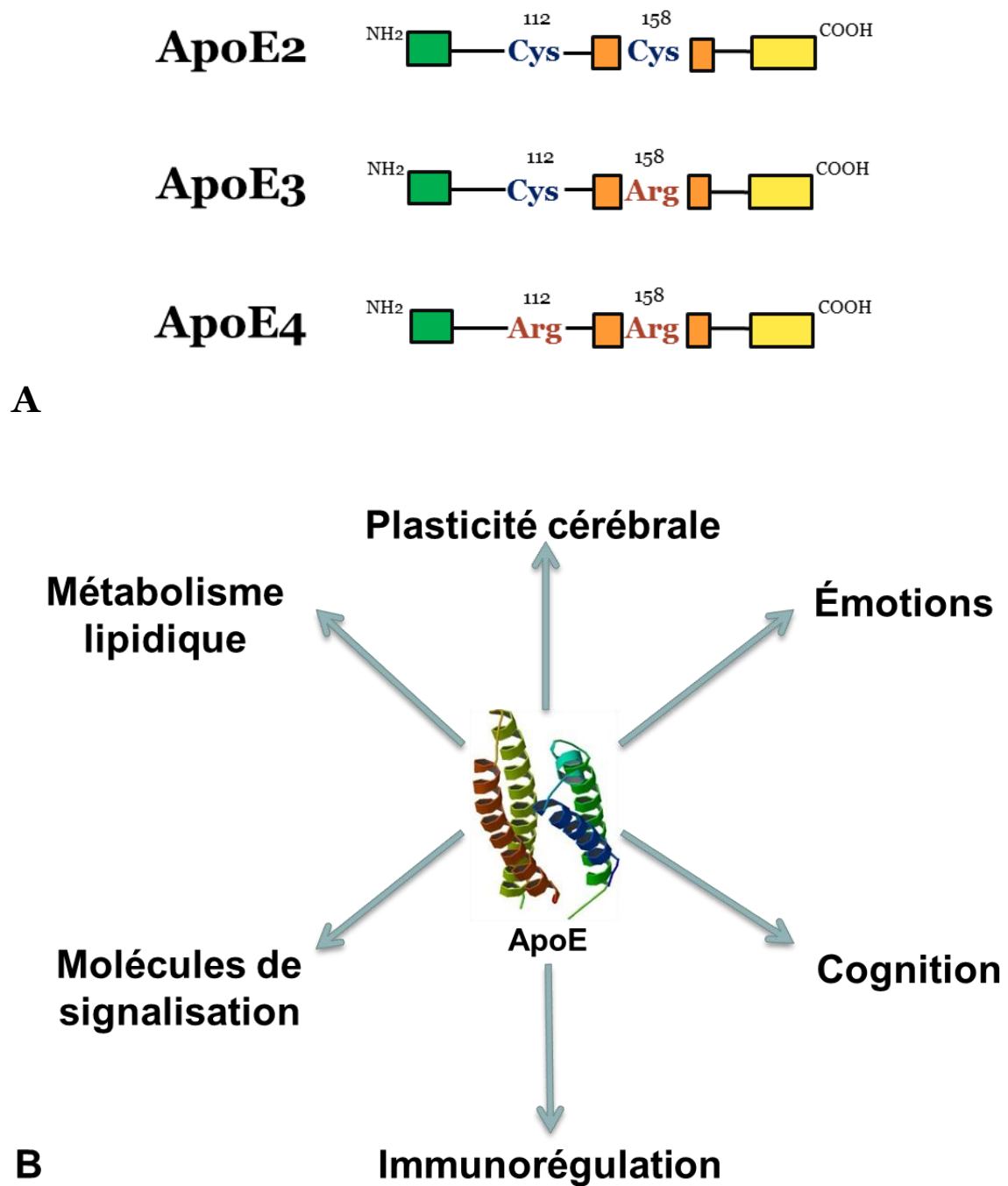


Figure 5 : A. Représentation schématique de la différence entre les trois isoformes de l'ApoE au niveau des acides aminés en positions 112 et 158. B. Schématisation des principaux rôles de l'ApoE.

maintenant vous résumer les principaux (résumés sur la Figure 5 B). Si on s'intéresse à l'ApoE de la souris, on peut noter qu'il n'existe qu'une seule forme d'ApoE murine assimilable d'un point de vue fonctionnel à l'ApoE3 humaine.

i. L'ApoE et les lipides

En tant que lipoprotéine, l'ApoE a été d'abord massivement étudiée pour son rôle dans le métabolisme et le transport lipidique (notamment du cholestérol), et son impact dans les maladies cardiovasculaires telles que l'hypercholestérolémie ou l'athérosclérose (Mahley, 1988; Sullivan et al., 1998; Knouff et al., 1999). En effet, la différence de configuration entraînée par ces changements sur seulement deux acides aminés entraîne des modifications d'affinité avec leur substrat (ApoE3 et ApoE2 ayant une meilleure affinité pour les HDL _High Density Lipoprotein_ alors que l'ApoE4 en possède une meilleure pour les LDL _Low Density Lipoprotein_) et peut ainsi favoriser des dépôts lipidiques artériels pathologiques chez les porteurs de l'ApoE4.

ii. L'ApoE et le système nerveux

Au niveau du système nerveux périphérique (SNP), le rôle de l'ApoE a été mis en avant dans la mobilisation et la redistribution du cholestérol pour la réparation, la croissance et l'entretien de la myéline et des membranes neuronales durant le développement et suite à des lésions. Au niveau du système nerveux central (SNC), son rôle a aussi été établi dans le métabolisme et la redistribution du cholestérol et des phospholipides au cours de la myélinisation et du remodelage des membranes associée à la régénération axonale : l'ApoE jouerait donc un rôle dans la plasticité cérébrale (Mahley, 1988; Handelsmann et al., 1992; Nathan et al., 1994; Weisgraber, 1994; Weisgraber et al., 1994; Veinbergs et al., 2001; Vance & Hayashi, 2010). Dans le cadre de lésions cérébrales ou nerveuses, le rôle de l'ApoE a aussi été mis en avant :

de grandes quantités de lipides et de cholestérol sont libérées des membranes des cellules neuronales ayant subi une perte de myéline et des connexions afférentes. Les astrocytes dans le SNC et les macrophages dans le SNP y répondent par la synthèse et la libération d'ApoE qui récupère le cholestérol et les phospholipides de la myéline et débris cellulaires pour contribuer ensuite à la régénération du SNP ou la réinnervation du SNC. Les sujets porteurs d' $\epsilon 4$ présentent des déficits dans la réparation tissulaire. Ce rôle de l'ApoE semble plus important dans le SNC que dans le SNP (Poirier et al., 1993a; Poirier, 1994, 1996; Teasdale et al., 1997; Crawford et al., 2009).

iii. L'ApoE et la maladie d'Alzheimer

En plus de ces différents rôles, l'implication du polymorphisme de l'ApoE a été mis en avant aussi dans le cadre de maladies neurodégénératives telles que la MA (Strittmatter & Roses, 1995; Mahley et al., 1996; Roses, 1996b), l'ApoE4 semblant être un facteur favorisant le développement de la MA (Poirier et al., 1993b; Saunders et al., 1993; Raber et al., 2004). En effet, dans le cadre des formes sporadiques de la maladie, de nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence le lien étroit existant entre MA et ApoE4 : en plus de pouvoir être touchés par la MA de manière plus précoce, les porteurs homozygotes pour l'allèle $\epsilon 4$ voient aussi ce risque d'apparition de la maladie accru par un facteur 10 par rapport aux porteurs homozygotes de l'allèle $\epsilon 3$, ce facteur étant presque divisé par deux pour les porteurs hétérozygotes $\epsilon 4/\epsilon 3$. Il est à noter aussi que les porteurs homozygotes pour l'allèle $\epsilon 2$ sont nettement moins touchés par la MA que les autres groupes (Ashford, 2004; Federoff, 2005; Mayeux, 2006; Bekris et al., 2010). Il faut ajouter aussi à ce polymorphisme de l'ApoE un autre facteur essentiel : le sexe. En effet, si ce risque est présent dans les deux sexes, il existe néanmoins une inégalité du fait que les femmes homozygotes pour l'allèle $\epsilon 4$ sont en proportion plus touchées que les hommes $\epsilon 4/\epsilon 4$, sans doute dû à des facteurs comme les

œstrogènes (Bickeboller et al., 1997; Raber et al., 2002; Wang et al., 2006; Acevedo et al., 2010). Une étude, effectuée sur un échantillon de patients certes peu élevé mais néanmoins suffisant pour donner une idée de l'inégalité liée au sexe, a montré que 100% des femmes $\epsilon 4/\epsilon 4$ âgées de 85 ans sont touchées par la MA contre seulement 50% des hommes (Corder et al., 1995).

Ainsi, on a trouvé chez les patients $\epsilon 4/\epsilon 4$ atteints de MA une formation accrue de plaques séniles par rapport aux patients atteints non porteur d' $\epsilon 4$, facilitation confirmée *in vitro* : l'ApoE4 agirait comme un promoteur du dépôt A β , l'ApoE3 jouerait un rôle neutre alors que l'ApoE2 jouerait au contraire un rôle totalement opposé en limitant ces dépôts (Schmechel et al., 1993; Roses, 1994; Castano et al., 1995; Pluta, 2000; Dodart et al., 2005; Vemuri et al., 2010). *A contrario*, il a été démontré chez des souris KO pour le gène de l'ApoE l'absence de dépôt d'A β , et ceci même à un âge avancé (Bales et al., 1999), pointant à nouveau l'importance de l'ApoE dans la formation des plaques séniles.

iv. L'ApoE et le système cholinergique

Enfin, l'ApoE jouerait aussi un rôle central dans le bon fonctionnement du système cholinergique. Les neurones étant fortement dépendant de la disponibilité des lipides pour synthétiser l'acétylcholine (Ach), la production d'Ach est significativement réduite chez les patients atteints par la MA porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ (Beffert et al., 1998). Il a été suggéré que le faible niveau de l'ApoE dans l'hippocampe, le cortex temporal et le LCR de patients $\epsilon 4/\epsilon 4$ atteints de MA compromettrait le transport du cholestérol et des phospholipides dans le SNC, limitant ainsi la neurotransmission cholinergique (Poirier, 1994; Poirier et al., 1995).

v. L'ApoE, la cognition et le comportement

Toutes ces données impliquant l'ApoE dans la plasticité du système nerveux, son impact sur le système cholinergique ainsi que dans des maladies neurodégénératives, suggèrent aussi son implication dans des processus cognitifs. Chez l'homme, des effets négatifs liés à la mutation ApoE4 ont été observés chez des paires de jumeaux, ceux porteurs de la forme ApoE4 présentant un déclin cognitif plus marqué que ceux qui en sont dépourvus (Reed et al., 1994). Il a de plus été démontré une potentialisation liée à l'ApoE4 de certains effets négatifs dus aux conditions de vie : ainsi une augmentation de la vulnérabilité aux effets du stress sur la cognition et l'état émotionnel a pu être observée chez des porteurs de la forme ApoE4 (Peavy et al., 2007; Lee et al., 2008; Peavy, 2008; Comijs et al., 2011). Il a été montré que des souris KO pour le gène de l'ApoE présentent des modifications de l'apprentissage et de la mémoire, passant du déficit à l'amélioration selon les études et les fonds génétiques utilisés (Krzywkowski et al., 1999; Puolivali et al., 2000a; Veinbergs et al., 2000; Grootendorst et al., 2001b). Chez des souris porteuses de l'ApoE4 et de l'ApoE3 humaines, des déficits ont été observés dans certaines tâches cognitives chez les souris ApoE4, notamment chez les femelles, ainsi que l'apparition de certains troubles anxieux (Grootendorst et al., 2005; Raber, 2007; van Meer et al., 2007; Bour et al., 2008; Raber, 2008; Siegel et al., 2010). Il est de plus intéressant de constater que chez la souris ApoE-KO, les effets négatifs d'un stress chronique sur la cognition sont atténués, montrant à nouveau l'intrication entre ApoE, cognition et stress (Grootendorst et al., 2001a; Grootendorst et al., 2001b).

L'ensemble de ces travaux relève donc l'intérêt porté à l'ApoE dans le cadre de la MA, mais aussi dans le cadre des troubles cognitifs et émotionnels.

2. Les facteurs non génétiques

Parmi les facteurs non génétiques, l'âge représente le principal facteur. En effet, le risque de développer la MA augmentant considérablement après 75 ans passant d'environ 3,5 cas pour 1000 personnes/année avant cet âge à 60 pour 1000 personnes/année chez les 90 ans et plus. Le sexe joue aussi un rôle important, les femmes présentant plus de risques que les hommes en vieillissant après 80 ans, probablement dû aux hormones sexuelles, et notamment aux œstrogènes. Le niveau d'éducation joue aussi un rôle essentiel ; les personnes ayant un haut niveau d'éducation, pratiquant fréquemment des exercices intellectuels et des activités variées sont moins sujettes à la MA. Il est à noter de plus que certains médicaments, tels que des anti-oxydants et des anti-inflammatoires non stéroïdiens, semblent jouer un rôle protecteur face à la MA (Roses, 1996a; Hannequin et al., 1998; Croisile, 2007; Bekris et al., 2010; Castellani et al., 2010; Williams et al., 2010; Eisenstein, 2011). Il résulte de tout cela que la MA, ne peut pas être réduite à quelques facteurs. Eisenstein le résume bien, en précisant que chaque malade possède son ensemble de facteurs propres, accumulés durant toute sa vie au travers de ses expériences et maladies, ainsi que son patrimoine génétique, qui à lui seul ne suffit pas à déterminer le risque réel de développer la MA (Eisenstein, 2011). On s'oriente donc de plus en plus vers des causes multifactorielles, comme le montre l'étude pilote récente de Ghebranious et collaborateurs étudiant l'impact de divers facteurs génétiques entre eux et comparés à des facteurs environnementaux (fumeur ou non-fumeur, tension artérielle, poids, etc...) (Ghebranious et al., 2011).

3. Les modèles animaux

Différentes approches expérimentales ont été utilisées pour reproduire chez l'animal un ou plusieurs aspects de la pathologie associée à la MA afin d'étudier leurs conséquences sur les processus cognitifs. Parmi les modèles utilisés, existe le sujet âgé. L'utilisation de ce modèle est en effet basée sur le fait que lors du vieillissement, une baisse des capacités cognitives, et

Nom	Mutation	Fond Génétique	Effets
3xTg	Injection de transgènes APPswe et τ APP23 chez des souris KI pour PS1M146V	129/C57BL6	A β intraneuronal à 3 mois, extracellulaire à 6 mois, τ hyperphosphorylé dans l'hippocampe à 12 mois, dysfonctions synaptiques
A β PPsw	Porte la mutation A β PPK670N, gène M671L	56.25% C57, 12.5% B6, 18.75% SJL et 12.5% Swiss-Webster	Dépôts amyloïdes et déclin cognitif à partir de 8 mois
ApoE3, ApoE4	Souris ApoE-KO portant l'ApoE humaine transfecté dans les cellules souches embryonnaires	ApoE KO et C57BL6	Expression d'ApoE humaine dans le cerveau, hauts taux de cholestérol
APP23	ADNc d'APP humaine avec la double mutation Swedish (positions 670/671) combinée à la mutation V717I insérée au site XhoI de la cassette d'expression contenant le gène murin Thy1.2	C57BL6	Dépôts de A β au niveau du néocortex et de l'hippocampe à partir de 6 mois
APP715SL	Mutations Swedish (KM670/671NL) et London (V717I) sous contrôle du promoteur Thy1	CBA/C57BL6	Dépôts de plaques amyloïdes à 6 mois
APP ^{NLh/NLh}	Séquence humaine codant pour A β KI avec le gène endogène pour l'APP gene, combiné avec la mutation Swedish (K670N/M671L)	129/Sv	Pas de dépôt de A β , mais produit 9 fois plus de A β humaine comparée aux niveaux humains normaux
APP/PS1 KI	Souris double-KI: souris APPNLh/NLh croisée avec souris PS1 P264L-KI, via la technique de KI Cre-lox et des promoteurs endogènes	CD-1/129	Augmentation en A β 42 levels, dépôts amyloïdes, et gliose réactive à 4 mois
APPswe/ind	Expression de l'APP humaine avec la mutation Swedish (K670N/M671L) et la mutation Indian V717I Indiana sous contrôle du promoteur PDGF promoter (lignée J20)	C57BL6 $\times$ DBA/2	Production augmentée en A β , dépôts de A β à 5–7 mois, diminution de l'immunoréactivité à la synaptophysine vers 2-4 mois
APPswe/PS1 Δ E9	Croisé d' APPswe et de PS1 Δ E9 (exprimant la PS1 humaine portant la variante exon 9 supprimé)	C57BL6J	Dépôts de plaques amyloïdes, diminution de marqueur cholinergique, déficits mnésiques à 6 mois
APPswe/PS1Leu235 Pro	Mutation Swedish APP croisée avec la mutation humaine PS1 Leu235Pro	C3H/HeJ/C57BL/6J	-
APPswe/PS1M146L	Tg2576 combinée avec la mutation PS1 (M146L) sous contrôle du promoteur PDGF	C57/B6/SJL/Swiss Webster	Comparées aux Tg2576, 41% plus de A β 42 précédant les dépôts fibrillaires de A β dans le cortex cérébral et l'hippocampe. Performance réduite dans le test d'alternance spontanée (Y Maze)
APPV717I-C100	Exprime la partie C-terminal de 100 acides aminés de l'APP avec la mutation London 717	C57BL6	Accumulation intracellulaire de A β soluble
APP-YAC	Le gène APP humain en entier inséré sur un chromosome artificiel de levure (YAC) B142F9, introduit dans des cellules souches embryonnaires par lipofection	C57BL6	Expression significative d'APP humaine dans le cortex cérébral
PDAPP	Mutation Indiana (V717F) avec des portions d'introns 6-8 de l'APP introns 6–8, sous contrôle du promoteur PDGF	-	Dépôts extracellulaire de A β dans l'hippocampe à 6 mois et dans le néocortex à 8 mois
PS1-L286V	Surexpression de la PS1 humaine avec la mutation L286V sous contrôle du promoteur humain PDGF- β promoter	FVB/N	Dépôts intracellulaires de A β 42 intracellulaire à 13 mois
TASTPM	Porte l'APPswe humaine et la mutation PS1 M146V	C57BL6/3H	Dépôts cérébraux de A β et déficits cognitifs à 6 mois
Tg19959	Souris TgCRND8 mice avec M146L + L286V PS1 inséré par un promoteur de protéine prion de hamster (PrP)	C57/C3H/129SvEv/Tac/FVB	Dépôts amyloïdes à 3 mois
Tg2576	APPswe humaine (double K670N, M671L) inséré par un promoteur de protéine prion de hamster (PrP)	C57BL6	5 fois plus A β 40 et 14 fois plus de A β 42, déficits comportementaux, plaques amyloïdes à 9 mois
TgC100	Exprime les 100 acides aminés de la partie terminale de l'APP humaine (avec ou sans la mutation London 717)	C57BL6	Accumulation intracellulaire d'A β
TgCRND8	Mutations APP Swedish et Indiana (V717F)	C57/C3H/129SvEv/Tac/FVB	Plaques à 3 mois, augmentation du ratio A β 42/40
TgV337M	V337M τ , ADNc inséré au niveau du vecteur d'expression PDGF β	B6SJL	Aggrégation de τ hyperphosphorylé activité neuronale réduite dans l'hippocampe, neurodégénérescences, comportement anormal

Tableau 1 : Liste des principaux modèles de souris pour la maladie d'Alzheimer (d'après Chouliaras & al, 2010)

des modifications neuroanatomiques telles que la présence de dépôts amyloïdes et de des dégénérescences neurofibrillaires, peuvent être observées (Struble et al., 1985; Walker et al., 1988). D'autre part, un autre exemple de modèle s'intéresse à une altération marquée du système cholinergique dans la MA, ayant conduit de nombreux auteurs à induire des déficits des systèmes cholinergiques chez l'animal, pharmacologiquement ou à l'aide de lésions spécifiques, et en étudier les effets sur l'apprentissage et la mémoire (van der Staay et al., 2006; Cassel et al., 2007; Cassel et al., 2008). Enfin, l'évolution des méthodes de la biologie moléculaire et le développement des techniques de transgénèse, ainsi que la découverte de protéines impliquées dans la pathologie de type Alzheimer, ont permis de créer des souris transgéniques développant de nombreuses lésions caractéristiques de la maladie, et manifestant des déficits importants dans divers tests d'apprentissage et de mémorisation. Un article de revue récent de Chouliaras et collaborateurs fait état des nombreux modèles différents dont nous pouvons disposer aujourd'hui, dont un résumé est disponible sur la Table 1, chaque modèle possédant ses avantages et ses inconvénients (Chouliaras et al., 2010).

Dans le cadre de mon travail, nous avons utilisé des souris transgéniques exprimant les trois isoformes de l'ApoE humaine. Nous avons donc disposé de souris ApoE2-, ApoE3- et ApoE4-KI, dont les performances ont été comparées à celles des souris contrôles issues des mêmes parents hétérozygotes (porteurs d'un allèle humain et d'un allèle murin) et exprimant l'ApoE murine. Le fait de travailler avec des souris issues d'un même élevage permet d'éviter d'éventuels biais dus, d'une part aux variations de fond génétique (dans le cas d'utilisation de souris consanguines comme contrôles), et d'autre part aux conditions d'élevage, permettant ainsi un phénotypage compréhensible et efficace (Mandillo et al., 2008).

C. Objectifs de la thèse

« Une thèse c'est un peu comme l'éternité. C'est très long, surtout sur la fin..... »

Rémi Gervais

Les données actuelles sur la MA montrent l'importance de ses origines multifactorielles. Si dans ses formes familiales, la MA est due à des mutations la rendant inévitable, il est important de noter que dans sa forme sporadique elle représente 90% des cas, et n'est pas due à une simple mutation ou un simple événement, mais à un ensemble de facteurs agissant ensemble. Dans ce contexte et en prenant en considération que le polymorphisme de l'ApoE constitue un facteur de risque majeur de la MA, mais seulement un facteur de risque (les sujets ApoE4 ne développent pas nécessairement la MA avec l'âge), nous nous sommes intéressés à l'étude d'une éventuelle interaction entre ce facteur de risque génétique et un facteur de type environnemental en l'occurrence le stress. Pour cela, nous avons utilisé des souris transgéniques pour les trois formes de l'ApoE humaine (ApoE2, ApoE3 et ApoE4), nées et élevées au sein de notre laboratoire (Sullivan et al., 1997; Sullivan et al., 1998; Knouff et al., 1999) et ainsi, contrôlées depuis leur naissance. Mon travail est décomposé en trois volets :

1) Dans un premier volet de ma thèse, nous avons d'abord procédé à une caractérisation des éventuelles différences comportementales consécutives aux différentes mutations ApoE humaines chez la souris. Dans ce cadre, une étude comportementale approfondie a été menée, visant à évaluer les performances des souris dans une large majorité de fonctions du système nerveux, incluant l'état général et les fonctions sensori-motrices, les comportements émotionnels et les fonctions cognitives. En effet, comme je l'ai évoqué plus haut, les études concernant les ApoE présentent des résultats contrastés dus en grande partie à des différences

méthodologiques ou de fond génétique (notamment concernant les groupes témoins) d'une part, et d'autre part les études comportementales sur les 3 génotypes (surtout ApoE2) en simultané sont quasi-inexistantes. Les souris ApoE2, ApoE3 et ApoE4 ont ainsi été comparées aux souris porteuses de l'ApoE murine (souris wildtypes), afin de mettre en évidence d'éventuelles altérations comportementales liées au génotype et se bâtir une base de référence.

2) Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'impact combiné d'un stress chronique et du polymorphisme de l'ApoE sur les comportements émotionnels et la fonction mnésique chez des souris à deux âges avancés (1 an et 1,5 ans) et en fonction du sexe. En effet, dans notre société, le stress est un facteur omniprésent face auquel nous ne sommes pas égaux et dont les conséquences sur la santé sont nombreuses. De nombreuses études chez la souris ont montré que celui-ci peut avoir des conséquences sur son comportement et sur ses capacités cognitives (Willner et al., 1987; Papp et al., 1991; Moreau et al., 1992; Moreau et al., 1993; Willner, 1997; Grootendorst et al., 2001b; Elizalde et al., 2008). Ainsi, nous nous sommes intéressés à l'impact que ce stress pouvait avoir sur des souris âgées en fonction de leur génotype. Le but étant donc de voir s'il existe en fonction de l'ApoE exprimée (ApoE2, ApoE3 ou ApoE4) des modifications dues au stress occasionnant des conséquences comportementales sur nos souris.

3) Enfin, la troisième partie de ma thèse a été consacrée à l'étude des relations entre la variation génotypique de l'ApoE et une forme de plasticité cérébrale : la neurogénèse. En effet, si l'ApoE est impliquée dans des mécanismes tels que les réparations cellulaires ou des terminaisons nerveuses, et dans la différenciation cellulaire, elle pourrait être impliquée dans d'autres formes de plasticité comme la formation de nouveaux neurones. Au début de ma thèse, aucun résultat n'était encore connu, et quelques études montrèrent après coup des

résultats contradictoires (Levi & Michaelson, 2007; Li et al., 2009; Nichol et al., 2009). Dans ce cadre, nous avons étudié l'impact du polymorphisme de l'ApoE sur la neurogénèse au niveau de l'hippocampe chez la souris en fonction de l'âge et du sexe, et le nombre de neurones néoformés a été quantifié en utilisant une technique par cytométrie de flux.

MATERIELS ET METHODES

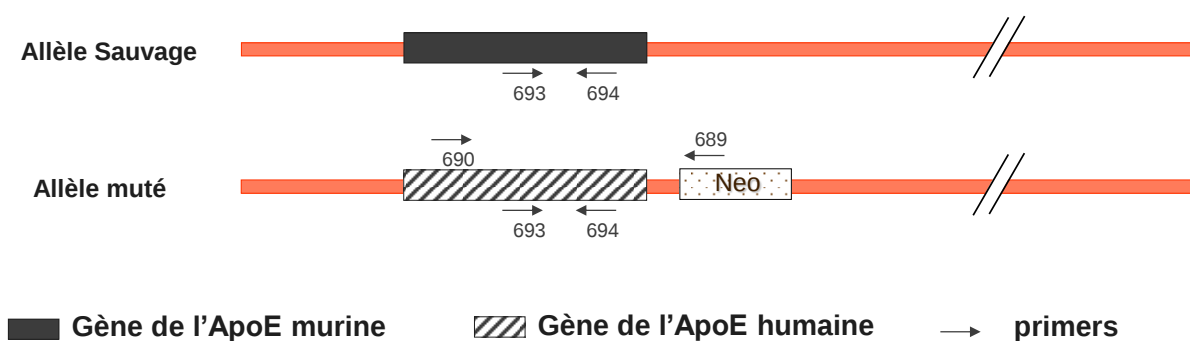
A. Animaux

I. Construction des souris génétiquement modifiées

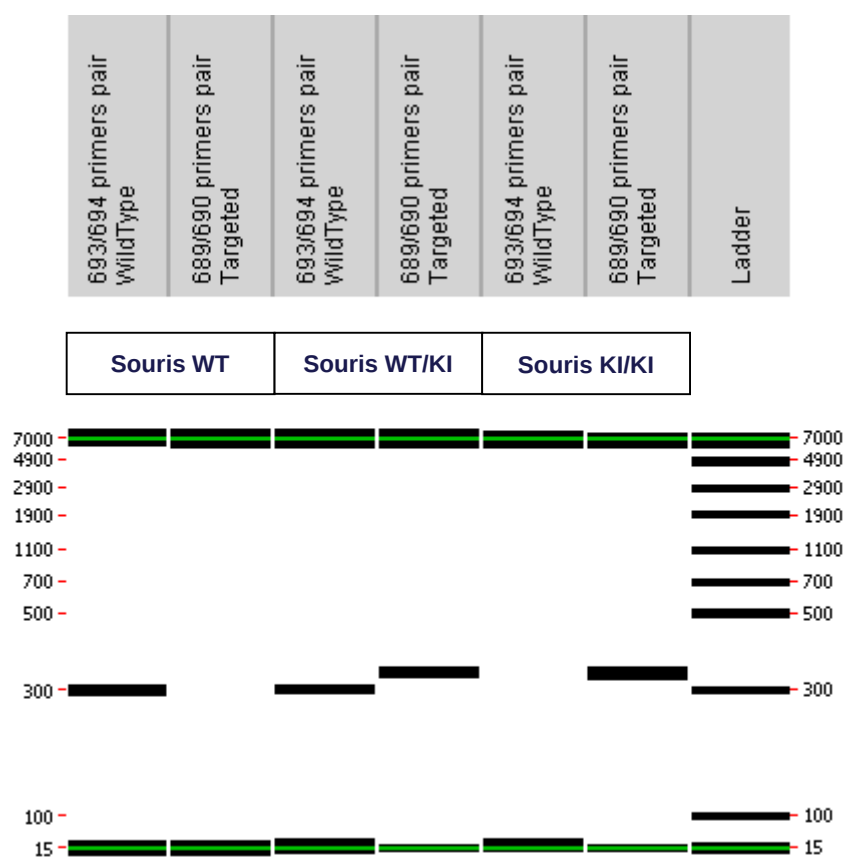
Les souris utilisées sont des souris transgéniques KI pour les trois isoformes du gène de l'ApoE humaine, construites toutes sur le même modèle par Sullivan & al (Sullivan et al., 1997; Sullivan et al., 1998; Knouff et al., 1999). Pour créer ces souris, une séquence possédant la partie codante du gène de l'ApoE désirée (la partie 39 de l'intron 1, les exons 2-4 et 1,5 kilobases de l'ADN non codant à proximité) ainsi que des fragments du gène de l'ApoE murine (notamment l'exon 1 et la partie 59 de l'intron 1 de 376 paires de bases) en 5' a été insérée en aval du gène de résistance à la néomycine (NEO) dans le vecteur pPNT qui fut ensuite transféré par électroporation dans des cellules souches embryonnaires (ES) de souris 129/SvPas (cf. Figure 6 A). Seules ont été conservées les cellules ayant intégré le vecteur et des chimères de première génération porteuses du gène de l'ApoE humaine désirée ont ainsi été créées, puis croisées avec des souris C57BL/6J sauvages. On obtient ainsi en seconde génération des souris à moitié C57BL/6J et 129/SvPas, hétérozygotes pour les ApoE murine et humaine. Ces souris sont ensuite croisées entre elles, jusqu'à obtenir des souris ayant un fond stable à 75% C57BL/6J et 25% 129/SvPas (notées BJ75%V25%). Les souris dont nous disposons sont toutes nées et élevées au sein de notre animalerie.

II. Mise en évidence du génotype

Les souris sont génotypées en utilisant la méthode d'amplification en chaîne par polymérase (PCR). Grâce à cette méthode, les fragments d'ADN récupérés à partir d'une biopsie (fragment de queue) sur la souris sont copiés en grand nombre afin de pouvoir mettre en



A



B

Figure 6 : A) Représentation schématique des séquences d'ADN avec l'allèle sauvage (murin) pour l'ApoE et l'allèle humain en aval de la néomycine. B) Résultat obtenu lors du génotypage de nos souris sur appareil microfluidique LapChip® 90: souris WT = souris portant l'ApoE murine ; souris WT/KI : souris hétérozygote pour l'ApoE murine et une ApoE humaine ; souris KI/KI : souris homozygote pour l'ApoE humaine.

évidence plus facilement le gène recherché. Le génotypage a été effectué au sein de notre laboratoire via un automate effectuant l'amplification de l'échantillon ainsi que l'analyse sur appareil microfluidique LapChip® 90 plus précis et plus sensible que par gel d'électrophorèse. Afin d'identifier les échantillons, quatre séquences d'amorçages (primers) différentes ont été utilisées permettant ainsi de différencier les souris sauvages, des souris hétérozygotes et homozygotes pour le gène de l'ApoE humaine (cf. Figure 6 B).

III. Conditions d'élevage

Les souris sont élevées en cage hermétiquement closes de type M.I.C.E®, branchées sur un système d'extraction de l'air dans des conditions d'élevage normalisées : nourriture et eau stérilisées ad libitum, cycles jour/nuit de 12h (jour à 7h, nuit à 19h), température de 21-22°C et pression constante (Champy et al., 2004). Les souris sont regroupées par génotype, leur nombre par cage variant de 1 à 4 selon les conditions expérimentales (les animaux stressés étant par exemple seuls).

B. Procédures comportementales

Dans ce projet, nous avons utilisé de nombreux tests comportementaux permettant d'évaluer une large majorité de fonctions ou troubles de fonctions sous-tendues par les systèmes nerveux central et périphérique, incluant l'état général et les fonctions sensorimotrices, les comportements émotionnels ou les capacités cognitives.

I. Évaluation clinique, capacités sensori-motrices et analyse de l'activité nycthémérale

1. Mesure de l'activité circadienne

Comme tous les mammifères, les souris vivent selon un rythme nycthéméral sous le contrôle d'une horloge interne localisée dans le noyau suprachiasmatique. Dans des conditions environnementales stables, il a été démontré que, sur une période de 24 heures, l'activité des souris a lieu principalement la nuit. Ceci est caractérisé par une augmentation de leurs déplacements ainsi que de leurs consommations en eau et nourriture (Heinrichs, 2001; Kopp, 2001). Nous disposons au sein de notre laboratoire d'un équipement nous permettant d'étudier cette activité circadienne et ainsi de mettre en évidence ou non d'éventuelles perturbations du rythme nycthéméral des souris.

L'activité spontanée et la consommation d'eau et de nourriture ont été mesurées dans 24 cages individuelles en plexiglas (22x12x18 cm) placées à l'intérieur d'armoires ventilées ; à raison de trois armoires équipées chacune de huit cages. Des faisceaux infrarouge positionnés à deux hauteurs différentes (2 et 8,5 cm) permettent de mesurer l'activité locomotrice ainsi que de dénombrer les redressements effectués par la souris. Sa consommation de nourriture est évaluée grâce à un distributeur automatique distribuant et comptabilisant des granules de nourriture calibrés de 0,02g un par un (à chaque fois que la souris en prend un, un autre tombe dans la mangeoire). Les granules non consommés tombent dans un tiroir situé sous le plancher et sont comptabilisés en fin d'expérience afin de déterminer la quantité réellement consommée. Sa consommation en eau est quant à elle déterminée grâce à un biberon relié à un capteur électrique. La souris ferme le circuit dès qu'elle boit et le nombre de léchages est ainsi automatiquement comptabilisé.

Le test débute à 11h et dure 32 heures. Il inclut ainsi une période d'habituation de 8h à l'appareillage, puis un cycle complet nuit et jour (12h chacun). L'activité locomotrice, le nombre de redressements ainsi que les consommations en nourriture et en eau sont enregistrés

par périodes de 10 minutes. Les résultats sont ensuite présentés heure par heure pour chacune des phases (habituation, nuit et jour) et pour la totalité des 32 heures.

2. Observations cliniques, ou SHIRPA modifié

Il s'agit ici d'un premier criblage inspiré du test d'Irwin (1968) et du protocole SHIRPA de Hatcher. Il fournit une première vue générale sur l'état de santé des animaux et les réflexes neurologiques de base (Rogers et al., 1997; Crawley, 1999; Rogers et al., 1999; Hatcher et al., 2001; Rogers et al., 2001; Lackner et al., 2006).

Le protocole s'effectue en trois étapes. On commence par peser et prendre la température rectale de la souris, avant de la placer dans un cylindre d'observation de 14 cm de diamètre et 18 cm de hauteur. On note sa posture, son activité spontanée et son apparence physique (états des yeux, du pelage et des vibrisses, tremblements). Dans un deuxième temps, la souris est transférée dans une arène (55 x 33 x 12 cm) dans laquelle sa réactivité immédiate, son activité locomotrice et sa démarche sont examinées. Sa vision est grossièrement évaluée en scrutant sa réponse d'orientation vers un objet (coton-tige) déplacé dans le champ visuel périphérique de la souris. Son audition est testée grâce au réflexe de sursaut en réponse à un stimulus acoustique (90dB et 20kHz), puis sa perception tactile est évaluée en vérifiant sa réaction aux touchers de la cornée et du pavillon de l'oreille. Enfin, la souris est manipulée afin de jauger son agressivité et sa capacité d'orientation (fonction vestibulaire).

3. Test d'agrippement

On mesure ici la force musculaire déployée par une souris grâce à un dynamomètre (Bioseb, France) relié à une petite grille sur laquelle on place la souris qui s'y agrippe avec ses quatre

pattes. On la tire ensuite horizontalement par la queue jusqu'à ce qu'elle lâche prise. Le dynamomètre mesure alors la force maximale déployée par la souris, exprimée en grammes. Trois essais consécutifs sont effectués et moyennés. En plus de cette valeur absolue, on détermine aussi une valeur ajustée de cette force musculaire rapportée au poids de la souris (qui sera alors exprimée en gramme de force par gramme d'animal).

4. Test de réflexe de traction, ou string test

Ce test permet d'évaluer la force de traction, la coordination et aussi de mettre en évidence les éventuels effets sédatifs de substance pharmacologiques (Meziane et al., 1996; Crawley, 1999; Karl et al., 2003). On utilise pour cela un fil métallique tendu à 40 cm de hauteur entre deux parois séparées de 37 cm. La souris est suspendue par les pattes avant au milieu du fil, et on chronomètre le temps mis pour s'accrocher de manière stable avec ses 4 pattes. Si au bout de 60 secondes, la souris n'est pas parvenue à se hisser, on interrompt le test. La souris est alors créditée d'un temps de 60s, de même si elle tombe. Trois essais, séparés d'un intervalle de 10 minutes sont effectués, et leur moyenne est calculée.

5. Test du cylindre rotatif, ou rotarod

Ce test qui nécessite de bonnes capacités proprioceptives et vestibulaires permet d'évaluer la coordination motrice et l'équilibre (Crawley, 1999; Harris et al., 2003). L'appareil est un rotarod automatisé, doté d'un cylindre de 4,5 cm de diamètre permettant de faire passer jusqu'à 5 souris en même temps (Bioseb, France). Chaque souris effectue trois essais avec un intervalle inter-essai de 10 à 15 minutes. Pour chaque essai, la souris est placée sur le rotarod qui accélère progressivement de 4 à 40 tours par minute (tpm) en 5 minutes. Lorsqu'elle tombe du cylindre, elle atterrit sur une bascule interrompant le chronomètre qui lui était

associé. On moyenne ensuite ses trois performances, la latence avant de tomber étant alors utilisée comme indice de la coordination motrice.

6. Tests nociceptifs

Nous avons utilisé trois tests connus pour mettre en jeu différents mécanismes physiologiques afin de déterminer le seuil nociceptif chez la souris : la plaque chauffante, le test du retrait de la queue (ou tail flick) et le test de sensibilité au choc électrique. En effet, le test du retrait de la queue permet de mesurer la douleur spinale, celui de la plaque chauffante la douleur centrale et le choc électrique une sensation désagréable (Mogil et al., 1996; Crawley, 1999; van Gaalen & Steckler, 2000; Karl et al., 2003; Lacroix-Fralish & Mogil, 2009).

Test de la plaque chauffante : la souris est installée dans un cylindre posé sur une plaque chauffant à 52°C (Bioseb, France). Deux essais par animal sont réalisés, séparés d'un intervalle de 5 à 10 minutes. La latence de première réaction de douleur (exprimée par des léchages, secouement des pattes, petit saut,...) est mesurée. Lors du deuxième essai, en plus de la première réaction, la latence de saut est aussi déterminée. Le premier essai dure au maximum 30 s, le second lui ne pouvant pas dépasser les 3 minutes.

Test du retrait de la queue : la souris est placée dans un tube de contention duquel seule la queue dépasse. Elle est ensuite posée sur une plaque pourvue d'une petite tranchée dans laquelle la queue est placée, et au-dessus de laquelle une lampe émet un faisceau lumineux chauffant à 75°C (Panlab, Espagne). La source de chaleur est activée jusqu'à ce que la souris retire sa queue. Un capteur photosensible aligné sur le faisceau et relié à un chronomètre est alors activé et interrompt la mesure du temps, donnant ainsi la latence mise par l'animal pour retirer sa queue. Trois essais séparés par un intervalle inter-essai de 2 à 3 minutes sont

effectués à différents endroits de la queue, puis moyennés. Si au bout de 20 secondes, la souris n'a pas réagi, l'essai est interrompu afin d'éviter d'éventuelles lésions tissulaires.

Test de sensibilité aux chocs électriques : ce test est souvent utilisé en tant que contrôle éprouvant la spécificité des effets observés lors de protocoles utilisant des chocs électriques, tels qu'un conditionnement aversif (conditionnement de peur émotionnelle). Ce test est réalisé dans les mêmes cages que celles utilisées pour le conditionnement pavlovien de peur (cf. partie sur le test de peur conditionnée). La souris est placée dans la cage de conditionnement. Après 30 secondes d'habituation, une série de chocs électriques d'une durée d'une seconde lui sont administrés, avec un intervalle de 30 secondes entre chaque choc, et ses réactions sont notées. Le premier choc est délivré à une intensité de 0,05 mA, puis l'intensité augmente graduellement de 0,05 en 0,05 jusqu'à ce que l'animal manifeste une première réaction (tressaillement des pattes, léchage,...) et/ou une vocalisation. Après cela, l'intensité augmente par tranche de 0,1 mA jusqu'à ce que l'animal saute, sans dépasser les 1 mA en intensité maximale.

7. Susceptibilité aux crises épileptiques

Afin de tester la susceptibilité aux crises épileptiques, nous avons utilisé le pentylenetétrazole (ou PTZ), qui est un antagoniste des récepteurs GABA_A connu pour son pouvoir convulsivant (Maher & Wurtman, 1987; Meldrum, 2002).

Le PTZ est dissous dans du NaCl à 0,9% et injecté par voie intrapéritonéale (i.p.) à la dose de 50 mg.kg⁻¹. Immédiatement après l'injection, la souris est placée dans une boîte en plexiglas et observée pendant au moins 20 minutes. Trois types de crises épileptiques peuvent être observées : myoclonique (petit soubresauts discontinus), clonique (gros spasmes et

convulsions continues) et tonique (raidissement et extension des membres, souvent suivie de la mort). On note la présence ou non de chacune de ces crises, ainsi que la latence de la crise clonico-tonique. Si au bout des 20 minutes, il n'y a pas eu de crises clonique ou tonique, le test est arrêté et une latence de 1200s est attribuée à l'animal.

II. Évaluation de la réactivité des souris dans différentes situations anxiogènes et de stress aigu

1. Test des cages claire/obscur

Ce test nous permet d'évaluer les réactions aversives des souris vis-à-vis d'une cage fortement éclairée opposé à une autre cage sombre. Dans cette situation, les souris ont tendance à passer plus de temps dans la zone sombre et à moins explorer la zone fortement éclairée (van Gaalen & Steckler, 2000; Hascoet et al., 2001; Bourin & Hascoet, 2003; Elizalde et al., 2008). Chacun des quatre appareils automatisés dont nous disposons est composé de deux cages de même taille (20 x 20 x 14cm), l'une sombre et l'autre fortement éclairée à 1700 lux, reliées entre elles par un tunnel opaque (5 x 7 x 10cm) (Immetronic, France). Deux rangées de faisceaux infrarouges quadrillent l'ensemble et sont reliées à un ordinateur via un boîtier d'intégration permettant de mesurer les différents paramètres. La souris est déposée dans la cage sombre et la latence d'entrée ainsi que le temps passé dans la cage fortement éclairée, le nombre de transitions d'une cage à l'autre et le nombre de redressements sont enregistrés sur une durée de 5 minutes.

2. Test du labyrinthe en croix surélevé

Ce test permet d'évaluer l'anxiété vis-à-vis du vide. L'appareil est un labyrinthe en croix surélevé à 66 cm du sol, et dont chacun des quatre bras fait 30 cm de longueur (Imetronic, France). Il est placé dans une pièce éclairée de façon homogène à une intensité de 50 lux. Deux bras se faisant face sont pourvus de parois latérales (bras fermés) et les deux autres bras (perpendiculaires donc aux précédents) en sont eux dépourvus (bras ouverts). La souris ayant peur du vide se réfugie naturellement dans les bras fermés qui lui offrent une plus grande sécurité du fait des parois. Plus une souris est anxieuse, et plus elle va hésiter avant d'explorer un bras ouvert et moins elle va s'y aventurer (Rodgers & Dalvi, 1997; van Gaalen & Steckler, 2000; Karl et al., 2003; Elizalde et al., 2008). Le labyrinthe est équipé de capteurs infrarouges permettant de détecter la position de l'animal et de suivre son activité exploratoire.

La souris est placée au centre du labyrinthe en croix et peut explorer librement l'appareil pendant 5 minutes durant lesquelles le nombre d'entrées dans les bras ouverts et dans les bras fermés, la latence et le temps passé dans les bras ouverts, le nombre de tentatives ainsi que le nombre d'explorations du vide sont comptabilisés.

3. Test du champ ouvert ou open-field

Ce test permet d'évaluer la réaction d'un animal vis-à-vis d'un environnement nouveau et spacieux. Il crée une situation de conflit entre la tendance naturelle de l'animal à explorer ce nouvel environnement et son aversion pour les espaces ouverts. De ce fait, les animaux normaux ont tendance à passer plus de temps dans les coins et la périphérie de l'appareil plutôt que dans le centre, qui est alors considéré comme la zone la plus anxiogène (Crawley, 1999; Palanza, 2001; Karl et al., 2003; Prut & Belzung, 2003; Elizalde et al., 2008).

On dispose de cinq champs ouverts complètement automatisés constitués d'une enceinte carrée (ou arène, de dimensions 45 x 45 x 17cm) en PVC avec un fond noir, des parois latérales et un couvercle transparents (Panlab, Barcelone, Espagne). L'arène est virtuellement subdivisée en deux zones : une périphérique de 8cm de largeur et une centrale couvrant le reste de l'appareil (représentant 40% de la superficie totale). Deux cadres de faisceaux infrarouges permettent de mesurer les mouvements de la souris dans les sens horizontal et vertical. Enfin, les champs ouverts sont éclairés de manière homogène à 150 lux.

Chaque souris est placée à la périphérie de l'appareil, la tête dirigée vers une paroi, et la distance parcourue, le nombre de redressements, ainsi que le temps passé dans les différentes zones sont enregistrés pendant 30 minutes, sans expérimentateur dans la pièce.

4. Test de suspension caudale

Le test de suspension caudale est parmi les tests de dépression les plus utilisés chez les rongeurs, du fait de sa simplicité et de sa rapidité pour l'évaluation des propriétés antidépessives de nouvelles molécules ainsi que pour le phénotypage de souris génétiquement modifiées (Willner, 1997; Cryan et al., 2005). Ce test repose sur le fait qu'une souris suspendue par la queue montre des périodes alternées d'agitation et d'immobilité. En général, les souris se débattent plus en début de test puis finissent par abandonner. La durée d'immobilité est alors considérée comme un indice de résignation. La souris est suspendue par la queue avec du ruban adhésif à un crochet connecté à un détecteur de vibration (MED Associates Inc, Vermont, USA). Le test dure 6 minutes pendant lesquelles la durée d'immobilité est enregistrée par périodes de 2 minutes. La latence de la première phase d'immobilité (au moins 2 secondes consécutives d'immobilité) est également mesurée.

5. Test de la nage forcée, ou test de Porsolt

Le test de la nage forcée est couramment utilisé pour l'évaluation du comportement de résignation. La souris est inévitablement forcée de nager, et, dans cette situation, elle commence alors par se débattre, puis abandonne avant de devenir immobile. L'immobilité reflète alors l'état de résignation qu'on peut associer au « désespoir » : plus une souris est résignée, plus elle va se laisser flotter dans l'eau (Porsolt et al., 1977; Karl et al., 2003; Elizalde et al., 2008). Ce test possède de plus une bonne validité prédictive et est ainsi largement utilisé pour l'évaluation de substances antidépressives. La souris est placée durant 6 minutes dans un bécher de 5L rempli aux deux tiers d'eau à 22-23°C, et la latence de la 1ère immobilisation, ainsi que la durée d'immobilité ou de flottement (i.e. vitesse de déplacement nulle et absence de mouvements des pattes) par périodes de 2 minutes sont mesurées. À l'issue du test, la souris est placée sous une lampe chauffante pendant une dizaine de minutes afin de favoriser sa récupération et son réchauffement.

III. Évaluation de la performance dans différentes tâches d'apprentissage et de mémorisation, et du filtrage sensorimoteur

1. Test d'alternance spontanée dans un labyrinthe en Y

Ce test permet d'évaluer la mémoire de travail qui consiste à retenir à court terme une information et l'utiliser immédiatement pour exprimer un comportement approprié. Il est basé sur la tendance naturelle des rongeurs à explorer un nouvel environnement. Quand l'animal est placé dans le labyrinthe, il explore spontanément le bras le moins récemment visité, et de ce fait, montre un haut degré d'alternance des visites des trois bras. Pour ce faire, il utilise la mémoire de travail qui consiste à mémoriser les bras les plus récemment visités et à

renouveler continuellement cette information (Nagahara & McGaugh, 1992; Holcomb et al., 1999). Cette tâche implique également certains aspects de l'attention, qui peuvent être mesurés en comptabilisant les retours au même bras visité ou au bras adjacents (Wall & Messier, 2002).

L'appareil est un labyrinthe en Y, fabriqué en Plexiglas avec 3 branches identiques (40 x 9 x 16 cm) séparées d'un angle de 120°. Les parois de chaque bras sont décorées d'un motif différent des autres permettant ainsi de les différencier (A, B et C). Pour le test, les animaux sont placés individuellement à l'extrémité d'une branche avec la tête dirigée vers la paroi, leur permettant ainsi d'explorer librement le labyrinthe pendant 5 minutes, avec l'expérimentateur en dehors de la pièce de test. Le nombre de bras visités et la séquence des visites sont recueillis à l'aide d'une caméra placée au-dessus du labyrinthe. Une alternance spontanée est définie comme trois entrées successives dans les trois différents bras du labyrinthe (*e.g.* ABC, CBA...). Le pourcentage d'alternance spontanée (% SPA) est utilisé comme indice de performance de la mémoire de travail des animaux, et est calculé de la façon suivante:

$$\% \text{ de SPA} = 100 \times \frac{\text{Nombre d'alternances réalisées}}{\text{Nombre d'alternances possibles}}$$

Le nombre d'alternances possibles correspond au nombre total des bras visités moins 2. Le pourcentage de retours dans le même bras visité (*e.g.* AAA) et le pourcentage de visites alternées (*e.g.* CBC), ainsi que la latence de sortie du bras de départ sont également enregistrées. Le niveau de hasard de SPA se situe à 22,22%.

2. Test de peur conditionnée

Le test de peur conditionnée, ou « Fear Conditioning », est un test d'apprentissage pavlovien, basé sur l'acquisition d'une association entre un stimulus conditionnel (SC, un son par ex.) et un stimulus inconditionnel (ou SI, un choc électrique) mettant en place des processus mnésique et émotionnel (Owen et al., 1997; Crawley, 1999; van Gaalen & Steckler, 2000; Karl et al., 2003). Après l'apprentissage, le SC ou le contexte spatial induit, en l'absence du SI, un état central de peur reflété par une diminution de l'activité locomotrice ou un manque total d'activité (immobilité ou « freezing »). La durée ou le pourcentage d'immobilité sont utilisés comme mesure de la performance mnésique.

Le dispositif comprend 4 cages de conditionnement opérant (18.5 x 18 x 21.5 cm, Coulbourn Instruments, Allentown, USA) avec des parois latérales en aluminium et des parois frontale et arrière en plexiglas transparent. Le plancher est constitué de barreaux métalliques reliés à un générateur de chocs électriques. Un haut-parleur et une ampoule situés au niveau des parois latérales constituent les sources du stimulus conditionnel (SC) lors du conditionnement et de la rétention. Un système de détection infrarouge placé au plafond permet de mesurer continuellement toute activité de la souris grâce à sa signature thermique par période de 100 ms. Toutes les séances sont contrôlées par un ordinateur qui enregistre également les données. Le protocole comporte 3 phases : le conditionnement (apprentissage de l'association SC-SI), la phase de contexte (mise en évidence d'une association au contexte) et la phase d'indice (mise en évidence de l'apprentissage de l'association SC-SI).

Phase de conditionnement : la souris est amenée au dernier moment dans la salle d'expérimentation et installée dans sa cage. Après 4 minutes d'habituation, le SC (son 75dB et 20kHz) est présenté pendant 20 secondes, et associé à un choc électrique d'une intensité de 0,4 mA pendant la dernière seconde. Deux minutes plus tard, on renouvelle l'association son

et choc, puis la souris est retirée de la cage de conditionnement 2 minutes plus tard. L'activité de l'animal est enregistrée par période de 2 min, lors de l'habituation et après chaque association SC-SI.

Mémoire contextuelle : 24 heures plus tard, chaque souris est remise dans la même cage que lors du conditionnement, mais en l'absence du SC et SI. L'activité de l'animal est enregistrée par tranches de 2 minutes afin de mesurer l'immobilité consécutive à la reconnaissance ou non du contexte spatial.

Mémoire indicée : l'après-midi, les animaux sont placés dans de nouvelles cages qui diffèrent de celles du conditionnement par leurs couleur, odeur et texture. Après deux minutes d'habituation à ce nouvel environnement, le SC est présenté seul pendant deux fois deux minutes, à deux minutes d'intervalle. Les mouvements de l'animal sont enregistrés pour évaluer l'immobilité consécutive à l'association du SC avec le choc électrique.

La performance d'immobilité (freezing) a été déterminée en rapportant l'activité de la souris lors du test au contexte à celle de l'habituation lors du conditionnement dans le cas de la mémoire contextuelle, et à rapporter l'activité lors de la présentation du SC dans un nouveau contexte à celle de l'habituation à ce nouveaux contexte dans le cas de la mémoire indicée.

3. Test de reconnaissance d'objets

Ce test repose sur la tendance naturelle des rongeurs à explorer plus longtemps un objet nouveau par rapport à un objet familier (Ennaceur & Delacour, 1988). Il met en jeu des processus de mémoire à court terme et est également caractérisé par un oubli rapide permettant d'évaluer la mémoire de reconnaissance à différents délais après l'acquisition

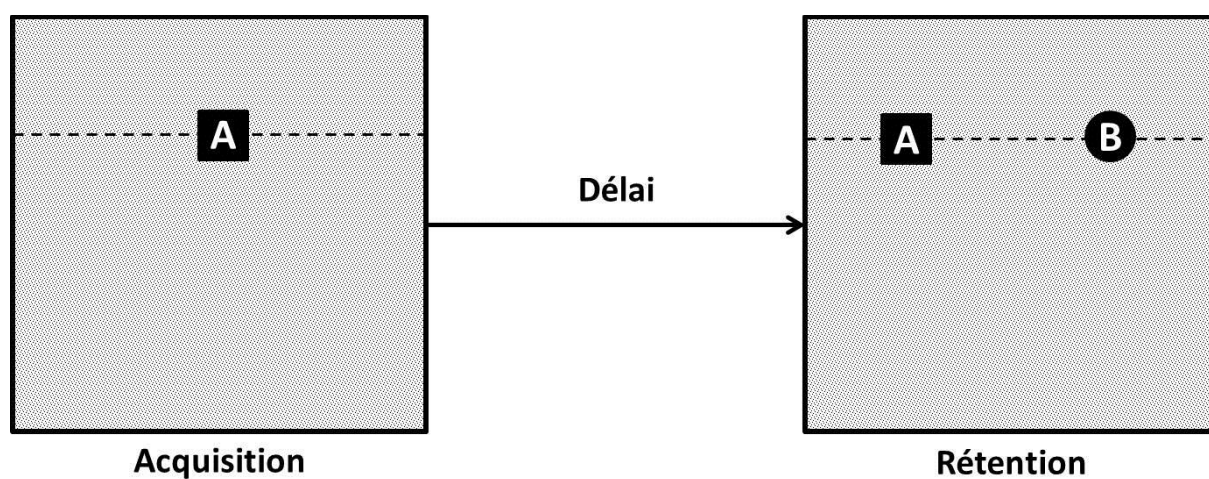


Figure 7 : Schéma représentant le positionnement des objets durant le test de reconnaissance d'objet pour les phases d'acquisition et de rétention. En pointillée, la ligne virtuelle située à 12 cm du mur de l'open field.

(Dodart et al., 1997; Meziane et al., 1998; van Gaalen & Steckler, 2000; Broadbent et al., 2004; Elizalde et al., 2008).

Le test s'est déroulé dans des open-field (cf. tests d'anxiété) éclairés de manière homogène et indirecte à 70 lux. Les objets à discriminer sont une bille en verre de 2,5 cm de diamètre et un dé en plastique de 1,8 cm d'arête. La souris est d'abord habituée à l'open-field pendant 30 min durant lesquelles l'activité locomotrice, le nombre de redressements et les paramètres d'exploration sont enregistrés. Le lendemain, la souris est soumise à un essai d'acquisition durant lequel elle est placée dans l'open-field en présence d'un objet A (bille ou dé) (voir figure 7). L'essai dure 10 min durant lesquelles le temps passé par la souris à explorer l'objet A (t_A), l'activité locomotrice et le nombre de redressements sont enregistrés. Un essai de rétention a lieu 3h ou 24h après l'acquisition. Il est effectué de la même manière que celui d'acquisition, sauf que cette fois deux objets ont été placés dans l'open-field, l'objet A (familier) et un nouvel objet B. L'activité locomotrice, le nombre de redressements et les temps d'exploration de chacun des deux objets sont enregistrés. On considère que l'animal explore lorsqu'il dirige son museau vers l'objet à moins de 1 cm de celui-ci. Un indice de reconnaissance (IR, cf. plus bas) a été défini comme le pourcentage de la durée d'exploration du nouvel objet par rapport à la durée d'exploration totale des deux objets. Un IR de 50% correspond au hasard, et plus cet indice est grand, meilleure est la performance.

$$IR = 100 \times \frac{t_A}{(t_A + t_B)}$$

4. Test du labyrinthe aquatique ou piscine de Morris

Le test de la piscine de Morris est un test de mémoire spatiale. Dans cette situation, la souris doit trouver une plateforme submergée à environ 1 à 2 cm en dessous de la surface de l'eau en utilisant seulement des indices visuels extra-labyrinthe clairsemés sur les murs alentours (Morris, 1984; Hodges, 1996; Owen et al., 1997).

L'appareil est composé d'une piscine circulaire (150 cm de diamètre) remplie d'eau entre 20 et 22°C, et opacifiée avec un liquide blanchâtre inodore et non toxique (Viewpoint). Elle est équipée de 4 plateformes circulaires escamotables de 10 cm de diamètre, dont seule une d'entre elles est utilisée pendant le test, les autres restant abaissées. Un système d'analyse vidéo informatisé (Viewpoint) permet d'enregistrer et d'analyser le trajet parcouru par la souris, et d'en extraire différents paramètres (latence pour atteindre la plateforme, vitesse moyenne, vitesse minimale, vitesse maximale, temps de flottaison, ...). La piscine est placée dans une pièce éclairée de façon homogène et indirecte à 100 lux, et pourvue d'indices placés sur les 4 murs (posters divers, rideau...).

La procédure comporte deux versions : une version indicée et une version spatiale, pouvant être exécutée dans un ordre indifférent. La version indicée ou dite de « la plateforme visible », sert à déterminer s'il n'existe pas de troubles moteurs et visuels chez les souris. Les indices muraux sont décrochés et la position de la plateforme est indiquée via un petit drapeau dépassant à une vingtaine de centimètres de la surface de l'eau. La souris effectue 4 essais par jour sur 2 jours, avec un intervalle inter-essai d'environ 15-20 minutes. À chaque essai, la souris est placée à un des 4 points de départ (Nord-Est, Sud-Est, Nord-Ouest et Sud-Ouest) et est forcée de nager pour atteindre la plateforme visible. Afin d'être sûr qu'elle se focalise sur l'indice de la plateforme et non pas sur un quelconque autre indice spatial, le point de départ et la position de la plateforme changent d'un essai à l'autre. L'essai dure un maximum de 2

minutes, et il est considéré valable si la souris reste au moins 3 secondes consécutives sur la plateforme. Si au bout de 120 secondes elle n'a pas trouvé la plateforme, l'essai est interrompu, puis la souris est guidée jusqu'à la plateforme et créditée d'un temps de 120 secondes. La souris est laissée sur la plateforme pendant 30 secondes, puis est essuyée, remplacée dans sa cage et réchauffée jusqu'à l'essai suivant. Les paramètres mesurés sont la latence et la distance parcourue pour atteindre la plateforme, ainsi que la vitesse moyenne de nage.

La version spatiale permet d'évaluer l'apprentissage spatial proprement dit. La souris doit utiliser seulement les indices extra-labyrinthe pour localiser la plateforme cachée (apprentissage allocentrique). Cette version comporte une phase d'apprentissage durant laquelle les souris sont soumises à 5 jours consécutifs d'entraînement à raison de 4 essais par jour séparés par un intervalle inter-essai de 15-20 minutes, ainsi qu'un essai test une heure après la dernière séance d'apprentissage. Des indices sont placés sur tous les murs de la pièce, la position de la plateforme reste au même endroit (NE, NO, SE ou SO) tout au long de l'apprentissage pour une souris donnée ; seul le point de départ de la souris change à chaque essai. La position de la plateforme est randomisée au sein de chaque groupe afin d'éviter ou neutraliser toute éventuelle préférence. Pour chaque essai, la souris est placée au point de départ préalablement défini ; la latence, la distance ainsi que la vitesse de la nage pour atteindre la plateforme sont mesurés. Comme pour la version indicée, l'essai dure au maximum 120 secondes et l'essai est validé si la souris reste au moins 3 secondes consécutives sur la plateforme. Si au bout des 2 minutes elle n'a pas trouvé la plateforme, l'essai est interrompu, la souris est guidée jusqu'à la plateforme et créditée d'un temps de 120 secondes. La souris est laissée pendant 30 secondes sur la plateforme afin qu'elle observe et

mémorise sa position par rapport aux indices muraux, puis essuyée, transférée dans sa cage et réchauffée.

Enfin, une heure après la fin de l'entraînement, les souris sont soumises à un essai test. Celui-ci permet d'évaluer le niveau d'apprentissage. L'essai test s'effectue dans les mêmes conditions que la phase d'entraînement sauf que la plateforme cible est rabaissée. La souris est placée au point de départ préalablement défini, et est forcée de nager durant 120 secondes, en l'absence de la plateforme. Puis, elle est replacée dans sa cage et séchée sous une lampe chauffante pendant 5 minutes. La piscine est virtuellement subdivisée en 4 quadrants égaux : celui où se trouvait la plateforme apprise constitue le quadrant cible, les quadrants adjacents à droite et à gauche, et le quadrant opposé. La performance est évaluée par la préférence pour le quadrant cible, ainsi que par le nombre de fois où la souris traverse l'emplacement théorique de la plateforme. Plus la souris passe de temps dans le quadrant cible et coupe l'emplacement théorique de la plateforme, plus cela montre une bonne mémorisation de la localisation de la plateforme.

5. Filtrage sensorimoteur : test du réflexe de sursaut (RS) et d'inhibition du réflexe de sursaut (IRS)

Le test de réflexe de sursaut (RS) est l'un des plus usités en laboratoire pour l'analyse des fonctions sensorimotrices chez le rongeur. Il consiste à analyser la réponse de sursaut à différents stimuli et permet ainsi de mettre en évidence d'éventuels troubles moteurs ou encore d'anxiété (Davis, 1980; Crawley, 1999; Yeomans et al., 2002). L'inhibition du réflexe de sursaut (IRS) est la réduction normale du RS pour un stimulus intense (acoustique dans le cadre de notre étude) lorsque celui-ci est précédé immédiatement d'un stimulus n'induisant

pas de sursaut. L'IRS permet ainsi de mesurer le filtrage sensorimoteur qui reflète l'habilité d'un animal à adapter sa réponse comportementale face à des informations sensorielles successives (Paylor & Crawley, 1997; Swerdlow et al., 1999; Karl et al., 2003). Des déficits de l'IRS sont mis en évidence dans de nombreux troubles psychiatriques, tels que la schizophrénie, les troubles obsessionnels compulsifs ou encore le syndrome de Tourette (Swerdlow & Geyer, 1998; Braff et al., 2001; Ouagazzal et al., 2001; Powell et al., 2009).

Les souris sont testées dans 8 cages indépendantes ventilées et insonorisées (San Diego Instruments, USA). Chaque souris est placée dans un cylindre de contention en plexiglas transparent (8 cm de long sur 5 cm de diamètre), équipé d'un détecteur de mouvements qui permet de mesurer l'amplitude des sursauts de l'animal. Un haut-parleur situé au plafond de chaque cage permet de générer un bruit de fond et d'envoyer les divers stimuli acoustiques aux différentes intensités. Ces stimuli acoustiques sont des sons « blancs », possédant un large spectre de fréquence. Le RS et l'IRS sont mesurés au cours d'une seule et même séance. La séance commence par 5 minutes d'habituation durant lesquelles seul le bruit de fond (65 dB) est présenté, puis les animaux sont soumis à 10 catégories d'essais : le stimulus sursautant seul (110 dB, durée 10ms, noté ST 110), 8 types d'essais pour lesquels des stimuli acoustiques de 70, 80, 85 et 90 dB (durée 10 ms) sont présentés seuls (prépulse) ou précédant de 50 ms le stimulus sursautant (prépulse-pulse ou PP) et enfin la présentation du bruit de fond seul afin de mesurer la réponse de base dans le cylindre. Après l'habituation le test débute par 5 présentations du stimulus sursautant non prises en compte dans l'analyse, puis chaque type d'essai est présenté 10 fois de manière aléatoire avec un intervalle inter-essai de 25 ± 5 sec. La mesure de l'amplitude du sursaut est effectuée par tranches d'1 ms pendant 65 ms à partir de la présentation du stimulus acoustique, les données étant digitalisées et

enregistrées sur un ordinateur. Le pourcentage d'inhibition du réflexe de sursaut est calculé ensuite par la formule suivante :

$$\% d'inhibition du sursaut = 100 \times \frac{(Sursaut ST 110) - (Sursaut PP X)}{Sursaut ST 110}$$

C. Protocole de stress chronique et imprévisible

Le protocole de stress s'inspire des travaux de Willner et de ceux de Moreau (Willner et al., 1987; Papp et al., 1991; Moreau et al., 1992; Moreau et al., 1993; Willner, 1997). Notre procédure de stress s'étale sur 4 semaines et comporte différents type d'événements stressants. Elle est décrite plus en détail dans la deuxième partie des résultats de cette thèse (article 1), destinée à étudier l'impact d'un stress chronique et le polymorphisme de l'ApoE dans les processus émotionnels et mnésiques.

D. Protocole d'évaluation de la neurogénèse par cytométrie de flux

Ce test permet de quantifier le niveau de prolifération neuronal au niveau de l'hippocampe, grâce à l'utilisation d'un analogue de la thymidine, le bromodésoxyuridine (ou BrdU). Le protocole utilise une technique de comptage cellulaire par cytométrie de flux dont les détails sont décrits dans la troisième partie de cette thèse (article 2).

E. Analyses Statistiques

Les résultats sont exprimés en valeur moyenne standard $\pm$ erreur standard à la moyenne (ou SEM). Les comparaisons entre les différents génotypes pour les paramètres non évolutifs ont été faites grâce au test t de Student ou à l'analyse de la variance (ANOVA). Pour les paramètres évolutifs, une analyse globale des données a été effectuée grâce à une ANOVA à mesures répétées avec un facteur intergroupes (génotype) et des facteurs intragroupes (évolution dans le temps, quadrants dans le test de la piscine,...). Enfin, pour les données qualitatives, nous avons effectué un test de Chi 2 (ou table de contingence). Les comparaisons des groupes deux à deux ont été faites à l'aide du test PLSD de Fisher. Dans le test de reconnaissance d'objets, les comparaisons par rapport au hasard ont été faites à l'aide du test t pour un groupe, celles entre les objets nouveau et familier à l'aide de test t de Student pour échantillons appariés. Un résultat est considéré comme significatif lorsque $p \leq 0,05$, et considéré comme une tendance lorsque $0,05 < p \leq 0,10$.

RÉSULTATS

Comme nous l'avons signalé à la fin de l'introduction, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à caractériser les différences comportementales liées au polymorphisme de l'ApoE chez la souris. Pour cela, des souris mutantes porteuses de l'allèle humain ApoE2, ApoE3 ou ApoE4, ont été analysées dans différents tests permettant l'évaluation d'une large majorité de fonctions sous-tendues par les systèmes nerveux central et périphérique. Les effets de ces mutations par elles-mêmes ont été évalués, aussi bien chez les mâles que chez les femelles, à l'âge adulte pour les souris ApoE2 et ApoE3, et à l'âge adulte et à un an et demi (souris âgées) pour les souris ApoE4. Les résultats de cette étude seront présentés dans la première partie de ce chapitre.

À l'issue de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'impact combiné d'un stress chronique et du polymorphisme de l'ApoE sur les processus émotionnels et cognitifs. Les résultats de cette étude seront présentés dans la 2^{ème} partie de ce chapitre (article 1).

Enfin, nous avons complété ce travail par une étude cellulaire pour évaluer l'impact du polymorphisme de l'ApoE, en fonction de l'âge et selon le sexe, sur la neurogénèse hippocampique. Les résultats de cette étude seront présentés dans la 3^{ème} partie de ce chapitre (article 2).

**Première partie : Phénotypage
comportemental des souris ApoE2,
ApoE3 et ApoE4**

Pour des raisons de commodité, nous allons présenter les données relatives aux effets des différentes mutations séparément.

A. Phénotypage comportemental des souris ApoE2 mâles et femelles adultes

Pour chacun des deux sexes, 3 groupes de souris âgées de 5-6 mois ont été utilisées. Un groupe WT, un groupe hétérozygote pour la mutation ApoE2 (ApoE2-WT/KI) et groupe homozygote pour la mutation ApoE2 (ApoE2-KI) (n=7-10 animaux par groupe et par sexe).

I. Effets de la mutation ApoE2-KI sur l'état général, l'activité circadienne et les capacités sensorimotrices

1. Activité circadienne

L'activité spontanée et la consommation d'eau et de nourriture ont été mesurées sur une période de 32 h incluant un cycle complet jour/nuit. Les courbes représentant l'évolution de ces activités montrent la présence de trois phases, l'habituation, la phase nocturne et la phase diurne (Fig. 8 et 9).

Chez les mâles, les groupes WT et ApoE2 montrent un niveau d'activité locomotrice élevé durant la première heure de test correspondant à la phase initiale d'exploration, bien connue pour mettre en cause la réactivité émotionnelle dans un nouvel environnement, puis l'activité locomotrice décroît progressivement et significativement jusque vers la fin de cette phase [$F(6,144)=62.73$, $p<0.001$] (Fig. 8A). Par ailleurs, le profil et niveau d'activité locomotrice

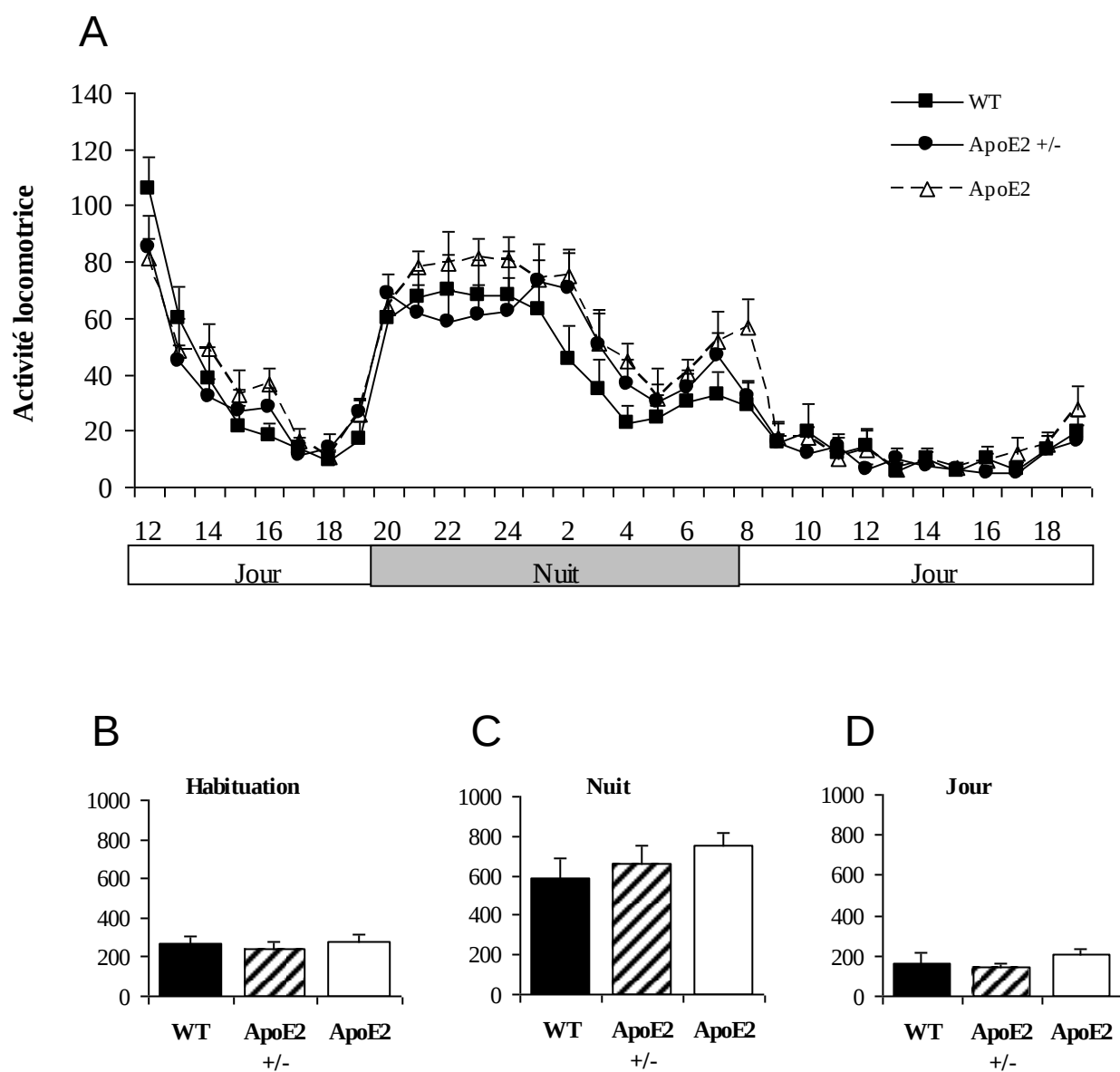


Figure 8: Activité locomotrice lors d'un cycle complet chez les souris ApoE2 mâles. A) Évolution de l'activité locomotrice lors des 32h de test ; B) Activité totale lors de l'habituation ; C) Activité totale lors de la phase nocturne ; D) Activité totale lors de la phase diurne.

sont comparables entre les souris WT et les souris ApoE2 mâles [$F(2,24)=0.20$, NS] (Fig. 8A, B). Dès le début de la phase nocturne, l'activité locomotrice augmente chez les 3 groupes qui montrent une activité intense durant cette phase. Cette phase est caractérisée par la présence de 2 pics d'activité, puis celle-ci diminue pour atteindre un niveau bas et constant durant la phase diurne. Par ailleurs, aucune différence n'a été observée entre les 3 génotypes, ni durant la phase nocturne [$F(2,24) = 0.76$, NS], ni durant la phase diurne [$F(2,24) = 0.49$, NS] (Fig. 8A, C, D). La courbe représentant l'évolution de l'activité verticale (nombre de redressements) pour chacun des 3 groupes présente la même allure que celle de l'activité locomotrice, avec un nombre de redressements élevé pendant la phase nocturne et réduit pendant la phase diurne (Fig. 9A). Par ailleurs, le nombre de redressements est comparable entre les WT et les souris ApoE2 mâles adultes pendant la phase d'habituation et la phase diurne [$F(2,24) \leq 0.43$, NS] (Fig. 9A, B, D). Lors de la phase nocturne, les souris ApoE2-KI mâles manifestent une légère augmentation de l'activité verticale, mais la différence entre les génotypes n'est pas significative [$F(2,24)=2.15$, NS] (Fig. 9A, C).

Chez les femelles, les courbes représentant l'activité locomotrice, le nombre de redressement et les consommations d'eau et de nourriture ont des profils d'évolution comparables à ceux des mâles avec la présence des 3 phases caractéristiques, l'habituation, la phase nocturne avec un niveau d'activité élevé et la phase diurne avec le niveau d'activité le plus faible. L'observation des graphiques représentant l'activité locomotrice (Fig. 10 A, B, et C) montre que les souris ApoE2+/- sont légèrement moins actives que les contrôles durant la phase nocturne. Toutefois, l'analyse statistique n'a révélé aucune différence significative entre les génotypes, ni pour l'activité totale, ni pour celles des différentes phases du cycle [$F(2,21) \leq$

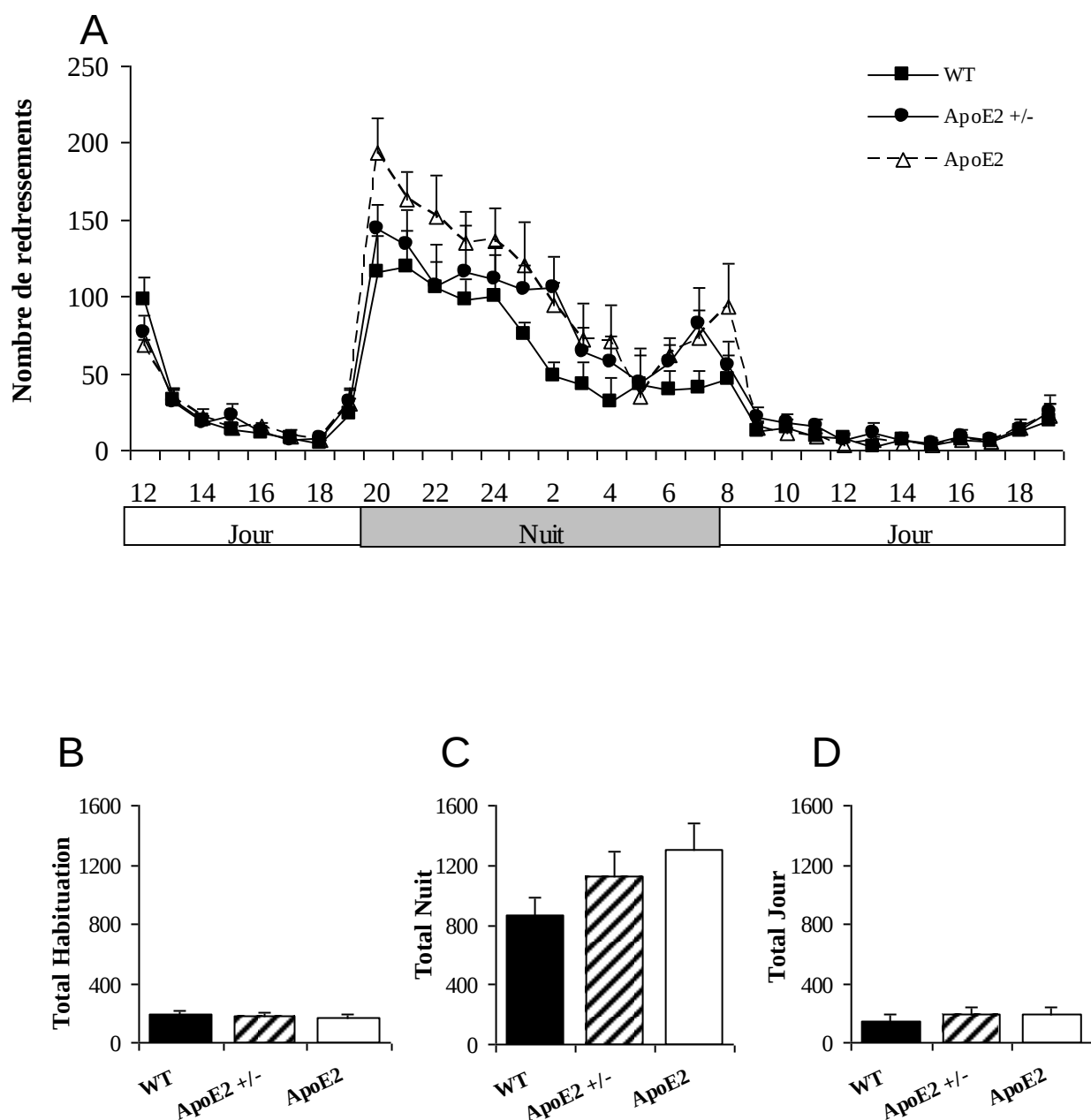


Figure 9: Activité verticale (nombre de redressements lors d'un cycle complet chez les souris apoE2 mâles. A) Évolution du nombre de redressements lors des 32h de test ; B) Nombre de redressements lors de l'habituation ; C) Nombre de redressements lors de la phase nocturne ; D) Nombre de redressements lors de la phase diurne.

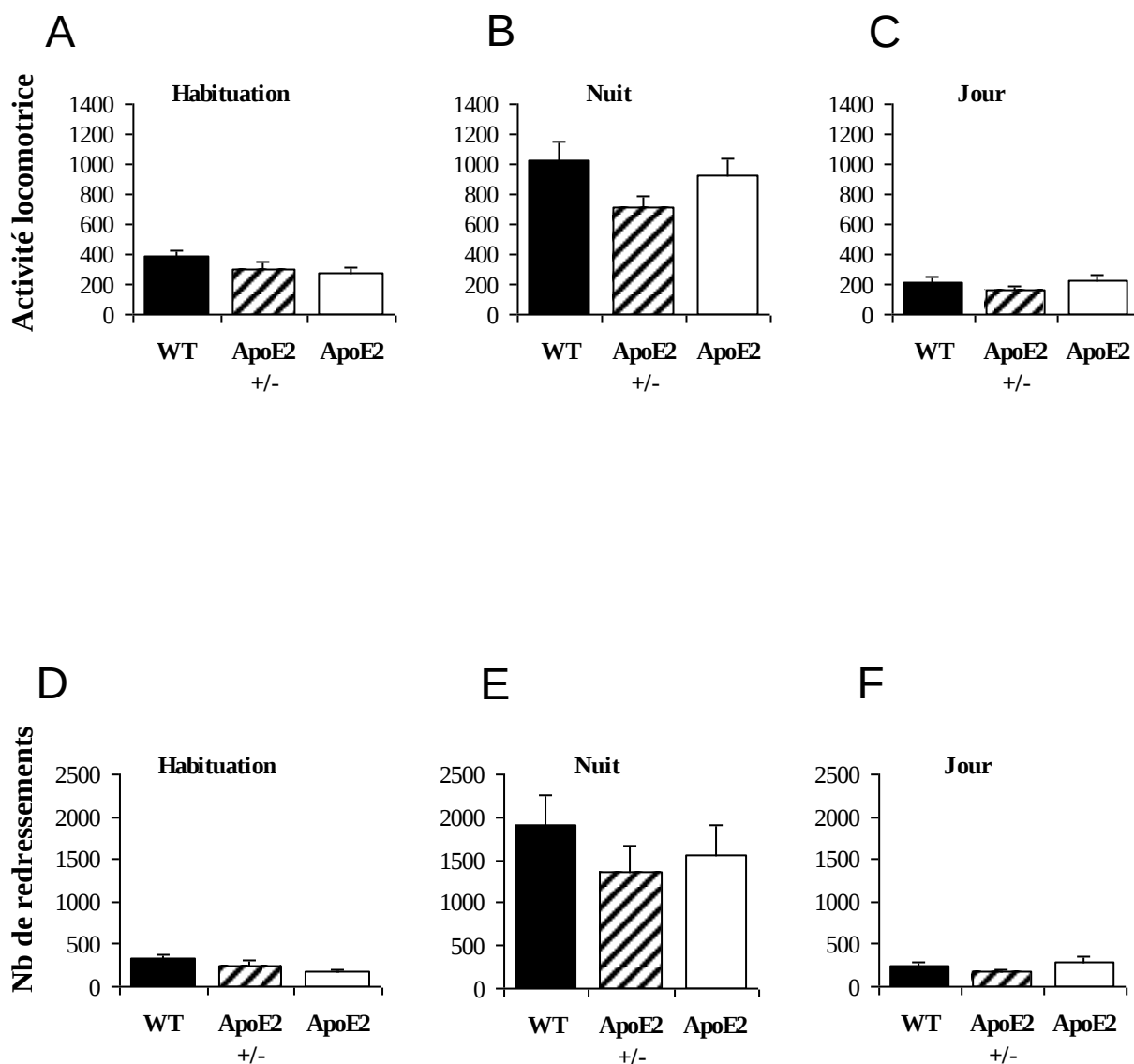
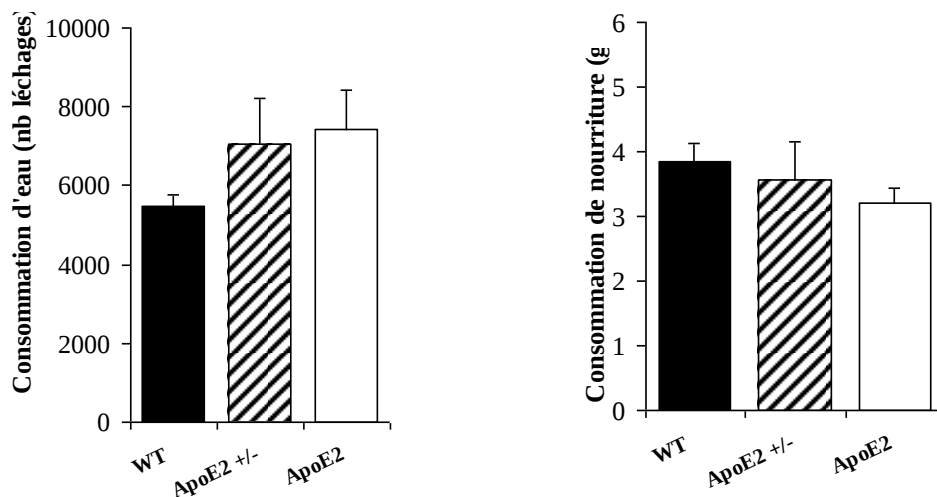


Figure 10: Activité locomotrice (A, B et C) et nombre de redressements (D, E et F) chez les souris ApoE2 femelles. A et D) lors de l'habituation ; B et E) lors de la phase nocturne ; C et F) lors de la phase diurne.

Mâles



Femelles

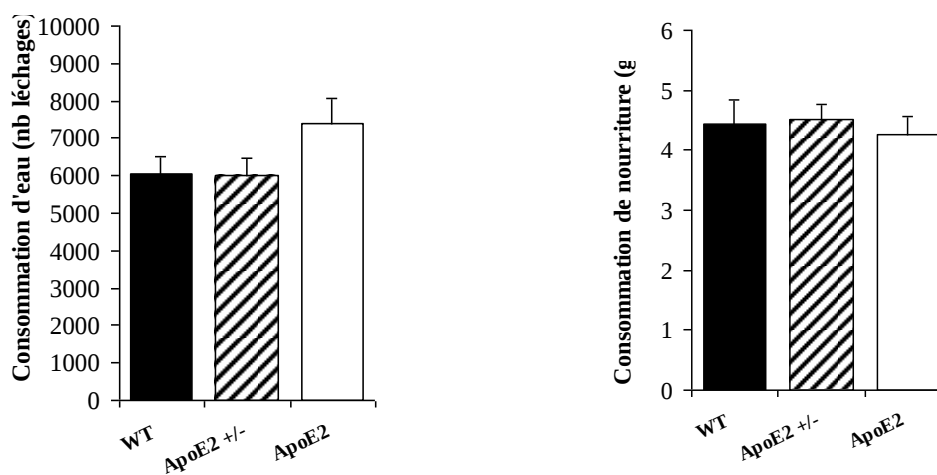


Figure 11: Consommation d'eau et de nourriture chez les souris ApoE2 mâles et femelles

2.30, NS]. Il en est de même pour le nombre de redressements [$F(2,21) \leq 1.58$, NS] (Fig. 10 D, E et F).

Enfin, la consommation d'eau est légèrement plus élevée chez les souris ApoE2 homozygotes mâles et femelles, mais la différence entre les génotypes n'est pas significative ($F(2,21)=2.1$, NS). La consommation de nourriture est comparable entre les génotypes (Fig. 11).

En conclusion, les résultats de cette expérience montrent que l'habituatation à un nouvel environnement et le rythme circadien ne sont pas affectés chez les souris ApoE2 hétérozygotes et homozygotes mâles et femelles adultes. Les souris ApoE2 mâles et femelles adultes ont également un niveau d'activité spontanée et des consommations d'eau et de nourriture comparable à ceux des animaux contrôles.

2. Évaluation de l'état général et des fonctions sensori-motrices :

Observations cliniques et capacités motrices

Chez les mâles, mais pas chez les femelles, les souris ApoE2 homozygotes et hétérozygotes ont une température rectale significativement supérieure à celle des souris WT [Mâle : $F(2,24) = 4.24$, $p < 0.05$, Fisher $p < 0.05$, vs WT ; Femelles $F(2,21)=1.67$, NS] (Tableau 2), mais celle-ci reste dans les normes physiologiques. Par ailleurs, les souris ApoE2 mâles et femelles ont un poids comparable à celui des animaux WT [Mâles : $F(2,24) = 1.13$, NS ; Femelles : $F(2,21)=0.52$, NS], et ne présentent aucune anomalie apparente ni en ce qui concerne l'aspect physique général ni en ce qui concerne les capacités sensorielles ou vestibulaires. L'évaluation des capacités motrices spécifiques a montré que la force d'agrippement, la latence avant de rattraper le fil dans le test du réflexe de traction, et le temps de maintien

A

	Wild-type	ApoE2 +/-	ApoE2
Poids corporel (g)	28.5 ± 1.2	30.4 ± 0.8	29.1 ± 0.8
Température rectale (°C)	37.0 ± 0.3	37.7 ± 0.2 *	37.9 ± 0.3 *
Rotarod accéléré (s)	142.2 ± 16.6	130.6 ± 18.2	140.8 ± 11.1
Réflexe de traction (s)	18.7 ± 7.5	9.8 ± 6.4	11.3 ± 7.0
Force d'agrippement	8.6 ± 0.4	8.1 ± 0.3	8.8 ± 0.3

B

	Wild-type	ApoE2 +/-	ApoE2
Poids corporel (g)	21.2 ± 0.7	22.0 ± 0.5	21.9 ± 0.8
Température rectale (°C)	36.3 ± 0.3	36.8 ± 0.2	36.8 ± 0.1
Rotarod accéléré (s)	206.9 ± 22.7	169.0 ± 14.3	196.5 ± 23.8
Réflexe de traction (s)	1.9 ± 0.2	1.6 ± 0.1	2.7 ± 0.6
Force d'agrippement	9.9 ± 0.3	9.7 ± 0.7	9.9 ± 0.2

Tableau 2: État général et capacités motrices chez les ApoE2 mâles (A) et femelles (B).

* p<0.05 vs. WT, test de Fisher

sur le rotarod sont comparables entre les génotypes aussi bien pour les mâles [$F(2,24) \leq 1.47$, NS] que pour les femelles [$F(2,21) \leq 2.66$, NS] (Tableau 2), montrant que la force musculaire et la coordination motrice ne sont pas affectées chez les souris ApoE2 adultes.

Sensibilité à la douleur

Aussi bien dans le test de retrait de la queue (tail flick) que celui de la plaque chauffante, la latence de la première réaction à un stimulus douloureux de haute température est comparable entre les génotypes aussi bien chez les mâles que chez les femelles [Mâles : $F(2,24) \leq 0.07$, NS ; Femelles : $F(2,21) \leq 1.41$, NS] (Tableau 3). D'autre part, lorsqu'on prolonge le test de la plaque chauffante, les souris ApoE2-KI mâles (homozygotes) manifestent des latences de saut supérieures à celles des animaux WT [$F(2,24) = 2.93$, $p = 0.08$, Fisher $p < 0.05$ ApoE-KI vs WT] (Tableau 3). Par ailleurs, le seuil de sensibilité aux chocs électriques n'est pas affecté chez les souris ApoE2 quel que soit le genre; l'intensité minimale de choc induisant le secouement de la patte, la vocalisation ou le saut est comparable entre les génotypes [Mâles : $F(2,24) \leq 0.93$, NS ; Femelles : $F(2,21) \leq 0.23$, NS] (Tableau 3).

Conclusion

Les résultats de ces expériences montrent que les souris ApoE2 homozygotes et hétérozygotes mâles ont une température corporelle supérieure à celles des animaux contrôles mais qui reste dans les normes physiologiques. En dehors de cela, l'état de santé général, les réflexes neurologiques de base, les capacités motrices spécifiques et la sensibilité à la douleur ne sont pas affectés chez les souris ApoE2 mâles et femelles.

A

		Wild-type	ApoE2 +/-	ApoE2
Tail Flick (s)		5.0 ± 0.5	4.8 ± 0.4	4.9 ± 0.3
Plaque Chauffante (s)	Première réaction	10.4 ± 0.7	10.5 ± 0.5	10.3 ± 0.7
	Saut	105.4 ± 11.4	102.6 ± 7.4	136.9 ± 12.9 *
Seuil de sensibilité au choc électrique (mA)	Secouement	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00
	Vocalisation	0.20 ± 0.05	0.25 ± 0.06	0.15 ± 0.04
	Saut	0.45 ± 0.07	0.49 ± 0.09	0.35 ± 0.08

B

		Wild-type	ApoE2 +/-	ApoE2
Tail Flick (s)		4.7 ± 0.2	4.1 ± 0.3	4.2 ± 0.4
Plaque Chauffante (s)	Première réaction	10.7 ± 1.0	12.0 ± 1.1	10.9 ± 0.6
	Saut	147.4 ± 11.7	142.3 ± 10.6	146.1 ± 13.2
Seuil de sensibilité au choc électrique (mA)	Secouement	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00
	Vocalisation	0.12 ± 0.02	0.15 ± 0.03	0.13 ± 0.03
	Saut	0.43 ± 0.10	0.54 ± 0.12	0.49 ± 0.14

Tableau 3: Sensibilité à la douleur chez les ApoE2 mâles (A) et femelles (B). * $p < 0.05$, vs WT, test de Fisher.

II. Effets de la mutation ApoE2-KI sur la réactivité émotionnelle dans différentes situations anxiogènes et de stress aigu

1. Test du champ ouvert ou open-field

Concernant l'activité locomotrice chez les souris mâles (Fig. 12A), les 3 groupes présentent un pic d'activité au début de la séance correspondant à l'exploration, puis le niveau d'activité diminue au fur et à mesure que le test progresse et tend à se stabiliser à la fin de la période exploratoire reflétant l'habituation. L'activité locomotrice globale est comparable entre les génotypes [$F(2,24)=1.99$, NS], mais évolue différemment en fonction des génotypes [Interaction Génotype X Temps : $F(10,120)=3.15$, $p<0.01$] ; l'activité locomotrice reste plus élevée au fil du temps chez les souris ApoE2 homozygotes par comparaison aux WT, suggérant un retard d'habituation chez les ApoE2 homozygotes mâles. Le nombre de redressement est comparable entre les génotypes [$F(2,24)=0.08$, NS], bien que les souris ApoE2 hétérozygotes et homozygotes tendent à avoir une activité verticale réduite en début de séance ($p=0.07$) (Fig. 12B). Le pourcentage global de temps passé dans le centre diffère significativement entre les génotypes [$F(2,24)=7.66$, $p<0.01$]. En effet, les souris ApoE2 homozygotes mâles passent plus de temps dans le centre que les souris WT ($p<0.01$ SNK), particulièrement au fur et à mesure que le test progresse (Fig. 12C). Le nombre d'entrées dans le centre est également plus élevé chez les souris ApoE2 homozygotes mâles que chez les WT [$F(2,24)=4.20$, $p<0.05$] (Tableau 4). Ceci suggère que les souris ApoE2 homozygotes mâles seraient moins anxieuses.

Aussi chez les femelles, l'activité locomotrice décroît au fil du temps chez les trois génotypes

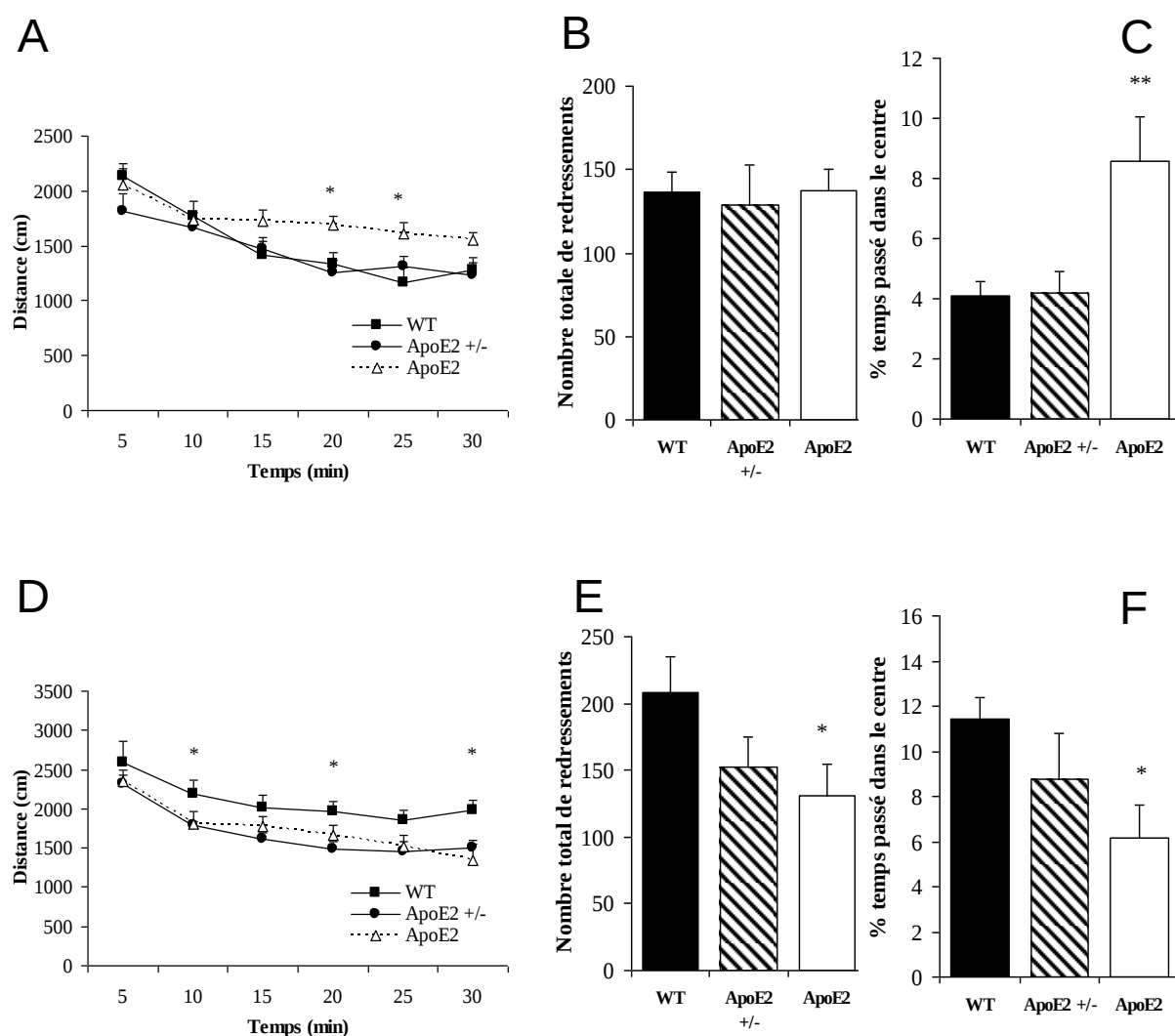


Figure 12: Activité locomotrice (A et D), nombre de redressements (B et E), et pourcentage de temps passé dans le centre (C et F) de l'open-field chez les souris ApoE2 mâles et femelles.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs WT, test de Fisher.

	Wild-type	ApoE2+/-	ApoE2
Mâles	56.5 ± 5.8	51.3 ± 8.7	83.6 ± 10.3 *
Femelles	124.0 ± 13.1	93.4 ± 16.3	77.3 ± 13.3 *

Tableau 4: Nombre d'entrées dans le centre de l'open-field chez les souris ApoE2 mâles et femelles). * $p < 0.05$, vs WT, test de Fisher.

[$F(5,105)=42.77$, $p<0.001$; interaction Génotype X Temps : $F(10,105)=1.00$, NS]. D'autre part, il y a un effet significatif du génotype [$F(2,21)=3.51$, $p<0.05$] ; les souris ApoE2 homozygotes et hétérozygotes étant significativement moins actives que les WT ($p<0.05$ SNK) (Fig. 12D). Le nombre de redressements tend à être plus faible chez les souris ApoE2 homozygotes et hétérozygotes [$F(2,21)=2.53$, $p=0.10$; $p<0.05$ Homozygotes vs WT Fischer]. Le nombre d'entrées et le pourcentage de temps passé dans le centre de l'open-field tendent à différer entre les génotypes [$F(2,21)=2.52$, $p=0.10$] ; les souris ApoE2 homozygotes passant globalement moins de temps dans le centre que les souris WT ($p<0.05$, Fischer).

En conclusion, les souris ApoE2 (homozygotes) mâles présenteraient un retard d'habituation, alors que les ApoE2 femelles homozygotes et hétérozygotes seraient moins actives que les WT. En plus de cela les souris ApoE2 homozygotes mâles explorent plus le centre, et les ApoE2 homozygotes femelles moins, ce qui laisserait penser que la mutation ApoE2 chez les mâles aurait des effets anxiolytiques et chez les femelles des effets anxiogéniques. Toutefois, ces effets pourraient aussi être liés aux effets sur l'activité exploratoire.

2. Test du labyrinthe en croix surélevé

Chez les mâles, aucune différence n'a été observée entre les génotypes concernant le pourcentage d'entrées (Fig. 13A), le pourcentage de temps et le nombre d'explorations du vide (Fig. 13B) dans les bras ouverts [$F(2,24)\leq 0.81$, NS]. Le nombre d'entrées dans les bras fermés et le nombre de redressements sont également comparables entre les génotypes [$F(2,24)\leq 2.41$, NS] (données non présentées). Il en est de même pour les femelles ; aucune différence n'a été détectée entre les génotypes pour l'ensemble des paramètres mesurés dans ce test (Fig. 13 D et 13 E).

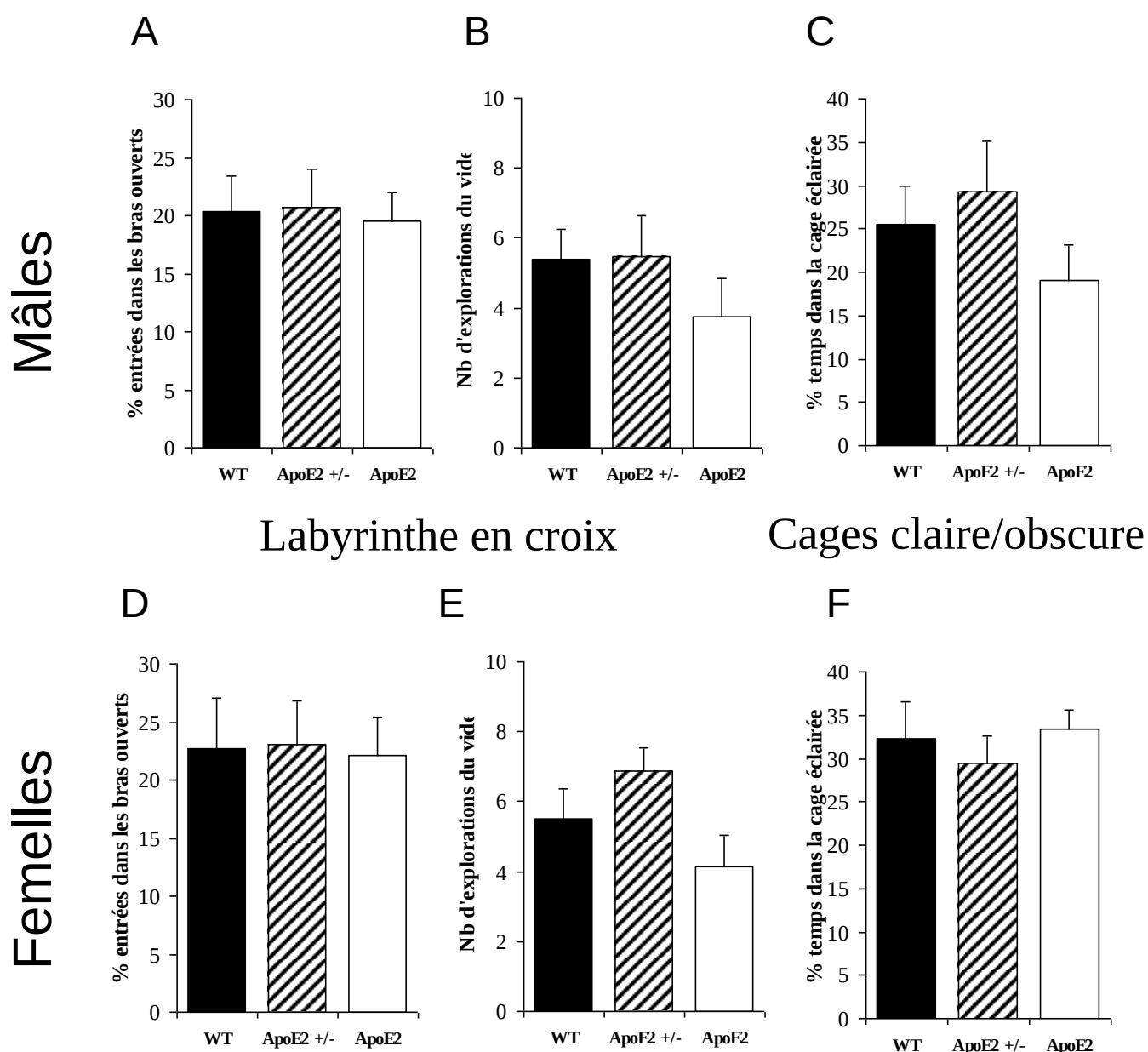


Figure 13: Pourcentage d'entrées dans les bras ouverts (A et D) et nombre d'explorations du vide (B et E) dans le test du labyrinthe en croix surélevé. Pourcentage de temps passé dans la cage éclairée dans le test des cages claire/obscur (C et F) chez les mâles et femelles.

Les résultats de ces expériences montrent que la mutation ApoE2-KI n'affecte pas l'anxiété dans le test du labyrinthe en croix surélevé, ni chez les mâles ni chez les femelles.

3. Test des cages claire/obscur

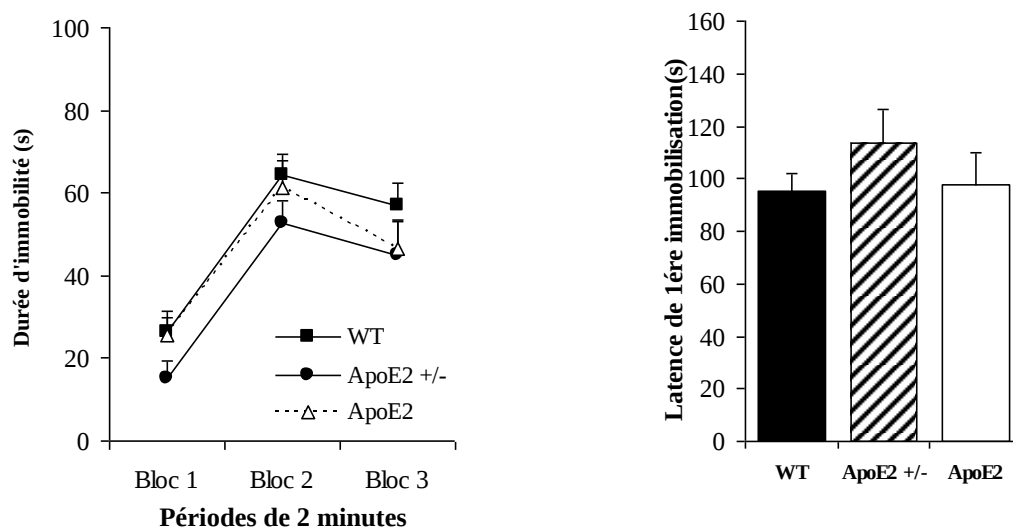
Dans le test des cages claire/obscur (Fig. 13), aucune différence n'a été observée entre les souris WT et les ApoE2 concernant le pourcentage de temps passé dans la cage éclairée (Fig. 13C et 13F), la latence d'entrée dans la cage éclairée et le nombre de transitions entre la cage obscure et celle éclairée, et ceci aussi bien chez les mâles que chez les femelles, [Mâles : $F(2,24) \leq 1.01$, NS ; Femelles : $F(2,21) \leq 0.96$, NS].

Ces résultats montrent que la mutation ApoE2-KI n'affecte pas l'anxiété dans ce test.

4. Test de suspension caudale

La figure 14 résume les résultats obtenus dans ce test. On peut constater que la durée d'immobilité est faible lors des 2 premières minutes du test et augmente significativement au fil du temps [Mâles : $F(2,48)=61.14$, $p<0.001$; Femelles : $F(2,42)=123.15$, $p<0.001$], montrant que les souris commencent d'abord par se débattre, puis rentrent progressivement dans une phase de résignation. D'autre part, le profil d'immobilité est comparable entre les génotypes quel que soit le sexe [Mâles : $F(2,24)=1.66$, NS ; Femelles : $F(2,21)=0.22$, NS]. De même, il n'y a pas de différence entre les souris WT et les ApoE2 concernant la latence de la première immobilisation [Mâles : $F(2,24)=0.91$, NS ; Femelles : $F(2,21)=1.31$, NS]. Ces résultats montrent que la mutation ApoE2-KI n'affecte pas non plus la susceptibilité à la résignation chez les souris adultes.

Mâles



Femelles

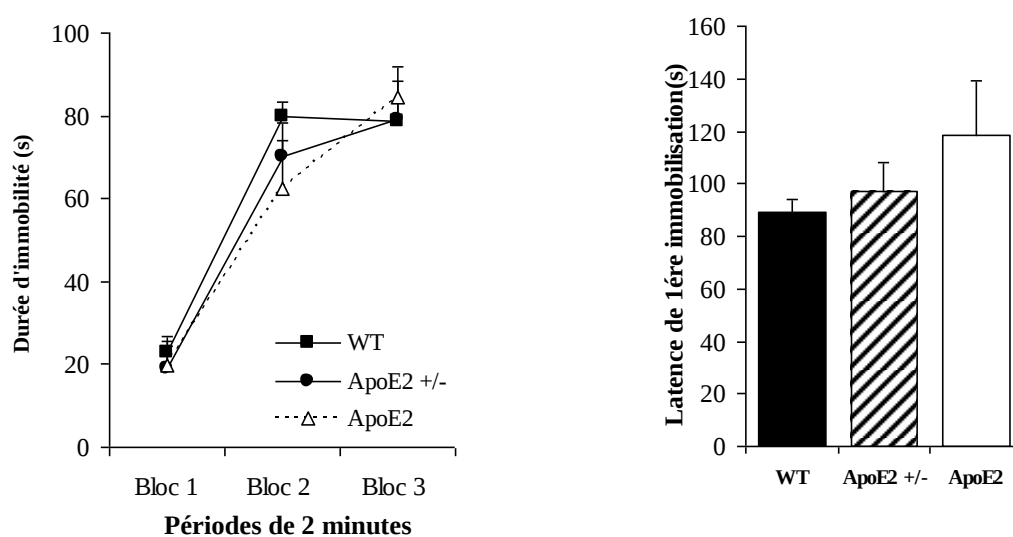


Figure 14: Durée d'immobilité et latence de la première immobilisation dans le test de suspension caudale chez les souris ApoE2 mâles et femelles.

III. Effets de la mutation ApoE2-KI sur les fonctions cognitives

1. Filtrage sensorimoteur : RS et IRS

La figure 15 montre l'amplitude du sursaut et le pourcentage d'IRS en fonction de l'intensité du stimulus acoustique. La réactivité de sursaut aux stimuli de faible intensité (prépulses) augmente avec l'intensité du stimulus (65-90 dB), mais reste faible dans son ensemble. Par ailleurs, il n'y a pas de différence entre les génotypes aussi bien chez les mâles que chez les femelles [Mâles : $F(2,24)=1.26$, NS ; Femelles : $F(2,21)=0.16$, NS]. D'autre part, l'amplitude de sursaut à un stimulus soudain de forte intensité tend à être plus faible chez les souris ApoE2 mâles, mais pas chez les femelles [Mâles : $F(2,24)=2.54$, $p=0.10$; Femelles : $F(2,21)=0.10$, NS] (Fig. 15). Lorsque le stimulus puissant (110 dB) est précédé par un prépulse de plus faible intensité (70-90 dB), l'amplitude de sursaut est réduite. Cette IRS reflète le processus d'inhibition qui régule les informations sensorielles entrant vers le cerveau permettant ainsi le traitement initial des informations. Le pourcentage d'IRS augmente avec l'intensité du prépulse quel que soit le génotype et le sexe (Fig. 15). Par ailleurs, il n'a pas de différence entre les génotypes concernant l'IRS [Mâles : $F(2,24)=1.02$, NS ; Femelles : $F(2,21)=0.08$, NS] (Fig. 15).

Ces résultats montrent que la réactivité de sursaut acoustique et le filtrage sensorimoteur ne sont pas affectés par la mutation ApoE2 chez les souris adultes.

2. Mémoire de travail : test d'alternances spontanées dans un labyrinthe en Y

Aussi bien chez les mâles que chez les femelles, le pourcentage d'alternances spontanées se situe autour de 60%, *i.e.* bien au-dessus du hasard (22,3 %), et il n'y a pas de différence de

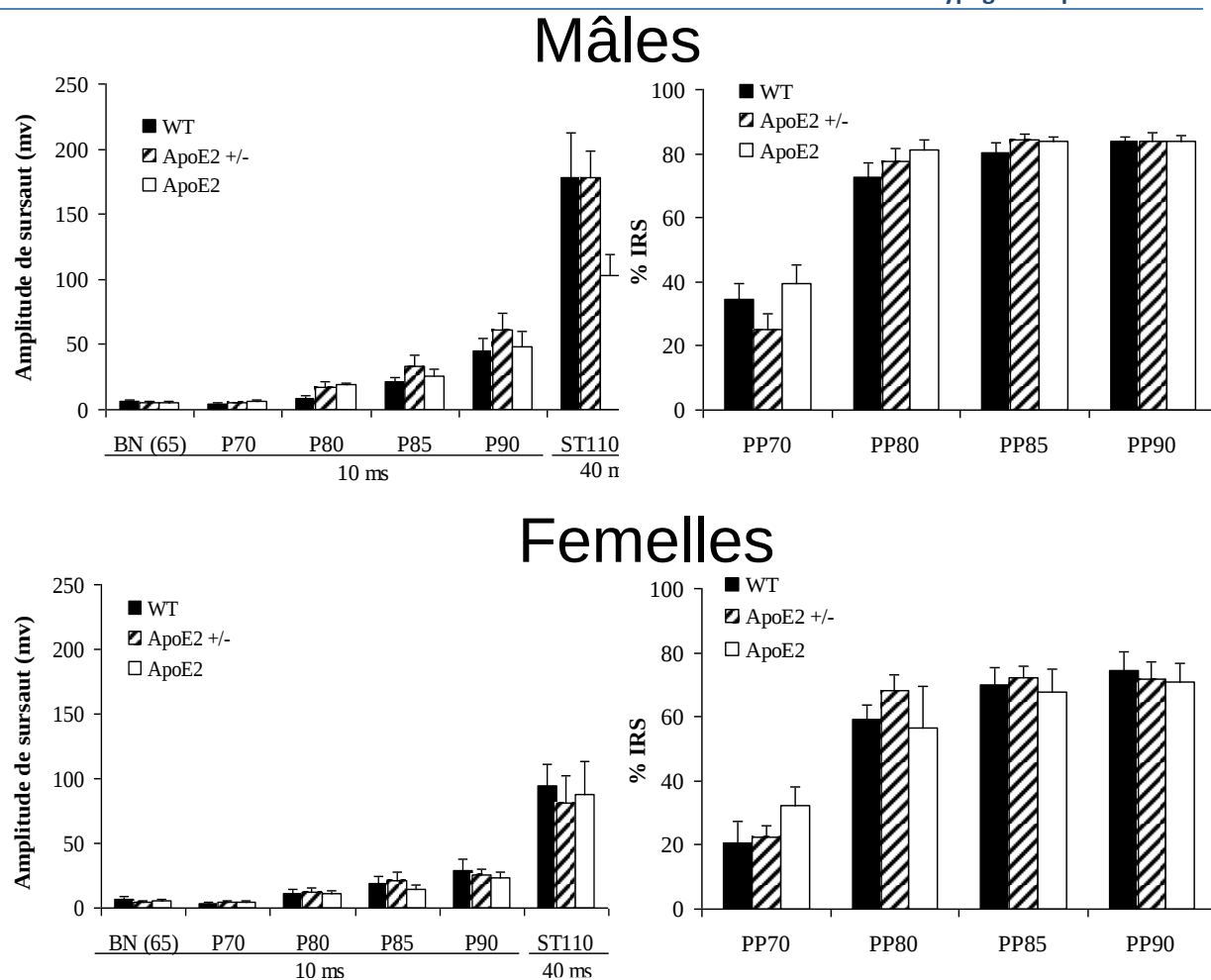


Figure 15: Réactivité de sursaut acoustique et pourcentage d'inhibition du réflexe de sursaut (%IRS) chez les souris ApoE2 mâles et femelles.

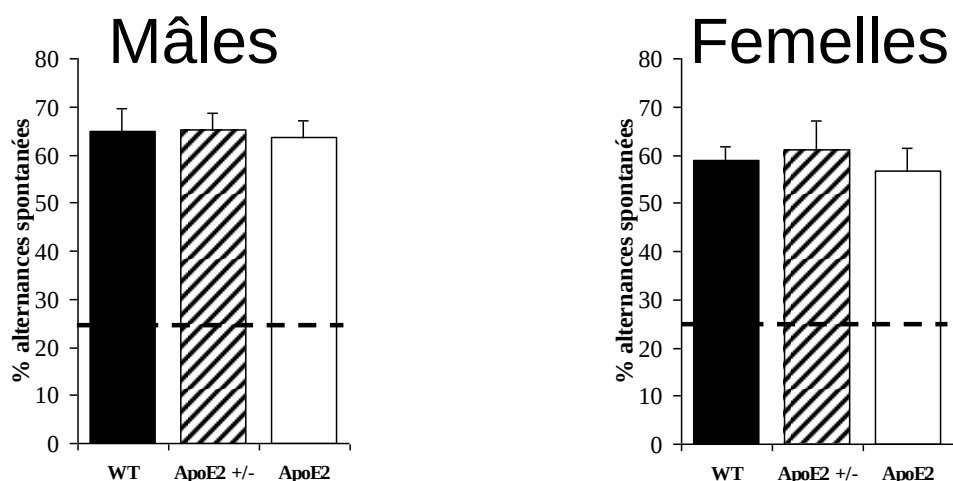


Figure 16: Pourcentage d'alternance spontanées dans le test du labyrinthe en Y chez les souris ApoE2 mâles et femelles.

performance entre les souris WT et ApoE2 [Mâles : $F(2,24) = 0.56$, NS ; Femelles : $F(2,21) = 1.01$, NS] (Fig. 16). Ceci montre que la mémoire de travail à court terme n'est pas affectée chez les souris ApoE2 adultes. Le nombre de bras visités est également comparable entre les souris WT et ApoE2 [Mâles : $F(2,24)=1.09$, NS ; Femelles : $F(2,21)=0.47$, NS] (non présenté).

3. Mémoire associative émotionnelle : test de peur conditionnée

Les figures 17 et 18 illustrent les résultats obtenus dans le test de peur émotionnelle conditionnée, respectivement chez les mâles et les femelles. Le niveau d'activité de base lors de l'habituation aux cages de conditionnement est comparables entre les génotypes chez les femelles [$F(2,21)=0.68$, NS] (Fig. 17B), mais il est inférieur chez les souris ApoE2 hétérozygotes mâles (WT/KI) par rapport à celui des WT ($p<0.05$, Fisher ; ANOVA : $F(2,24)=4.11$, $p<0.05$) (Fig. 17A). Lorsqu'ils sont réexposés au même contexte 24 h après le conditionnement, les mâles et femelles des différent génotypes manifestent une diminution significative et similaire de leur activité par rapport au niveau de base [Temps : $F\geq 91.90$, $p<0.001$; Génotype X Temps : $F\leq 0.51$, NS] (Fig. 17A-17B), montrant que les animaux des 3 génotypes se rappellent du contexte dans lequel ils ont reçu le choc. Par ailleurs, le pourcentage de suppression d'activité dans le même contexte est comparable entre les génotypes [Mâles : $F(2,24)=0.18$, NS ; Femelles : $F(2,21)=0.52$, NS] (Fig. 17C et 17D), montrant que la performance de mémoire contextuelle n'est pas affectée par la mutation ApoE2 chez les souris adultes. Lorsque les souris sont placées dans un nouveau contexte, la présentation du SC (son) seul induit chez les souris des 3 génotypes une réaction de peur reflétée par une diminution significative de leur activité (Fig. 18A et 18B, indice 1 et 2). Le pourcentage de suppression d'activité au SC est statistiquement comparable entre les

Mémoire contextuelle

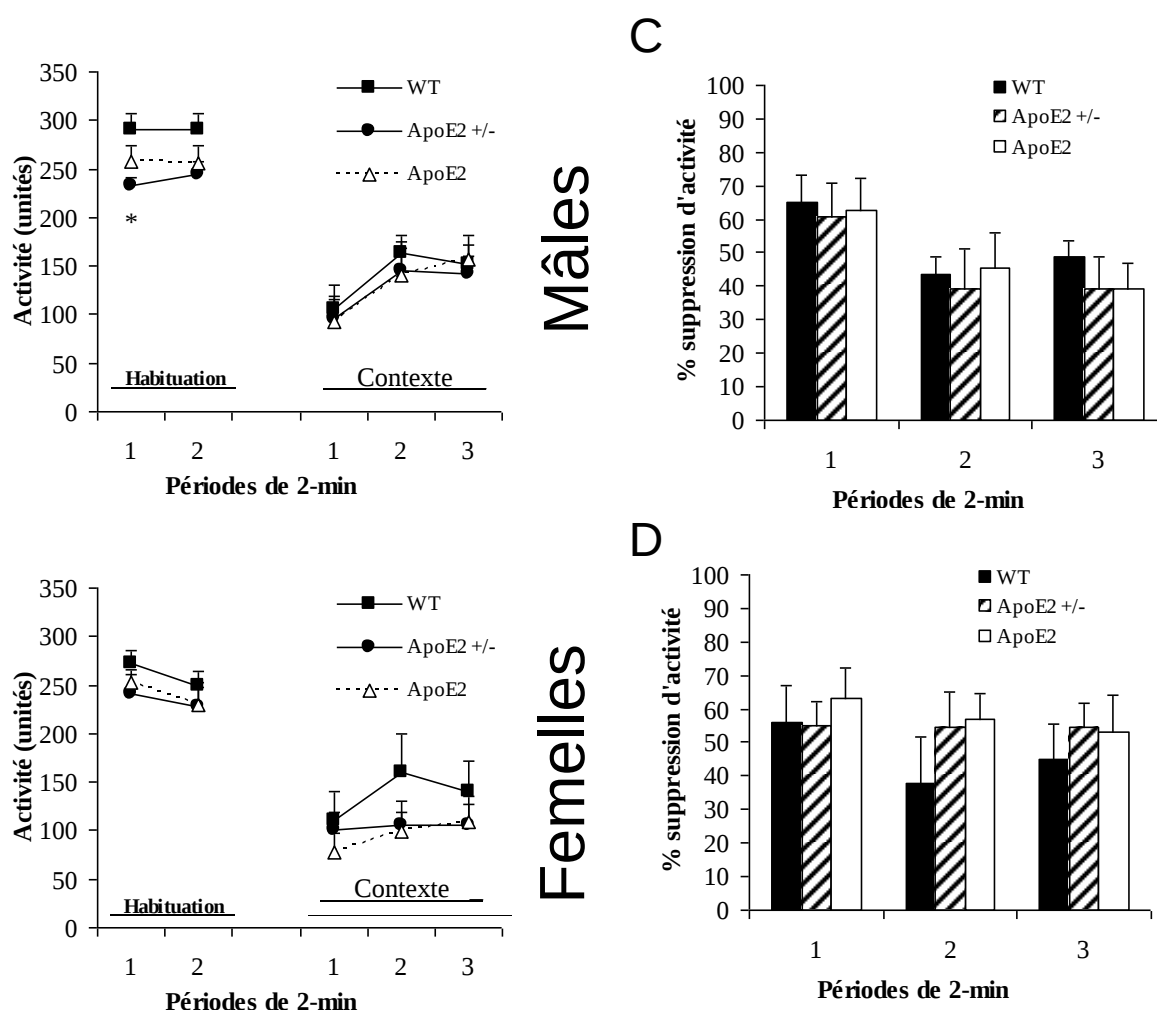


Figure 17: Activité lors de l'habituation aux cages de conditionnement et lors du test au contexte (A chez les mâles, et B chez les femelles), et pourcentage de suppression d'activité (freezing) lors du test au contexte (C chez les mâles et D chez les femelles). * $p < 0.05$, vs WT, test de Fisher

Mémoire indicée

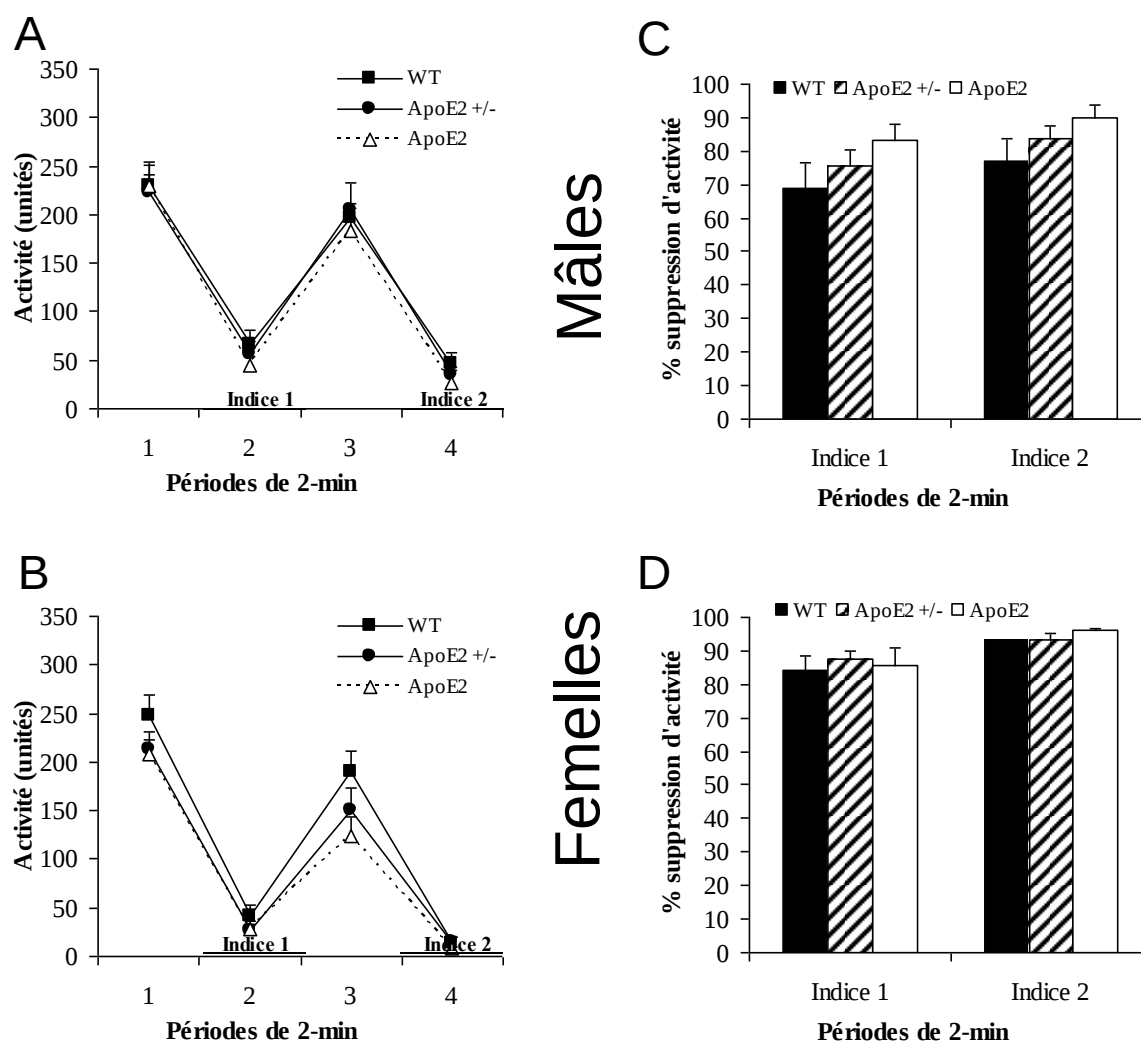
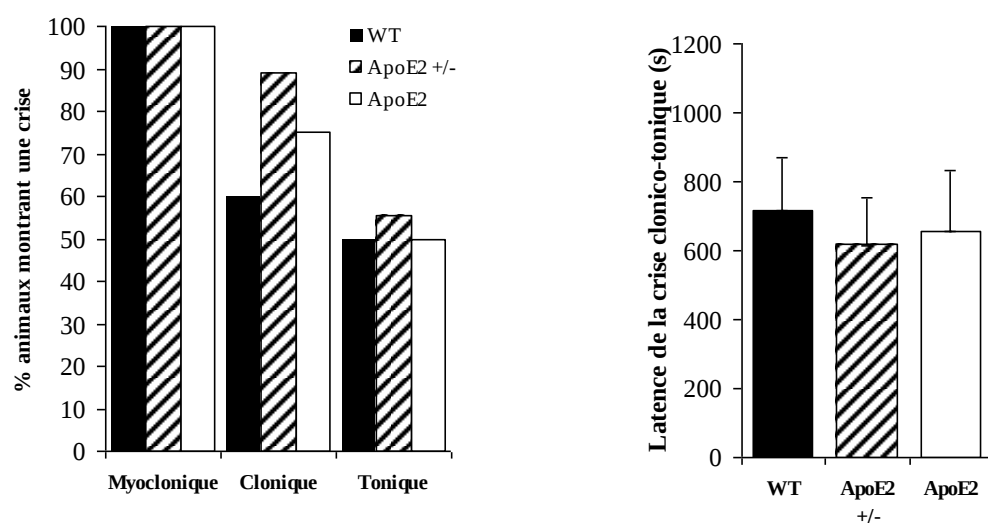


Figure 18: Activité dans le nouveau contexte (A et B) et pourcentage de suppression d'activité lors de la présentation des SC (C et D).

Mâles



Femelles

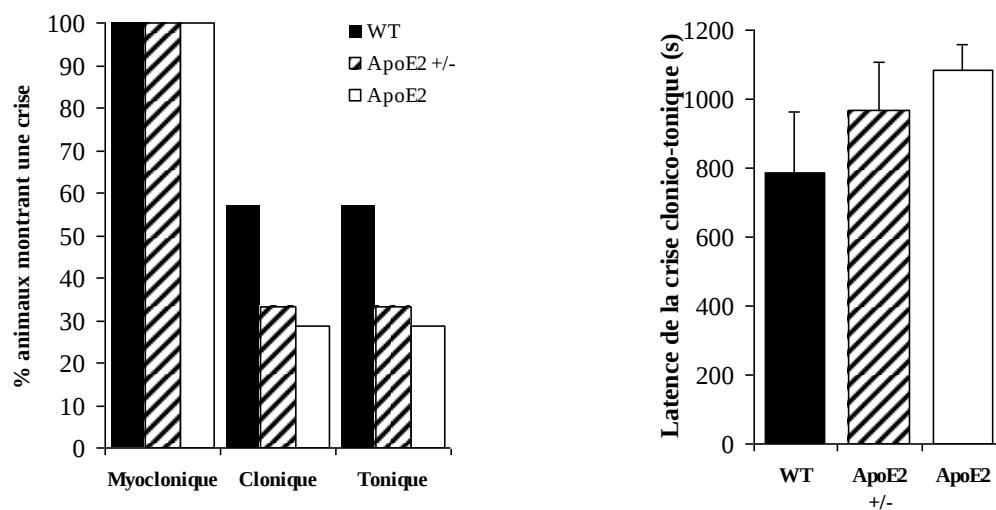


Figure 19: Susceptibilité aux crises épileptiques induites par le pentylenététrazole.

génotypes [Mâles : $F(2,24)=1.51$, NS ; Femelles : $F(2,21)=0.09$, NS] (Fig. 18C et 18D), montrant que la mémoire émotionnelle indicée n'est pas affectées chez les souris ApoE2 adultes.

IV. Effets de la mutation ApoE2-KI sur la susceptibilité aux crises épileptiques

Lorsque le PTZ est injecté aux souris par voie IP à la dose de 50 mg/kg, le pourcentage d'animaux manifestant des myoclonies, des crises cloniques ou toniques est comparable entre les souris WT et ApoE2, aussi bien chez les mâles que chez les femelles [$\chi^2 \leq 2.06$, NS] (Fig. 19). La latence des crises clonico-tonique est également comparable entre les génotypes [$F \leq 1.08$, NS] (Fig. 19).

Ceci suggère que la mutation ApoE2-KI n'affecte pas la susceptibilité aux crises induites par le PTZ chez les souris adultes.

Conclusion

Les souris ApoE2 mâles et femelles aussi bien homozygotes qu'hétérozygotes ont une activité circadienne normale, un niveau d'activité spontanée ainsi que des consommations d'eau et de nourriture comparables à ceux des animaux contrôles, lors d'un cycle complet jour-nuit. Toutefois, les souris ApoE2 femelles homozygotes et hétérozygotes seraient moins actives que les WT dans le test de l'open-field. Ceci concorde avec les données des premières heures de test dans les cages d'actimétrie. D'autre part, les souris ApoE2 homozygotes et hétérozygotes mâles ont une température rectale supérieure à celles des animaux contrôles mais qui reste dans les normes physiologiques. En dehors de cela, l'état de santé général, les réflexes neurologiques de base, les capacités motrices spécifiques, la sensibilité à la douleur,

et la susceptibilité aux crises induites par le PTZ ne sont pas affectés chez les souris ApoE2 mâles et femelles. L'analyse des comportements émotionnels montrent que la mutation ApoE2-KI n'affecte pas la susceptibilité à la résignation dans le test de suspension caudal, et l'anxiété dans le test des cages claire/obscur et celui du labyrinthe en croix surélevé. Dans le test de l'open-field, les souris ApoE2 homozygotes mâles explorent plus le centre, et les ApoE2 femelles moins, ce qui laisserait penser que la mutation ApoE2 chez les mâles aurait des effets anxiolytiques et chez les femelles des effets anxiogéniques. Ces effets pourraient aussi être liés aux effets sur l'activité exploratoire. En ce qui concerne les capacités cognitives, les souris ApoE2 mâles présenteraient un retard d'habituation mesuré dans l'open-field. D'autre part, le filtrage sensorimoteur, la mémoire de travail, et la performance de mémoire émotionnelle contextuelle et indicée ne sont pas affectée par la mutation ApoE2 chez les souris adultes.

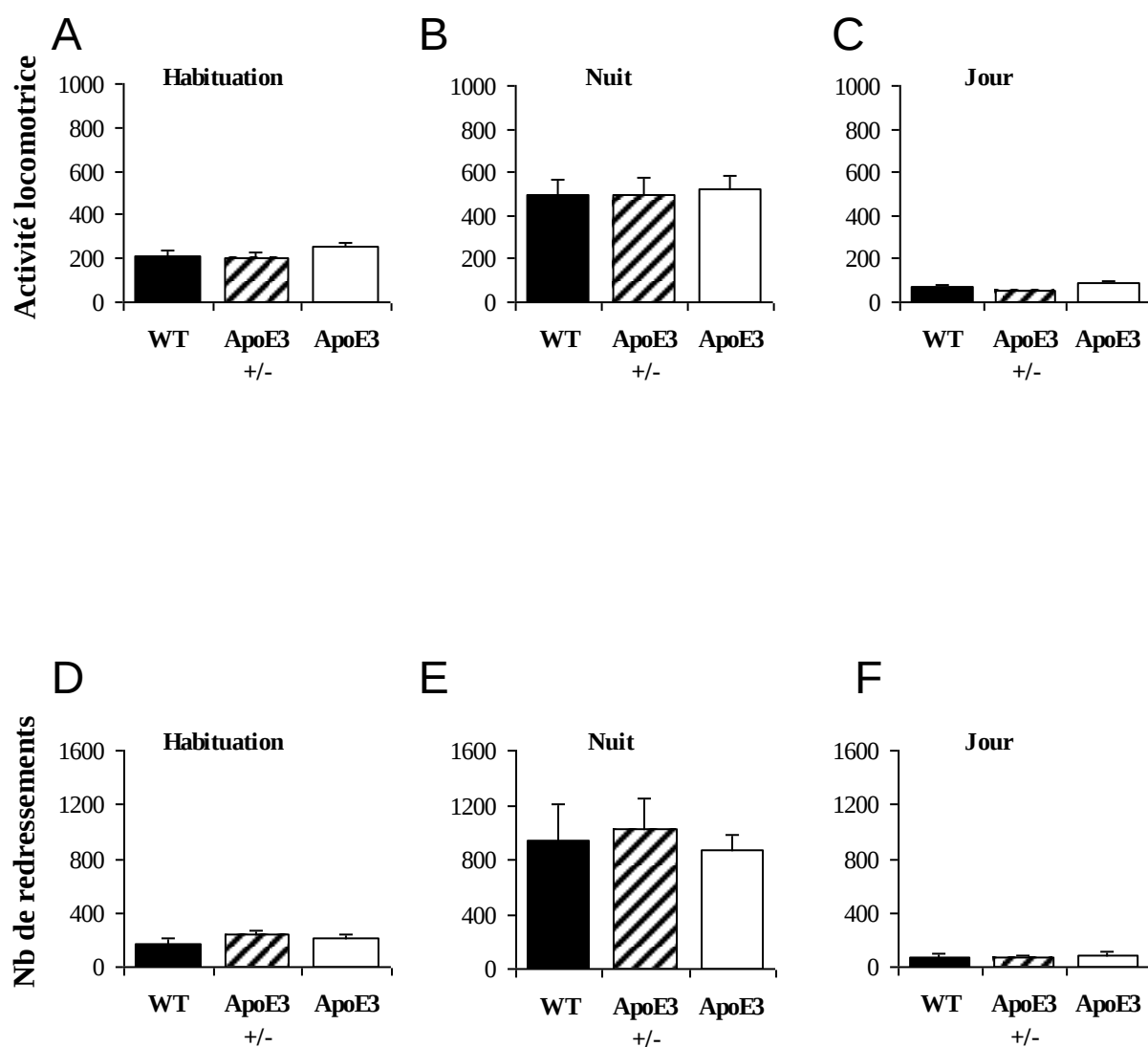


Figure 20: Activité locomotrice (A, B et C) et nombre de redressements (D, E et F) chez les souris ApoE3 mâles. A et D) lors de l'habitation ; B et E) lors de la phase nocturne ; C et F) lors de la phase diurne.

B. Phénotypage comportemental des souris ApoE3 mâles et femelles adultes

Pour chacun des deux sexes, 3 groupes de souris âgées de 5-6 mois ont été utilisés. Un groupe WT, un groupe hétérozygote pour la mutation ApoE3 (ApoE3-WT/KI) et un groupe homozygote pour la mutation ApoE3 (ApoE3-KI) (n=8-11 animaux par groupe et par sexe).

I. Effets de la mutation ApoE3-KI sur l'état général, l'activité circadienne et les capacités sensorimotrices

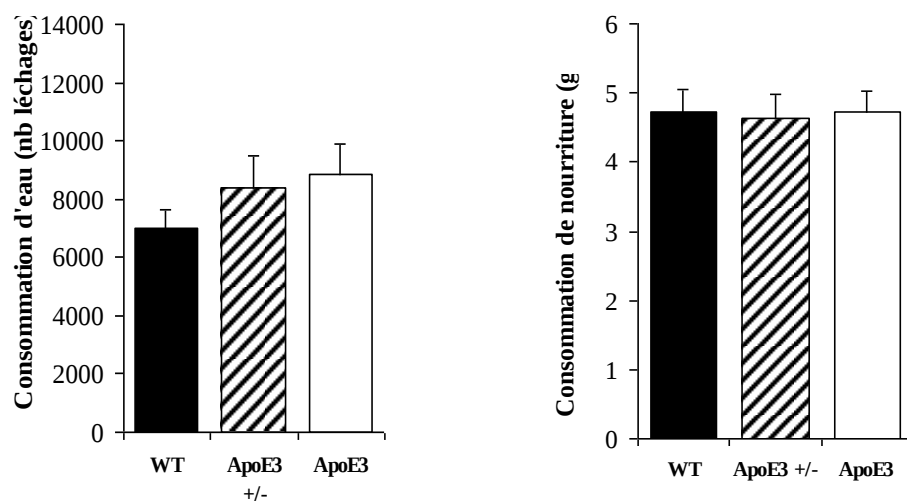
1. Activité circadienne

Aussi bien chez les mâles que chez les femelles, les courbes représentant l'activité locomotrice, le nombre de redressement et les consommations d'eau et de nourriture ont des profils d'évolution comparables à ceux déjà décrits précédemment, avec la présence des 3 phases caractéristiques, l'habituation, la phase nocturne et la phase diurne (données non présentées).

Par ailleurs, il n'y a pas de différences entre les souris WT et les souris ApoE3 mâles concernant le niveau d'activité locomotrice (Fig. 20 A, B et C) et celui du nombre de redressement (Fig. 20D, E et F)), ni pour l'activité totale, ni pour celles des différentes phases du cycle [$F(2,24) \leq 1.50$, NS]. L'activité locomotrice et le nombre de redressement sont également comparables entre les souris WT et ApoE3 femelles (données non présentées).

Aussi bien chez les mâles que chez les femelles, la consommation d'eau est comparable entre les génotypes [$F(2,24) \leq 1.03$, NS] (Fig. 21), mais les souris ApoE3 homozygotes femelles tendent à consommer plus de nourriture que les souris WT [$F(2,25)=2.42$, $p=0.11$,

Mâles



Femelles

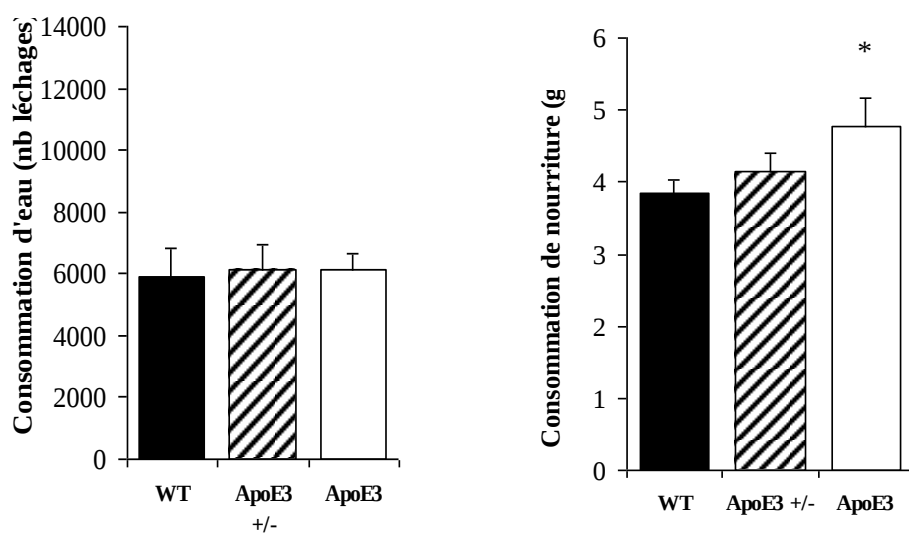


Figure 21: Consommation d'eau et de nourriture chez les souris ApoE3 mâles et femelles.

* $p < 0.05$ vs WT, Fisher.

$p < 0.04$ Fischer].

En conclusion, les résultats de cette expérience montrent que les souris ApoE3 adultes mâles et femelles ne présentent pas de trouble du rythme circadien, et manifestent un niveau d'activité exploratoire comparable à celui des WT. Par ailleurs, les souris ApoE3 homozygotes femelles tendent à manger plus.

2. Évaluation de l'état général et des fonctions sensori-motrices :

Observations cliniques et capacités motrices

Les souris ApoE3 homozygotes et hétérozygotes femelles ont une température rectale significativement inférieure à celle des souris WT [Mâle : $F(2,24)=0.11$, NS ; Femelles $F(2,25)=4.54$, $p < 0.05$, $p < 0.05$ vs WT, Fisher] (Table 5). En dehors de cela, les souris ApoE3 mâles et femelles ont un poids comparable à celui des animaux WT [Mâles : $F(2,24) = 1.11$, NS ; Femelles : $F(2,25)=1.50$, NS], et ne présentent aucune anomalie apparente ni en ce qui concerne l'aspect physique général ni en ce qui concerne les capacités sensorielles ou vestibulaires. L'évaluation des capacités motrices spécifiques a montré que le temps de maintien sur le rotarod est comparable entre les génotypes aussi bien pour les mâles [$F(2,24)=0.65$, NS] que pour les femelles [$F(2,25)=0.73$, NS] (Table 5). D'autre part, la force d'agrippement tend à être inférieure chez les souris ApoE3 hétérozygotes mâles [$F(2,24)=2.79$, $p=0.08$], et supérieure chez les souris ApoE3 hétérozygotes femelles [$F(2,25)=2.87$, $p=0.08$] par rapport à celle de leurs WT respectifs ($p < 0.05$ Fischer). Les données du test de reflexe de traction chez les mâles ne sont pas exploitables.

A

	Wild-type	ApoE3 +/-	ApoE3
Poids corporel (g)	26.4 ± 0.8	27.5 ± 0.7	27.9 ± 0.7
Température rectale (°C)	37.0 ± 0.2	36.9 ± 0.1	36.9 ± 0.1
Rotarod accéléré (s)	109.7 ± 4.0	136.3 ± 23.9	129.9 ± 15.0
Réflexe de traction (s)	Non exploitable	Non exploitable	Non exploitable
Force d'agrippement	9.3 ± 0.4	8.4 ± 0.2 *	9.1 ± 0.3

B

	Wild-type	ApoE3 +/-	ApoE3
Poids corporel (g)	21.4 ± 0.5	20.9 ± 0.4	22.0 ± 0.5
Température rectale (°C)	37.3 ± 0.2	36.7 ± 0.1 *	36.7 ± 0.2 *
Rotarod accéléré (s)	180.0 ± 15.4	190.2 ± 11.7	164.6 ± 18.6
Réflexe de traction (s)	2.6 ± 0.4	1.7 ± 0.2	2.1 ± 0.3
Force d'agrippement	9.3 ± 0.4	10.6 ± 0.4 *	9.7 ± 0.4

Tableau 5: État général et capacités motrices chez les ApoE3 mâles (A) et femelles (B).

*p<0.05 vs WT, test de Fisher.

Sensibilité à la douleur

Chez les femelles, mais pas chez les mâles, la latence de retrait de la queue dans le test du tail flick diffère significativement entre les génotypes [Mâles : $F(2,24)=0.58$, NS ; Femelles : $F(2,25)=5.50$, $p<0.05$] ; les souris ApoE3 homozygotes femelles présentant des latences significativement supérieures à celles des animaux WT ($p<0.01$ Fisher ; Table 6B). Les latences de saut pour échapper à un stimulus douloureux dans le test de la plaque chauffante sont également plus élevées chez les souris ApoE3 homozygotes femelles [Mâles : $F(2,24)=2.54$, NS ; Femelles : $F(2,25)=4.96$, $p<0.05$; $p<0.0$ vs WT, Fisher] (Table 6A). Par ailleurs, le seuil de sensibilité aux chocs électriques n'est pas affecté chez les souris ApoE3 quel que soit le sexe; l'intensité minimale de choc induisant le secouement de la patte, la vocalisation ou le saut sont comparables entre les génotypes [Mâles : $F(2,24)\leq 1.85$, NS ; Femelles : $F(2,25)\leq 0.63$, NS] (Table 6).

Ces résultats suggèrent que la sensibilité à la douleur est réduite chez les souris ApoE3 homozygotes femelles.

Conclusion

Les résultats de ces expériences montrent que l'état de santé général, les réflexes neurologiques de base, la coordination motrice et la force musculaire ne sont pas affectés chez les souris ApoE3 mâles et femelles. D'autre part, les souris ApoE3 hétérozygotes et homozygotes femelles ont une température rectale inférieure à celles des animaux WT, et les souris ApoE3 homozygotes femelles seraient moins sensibles à la douleur thermique mesurée dans les tests du tail flick et de la plaque chauffante.

A

		Wild-type	ApoE3 +/-	ApoE3
Tail Flick (s)		5.1 ± 0.3	4.7 ± 0.3	5.1 ± 0.3
Plaque Chauffante (s)	Première réaction	9.4 ± 0.6	8.6 ± 0.4	8.8 ± 0.6
	Saut	132.5 ± 16.5	92.5 ± 6.1	122.7 ± 12.1
Seuil de sensibilité au choc électrique (mA)	Secouement	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00
	Vocalisation	0.14 ± 0.04	0.12 ± 0.02	0.19 ± 0.02
	Saut	0.48 ± 0.09	0.36 ± 0.03	0.49 ± 0.08

B

		Wild-type	ApoE3 +/-	ApoE3
Tail Flick (s)		3.6 ± 0.2	4.1 ± 0.2	4.5 ± 0.2 **
Plaque Chauffante (s)	Première réaction	11.1 ± 1.0	10.2 ± 0.5	11.6 ± 1.0
	Saut	116.2 ± 11.4	107.6 ± 8.0	152.4 ± 12.5 *
Seuil de sensibilité au choc électrique (mA)	Secouement	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00
	Vocalisation	0.16 ± 0.03	0.14 ± 0.03	0.18 ± 0.03
	Saut	0.61 ± 0.13	0.65 ± 0.12	0.47 ± 0.12

Tableau 6: Sensibilité à la douleur chez les ApoE3 mâles (A) et femelles (B). * p<0.05, vs WT, test de Fisher.

II. Effets de la mutation ApoE3-KI sur la réactivité émotionnelle dans différentes situations anxiogènes et de stress aigu

1. Test du champ ouvert ou open-field

Chez les mâles, les trois génotypes ont une activité locomotrice plus élevée au début de la séance correspondant à l'exploration, puis celle-ci diminue au fur et à mesure que le test progresse reflétant l'habituation. Par ailleurs, il n'y a pas de différence entre les souris WT et ApoE3 mâles [$F(2,24)=0.34$, NS] (Fig. 22A). Le nombre de redressements est également comparable entre les génotypes [$F(2,24)=0.72$, NS] (Fig. 22B). D'autre part, le nombre d'entrées dans le centre est significativement plus élevé [$F(2,24)=3.38$, $p=0.05$; $p<0.05$ vs WT, Fisher] et le pourcentage global de temps passé dans le centre est légèrement plus élevé ($p=0.06$, vs WT, Fisher) chez les souris ApoE3 homozygotes mâles par rapport au souris WT (Fig. 22C, Table 7). Chez les femelles, l'activité locomotrice, le nombre de redressements, le pourcentage du temps passé dans le centre (Fig. 22D, 22E et 22F) et le nombre d'entrées dans le centre (Tableau 7) sont comparables entre les souris WT et ApoE3 femelles adultes [$F(2,25)\leq 0.89$, NS].

Les résultats de cette expérience montrent que l'activité exploratoire dans l'open-field n'est pas affectée chez les souris ApoE3 mâles et femelles adultes. Toutefois, les souris ApoE3 homozygotes mâles auraient tendance à être moins anxieuses dans ce test.

2. Test du labyrinthe en croix surélevé

Chez les mâles, aucune différence n'a été observée entre les souris WT et ApoE3 concernant le pourcentage d'entrées, le pourcentage de temps et le nombre d'explorations du vide dans

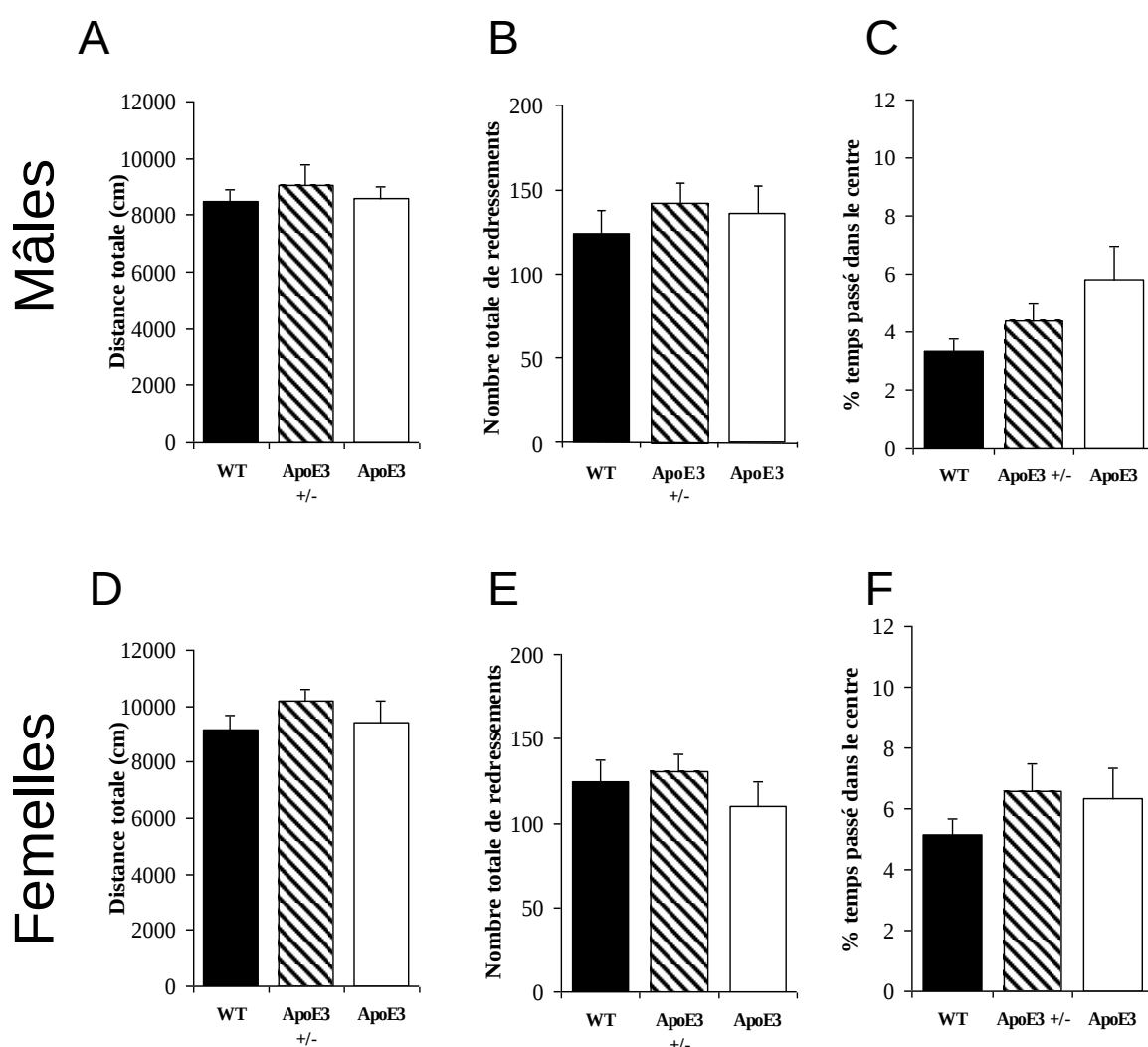


Figure 22: Activité locomotrice (A et D), nombre de redressements (B et E), et pourcentage de temps passé dans le centre (C et F) de l'open-field chez les souris ApoE3 mâles et femelles.

	Wild-type	ApoE3+/-	ApoE3
Mâles	38.3 ± 4.4	53.9 ± 5.3	61.1 ± 7.4 *
Femelles	63.9 ± 6.2	73.8 ± 6.5	69.9 ± 10.8

Tableau 7: Nombre d'entrées dans le centre de l'open-field chez les souris ApoE3 mâles et femelles). * $p < 0.05$, vs WT, test de Fisher.

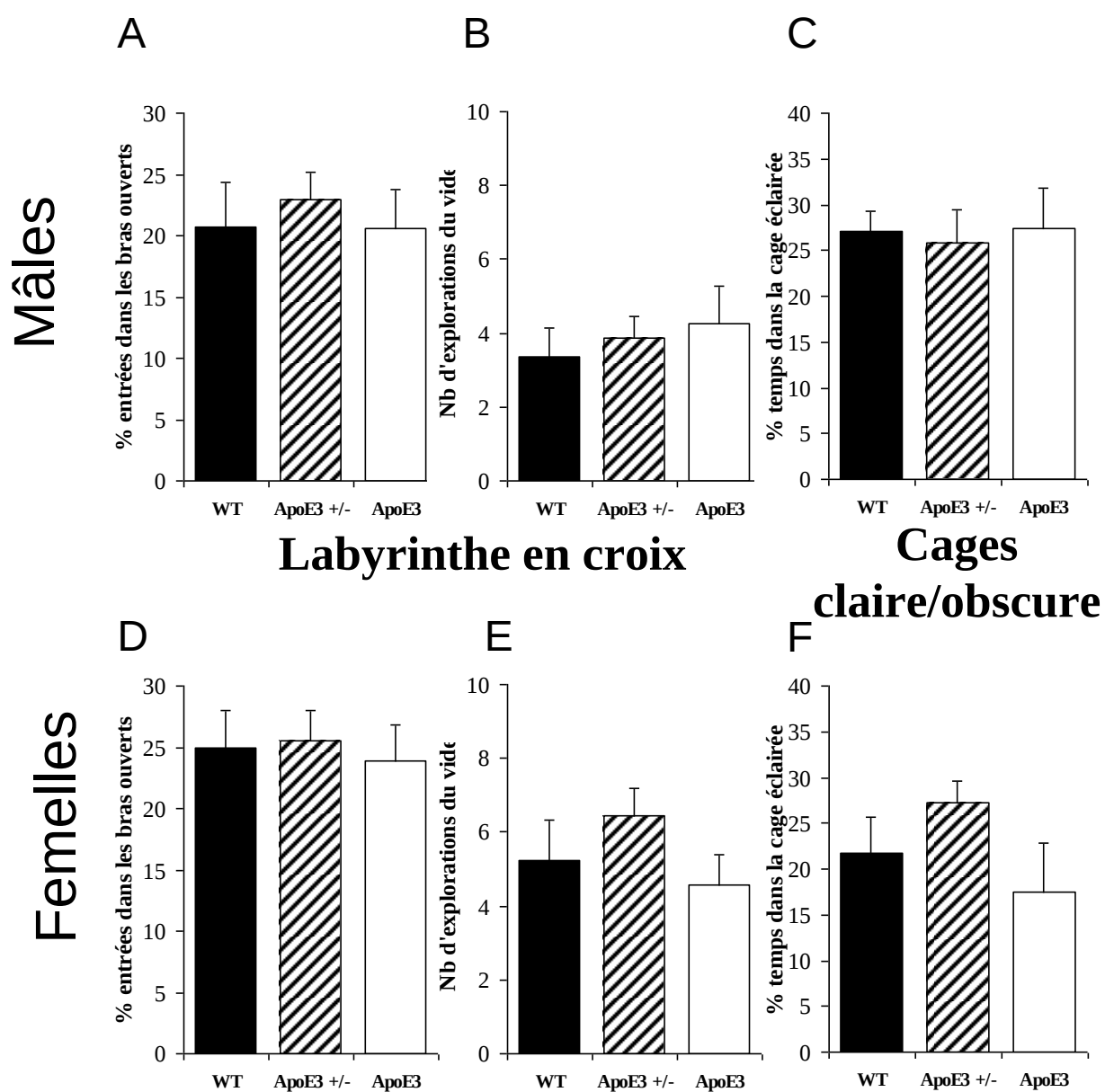


Figure 23: Pourcentage d'entrées dans les bras ouverts (A et D) et nombre d'explorations du vide (B et E) dans le test du labyrinthe en croix surélevé, et pourcentage de temps passé dans la cage éclairée dans le test des cages claire/obscur (C et F) chez les souris ApoE3 mâles et femelles.

les bras ouverts [$F(2,24) \leq 0.28$, NS] (Fig. 23A et 23B). Le nombre d'entrées dans les bras fermés et le nombre de redressements sont également comparables entre les génotypes [$F(2,24) \leq 1.73$, NS] (non présentés). Il en est de même pour les femelles ; aucune différence n'a été détectée entre les génotypes pour l'ensemble des paramètres mesurés dans ce test (Fig. 23D et 23E).

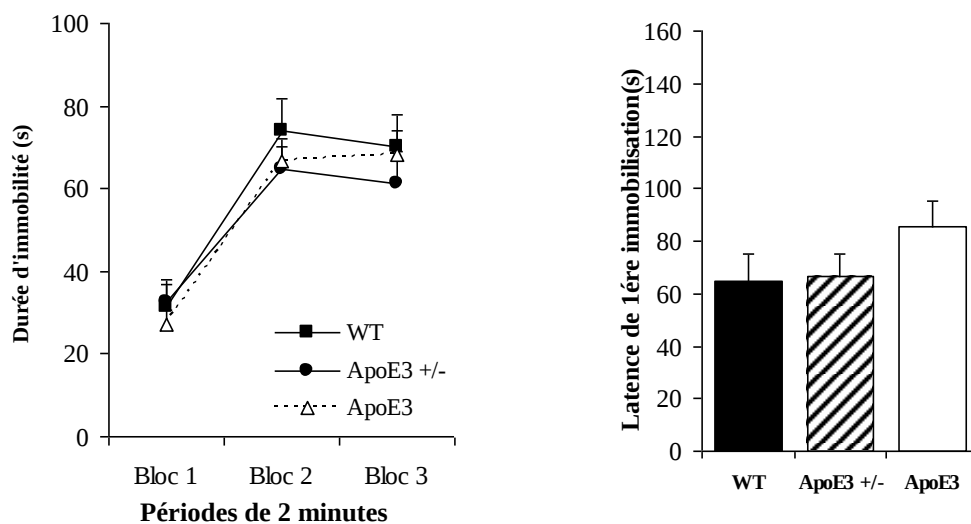
Les résultats de ces expériences montrent que la mutation ApoE3-KI n'affecte pas l'anxiété dans le test du labyrinthe en croix surélevé, ni chez les mâles ni chez les femelles à l'âge adulte.

3. Test des cages claire/obscur

Aussi bien chez les mâles que chez les femelles, aucune différence n'a été observée entre les souris WT et ApoE3 concernant le pourcentage de temps passé dans la cage éclairée [Mâles : $F(2,24) \leq 0.06$, NS ; Femelles : $[F(2,25) \leq 1.56$, NS] (Fig. 23C et 23F). Les nombres de transitions entre les cages obscure et éclairée sont également comparables entre les génotypes, mais la latence d'entrée dans la cage éclairée chez les femelles est significativement plus élevée chez les ApoE3 homozygotes que celles hétérozygotes [Mâles : $F(2,24) = 1.00$, NS ; Femelles : $[F(2,25) = 3.77$, $p < 0.05$ hétérozygotes vs homozygotes] (non présentés). Cette différence est essentiellement due au fait que 3 femelles ApoE3 homozygotes ne soient pas entrées dans la cage éclairée.

Excepté la différence concernant la latence d'entrée dans la cage éclairée qui est plus élevée chez les souris ApoE3 homozygotes femelles que celles hétérozygotes, les résultats de cette expérience suggèrent que la mutation ApoE3-KI n'affecte pas de façon évidente l'anxiété dans ce test.

Mâles



Femelles

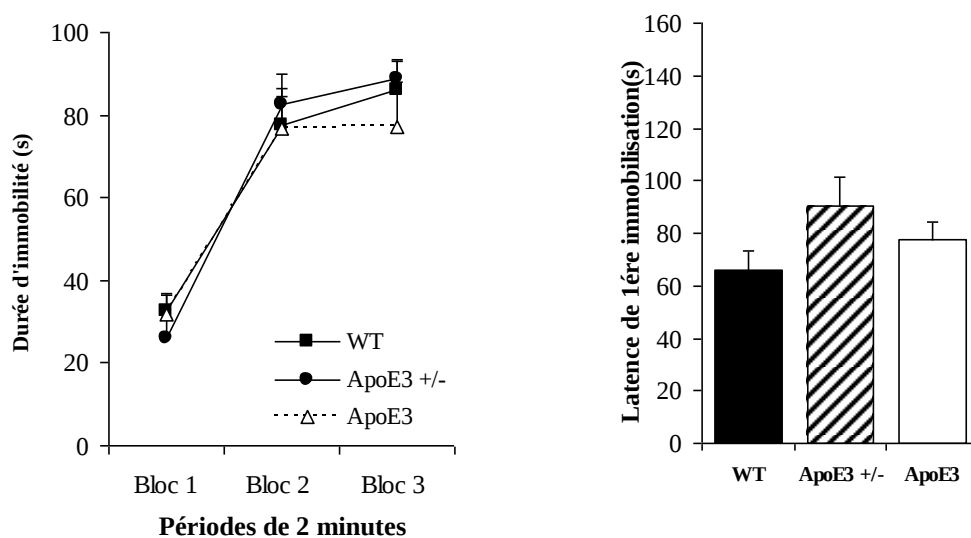


Figure 24: Durée d'immobilité et latence de la première immobilisation dans le test de suspension caudale chez les souris ApoE3 mâles et femelles.

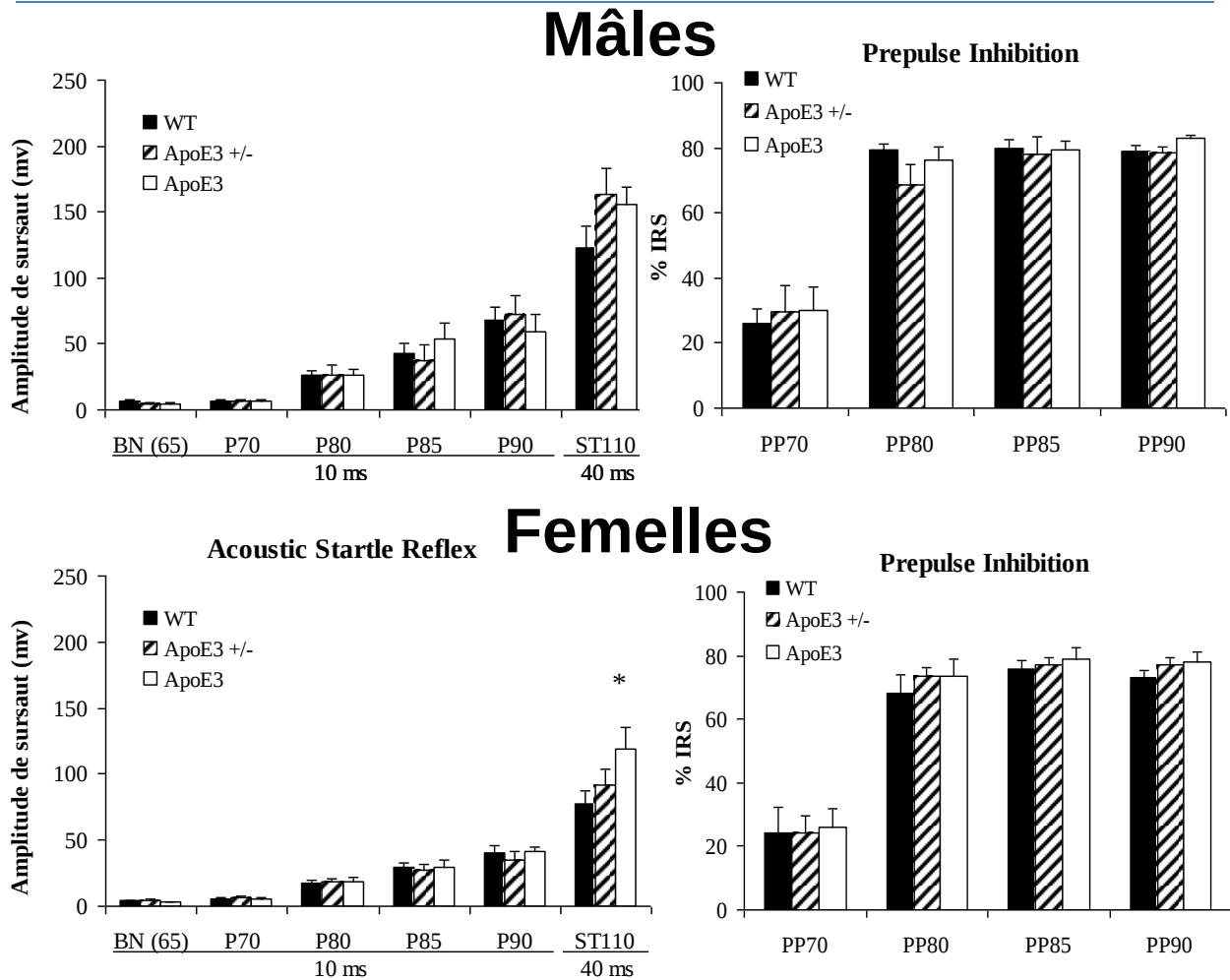


Figure 25: Réactivité de sursaut acoustique et pourcentage d'inhibition du réflexe de sursaut (%IRS) chez les souris ApoE3 mâles et femelles. * <0.05 vs WT, test de Fisher.

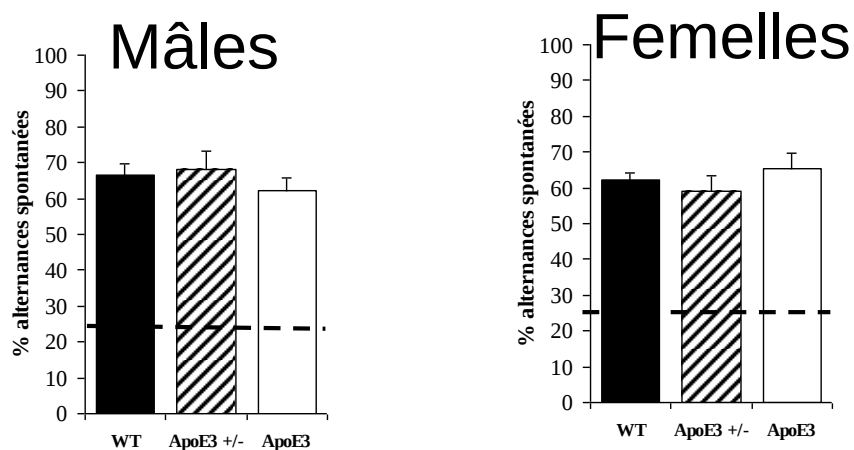


Figure 26: Pourcentage d'alternances spontanées dans le test du labyrinthe en Y chez les souris ApoE3 mâles et femelles

4. Test de suspension caudale

On peut constater que la durée d'immobilité est comparable entre les génotypes quel que soit le sexe [Mâles : $F(2,24)=0.32$, NS ; Femelles : $F(2,25)=0.15$, NS] (Fig. 24)). De même, il n'y a pas de différence entre les souris WT et ApoE3 concernant la latence de première immobilisation [Mâles : $F(2,24)=1.50$, NS ; Femelles : $F(2,26)=2.08$, NS] (Fig. 24). Ces résultats montrent que la mutation ApoE3-KI n'affecte pas la susceptibilité à la résignation chez les souris adultes.

III. Effets de la mutation ApoE3-KI sur les fonctions cognitives

1. Filtrage sensorimoteur : RS et IRS

La figure 25 montre l'amplitude du sursaut et le pourcentage d'IRS en fonction de l'intensité du stimulus acoustique. La réactivité de sursaut aux stimuli de faible intensité (65-90 dB), est comparable entre les génotypes aussi bien chez les mâles que chez les femelles [Mâles : $F(2,24)=0.01$, NS ; Femelles : $F(2,25)=0.11$, NS]. D'autre part, l'amplitude de sursaut à un stimulus soudain de forte intensité tend à être plus élevée chez les souris ApoE3 femelles [Mâles : $F(2,24)=1.64$, NS ; Femelles : $F(2,25)=2.54$, $p=0.10$; $p<0.05$ Fisher]. Lorsque le stimulus sursautant (110 dB) est précédé par un prépulse de plus faible intensité (70-90 dB), le pourcentage d'IRS augmente avec l'intensité du prépulse quel que soit le génotype et le sexe (Fig. 25). Par ailleurs, il n'y a pas de différence entre les génotypes concernant l'IRS [Mâles : $F(2,24)=0.40$, NS ; Femelles : $F(2,25)=0.35$, NS] (Fig. 25).

Les résultats de cette expérience montrent que l'amplitude de sursaut est légèrement plus élevée chez les souris ApoE3 homozygotes femelles. Le filtrage sensorimoteur n'est pas

Mémoire contextuelle

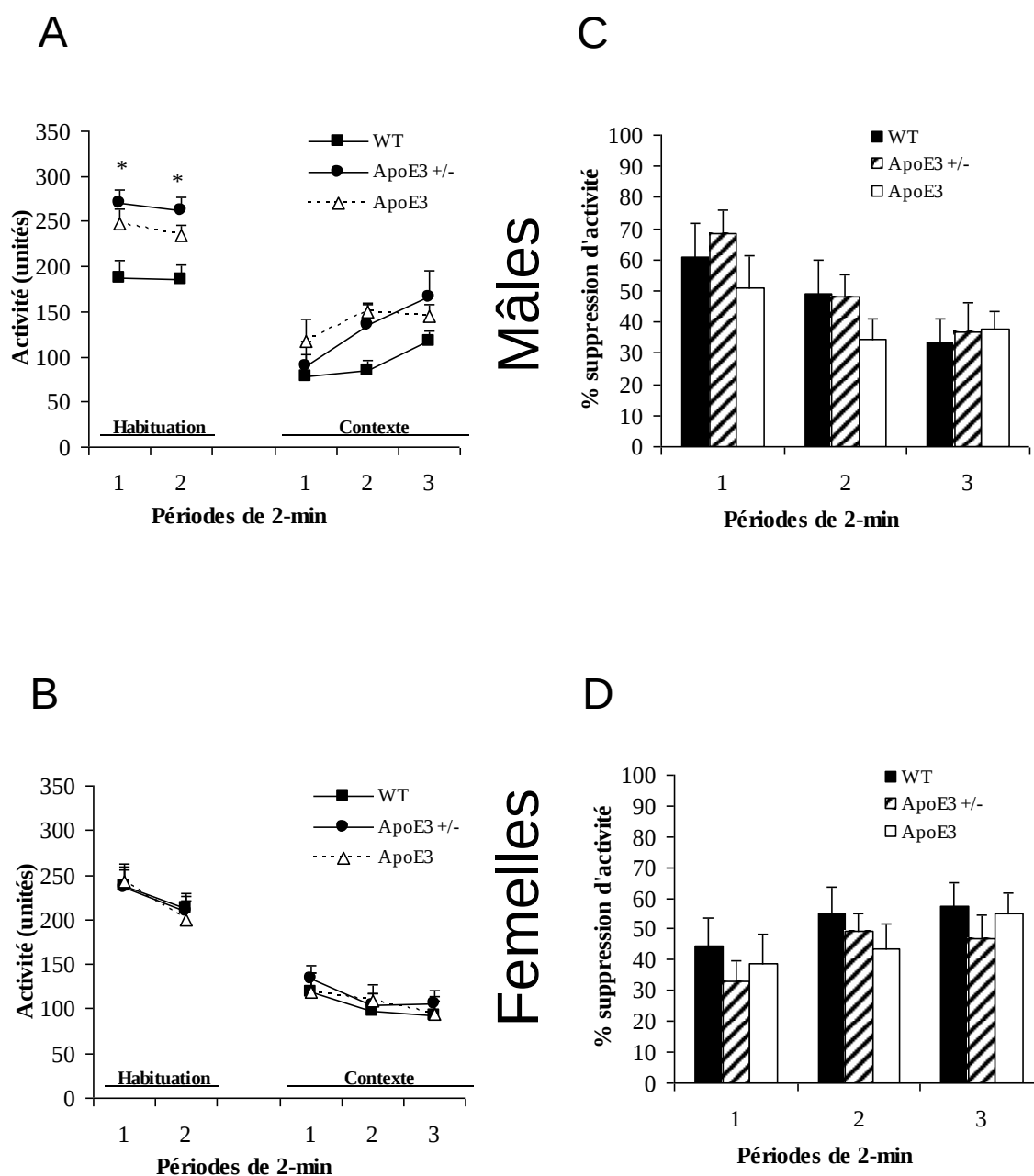


Figure 27: Activité lors de l'habituation aux cages de conditionnement et lors du test au contexte (A chez les mâles, et B chez les femelles), et pourcentage de suppression d'activité (freezing) lors du test au contexte (C chez les mâles et D chez les femelles). $P < 0.05$, vs WT, Fisher.

affecté par la mutation ApoE3 chez les souris adultes mâles et femelles.

2. Mémoire de travail : test d'alternances spontanées dans un labyrinthe en Y

Il n'y a pas de différence entre les souris WT et ApoE3 concernant le pourcentage d'alternances spontanées [Mâles : $F(2,23)=1.67$, NS ; Femelles : $F(2,25)=0.69$, NS] (Fig. 26). Le nombre de bras visités est également comparable entre les génotypes [Mâles : $F(2,23)=0.35$, NS ; Femelles : $F(2,25)=0.07$, NS] (non présentés). Ces résultats suggèrent que la mutation ApoE3-KI n'affecte pas la performance de mémoire de travail chez les souris mâles et femelles adultes.

3. Mémoire associative émotionnelle : test de peur conditionnée

Le niveau d'activité de base lors de l'habituation aux cages de conditionnement est significativement plus élevé chez les souris ApoE3 homozygotes et hétérozygotes mâles par rapport à celui des WT du même sexe [$F(2,24)=8.84$, $p<0.01$, $p<0.05$ SNK] (Fig. 27A), mais il est comparable entre les génotypes chez les femelles [$F(2,25)=0.01$, NS] (Fig. 27B). Lorsqu'ils sont réexposés au même contexte 24 h après le conditionnement, les mâles et femelles des différents génotypes se rappellent du contexte dans lequel ils ont reçu le choc, manifestant une diminution significative de leur activité par rapport au niveau de base [Temps : $F\geq 64.45$, $p<0.001$; Génotype X Temps : $F\leq 2.37$, NS] (Fig. 27C et 27D). Par ailleurs, le pourcentage de suppression d'activité dans le même contexte est comparable entre les génotypes [Mâles : $F(2,24)=0.72$, NS ; Femelles : $F(2,25)=0.62$, NS], montrant que la performance de mémoire contextuelle n'est pas affectée par la mutation ApoE3 chez les souris adultes. Lorsque les souris sont placées dans un nouveau contexte, le pourcentage de suppression d'activité au SC est comparable entre les génotypes [Mâles : $F(2,24)=1.77$, NS ;

Femelles : $F(2,25)=0.70$, NS] (données non présentées), montrant que la mémoire émotionnelle indicée n'est pas affectée chez les souris ApoE3 adultes.

IV. Effets de la mutation ApoE3-KI sur la susceptibilité aux crises épileptiques

Lorsque le PTZ est injecté aux souris par voie IP à la dose de 50 mg/kg, le pourcentage d'animaux manifestant des myoclonies, des crises cloniques ou toniques est comparable entre les souris WT et ApoE3, aussi bien chez les mâles que chez les femelles [$\chi^2 \leq 1.51$, NS] (données non présentées). La latence des crises clonico-tonique est également comparable entre les génotypes [$F \leq 1.17$, NS] (données non présentées). Ceci suggère que la mutation ApoE3-KI n'affecte pas la susceptibilité aux crises induites par le PTZ chez les souris mâles et femelles adultes.

Conclusion

Les souris ApoE3 adultes mâles et femelles ne présentent pas de trouble du rythme circadien, et manifestent un niveau d'activité comparable à celui des WT. Par ailleurs, les souris ApoE3 homozygotes femelles tendent à manger plus. Les réflexes neurologiques de base, la coordination motrice et la force musculaire ne sont pas affectées chez les souris ApoE3 mâles et femelles. D'autre part, les souris ApoE3 hétérozygotes et homozygotes femelles ont une température rectale inférieure à celles des animaux WT, et les souris ApoE3 homozygotes femelles seraient moins sensibles à la douleur thermique mesurée dans les tests du tail flick et de la plaque chauffante. L'amplitude de sursaut acoustique est également légèrement plus élevée chez les souris ApoE3 homozygotes femelles. L'analyse des comportements émotionnels montre que les souris ApoE3 homozygotes mâles adultes auraient tendance à être moins anxieuses dans le test d'open-field. Par ailleurs, la mutation ApoE3-KI n'affecte ni

l'anxiété dans le test des cages claire/obscur et dans celui du labyrinthe en croix surélevé, ni la susceptibilité à la résignation dans le test de suspension caudale. En ce qui concerne les capacités cognitives, le filtrage sensorimoteur, la mémoire de travail, et la performance de mémoire émotionnelle contextuelle et indicée, ils ne sont pas affectés chez les souris ApoE3 mâles et femelles. Enfin, la mutation ApoE3-KI n'affecte pas la susceptibilité aux crises épileptiques dans nos conditions expérimentales.

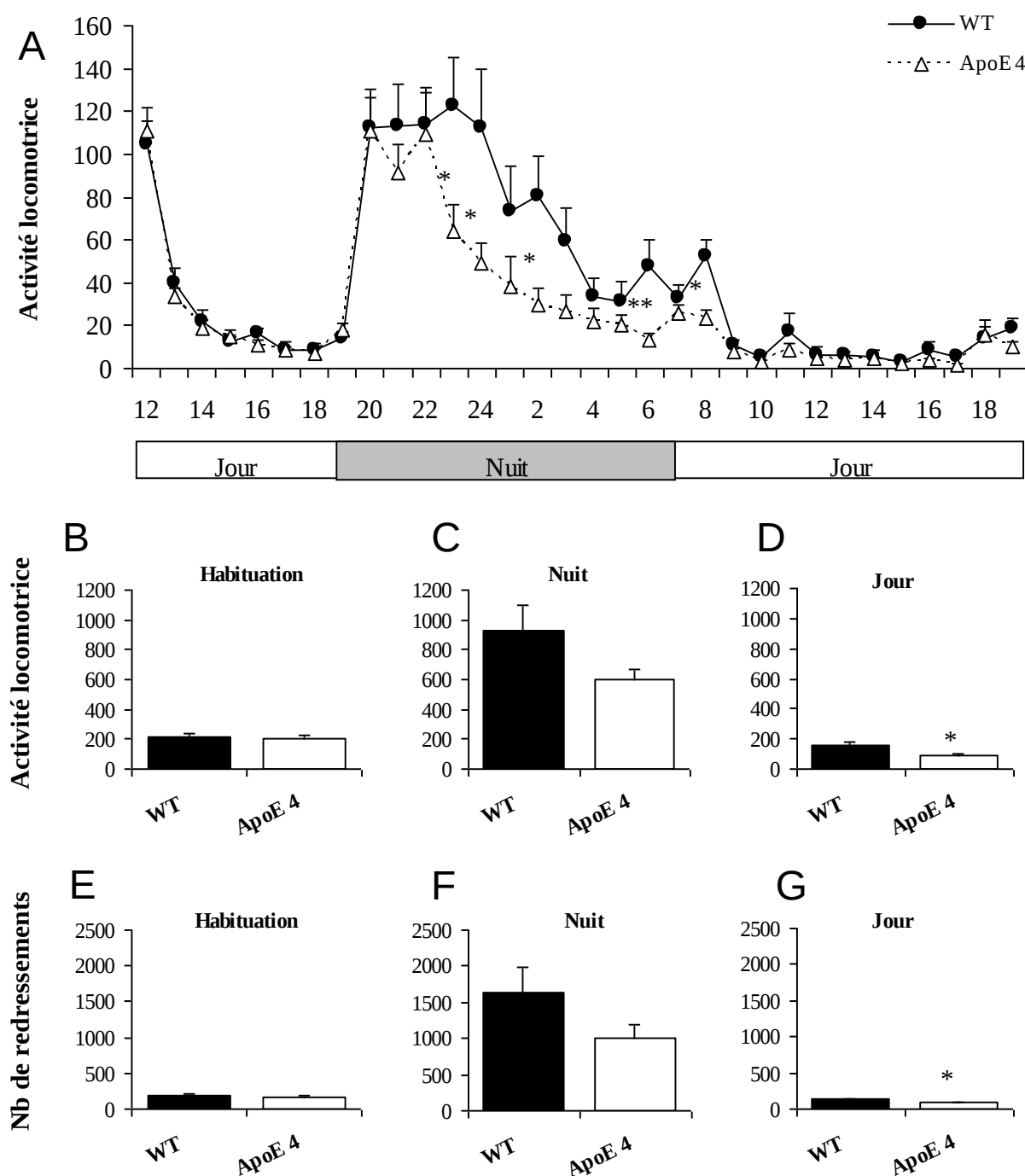


Figure 28: Activité locomotrice et nombre de redressements chez les souris ApoE4 mâles. A) Évolution de l'activité locomotrice lors des 32h de test ; B) Activité locomotrice totale lors de l'habitude ; C) lors de la phase nocturne ; D) lors de la phase diurne ; E) Nombre de redressements lors de l'habitude, F) lors de la phase nocturne ; G) lors de la phase diurne. * $p < 0.05$ vs WT, test t de Student.

Phénotypage comportemental des souris ApoE4 mâles et femelles

La caractérisation des éventuels effets comportementaux de la mutation ApoE4-KI a été réalisée chez des souris mâles et femelles d'une part à l'âge adulte (3-5 mois) et d'autre part chez des souris âgées d'un an et demi (1,5 ans).

A. Effets de la mutation ApoE4-KI sur les performances comportementales chez les souris mâles et femelles adultes

Un groupe de souris WT et un groupe de souris ApoE4 homozygotes pour la mutation ont été utilisés pour chacun des deux sexes (n=7-12 souris par sexe et par génotype). Nous n'avons pas pu avoir une cohorte appropriée de souris hétérozygotes.

I. Effets de la mutation ApoE4-KI sur l'état général, l'activité circadienne et les capacités sensorimotrices

1. Activité circadienne

Comme on peut le constater sur les courbes représentant l'activité locomotrice (Fig. 28A-D) et le nombre de redressements (Fig. 28E-G) chez les mâles, les groupes WT et ApoE4 montrent un niveau d'activité élevé durant la première heure de test correspondant à la phase initiale d'exploration du nouvel environnement, qui décroît progressivement et significativement jusque vers la fin de cette phase, appelée phase d'habituation [$F(6,90) \geq 84.29$, $p < 0.001$]. Par ailleurs, le profil et les niveaux d'activités lors de la phase d'habituation sont comparables entre les deux groupes de souris pour l'activité et le nombre de redressements [$t_{15} \leq 0.21$, NS], (Fig. 28A, 28B et 28E). Dès le début de la phase nocturne

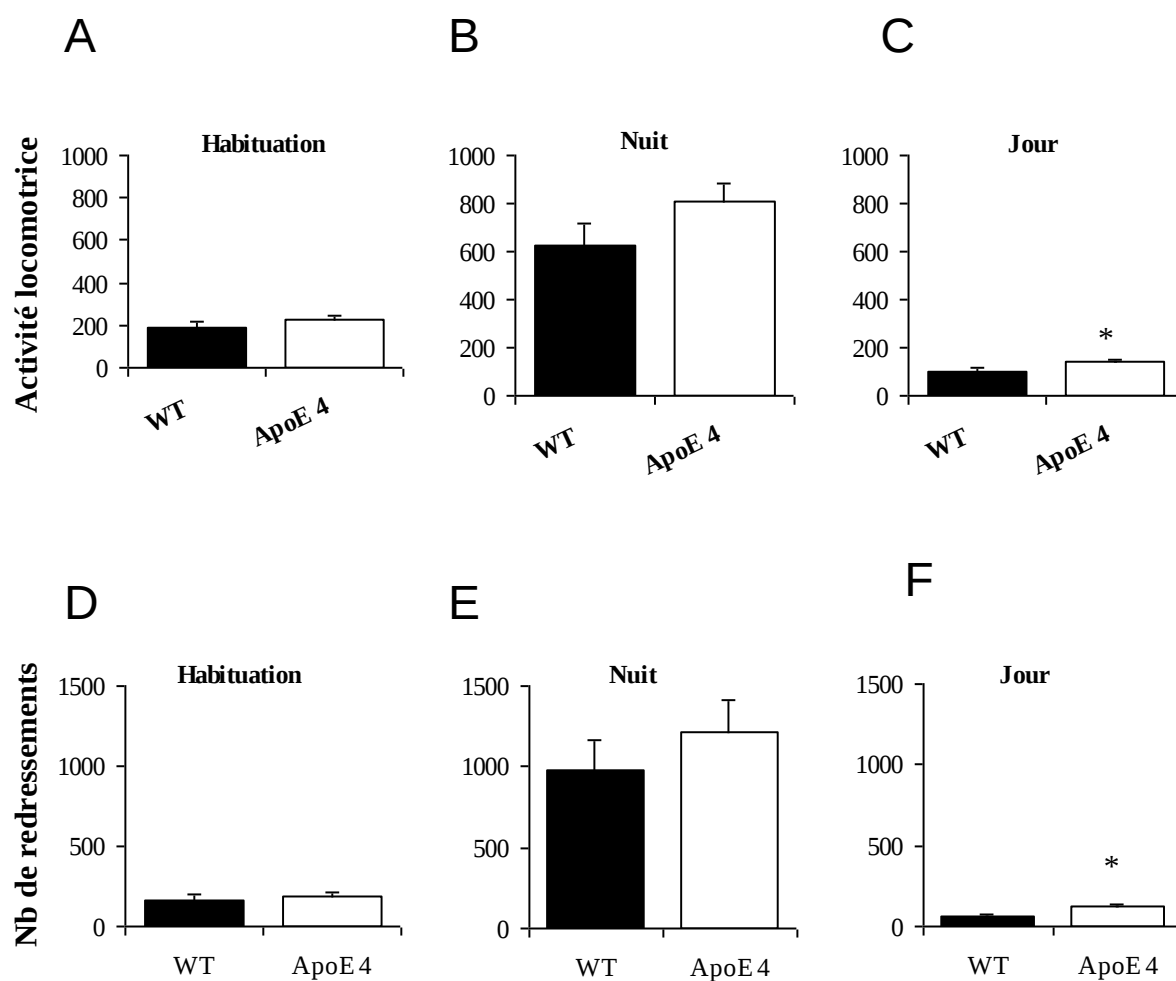


Figure 29: Activité locomotrice (A, B et C) et nombre de redressements (D, E et F) chez les souris ApoE4 femelles. A et D) lors de l'habituation, B et E) lors de la phase nocturne, C et F) lors de la phase diurne. * $p < 0.05$ vs WT, test t de Student.

(19h), ces deux paramètres voient leur activité augmenter de manière identique pour nos deux groupes, montrant une activité intense durant le début de cette phase nocturne perdurant quelques heures avant de décroître progressivement jusqu'à atteindre un niveau faible et constant lors de la phase diurne. On peut cependant remarquer que l'activité locomotrice (Fig. 28A) ainsi que le nombre de redressement des souris ApoE4 (Fig.28F) décroissent plus rapidement durant la phase nocturne, étant significativement plus bas entre 23h et 6h du matin [$t_{15} \leq -2.22$, $p < 0.05$], offrant une différence presque significative sur les mesures globales de ces activités nocturnes (activité locomotrice [$F(1,15) = 4.36$, $p = 0.054$] et redressements [$F(1,15) = 3.24$, $p = 0.09$]). L'activité locomotrice et le nombre de redressements sont également plus bas chez les souris ApoE4 mâles adultes que chez les souris WT sur la globalité de la phase diurne, [$F(1,15) \geq 6.20$, $p < 0.05$] (Fig. 28D et 28G).

Chez les femelles, l'activité locomotrice et le nombre de redressements sont similaires entre les deux génotypes lors des phases d'habituation (Fig. 29A et 29D) et de nuit (Fig. 29B et 29E) [$t_{19} \leq 1.57$, NS], mais sont significativement plus élevés chez les souris ApoE4 par rapport aux souris WT durant la phase de jour [$t_{19} \geq 2.154$, $p < 0.05$] (Fig. 29C et 29F).

La consommation d'eau est comparable entre les souris WT et ApoE4 aussi bien chez les mâles que chez les femelles adultes ($t_{15} = 0.98$, NS), celle de nourriture tend à être plus élevée chez les souris ApoE4 mâles que chez les souris WT ($t_{15} = 1.87$, $p = 0.08$) (données non présentées).

En conclusion, les résultats de cette expérience montrent que les souris ApoE4 mâles et femelles adultes ont un niveau d'habituation normal. D'autre part les souris ApoE4 mâles sont moins actives que les WT lors des phases nocturne et diurne, alors que les ApoE4 femelles

A

	Wild-type	ApoE4
Poids Corporel (g)	29,89 ± 0,71	28,81 ± 0,94
Température Rectale (°C)	37,43 ± 0,31	36,95 ± 0,27
Rotarod accéléré (s)	169,05 ± 15,72	185,33 ± 14,53
Réflexe de traction (s)	15,06 ± 5,10	12,85 ± 2,73
Force d'agrippement	7,93 ± 0,23	7,90 ± 0,33

B

	Wild-type	ApoE4
Poids Corporel (g)	21,74 ± 0,59	21,73 ± 0,37
Température Rectale (°C)	36,44 ± 0,16	36,36 ± 0,11
Rotarod accéléré (s)	170,70 ± 14,00	180,97 ± 10,63
Réflexe de traction (s)	7,93 ± 2,96	10,09 ± 3,65
Force d'agrippement	9,43 ± 0,28	8,93 ± 0,23

Tableau 8: État général et capacités motrices chez les souris ApoE4 mâles (A) et femelles (B).

manifestent une augmentation de l'activité lors de la phase diurne.

2. Évaluation de l'état général et des fonctions sensori-motrices

Observations cliniques et capacités motrices

Les observations cliniques n'ont révélé aucune différence entre les souris ApoE4 et WT, que ce soit pour les mâles ou les femelles, concernant les températures rectales et le poids [mâles ($t_{15} \leq 1.15$, NS) et femelles ($t_{19} \leq 0.46$, NS)] (Tableau 8). De plus, aucune anomalie apparente concernant l'aspect physique général ainsi que les capacités sensorielles ou vestibulaires n'a été observée. Concernant l'évaluation des capacités motrices spécifiques, la force d'agrippement, la latence pour se raccrocher au fil dans le test du réflexe de traction, ainsi que le temps de maintien sur le rotarod, ils sont similaires pour les deux groupes de souris WT et ApoE4, aussi bien chez les mâles ($t_{15} \leq 0.75$, NS) que les femelles ($t_{19} \leq 1.39$, NS) (Tableau 8). Ceci montre que la force musculaire et la coordination motrice ne sont pas affectées chez les souris ApoE4 mâles et femelles adultes.

Sensibilité à la douleur

Aussi bien dans le test de retrait de la queue que celui de la plaque chauffante, la latence de la première réaction à un stimulus douloureux de haute température est comparable entre les souris WT et ApoE4, aussi bien chez les mâles que chez les femelles [Mâles : ($t_{15} \leq 1.14$, NS ; Femelles : $t_{19} \leq 0.84$, NS) (Tableau 9). De la même façon, lorsqu'on prolonge le test de la plaque chauffante, les latences de saut observées sont similaires chez les souris WT et ApoE4 aussi bien chez les mâles ($t_{15} \leq 1.11$, NS) que chez les femelles ($t_{19} \leq 0.24$, NS) (Tableau 9). De plus, le seuil de sensibilité aux chocs électriques n'est pas affecté chez les souris ApoE4

A

		Wild-type	ApoE4
Tail Flick (s)		3,03 ± 0,44	3,30 ± 0,22
Plaque Chauffante (s)	Première réaction	9,21 ± 0,47	10,24 ± 0,67
	Saut	86,34 ± 9,67	103,72 ± 11,24
Seuil de sensibilité au choc électrique (mA)	Secouement	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,00
	Vocalisation	0,26 ± 0,03	0,26 ± 0,01
	Saut	1,00 ± 0,00	0,95 ± 0,03

B

		Wild-type	ApoE4
Tail Flick (s)		3,83 ± 0,21	3,77 ± 0,21
Plaque Chauffante (s)	Première réaction	9,42 ± 0,57	10,29 ± 0,79
	Saut	98,66 ± 12,91	102,14 ± 7,82
Seuil de sensibilité au choc électrique (mA)	Secouement	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,00
	Vocalisation	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01
	Saut	1 ± 0,00	0,99 ± 0,01

Tableau 9: Sensibilité à la douleur chez les souris ApoE4 mâles (A) et femelles (B).

quel que soit le sexe; l'intensité minimale de choc induisant le secouement de la patte, la vocalisation ou le saut sont comparables entre les génotypes (Mâles : $t_{15} \leq 1.541$, NS; Femelles : $t_{19} \leq 0.86$, NS) (Tableau 9).

Conclusion

Les résultats de ces expériences montrent que les souris ApoE4 mâles et femelles adultes ne présentent pas de modification notable de leur état de santé général, des réflexes neurologiques de base, des capacités motrices spécifiques ou de leur sensibilité à la douleur.

II. Effets de la mutation ApoE4-KI sur la réactivité émotionnelle dans différentes situations anxiogènes et de stress aigu

1. Test du champ ouvert ou open-field

Aussi bien chez les mâles que chez les femelles, l'activité locomotrice et le nombre de redressements sont comparables entre souris WT et ApoE4 adultes [$t \leq 0.71$, NS] (Fig. 30A, 30B, 30D et 30E). Le temps d'exploration de la partie centrale de l'open-field est également comparable entre les souris WT et ApoE4 mâles adultes ($t_{15} \leq 0.34$) (Fig. 30C et tableau 10). Chez les femelles, le pourcentage de temps passé dans le centre de l'arène et le nombre d'entrées dans le centre tendent à être plus élevés chez les souris ApoE4 par rapport aux souris WT ($0.5 < p < 0.10$) (Fig. 30F et tableau 10), suggérant que les souris ApoE4 femelles adultes ont tendance à être moins anxieuses dans ce test.

2. Test du labyrinthe en croix surélevé

Chez les mâles, les pourcentages d'entrées et de temps dans les bras ouverts (Fig. 31A-B) ainsi que le nombre d'explorations du vide sont comparables entre les génotypes ($t_{15} \leq 1.19$,

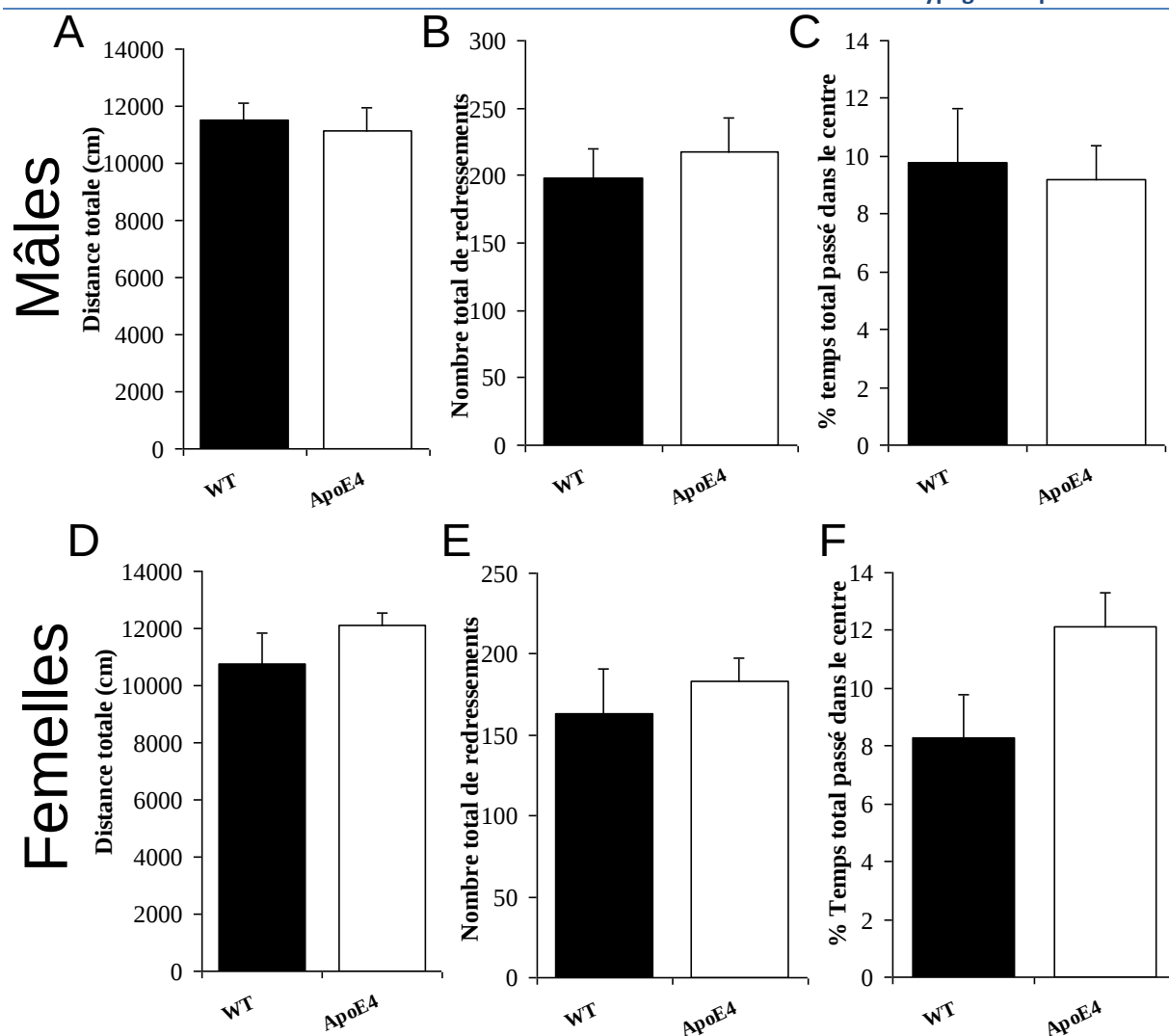


Figure 30: Activité locomotrice (A et D), nombre de redressements (B et E), et pourcentage de temps passé dans le centre (C et F) de l'open-field chez les souris ApoE4 mâles et femelles.

	Wild-type	ApoE4
Mâles	95.9 ± 11.2	90.0 ± 11.8
Femelles	84.1 ± 14.1	115.0 ± 11.2

Tableau 10: Nombre d'entrées dans le centre de l'open-field chez les souris ApoE4 mâles et femelles

NS). En revanche, les souris ApoE4 femelles, passent significativement moins de temps dans les bras ouverts que les souris WT ($t_{19}=2.56$, $p<0.01$) (Fig. 31F). Le pourcentage d'entrées dans les bras ouverts est également plus faible chez les souris ApoE4 femelles bien que la différence par rapport aux souris WT ne soit pas significative. Ces résultats suggèrent que les souris ApoE4 femelles adultes seraient plus anxieuses vis-à-vis du vide. Les nombres d'entrées dans les bras fermés et les nombres de redressement sont comparables entre les souris WT et ApoE4 mâles et femelles (données non présentées).

3. Test de la cage claire/obscur

Dans le test des cages claire/obscur, les souris ApoE4 mâles ont un pourcentage de temps dans la zone claire (Fig. 31C) et un nombre de transitions d'une zone à l'autre significativement plus élevés, ainsi qu'une latence d'entrée significativement inférieure dans la zone claire (Fig. 31D) que les souris WT ($t_{15}\geq 2.64$, $p<0.05$). Ces résultats montrent clairement que les souris ApoE4 mâles adultes ont moins d'appréhension vis-à-vis de la zone fortement éclairée. Cependant, ce résultat est à considérer avec précaution, les valeurs observées du pourcentage de temps pour les souris WT étant anormalement basses pour l'ensemble du groupe. Chez les femelles, le pourcentage de temps passé dans la zone fortement éclairée, la latence avant la première entrée dans la zone claire et le nombre de transitions d'une zone à l'autre sont similaires entre les deux génotypes ($t_{18} \leq 0.38$, NS) (Fig. 31G-H).

4. Test de la suspension caudale

Aussi bien chez les mâles que chez les femelles, il n'y a pas de différence entre les souris WT et ApoE4 concernant la durée d'immobilité et la latence d'immobilisation ($t \leq 0.94$, NS)

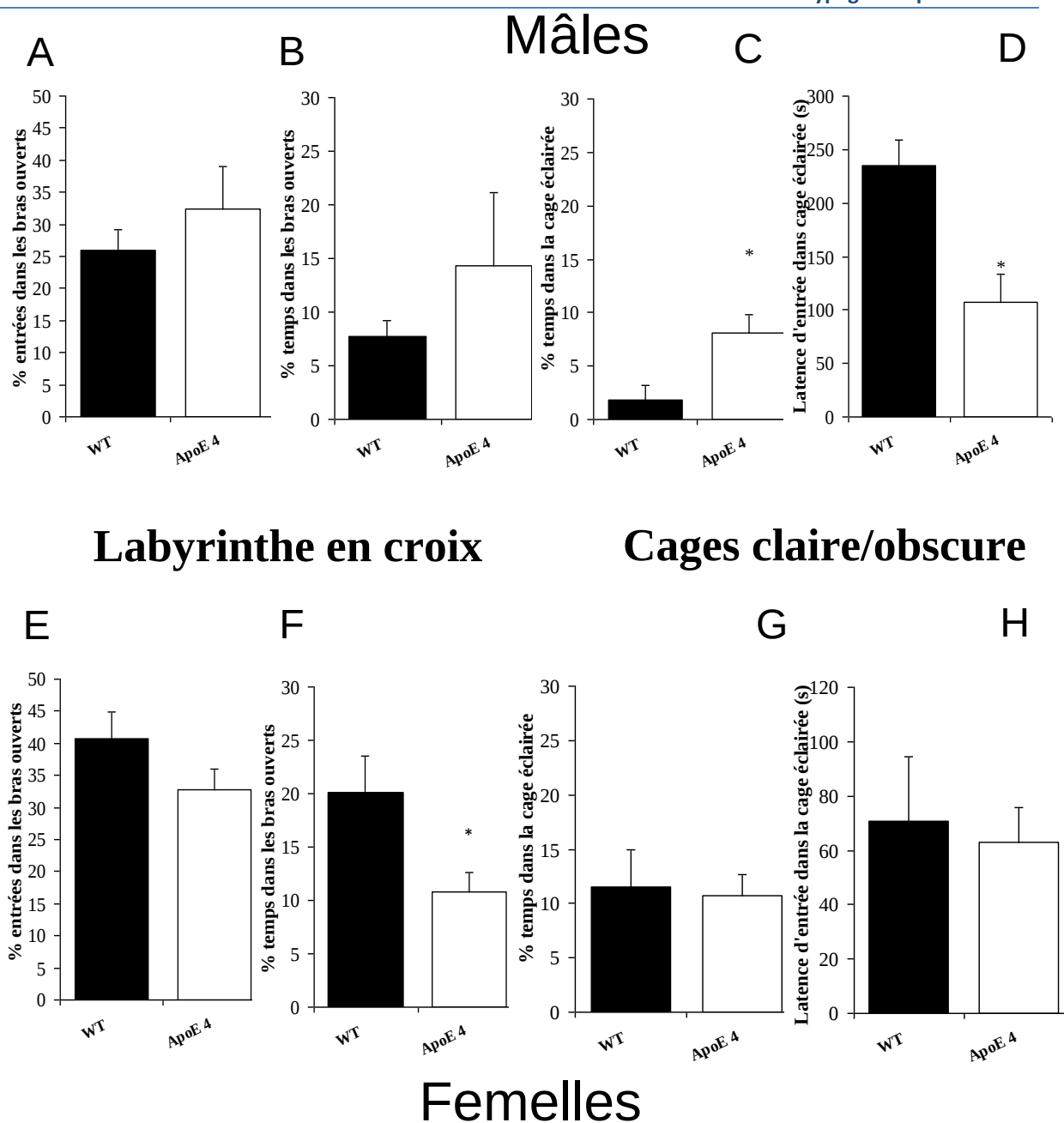


Figure 31: Pourcentage d'entrées (A et E) et pourcentage de temps (B et F) dans les bras ouverts dans le test du labyrinthe en croix surélevé ; et pourcentage de temps passé dans la cage éclairée (C et G) et latence d'entrée (D et H) dans le test des cages claire/obscur chez les souris ApoE4 mâles et femelles adultes.

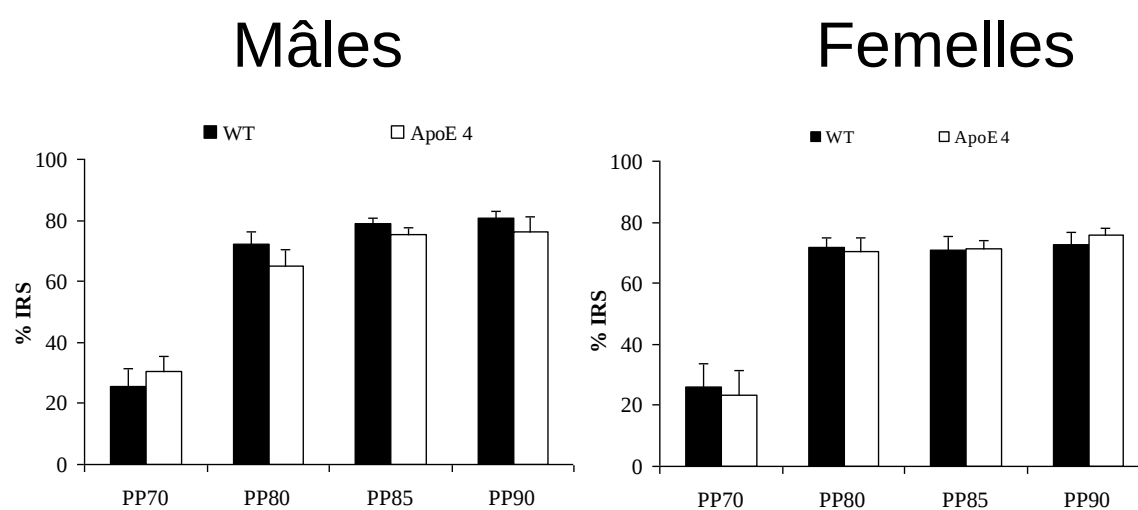


Figure 32: Pourcentage d'inhibition du réflexe de sursaut (%IRS) chez les souris ApoE4 mâles et femelles.

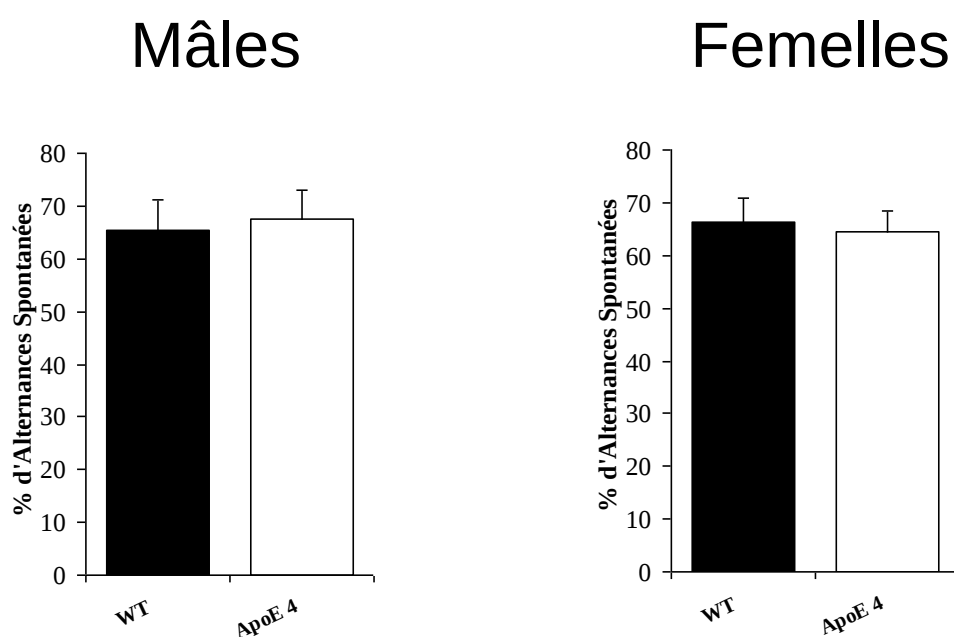


Figure 33: Pourcentage d'alternance spontanées dans le test du labyrinthe en Y chez les souris ApoE4 mâles et femelles.

(données non présentées). Ceci montre que la mutation ApoE4-KI n'affecte pas la susceptibilité à la résignation chez les souris mâles et femelles adultes.

III. Effets de la mutation ApoE4-KI sur les fonctions cognitives

1. Filtrage sensorimoteur : RS et IRS

Aussi bien chez les mâles que chez les femelles, l'amplitude de sursaut acoustique est comparable entre les souris WT et ApoE4 pour l'ensemble des stimuli incluant le stimulus induisant un sursaut (110dB) (données non présentées). Lorsque le stimulus ST110 est précédé par des préimpulsions de plus faible intensité, le pourcentage d'IRS est également comparable entre les souris WT et ApoE4 mâles et femelles [$F \leq 1,17$, NS] (Fig. 32). Ces résultats montrent que la mutation ApoE4-KI n'affecte ni le réflexe de sursaut ni le filtrage sensorimoteur chez les souris mâles et femelles adultes.

2. Test du labyrinthe en Y

Il n'y a pas de différence entre les souris WT et ApoE4 concernant le pourcentage d'alternances spontanées [Mâles : $t_{15}=0.28$, NS, Femelles : $t_{19}=0.28$, NS] (Fig. 33), montrant que la mémoire de travail n'est pas affectée par la mutation ApoE4-KI. De plus, l'activité locomotrice des souris, représentée par le nombre de bras visités durant le test, ainsi que la latence de sortie du bras de départ sont eux aussi similaires entre les deux génotypes aussi bien chez les mâles que chez les femelles ($t \leq 1.05$, NS).

3. Test de la piscine de Morris

Lorsque les animaux sont entraînés pour atteindre une plateforme cachée en utilisant les indices muraux extra-labyrinthe, la latence (Fig. 34A et 34D) et la distance parcourue pour

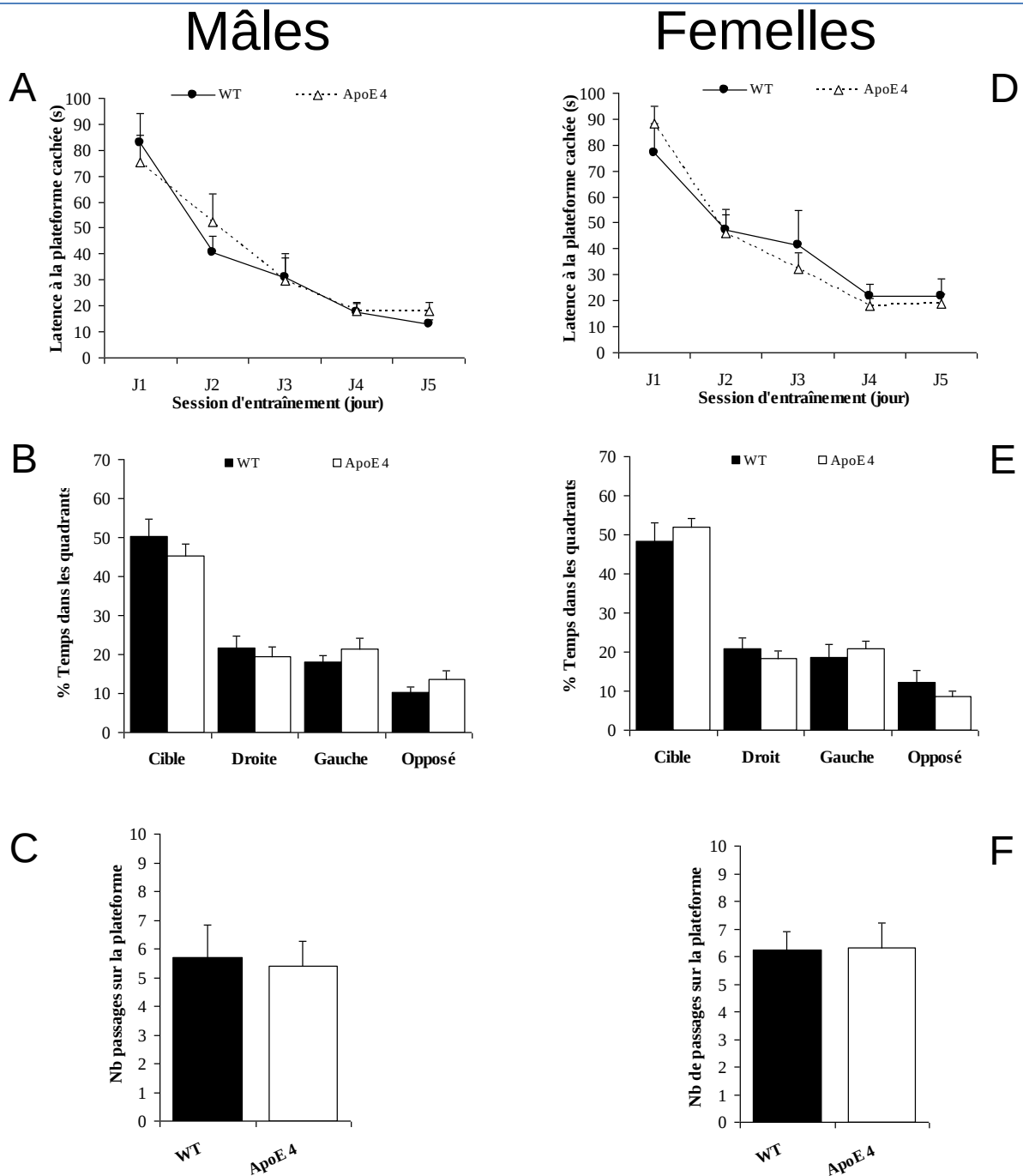


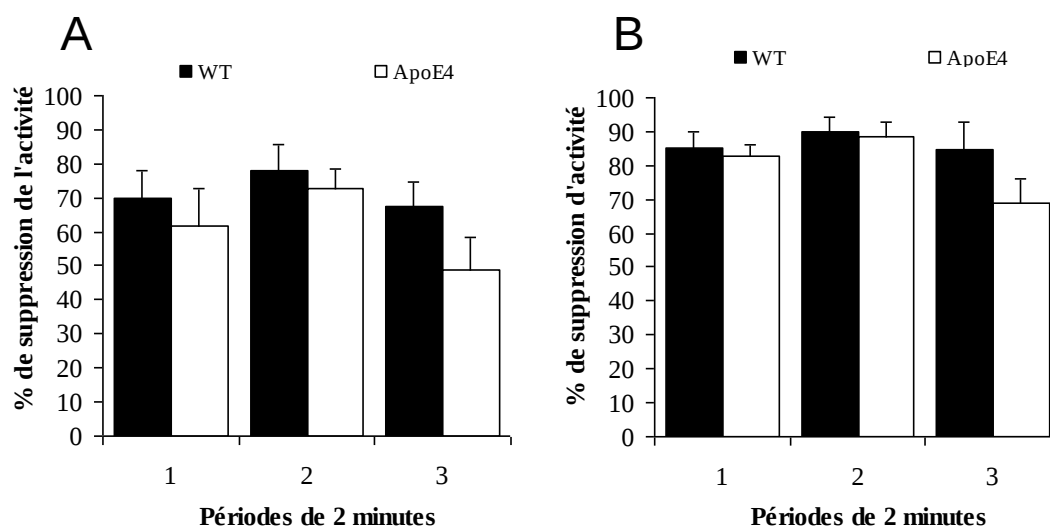
Figure 34: A et D) Évolution des latences pour atteindre la plateforme cachée lors de l'apprentissage dans le test de la piscine chez les souris ApoE4. B et E) Pourcentage de temps passé dans chacun des quadrants de la piscine lors de l'essai test. C et F) Nombre de passages lors de l'essai test à l'emplacement où se trouvait la plateforme lors de l'apprentissage.

trouver la plateforme diminuent au fur et à mesure des séances d'entraînement chez les souris WT et ApoE4 [Mâles : $F(4,60) \geq 23.30$, $p < 0.001$; Femelles : $F(4,76) \geq 24.10$, $p < 0.001$]. Par ailleurs, il n'y a pas de différence entre les souris WT et ApoE4 pour ces paramètres [Mâles : $F(1,15) \leq 0.20$, NS ; Femelles : $F(1,19) \leq 1.33$, NS]. Lorsque la plateforme est retirée lors d'un essai test à la fin de l'entraînement, les groupes WT et ApoE4 manifestent une préférence pour le quadrant cible (dans lequel la plateforme se trouvait lors de l'acquisition) par rapport aux autres quadrants [Mâles : $F(3,45) = 48.06$, $p < 0.001$; Femelles : $F(3,57) = 68.09$, $p < 0.001$], sans différence liée au génotype [Mâles : Génotypes $F(1,15) = 2.44$, NS ; Interaction Génotype*Quadrant $F(3,45) = 0.81$, NS ; Femelles: Génotype : $F(1,19) = 0.42$, Interaction Génotype*Quadrant $F(3,57) = 0.69$, NS]) (Fig. 34B et 34E). De plus, le nombre de passages à l'emplacement théorique de la plateforme est similaire entre les génotypes (Mâles : $t_{15} = 1.29$, NS ; Femelles : $t_{19} = 0.09$, NS) (Fig. 34C et 34F). Ceci montre que les souris ApoE4 mâles et femelles adultes manifestent une performance d'apprentissage spatial comparable à celle des souris WT. Enfin, lorsque la tâche est modifiée, et que la position de la plateforme est indiquée par un drapeau, aussi bien les souris WT que ApoE4 sont capables d'assimiler très vite la nouvelle règle. Aucune différence n'a été détectée entre les génotypes (données non présentées).

4. Test du conditionnement de peur

Chez les mâles comme chez les femelles, les souris WT et ApoE4 ont un niveau d'activité basal comparable lors de l'habituation aux cages de conditionnement (données non présentées). Lorsque les souris sont à nouveau placées dans le même contexte expérimental 24h après le conditionnement, aussi bien les souris WT que les souris ApoE4 mâles et

Mémoire contextuelle



Mémoire indicée

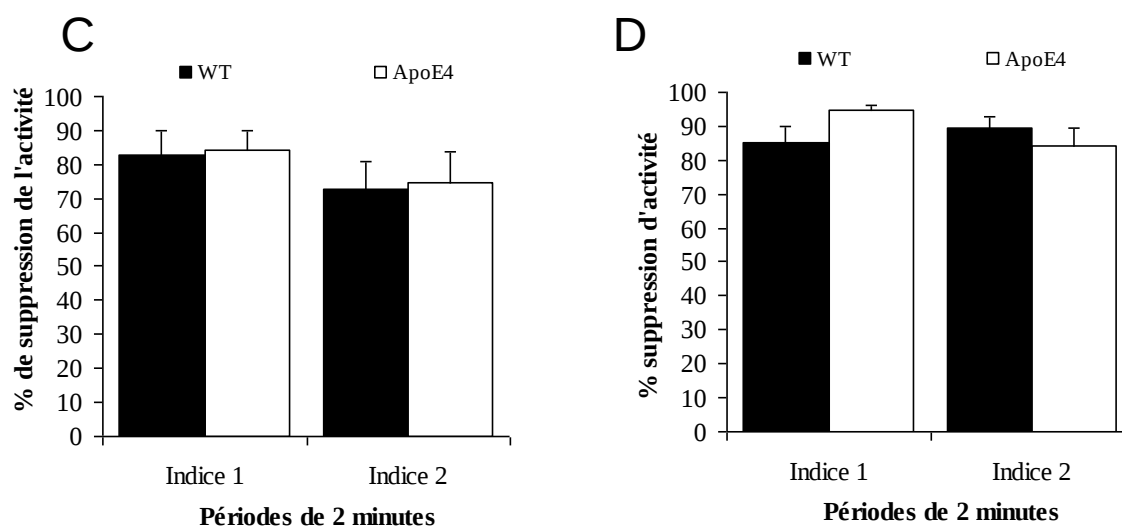


Figure 35: Pourcentage de suppression d'activité (freezing) lors du test au contexte (A chez les mâles, B chez les femelles) et lors de la présentation des indices (C chez les mâles et D chez les femelles).

femelles manifestent une diminution significative de leur activité comparativement au niveau de base, indiquant qu'elles se rappellent bien du contexte dans lequel elles ont été conditionnées. Par ailleurs, le pourcentage de freezing au contexte est comparable entre les génotypes [Mâles : $F(1,15)=0.99$, NS ; Femelles : $F(1,19)=1.34$, NS] (Fig. 35A et 35B). Lorsque les souris sont placées dans un nouveau contexte, le pourcentage de freezing lors de la présentation du SC est également comparable entre les génotypes [Mâles : $F(1,15)=0.04$, NS; Femelles : $F(1,19)=0.03$, NS] (Fig. 35C et 35D). Ces résultats montrent que la mutation ApoE4-KI n'affecte pas la mémoire émotionnelle contextuelle et indicée chez les souris mâles et femelles adultes.

IV. Effets de la mutation ApoE4-KI sur la sensibilité épileptique

L'injection i.p. de PTZ à la dose de 50 mg/kg a entraîné chez les animaux des différents génotypes l'apparition de crises myocloniques, cloniques ou toniques avec une sévérité et des proportions comparables entre les souris WT et ApoE4 mâles et femelles [$\chi^2 \leq 0.96$, NS] (données non présentées). De plus, les latences d'apparition des crises clonico-toniques sont également comparables entre les génotypes ($t \leq 0.65$, NS). Ceci suggère que la mutation ApoE4-KI n'affecte pas la susceptibilité aux crises induites par le PTZ chez les souris mâles et femelles adultes.

Conclusion

Les souris ApoE4 mâles adultes manifestent une diminution significative de leur activité exploratoire lors des phases nocturnes et diurnes, alors que les souris ApoE4 femelles manifestent une augmentation de l'activité diurne. D'autre part, l'état de santé général, les capacités motrices spécifiques, la sensibilité à la douleur et la susceptibilité aux crises

épileptiques ne sont pas affectés par la mutation ApoE4-KI chez les mâles et les femelles. L'analyse des comportements émotionnels montre que les souris ApoE4 mâles présentent une diminution de l'anxiété dans le test des cages claire/obscur, alors que les souris ApoE4 femelles seraient plus anxieuses vis-à-vis du vide dans le test du labyrinthe en croix surélevé. En ce qui concerne les fonctions cognitives, le filtrage sensorimoteur, la mémoire de travail, l'apprentissage spatial et la mémoire émotionnelle contextuelle et indicée, ils ne sont pas affectés par la mutation ApoE4-KI chez la souris adulte dans nos conditions expérimentales.

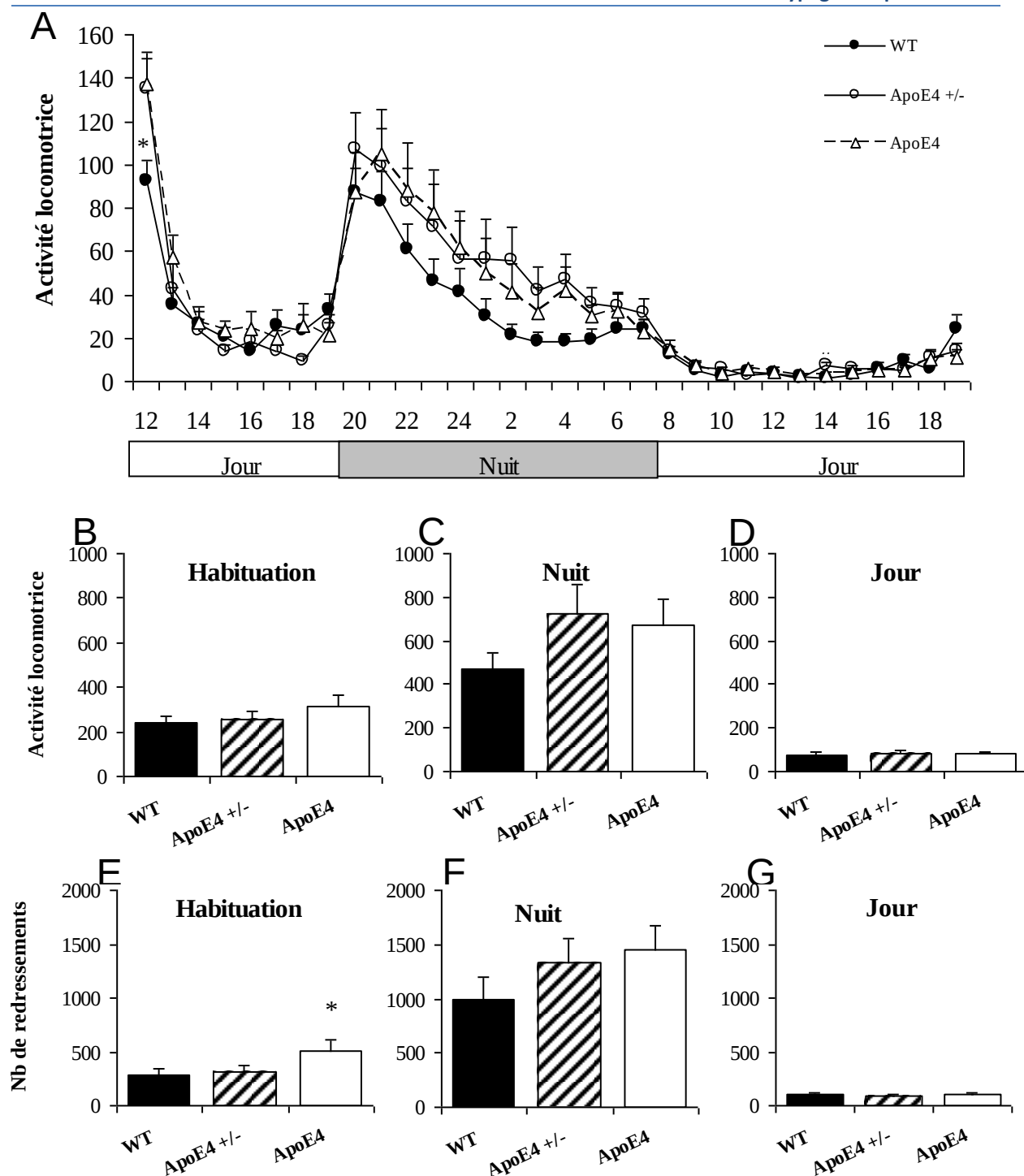


Figure 36: Activité locomotrice et nombre de redressements chez les souris ApoE4 mâles âgées. A) Évolution de l'activité locomotrice lors des 32h de test ; B) Activité locomotrice totale lors de l'habituation ; C) lors de la phase nocturne ; D) lors de la phase diurne ; E) Nombre de redressements lors de l'habituation, F) lors de la phase nocturne ; G) lors de la phase diurne. * $p < 0.05$ vs WT, test de Fisher.

B. Étude comportementale des effets du vieillissement sur les souris

ApoE4 mâles et femelles

Pour chacun des deux sexes, trois groupes de souris âgées d'environ un an et demi (18-20 mois) ont été utilisés ; un groupe WT, un groupe hétérozygote (ApoE4-WT/KI), et un groupe homozygote pour la mutation ApoE4 (ApoE4-KI/KI) (n=14-18 pour les mâles, n=9-17 pour les femelles). Les tests de reconnaissance d'objets et de la piscine de Morris ont été réalisés sur une cohorte supplémentaire de souris mâles uniquement.

I. Effets de la mutation ApoE4-KI sur l'état général, l'activité circadienne et les capacités sensorimotrices

1. Activité circadienne

Pour les deux sexes, les mesures d'activité spontanée et de consommation en eau et nourriture ont été effectuées sur une période de 32 heures, incluant ainsi un cycle jour/nuit complet, et ses trois phases : habituation, phase nocturne et phase diurne.

Le graphique représentant l'évolution de l'activité locomotrice chez les mâles (Fig. 36A) montre que celle-ci est plus élevée durant la première heure de test (phase initiale d'exploration), qui décroît progressivement et significativement jusqu'à la fin de l'habituation pour les trois génotypes [$F(6,282) = 3.828$, $p < 0.01$]. On observe aussi que les souris ApoE4 mâles homozygotes et hétérozygotes âgées ont une activité plus importante que celle des souris WT durant la première heure de test ([$F(2,47) = 4.16$, $p < 0.05$, Fisher $p < 0.05$ vs WT] (Fig. 36A), même si le profil général durant cette phase ne présente pas de différence liée aux

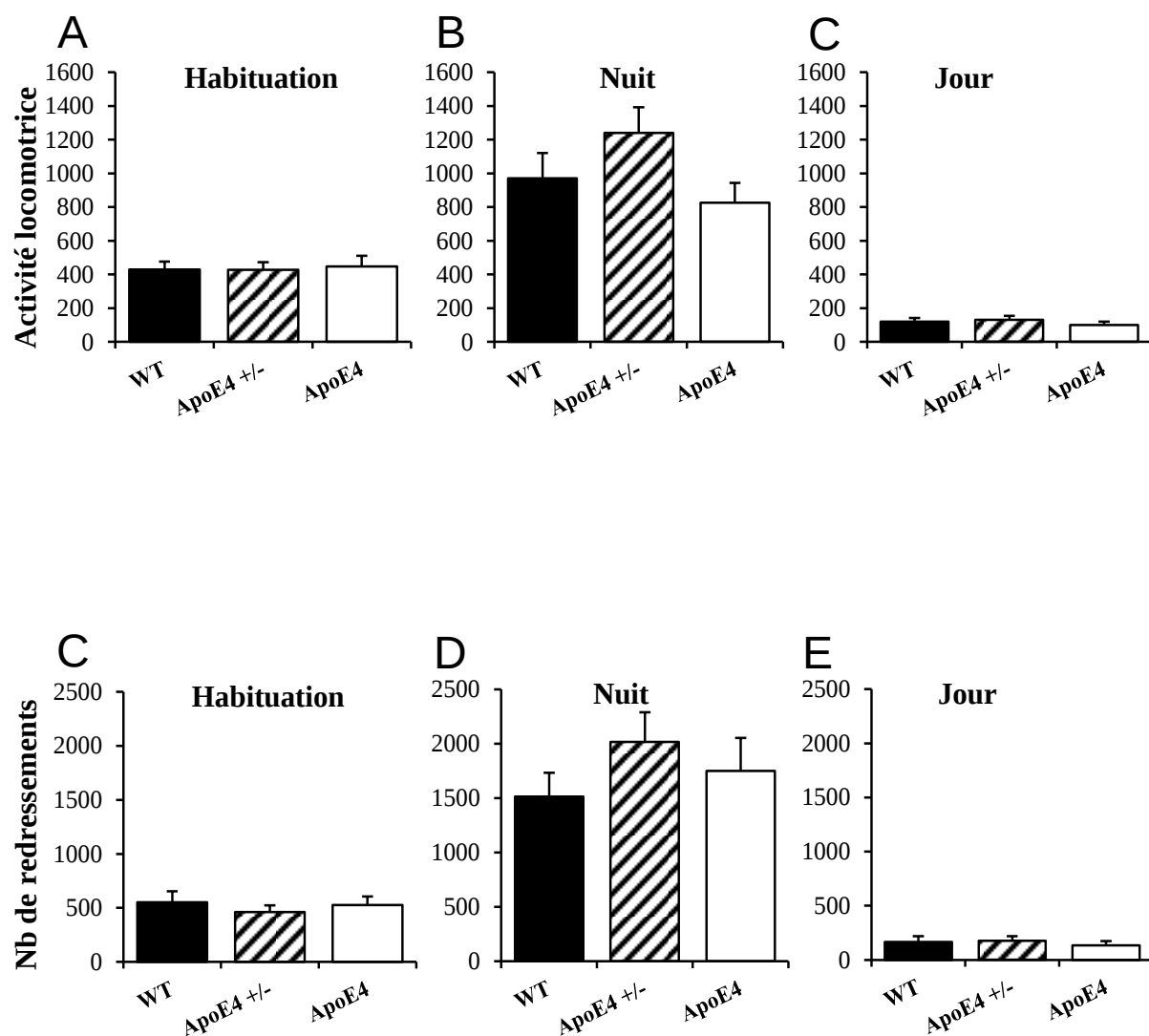


Figure 37: Activité locomotrice et nombre de redressements chez les souris ApoE4 femelles âgées. A et D) lors de l'habituation ; B et E) lors de la phase nocturne ; C et F) lors de la phase diurne.

génotypes [$F(2,47) = 0.95$, NS] (Fig. 36B). D'autre part, il n'y a pas de différence d'activité locomotrice entre les génotypes lors de la phase nocturne [$F(2,47)=1.43$, NS] (Fig. 36C) et celle diurne [$F(2,47)=0.13$, NS] (Fig. 36D). Le nombre de redressements est cependant plus élevé chez les souris ApoE4 homozygotes et hétérozygotes mâles âgées lors de la première heure d'habituation [$F(3,47)=4.62$, $p<0.05$, Fisher $p<0.05$ vs WT] (données non présentées). Le nombre de redressements est aussi plus élevé sur la totalité de l'habituation chez les souris ApoE4 mâles homozygotes ($p<0.05$, Fisher) (Fig. 36E), mais reste comparable entre les génotypes lors des phases nocturne et diurne [$F(2,47)\leq 1.24$, NS] (Fig. 36F et 36G).

Chez les femelles âgées, il n'y a pas de différence entre les génotypes concernant l'activité locomotrice et le nombre de redressement pour aucune des phases du cycle [$F(2,34)=2.01$, NS] (Fig. 37).

Les consommations en nourriture et en eau sont également comparables entre les souris WT et ApoE4 âgées aussi bien chez les mâles que chez les femelles [$F\leq 1.51$, NS] (données non présentées).

En conclusion, les résultats de ces expériences montrent que les souris ApoE4 homozygotes et hétérozygotes sont plus actives que les contrôles lors de la première heure de test, suggérant une réactivité exagérée lorsqu'elles sont placées dans un nouvel environnement. Par ailleurs, le rythme biologique et le niveau d'activité global ne sont pas affectés chez les souris ApoE4 mâles et femelles à l'âge d'un an et demi.

2. Évaluation de l'état général et des fonctions sensori-motrices

A

	Wild-type	ApoE4 +/-	ApoE4
Poids Corporel (g)	33,70 ± 0,71	33,78 ± 1,01	32,32 ± 0,79
Température Rectale (°C)	36,31 ± 0,19	35,96 ± 0,15	35,71 ± 0,21
Rotarod accéléré (s)	112,70 ± 8,28	110,17 ± 7,05	109,71 ± 7,16
Réflexe de traction (s)	51,59 ± 2,51	54,53 ± 1,83	41,72 ± 4,14
Force d'agrippement	6,32 ± 0,17	6,21 ± 0,29	6,47 ± 0,19

B

	Wild-type	ApoE4 +/-	ApoE4
Poids Corporel (g)	26,17 ± 0,98	27,06 ± 0,91	25,16 ± 0,90
Température Rectale (°C)	36,38 ± 0,11	36,81 ± 0,14	36,49 ± 0,26
Rotarod accéléré (s)	115,21 ± 11,59	119,37 ± 6,67	139,67 ± 14,37
Réflexe de traction (s)	34,49 ± 5,74	37,64 ± 4,77	43,17 ± 7,53
Force d'agrippement	7,63 ± 0,30	7,42 ± 0,25	7,65 ± 0,42

Tableau 11: État général et capacités motrices chez les souris ApoE4 mâles (A) et femelles (B)

âgées d'un an et demi. *p<0.05 vs WT, Fisher

Observations cliniques et capacités motrices

Chez les mâles âgés, la température rectale tend à différer entre les génotypes [$F(2,47)=2.70$, $p=0.08$]; les souris ApoE4 homozygotes et hétérozygotes présentant une température inférieure à celle des souris WT (Tableau 11A). En dehors de cela, les souris ApoE4 mâles et femelles âgées ont un poids comparable à celui des souris WT [Mâles : $F(2,47) = 0.82$, NS ; femelles : $F(2,34) = 0.96$, NS], et ne présentent aucune anomalie apparente au niveau de l'aspect physique général ou des capacités sensorielles ou vestibulaires.

L'évaluation des capacités motrices n'a révélé aucune différence entre les génotypes dans le temps de maintien sur le rotarod et la force d'agrippement aussi bien chez les mâles [$F(2,47) \leq 0.32$, NS] que chez les femelles [$F(2,34) \leq 1.38$, NS]. En revanche, les souris mâles ApoE4 homozygotes présentent de meilleures performances au test du réflexe de traction, mettant moins de temps à se hisser que les souris WT et hétérozygotes ([$F(2,47) = 5.32$, $p<0.01$, Fisher $p<0.05$), alors qu'aucune différence ne ressort dans ce test chez les souris femelles [$F(2,34)= 0.46$, NS]. Néanmoins, ce résultat est à prendre avec du recul, les 4/5 des mâles WT et les 5/6 des mâles ApoE4-KI/WT ayant échoué à chacun des essais, contre seulement le 1/3 des souris ApoE4-KI.

Sensibilité à la douleur

Chez les souris mâles comme femelles, aucune différence n'a été observée dans les latences de retrait de la queue dans le test du tail-flick et de la première réaction à la plaque chauffante [Mâles : $F(2,47)\leq 0.98$, NS] ; Femelles : $F(2,34)\leq 0.57$, NS] (données non présentées).

Conclusion

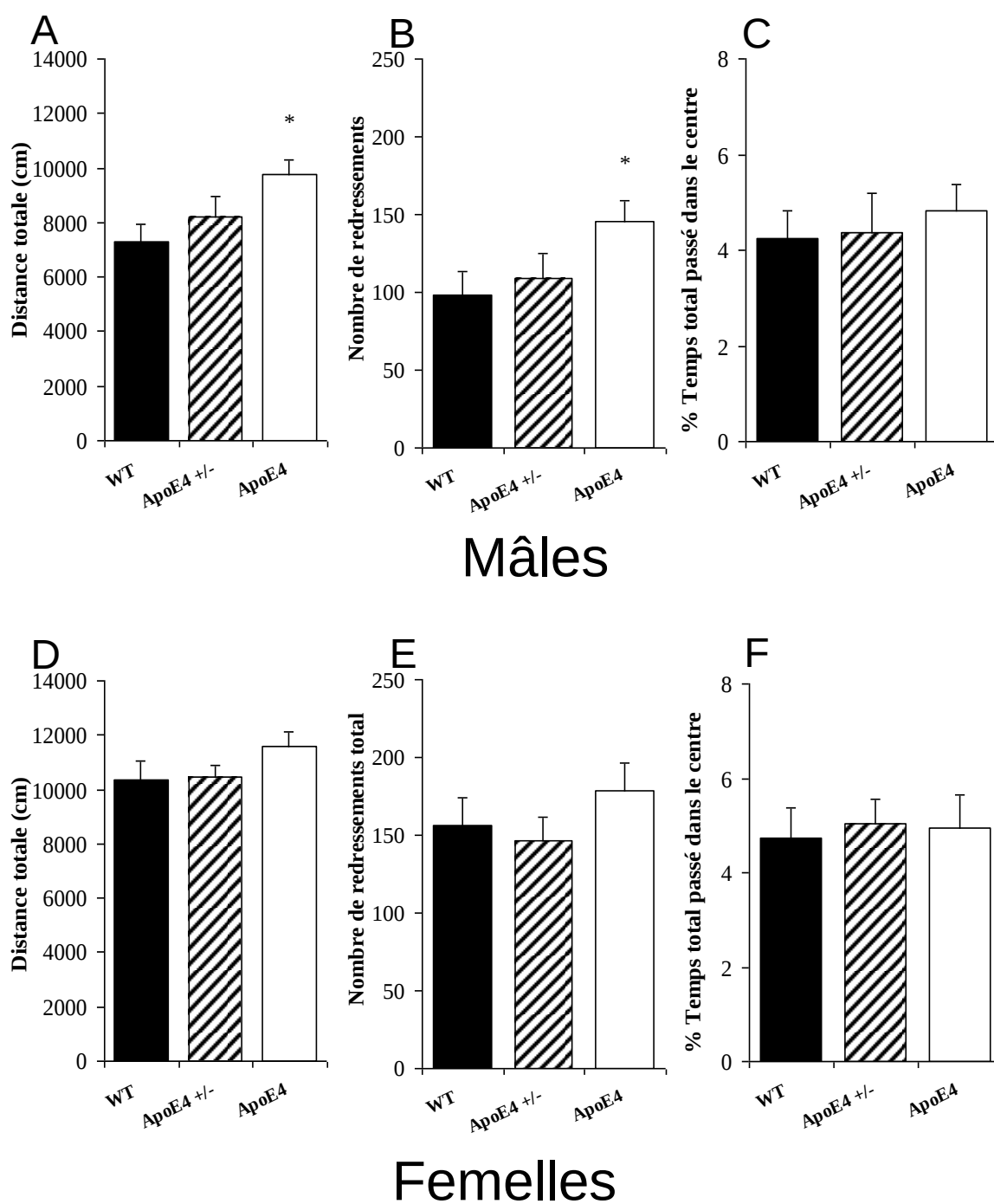


Figure 38: Activité locomotrice (A et D), nombre de redressements (B et E), et pourcentage de temps passé dans le centre (C et F) de l'open-field chez les souris ApoE4 mâles et femelles âgées. * $p < 0.05$ vs WT, Test de Fisher.

Il ressort de ces expériences que les souris mâles ApoE4 homozygotes âgées d'un an et demi manifestent de meilleures performances dans le test de reflexe de traction pouvant suggérer une meilleure coordination et plus de force de traction. Toutefois, ces souris manifestent des performances comparables aux contrôles dans le test du rotarod classiquement connu pour évaluer la coordination motrice, et dans le test d'agrippement spécifique pour la mesure de la force musculaire. Les bonnes performances relatives des souris ApoE4 mâles âgées seraient plutôt dues aux mauvaises performances des contrôles. Par ailleurs, l'état de santé général et la sensibilité à la douleur ne sont pas non plus affectés chez les souris ApoE4 mâles et femelles à l'âge d'un an et demi.

II. Effets de la mutation ApoE4-KI sur la réactivité émotionnelle dans différentes situations anxiogènes et de stress aigu

1. Test du champ ouvert ou open-field

Chez les mâles, l'activité locomotrice diffère significativement entre les génotypes [$F(2,47)3.41$, $p<0.05$]. En effet, les souris ApoE4 homozygotes mâles âgées sont plus actives que les souris WT ($p<0.05$, Fisher) (Fig. 38A). Le nombre de redressements est également plus élevé chez les souris ApoE4 mâles ($p<0.05$, Fisher) (Fig. 38B). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans le test d'activité circadienne. Chez les femelles, l'activité locomotrice et le nombre de redressements sont comparables entre les souris WT et ApoE4 âgées [$F(2,34)\leq 1.34$, NS] (Fig. 38D et 38E). Enfin, le nombre d'entrées (données non présentées) et le pourcentage de temps passé dans le centre de l'open-field sont comparables entre les génotypes chez les mâles comme chez les femelles [$F\leq 1.55$, NS] (Fig. 38C et 38F), montrant que la mutation ApoE4 n'affecte pas l'anxiété chez les souris âgées dans ce test.

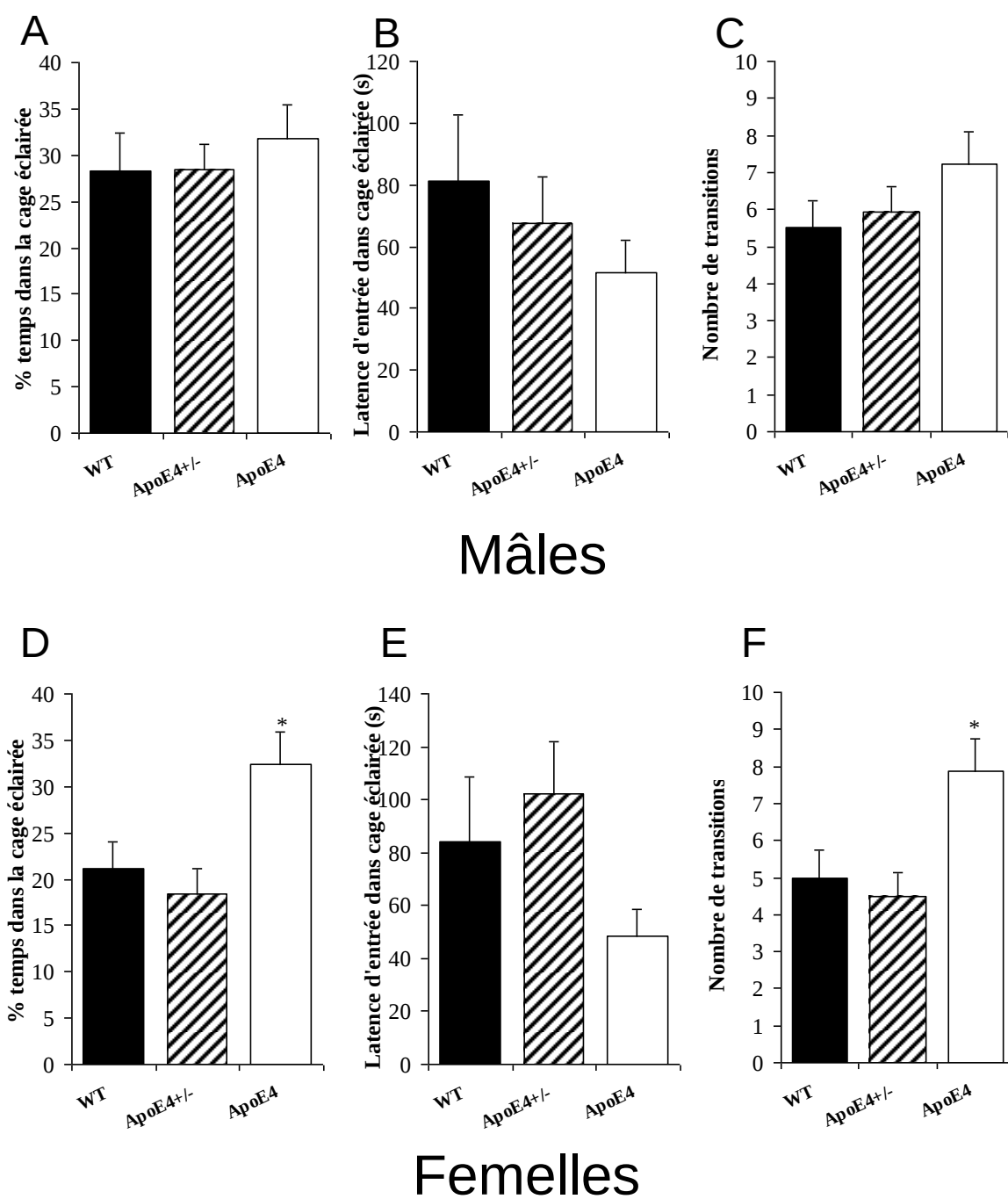


Figure 39: Pourcentage de temps dans la cage éclairée (A et D), latence d'entrée dans la cage éclairée (B et E), et nombre de transitions de la cage éclairée vers la cage obscure (C et F) chez les souris ApoE4 mâles et femelles âgées. * $p < 0.05$ vs WT, Test de Fisher.

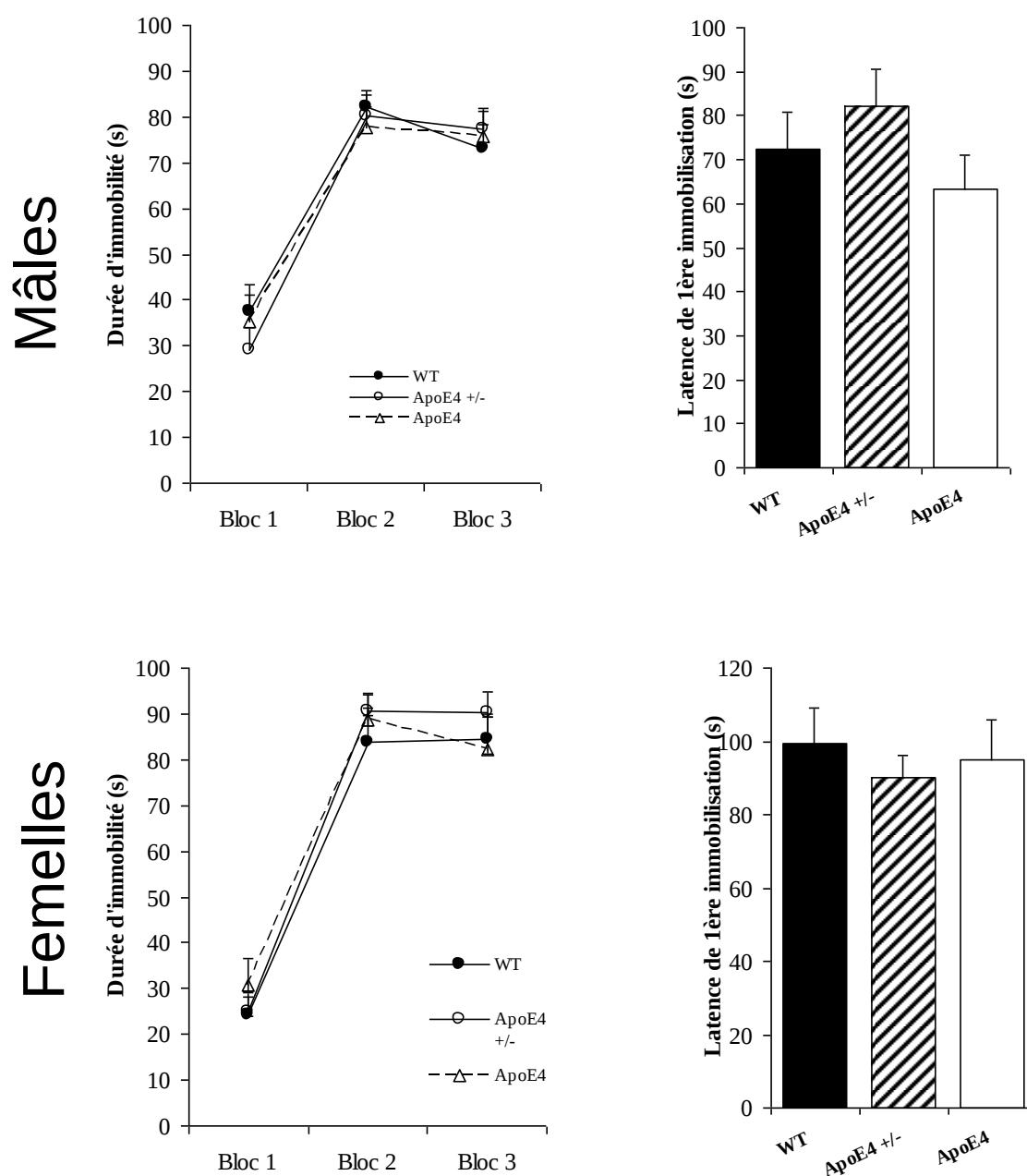


Figure 40: Durée d'immobilité et latence de la première immobilisation dans le test de suspension caudale chez les souris ApoE4 mâles et femelles âgées.

2. Test de la cage claire/obscur

Chez les mâles, il n'y a pas de différence entre les génotypes concernant le pourcentage de temps passé et la latence d'entrée dans la cage éclairée, ainsi que dans le nombre de transitions entre la cage obscure et celle éclairée [$F(2,47) \leq 1.31$, NS] (Fig. 39A-C). En revanche, les souris ApoE4-KI femelles passent plus de temps que les souris WT dans la cage éclairée [$F(2,34) = 5.66$, $p < 0.01$, Fisher $p < 0.05$] (Fig. 39D) et effectuent aussi plus de passages d'une cage à l'autre [$F(2,34) = 3.84$, $p < 0.05$, Fisher, $p < 0.05$] (Fig. 39F). De plus, lorsque les souris ApoE4-KI sont dans la cage éclairée, elles ont une activité de redressements plus élevée que les souris WT [$F(2,34) = 3.61$, $p < 0.05$, Fisher, $p < 0.05$] (données non présentées). L'ensemble de ces résultats montrent que la mutation ApoE4-KI entraîne une diminution de l'anxiété dans une situation fortement éclairée chez les souris femelles âgées.

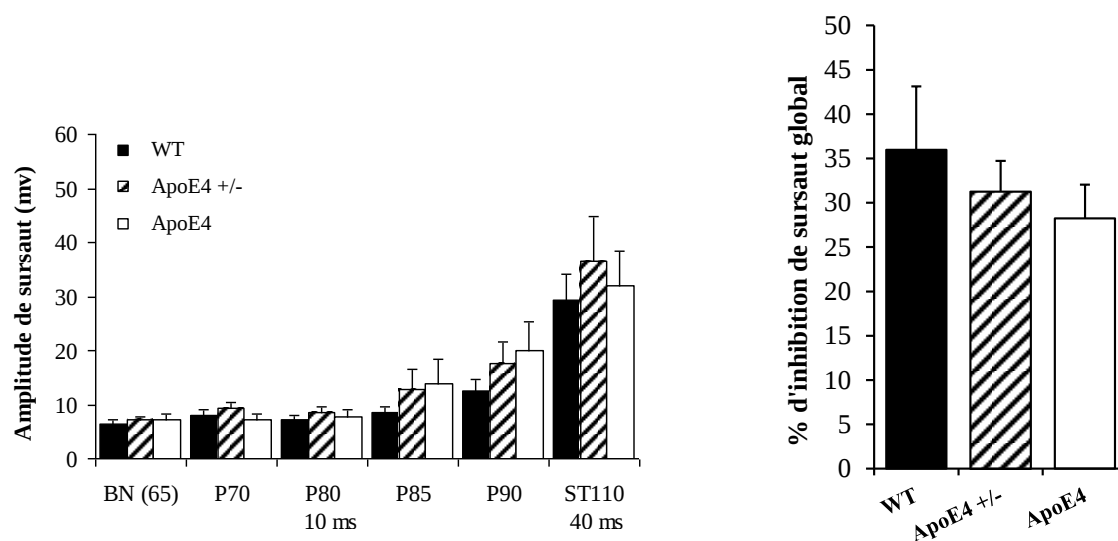
3. Test de la suspension caudale

Le profil d'immobilité est comparable entre les souris WT et ApoE4 âgées aussi bien chez les mâles que chez les femelles [Mâles : [$F(2,46) = 0.08$, NS] ; Femelles : [$F(2,34) = 0.44$, NS] (Fig. 40). De même, aucune différence n'a été observée entre les trois groupes dans la latence de la première immobilisation [Mâles : [$F(2,46) = 1.20$, NS] ; Femelles : [$F(2,34) = 0.33$, NS] (Fig. 40). Ces résultats montrent que la mutation ApoE4-KI n'affecte pas la susceptibilité à la résignation chez les souris âgées aussi bien mâles que femelles.

III. Effets de la mutation ApoE4-KI sur les fonctions cognitives

1. Filtrage sensorimoteur : RS et IRS

Mâles



Femelles

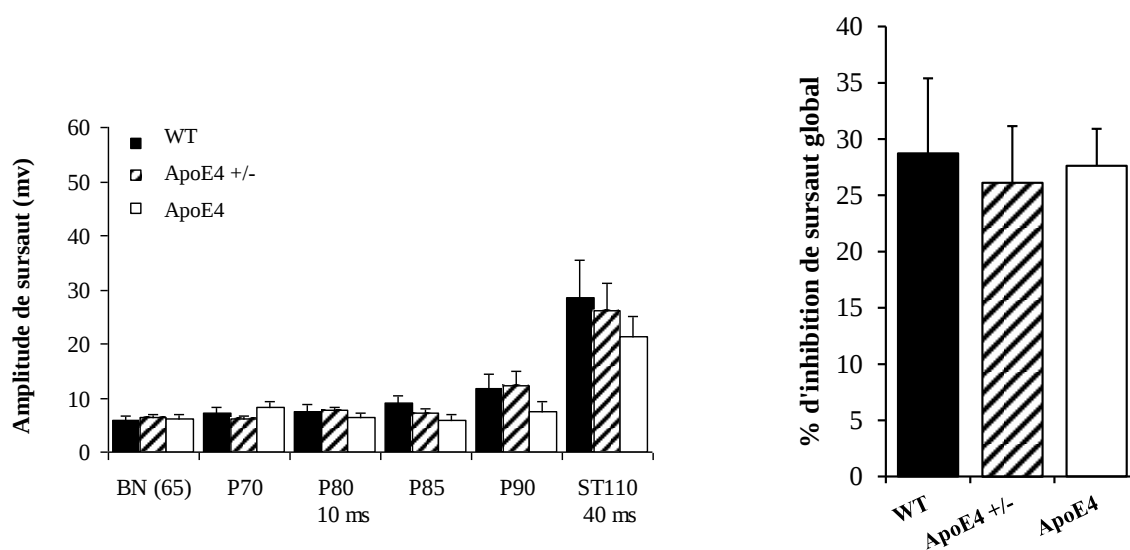


Figure 41: Réactivité de sursaut acoustique et pourcentage d'inhibition du réflexe de sursaut (%IRS) chez les souris ApoE4 mâles et femelles âgées.

Aussi bien chez les mâles que chez les femelles, l'amplitude de sursaut acoustique est comparable entre les souris WT et ApoE4 âgées pour l'ensemble des stimuli incluant le stimulus induisant le sursaut (ST110) (Fig. 41). Lorsque le ST110 est précédé par des préimpulsions de plus faible intensité, le pourcentage d'IRS est également comparable entre les souris WT et ApoE4 mâles et femelles (Fig. 41). Ces résultats montrent que la mutation ApoE4-KI n'affecte pas le réflexe de sursaut ni le filtrage sensorimoteur chez les souris mâles et femelles à l'âge d'un an et demi. Il est à noter que certains animaux n'ont pas réagi aux stimuli et ont été exclus des analyses.

2. Test du labyrinthe en Y

Aussi bien chez les mâles que chez les femelles, le pourcentage d'alternances spontanées ne montre pas de différence liée au génotype [mâles : $F(2,47)=0.53$ NS ; Femelles : $F(2,34)=0.26$, NS] (Fig. 42), montrant que la mémoire de travail à court terme n'est pas affectée par la mutation ApoE4-KI chez les souris âgées. De plus, l'activité exploratoire dans le labyrinthe est aussi similaire entre les groupes [Mâles : $F(2,47)\leq 2.09$ NS ; Femelles : $F(2,34)\leq 2.42$, NS].

3. Test de reconnaissance d'objet

La durée d'exploration de l'objet familier lors de l'essai d'acquisition est comparable entre les génotypes [$F(2,19)=0.77$, NS] (données non présentées). Lorsque les souris sont replacées dans l'open-field en présence de l'objet familier et d'un objet nouveau lors d'un essai de rétention effectué 3h après l'acquisition, la performance de reconnaissance est comparable entre les génotypes [$F(2,19)=0.09$, NS] (Fig.43A). Aussi bien les souris WT que les souris ApoE4 mâles ont une performance de reconnaissance supérieure au hasard ($p<0.05$, test t pour un groupe), explorant significativement plus le nouvel objet que l'objet familier ($p<0.05$,

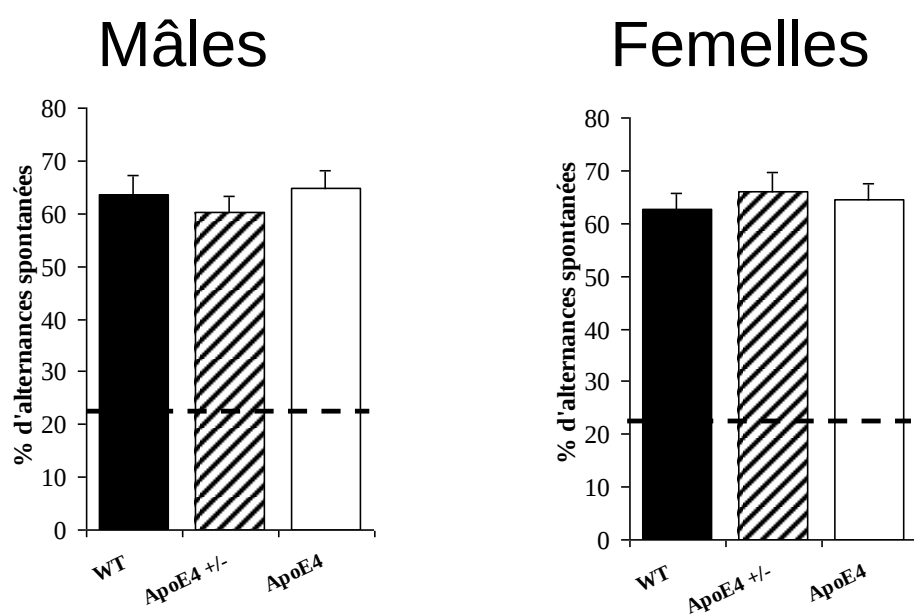


Figure 42: Pourcentage d'alternances spontanées dans le test du labyrinthe en Y chez les souris ApoE4 mâles et femelles âgées.

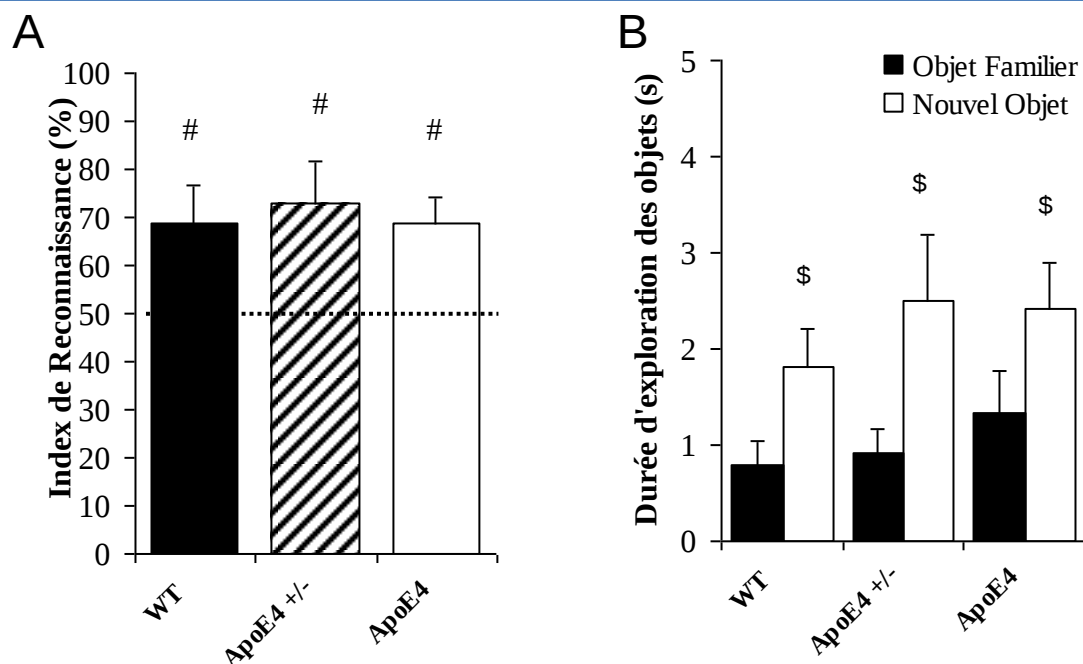


Figure 43: Indice de reconnaissance (A) et durée d'exploration des objets (B) lors de l'essai de rétention chez les souris ApoE4 mâles âgées. # $p < 0.05$ vs. hasard (test t pour un groupe) ; \$ $p < 0.05$ vs objet familier (test t apparié).

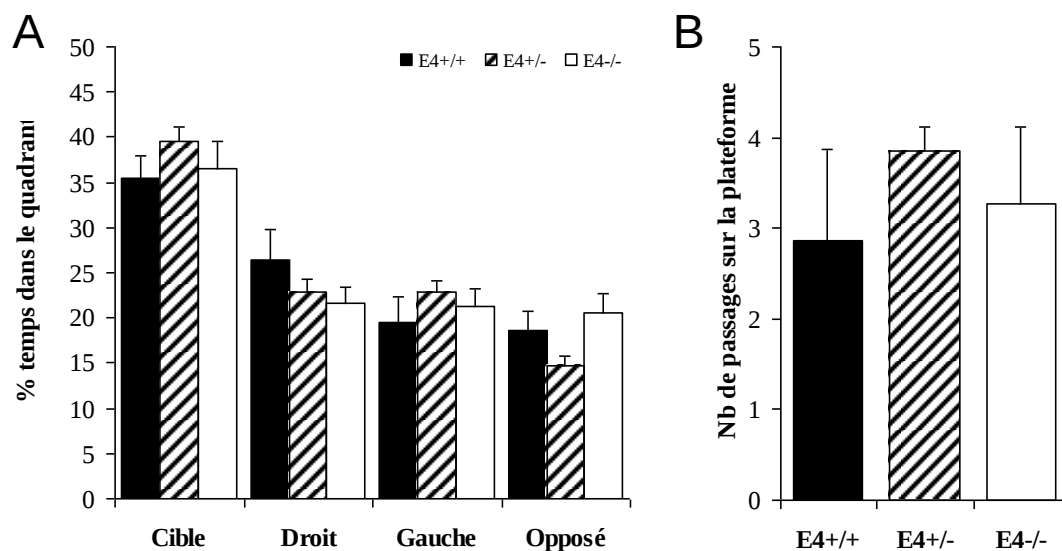


Figure 44: Pourcentage de temps passé dans chacun des quadrants de la piscine de Morris lors de l'essai test. B) Nombre de passages lors de l'essai test à l'emplacement où se trouvait la plateforme lors de l'apprentissage chez les souris ApoE4 mâles âgées.

test t apparié) (Fig. 43B). *Quelques souris ont été exclues car n'exploraient pas suffisamment les objets lors de l'acquisition ou de la rétention.* Les résultats de cette expérience montrent que la mutation ApoE4-KI n'affecte pas la mémoire de reconnaissance chez les souris mâles âgées dans nos conditions.

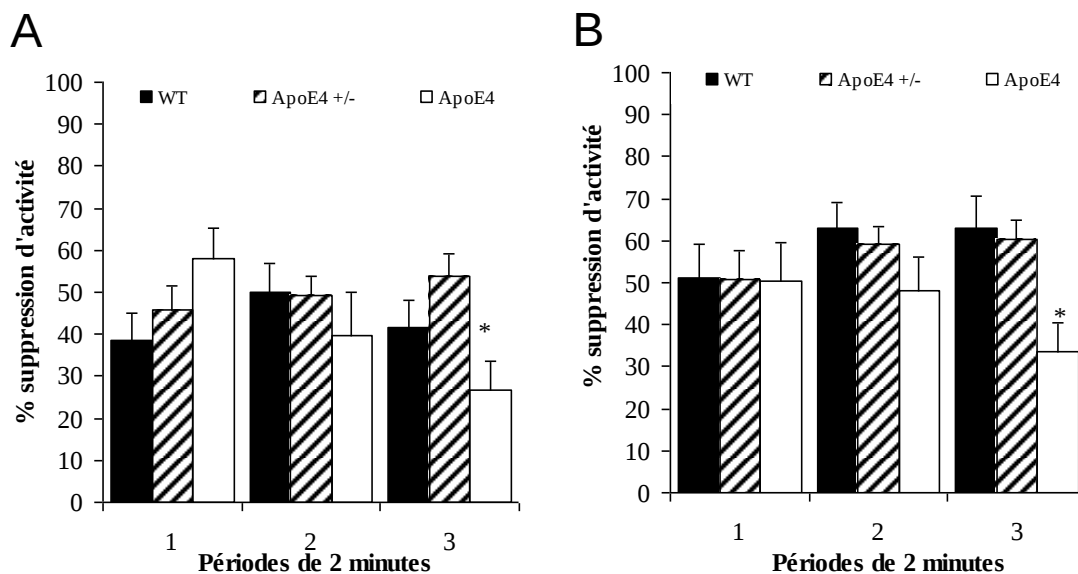
4. Test de la piscine de Morris

La latence et la distance pour atteindre la plateforme submergée, en utilisant les indices spatiaux, sont comparables entre les génotypes [$F(2,22) \leq 1.31$, NS] . Les 3 groupes améliorent leur performance au fil des séances d'apprentissage (données non présentées). Lorsque la plateforme a été retirée durant l'essai test à la fin de l'entraînement, aussi bien les souris WT que les souris ApoE4 mâles âgées manifestent une préférence significative pour le quadrant cible, et aucune différence n'a été observée entre les 3 génotypes [Quadrant : $F(3,66)=29.64$, $p<0.001$; Génotypes $F(2,22)=2.06$, NS ; Interaction Génotype*Quadrant $F(6,66)=0.99$, NS] (Fig.44 A). Le nombre de passage à la position où se trouvait la plateforme est également comparable entre les génotypes (Fig. 44B). Ces résultats montrent que les souris des 3 génotypes arrivent à localiser la plateforme en utilisant des indices spatiaux extra-labyrinthe et que la mutation ApoE4-KI n'affecte pas l'apprentissage spatial chez les souris mâles âgées.

5. Test du conditionnement de peur

Le niveau d'activité de base lors de l'habituation aux cages de conditionnement est comparable entre les génotypes chez les femelles [$F(2,34)=0.56$, NS], mais diffère significativement entre les génotypes chez les mâles [$F(2,47)=4.66$, $p<0.05$] ; ceci est dû aux souris ApoE4 hétérozygotes mâles qui présentent des valeurs plus élevées que celles des homozygotes ($p<0.05$ Fisher) (données non présentées). Après réexposition au même

Mémoire contextuelle



Mémoire indicée

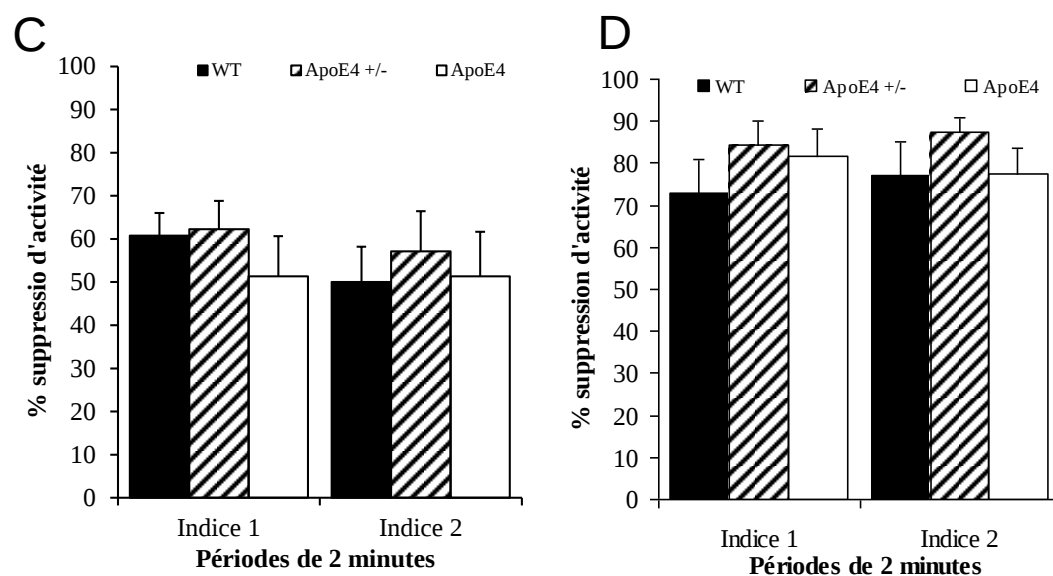


Figure 45: Pourcentage de suppression d'activité (freezing) lors du test au contexte (A chez les mâles, B chez les femelles) et lors de la présentation des indices (C chez les mâles et D chez les femelles) chez les souris ApoE4 âgées d'un an et demi.

contexte 24 h après le conditionnement, les souris mâles et femelles des différents génotypes manifestent une diminution significative de leur activité par rapport au niveau de base, montrant qu'elles se rappellent du contexte dans lequel elles ont reçu le choc. D'autre part, le freezing contextuel évolue différemment chez les souris mâles selon le génotype au fur et à mesure de la séance de test [Interaction temps*Génotype : $F(4,94)=6.80$, $p<0.001$] ; le pourcentage de freezing diminue en fin de séance chez les souris ApoE4-KI mâles âgées ($p<0.05$ vs WT pour le 3^{ème} bloc de 2 minutes), suggérant une extinction plus rapide (Fig. 45A). Les mêmes tendances sont observées chez les souris ApoE4-KI femelles âgées ($p<0.05$ vs WT, Fisher) (Fig. 45B). Lorsque les souris sont placées dans un nouveau contexte, le pourcentage de freezing lors de la présentation du SC est comparable entre les génotypes [Mâles : $F(2,47)=0.36$, NS; Femelles : $F(2,34)=1.38$, NS] (Fig. 45C et 45D).

Ces résultats montrent que les souris ApoE4-KI mâles et femelles manifesteraient une extinction rapide de la mémoire émotionnelle contextuelle. La performance de la mémoire indicée n'est pas affectée par la mutation ApoE4-KI chez les souris âgées.

IV. Effets de la mutation apoE4-KI sur la sensibilité épileptique

Lorsque le PTZ est injecté aux souris par voie i.p. à la dose de 50 mg/kg, le pourcentage d'animaux manifestant des myoclonies, des crises cloniques ou toniques est comparable entre les trois groupes de souris, aussi bien chez les mâles que chez les femelles [$\chi^2 \leq 3.19$, NS] (données non présentées). La latence des crises clonico-tonique est également comparable entre les génotypes [$F \leq 0.78$, NS].

Ceci suggère que la mutation ApoE4-KI n'affecte pas la susceptibilité aux crises induites par le PTZ chez les souris âgées.

Conclusion

Les souris ApoE4 homozygotes et hétérozygotes mâles âgées d'un an et demi sont plus actives que les contrôles lors de la première heure de test d'activité circadienne, suggérant une réactivité exagérée lorsqu'elles sont placées dans un nouvel environnement. Ceci est confirmé par les données de l'open-field montrant que les souris ApoE4 mâles sont plus actives. L'état de santé général, les capacités sensorimotrices, la sensibilité à la douleur et la susceptibilité aux crises ne sont pas affectés chez les souris ApoE4 âgées. L'analyse des comportements émotionnels montre que la mutation ApoE4-KI entraîne une diminution de l'anxiété dans une situation fortement éclairée chez les souris femelles âgées, mais pas chez les mâles. En ce qui concerne les capacités cognitives, les souris ApoE4 homozygotes mâles et femelles âgées manifesteraient une extinction rapide de la mémoire émotionnelle contextuelle. Le filtrage sensorimoteur, la mémoire de travail, ainsi que pour les mâles la mémoire de reconnaissance et la mémoire spatiale, ne sont pas affectés par la mutation ApoE4-KI chez les souris âgées mâles dans nos conditions expérimentales.

	ApoE2		ApoE3		ApoE4 adultes		ApoE4 âgées	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Cognition	/	/	/	/	/	/	Extinction de la mémoire contextuelle	
Émotions	Anxiolyse	Anxiogénie	Anxiolyse	/	/	Anxiogénie	/	Anxiolyse
État général	/	Moins actives	/	/	Moins actives	Plus actives	/	/

Tableau 12 : Résumé des principaux effets des différentes mutations ApoE humaines chez la souris sur la cognition, les émotions et l'état général.

Hormis quelques résultats concernant notamment l'état émotionnel de nos souris, le polymorphisme de l'ApoE ne semblait pas avoir d'effets notables sur leurs capacités cognitives, dans nos conditions. À l'issue de ce travail, nous nous sommes donc proposés d'étudier si un facteur environnemental tel que le stress chronique chez des souris âgées pouvait moduler les phénotypes comportementaux liées au polymorphisme de l'ApoE.

Les résultats de cette étude sont reportés dans l'article qui va vous être présenté dans la deuxième partie qui suit, l'article 1 : *Interaction between chronic stress and ApoE polymorphism on emotional and cognitive performances in mice.*

Deuxième partie : Impact combiné

**d'un stress chronique et du
polymorphisme de l'ApoE sur les
comportements émotionnels et
capacités cognitives chez la souris
âgée**

(Article 1 en cours de soumission)

Interaction between chronic stress and ApoE polymorphism on emotional and cognitive performances in mice

Alexis Koutseff ^a, Christophe Mittelhaeuser ^a, Johan Auwerx ^b & Hamid Meziane ^{a*}

^a *Institut Clinique de la Souris (ICS) Illkirch, France;* ^b *Laboratory of Integrative and Systems Physiology (LISP-NCM), École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Lausanne, Switzerland*

Abbreviated title: Impact of Chronic stress and Apolipoprotein E polymorphism on behaviour in mice

Keywords: Apolipoprotein E2, Apolipoprotein E3, Apolipoprotein E4, Knock-in mice, Chronic stress, emotional behaviours, cognitive functions, gender factor, Alzheimer's disease

Corresponding author: Hamid Meziane, Institut Clinique de la Souris (ICS), 1 rue Laurent Fries, B.P. BP10142, 67404 Illkirch Cedex, France

Telephone: +33 388 655663 / Fax: +33 388 655602 / E-mail: meziane@igbmc.fr

Number of figures: 10

Abstract

The Apolipoprotein E (ApoE) is a lipoprotein involved in various mechanisms in human, like lipid transport, hormones regulation, tissue repair, cell growth and differentiation. In human, three alleles ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ and $\epsilon 4$), localized on the same locus of the chromosome 19, are coding for three isoforms of ApoE (respectively ApoE2, Apo3 and ApoE4). Polymorphism of ApoE is considered as a major risk factor in sporadic form of Alzheimer's disease (AD) : ApoE4 enhances the risk to develop AD, whereas ApoE2 seems to have a protective effect. Several studies using humanized ApoE mice, showed cognitive impairments and increased anxiety following ApoE4 mutation. However, the mechanisms by which ApoE polymorphism modulate behavior and AD risk remain to be documented. Particularly because studies focused mainly on ApoE4 genotype, and presumably other endogenous or environmental factors collaborate to induce behavioral and pathological changes. In this regard, the present study was designed to evaluate the impact of unpredictable chronic stress on ApoE polymorphism expression of emotional behaviors and learning and memory processes in aged male and female mice carrying human ApoE2, ApoE3 or ApoE4 mutation. Our results show that one year old ApoE4 and ApoE2 male mice previously submitted to chronic stress showed reduced anxiety while ApoE2 females were more anxious, as compared to wildtype counterparts. Moreover at one year of age, both ApoE2 males and females showed reduced susceptibility to despair, whereas ApoE3 females demonstrated increased resignation, under stress conditions. Results from cognitive tests show that ApoE4 male mice under stress conditions had altered object recognition memory and spatial learning at 1.5 years of age, but not at 1 year-old. In stressed females, ApoE4-KI mutation caused significant deficits in object recognition memory starting from 1 year of age, suggesting increased susceptibility of

females to combined stress and ApoE4 genotype. Interestingly, we showed for the first time that ApoE2-KI females submitted to stress displayed improved recognition and spatial learning and memory performance at one year of age. Such cognitive improvement in ApoE2 females was still observed at 1.5 year-old in several forms of learning and memory including working memory, object recognition and spatial learning, thus supporting the protective effects of ApoE2 genotype previously reported in humans. Finally, aged ApoE3 females showed altered object recognition, and decreased contextual freezing performance under stress conditions. Emotional and cognitive phenotypes observed in ApoE3 mice suggest that the strategy using the ApoE3 genotype in mice as control is presumably misleading. The effects of stress on affective behavior and cognitive performance might be related to molecular signals, structural and physiological changes previously reported in specific brain regions such as the amygdala and hippocampus, depending on the ApoE genotype, the age and the gender. All together, the stress provide an excellent model for understanding pathophysiological mechanisms underlying age-related cognitive and emotional changes associated to ApoE polymorphism risks factors, and thus might allow better understanding of pathophysiological mechanisms leading to sporadic forms of Alzheimer's disease.

I. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease described by Alois Alzheimer in 1907 (Graeber & Mehraein, 1999; Goedert & Ghetti, 2007) characterized in a behavioral point of view by memory and personality troubles (memory impairment, social disturbance, anxiety, depression, aphasia, apraxia, ...), and in an histological point of view by beta-amyloid deposits, tau neuronal accumulation and neurofibrillary tangles (Graeber & Mehraein, 1999; Goedert & Spillantini, 2006; Castellani et al., 2010). Two forms of the disease are described: sporadic (late) and familial (early). The early-onset of the disease is closely linked to autosomal dominant inheritance (like mutations for Presenilin 1 & 2, Amyloid Precursor Protein (APP) ...), whereas the late-onset is linked to the age (Kamboh, 2004; St George-Hyslop & Petit, 2005; Mayeux, 2006). However in both cases, some factors can increase or decrease the risk to develop AD.

The most common factor known is the Apolipoprotein E (ApoE) polymorphism (Saunders et al., 1993; Strittmatter & Roses, 1995; Ashford, 2004; Raber et al., 2004). In human, three alleles ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ and $\epsilon 4$), localized on the same locus of the chromosome 19, are coding for three isoforms of ApoE (respectively ApoE2, ApoE3 and ApoE4) (Utermann et al., 1980; Olaisen et al., 1982). The ApoE is a polymorphic multifunctional protein principally involved in lipid and cholesterol transport (Mahley, 1988), tissue repair, cell growth and differentiation

(Nathan et al., 1994; Kawakami et al., 2003; Levi & Michaelson, 2007; Crawford et al., 2009; Li et al., 2009; Nichol et al., 2009). ApoE polymorphism was first studied in metabolic dysfunctions (Mahley, 1988), then has been considered later as a major risk factor in the sporadic and familial forms of AD. ApoE3, the most common isoform, appears as the “normal” ApoE, whereas ApoE4 increases by a factor ten the risk of AD and ApoE2 decreases this risk (Weisgraber et al., 1994; Strittmatter & Roses, 1995; Roses, 1996b, a; Strittmatter & Roses, 1996; Hannequin et al., 1998; Martinez et al., 1998; Ashford, 2004; Schipper, 2009). While the link between the genotypic variation of ApoE and the prevalence of AD is well established, the real impact of the ApoE polymorphism is still to be documented, considering that other endogenous and exogenous factors are concomitant with the apparition of AD (Mayeux, 2006; Eisenstein, 2011). To better understand the mechanisms underlying the ApoE polymorphism and its role in AD, several studies used mouse models carrying human ApoE alleles. In fact, a single ApoE form exists in the mouse; the mouse ApoE gene is replaced by the different human alleles (Sullivan et al., 1997; Sullivan et al., 1998; Knouff et al., 1999). Using humanized ApoE mice, several studies, demonstrated the impact of the ApoE4 genotype on behavior. In this regard, ApoE4 female mice showed impaired spatial learning performance compared to ApoE3 ones (Grootendorst et al., 2005; Bour et al., 2008). Other studies using mice expressing human ApoE4 mutations either in neurons or in astrocytes and compared to ApoE-KO mice confirmed this deleterious impact of ApoE4 on spatial learning

(Raber et al., 1998; Raber et al., 2000b; van Meer et al., 2007). Other cognitive impairments have been observed following ApoE4 mutations including altered working memory (Hartman et al., 2001), or in novel object-location preference task, contextual fear conditioning test, and a two-choice visual discrimination test when ApoE4 is associated with the human APP gene (Kornecook et al., 2010). Concerning emotional behaviors, ApoE genotypes have also been shown to impact anxiety-related behaviors, ApoE4 mice showing increased (Robertson et al., 2005; Raber, 2007 ; (Siegel et al., 2010).

Considering the literature data, most of studies were interested in analyzing the impact of ApoE polymorphism by itself, focusing particularly on ApoE4, taking into consideration that the $\epsilon 4$ allele represents a major risk factor to develop AD. ApoE4 genotype was also associated to autosomic mutations like APP. However, the ApoE4 allele represents only a risk factor to develop AD, but not necessarily a cause of potential cognitive deficits; ApoE4 might act together with other endogenous or exogenous factor to precipitate cognitive deficits.

In this context, our study focuses on the interaction between environmental factors and ApoE polymorphism on behavioral and cognitive performances, more precisely the impact of the stress, omnipresent in our society. Indeed, chronic unpredictable stress was shown to alter emotional behavior and cognitive capacities (Willner et al., 1987; Papp et al., 1991; Moreau et al., 1992; Moreau et al., 1993; Willner, 1997; Elizalde et al., 2008). Elsewhere, relationship

between stress and ApoE on behavior has already been described; ApoE-KO mice previously submitted to social stress showed improved spatial learning performance (Grootendorst et al., 2001). The integration of the stress is different between individuals, and this last interesting study shows that adaptive mechanism to stress may be dependent on the ApoE genotype. One may wonder whether chronic stressing events may modulate susceptibility of ApoE genotypes in the apparition of behavioral deficits observed in AD.

In this regard, the present study is aimed to evaluate the impact of combined chronic stress and ApoE polymorphism on emotional behavior and cognitive abilities in aged male and female mice. This study was designed following our previous results, where the behavioral effects of different forms of ApoE were analyzed in male and female mice at different ages, using apoE-KI mouse models. We found contrarily to some literature data, that ApoE4, by itself, did not affect cognitive abilities whatever the gender and age of mice. In the present work, all mice were submitted to an unexpected chronic stress, and their behavioral performance evaluated in different tests allowing measurement of emotional and cognitive abilities.

II. Materials and methods

1. Animals

ApoE Knock-in (KI) mice were used for this study. They were generated as described previously by replacing the murine ApoE gene with three human apoE alleles (Sullivan et al., 1997; Sullivan et al., 1998; Knouff et al., 1999). The mice used in this study had 75%-C57BL6/J and 25%-129Sv genetic background. A PCR genotyping protocol with specific primers to the mouse wild type allele and to the targeted human ApoE allele was used. PCR products were analyzed using a LabChip® 90 microfluidic apparatus and analyzed with the HT DNA 5K LabChip® 90 Assay kit. WT mice were littermates from the ApoE-KI mice and all mice issued from heterozygous parents breeding. Mice were single housed and kept under controlled vivarium conditions (Champy et al., 2004): temperature kept at 21-22°C and constant light-dark cycle (12hr with lights on at 07 a.m.) with food and sterile water available ad libitum.

For this study different, groups of male and female mice with different genotype and age were constituted and submitted to unpredictable chronic stress before behavioral testing (see below). All experiments were carried out in accordance with institutional guidelines and procedures agreed by the local ethics committee.

2. Unpredictable chronic Stress

A “mild” chronic stress protocol adapted from works of Willner or Moreau was used for this study (Willner et al., 1987; Moreau et al., 1992). Mice were submitted to unpredictable stressing events one to three times per day, during 4 consecutive weeks. The stress regimen consisted in 1 hour period of confinement in restriction tube (9 cm long, 3 cm diameter) with unexpected noises, 15 hours of food restriction followed by 2 hours of restricted access to food (difficult access to food) , 15 hours of water restriction followed by 2 hours of empty bottle exposure, 1.5 hour in a cage with a marble litter, 18 hours in the soiled home cage with the litter saturated in water, 30 minutes of forced bath in a 35°C water, or 2 consecutive days of light/dark cycle inversions. The sequence and moment of stressing events were randomly organized to avoid habituation or foresight, and maximize their stressing effects.

3. Behavioral procedures

Immediately at the end of stress period, mice were submitted to different tests allowing evaluation of emotional behaviors and cognitive performances.

a) Emotional behaviors

In order to evaluate the impact of combined chronic stress and apoE polymorphism on emotional behaviors, mice were tested in different experimental paradigms known to trigger distinctive types of stress and anxiety.

The light/dark test: this test allows evaluation of mice aversive reactions in highly illumination situations (van Gaalen & Steckler, 2000; Hascoet et al., 2001; Bourin & Hascoet, 2003). The apparatus consists of two PVC boxes (20 x 20 x 14 cm), one dark and the other highly illuminated (1.700 lux), connected by an opaque tunnel (5 x 7 x 10 cm) (Imetronic, Pessac, France). Both compartments and the tunnel are equipped with infrared sensors allowing to detect the presence of the mouse and to measure its activity. Animals are placed individually in the dark side. The time spent in the light side, the latency to enter into the light side and the number of dark-light transitions are measured for 5 min as an index of anxiety. Locomotor activity and rears are also recorded.

The elevated plus maze: this test evaluates anxiety for height. Animals are confronted to a choice between threatening environment, an exposed runway elevated from the floor, and relatively safe enclosure (Rodgers & Dalvi, 1997; van Gaalen & Steckler, 2000; Karl et al., 2003). The apparatus is an automated cross maze elevated from the floor to 66 cm, and composed of two open arms (30 X 5 cm) opposite one to the other, and crossed by two enclosed arms (30 X 5 X 15 cm) (Imetronic). The apparatus is equipped with infrared captors allowing the detection of the mouse in the enclosed arms and different areas of the open arms. The elevated plus maze is placed in a room homogenously illuminated (50 Lux at the

extremity of each open arm). For testing, mice are placed in the center of the apparatus, and allowed to explore freely the maze for 5 min, with the experimenter out of the animal's sight. The number of entries into and time spent in the open arms were used as an index of anxiety. Closed arm entries were used as measures of general motor activity. The number of rears in the closed arms, as well as ethological parameters such as stretching, attempts and head dips were also automatically scored.

The open field test: This test allows evaluation of anxiety for a novel wide space. Automated square openfields (45 x 45 cm), delimited by transparent cover and walls (18 cm high) are used (Panlab, Barcelona, Spain). Each arena is fitted with two frames of 32 infrared beams (16 front to back and 16 side to side with 2.5 cm space between two successive beams) located 2 and 7.5 cm off the arena floor, providing automated measures of horizontal and vertical activity, respectively. The open field arena is divided into peripheral (8 cm large) and central (the rest) regions. Mice prefer exploring arena staying close to the walls, and the more time they spend in the center of the arena, the less anxious they are (Crawley, 1999; Prut & Belzung, 2003). The openfields are placed in a room homogeneously illuminated at 150 Lux.

For testing, each mouse was placed in the periphery of the open field and allowed to explore freely the apparatus for 30 min, with the experimenter out of the animal's sight. The distance traveled, the number of rears, and time spent in the central and peripheral regions were recorded over the test session. The number of entries and the percentage of time spent in center area are used as index of emotionality/anxiety

Tail suspension test: The tail suspension and forced swim tests are among the most widely utilized rodent model of depression (Porsolt et al., 1977; Karl et al., 2003). They allow evaluation of susceptibility to despair behavior, In the tail suspension test, the mouse is attached to a hook connected to a dynamometer measuring the mouse struggle vibrations (MED Associates Inc, Vermont, USA); the less they struggle, the more resigned they are (Cryan et al., 2005; Meziane et al., 2007). During the 6 testing minutes, the duration of immobility is measured by 2 minutes blocks as a despair index. The latency to the first immobilization is also measured.

Forced swim test: In the forced swim procedure, mice are forced to swim in un-escapable situation. The mouse is placed in 5 L beaker filled with water at 22-23° C during 6 minutes. After a period of vigorous struggling, the animal becomes immobile, or makes only those movements necessary to keep its head above the water. The immobility duration is measured by 2 minutes periods, as well as the latency to the first immobilization.

b) Learning and memory

Y-maze spontaneous alternation: The Y-maze spontaneous alternation paradigm is based on the natural tendency of rodents to explore novel environment. When placed in the Y-maze, normal mouse prefer to explore the least recently visited arm, and thus tend to alternate visits between the three arms. A mouse with impaired working memory cannot remember which arm it just visited and thus show decreased spontaneous alternation ((Nagahara and McGaugh, 1992). The apparatus was a Y-maze made of Plexiglas and having 3 identical arms (40x9x16 cm) placed at 120° from each others. Each arm had walls with specific motifs allowing distinguish it from the others. Each mouse was placed at the end of one of the three arms, and allowed to explore freely the apparatus for 5min, with the experimenter out of the animal's sight. Alternations are operationally defined as successive entries into each of the three arms as on overlapping triplet sets (i.e., ABC, BCA ...). The percentage of spontaneous alternations (%SPA) was calculated as index of working memory performance. Total arm entries and the latency to exit the starting arm were also scored as indexes of ambulatory activity and emotionality in the Y-maze, respectively. The chance level is around 22 % SPA

Object recognition task: The object recognition test allows evaluation of recognition memory and is characterized by a rapid forgetting (Dodart et al. 1997, Meziane et al. 1998). This test is based on the natural tendency of rodents to explore a novel object by comparison to a familiar one (Ennaceur and Delacour 1988). The object recognition task was performed in automated

open fields (see above). The open-fields were placed in a room homogeneously illuminated at 70 Lux at the level of each open field. The objects to be discriminated were a glass marble (2.5 cm diameter) and a plastic dice (2 cm). Animals were first habituated to the open-field for 30 min. The next day, they were submitted to a 10-minutes acquisition trial during which they were placed in the open-field in presence of an object A (marble or dice). The time the animal took to explore the object A (when the animal's snout was directed towards the object at a distance ≤ 1 cm) is manually recorded. A 10-minutes retention trial is performed 3h, 6h or 24h later. During this trial, the object A and another object B are placed in the open-field, and the times t_A and t_B the animal takes to explore the two objects are recorded. A recognition index (RI) is defined as $(t_B / (t_A + t_B)) \times 100$. A recognition index of 50% corresponds to random, and higher the index, better is the performance.

Morris water maze: This test evaluates spatial learning and memory. In this situation mice are trained to escape from water by swimming to a hidden platform whose location can only be identified using distal extra-maze cues (Morris, 1984 ; Hodges, 1996; Owen et al., 1997).

The water maze consisted of a white circular tank (1.50 m diameter) filled with opaque water. Pool temperature was adjusted to $21 \pm 1^\circ\text{C}$. For the hidden platform task, the escape platform (10 cm diameter) was positioned 1cm below water level in the centre of one of the pool

quadrants. For the cued task, platform position was signaled by the addition of a small flag. The walls surrounding the water maze were hung with posters and flags, which served as visual cues and are visible during all stages of training and testing. Movement of the mice within the pool was tracked and analyzed with a computerized tracking system (ViewPoint, France).

Animals were first trained in the hidden platform protocol (spatial learning). Mice were required to locate a submerged hidden platform by using only extra-maze cues. Each mouse received 5 blocks of training trials over five consecutive days in which they were placed in the pool at one of four randomized start positions, and allowed to locate the hidden platform. Trials lasted for a maximum of 120s and were separated by 15-20 min intervals. If a mouse failed to find the platform within this period, it is guided to its position by the experimenter. Spatial learning performance was assessed during a probe trial 1h after training, and for which the target platform was removed from the pool.

Mice were then tested for cued training (visible platform), in which they were placed in the pool facing the edge at one of four start positions (NE, SE, SW, NW), and required to locate a flagged platform whose position varies across trials. Each mouse received 4 trials per day for 2 consecutive days. Trials lasted for a maximum of 120s and were separated by 15-20 min intervals. If a mouse failed to find the platform within this period, it is guided to its position by the experimenter.

The latency, distance and the average speed were used to evaluate performance during training trial. For the probe trial, the percentage of time in each quadrant and the number of platform crosses were used as index of spatial learning performance.

Pavlovian fear conditioning: The fear conditioning is an associative learning paradigm for measuring aversive learning and memory. In the fear conditioning procedure, a neutral conditioned stimulus (CS) such as light or tone is paired with an aversive unconditioned stimulus (US) such as mild footshock. Concomitantly, animals associate the background context cues with the CS. After conditioning, the CS or the spatial context elicits a central state of fear in the absence of the US, expressed as reduced locomotor activity or total lack of movement (freezing). Immobility time is used as a measure of emotional learning/memory performances (Owen et al., 1997; Crawley, 1999; Karl et al., 2003; LeDoux, 2003). Polymodal operant chambers (Coulbourn Instruments, Allentown, PA, USA) were used. Each chamber (18.5 x 18 x 21.5 cm) consisted of aluminum side walls and Plexiglas rear and front (the door) walls. A loudspeaker and a bright light constituted the sources of the cues during conditioning and cue-testing. The general activity of animals was recorded through the infrared cell placed at the ceiling of the chambers and was directly recorded on a PC computer using the Graphic State software (Coulbourn).

For conditioning, mice were allowed to acclimate for 4 min, then a light/tone (10 kHz) CS was presented for 20 s and co-terminated by a mild (1 s, 0.4 mA) footshock (US). Two minutes later another CS-US pairing was presented. Mice were returned to their home cages 2 min later. Testing was performed 24 h following conditioning session. Testing for the context was performed in the morning. The mouse was placed back into the same chamber that was used for the conditioning and allowed to explore for 6 minutes without presentation of the light/auditory CS. Testing for the cue was performed in the afternoon (about 5 h after the context testing). The contextual environment of the chambers was changed (wall color, odor and floor texture). The mouse was placed in the new chamber and allowed to habituate for 2 minutes then presented with light/auditory cues for 2 minutes. This sequence was repeated once again. At the end of testing, animals were returned to their home cages.

Percentage of suppression activity (freezing) during re-exposition to the context or to the auditory/visual cues is used as an index of learning. A high percent value reflects a better learning. The percentage of freezing is calculated in blocks of 2-min bins, by reporting the 2-min periods activity during the context or cue presentation to the baseline activity during habituation to conditioning cages (for the context-dependent learning) or to the new context (cue-dependent learning).

4. Experimental cohorts

Cohorts of one year-old and 1.5 year-old mice of each gender and genotype (WT, ApoE2, ApoE3 and ApoE4) were used in this study, except for the most aged males for which the number of ApoE2 and ApoE3 mice were not enough for appropriate analysis. The effects of chronic stress on emotional behaviors were evaluated in 1 year old WT and the different ApoE mutant mice. Cognitive capacities were analyzed both at 1 year and 1.5 year-old. The different cohorts are presented as follow:

- One year-old females: 10 WT, 7 ApoE2, 12 ApoE3 and 10 ApoE4
- One year-old males: 10 WT, 9 ApoE2, 11 ApoE3 and 11 ApoE4
- 1.5 year-old females: 10 WT, 6 ApoE2, 9 ApoE3 and 10 ApoE4
- 1.5 year-old males: 7 WT and 10 ApoE4

5. Statistical analyses

Data are presented as mean $\pm$ SEM and analyzed using one factor or repeated measures analysis of variance (ANOVA). Fisher's PLSD post-hoc test was used to compare data between two groups. The level of significance was set at $p < 0.05$.

III. Results

1. Effects of chronic stress and ApoE polymorphism on emotional behaviors in aged male and female mice

As stated above, the impact of combined chronic stress and apoE polymorphism on emotional behaviors was evaluated at one-year of age in different experimental paradigms known to trigger distinctive types of stress and anxiety.

Females

In the light/dark test, the latency to enter into the light side differed significantly between genotypes [$F(3,35) = 3.88$, $p < 0.02$]. Indeed, ApoE2 females displayed significantly higher latencies than WT counterparts ($p < 0.01$, vs WT, Fisher) (Fig. 1B), which might be interpreted as increased anxiety in ApoE2 aged females. However, the percentage of time spent in the light side (Fig. 1A) and the number of transitions from the dark to the light sides (not shown) were similar between the four groups of mice [$F(3,35) \leq 0.917$, NS]. The number of entries in the dark box was also comparable between genotypes (not shown).

In the elevated plus maze, no difference was found between genotypes in the percentage of entries (Fig. 1C) and percentage of time in the open arms. The number of head-dips tended to differ between genotypes [$F(3,35) = 2.40$, $p = 0.08$]; One year-old ApoE2 females showing

significantly lower number of head dips than wildtypes ($p < 0.05$, Fisher) (Fig. 1D), which might suggest increased anxiety in ApoE2 aged females under stress conditions.

In the open field test, overall locomotor activity (Fig. 1D) and rears were comparable between genotypes [$F(3,35) \leq 1.88$, NS]. Exploration of the central part of the openfield arena (Percentage of time and number of entries) were also comparable between genotypes, showing that anxiety toward an open space was not affected by ApoE mutations in aged females under chronic stress.

The tail suspension and forced swim tests are among the most widely utilized rodent model of depression. In the tail suspension test, duration of immobility differed significantly between genotypes [$F(3,35) = 3.01$, $p < 0.05$]. Indeed, aged ApoE3 females showed significantly higher duration of immobility than WTs ($p < 0.05$, Fisher) (Fig. 2A). The latency to the first immobilization was also decreased in ApoE3 females comparing to WT counterparts ($p < 0.5$, Fisher) (Fig. 2B). On the other hand results from the forced swim test showed that floating duration was significantly reduced in ApoE2 females ($p < 0.05$, Fisher) (Fig. 2C), suggesting reduced susceptibility to despair in ApoE2 females in the forced swim test.

Males

In the light/dark test, the percentage of time spent in the light side and the latency to enter into the light side differed significantly between genotypes [%time: $F(3,37)=3.48$, $p<0.05$; latency: $F(3,37)=5.21$, $p<0.01$]. Indeed, ApoE2 and ApoE4 male mice showed significantly higher percentage of time in the light side ($p<0.05$, Fisher) and lower latencies ($p<0.05$, Fisher) (Fig. 3A and 3B), suggesting reduced anxiety in one year-old ApoE2 and ApoE4 males under stress. One year-old ApoE2 males under stress conditions also had significantly higher number of transitions from the dark to the light box (Fig. 3C) and higher number of entries in the dark box (not shown), as compared to WT counterparts [Transitions: $F(3,37) = 11.94$, $p<0.001$, Fisher $p<0.01$; Dark entries: $F(3,37)=3.40$, $p<0.05$; Fisher $p<0.05$]. These data also suggest increased activity in one year-old ApoE2 males.

In the elevated plus maze, no difference was found between genotypes in the percentage of entries (Fig. 3D) and percentage time (not shown) in the open arms [$F(3,37) \leq 1.26$, NS]. On the other hand, the number head dips tended to differ between groups [$F(3,37) = 2.20$, $p=0.10$]; ApoE4 males showing higher number of head dips than wildtype counterparts ($p<0.05$, Fisher) (Fig. 3E), thus suggesting reduced anxiety in ApoE4 mice in this test. The number of closed arm entries also tended to differ between genotypes [$F(3,37) = 2.41$, $p=0.08$]; with ApoE2 mice showing significantly higher number of entries ($p<0.05$, Fisher). These data suggest increased activity in one year-old ApoE2 males previously submitted to chronic stress.

In the open field, Overall locomotor activity and rears differed significantly between genotypes [Distance: $F(3,37)=5.02$, $p<0.01$; Rears: $F(3,37)=9.90$, $p<0.001$]. Indeed, aged ApoE2 males showed significantly higher levels of locomotor activity and rears than WT males throughout the testing period ($p<0.01$, Fisher) (Fig. 3F and 3G). The percentage of time in the center was comparable between genotypes [$F(3,37)=1.94$, NS] (Fig. 3H), but the number of entries into the center (Fig. 3I) was higher in ApoE2 mutant mice ($p<0.05$ Fisher). These data suggest reduced (or tendency to reduced) anxiety in ApoE2 mutant males in the openfield.

Susceptibility to despair was evaluated in the tail suspension and forced swim tests. In the tail suspension test, the total duration of immobility was comparable between genotypes [$F(3,37)=0.84$, NS]. Nevertheless, ApoE2 mutant males showed significantly lower immobility duration during the first 2-min of testing [$F(3,37)=4.76$, $p<0.01$, Fisher $p<0.01$ ApoE2 vs WT] (Fig. 4A) and higher latency to the first immobilization [$F(3,37)=5.46$, $p<0.01$, Fisher $p<0.01$ ApoE2 vs WT] (Fig. 4B). Floating duration in the forced swim test (Fig. 4C) also differed between genotypes [$F(3,35)=3.72$, $p<0.05$], with ApoE2 mutant males showing significantly reduced immobility duration, as compared to WT counterparts ($p<0.05$, Fisher). These results clearly suggest reduced susceptibility to despair behavior in one year-old ApoE2 males previously submitted to chronic stress.

All together, results from these experiments show that one year-old ApoE4 mutant males submitted previously to unpredictable stress showed reduced anxiety in the light/dark and elevated plus maze. On the other hand, ApoE2 males showed increased activity in several situations, including the openfield, the light dark and elevated plus maze. In addition, one year-old ApoE2 males also showed reduced anxiety in the light/dark and openfield situations, while females showed tendency to increased anxiety. Both ApoE2 males and females showed reduced susceptibility to despair, males in the tail suspension and forced swim test, and females in the forced swim test. Finally, one year-old ApoE3 females submitted to chronic stress showed increased susceptibility to despair, as revealed in the tail suspension test.

2. Effects of chronic stress and ApoE polymorphism on learning and memory performance in aged male and female mice

The impact of combined chronic stress and ApoE polymorphism on cognitive abilities was evaluated on 1 year-old and 1.5 year-old male and female mice.

One-year old females

In the Y Maze test, the percentage of spontaneous alternations is well above the chance level and was comparable for all groups of mice [$F(3,35) = 1.59$, NS] (Fig. 5A), showing that working memory was not affected by the different ApoE-KI mutations under chronic stress

conditions. The number of visited arms was also similar for the four groups of mice [$F(3,35) = 1.72$, NS] (not shown).

Concerning the object recognition test, exploration duration of the familiar object during the acquisition trial was comparable between genotypes [$F(3,35)=0.47$, NS] (not shown). When animals were allowed to explore both the familiar and a novel object during a retention trial, 24h after acquisition, object recognition performance differed significantly between genotypes [$F(3,34)=5.79$, $p<0.01$]; one year-old ApoE2 females showing significantly higher recognition performance than the other genotypes ($p<0.05$ vs WT, Fisher) (Fig. 5B). On the other, ApoE3 females displayed significant deficit in recognition performance ($p<0.05$ vs WT Fisher). Indeed, only WT and ApoE2 females showed recognition performance above the chance level (Fig. 5B) exploring significantly more the novel object than the familiar one ($p<0.05$, paired t-test) (Fig. 5C), while ApoE3 and ApoE4 performed around the chance level (Fig. 5B). These data shows that ApoE2-KI mutation improved recognition performance in one year-old females under stress conditions, while ApoE3-KI and ApoE4-KI induced significant deficits in recognition memory in stressed old females. In addition, ApoE2 females showed significantly increased locomotor activity (Fig. 5D) and rears during the retention trial ($p<0.05$, Fisher, following significant ANOVA).

In the Morris Water Maze, the latency (Fig. 5E) and distance to reach the submerged platform decreased significantly as testing progressed in all WT and the three ApoE mutant groups,

[Time: $F(4,136) \geq 46.11$, $p < 0.001$; Interaction: $F(12,136) \leq 0.93$, NS]. Nevertheless, ApoE2 females showed significantly lower latencies ($p < 0.05$) to the platform on the first day of training (Fig. 5E), and ApoE3 females showed higher latencies and distance on the last training day ($p < 0.05$), without difference in the swimming speed [$F(3,34) = 0.44$, NS]. When animals were submitted to a probe trial at the end of training, all groups showed a significant preference for the target quadrant [Quadrant: $F(3,102) = 32.43$, $p < 0.01$, Genotype: $F(3,34) = 0.61$, NS]. On the other hand, it can be seen that ApoE2 females showed higher preference for the target quadrant than WT counterparts [Interaction quadrant*Genotype: $F(3,45) = 6.01$, $p < 0.01$] (Fig. 5F). Indeed, the percentage of time spent in the target quadrant was significantly higher ($p < 0.01$) and that in the opposite quadrant tended to be lower in ApoE2 females than in wildtypes ($p = 0.09$). The number of platform crosses was also higher in ApoE2 females than in WTs ($p < 0.05$) (Fig. 5G). These data suggest improved spatial learning in one year-old ApoE2 females under stress conditions. When the platform position was indicated by a flag, no difference appeared between the genotypes concerning the latency and the distance to reach it [$F(3,34) \leq 1.73$, NS] (not shown), showing that visual and swim abilities were not affected in the different ApoE mutants.

Concerning the behavioral responses to the Pavlovian fear conditioning test, there was no difference between genotype concerning the baseline level of activity during the habituation to the conditioning cages [$F(3,34) = 0.70$, NS] (Fig. 6A). Furthermore, all the groups reacted

similarly to the exposition to CS-US pairings [$F(3,34) = 0.43$, NS]. When the mice were re-exposed in the same context 24 hours later, they all showed a significant decrease of the activity compared to the habituation, showing that they made the association between the conditioning cage and the foot-shock [Pre-Post conditioning: $F(1,34)=133.45$, $p<0.001$; Genotype: $F(3,34)=0.57$, NS; Interaction $F(3,34)=0.17$, NS, repeated ANOVA on the last 2-min of habituation and the first 2-min of context] (not shown), suggesting that all genotypes remembered the context where they received the shocks. On the other hand, contextual freezing performance (activity suppression) was comparable between genotypes [$F(3,34)=0.62$, NS] (Fig. 6B). When the context is modified, the presentation of CS alone induced in all genotypes a clear fear reaction that was reflected by a marked suppression of activity. The level of suppression of activity, which can be associated to the cued freezing performance, was similar for all groups [$F(3,34)=0.52$, NS] (Fig. 6C). These results show that one year-old ApoE2, ApoE3 and apoE4 females under stress condition did not show altered contextual or cued fear conditioning.

1.5 year-old females

Cognitive abilities were also re-evaluated in the same animals at 1.5 years of age. It should be noted that some mice died during this period.

The percentage of spontaneous alternations measured in the Y Maze test tended to differ between genotypes [$F(3,33)=2.51$, $p=0.07$]; aged ApoE2 females displaying higher performance than WT (s) ($p<0.05$, Fisher) (Fig. 7A), which may suggest improved working memory in 1.5 year old ApoE2 females previously submitted to unpredictable chronic. The number of arm entries was comparable between genotypes [$F(3,33)=0.64$].

For the object recognition task, even if this task is known to be submitted to rapid forgetting (Dodart et al, 1997, Meziane et al, 1998), the choice of familiar and novel objects object was balanced to avoid any potential residual recognition from the previous training. No difference was found between genotypes in recognition performance [$F\leq 2.18$, NS]. Nevertheless, intragroup analysis shows that at 3h delay, only WT and ApoE2 females showed recognition performance significantly above the chance level ($p<0.05$ one group t-test), while ApoE4 females performed at the chance level and ApoE3 females tended to perform above the chance level ($p=0.07$) (Fig. 7C), which suggest altered recognition performance in ApoE4 females at this delay. At 24h delay, only ApoE2 females performed significantly above the chance level ($p<0.05$) (Fig. 7D), suggesting improved recognition performance in ApoE2 females.

In the water maze test, the latency and distance to find the hidden platform decreased with time and were comparable between genotypes [$F(3,30)\leq 1.63$, NS]. On the other hand, results from the probe trial showed that the quadrant preference differed between genotypes [Interaction Genotype*quadrant: $F(9,93)=3.02$, $p<0.01$]. Indeed 1.5 year-old ApoE2 females

better preference for the target quadrant than the others, as compared to WT, spending more time in the target and less time in the left and opposed quadrants ($p < 0.05$ vs WT) (Fig. 7B). These data clearly suggest improved spatial learning and memory performance in 1.5 years ApoE2 females.

One-year old males

In the Y Maze test, the percentage of spontaneous alternations was comparable between genotypes [$F(3,37) = 0.95$, NS] (Fig. 8A), showing that working memory is not affected by the different apoE mutations in one year-old stressed males. The number of visited arms is also similar for the four groups [$F(3,37) = 0.10$, NS] (not shown).

In the object recognition test, exploration duration of the familiar object during the acquisition trial was comparable between genotypes [$F(3,37) = 0.34$, NS] (not shown). When animals were allowed to explore both the familiar object and a new one, 24h after acquisition, we can see that no difference was found between genotypes in object recognition performance [$F(3,33) = 0.29$, NS] (Fig. 8B). All of WT, ApoE2, ApoE3, and ApoE4 groups showed recognition performance above the chance level, exploring more the novel object than the familiar one (Fig. 8C). On the other hand, ApoE2 males showed significantly increased locomotor activity during the retention trial [$F(3,33) = 3.88$, $p < 0.05$, Fisher $p < 0.05$] and increased number of rears during both the acquisition and retention trials [$F \geq 4.31$, $p < 0.01$, Fisher $p < 0.01$] (Fig. 8D).

The results of the Morris Water Maze show that the latency (Fig. 8E) and distance to reach the submerged platform decreased significantly over the course of training in all WT and ApoE groups, and no difference was found between genotypes concerning these parameters [Genotype: $F(3,37) \leq 1.51$ NS; Time: $F(4,148) \geq 46.66$, $p < 0.001$; Interaction: $F(12,148) \leq 1.35$, NS], suggesting that all genotypes learned to find the hidden platform by using only the extra-maze cues. In agreement with this, results of the probe trial performed on the last day of training without any platform, showed that all WT and ApoE genotypes showed a significant and comparable preference for the target quadrant [Quadrant: $F(3,111) = 77.63$, $p < 0.001$; Genotype: $F(3,37) = 0.35$, NS; Interaction genotype*quadrant: $F(9,111) = 0.79$, NS] (Fig. 8F) and comparable number of platform position crosses [$F(3,37) = 0.77$] (Fig. 8G). When the rules were changed by indicating the platform position with a flag and changing its position from trial to trial, we can see that all groups learned quickly the task, without difference between genotypes concerning the latency, the distance or the swimming speed [$F(3,37) \leq 1.53$, NS] (not shown). These data also suggest that swim abilities are not affected in ApoE mutants. Results of this experiment show that ApoE2, ApoE3, and ApoE4 mutation did not affect spatial learning in one year-old males submitted to chronic stress.

Finally, concerning the behavioral responses to the Pavlovian fear conditioning test, we can see that there is no genotype difference in the mice activity during the four minutes habituation to the apparatus [$F(3,36) = 2.16$, NS] (Fig. 9A), even if the ApoE2 mice were

slightly more active than the ApoE3 mice. Furthermore, this baseline activity decreased highly in the same way for all the groups after the exposition to the CS-US (stimuli and foot-shock) without any genotype difference, even if the ApoE2 mice stayed at a higher level of activity than the other groups [$F(3,36) = 2.18$, NS]. When the mice were put again in the same context without stimuli and foot-shock, they all had a decrease of the activity compared to the baseline measured during the habituation, showing they remembered the context where they received the foot-shock. In addition, there was a significant difference between genotypes concerning contextual freezing performance [$F(3,37)=4.67$, $p<0.01$]; ApoE2 and ApoE3 males showing significantly lower freezing than wildtypes ($p<0.05$ Fisher) (Fig. 9B). When animals were placed in a new context, the presentation of CS alone induced in all genotypes a clear fear reaction that was reflected by a marked suppression of activity. The cued freezing performance was comparable between genotypes [$F(3,36)=1.46$, NS] (Fig 9C). Data from this experiment show that ApoE2 and ApoE3 aged males submitted to stress displayed reduced contextual freezing performance, which may suggest altered emotional learning and memory performance in ApoE2 and ApoE3 aged males. Nevertheless, decreased freezing performance in ApoE2 males might presumably be explained by increased activity and reduced anxiety in these animals.

1.5 year-old males

In males the effect of chronic stress on cognitive abilities were also evaluated in ApoE4 animals at 1.5 years of age. It should be noted that ApoE2 and ApoE3 were not evaluated for cognitive abilities at this age because the number of mice too low for appropriate analysis.

No difference was observed between genotypes in the percentage of spontaneous alternation in the Y Maze test (Fig. 10A) ($t_{15}=0.40$, NS), showing that working memory was not affected in 1.5 years ApoE4 males submitted to chronic stress. In the object recognition test, no significant difference was found between WT and ApoE4 males in recognition performance, neither at 3h nor at 24h delay ($t \leq 1.40$, NS) (Fig. 10B and 10C). Nevertheless, at 24h delay, only WT, but not ApoE4, mice performed significantly above the chance level ($p=0.05$, one group t-test). These data suggest that 1.5 year-old males submitted to stress showed altered recognition memory.

In Morris water maze, the latency and distance to find the hidden platform decreased significantly in both genotypes as testing progressed, but tended to be higher in ApoE4 males, as compared to WT counterparts [$F(1,14) \geq 2.94$, $p=0.10$] (not shown) suggesting delayed learning in ApoE4 males. When the platform was removed to test the strength of the learning during the probe test, the preference for quadrants differed significantly between genotypes [Interaction genotype*quadrant $F(3,42)=3.25$, $p<0.05$] (Fig. 10D). Indeed, ApoE4 males spent less time than WTs in the target quadrant ($p<0.05$). The number of platform crosses was also significantly lower in ApoE4 males than in WTs ($t_{14}=2.82$, $p<0.05$) (Fig. 10E). These data

clearly suggest that 1.5 years ApoE4 males under stress conditions showed altered spatial learning performance.

All together, results obtained from cognitive tests show that one year old ApoE2 and ApoE3 males submitted to unpredictable stress showed decreased contextual freezing performance, which might be due in ApoE2 animals to the observed increased activity and reduced anxiety. Working memory, recognition memory, and spatial learning were not affected by the different ApoE-KI mutation in stressed males at one year old of age. On the other hand, object recognition memory and spatial learning were altered in older (1.5 years of age) ApoE4 males.

In female mice, combined stress and ApoE4-KI mutation caused significant deficits in object recognition memory starting from 1 year of age. On the other hand, ApoE2-KI females submitted to stress showed improved recognition and spatial learning and memory performance at one year of age. Such cognitive improvement in ApoE2 females was still observed at 1.5 year-old in several forms of learning and memory including working memory, object recognition and spatial learning. Finally, ApoE3 females also showed altered object recognition performance.

IV. **Discussion**

The present was designed to investigate the effects of unpredictable chronic stress on ApoE polymorphism expression of emotional behaviors and cognitive abilities in aged mice. Results from this study show that the impact of stress is different depending on the gender and age of mice.

Concerning the emotional behaviors, one year-old ApoE4 mutant males submitted previously to unpredictable stress showed reduced anxiety in the light/dark and elevated plus maze, while ApoE4 insertion did not affect anxiety in stressed females in our experimental conditions. According to our knowledge, our work is the first one analyzing the effect of stress on emotional behaviors in aged ApoE2, ApoE3 and ApoE4 male and female mice. On the other hand several studies analyzed the influence of ApoE genotypes by themselves on anxiety in mice. In this regard, adult ApoE-KO and ApoE4, but not ApoE3, male mice were reported to show increased anxiety (Robertson et al., 2005; Raber, 2007). Such effects were associated with significantly reduced microtubule-associated protein (MAP) 2-positive neuronal dendrites in the central nucleus of the amygdala, structure importantly involved in the regulation of fear and anxiety (Robertson et al., 2005). These authors also showed that ApoE-KO, apoE3, and ApoE4 mutants also showed abnormally increased plasma corticosterone levels following anxiety testing, suggesting that measures of anxiety in ApoE-KO and ApoE4 mutants were dissociated from HPA axis activation (Robertson et al., 2005). This also suggests that HPA axis activation is presumably due to ApoE deletion in the mouse, rather

than human ApoE ϵ s insertion in mice. Adult and aged ApoE4 females were also reported to show increased anxiety, as compared to ApoE2 and ApoE3 counterparts (Siegel et al., 2010). In our laboratory, we found that ApoE4 mutation by itself reduced anxiety in adult male and aged female mice in the light dark test, while adult females showed increased anxiety in the elevated plus maze (not yet published). Our data contrast with those of Raber's team, and suggest that the impact of apoE4 mutation also depends on the anxiety situation (anxiety for height vs anxiety for highly illuminated situation). It should also be noted that, in the study of Siegel et al, ApoE4 were compared to ApoE2 and ApoE3, while in our case we used specific WT controls from heterozygote parents breeding. The difference between our results and those of these authors might also be explained by differences in the background of mice. Indeed, Robertson et al. used C57BL/6J background while mice used in our studies had a mixed 129Sv/C57BL6J background, and the functional expression of mutations strongly depends in the genetic background of animals (Lominska et al., 2001).

We also showed that combined chronic stress and ApoE2 insertion in males had anxiolytic properties in the light dark and openfield, and increased activity in several situations, including the openfield, the light dark and elevated plus maze. On the other hand, one year old ApoE2 females previously submitted to stress showed tendency to increased anxiety. ApoE2 mutation by itself did not affect anxiety in adult male and female mice (personal data, not yet published). These results are also the first ones describing stress and ApoE2 impact on anxiety;

most studies in animals generally focused on ApoE4 mutation considering that ApoE4 represents a major genetic risk factor in Alzheimer's disease, while the potential effects of ApoE2 mutation were neglected. It is clear, in our case, that stress has an impact on the anxiety phenotype related to ApoE2 genotype in mice. These data are in agreement with several studies showing that behavioral parameters can be modified under specific environmental conditions such as the stress (Willner et al., 1987; Papp et al., 1991; Moreau et al., 1992; Moreau et al., 1993; Lechin et al., 1996; Willner, 1997; Elizalde et al., 2008; LeBlanc, 2009). In addition, our data show that the stress affects differentially males and females, and support previous observations showing that stress could be anxiolytic in males and anxiogenic in females (Luine et al., 2007). In the same line, our results also show that Both ApoE2 males and females previously submitted to chronic stress showed reduced susceptibility to despair, males in the tail suspension and forced swim test, and females in the forced swim test. Depression is an important comorbidity in Alzheimer's disease, and ApoE2 genotype was reported to have protective effects in human (Fan et al., 2006; Julian et al., 2009). Our work is the first to show protective effects of ApoE2 genotype in mice.

Finally, our results show that one year-old ApoE3 females submitted to chronic stress showed increased susceptibility to despair in the tail suspension test. If this result is difficult to interpret, at least it shows that ApoE3 mutation might affect behavior in the mice, and the

strategy using apoE3 mutant mice as controls for evaluation of the impact of ApoE4 genotype in animals might be misleading and should be considered with caution.

Concerning cognitive abilities, our results shows that ApoE4 male mice under stress conditions showed altered object recognition memory and spatial learning at 1.5 years of age, but not at 1 year-old. In stressed females, ApoE4-KI mutation caused significant deficits in object recognition memory starting from 1 year of age. Decreased cognitive performance was previously observed following ApoE4 insertion. In this regard, adult or middle-aged ApoE4 female mice did not detect changes in the spatial configuration of objects and showed impaired spatial learning performance, as compared to ApoE3 ones (Grootendorst et al., 2005; Bour et al., 2008). Other studies using mice carrying human ApoE4 allele by itself or coupled to APP mutation confirmed the deleterious impact of ApoE4 on spatial learning, which were seen primarily in females (Raber et al., 1998; Raber et al., 2000b; van Meer et al., 2007; Kornecook et al., 2010). In our laboratory, ApoE4 KI mutation did not affect learning and memory by itself in adult or aged mice, except an accelerated extinction in contextual fear conditioning in both male and female mice. The lack of effects of ApoE4 mutation by itself in our case was not surprising, considering that the ApoE4 allele represents only a risk factor to develop AD, but not necessarily a cause of potential cognitive deficits; ApoE4 might act together with other endogenous or exogenous factor to precipitate cognitive deficits. In addition, the controls used and genetic backgrounds of mice differed between our conditions

and the other studies. Our results clearly show that chronic stress is one of the environmental factors influencing ApoE4 expression to induce learning and memory deficits with age, such deficits appears earlier in females.

Interestingly, our results also show that ApoE2-KI females submitted to stress displayed improved recognition and spatial learning and memory performance at one year of age. Such cognitive improvement in ApoE2 females was still observed at 1.5 year-old in several forms of learning and memory including working memory, object recognition and spatial learning. Several clinical studies showed that ApoE2 genotype is associated with reduced risk to develop cognitive deficits and AD (Farrer et al., 1997; Martins et al., 2005). According to our knowledge, our work is the first to describe cognitive enhancing effects of ApoE2 genotype in animals. In agreement with this, ApoE2 TR mice were shown to be resistant to long term potentiation (LTP) blockade by A β in hippocampal slices (Trommer et al., 2005); LTP is considered as physiological phenomenon underlying learning and memory processes.

In the present study, we also showed that one year old ApoE2 and ApoE3 males submitted to unpredictable stress showed decreased contextual freezing performance, which might be due in ApoE2 animals to the observed increased activity and reduced anxiety. ApoE3 females also showed altered object recognition performance at one year old. Deleterious effects of ApoE3 mutation were also reported by Groontendorst et al. showing that female apoE3 mice failed to improve their performance during training in a reference memory version of the spatial water-

maze task (Grootendorst et al., 2005), and confirm our observations in the tail suspension test, supporting the fact that the strategy consisting to use ApoE3 mice as controls is presumably inappropriate.

The mechanisms by which apoE genotypes, alone or in combination with stress, affect emotional behavior and cognitive abilities are still to be documented. Nevertheless, Robertson et al. (2005) showed that increased anxiety in apoE4 mice was associated with reduced microtubule-associated protein (MAP) 2-positive neuronal dendrites in the central nucleus of the amygdala, structure importantly involved in the regulation of fear and anxiety. In addition to the amygdala, the hippocampus has largely been involved in anxiety and stress regulation (Leuner & Gould, 2010). Interestingly, hippocampal and amygdalar atrophy were observed in poE4 carriers (Plassman et al., 1997; Lind et al., 2006). On the other hand, young apoE4-TR males show a reduced magnitude of dentate gyrus (DG) LTP, and ApoE2 TR mice were shown to be resistant to LTP blockade by A β in hippocampal slices (Trommer et al., 2004; Trommer et al., 2005). Thus, the memory and emotional changes following ApoE mutations might be related to structural and functional alterations.

Concerning the possible molecular mechanisms, different pathways can be affected by stress. The central noradrenergic system is classically involved of stress effects (Lechin et al., 1996). In ApoE-KO mice, specific decrease in noradrenalin levels has been observed in kidney (Michel et al., 2008) and in the hippocampus (Puolivali et al., 2000b), demonstrating the

implication of ApoE in the noradrenergic activity. Other molecules like corticosterone, glucocorticoid or adrenal stress hormones also act in a stress-induced plasticity principally in the amygdala, but also in other brain regions, and could have long-term consequences for cognitive performance and pathological anxiety exhibited in people with affective disorders (Roosendaal et al., 2009). In this regard, Grootendorst & al. showed that aged ApoE-KO female mice had increased corticosterone secretion which parallels cognitive decline in water maze performance (Grootendorst et al., 2001b; Grootendorst et al., 2004). Increase in plasma corticosterone was also observed in ApoE-KO, ApoE3 and ApoE4 mice following anxiety testing (Robertson et al., 2005). The cholinergic system is largely involved in learning and memory abilities (Lecourtier et al., 2010), and shown to be altered in Alzheimer's disease (Craig et al., 2011). It has been shown that chronic stress induces an increase in acetylcholine esterase levels in the rat stressed hippocampus (Tagliari et al., 2011). On the other hand apolipoprotein E-deficient mice were reported to have reduced levels of hippocampal cholinergic nerve terminals (Chapman et al., 2000) and reduced cholinergic muscarinic receptors (Siegel et al., 2011), suggesting cortical and hippocampal modulation of the cholinergic system by ApoE.

One may suggest that the stress might affect these molecular signals depending on the ApoE genotype, the age and the gender, in specific brain regions such as the amygdala and hippocampus to modulate affective behavior and cognitive performance. In our conditions,

such interactive effects of stress and apoE polymorphism produced anxiolytic effects in ApoE4 and ApoE2 males, and increased anxiety in ApoE2 females at one year of age. The effects of stress on cognitive abilities were deleterious in ApoE4 mutants primarily in females, and allowed to detect the cognitive enhancing effects of ApoE2 genotype.

All together, results of the present study shows that the stress provide an excellent model for understanding pathophysiological mechanisms underlying age-related cognitive and emotional changes associated to ApoE polymorphism risks factors, and thus might provide progress in the understanding of pathophysiological mechanisms leading to sporadic forms of Alzheimer's disease.

References

- Ashford JW (2004) APOE genotype effects on Alzheimer's disease onset and epidemiology. *J Mol Neurosci* 23: 157-165.
- Bour A, Grootendorst J, Vogel E, Kelche C, Dodart JC, Bales K, Moreau PH, Sullivan PM, Mathis C (2008) Middle-aged human apoE4 targeted-replacement mice show retention deficits on a wide range of spatial memory tasks. *Behav Brain Res* 193: 174-182.
- Bourin M, Hascoet M (2003) The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol* 463: 55-65.
- Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA (2010) Alzheimer disease. *Dis Mon* 56: 484-546.
- Champy MF, Selloum M, Piard L, Zeitler V, Caradec C, Chambon P, Auwerx J (2004) Mouse functional genomics requires standardization of mouse handling and housing conditions. *Mamm Genome* 15: 768-783.
- Chapman S, Sabo T, Roses AD, Michaelson DM (2000) Reversal of presynaptic deficits of apolipoprotein E-deficient mice in human apolipoprotein E transgenic mice. *Neuroscience* 97: 419-424.
- Craig LA, Hong NS, McDonald RJ (2011) Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 35: 1397-1409.
- Crawford F, Wood M, Ferguson S, Mathura V, Gupta P, Humphrey J, Mouzon B, Laporte V, Margenthaler E, O'Steen B, Hayes R, Roses A, Mullan M (2009) Apolipoprotein E-genotype dependent hippocampal and cortical responses to traumatic brain injury. *Neuroscience* 159: 1349-1362.

- Crawley JN (1999) Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain Res* 835: 18-26.
- Cryan JF, Mombereau C, Vassout A (2005) The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 571-625.
- Eisenstein M (2011) Genetics: finding risk factors. *Nature* 475: S20-22.
- Elizalde N, Gil-Bea FJ, Ramirez MJ, Aisa B, Lasheras B, Del Rio J, Tordera RM (2008) Long-lasting behavioral effects and recognition memory deficit induced by chronic mild stress in mice: effect of antidepressant treatment. *Psychopharmacology (Berl)* 199: 1-14.
- Fan PL, Chen CD, Kao WT, Shu BC, Lung FW (2006) Protective effect of the apo epsilon2 allele in major depressive disorder in Taiwanese. *Acta psychiatrica Scandinavica* 113: 48-53.
- Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM (1997) Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 278: 1349-1356.
- Goedert M, Ghetti B (2007) Alois Alzheimer: his life and times. *Brain Pathol* 17: 57-62.
- Goedert M, Spillantini MG (2006) A century of Alzheimer's disease. *Science* 314: 777-781.
- Graeber MB, Mehraein P (1999) Reanalysis of the first case of Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 249 Suppl 3: 10-13.

- Grootendorst J, Bour A, Vogel E, Kelche C, Sullivan PM, Dodart JC, Bales K, Mathis C (2005) Human apoE targeted replacement mouse lines: h-apoE4 and h-apoE3 mice differ on spatial memory performance and avoidance behavior. *Behav Brain Res* 159: 1-14.
- Grootendorst J, Enthoven L, Dalm S, de Kloet ER, Oitzl MS (2004) Increased corticosterone secretion and early-onset of cognitive decline in female apolipoprotein E-knockout mice. *Behavioural brain research* 148: 167-177.
- Grootendorst J, Oitzl MS, Dalm S, Enthoven L, Schachner M, de Kloet ER, Sandi C (2001) Stress alleviates reduced expression of cell adhesion molecules (NCAM, L1), and deficits in learning and corticosterone regulation of apolipoprotein E knockout mice. *The European journal of neuroscience* 14: 1505-1514.
- Hannequin D, Campion D, Dumanchin C, Martinez M, Agid Y, Clerget-Darpoux F, Frebourg T, Brice A (1998) [Genetics of Alzheimer's disease]. *Rev Neurol (Paris)* 154 Suppl 2: S65-74.
- Hartman RE, Wozniak DF, Nardi A, Olney JW, Sartorius L, Holtzman DM (2001) Behavioral phenotyping of GFAP-apoE3 and -apoE4 transgenic mice: apoE4 mice show profound working memory impairments in the absence of Alzheimer's-like neuropathology. *Exp Neurol* 170: 326-344.
- Hascoet M, Bourin M, Dhonnchadha BA (2001) The mouse light-dark paradigm: a review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 25: 141-166.
- Julian LJ, Vella L, Frankel D, Minden SL, Oksenberg JR, Mohr DC (2009) ApoE alleles, depression and positive affect in multiple sclerosis. *Mult Scler* 15: 311-315.

- Kamboh MI (2004) Molecular genetics of late-onset Alzheimer's disease. *Ann Hum Genet* 68: 381-404.
- Karl T, Pabst R, von Horsten S (2003) Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. *Exp Toxicol Pathol* 55: 69-83.
- Kawakami A, Tanaka A, Chiba T, Nakajima K, Shimokado K, Yoshida M (2003) Remnant lipoprotein-induced smooth muscle cell proliferation involves epidermal growth factor receptor transactivation. *Circulation* 108: 2679-2688.
- Knouff C, Hinsdale ME, Mezdour H, Altenburg MK, Watanabe M, Quarfordt SH, Sullivan PM, Maeda N (1999) Apo E structure determines VLDL clearance and atherosclerosis risk in mice. *J Clin Invest* 103: 1579-1586.
- Kornecook TJ, McKinney AP, Ferguson MT, Dodart JC (2010) Isoform-specific effects of apolipoprotein E on cognitive performance in targeted-replacement mice overexpressing human APP. *Genes Brain Behav* 9: 182-192.
- LeBlanc VR (2009) The effects of acute stress on performance: implications for health professions education. *Acad Med* 84: S25-33.
- Lechin F, Van der Dijs B, Benaim M (1996) Stress versus depression. *Progress in neuropsychopharmacology & biological psychiatry* 20: 899-950.
- Lecourtier L, de Vasconcelos AP, Leroux E, Cosquer B, Geiger K, Lithfous S, Cassel JC (2010) Septohippocampal pathways contribute to system consolidation of a spatial memory: Sequential implication of gabaergic and cholinergic neurons. *Hippocampus*.
- LeDoux J (2003) The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cell Mol Neurobiol* 23: 727-738.

- Leuner B, Gould E (2010) Structural plasticity and hippocampal function. *Annual review of psychology* 61: 111-140, C111-113.
- Levi O, Michaelson DM (2007) Environmental enrichment stimulates neurogenesis in apolipoprotein E3 and neuronal apoptosis in apolipoprotein E4 transgenic mice. *J Neurochem* 100: 202-210.
- Li G, Bien-Ly N, Andrews-Zwilling Y, Xu Q, Bernardo A, Ring K, Halabisky B, Deng C, Mahley RW, Huang Y (2009) GABAergic interneuron dysfunction impairs hippocampal neurogenesis in adult apolipoprotein E4 knockin mice. *Cell Stem Cell* 5: 634-645.
- Lind J, Larsson A, Persson J, Ingvar M, Nilsson LG, Backman L, Adolfsson R, Cruts M, Sleegers K, Van Broeckhoven C, Nyberg L (2006) Reduced hippocampal volume in non-demented carriers of the apolipoprotein E epsilon4: relation to chronological age and recognition memory. *Neuroscience letters* 396: 23-27.
- Lominska C, Levin JA, Wang J, Sikes J, Kao C, Smith JD (2001) Apolipoprotein E deficiency effects on learning in mice are dependent upon the background strain. *Behavioural brain research* 120: 23-34.
- Luine VN, Beck KD, Bowman RE, Frankfurt M, Maclusky NJ (2007) Chronic stress and neural function: accounting for sex and age. *J Neuroendocrinol* 19: 743-751.
- Mahley RW (1988) Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240: 622-630.
- Martinez M, Campion D, Brice A, Hannequin D, Dubois B, Didierjean O, Michon A, Thomas-Anterion C, Puel M, Frebourg T, Agid Y, Clerget-Darpoux F (1998) Apolipoprotein E epsilon4 allele and familial aggregation of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 55: 810-816.

- Martins CA, Oulhaj A, de Jager CA, Williams JH (2005) APOE alleles predict the rate of cognitive decline in Alzheimer disease: a nonlinear model. *Neurology* 65: 1888-1893.
- Mayeux R (2006) Genetic epidemiology of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 20: S58-62.
- Meziane H, Ouagazzal AM, Aubert L, Wietrzyk M, Krezel W (2007) Estrous cycle effects on behavior of C57BL/6J and BALB/cByJ female mice: implications for phenotyping strategies. *Genes Brain Behav* 6: 192-200.
- Michel F, Simonet S, Vayssettes-Courchay C, Bertin F, Sansilvestri-Morel P, Bernhardt F, Paysant J, Silvestre JS, Levy BI, Feletou M, Verbeuren TJ (2008) Altered TP receptor function in isolated, perfused kidneys of nondiabetic and diabetic ApoE-deficient mice. *American journal of physiology Renal physiology* 294: F120-129.
- Moreau JL, Jenck F, Martin JR, Mortas P, Haefely W (1993) Effects of moclobemide, a new generation reversible Mao-A inhibitor, in a novel animal model of depression. *Pharmacopsychiatry* 26: 30-33.
- Moreau JL, Jenck F, Martin JR, Mortas P, Haefely WE (1992) Antidepressant treatment prevents chronic unpredictable mild stress-induced anhedonia as assessed by ventral tegmentum self-stimulation behavior in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 2: 43-49.
- Nathan BP, Bellosta S, Sanan DA, Weisgraber KH, Mahley RW, Pitas RE (1994) Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science* 264: 850-852.
- Nichol K, Deeny SP, Seif J, Camacalang K, Cotman CW (2009) Exercise improves cognition and hippocampal plasticity in APOE epsilon4 mice. *Alzheimers Dement* 5: 287-294.

- Olaisen B, Teisberg P, Gedde-Dahl T, Jr. (1982) The locus for apolipoprotein E (apoE) is linked to the complement component C3 (C3) locus on chromosome 19 in man. *Hum Genet* 62: 233-236.
- Owen EH, Logue SF, Rasmussen DL, Wehner JM (1997) Assessment of learning by the Morris water task and fear conditioning in inbred mouse strains and F1 hybrids: implications of genetic background for single gene mutations and quantitative trait loci analyses. *Neuroscience* 80: 1087-1099.
- Papp M, Willner P, Muscat R (1991) An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. *Psychopharmacology (Berl)* 104: 255-259.
- Plassman BL, Welsh-Bohmer KA, Bigler ED, Johnson SC, Anderson CV, Helms MJ, Saunders AM, Breitner JC (1997) Apolipoprotein E epsilon 4 allele and hippocampal volume in twins with normal cognition. *Neurology* 48: 985-989.
- Prut L, Belzung C (2003) The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 463: 3-33.
- Puolivali J, Pradier L, Riekkinen P, Jr. (2000) Impaired recovery of noradrenaline levels in apolipoprotein E-deficient mice after N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine lesion. *Neuroscience* 95: 353-358.
- Raber J (2007) Role of apolipoprotein E in anxiety. *Neural Plast* 2007: 91236.
- Raber J, Huang Y, Ashford JW (2004) ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. *Neurobiol Aging* 25: 641-650.

- Raber J, Wong D, Buttini M, Orth M, Bellosta S, Pitas RE, Mahley RW, Mucke L (1998) Isoform-specific effects of human apolipoprotein E on brain function revealed in ApoE knockout mice: increased susceptibility of females. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10914-10919.
- Raber J, Wong D, Yu GQ, Buttini M, Mahley RW, Pitas RE, Mucke L (2000) Apolipoprotein E and cognitive performance. *Nature* 404: 352-354.
- Robertson J, Curley J, Kaye J, Quinn J, Pfankuch T, Raber J (2005) apoE isoforms and measures of anxiety in probable AD patients and Apoe^{-/-} mice. *Neurobiology of aging* 26: 637-643.
- Rodgers RJ, Dalvi A (1997) Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev* 21: 801-810.
- Roosendaal B, McEwen BS, Chattarji S (2009) Stress, memory and the amygdala. *Nature reviews Neuroscience* 10: 423-433.
- Roses AD (1996a) The Alzheimer diseases. *Curr Opin Neurobiol* 6: 644-650.
- Roses AD (1996b) Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. *Annu Rev Med* 47: 387-400.
- Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ, et al. (1993) Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43: 1467-1472.
- Schipper HM (2009) Apolipoprotein E: Implications for AD neurobiology, epidemiology and risk assessment. *Neurobiol Aging*.

- Siegel JA, Benice TS, Van Meer P, Park BS, Raber J (2011) Acetylcholine receptor and behavioral deficits in mice lacking apolipoprotein E. *Neurobiol Aging* 32: 75-84.
- Siegel JA, Haley GE, Raber J (2010) Apolipoprotein E isoform-dependent effects on anxiety and cognition in female TR mice. *Neurobiol Aging*.
- St George-Hyslop PH, Petit A (2005) Molecular biology and genetics of Alzheimer's disease. *C R Biol* 328: 119-130.
- Strittmatter WJ, Roses AD (1995) Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 4725-4727.
- Strittmatter WJ, Roses AD (1996) Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci* 19: 53-77.
- Sullivan PM, Mezdour H, Aratani Y, Knouff C, Najib J, Reddick RL, Quarfordt SH, Maeda N (1997) Targeted replacement of the mouse apolipoprotein E gene with the common human APOE3 allele enhances diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis. *J Biol Chem* 272: 17972-17980.
- Sullivan PM, Mezdour H, Quarfordt SH, Maeda N (1998) Type III hyperlipoproteinemia and spontaneous atherosclerosis in mice resulting from gene replacement of mouse Apoe with human Apoe*2. *J Clin Invest* 102: 130-135.
- Tagliari B, Tagliari AP, Schmitz F, da Cunha AA, Dalmaz C, Wyse AT (2011) Chronic variable stress alters inflammatory and cholinergic parameters in hippocampus of rats. *Neurochemical research* 36: 487-493.

- Trommer BL, Shah C, Yun SH, Gamkrelidze G, Pasternak ES, Stine WB, Manelli A, Sullivan P, Pasternak JF, LaDu MJ (2005) ApoE isoform-specific effects on LTP: blockade by oligomeric amyloid-beta1-42. *Neurobiology of disease* 18: 75-82.
- Trommer BL, Shah C, Yun SH, Gamkrelidze G, Pasternak ES, Ye GL, Sotak M, Sullivan PM, Pasternak JF, LaDu MJ (2004) ApoE isoform affects LTP in human targeted replacement mice. *Neuroreport* 15: 2655-2658.
- Utermann G, Langenbeck U, Beisiegel U, Weber W (1980) Genetics of the apolipoprotein E system in man. *Am J Hum Genet* 32: 339-347.
- van Gaalen MM, Steckler T (2000) Behavioural analysis of four mouse strains in an anxiety test battery. *Behav Brain Res* 115: 95-106.
- van Meer P, Acevedo S, Raber J (2007) Impairments in spatial memory retention of GFAP-apoE4 female mice. *Behav Brain Res* 176: 372-375.
- Weisgraber KH, Roses AD, Strittmatter WJ (1994) The role of apolipoprotein E in the nervous system. *Curr Opin Lipidol* 5: 110-116.
- Willner P (1997) Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)* 134: 319-329.
- Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R (1987) Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl)* 93: 358-364.

Legends:

Figure 1: Anxiety-related behavior in one year-old ApoE female mice. Light Dark: A. Percentage of time spent in the light box. B. Latency to enter the light box. Plus Maze: C. Percentage of entries in the open arms. D: Number of head dips. Open-field: E. Total distance in the whole arena. F: Percentage of time spent in the center of the arena. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. WT (Fisher).

Figure 2: Susceptibility to despair in one year-old ApoE female mice. A. Total duration of immobility in the tail suspension test. B. Latency to the first immobilization in the tail suspension test. C. Total duration of floating in the forced swim test. * $p < 0.05$ vs. WT (Fisher).

Figure 3: Anxiety-related behavior in one year-old ApoE male mice. Light Dark: A. percentage of time spent in the light box. B. Latency to enter the light box. C. Number of dark/light transitions. Plus Maze: D. Percentage of entries in the open arms. E. Number of head dips. Open-field: F. Total distance in the openfield. G. Total number of rears. H. Percentage of time spent in the center of the arena. I. Total number of entries in the center of the arena. *: $p < 0.05$, ** $p < 0,01$ vs. WT (Fisher).

Figure 4: Susceptibility to despair in one year-old ApoE4 male mice. A. Duration of immobility over the 6 minutes of testing in the tails suspension test. B. Latency to the first

immobilization in the tail suspension test. C. Total duration of immobility in the forced swim test. * $p < 0.05$ vs. WT (Fisher).

Figure 5: Cognitive abilities in 1 year-old ApoE female mice. A. Percentage of spontaneous alternation in the Y-maze. B. Object recognition index. C. Exploration duration of familiar and new objects during the retention trial in the object recognition test. D. Locomotor activity during the retention trial in the object recognition test. E. Latency to find the submerged platform during the five days of training in the water maze. F. Percentage of time spent in the different quadrants during the probe trial in the water maze. G: Number of platform crosses during the probe trial. * $p < 0.05$ vs. WT, Fisher; # $p < 0.05$ vs. the chance level (one group t-test); \$ $p < 0.05$ vs. familiar object (paired t-test).

Figure 6: Performance in the fear conditioning test in 1 year-old female mice A. Evolution of the activity during the conditioning session. B. Percentage of suppression of the activity to the context. C. Percentage of suppression of the activity in response to the cues.

Figure 7: Cognitive abilities in 1.5 year-old ApoE female mice. A. Percentage of spontaneous alternation. B. Percentage of time spent in the different quadrants during the probe trial in the water maze. C. Object recognition index at 3 h delay. D. Object recognition index at 24h delay. * $p < 0.05$ vs. WT, Fisher, # $p < 0.05$ vs. the chance level (one group t-test), \$ $p < 0.05$ vs. familiar object (paired t-test).

Figure 8: Cognitive abilities in 1 year-old ApoE male mice. A. Percentage of spontaneous alternation in the Y maze. B. Object recognition index. C. Exploration duration of the familiar and new objects during the retention session. D. Locomotor activity during the retention trial in the object recognition. E. Latency to find the submerged platform during the five days of training in the water maze. F. Percentage of time spent in the different quadrants during the probe trial in the water maze. G: Number of platform crosses during the probe trial. * $p < 0.05$ vs. WT, # $p < 0.05$ vs. the chance level (one group t-test), \$ $p < 0.05$ vs familiar object (paired t-test).

Figure 9: Fear conditionning performance in 1 year-old male mice A. Evolution of the activity during the conditionning session. B. Percentage of suppression of the activity during the context session. C. Percentage of suppression of the activity in response to the cues.

Figure 10: Cognitive abilities in 1.5 year-old ApoE4 male mice. A. Percentage of spontaneous alternation in the Y maze. B. Object recognition index after 3 h delay. C. Object recognition index after 24h of delay. D. Percentage of time spent in the different quadrants during the probe trial in the water maze. E. Number of platform crosses during the probe trial. * $p < 0.05$ vs. WT, # $p < 0.05$ vs. the chance level (one group t-test).

Figures

Figure 1 - Koutseff A., Mittelhaeuser C., Auwerx J. & Meziane H.

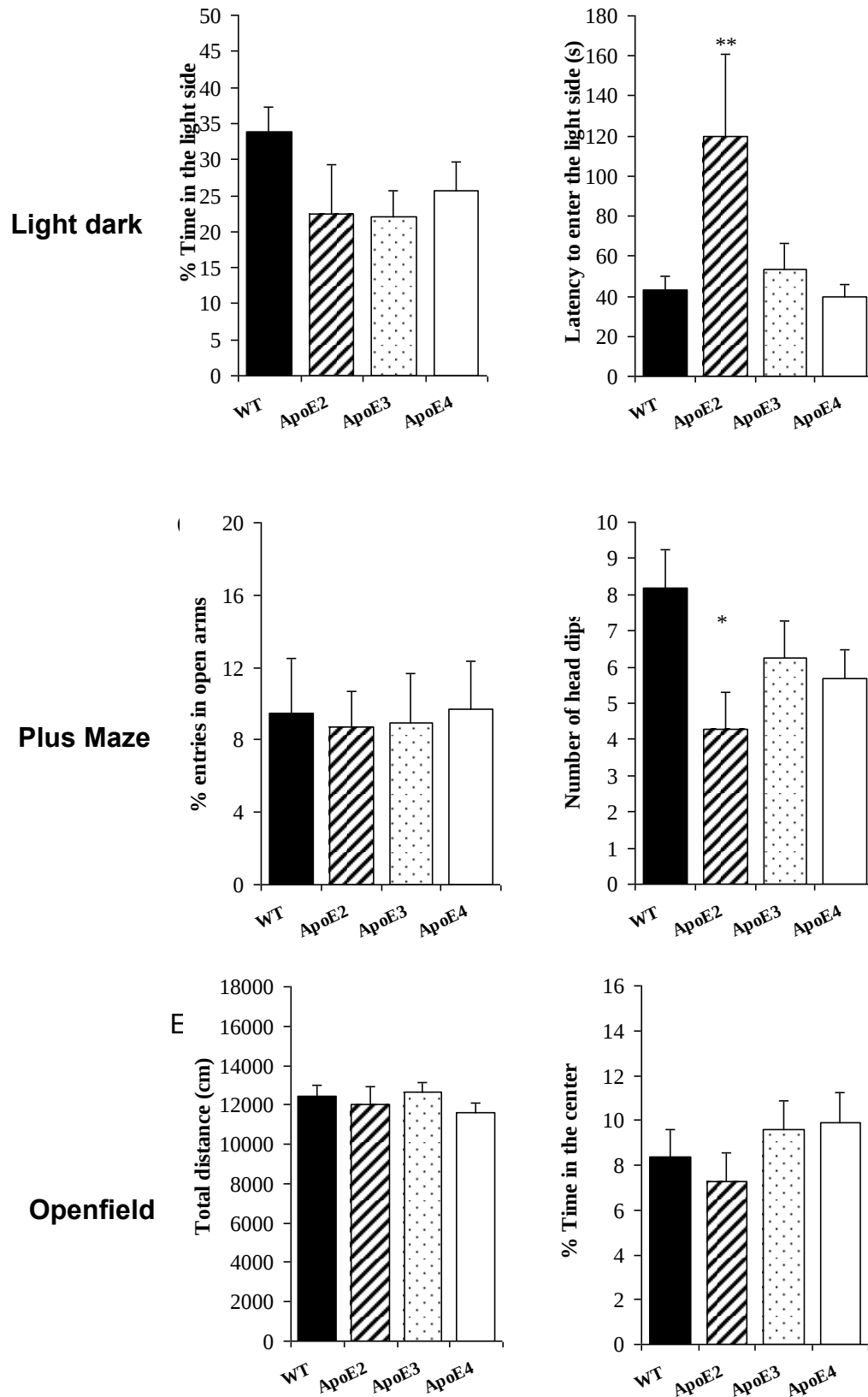


Figure 2 - Koutseff A., Mittelhaeuser C., Auwerx J. & Meziane H.

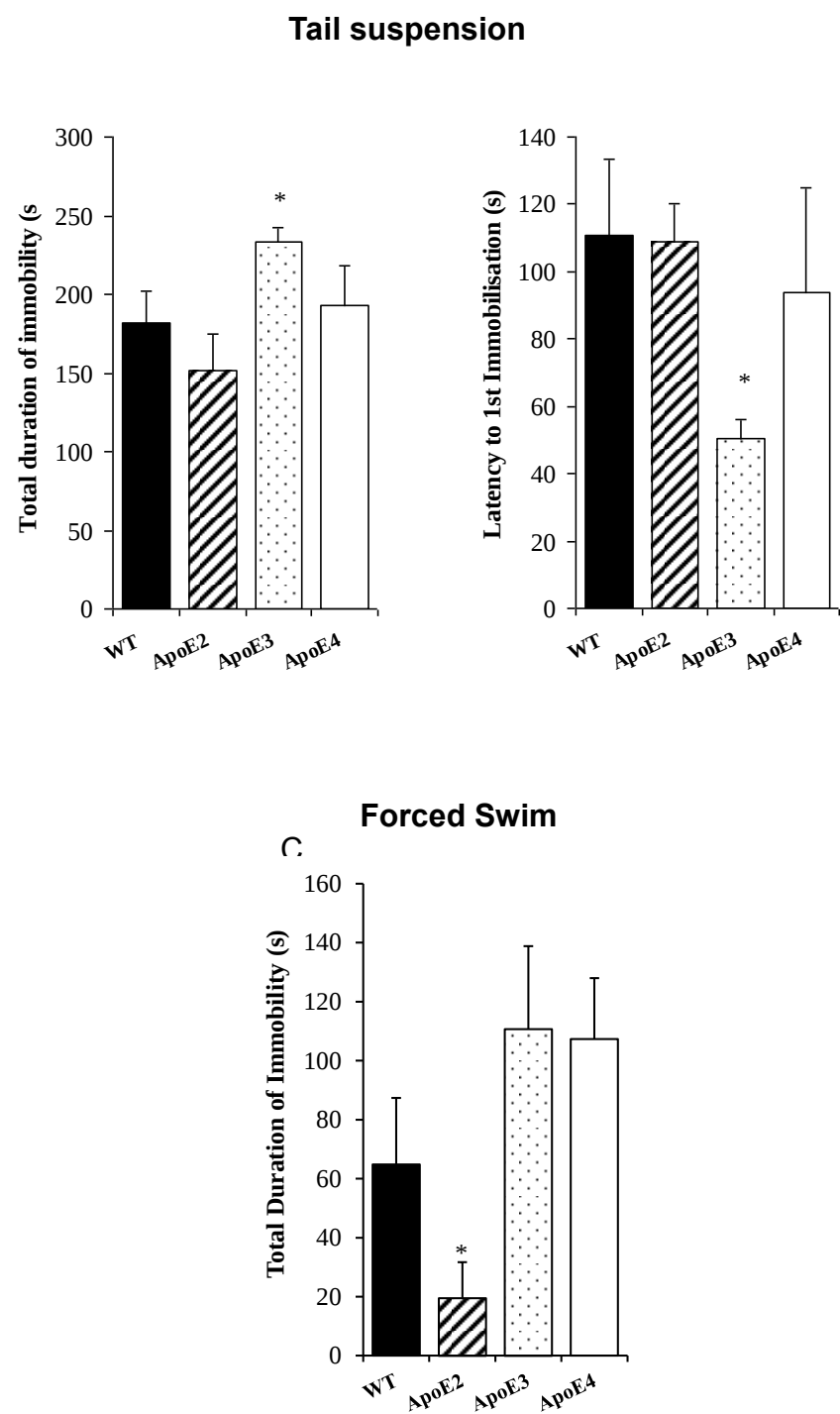


Figure 3 - Koutseff A., Mittelhaeuser C., Auwerx J. & Meziane H.

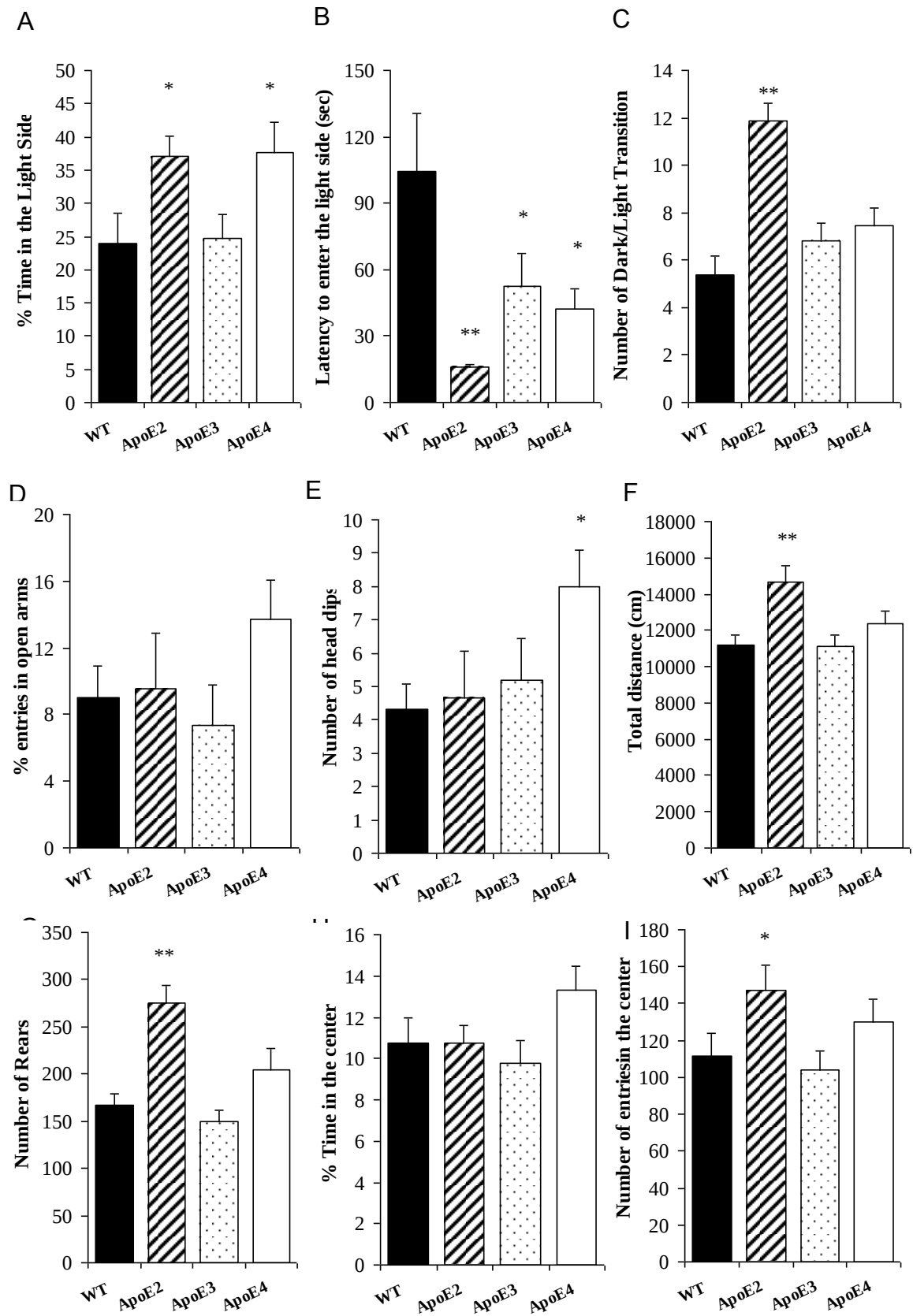


Figure 4 - Koutseff A., Mittelhaeuser C., Auwerx J. & Meziane H.

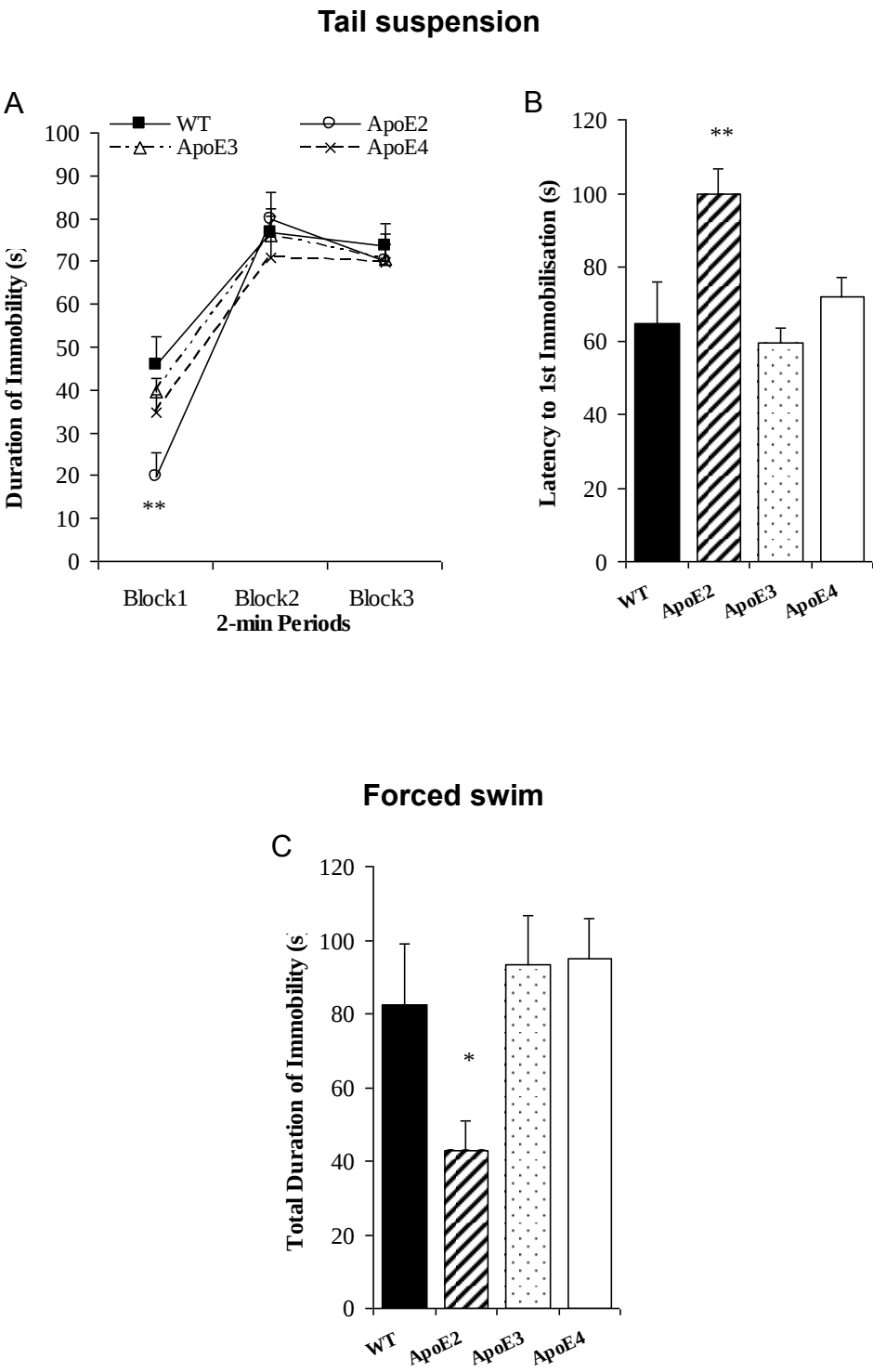


Figure 5 - Koutseff A., Mittelhaeuser C., Auwerx J. & Meziane H.

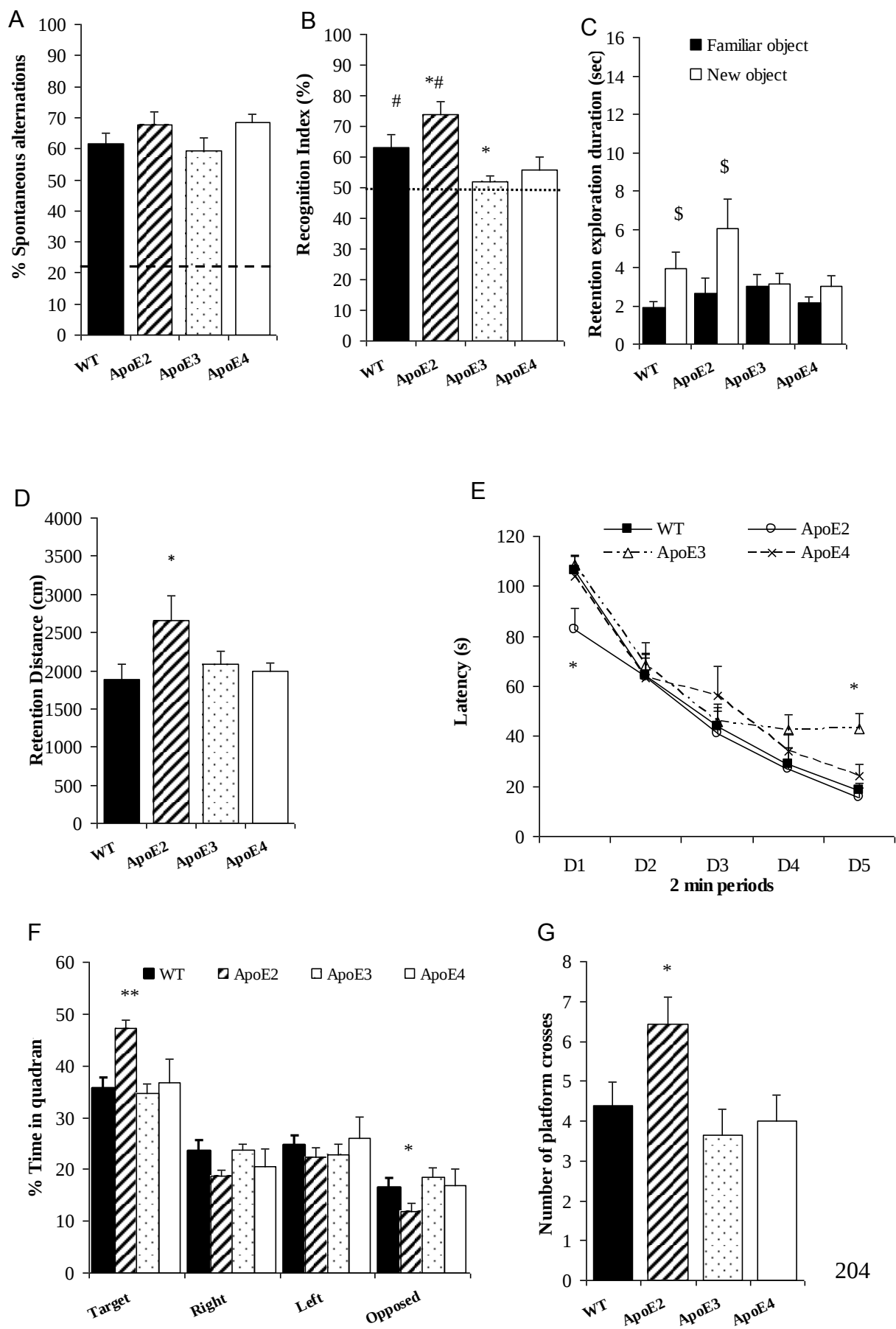


Figure 6 - Koutseff A., Mittelhaeuser C., Auwerx J. & Meziane H.

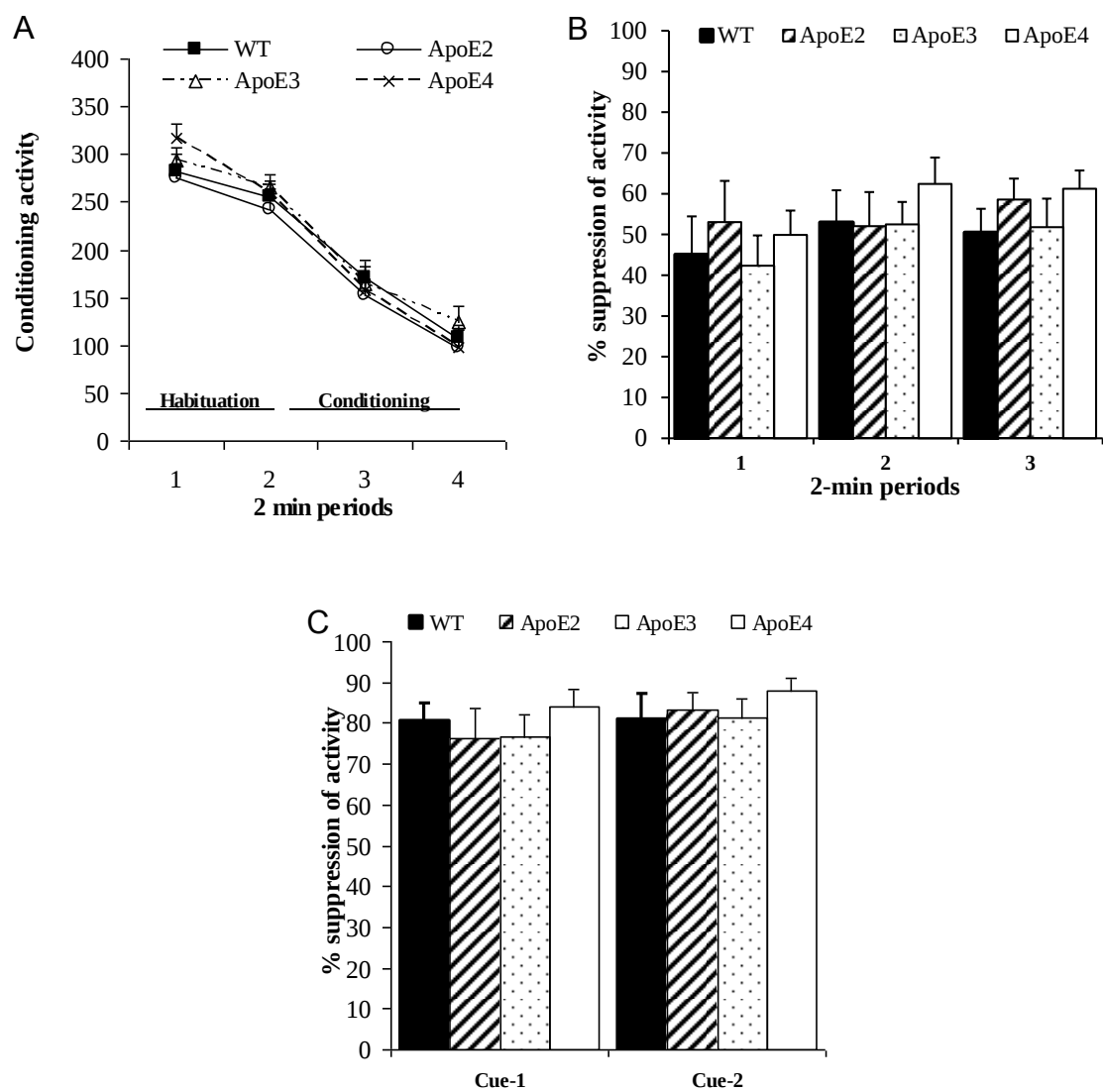


Figure 7 - Koutseff A., Mittelhaeuser C., Auwerx J. & Meziane H.

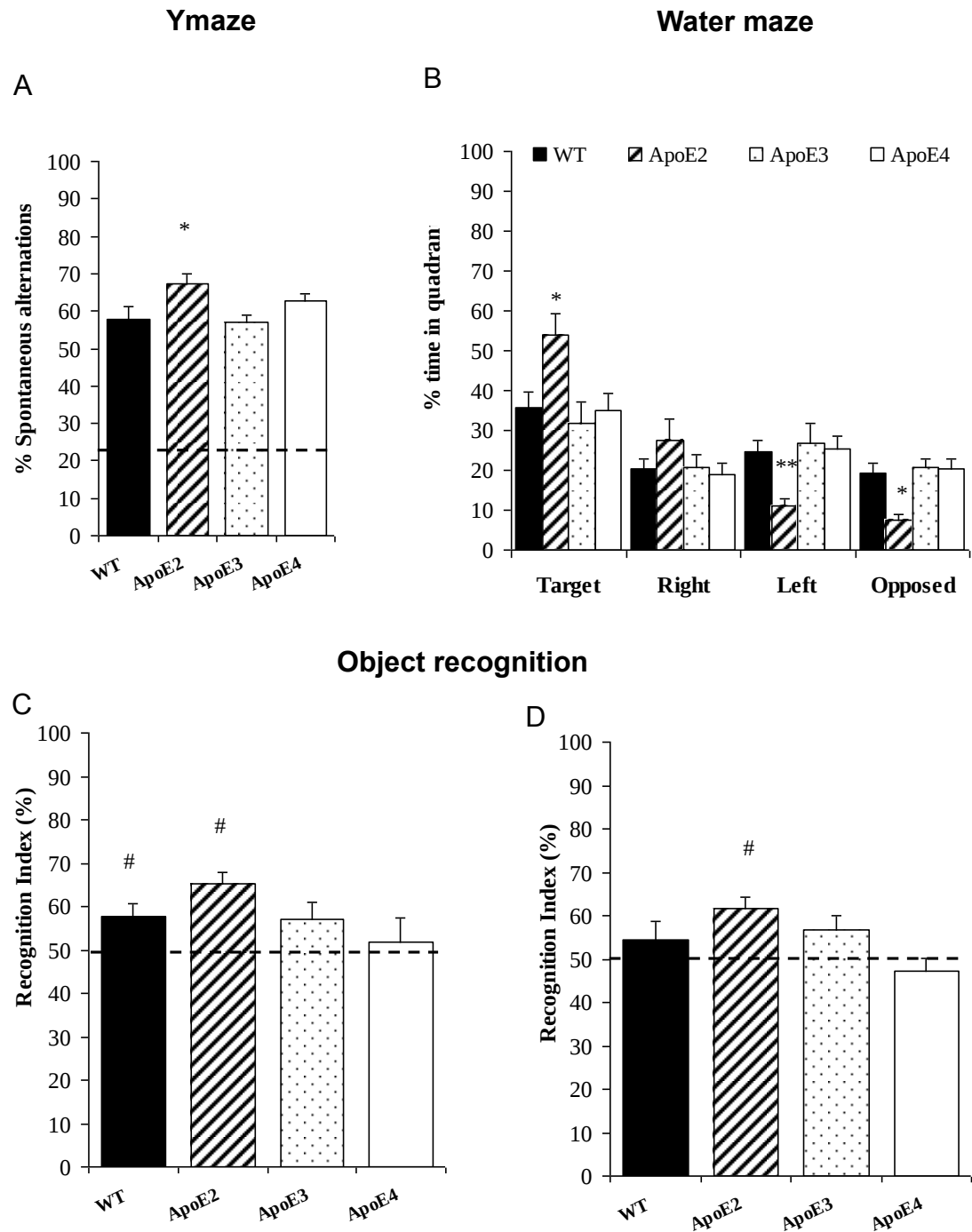


Figure 8 - Koutseff A., Mittelhaeuser C., Auwerx J. & Meziane H.

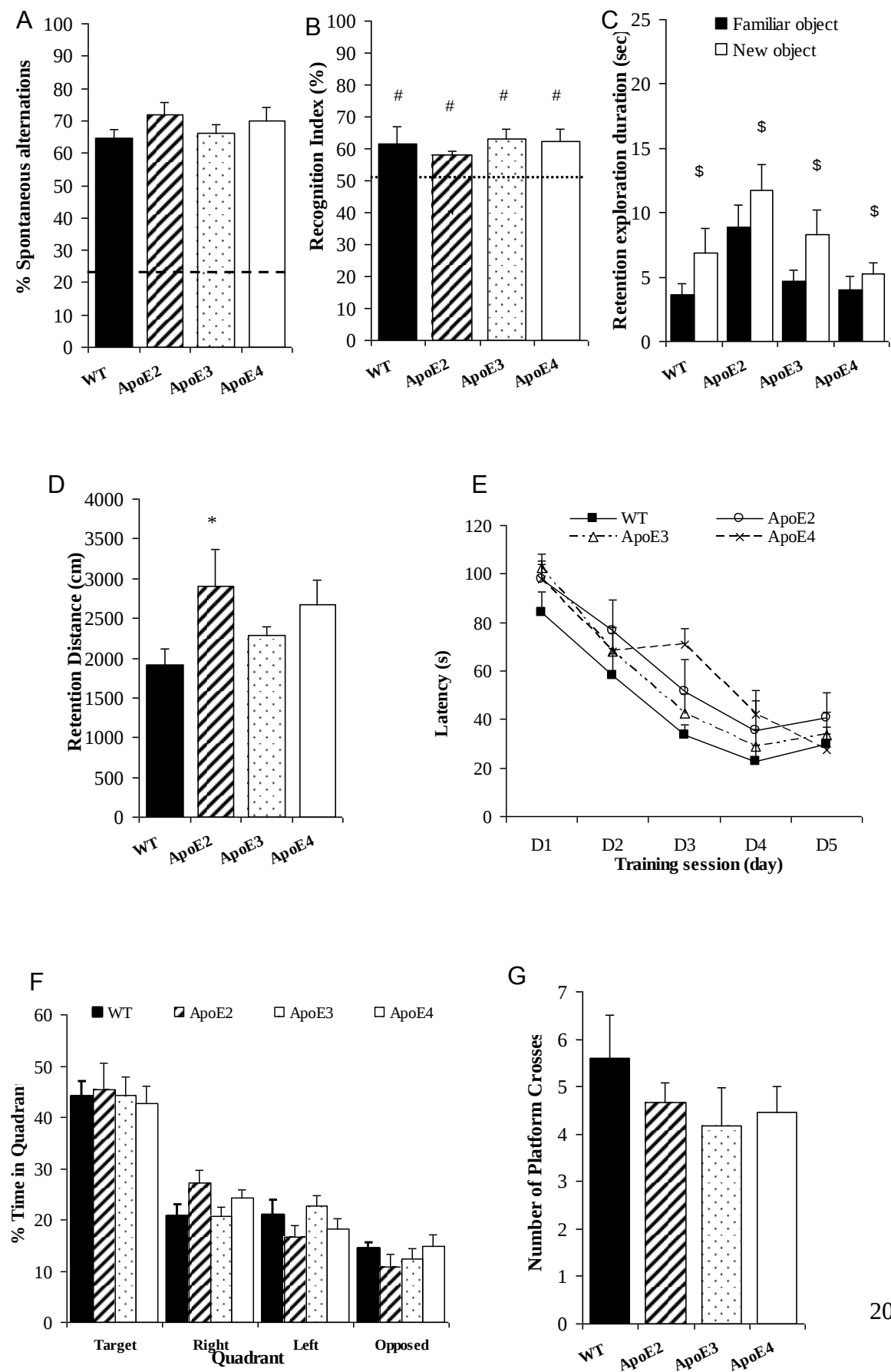


Figure 9 - Koutseff A., Mittelhaeuser C., Auwerx J. & Meziane H.

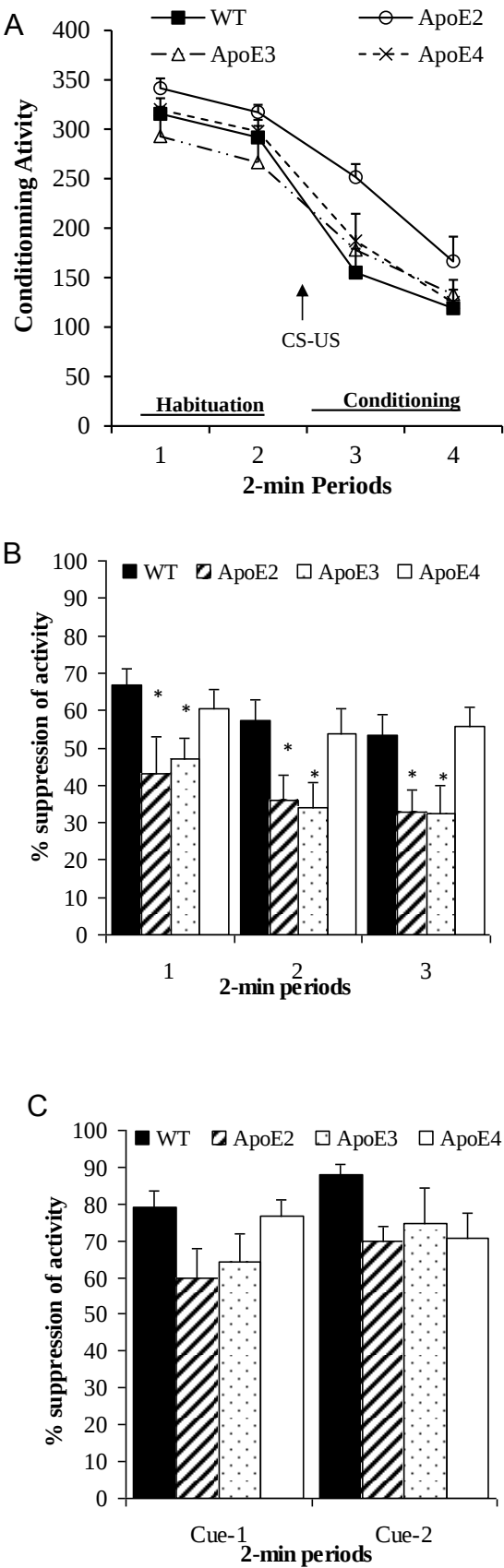
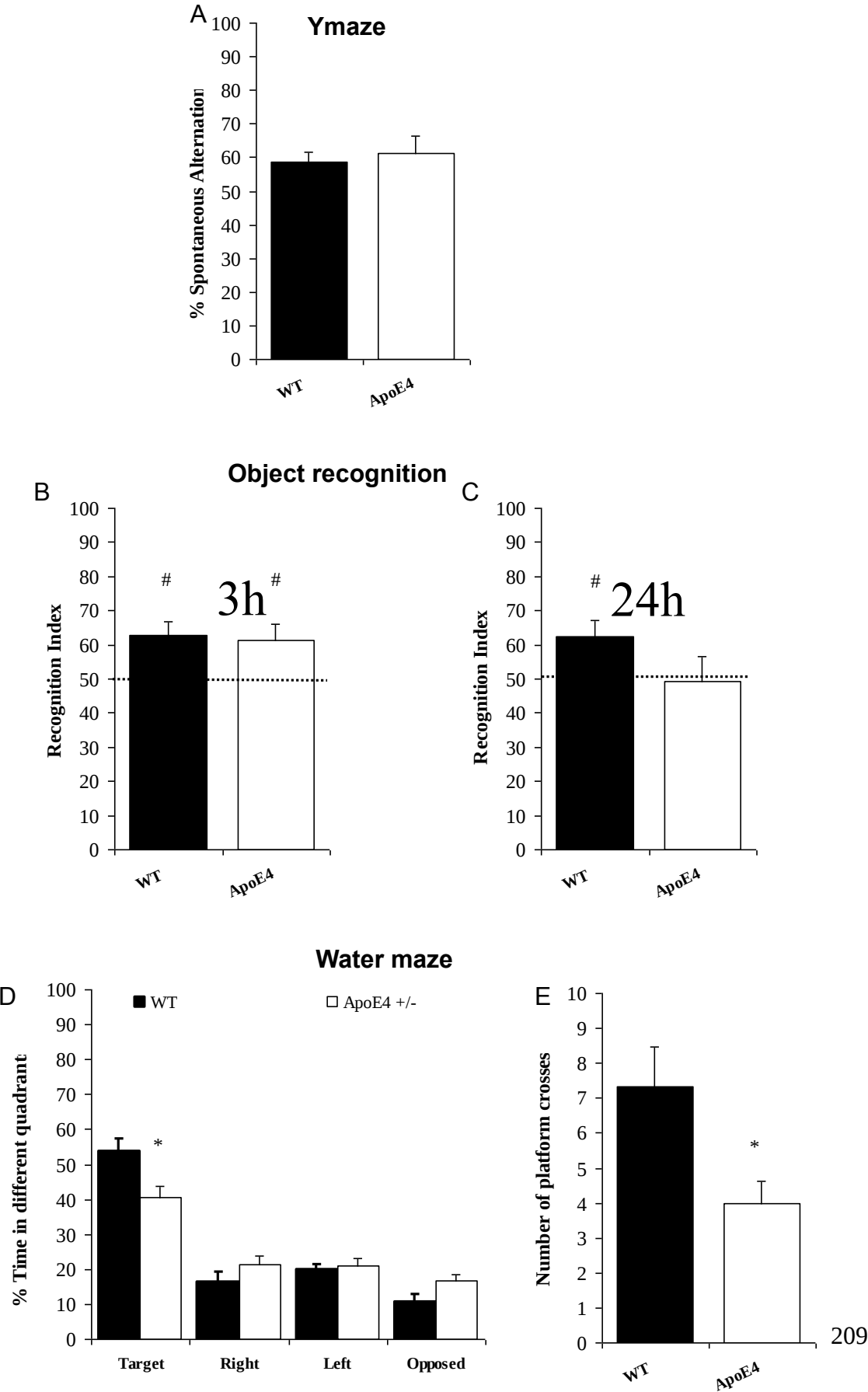


Figure 10 - Koutseff A., Mittelhaeuser C., Auwerx J. & Meziane H.



	1 an						1,5 an			
	ApoE2		ApoE3		ApoE4		ApoE2	ApoE3	ApoE4	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♀	♀	♂	♀
Cognition	/	+	/	-	/	-	+	-	-	-
		+	/	/	/	/	+	/	-	/
Émotion	-	+	/	/	-	/	NA			
		-	/	+	/	/				

Tableau 13. Résumé des principaux effets du stress lié aux différentes mutations ApoE humaines chez la souris sur la cognition et les émotions.

Les inégalités observées dans l'intégration du stress chronique liées au génotype de l'ApoE ainsi qu'au sexe, nous ont démontré que le polymorphisme de l'ApoE pouvait moduler l'intégration de facteurs de plasticité cérébrale. Le stress chronique étant en effet capable de modifier le fonctionnement des réseaux neuronaux.

Nous avons donc décidé, de compléter ce travail comportemental par une étude cellulaire, permettant d'évaluer l'impact du polymorphisme de l'ApoE, en fonction de l'âge et du sexe, sur la neurogénèse hippocampique, une forme de plasticité cérébrale. La prolifération neuronale a été quantifiée en utilisant une technique par cytométrie de flux.

Les résultats de cette étude vous sont présentés dans la troisième partie qui suit, à savoir l'article 2 : *Impact of the apolipoprotein E polymorphism, age and gender on neurogenesis in mice: pathophysiological relevance for Alzheimer's disease?*.

Troisième partie : Étude de l'effet
du polymorphisme de l'ApoE sur
un facteur particulier de plasticité
cérébrale : la neurogénèse
(Article 2)

Impact of the apolipoprotein E polymorphism, age and gender on neurogenesis in mice: pathophysiological relevance for Alzheimer's disease?

Alexis Koutseff a, Christophe Mittelhaeuser a, Karim Essabri a, Johan Auwerx b & Hamid Meziane a

a Institut Clinique de la Souris (ICS) Illkirch, France; b Laboratory of Integrative and Systems Physiology (LISP-NCM), École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Lausanne, Switzerland

Abbreviated title: Apolipoprotein E polymorphism and neurogenesis

Keywords: Neurogenesis, Apolipoprotein E2, Apolipoprotein E3, Apolipoprotein E4, Knock-in mice, age factor, gender factor, Alzheimer's disease

Corresponding author: Hamid Meziane, Ph.D., Institut Clinique de la Souris (ICS), 1 rue Laurent Fries, B.P. BP10142, 67404 Illkirch Cedex, France

Telephone: +33 388 655663

Fax: +33 388 655602

E-mail: meziane@igbmc.fr

Number of figures: 6

Number of pages: 30

Number of words in Abstract: 241

Abstract:

Apolipoprotein E (ApoE) is found in three different forms in human (ApoE2, ApoE3 and ApoE4), and ApoE polymorphism is recognized as one of the most prevalent risk factors for Alzheimer's disease (AD). ApoE is involved in lipid and cholesterol transport, cell repair, and amyloid- β deposition and some studies suggest potential implications in neurogenesis. In this regard, we investigated the possible impact of the three human different ApoE isoforms on neurogenesis. We used ApoE knock-in mice with different ages and genders, and quantified newborn cells in the hippocampus by flow cytometry. Young adult mice (10-12 week-old) from both genders carrying the ApoE4 gene displayed reduced neurogenesis compared to wild-type littermates. In addition, young adult ApoE2 female mice showed improved hippocampal progenitor cell proliferation. In older mice (1 year), hippocampal neurogenesis was globally decreased, particularly in females, and the difference between ApoE4 and WT disappeared for the two genders. Moreover, a surprising protective effect of the ApoE3 genotype was observed in aged females. Our study clearly supports the role of ApoE in neurogenesis, and shows for the first time an early inequality between the ApoE genotypes. The reduced neurogenesis observed for the ApoE4 genotype and the improved results obtained in young ApoE2 females supports the idea of a difference in the balance between neuronal birth and death modulated by the ApoE polymorphism in young animals. The maintenance of this balance and its modulation can influence pathophysiological mechanisms predisposing to neurodegenerative diseases like AD.

1. Introduction

Neurogenesis was localized in rodents in the subventricular zone of the anterior lateral ventricle and in the subgranular zone of the hippocampal dentate gyrus (Corotto, et al., 1993; Das and Altman, 1970; Luskin, 1993; Taupin and Gage, 2002). Such neuronal cell

proliferation was evidenced through the use of 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) an analogue of the thymidine, which labels DNA during the S-phase of the cellular cycle of dividing cells.

Recently, several bodies of evidence established links between hippocampal precursor cell proliferation and depression-like symptoms. Indeed, chronic stress, recognized as a major etiological factor in depression, and stress related glucocorticoids such as corticosterone decrease hippocampal neurogenesis (Bilslund, et al., 2006; Gould, et al., 1997). On the other hand, antidepressants from different classes can increase hippocampal cell proliferation (Bilslund, et al., 2006; Santarelli, et al., 2003). Neurogenesis is also in altered other brain diseases related to ageing, such as Alzheimer's disease (AD) (Crews, et al., 2010; Kuhn, et al., 1996; Mattson and Magnus, 2006; Phillips, et al., 2006; Simpson, et al., 2010; Thompson, et al., 2008). One may suggest that the efficiency of neurogenesis in young or adult may affect the susceptibility to develop Alzheimer's disease with age, and conversely that risk factors for AD may regulate neurogenesis. In this context, Apolipoprotein E (ApoE) polymorphism constitutes one of the risk factors of AD. Three alleles ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ and $\epsilon 4$), localized on chromosome 19, are coding for three different isoforms in humans (respectively ApoE2, Apo3 and ApoE4). ApoE is involved in lipid and cholesterol transport, tissue repair, neuronal growth and differentiation (Mahley, 1988; Nathan, et al., 1994). ApoE polymorphisms were first linked to metabolic abnormalities (Mahley, 1988). Later on, several studies have shown a link between genotypic variations of ApoE and the prevalence of AD, with the $\epsilon 4$ allele considered as a major genetic risk factor of AD (Ashford, 2004; Mahley, et al., 1996; Roses, 1996; Roses, 1998; Strittmatter and Roses, 1995). In the same line, old twins with the $\epsilon 4$ allele demonstrated poorer cognitive performance than their co-twins without the $\epsilon 4$ allele

(Reed, et al., 1994). Even if its impact in AD is known, the exact processes by which the ApoE4 contributes to the disease are still to be documented.

We submit here the idea that ApoE, in addition of its role in cell reparation and differentiation, can regulate cell generation. According to our knowledge, only two studies analyzed the effect of ApoE on neurogenesis, and contrasting data were found (Levi and Michaelson, 2007; Li, et al., 2009). In this regard, we investigated here the impact of the human ApoE polymorphism on the neurogenesis in mice. To this end, mutant mice carrying the human mutations $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, or $\epsilon 4$ were used. Hippocampal progenitor cells proliferation was analyzed both in young adult and aged mice from both genders to determine the influence of age and sex. Neurogenesis was quantified using flow cytometry, a rapid, reliable and robust technique (Balu, et al., 2009; Bilsland, et al., 2006).

2. Methods

2.1 Mice, administration of BrdU and sample preparation

ApoE mutant mice were generated as described by Sullivan et al. by replacing the mouse ApoE gene with the 3 different human ApoE alleles (Knouff, et al., 1999; Sullivan, et al., 1997; Sullivan, et al., 1998). The mice used in this study had 75%-C57BL6/J and 25%-129Sv genetic background. A PCR genotyping protocol with specific primers to the mouse wild type allele and to the targeted human ApoE allele was used. PCR products were analyzed using a LabChip® 90 microfluidic apparatus and analyzed with the HT DNA 5K LabChip® 90 Assay kit, which is more sensitive than gel analysis. WT mice were littermates from the ApoE knock-in mice and all mice issued from heterozygous parents breeding. Mice were group housed and kept under controlled vivarium conditions (Champy, et al., 2004): temperature

kept at 21-22°C and constant light-dark cycle (12hr with lights on at 07 a.m.) with food and sterile water available ad libitum. Young adult (9-13 week-old) and aged (1 year-old) mice of each gender and genotype (WT, ApoE2, ApoE3 and ApoE4) were used in this study.

BrdU was prepared in saline solution and administered i.p. for 4 consecutive days at a dose of 100 mg/kg. Animals were euthanized by cervical dislocation the day following the last BrdU injection and the hippocampus was immediately dissected out bilaterally, taking care to remove the rostral tip of hippocampus, where contamination with SVZ progenitors is likely. Samples were prepared according to Bilsland et al (Bilsland, et al., 2006). Briefly, hippocampi were dissociated using DNase I, and BrdU expression visualized using a conjugated primary antibody. Nuclei are labeled using the nuclear dye 7-AAD, and the BrdU expression quantified by flow cytometry.

2.2 Flow cytometry protocol

Flow cytometry was performed using the FACS Calibur flow cytometry analysis system (BD Biosciences, Oxford, UK). Population events were first sorted according to their size and granularity. 7-AAD cells were first gated on a histogram; the expressing cells were visualized on a forward/side scatter plot. They were then back-gated by quantifying their expression of 7-AAD to eliminate debris prior to analysis; this also eliminated autofluorescence of the sample. Another gating was generated, with FITC fluorescence (showing BrdU presence) on the Y-axis and 7-AAD fluorescence on the X-axis. Gates were always set using dissociates from animals which did not receive BrdU in vivo, but which were processed and stained alongside the experimental samples. Around 20.000 7-AAD expressing cells were gated, and the number of these cells expressing BrdU analyzed. The number of BrdU positive cells per

20.000 cells was determined, and expressed as percentage of 7AAD-BrdU positive cells relative to gated 7AAD-positive cells.

2.3 Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using the Statview software. For comparison between groups, non-parametric tests were used: Kruskal-Wallis test (KW) to compare 3 groups or more and Mann-Whitney test (MW) to compare 2 groups. The level of significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Flow cytometer acquisition parameters for BrdU labeled cells

The suspensions obtained from hippocampal dissociation were analyzed using flow cytometry. Figures 1 and 2 show plots obtained from flow cytometry acquisition for hippocampal dissociates from no-BrdU and BrdU-treated WT mice, respectively. For each figure, we can see on A the sorting of events based on their physical parameters; the X-axis (FSC for Forward Scatter) shows the events size whereas the Y-axis (SSC for Side Scatter) shows the events granularity. In panel B, the histogram represents 7-AAD fluorescence on the X-axis and FSC on the Y-axis; we can see two peaks: the first one on the left of the graph with low 7-AAD fluorescence reflecting cell debris. The second one on the right with higher fluorescence has smaller FSC and reflects nuclei labeled with 7-AAD and thus the population of cells expressing 7-AAD. A first gate (Gate 1 on the figure) was made on the histogram; the 7-AAD cells were gated and visualized on FSC/SCC plot (Fig. C), keeping only the cells based upon their morphology. Most of cells have low SSC and low-intermediate FSC. A polygonal gate

(Gate 2) was drawn around these cells. In panel D, we can see the cells population gated in panel C and sorted by 7-AAD (x-axis) and FITC (y-axis) fluorescence; the 7-AAD expressing events comprise two subpopulations, one large population and a much smaller population with higher DNA content, possibly representing doublets or dividing cells with double DNA content; voltage settings in the FITC channel were adjusted using no-BrdU labeled sample to a point where the 7-AAD cells formed a compact group. A window (Gate 3) was made focusing on the part of the graph with high concentrations in 7-AAD and FITC, using the no-BrdU mice results. This window is then kept for all the group results and presents no or a few cells for the no-BrdU mice, and more cells for the BrdU-treated mice. Thereby, in figure 1D we can see only few cells (only 5 from 20000 7-AAD expressing cells) in the window for a sample of a no-BrdU mouse. For the BrdU-treated mice, a higher number of 7AAD-BrdU positive cells are observed (156 in Fig.2D). The results are processed and analyzed independently for each hippocampus and averaged for each animal.

3.2 Effects of ApoE polymorphism on hippocampal neurogenesis in males and females

This experiment was designed to evaluate the effect of genotypic variation in the ApoE gene on hippocampal progenitor cell proliferation in young adult and aged male and female mice. Two to three month-old and 1-year-old WT, ApoE2, ApoE3 and ApoE4 homozygote mice from each gender, injected with BrdU were used; no-BrdU mice were used on each experiment day as controls. The number of BrdU-positive cells per 20.000 cells was determined, and expressed as percentage of 7AAD-BrdU positive cells, relative to gated 7AAD-positive cells. Plots from representative mice of each group are also presented.

Figure 3 summarizes data obtained in young adult males. We can see that no-BrdU mice have only sporadic events (Fig. 3 E, F). Samples from BrdU-treated mice, whatever the genotype, contained a significant number of 7-AAD-BrdU positive cells (Fig. 3 A-F). A global analysis of the data from BrdU-treated animals showed a significant effect of genotype [$H=10.711$, $p<0.02$, KW]. Indeed, ApoE4 males showed significantly lower number of 7AAD-BrdU positive cells as compared to WT counterparts [$U=3.00$, $p<0.03$, MW] (Fig. 3A, D-F). On the other hand, ApoE2 and ApoE3 young adult males had comparable levels of 7-AAD-BrdU positive cells to WTs [$U\geq 8.00$, NS, MW].

When neurogenesis was evaluated in aged males, no difference was found between WT and ApoE mutant groups [$H=1.103$, NS, KW] (data not shown). Additional analysis also did not show any difference between young and aged WT animals [$U=10.00$, NS, MW] (Fig. 4)

Figure 5 shows results obtained in young adult females. As observed in males, samples from no-BrdU mice showed only sporadic events, while those from BrdU-treated animals contained a significant number of 7-AAD-BrdU positive cells, as a result of BrdU uptake. In addition, there was a significant effect of genotypes [$H=11.50$, $p<0.01$ KW]. Indeed, ApoE4 females showed significantly lower number of 7-AAD-BrdU positive cells, as compared to WTs [$U=3.00$, $p<0.05$, MW] (Fig. 5A, D-F). By contrast, ApoE2 females displayed significantly increased number of 7-AAD-BrdU positive cells than WTs [$U=2.00$, $p<0.03$, MW] (Fig. 5A-B, E-F). The number of labeled cells was not modified in ApoE3 females [$U=11.00$, NS, MW].

In aged females the number of 7-AAD-BrdU positive cells also differed between genotypes [$H=10.177$, $p<0.05$, KW]. Surprisingly, ApoE3 females had significantly increased number of 7-AAD-BrdU positive cells, as compared to WTs [$U=0.00$, $p<0.01$, MW], while no difference was observed between ApoE2, ApoE4 and WTs [$U\geq 11.00$, NS, MW] (Fig. 6). When considering young versus aged animals, the number of labeled cells was significantly decreased in aged female mice than in young counterparts [$U= 25.000$ $p<0.01$ MW] (Fig. 4).

4. Discussion

We show here that the genotypic variation in the ApoE gene affects hippocampal progenitor cell proliferation in mice. More precisely, the insertion of the human ApoE4 allele in mice decreases hippocampal progenitor cell proliferation both in male and female adult mice. We also show that neurogenesis is decreased in aged female mice but not in males. Our data also show for the first time that ApoE2 knock-in mutation improves neurogenesis in young adult females, and the ApoE3 knock-in mutation improves neurogenesis in aged females.

ApoE is strongly expressed in the liver, but the brain comes directly in the second place. It is primarily synthesized locally by astrocytes and to a lower extent by microglia and neurons (Hauser, et al., 2010; Weisgraber, et al., 1994). ApoE plays an essential role in phospholipid metabolism, as it is involved in the transport of lipids and cholesterol (Jarvik, et al., 1997; Mahley, 1988; Yu, et al., 2010). Strong evidence associates ApoE polymorphisms with Alzheimer's diseases, particularly the ApoE4 allele constitutes the major known risk factor for AD in a gene-dose dependent manner (Corder, et al., 1993; Reed, et al., 1994; Saunders, et al., 1993). Nevertheless, the mechanisms by which ApoE gene variation contributes to AD are still to be documented. In this regard, several studies have shown the ApoE involvement

in tissue repair and cell growth and differentiation (Mahley, 1988). Among the ApoE isoforms, ApoE3 increases whereas ApoE4 decreased neuronal outgrowth in vitro in the presence of very low density lipoproteins and cholesterol (Handelmann, et al., 1992; Nathan, et al., 1994). In vivo, Buttini et al showed that the expression of ApoE3, but not ApoE4, has neuroprotective properties against excitotoxin-induced neuronal damage and age-related neurodegeneration (Buttini, et al., 1999; Buttini, et al., 2002). In addition, in case of brain injury, patients with ApoE4 genotype have a decrease in the recovery efficiency compared to those with ApoE3 genotype (Crawford, et al., 2009; Jordan, 2007; Teasdale, et al., 1997). On the other hand, only few studies described the involvement of ApoE in neurogenesis (Levi and Michaelson, 2007; Li, et al., 2009). Li et al reported that ApoE-KO and ApoE4 knock-in mice showed altered neurogenesis and that ApoE4 inhibition of neurogenesis occurs by impairing neuronal maturation and is mediated by GABA signaling (Li, et al., 2009). On the other hand, Levi and Michaelson (Levi and Michaelson, 2007) surprisingly showed that neurogenesis was increased in ApoE4 mice under regular conditions. Moreover, environmental enrichment, which was normally shown to improve cell proliferation, altered neurogenesis in ApoE4 transgenic male mice (Levi and Michaelson, 2007). Our results support the involvement of ApoE in hippocampal neurogenesis and clearly show disruptive effects of the ApoE4 allele in young adult male and female mice.

The more likely mechanism to explain ApoE's impact on neurogenesis seems linked to its role in lipid metabolism, as ApoE is clearly involved in the transport of lipids and cholesterol (Mahley, 1988; Yu, et al., 2010). These properties are important in cell proliferation and differentiation, as illustrated for the smooth muscle (Kawakami, et al., 2003), and also in neuronal repair, remodelling and synaptogenesis (Goritz, et al., 2002; Huang, 2006a; Huang,

2006b; Huang, et al., 2004; Mahley, et al., 2006). Furthermore, docosahexaenoic acid (22:6n-3, DHA), an omega-3 (n-3) long chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA), are highly enriched in the central nervous system (Martin and Bazan, 1992), and their metabolism can be modulated by ApoE polymorphism (Anil, 2007; Dreon, et al., 1995; Lopez-Miranda, et al., 1994; Martin, et al., 1993; Schaefer, et al., 1995). In relation with this, higher plasma levels of DHA were correlated with a reduced decline in memory deficits in ApoE-ε4 carriers (Samieri, et al., 2010), and DHA was reported to promote neurogenesis and neural differentiation in vitro (He et al. 2009). In addition, Fat-1 transgenic mice, displaying higher brain DHA levels, showed improved neurogenesis and neuritogenesis, and improved water maze learning performance (He, et al., 2009). In the fat-1 transgenic mice, the n-6 DPA can be converted to DHA leading to a higher level of DHA, which is beneficial to neurogenesis. One may therefore suggest that ApoE4 reduces neurogenesis through the alteration of the mechanism to produce DHA.

In addition, the role of ApoE receptors (ApoE-R) as signal modulators (Bu, 2009; Herz, 2009) might also explain the impact of the ApoE genotype on neurogenesis. In normal conditions, binding to ApoE-R activates the transcription factor CREB (cAMP response element binding protein) regulating both neurotrophic factors pathway and/or tau protein production and phosphorylation pathways involved in cell division and cytoskeleton formation, leading to the generation and maturation of new cells (Bu, 2009; Herz, 2009). In case of ApoE4, the affinity and/or binding to ApoE-R might be altered leading to abnormal downstream signaling, decreasing the efficiency to produce new neurons. It has been also shown that ApoE4 impaired the survival of GABAergic interneurons, leading to decreased GABAergic input onto new-born neurons and thereby inhibiting neuronal maturation of neuronal stem cells and

neurogenesis. Along a similar vein, ApoE deficiency decreased the bone-morphogenetic protein (BMP) antagonist Noggin expression in neuronal stem cells, leading to stimulation of astrogenesis and inhibition of neurogenesis (Li, et al., 2009).

In the present study, we showed for the first time that young adult ApoE2 knock-in females and 1-year-old ApoE3 knock-in females showed improved hippocampal progenitor cell proliferation. The genotypic variation in ApoE gene affects the susceptibility to develop Alzheimer's disease with age differently in males and females; the protective effect of the ApoE2 genotype and the deleterious effect of ApoE4 genotype is more pronounced in females than males (Ashford, 2004). Our data are in line with this observation, and support the gender differences in neurogenesis, which might be related to effects of sexual hormones on cholesterol and lipid metabolism. The ApoE2 protein has an increased efficiency in the transport of cholesterol compared to ApoE4. Cholesterol is implicated in the production of female gonadotropic hormones like estrogen. Estradiol and ApoE are furthermore involved in the neuronal regeneration (Struble, et al., 2007), promoting the glial release of ApoE. Synergistic effect of ApoE2 genotype and sexual hormones presumably act together to improve neurogenesis in adult females. The improved effect of ApoE3 knock-in mutation on neurogenesis in aged females is more complex to explain. ApoE3 is the most common isoform in humans and considered to be the normal form (Huang, 2006a; Huang, 2006b; Huang, et al., 2004; Mahley, et al., 2006). Nevertheless, the murine ApoE isoform is unique and differs from human ApoE3. One may wonder whether the ApoE3 knock-in could induce by itself structural and functional modifications as compared to murine WT allele. In agreement with this, the ApoE3 isoform was shown to improve neuronal outgrowth (Handelmann, et al., 1992; Nathan, et al., 1994).

Finally our data demonstrate that neuronal cell proliferation is decreased with age in mice, more particularly in females. These data are in agreement with previously reported data in different species (Cameron and McKay, 1999; Heine, et al., 2004; Kuhn, et al., 1996; Leuner, et al., 2007; Siwak-Tapp, et al., 2007).

All together, our work introduces the possibility of another aspect concerning the importance of the ApoE polymorphism in AD. ApoE has been shown to interact differently with the amyloid plaque depending on its isoform. Here we show that the genotypic variation of ApoE gene can be a determinant in the neurodegenerative processes leading to disease. With less neurons produced by the ApoE4 genotype, as compared to ApoE2 and ApoE3 genotypes, such disparity can be maintained during the whole life, and exacerbated when neuronal extinction increases. This can induce a negative balance for ApoE4 genotype; the association of a greatest cellular death to less cells replacement increases the possibility of the development of AD with age in carriers of the ApoE4 genotype. For the females with ApoE2 genotype, this balance is likely to be positive providing a better protection to neurodegenerative disorders like AD.

Acknowledgements

We thank Chaouki BAM'HAMED for animal care and colony management.

This work was supported by the Institut Clinique de la Souris (ICS). A. Koutseff was supported by a grant from the ICS.

Disclosure Statement

There are no actual or potential conflicts of interest.

References

- Anil, E. 2007. The impact of EPA and DHA on blood lipids and lipoprotein metabolism: influence of apoE genotype. *Proc Nutr Soc.* 66(1), 60-8
- Ashford, J.W. 2004. APOE genotype effects on Alzheimer's disease onset and epidemiology. *J Mol Neurosci.* 23(3), 157-65
- Balu, D.T., Hodes, G.E., Hill, T.E., Ho, N., Rahman, Z., Bender, C.N., Ring, R.H., Dwyer, J.M., Rosenzweig-Lipson, S., Hughes, Z.A., Schechter, L.E., Lucki, I. 2009. Flow cytometric analysis of BrdU incorporation as a high-throughput method for measuring adult neurogenesis in the mouse. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 59(2), 100-7
- Bilsland, J.G., Haldon, C., Goddard, J., Oliver, K., Murray, F., Wheeldon, A., Cumberbatch, J., McAllister, G., Munoz-Sanjuan, I. 2006. A rapid method for the quantification of mouse hippocampal neurogenesis in vivo by flow cytometry. Validation with conventional and enhanced immunohistochemical methods. *J Neurosci Methods.* 157(1), 54-63
- Bu, G. 2009. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci.* 10(5), 333-44
- Buttini, M., Orth, M., Bellosta, S., Akeefe, H., Pitas, R.E., Wyss-Coray, T., Mucke, L., Mahley, R.W. 1999. Expression of human apolipoprotein E3 or E4 in the brains of Apoe^{-/-} mice: isoform-specific effects on neurodegeneration. *J Neurosci.* 19(12), 4867-80

- Buttini, M., Yu, G.Q., Shockley, K., Huang, Y., Jones, B., Masliah, E., Mallory, M., Yeo, T., Longo, F.M., Mucke, L. 2002. Modulation of Alzheimer-like synaptic and cholinergic deficits in transgenic mice by human apolipoprotein E depends on isoform, aging, and overexpression of amyloid beta peptides but not on plaque formation. *J Neurosci.* 22(24), 10539-48
- Cameron, H.A., McKay, R.D. 1999. Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat Neurosci.* 2(10), 894-7
- Champy, M.F., Selloum, M., Piard, L., Zeitler, V., Caradec, C., Chambon, P., Auwerx, J. 2004. Mouse functional genomics requires standardization of mouse handling and housing conditions. *Mamm Genome.* 15(10), 768-83
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A. 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 261(5123), 921-3
- Corotto, F.S., Henegar, J.A., Maruniak, J.A. 1993. Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain. *Neurosci Lett.* 149(2), 111-4
- Crawford, F., Wood, M., Ferguson, S., Mathura, V., Gupta, P., Humphrey, J., Mouzon, B., Laporte, V., Margenthaler, E., O'Steen, B., Hayes, R., Roses, A., Mullan, M. 2009. Apolipoprotein E-genotype dependent hippocampal and cortical responses to traumatic brain injury. *Neuroscience.* 159(4), 1349-62
- Crews, L., Rockenstein, E., Masliah, E. 2010. APP transgenic modeling of Alzheimer's disease: mechanisms of neurodegeneration and aberrant neurogenesis. *Brain Struct Funct.* 214(2-3), 111-26

- Das, G.D., Altman, J. 1970. Postnatal neurogenesis in the caudate nucleus and nucleus accumbens septi in the rat. *Brain Res.* 21(1), 122-7
- Dreon, D.M., Fernstrom, H.A., Miller, B., Krauss, R.M. 1995. Apolipoprotein E isoform phenotype and LDL subclass response to a reduced-fat diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15(1), 105-11
- Goritz, C., Mauch, D.H., Nagler, K., Pfrieder, F.W. 2002. Role of glia-derived cholesterol in synaptogenesis: new revelations in the synapse-glia affair. *J Physiol Paris.* 96(3-4), 257-63
- Gould, E., McEwen, B.S., Tanapat, P., Galea, L.A., Fuchs, E. 1997. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci.* 17(7), 2492-8
- Handelmann, G.E., Boyles, J.K., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W., Pitas, R.E. 1992. Effects of apolipoprotein E, beta-very low density lipoproteins, and cholesterol on the extension of neurites by rabbit dorsal root ganglion neurons in vitro. *J Lipid Res.* 33(11), 1677-88
- Hauser, P.S., Narayanaswami, V., Ryan, R.O. 2010. Apolipoprotein E: From lipid transport to neurobiology. *Prog Lipid Res.*
- He, C., Qu, X., Cui, L., Wang, J., Kang, J.X. 2009. Improved spatial learning performance of fat-1 mice is associated with enhanced neurogenesis and neuritogenesis by docosahexaenoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(27), 11370-5
- Heine, V.M., Maslam, S., Joels, M., Lucassen, P.J. 2004. Prominent decline of newborn cell proliferation, differentiation, and apoptosis in the aging dentate gyrus, in absence of an age-related hypothalamus-pituitary-adrenal axis activation. *Neurobiol Aging.* 25(3), 361-75

- Herz, J. 2009. Apolipoprotein E receptors in the nervous system. *Curr Opin Lipidol.* 20(3), 190-6
- Huang, Y. 2006a. Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Neurology.* 66(2 Suppl 1), S79-85
- Huang, Y. 2006b. Molecular and cellular mechanisms of apolipoprotein E4 neurotoxicity and potential therapeutic strategies. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 9(5), 627-41
- Huang, Y., Weisgraber, K.H., Mucke, L., Mahley, R.W. 2004. Apolipoprotein E: diversity of cellular origins, structural and biophysical properties, and effects in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci.* 23(3), 189-204
- Jarvik, G.P., Goode, E.L., Austin, M.A., Auwerx, J., Deeb, S., Schellenberg, G.D., Reed, T. 1997. Evidence that the apolipoprotein E-genotype effects on lipid levels can change with age in males: a longitudinal analysis. *Am J Hum Genet.* 61(1), 171-81
- Jordan, B.D. 2007. Genetic influences on outcome following traumatic brain injury. *Neurochem Res.* 32(4-5), 905-15
- Kawakami, A., Tanaka, A., Chiba, T., Nakajima, K., Shimokado, K., Yoshida, M. 2003. Remnant lipoprotein-induced smooth muscle cell proliferation involves epidermal growth factor receptor transactivation. *Circulation.* 108(21), 2679-88
- Knouff, C., Hinsdale, M.E., Mezdour, H., Altenburg, M.K., Watanabe, M., Quarfordt, S.H., Sullivan, P.M., Maeda, N. 1999. Apo E structure determines VLDL clearance and atherosclerosis risk in mice. *J Clin Invest.* 103(11), 1579-86

- Kuhn, H.G., Dickinson-Anson, H., Gage, F.H. 1996. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci.* 16(6), 2027-33
- Leuner, B., Kozorovitskiy, Y., Gross, C.G., Gould, E. 2007. Diminished adult neurogenesis in the marmoset brain precedes old age. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(43), 17169-73
- Levi, O., Michaelson, D.M. 2007. Environmental enrichment stimulates neurogenesis in apolipoprotein E3 and neuronal apoptosis in apolipoprotein E4 transgenic mice. *J Neurochem.* 100(1), 202-10
- Li, G., Bien-Ly, N., Andrews-Zwilling, Y., Xu, Q., Bernardo, A., Ring, K., Halabisky, B., Deng, C., Mahley, R.W., Huang, Y. 2009. GABAergic interneuron dysfunction impairs hippocampal neurogenesis in adult apolipoprotein E4 knockin mice. *Cell Stem Cell.* 5(6), 634-45
- Lopez-Miranda, J., Ordovas, J.M., Mata, P., Lichtenstein, A.H., Clevidence, B., Judd, J.T., Schaefer, E.J. 1994. Effect of apolipoprotein E phenotype on diet-induced lowering of plasma low density lipoprotein cholesterol. *J Lipid Res.* 35(11), 1965-75
- Luskin, M.B. 1993. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron.* 11(1), 173-89
- Mahley, R.W. 1988. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science.* 240(4852), 622-30
- Mahley, R.W., Nathan, B.P., Pitas, R.E. 1996. Apolipoprotein E. Structure, function, and possible roles in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 777, 139-45

- Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., Huang, Y. 2006. Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(15), 5644-51
- Martin, L.J., Connelly, P.W., Nancoo, D., Wood, N., Zhang, Z.J., Maguire, G., Quinet, E., Tall, A.R., Marcel, Y.L., McPherson, R. 1993. Cholesteryl ester transfer protein and high density lipoprotein responses to cholesterol feeding in men: relationship to apolipoprotein E genotype. *J Lipid Res*. 34(3), 437-46
- Martin, R.E., Bazan, N.G. 1992. Changing fatty acid content of growth cone lipids prior to synaptogenesis. *J Neurochem*. 59(1), 318-25
- Mattson, M.P., Magnus, T. 2006. Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci*. 7(4), 278-94
- Nathan, B.P., Bellosta, S., Sanan, D.A., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W., Pitas, R.E. 1994. Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science*. 264(5160), 850-2
- Phillips, W., Michell, A.W., Barker, R.A. 2006. Neurogenesis in diseases of the central nervous system. *Stem Cells Dev*. 15(3), 359-79
- Reed, T., Carmelli, D., Swan, G.E., Breitner, J.C., Welsh, K.A., Jarvik, G.P., Deeb, S., Auwerx, J. 1994. Lower cognitive performance in normal older adult male twins carrying the apolipoprotein E epsilon 4 allele. *Arch Neurol*. 51(12), 1189-92
- Roses, A.D. 1996. Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. *Annu Rev Med*. 47, 387-400

- Roses, A.D. 1998. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. The tip of the susceptibility iceberg. *Ann N Y Acad Sci.* 855, 738-43
- Samieri, C., Feart, C., Proust-Lima, C., Peuchant, E., Dartigues, J.F., Amieva, H., Barberger-Gateau, P. 2010. Omega-3 fatty acids and cognitive decline: modulation by ApoEepsilon4 allele and depression. *Neurobiol Aging.*
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C., Hen, R. 2003. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science.* 301(5634), 805-9
- Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D., George-Hyslop, P.H., Pericak-Vance, M.A., Joo, S.H., Rosi, B.L., Gusella, J.F., Crapper-MacLachlan, D.R., Alberts, M.J., et al. 1993. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology.* 43(8), 1467-72
- Schaefer, E.J., Lichtenstein, A.H., Lamon-Fava, S., Contois, J.H., Li, Z., Rasmussen, H., McNamara, J.R., Ordovas, J.M. 1995. Efficacy of a National Cholesterol Education Program Step 2 diet in normolipidemic and hypercholesterolemic middle-aged and elderly men and women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15(8), 1079-85
- Simpson, J.M., Gil-Mohapel, J., Pouladi, M.A., Ghilan, M., Xie, Y., Hayden, M.R., Christie, B.R. 2010. Altered adult hippocampal neurogenesis in the YAC128 transgenic mouse model of Huntington disease. *Neurobiol Dis.*

- Siwak-Tapp, C.T., Head, E., Muggenburg, B.A., Milgram, N.W., Cotman, C.W. 2007. Neurogenesis decreases with age in the canine hippocampus and correlates with cognitive function. *Neurobiol Learn Mem.* 88(2), 249-59
- Strittmatter, W.J., Roses, A.D. 1995. Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(11), 4725-7
- Struble, R.G., Nathan, B.P., Cady, C., Cheng, X., McAsey, M. 2007. Estradiol regulation of astroglia and apolipoprotein E: an important role in neuronal regeneration. *Exp Gerontol.* 42(1-2), 54-63
- Sullivan, P.M., Mezdour, H., Aratani, Y., Knouff, C., Najib, J., Reddick, R.L., Quarfordt, S.H., Maeda, N. 1997. Targeted replacement of the mouse apolipoprotein E gene with the common human APOE3 allele enhances diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis. *J Biol Chem.* 272(29), 17972-80
- Sullivan, P.M., Mezdour, H., Quarfordt, S.H., Maeda, N. 1998. Type III hyperlipoproteinemia and spontaneous atherosclerosis in mice resulting from gene replacement of mouse Apoe with human Apoe*2. *J Clin Invest.* 102(1), 130-5
- Taupin, P., Gage, F.H. 2002. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res.* 69(6), 745-9
- Teasdale, G.M., Nicoll, J.A., Murray, G., Fiddes, M. 1997. Association of apolipoprotein E polymorphism with outcome after head injury. *Lancet.* 350(9084), 1069-71

- Thompson, A., Boekhoorn, K., Van Dam, A.M., Lucassen, P.J. 2008. Changes in adult neurogenesis in neurodegenerative diseases: cause or consequence? *Genes Brain Behav.* 7 Suppl 1, 28-42
- Weisgraber, K.H., Pitas, R.E., Mahley, R.W. 1994. Lipoproteins, neurobiology, and Alzheimer's disease: structure and function of apolipoprotein E. *Current Opinion in Structural Biology.* 4(4), 507-15
- Yu, C., Youmans, K.L., LaDu, M.J. 2010. Proposed mechanism for lipoprotein remodelling in the brain. *Biochim Biophys Acta.* 1801(8), 819-23

Legends

Figure 1: Representative example of results for a no-BrdU mouse. A: Sorting of cells based on their physical parameters; cell size is on the x-axis (Forward Scatter, FSC) and cell granularity is on the Y-axis (side scatter, SSC). B: Peaks of 7-AAD fluorescence and cell size; on the left, peak of cellular debris and on the right peak of 7-AAD labeled cells. Only the part under the blue line (gate 1) is kept for the analysis. C: Population of cells issued from the gate 1: fewer cells are present, and only those in the blue area (gate 2) are kept for the end of analysis to eliminate debris and autofluorescence. D: Population of cells in the gate 2 depending on 7-AAD fluorescence on the X-axis and the FITC fluorescence on the Y-axis. The gate 3 in blue determines the number of cells including FITC and BrdU and neo-formed

and has been used for each sample to count new cells. We can see only nearly 4 events in the area.

Figure 2: Example of results for a WT mouse. A: Sorting of cells based on their physical parameters; cell size is on the x-axis (Forward Scatter, FSC) and cell granularity is on the Y-axis (side scatter, SSC). B: Peaks of 7-AAD fluorescence and cell size; on the left, peak of cellular debris and on the right peak of 7-AAD labeled cells. Only the part under the blue line (gate 1) is kept for the analysis. C: Population of cells issued from the gate 1: fewer cells are present, and only those in the blue area (gate 2) are kept for the end of analysis to eliminate debris and autofluorescence. D: Population of cells in the gate 2 depending on 7-AAD fluorescence on the X-axis and the FITC fluorescence on the Y-axis. The gate 3 in blue determinates the number of cells including FITC and BrdU and neo-formed and has been used for each sample to count new cells. We can see only nearly 156 events in the area.

Figure 3: A to D: Representative example of population of BrdU positive cells obtained by flow cytometry for each genotype for the males (7-AAD fluorescence on the X-axis and the FITC fluorescence on the Y-axis). E: Quantification of BrdU positive cells reported to 7-AAD positive cells for the males shown for each animal. F: Average of the quantification of BrdU positive cells reported to 7-AAD positive cells for each genotype. (*: $p < 0.05$ to WT, MW).

Figure 4: Average of the quantification of BrdU positive cells reported to 7-AAD positive cells for young vs. old WT mice for the two genders. (**: $p < 0.01$ to WT-Young, MW).

Figure 5: A to D: Example of population of cells BrdU positive obtained by the flow cytometry for each genotype for the females (7-AAD fluorescence on the X-axis and the FITC fluorescence on the Y-axis). E: Quantification of BrdU positive cells reported to 7-AAD positive cells for the males shown for each animal. F: Average of the quantification of BrdU positive cells reported to 7-AAD positive cells for each genotype on G. (*: $p < 0.05$ to WT, MW).

Figure 6: Average of the quantification of BrdU positive cells reported to 7-AAD positive cells for the three genotypes in old female mice (**: $p < 0.01$ to WT, MW).

Figures:

Figure 1:

Koutseff A., Mittelhaeuser C., Essabri K., Auwerx J. & Meziane H

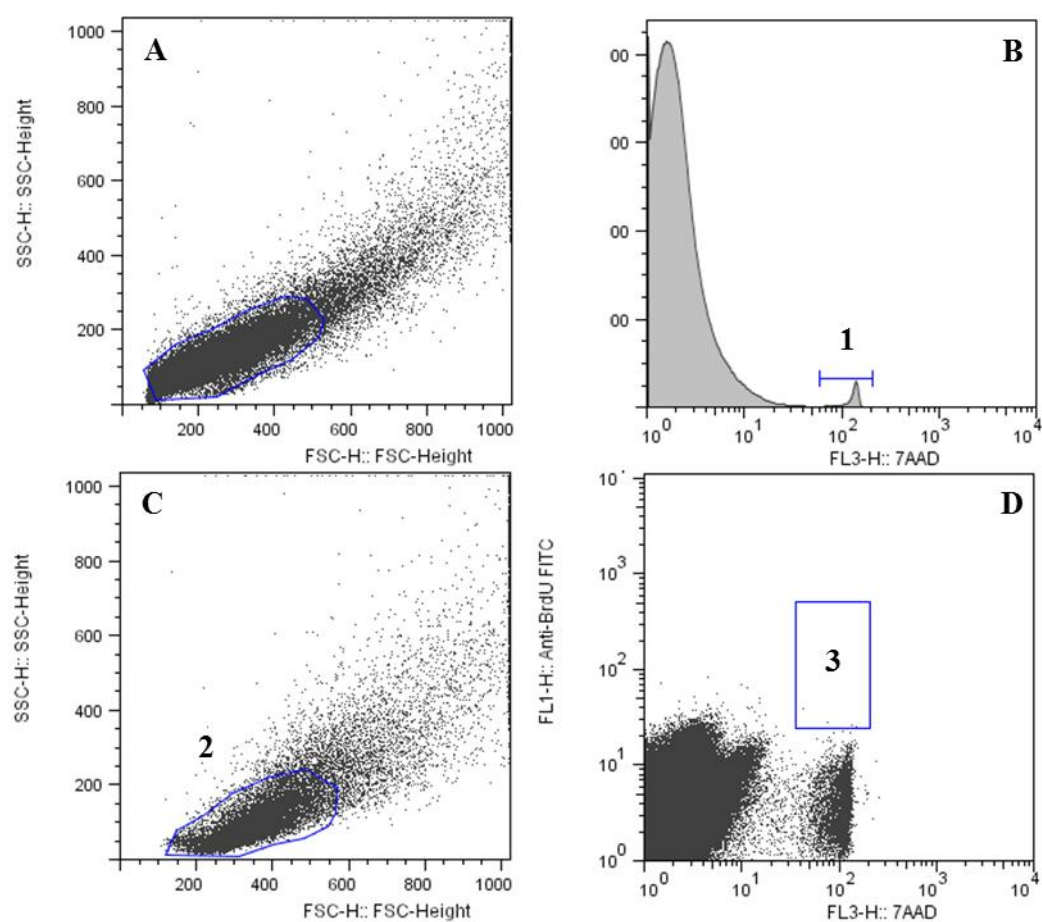


Figure 2:

Koutseff A., Mittelhaeuser C., Essabri K., Auwerx J. & Meziane H

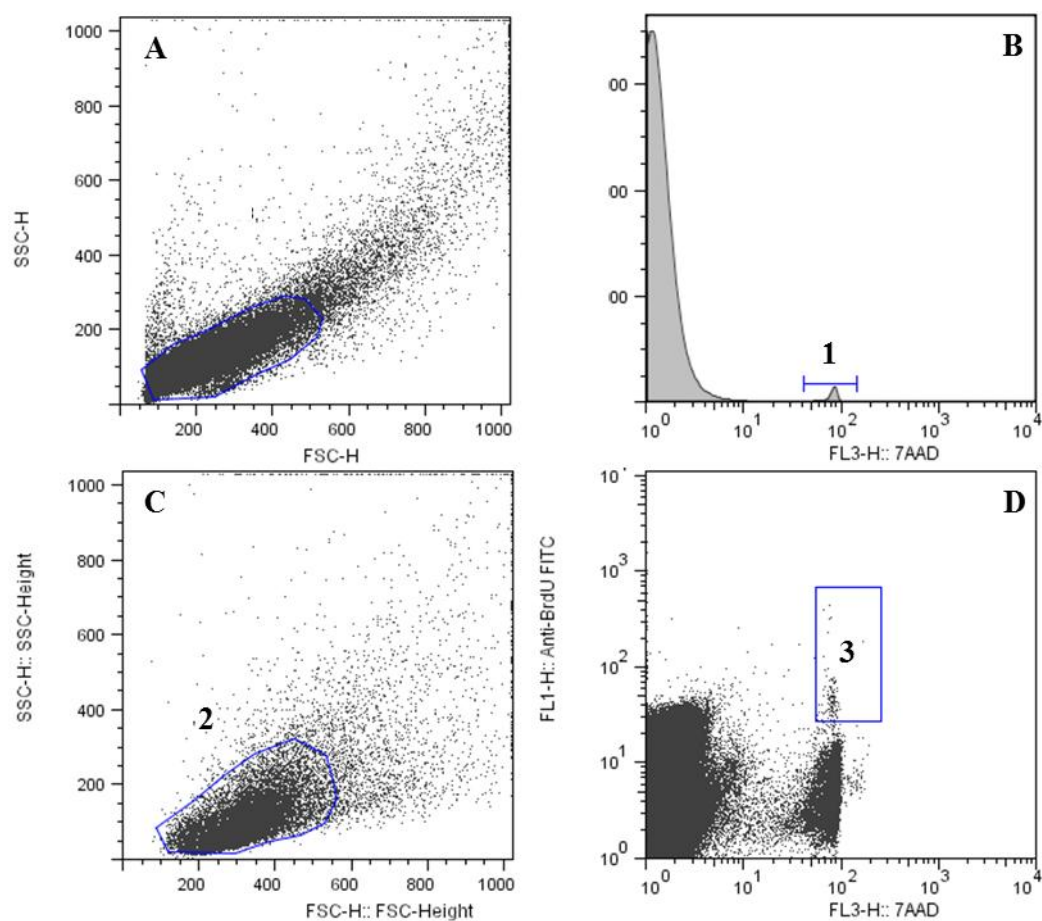


Figure 3:

Koutseff A., Mittelhaeuser C., Essabri K., Auwerx J. & Meziane H

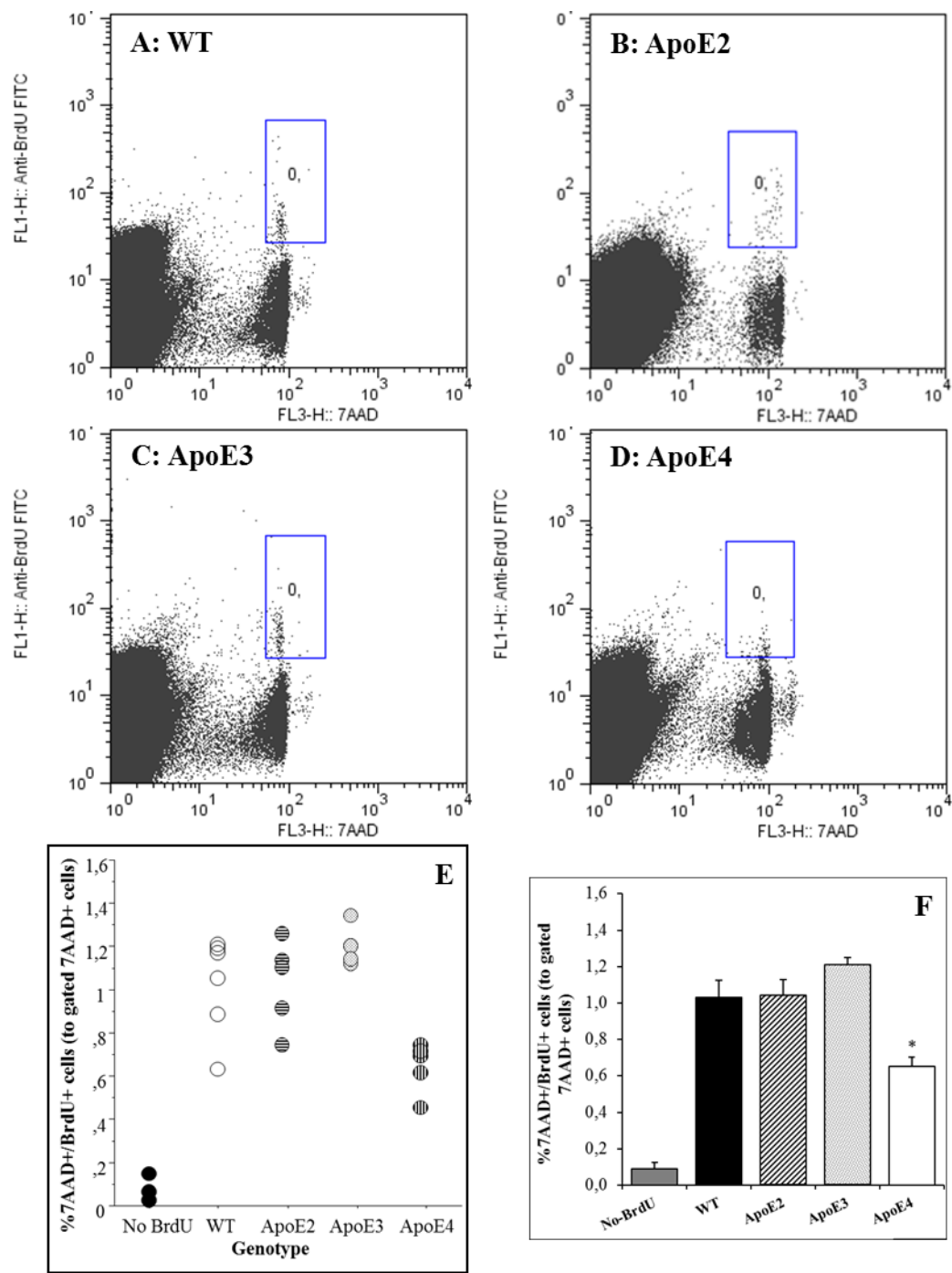


Figure 4:

Koutseff A., Mittelhaeuser C., Essabri K., Auwerx J. & Meziane H

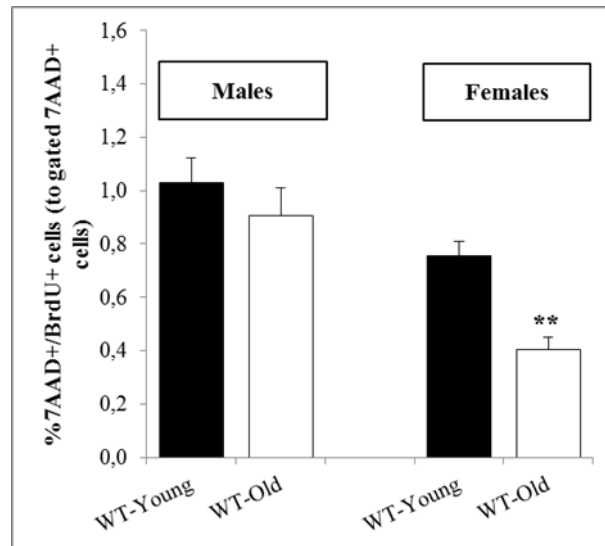


Figure 5:

Koutseff A., Mittelhaeuser C., Essabri K., Auwerx J. & Meziane H

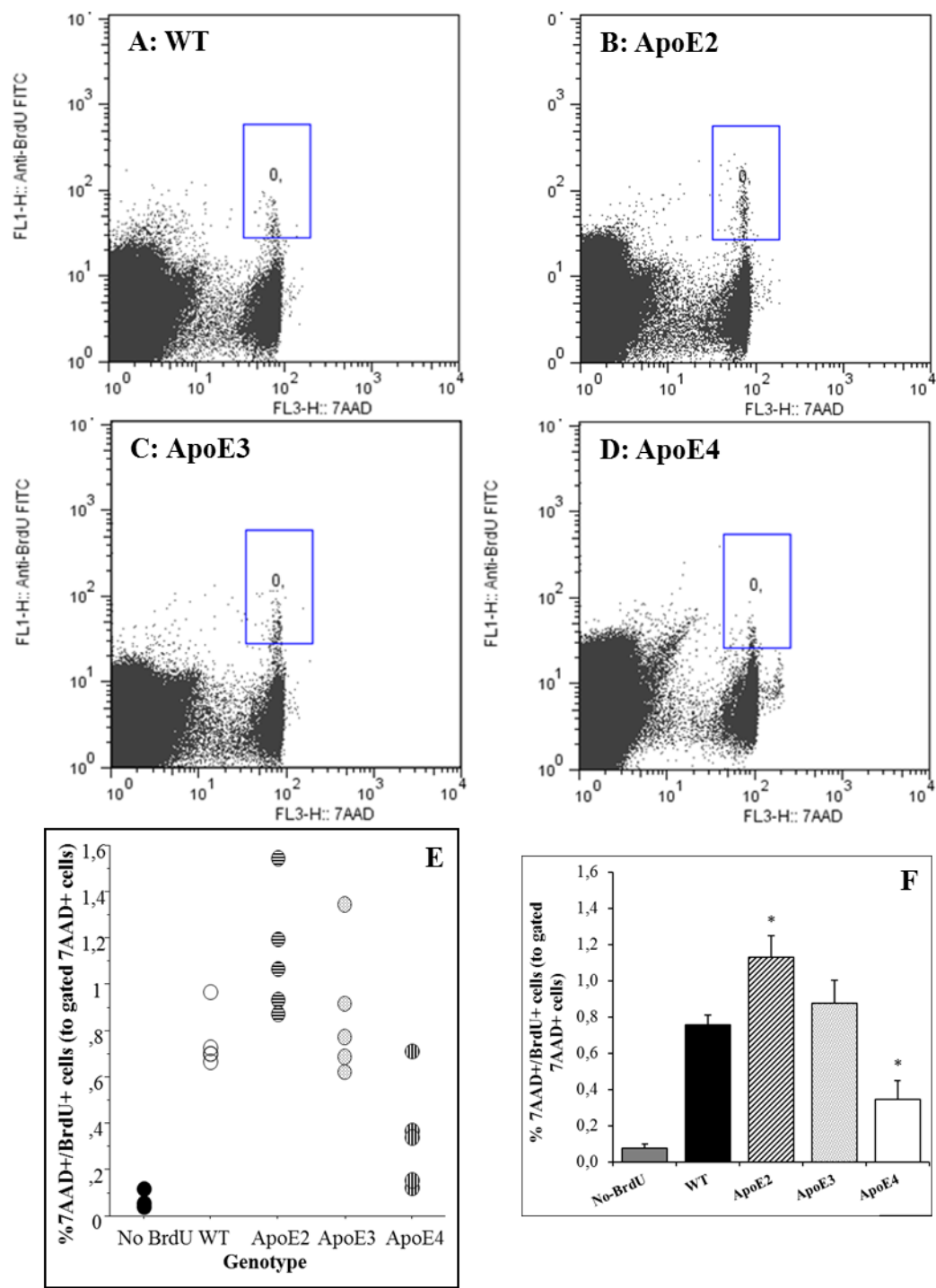
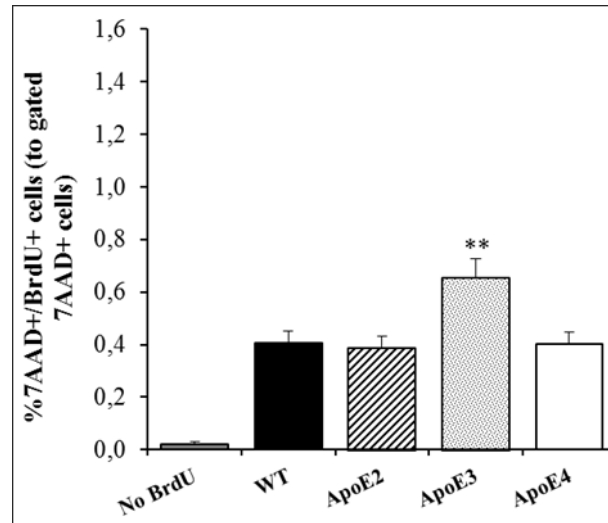


Figure 6:

Koutseff A., Mittelhaeuser C., Essabri K., Auwerx J. & Meziane H



	ApoE2		ApoE3		ApoE4 adultes		Souris WT	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Adultes	/	+	/	/	-	-	/	/
Âgées	/	/	/	+	/	/	/	-

Tableau 14 : Résumé des principaux effets liés aux différentes mutations ApoE humaines et à l'âge chez la souris sur la neurogénèse (prolifération cellulaire).

DISCUSSION

GÉNÉRALE

La première partie de ma thèse a été consacrée à l'évaluation des éventuelles différences comportementales consécutives aux différentes mutations ApoE humaines chez la souris. Les résultats de ces expériences montrent que les effets des trois mutations se manifestaient différemment selon le sexe.

En ce qui concerne l'activité circadienne, les souris ApoE4 mâles adultes manifestent une diminution significative de leur activité exploratoire lors des phases nocturne et diurne, alors que les souris ApoE4 femelles sont plus actives lors de la phase diurne. À l'âge d'un et demi, les souris ApoE4 mâles sont plus actives que les contrôles lors de la première heure de test d'activité circadienne, suggérant une réactivité exagérée lorsqu'elles sont placées dans un nouvel environnement. Ce résultat est confirmé par les données de l'openfield montrant que les souris ApoE4 mâles âgées sont plus actives. Les souris ApoE2 et ApoE3 mâles et femelles adultes, aussi bien homozygotes qu'hétérozygotes, ne présentent pas de trouble du rythme circadien et manifestent des niveaux d'activité comparables à ceux des WT tout au long d'un cycle jour/nuit complet. D'autre part, les souris ApoE3 femelles homozygotes montrent un appétit plus important, et les souris ApoE2 femelles homozygotes et hétérozygotes sont moins actives que les WT dans le test de l'open-field.

L'état de santé général, les capacités motrices spécifiques, et la susceptibilité aux crises épileptiques ne sont pas affectés par les différentes mutations. D'autre part, les souris ApoE3 hétérozygotes et homozygotes femelles ont une température rectale inférieure à celles des animaux WT, et les souris ApoE3 homozygotes femelles seraient moins sensibles à la douleur thermique. L'amplitude de sursaut acoustique est également légèrement plus élevée chez les souris ApoE3 homozygotes femelles.

L'analyse des comportements émotionnels montrent qu'aucune des mutations ApoE-KI n'affecte la susceptibilité à la résignation ni à l'âge adulte, ni chez les souris ApoE4 âgées. D'autre part, les souris ApoE2 et ApoE3 mâles homozygotes manifestent une diminution de l'anxiété dans le test de l'open-field, alors que les souris ApoE2 femelles homozygotes sont plus anxieuses dans ce test. Chez les souris ApoE2, ceci pourrait aussi être lié aux effets de la mutation sur l'activité exploratoire. La mutation ApoE4 a également des conséquences anxiolytiques chez les souris mâles adultes dans le test des cages claire/obscur, et anxiogéniques chez les femelles vis-à-vis du vide dans le test du labyrinthe en croix surélevé. Les souris ApoE4 femelles âgées sont moins anxieuses dans une situation fortement éclairée.

En ce qui concerne les capacités cognitives, le filtrage sensorimoteur, la mémoire de travail, et la performance de mémoires émotionnelles contextuelle et indicée, ne sont affectés par aucune des mutations ApoE-KI à l'âge adulte dans nos conditions expérimentales. Toutefois, les souris ApoE4 homozygotes mâles et femelles âgées montrent une extinction rapide de la mémoire émotionnelle contextuelle.

L'ensemble de ces résultats a ainsi surtout mis en avant l'implication de l'ApoE4 dans les processus anxieux. Les effets de l'ApoE seraient dépendants du sexe ; les mutations ApoE-KI seraient plutôt anxiolytiques chez les mâles et anxiogéniques chez les femelles.

L'anxiété fait partie des troubles du comportement observés fréquemment dans la MA, et apparaît assez tôt (avant 65 ans) (Porter et al., 2003). L'ApoE, impliquée comme facteur de risque dans la MA, a aussi été évoquée dans le cadre de l'anxiété. En effet, des sujets mâles et femelles diagnostiqués comme Alzheimer probables et homozygotes $\epsilon 4/\epsilon 4$ sont plus anxieux que des sujets $\epsilon 3/\epsilon 3$ (Robertson et al., 2005). Chez l'animal, Il a été montré que des souris

ApoE-KO ou ApoE4 mâles manifestent une augmentation de l'anxiété vis-à-vis du vide (Raber et al., 2000a; Robertson et al., 2005). Cet effet sur l'anxiété serait lié à des modifications structurales au niveau du noyau central de l'amygdale, des glandes corticosurrénales et impliquerait également les histamines (Raber, 2007). Cependant, ces études comparaient uniquement des souris mâles entre elles et omettaient l'ApoE2. Néanmoins, une étude plus récente effectuée chez des souris femelles a complété ces résultats, mettant en avant chez les souris ApoE4 une augmentation de l'anxiété mais aussi des performances dans une tâche de mémoire spatiale (piscine de Morris). Elle a ainsi établi un lien entre niveau d'anxiété et niveau de performance mnésique ; un niveau d'anxiété élevé étant associé à une performance cognitive élevée chez les souris ApoE4 (Siegel et al., 2010).

Les résultats de nos expériences diffèrent de ceux des équipes de Raber et Robertson. La mutation ApoE4 dans nos expériences induit plutôt des effets anxiolytiques chez les mâles. En revanche, de la même manière que Siegel, les souris apoE4 femelles dans nos expériences montrent une augmentation de l'anxiété vis-à-vis du vide à l'âge adulte, mais qui disparaît chez les souris femelles âgées. Les résultats de nos expériences montrent également que les effets de l'ApoE dépendent du type d'anxiété (peur du vide versus anxiété vis-à-vis d'un éclairage intense). Les différences observées entre nos résultats et ceux de la littérature, peuvent provenir des critères de comparaison ou des différences liées au fond génétique. Dans les études de Raber, un fond génétique C57BL/6J a été utilisé, alors que nos souris ont un fond mixte 129Sv/C57BL6. Par ailleurs, les souris ApoE4 ont été comparées aux souris ApoE2 et ApoE3 dans l'étude Siegel et coll., alors que dans nos expériences nous avons utilisé des WT et des mutants provenant d'un croisement entre hétérozygotes. Enfin les mutations ne sont pas tout à fait les mêmes (pas les mêmes promoteurs). Les résultats de nos

expériences montrent aussi pour la première fois que les mutations ApoE2 et ApoE3 peuvent également affecter l'anxiété chez la souris en fonction du sexe ; les souris ApoE2 et ApoE3 mâles sont moins anxieuses alors que les souris ApoE2 femelles sont plus anxieuses.

Concernant les capacités cognitives et mnésiques, l'absence de différence dans les tâches mnésiques de nos expériences va un peu à l'encontre des résultats de Grootendorst *et al.*, qui ont observé une diminution des performances de la mémoire spatiale chez les souris ApoE4 femelles adultes et dans une moindre mesure chez les souris ApoE3 femelles adultes (Grootendorst *et al.*, 2005), ainsi que des résultats de Bour *et al.* ayant mis en avant chez des souris plus âgées (15-18 mois) l'effet délétère de la mutation ApoE4-KI sur les performances mnésique dans des tâches de mémoire spatiale et d'évitement actif, chez les femelles notamment (Bour *et al.*, 2008). D'autres études ont montré des effets délétères de la mutation ApoE4 chez la souris, seule ou lorsqu'elle est associée à une mutation du gène de l'APP particulièrement chez les femelles (Raber *et al.*, 1998; Raber *et al.*, 2000b; van Meer *et al.*, 2007; Kornecook *et al.*, 2010). Les différences entre nos résultats et ceux-ci peuvent s'expliquer par les mêmes raisons citées plus haut (contrôles et fond génétique). **L'absence d'effet de la mutation ApoE4 sur la mémoire n'est pas surprenant, dans la mesure où l'allèle $\epsilon 4$ représente seulement un facteur de risque et montre que les souris ApoE4 ne sont pas, à première vue, un bon modèle d'étude pour la maladie d'Alzheimer.**

À l'issue de ce travail initialement axé sur l'évaluation des effets comportementaux des mutations humaines ApoE chez la souris, nous nous sommes proposés par la suite d'étudier si un facteur environnemental tel que le stress chronique chez des souris âgées pouvait moduler les phénotypes comportementaux liées au polymorphisme de l'ApoE.

Les résultats obtenus montrent que les souris ApoE4 et ApoE2 mâles âgées d'un an et préalablement soumis à un régime de stress chronique manifestent une diminution de l'anxiété dans différentes situations anxiogènes, alors que les souris ApoE2 femelles âgées et sous l'effet du stress sont plus anxieuses. Nous avons également observé que les souris ApoE2 mâles et femelles âgées et stressées manifestaient une diminution de la susceptibilité à la résignation, alors que les souris ApoE3 femelles ont au contraire montré une susceptibilité accrue au désespoir. Chez l'homme, la mutation ApoE2 a été associée à une diminution des symptômes dépressifs et faciliterait les effets d'un traitement par électrochoc (Fan et al., 2006; Julian et al., 2009). Nos résultats montrent pour la première fois chez la souris les effets protecteurs de la mutation ApoE2.

Du point de vue cognitif, nous avons montré que les souris ApoE4 mâles stressées manifestaient des déficits de la mémoire de reconnaissance et de la mémoire spatiale à l'âge d'un an et demi. Les femelles ApoE4 stressées, quant à elles, présentaient des déficits de la mémoire de reconnaissance à partir de l'âge d'un an. Ces résultats montrent qu'un stress chronique est susceptible de précipiter des déficits cognitifs chez les souris porteuses de la mutation humaine ApoE4, apparaissant de manière plus précoce chez les femelles que chez les mâles. De façon surprenante, nous avons aussi observé que les souris ApoE2 femelles manifestent une amélioration des performances de la mémoire de reconnaissance et lors d'un apprentissage spatial à l'âge d'un an. Cette amélioration des performances chez les femelles ApoE2 persiste à l'âge d'un an et demi, incluant aussi la mémoire de travail. Plusieurs études cliniques ont montré que l'allèle $\epsilon 2$ procure un effet protecteur contre la MA (Farrer et al., 1997; Federoff, 2005; Martins et al., 2005). Non seulement les populations homozygotes sont moins touchées par la MA, mais il a aussi été montré que des femmes âgées homozygotes

$\epsilon 2/\epsilon 2$ présentent de meilleures performances cognitives (Kang et al., 2005). Nos résultats montrent pour la première fois chez l'animal que la mutation ApoE2 entraîne une amélioration des performances cognitives. Enfin dans le test de peur émotionnelle conditionnée, nous avons observé que les souris ApoE2 et ApoE3 mâles manifestent une diminution de la performance de la mémoire contextuelle. On pourrait envisager que la diminution du « freezing » chez les souris ApoE2 puisse être expliquée par une anxiété réduite et une activité plus élevée. Les souris apoE3 femelles âgées et stressées ont également montré une diminution de la performance dans le test de reconnaissance d'objets. Les phénotypes observés chez les souris ApoE3 dans les différents processus émotionnels et cognitifs suggèrent que la stratégie consistant à considérer la mutation ApoE3 chez la souris comme contrôle est inappropriée et peut être remise en question.

Enfin, nous avons complété ce travail par une étude cellulaire pour évaluer l'impact du polymorphisme de l'ApoE, en fonction de l'âge et selon le sexe, sur la neurogénèse hippocampique, une forme de plasticité cérébrale. La prolifération neuronale a été mise en évidence en utilisant le BrdU, et le nombre de neurones néoformés a été quantifié en utilisant une technique par cytométrie de flux.

Les résultats obtenus montrent que les effets du polymorphisme de l'ApoE sur la neurogénèse dépendent du sexe et de l'âge. À l'âge adulte, les souris exprimant ApoE4, aussi bien mâles que femelles, ont une neurogénèse moins élevée que les souris WT, alors qu'au contraire celle-ci est augmentée chez les souris ApoE2 femelles. Nous avons également montré que la neurogénèse diminue globalement avec l'âge particulièrement chez les femelles. D'autre part, les souris ApoE3 femelles âgées manifestent une neurogénèse plus élevée. Peu d'études ont été effectuées sur le lien entre l'ApoE et la neurogénèse, et ont montré des résultats

contradictaires. Ainsi, Li *et al.* ont montré que la mutation apoE4-KI entraîne une diminution de la neurogénèse (Li et al., 2009), alors qu'au contraire une augmentation de la neurogénèse a été observée par Levi et Michaelson chez les souris ApoE4 (Levi & Michaelson, 2007). Paradoxalement, ces derniers auteurs ont de plus montré qu'un environnement enrichi, entraîne une diminution de la neurogénèse chez les souris ApoE4 (et une augmentation de la neurogénèse chez les souris ApoE3 dans cette même condition).

Nos résultats supportent l'implication de l'ApoE dans la neurogénèse, et montrent clairement un effet délétère de la mutation ApoE4, en accord avec les résultats de Li *et al.*, et un effet positif de la mutation ApoE2 au moins chez les femelles. Les résultats obtenus chez les souris ApoE3 âgées restent cependant difficiles à expliquer. Dans tous les cas, ces résultats supportent nos données comportementales montrant un effet délétère de la mutation ApoE4 sur les processus mnésiques sous l'effet du stress, et un effet améliorant de la mutation ApoE2 chez les femelles.

Les mécanismes les plus probables par lesquels l'ApoE influencerait le processus de neurogénèse seraient liés à son rôle dans le transport des lipides et du cholestérol (voire article neurogénèse). Ces propriétés sont importantes pour la prolifération cellulaire, la différenciation, la réparation tissulaire, et la synaptogénèse (Goritz et al., 2002; Huang et al., 2004; Huang, 2006b, a; Mahley et al., 2006). De plus le SNC est très riche en acide docosahexaénoïque (DHA), un omega-3 acide gras polyinsaturé dont le métabolisme est modulé par le polymorphisme de l'ApoE (Martin & Bazan, 1992; Martin et al., 1993; Lopez-Miranda et al., 1994; Dreon et al., 1995; Schaefer et al., 1995; Anil, 2007). Des souris Fat-1, ayant des niveaux élevés de DHA dans le cerveau, montrent une amélioration de la neurogénèse associée à de meilleures performances dans la mémoire spatiale (He et al., 2009).

On pourrait supposer que l'ApoE4 réduirait la neurogénèse en altérant les mécanismes de production de DHA. D'autres mécanismes peuvent être évoqués impliquant par exemple les facteurs de transcriptions CREB (voir article neurogénèse).

Nous avons évoqué plusieurs mécanismes pour expliquer l'impact du polymorphisme de l'ApoE, seul ou conjugué au stress, sur les processus émotionnels et cognitifs (Article impact du stress et du polymorphisme de l'ApoE). Ces mécanismes potentiels mettraient en jeu des modifications moléculaires affectant les systèmes cholinergiques et noradrénergiques (Chapman et al., 2000; Puolivali et al., 2000b; Michel et al., 2008; Siegel et al., 2011), les glucocorticoïdes (Grootendorst et al., 2001b; Grootendorst et al., 2004), ou encore hormones sexuelles (Raber, 2008). Ces modifications moléculaires, ainsi que des modifications structurales affectant la protéine associée au microtubules-2 (MAP-2) (Robertson et al., 2005), et des modifications physiologiques, interviendraient selon le génotype, l'âge et le sexe dans des régions spécifiques du cerveau telles que l'amygdale et l'hippocampe, classiquement impliquées dans les processus cognitifs, dans les processus émotionnels et dans la régulation du stress. Nos résultats de l'étude cellulaire et moléculaire nous permettent de rajouter à cela le processus de neurogénèse.

Au final, ce travail montre un autre aspect concernant l'impact du stress et du polymorphisme de l'ApoE sur les processus émotionnel et cognitif, et leur importance dans les processus liés à la maladie d'Alzheimer, et suggère, lié aux résultats observés dans notre étude de neurogénèse, l'idée d'un équilibre entre la formation de nouveaux neurones et la mort neuronale pouvant être modulé par le polymorphisme de l'ApoE. Ce travail montre aussi que le stress est un excellent modèle pour mieux comprendre les mécanismes sous-tendant les troubles émotionnels et cognitifs liés à l'âge et dépendant du polymorphisme de l'ApoE, et

permettrait ainsi des avancées dans la compréhension des formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer.

BIBLIOGRAPHIE

- Acevedo SF, Piper BJ, Craytor MJ, Benice TS, Raber J (2010) Apolipoprotein E4 and sex affect neurobehavioral performance in primary school children. *Pediatr Res* 67: 293-299.
- Aggleton JP, Brown MW (1999) Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. *Behav Brain Sci* 22: 425-444; discussion 444-489.
- Altman J (1966) Proliferation and migration of undifferentiated precursor cells in the rat during postnatal gliogenesis. *Exp Neurol* 16: 263-278.
- Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124: 319-335.
- Anderson MC, Green C (2001) Suppressing unwanted memories by executive control. *Nature* 410: 366-369.
- Anil E (2007) The impact of EPA and DHA on blood lipids and lipoprotein metabolism: influence of apoE genotype. *Proc Nutr Soc* 66: 60-68.
- Ashford JW (2004) APOE genotype effects on Alzheimer's disease onset and epidemiology. *J Mol Neurosci* 23: 157-165.
- Avila J (2006) Tau protein, the main component of paired helical filaments. *J Alzheimers Dis* 9: 171-175.
- Bales KR, Verina T, Cummins DJ, Du Y, Dodel RC, Saura J, Fishman CE, DeLong CA, Piccardo P, Petegnief V, Ghetti B, Paul SM (1999) Apolipoprotein E is essential for amyloid deposition in the APP(V717F) transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *P Natl Acad Sci USA* 96: 15233-15238.
- Beffert U, Danik M, Krzywkowski P, Ramassamy C, Berrada F, Poirier J (1998) The neurobiology of apolipoproteins and their receptors in the CNS and Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev* 27: 119-142.
- Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW (2010) Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 23: 213-227.
- Bickeboller H, Campion D, Brice A, Amouyel P, Hannequin D, Didierjean O, Penet C, Martin C, Perez-Tur J, Michon A, Dubois B, Ledoze F, Thomas-Anterion C, Pasquier F, Puel M, Demonet JF, Moreaud O, Babron MC, Meulien D, Guez D, Chartier-Harlin MC, Frebourg T, Agid Y, Martinez M, Clerget-Darpoux F (1997) Apolipoprotein E and Alzheimer disease: genotype-specific risks by age and sex. *American journal of human genetics* 60: 439-446.
- Bilsland JG, Haldon C, Goddard J, Oliver K, Murray F, Wheeldon A, Cumberbatch J, McAllister G, Munoz-Sanjuan I (2006) A rapid method for the quantification of mouse hippocampal neurogenesis in vivo by flow cytometry. Validation with conventional and enhanced immunohistochemical methods. *J Neurosci Methods* 157: 54-63.
- Bour A, Grootendorst J, Vogel E, Kelche C, Dodart JC, Bales K, Moreau PH, Sullivan PM, Mathis C (2008) Middle-aged human apoE4 targeted-replacement mice show retention deficits on a wide range of spatial memory tasks. *Behav Brain Res* 193: 174-182.
- Bourin M, Hascoet M (2003) The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol* 463: 55-65.
- Braff DL, Geyer MA, Swerdlow NR (2001) Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. *Psychopharmacology (Berl)* 156: 234-258.
- Brandt R, Hundelt M, Shahani N (2005) Tau alteration and neuronal degeneration in tauopathies: mechanisms and models. *Biochim Biophys Acta* 1739: 331-354.
- Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE (2004) Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14515-14520.
- Cassel JC, Lazaris A, Birlhelmer A, Jackisch R (2007) Spatial reference- (not working- or procedural-) memory performance of aged rats in the water maze predicts the magnitude of sulpiride-induced facilitation of acetylcholine release by striatal slices. *Neurobiology of aging* 28: 1270-1285.

- Cassel JC, Mathis C, Majchrzak M, Moreau PH, Dalrymple-Alford JC (2008) Coexisting cholinergic and parahippocampal degeneration: a key to memory loss in dementia and a challenge for transgenic models? *Neuro-degenerative diseases* 5: 304-317.
- Castano EM, Prelli F, Wisniewski T, Golabek A, Kumar RA, Soto C, Frangione B (1995) Fibrillogenesis in Alzheimer's disease of amyloid beta peptides and apolipoprotein E. *The Biochemical journal* 306 (Pt 2): 599-604.
- Castellani RJ, Nunomura A, Lee HG, Perry G, Smith MA (2008) Phosphorylated tau: toxic, protective, or none of the above. *J Alzheimers Dis* 14: 377-383.
- Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA (2010) Alzheimer disease. *Dis Mon* 56: 484-546.
- Champy MF, Selloum M, Piard L, Zeitler V, Caradec C, Chambon P, Auwerx J (2004) Mouse functional genomics requires standardization of mouse handling and housing conditions. *Mamm Genome* 15: 768-783.
- Chapman S, Sabo T, Roses AD, Michaelson DM (2000) Reversal of presynaptic deficits of apolipoprotein E-deficient mice in human apolipoprotein E transgenic mice. *Neuroscience* 97: 419-424.
- Chapouthier G (2006) *Biologie de la mémoire*. Editions Odile Jacob.
- Chapuis J, Garcia S, Messaoudi B, Thevenet M, Ferreira G, Gervais R, Ravel N (2009) The way an odor is experienced during aversive conditioning determines the extent of the network recruited during retrieval: a multisite electrophysiological study in rats. *J Neurosci* 29: 10287-10298.
- Cheng H, Vetrivel KS, Gong P, Meckler X, Parent A, Thinakaran G (2007) Mechanisms of disease: new therapeutic strategies for Alzheimer's disease--targeting APP processing in lipid rafts. *Nat Clin Pract Neurol* 3: 374-382.
- Chertkow H, Bub D (1990) Semantic memory loss in dementia of Alzheimer's type. What do various measures measure? *Brain* 113 (Pt 2): 397-417.
- Chouliaras L, Sierksma AS, Kenis G, Prickaerts J, Lemmens MA, Brasnjovic I, van Donkelaar EL, Martinez-Martinez P, Losen M, De Baets MH, Kholod N, van Leeuwen F, Hof PR, van Os J, Steinbusch HW, van den Hove DL, Rutten BP (2010) Gene-environment interaction research and transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis* 2010.
- Comijs HC, van den Kommer TN, Minnaar RW, Penninx BW, Deeg DJ (2011) Accumulated and differential effects of life events on cognitive decline in older persons: depending on depression, baseline cognition, or ApoE epsilon4 status? *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci* 66 Suppl 1: i111-120.
- Cooper SJ (2005) Donald O. Hebb's synapse and learning rule: a history and commentary. *Neurosci Biobehav Rev* 28: 851-874.
- Coq JO, Xerri C (1998) Environmental enrichment alters organizational features of the forepaw representation in the primary somatosensory cortex of adult rats. *Exp Brain Res* 121: 191-204.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Jr., Roses AD, Pericak-Vance MA, Small GW, Haines JL (1995) The apolipoprotein E E4 allele and sex-specific risk of Alzheimer's disease. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 273: 373-374.
- Corotto FS, Henegar JA, Maruniak JA (1993) Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain. *Neurosci Lett* 149: 111-114.
- Craig LA, Hong NS, McDonald RJ (2011) Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 35: 1397-1409.
- Crawford F, Wood M, Ferguson S, Mathura V, Gupta P, Humphrey J, Mouzon B, Laporte V, Margenthaler E, O'Steen B, Hayes R, Roses A, Mullan M (2009) Apolipoprotein E-genotype dependent hippocampal and cortical responses to traumatic brain injury. *Neuroscience* 159: 1349-1362.

- Crawley JN (1999) Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain Res* 835: 18-26.
- Crews L, Rockenstein E, Masliah E (2010) APP transgenic modeling of Alzheimer's disease: mechanisms of neurodegeneration and aberrant neurogenesis. *Brain Struct Funct* 214: 111-126.
- Croisile B (ed.) (2007) *Alzheimer et les maladies apparentées*.
- Cryan JF, Mombereau C, Vassout A (2005) The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 571-625.
- Daoudal G, Debanne D (2003) Long-term plasticity of intrinsic excitability: learning rules and mechanisms. *Learn Mem* 10: 456-465.
- Das GD, Altman J (1970) Postnatal neurogenesis in the caudate nucleus and nucleus accumbens septi in the rat. *Brain Res* 21: 122-127.
- Davis M (1980) Neurochemical modulation of sensory-motor reactivity: acoustic and tactile startle reflexes. *Neurosci Biobehav Rev* 4: 241-263.
- Davis RL (2004) Olfactory learning. *Neuron* 44: 31-48.
- Delacourte A, David JP, Sergeant N, Buee L, Wattez A, Vermersch P, Ghazali F, Fallet-Bianco C, Pasquier F, Lebert F, Petit H, Di Menza C (1999) The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 52: 1158-1165.
- Diamond ME, Armstrong-James M, Ebner FF (1993) Experience-dependent plasticity in adult rat barrel cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 2082-2086.
- Dickson DW (1997) Neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease: a perspective from longitudinal clinicopathological studies. *Neurobiol Aging* 18: S21-26.
- Dickson TC, Vickers JC (2001) The morphological phenotype of beta-amyloid plaques and associated neuritic changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 105: 99-107.
- Dodart JC, Marr RA, Koistinaho M, Gregersen BM, Malkani S, Verma IM, Paul SM (2005) Gene delivery of human apolipoprotein E alters brain Abeta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 1211-1216.
- Dodart JC, Mathis C, Ungerer A (1997) Scopolamine-induced deficits in a two-trial object recognition task in mice. *Neuroreport* 8: 1173-1178.
- Dreon DM, Fernstrom HA, Miller B, Krauss RM (1995) Apolipoprotein E isoform phenotype and LDL subclass response to a reduced-fat diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 105-111.
- Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, Cummings J, Delacourte A, Galasko D, Gauthier S, Jicha G, Meguro K, O'Brien J, Pasquier F, Robert P, Rossor M, Salloway S, Stern Y, Visser PJ, Scheltens P (2007) Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol* 6: 734-746.
- Dubois B, Pillon B (1997) Cognitive deficits in Parkinson's disease. *J Neurol* 244: 2-8.
- Dudai Y (2004) The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* 55: 51-86.
- Eichenbaum H, Harris K (2000) Toying with memory in the hippocampus. *Nat Neurosci* 3: 205-206.
- Eisenberg M, Dudai Y (2004) Reconsolidation of fresh, remote, and extinguished fear memory in *Medaka*: old fears don't die. *Eur J Neurosci* 20: 3397-3403.
- Eisenstein M (2011) Genetics: finding risk factors. *Nature* 475: S20-22.
- Elizalde N, Gil-Bea FJ, Ramirez MJ, Aisa B, Lasheras B, Del Rio J, Tordera RM (2008) Long-lasting behavioral effects and recognition memory deficit induced by chronic mild stress in mice: effect of antidepressant treatment. *Psychopharmacology (Berl)* 199: 1-14.
- Emahazion T, Feuk L, Jobs M, Sawyer SL, Fredman D, St Clair D, Prince JA, Brookes AJ (2001) SNP association studies in Alzheimer's disease highlight problems for complex disease analysis. *Trends Genet* 17: 407-413.

- Ennaceur A, Delacour J (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural brain research* 31: 47-59.
- Ergorul C, Eichenbaum H (2004) The hippocampus and memory for "what," "where," and "when". *Learn Mem* 11: 397-405.
- Fan PL, Chen CD, Kao WT, Shu BC, Lung FW (2006) Protective effect of the apo epsilon2 allele in major depressive disorder in Taiwanese. *Acta psychiatrica Scandinavica* 113: 48-53.
- Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM (1997) Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 278: 1349-1356.
- Federoff HJ (2005) Alzheimer's disease: reducing the burden with ApoE2. *Gene Ther* 12: 1019-1029.
- Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR (1975) "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12: 189-198.
- Gallo G (2007) Tau is actin up in Alzheimer's disease. *Nat Cell Biol* 9: 133-134.
- Gandy S, Caporaso G, Buxbaum J, Frangione B, Greengard P (1994) APP processing, A beta-amyloidogenesis, and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 15: 253-256.
- Geraerts E, McNally RJ (2008) Forgetting unwanted memories: directed forgetting and thought suppression methods. *Acta Psychol (Amst)* 127: 614-622.
- Ghebranious N, Mukesh B, Giampietro PF, Glurich I, Mickel SF, Waring SC, McCarty CA (2011) A pilot study of gene/gene and gene/environment interactions in Alzheimer disease. *Clin Med Res* 9: 17-25.
- Glenner GG, Wong CW (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120: 885-890.
- Goedert M (2009) Oskar Fischer and the study of dementia. *Brain* 132: 1102-1111.
- Goedert M, Ghetti B (2007) Alois Alzheimer: his life and times. *Brain Pathol* 17: 57-62.
- Goedert M, Klug A, Crowther RA (2006) Tau protein, the paired helical filament and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 9: 195-207.
- Goedert M, Spillantini MG (2006) A century of Alzheimer's disease. *Science* 314: 777-781.
- Goritz C, Mauch DH, Nagler K, Pfrieder FW (2002) Role of glia-derived cholesterol in synaptogenesis: new revelations in the synapse-glia affair. *J Physiol Paris* 96: 257-263.
- Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E (1997) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci* 17: 2492-2498.
- Graeber MB, Mehraein P (1999) Reanalysis of the first case of Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 249 Suppl 3: 10-13.
- Grootendorst J, Bour A, Vogel E, Kelche C, Sullivan PM, Dodart JC, Bales K, Mathis C (2005) Human apoE targeted replacement mouse lines: h-apoE4 and h-apoE3 mice differ on spatial memory performance and avoidance behavior. *Behav Brain Res* 159: 1-14.
- Grootendorst J, de Kloet ER, Dalm S, Oitzl MS (2001a) Reversal of cognitive deficit of apolipoprotein E knockout mice after repeated exposure to a common environmental experience. *Neuroscience* 108: 237-247.
- Grootendorst J, Enthoven L, Dalm S, de Kloet ER, Oitzl MS (2004) Increased corticosterone secretion and early-onset of cognitive decline in female apolipoprotein E-knockout mice. *Behavioural brain research* 148: 167-177.
- Grootendorst J, Oitzl MS, Dalm S, Enthoven L, Schachner M, de Kloet ER, Sandi C (2001b) Stress alleviates reduced expression of cell adhesion molecules (NCAM, L1), and deficits in learning and corticosterone regulation of apolipoprotein E knockout mice. *The European journal of neuroscience* 14: 1505-1514.

- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM (1986a) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261: 6084-6089.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1986b) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 4913-4917.
- Handelmann GE, Boyles JK, Weisgraber KH, Mahley RW, Pitas RE (1992) Effects of apolipoprotein E, beta-very low density lipoproteins, and cholesterol on the extension of neurites by rabbit dorsal root ganglion neurons in vitro. *J Lipid Res* 33: 1677-1688.
- Hannequin D, Campion D, Dumanchin C, Martinez M, Agid Y, Clerget-Darpoux F, Frebourg T, Brice A (1998) [Genetics of Alzheimer's disease]. *Rev Neurol (Paris)* 154 Suppl 2: S65-74.
- Harris FM, Brecht WJ, Xu Q, Tesseur I, Kekonius L, Wyss-Coray T, Fish JD, Masliah E, Hopkins PC, Scearce-Levie K, Weisgraber KH, Mucke L, Mahley RW, Huang Y (2003) Carboxyl-terminal-truncated apolipoprotein E4 causes Alzheimer's disease-like neurodegeneration and behavioral deficits in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10966-10971.
- Hartman RE, Wozniak DF, Nardi A, Olney JW, Sartorius L, Holtzman DM (2001) Behavioral phenotyping of GFAP-apoE3 and -apoE4 transgenic mice: apoE4 mice show profound working memory impairments in the absence of Alzheimer's-like neuropathology. *Exp Neurol* 170: 326-344.
- Hascoet M, Bourin M, Dhonnchadha BA (2001) The mouse light-dark paradigm: a review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 25: 141-166.
- Hatcher JP, Jones DN, Rogers DC, Hatcher PD, Reavill C, Hagan JJ, Hunter AJ (2001) Development of SHIRPA to characterise the phenotype of gene-targeted mice. *Behav Brain Res* 125: 43-47.
- He C, Qu X, Cui L, Wang J, Kang JX (2009) Improved spatial learning performance of fat-1 mice is associated with enhanced neurogenesis and neuritogenesis by docosahexaenoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 11370-11375.
- Hebb DO (1967) Cerebral organization and consciousness. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 45: 1-7.
- Heindel WC, Salmon DP, Shults CW, Walicke PA, Butters N (1989) Neuropsychological evidence for multiple implicit memory systems: a comparison of Alzheimer's, Huntington's, and Parkinson's disease patients. *J Neurosci* 9: 582-587.
- Heinrichs SC (2001) Mouse feeding behavior: ethology, regulatory mechanisms and utility for mutant phenotyping. *Behav Brain Res* 125: 81-88.
- Hodges H (1996) Maze procedures: the radial-arm and water maze compared. *Brain Res Cogn Brain Res* 3: 167-181.
- Holcomb LA, Gordon MN, Jantzen P, Hsiao K, Duff K, Morgan D (1999) Behavioral changes in transgenic mice expressing both amyloid precursor protein and presenilin-1 mutations: lack of association with amyloid deposits. *Behavior genetics* 29: 177-185.
- Huang R, Huang J, Cathcart H, Smith S, Poduslo SE (2007) Genetic variants in brain-derived neurotrophic factor associated with Alzheimer's disease. *J Med Genet* 44: e66.
- Huang Y (2006a) Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Neurology* 66: S79-85.
- Huang Y (2006b) Molecular and cellular mechanisms of apolipoprotein E4 neurotoxicity and potential therapeutic strategies. *Curr Opin Drug Discov Devel* 9: 627-641.
- Huang Y, Weisgraber KH, Mucke L, Mahley RW (2004) Apolipoprotein E: diversity of cellular origins, structural and biophysical properties, and effects in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 23: 189-204.
- Iqbal K, Zaidi T, Thompson CH, Merz PA, Wisniewski HM (1984) Alzheimer paired helical filaments: bulk isolation, solubility, and protein composition. *Acta Neuropathol* 62: 167-177.
- Johnson GV (2006) Tau phosphorylation and proteolysis: insights and perspectives. *J Alzheimers Dis* 9: 243-250.

- Johnson GV, Hartigan JA (1999) Tau protein in normal and Alzheimer's disease brain: an update. *J Alzheimers Dis* 1: 329-351.
- Jonides J, Lewis RL, Nee DE, Lustig CA, Berman MG, Moore KS (2008) The mind and brain of short-term memory. *Annu Rev Psychol* 59: 193-224.
- Julian LJ, Vella L, Frankel D, Minden SL, Oksenberg JR, Mohr DC (2009) ApoE alleles, depression and positive affect in multiple sclerosis. *Mult Scler* 15: 311-315.
- Kamboh MI (2004) Molecular genetics of late-onset Alzheimer's disease. *Ann Hum Genet* 68: 381-404.
- Kang JH, Logroscino G, De Vivo I, Hunter D, Grodstein F (2005) Apolipoprotein E, cardiovascular disease and cognitive function in aging women. *Neurobiology of aging* 26: 475-484.
- Karl T, Pabst R, von Horsten S (2003) Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. *Exp Toxicol Pathol* 55: 69-83.
- Kawakami A, Tanaka A, Chiba T, Nakajima K, Shimokado K, Yoshida M (2003) Remnant lipoprotein-induced smooth muscle cell proliferation involves epidermal growth factor receptor transactivation. *Circulation* 108: 2679-2688.
- Kidd M (1963) Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197: 192-193.
- Knouff C, Hinsdale ME, Mezdoor H, Altenburg MK, Watanabe M, Quarfordt SH, Sullivan PM, Maeda N (1999) Apo E structure determines VLDL clearance and atherosclerosis risk in mice. *J Clin Invest* 103: 1579-1586.
- Knowlton BJ, Squire LR (1993) The learning of categories: parallel brain systems for item memory and category knowledge. *Science* 262: 1747-1749.
- Kopp C (2001) Locomotor activity rhythm in inbred strains of mice: implications for behavioural studies. *Behav Brain Res* 125: 93-96.
- Kornecook TJ, McKinney AP, Ferguson MT, Dodart JC (2010) Isoform-specific effects of apolipoprotein E on cognitive performance in targeted-replacement mice overexpressing human APP. *Genes Brain Behav* 9: 182-192.
- Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ (1986) Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 4044-4048.
- Krzywkowski P, Ghribi O, Gagne J, Chabot C, Kar S, Rochford J, Massicotte G, Poirier J (1999) Cholinergic systems and long-term potentiation in memory-impaired apolipoprotein E-deficient mice. *Neuroscience* 92: 1273-1286.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16: 2027-2033.
- Kuret J, Chirita CN, Congdon EE, Kannanayakal T, Li G, Necula M, Yin H, Zhong Q (2005) Pathways of tau fibrillization. *Biochim Biophys Acta* 1739: 167-178.
- Lackner P, Beer R, Heussler V, Goebel G, Rudzki D, Helbok R, Tannich E, Schmutzhard E (2006) Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. *Neuropathol Appl Neurobiol* 32: 177-188.
- Lacroix-Fralish ML, Mogil JS (2009) Progress in genetic studies of pain and analgesia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49: 97-121.
- LeBlanc VR (2009) The effects of acute stress on performance: implications for health professions education. *Acad Med* 84: S25-33.
- Lechin F, Van der Dijs B, Benaim M (1996) Stress versus depression. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 20: 899-950.
- Lecourtier L, de Vasconcelos AP, Leroux E, Cosquer B, Geiger K, Lithfous S, Cassel JC (2010) Septohippocampal pathways contribute to system consolidation of a spatial memory: Sequential implication of gabaergic and cholinergic neurons. *Hippocampus*.
- LeDoux J (2003) The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cell Mol Neurobiol* 23: 727-738.

- Lee BK, Glass TA, Wand GS, McAtee MJ, Bandeen-Roche K, Bolla KI, Schwartz BS (2008) Apolipoprotein e genotype, cortisol, and cognitive function in community-dwelling older adults. *The American journal of psychiatry* 165: 1456-1464.
- Lee HG, Perry G, Moreira PI, Garrett MR, Liu Q, Zhu X, Takeda A, Nunomura A, Smith MA (2005) Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector? *Trends Mol Med* 11: 164-169.
- Leuner B, Gould E (2010) Structural plasticity and hippocampal function. *Annual review of psychology* 61: 111-140, C111-113.
- Levi O, Michaelson DM (2007) Environmental enrichment stimulates neurogenesis in apolipoprotein E3 and neuronal apoptosis in apolipoprotein E4 transgenic mice. *J Neurochem* 100: 202-210.
- Li G, Bien-Ly N, Andrews-Zwilling Y, Xu Q, Bernardo A, Ring K, Halabisky B, Deng C, Mahley RW, Huang Y (2009) GABAergic interneuron dysfunction impairs hippocampal neurogenesis in adult apolipoprotein E4 knockin mice. *Cell Stem Cell* 5: 634-645.
- Lind J, Larsson A, Persson J, Ingvar M, Nilsson LG, Backman L, Adolfsson R, Cruts M, Sleegers K, Van Broeckhoven C, Nyberg L (2006) Reduced hippocampal volume in non-demented carriers of the apolipoprotein E epsilon4: relation to chronological age and recognition memory. *Neuroscience letters* 396: 23-27.
- Lominska C, Levin JA, Wang J, Sikes J, Kao C, Smith JD (2001) Apolipoprotein E deficiency effects on learning in mice are dependent upon the background strain. *Behavioural brain research* 120: 23-34.
- Lopez-Miranda J, Ordovas JM, Mata P, Lichtenstein AH, Clevidence B, Judd JT, Schaefer EJ (1994) Effect of apolipoprotein E phenotype on diet-induced lowering of plasma low density lipoprotein cholesterol. *J Lipid Res* 35: 1965-1975.
- Luine VN, Beck KD, Bowman RE, Frankfurt M, Maclusky NJ (2007) Chronic stress and neural function: accounting for sex and age. *J Neuroendocrinol* 19: 743-751.
- Luo Y, Bolon B, Kahn S, Bennett BD, Babu-Khan S, Denis P, Fan W, Kha H, Zhang J, Gong Y, Martin L, Louis JC, Yan Q, Richards WG, Citron M, Vassar R (2001) Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci* 4: 231-232.
- Luskin MB (1993) Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11: 173-189.
- Maher TJ, Wurtman RJ (1987) Possible neurologic effects of aspartame, a widely used food additive. *Environ Health Perspect* 75: 53-57.
- Mahley RW (1988) Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240: 622-630.
- Mahley RW, Nathan BP, Pitas RE (1996) Apolipoprotein E. Structure, function, and possible roles in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 777: 139-145.
- Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y (2006) Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 5644-5651.
- Mandillo S, Tucci V, Holter SM, Meziane H, Banchaabouchi MA, Kallnik M, Lad HV, Nolan PM, Ouagazzal AM, Coghill EL, Gale K, Golini E, Jacquot S, Krezel W, Parker A, Riet F, Schneider I, Marazziti D, Auwerx J, Brown SD, Chambon P, Rosenthal N, Tocchini-Valentini G, Wurst W (2008) Reliability, robustness, and reproducibility in mouse behavioral phenotyping: a cross-laboratory study. *Physiological genomics* 34: 243-255.
- Martin C, Gervais R, Chabaud P, Messaoudi B, Ravel N (2004a) Learning-induced modulation of oscillatory activities in the mammalian olfactory system: the role of the centrifugal fibres. *J Physiol Paris* 98: 467-478.

- Martin C, Gervais R, Hugues E, Messaoudi B, Ravel N (2004b) Learning modulation of odor-induced oscillatory responses in the rat olfactory bulb: a correlate of odor recognition? *J Neurosci* 24: 389-397.
- Martin LJ, Connelly PW, Nanchoo D, Wood N, Zhang ZJ, Maguire G, Quinet E, Tall AR, Marcel YL, McPherson R (1993) Cholesteryl ester transfer protein and high density lipoprotein responses to cholesterol feeding in men: relationship to apolipoprotein E genotype. *J Lipid Res* 34: 437-446.
- Martin RE, Bazan NG (1992) Changing fatty acid content of growth cone lipids prior to synaptogenesis. *J Neurochem* 59: 318-325.
- Martinez M, Campion D, Brice A, Hannequin D, Dubois B, Didierjean O, Michon A, Thomas-Anterion C, Puel M, Frebourg T, Agid Y, Clerget-Darpoux F (1998) Apolipoprotein E epsilon4 allele and familial aggregation of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 55: 810-816.
- Martins CA, Oulhaj A, de Jager CA, Williams JH (2005) APOE alleles predict the rate of cognitive decline in Alzheimer disease: a nonlinear model. *Neurology* 65: 1888-1893.
- Mattson MP, Magnus T (2006) Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci* 7: 278-294.
- Mayeux R (2006) Genetic epidemiology of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 20: S58-62.
- McGaugh JL, Izquierdo I (2000) The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. *Trends Pharmacol Sci* 21: 208-210.
- Meldrum B (2002) Do preclinical seizure models preselect certain adverse effects of antiepileptic drugs. *Epilepsy Res* 50: 33-40.
- Mensink GJ, Raaijmakers JG (1988) A model for interference and forgetting. *Psychol Rev* 95: 434-455.
- Meziane H, Dodart JC, Mathis C, Little S, Clemens J, Paul SM, Ungerer A (1998) Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 12683-12688.
- Meziane H, Mathis C, Paul SM, Ungerer A (1996) The neurosteroid pregnenolone sulfate reduces learning deficits induced by scopolamine and has promnesic effects in mice performing an appetitive learning task. *Psychopharmacology (Berl)* 126: 323-330.
- Meziane H, Ouagazzal AM, Aubert L, Wietrzyk M, Krezel W (2007) Estrous cycle effects on behavior of C57BL/6J and BALB/cByJ female mice: implications for phenotyping strategies. *Genes Brain Behav* 6: 192-200.
- Michel F, Simonet S, Vayssettes-Courchay C, Bertin F, Sansilvestri-Morel P, Bernhardt F, Paysant J, Silvestre JS, Levy BI, Feletou M, Verbeuren TJ (2008) Altered TP receptor function in isolated, perfused kidneys of nondiabetic and diabetic ApoE-deficient mice. *American journal of physiology Renal physiology* 294: F120-129.
- Milner B (1972) Disorders of learning and memory after temporal lobe lesions in man. *Clin Neurosurg* 19: 421-446.
- Mogil JS, Sternberg WF, Marek P, Sadowski B, Belknap JK, Liebeskind JC (1996) The genetics of pain and pain inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 3048-3055.
- Mohajeri MH, Saini KD, Nitsch RM (2004) Transgenic BACE expression in mouse neurons accelerates amyloid plaque pathology. *J Neural Transm* 111: 413-425.
- Montejo de Garcini E, Serrano L, Avila J (1986) Self assembly of microtubule associated protein tau into filaments resembling those found in Alzheimer disease. *Biochem Biophys Res Commun* 141: 790-796.
- Moreau JL, Jenck F, Martin JR, Mortas P, Haefely W (1993) Effects of moclobemide, a new generation reversible Mao-A inhibitor, in a novel animal model of depression. *Pharmacopsychiatry* 26: 30-33.

- Moreau JL, Jenck F, Martin JR, Mortas P, Haefely WE (1992) Antidepressant treatment prevents chronic unpredictable mild stress-induced anhedonia as assessed by ventral tegmentum self-stimulation behavior in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 2: 43-49.
- Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11: 47-60.
- Mouly AM, Fort A, Ben-Boutayab N, Gervais R (2001) Olfactory learning induces differential long-lasting changes in rat central olfactory pathways. *Neuroscience* 102: 11-21.
- Mouly AM, Gervais R (2002) Polysynaptic potentiation at different levels of rat olfactory pathways following learning. *Learn Mem* 9: 66-75.
- Murphy T, Yip A, Brayne C, Easton D, Evans JG, Xuereb J, Cairns N, Esiri MM, Rubinsztein DC (2001) The BACE gene: genomic structure and candidate gene study in late-onset Alzheimer's disease. *Neuroreport* 12: 631-634.
- Nagahara AH, McGaugh JL (1992) Muscimol infused into the medial septal area impairs long-term memory but not short-term memory in inhibitory avoidance, water maze place learning and rewarded alternation tasks. *Brain Res* 591: 54-61.
- Naslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL, Davies P, Greengard P, Buxbaum JD (2000) Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA* 283: 1571-1577.
- Nathan BP, Bellosta S, Sanan DA, Weisgraber KH, Mahley RW, Pitas RE (1994) Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science* 264: 850-852.
- Nichol K, Deeny SP, Seif J, Camaclang K, Cotman CW (2009) Exercise improves cognition and hippocampal plasticity in APOE epsilon4 mice. *Alzheimers Dement* 5: 287-294.
- Olaisen B, Teisberg P, Gedde-Dahl T, Jr. (1982) The locus for apolipoprotein E (apoE) is linked to the complement component C3 (C3) locus on chromosome 19 in man. *Hum Genet* 62: 233-236.
- Ouagazzal AM, Jenck F, Moreau JL (2001) Drug-induced potentiation of prepulse inhibition of acoustic startle reflex in mice: a model for detecting antipsychotic activity? *Psychopharmacology (Berl)* 156: 273-283.
- Owen EH, Logue SF, Rasmussen DL, Wehner JM (1997) Assessment of learning by the Morris water task and fear conditioning in inbred mouse strains and F1 hybrids: implications of genetic background for single gene mutations and quantitative trait loci analyses. *Neuroscience* 80: 1087-1099.
- Palanza P (2001) Animal models of anxiety and depression: how are females different? *Neurosci Biobehav Rev* 25: 219-233.
- Papp M, Willner P, Muscat R (1991) An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. *Psychopharmacology (Berl)* 104: 255-259.
- Parks AL, Curtis D (2007) Presenilin diversifies its portfolio. *Trends Genet* 23: 140-150.
- Paylor R, Crawley JN (1997) Inbred strain differences in prepulse inhibition of the mouse startle response. *Psychopharmacology (Berl)* 132: 169-180.
- Peavy GM (2008) The effects of stress and APOE genotype on cognition in older adults. *The American journal of psychiatry* 165: 1376-1378.
- Peavy GM, Lange KL, Salmon DP, Patterson TL, Goldman S, Gamst AC, Mills PJ, Khandrika S, Galasko D (2007) The effects of prolonged stress and APOE genotype on memory and cortisol in older adults. *Biological psychiatry* 62: 472-478.
- Peretto P, Merighi A, Fasolo A, Bonfanti L (1999) The subependymal layer in rodents: a site of structural plasticity and cell migration in the adult mammalian brain. *Brain Res Bull* 49: 221-243.
- Perry G, Taddeo MA, Nunomura A, Zhu X, Zenteno-Savin T, Drew KL, Shimohama S, Avila J, Castellani RJ, Smith MA (2002) Comparative biology and pathology of oxidative stress in

- Alzheimer and other neurodegenerative diseases: beyond damage and response. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 133: 507-513.
- Phillips W, Michell AW, Barker RA (2006) Neurogenesis in diseases of the central nervous system. *Stem Cells Dev* 15: 359-379.
- Pillon B, Dubois B, Agid Y (1996) Cognitive deficits in non-Alzheimer's degenerative diseases. *J Neural Transm Suppl* 47: 61-71.
- Plassman BL, Welsh-Bohmer KA, Bigler ED, Johnson SC, Anderson CV, Helms MJ, Saunders AM, Breitner JC (1997) Apolipoprotein E epsilon 4 allele and hippocampal volume in twins with normal cognition. *Neurology* 48: 985-989.
- Pluta R (2000) The role of apolipoprotein E in the deposition of beta-amyloid peptide during ischemia-reperfusion brain injury. A model of early Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 903: 324-334.
- Poirier J (1994) Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease. *Trends in neurosciences* 17: 525-530.
- Poirier J (1996) Apolipoprotein E in the brain and its role in Alzheimer's disease. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN* 21: 128-134.
- Poirier J, Baccichet A, Dea D, Gauthier S (1993a) Cholesterol synthesis and lipoprotein reuptake during synaptic remodelling in hippocampus in adult rats. *Neuroscience* 55: 81-90.
- Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P, Gauthier S (1993b) Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 342: 697-699.
- Poirier J, Delisle MC, Quirion R, Aubert I, Farlow M, Lahiri D, Hui S, Bertrand P, Nalbantoglu J, Gilfix BM, Gauthier S (1995) Apolipoprotein E4 allele as a predictor of cholinergic deficits and treatment outcome in Alzheimer disease. *P Natl Acad Sci USA* 92: 12260-12264.
- Porsolt RD (2000) Animal models of depression: utility for transgenic research. *Reviews in the neurosciences* 11: 53-58.
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266: 730-732.
- Porter VR, Buxton WG, Fairbanks LA, Strickland T, O'Connor SM, Rosenberg-Thompson S, Cummings JL (2003) Frequency and characteristics of anxiety among patients with Alzheimer's disease and related dementias. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 15: 180-186.
- Powell SB, Zhou X, Geyer MA (2009) Prepulse inhibition and genetic mouse models of schizophrenia. *Behav Brain Res* 204: 282-294.
- Prut L, Belzung C (2003) The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 463: 3-33.
- Puolivali J, Miettinen R, Pradier L, Riekkinen P, Jr. (2000a) Apolipoprotein E-deficient mice are not more susceptible to the biochemical and memory deficits induced by nucleus basalis lesion. *Neuroscience* 96: 291-297.
- Puolivali J, Pradier L, Riekkinen P, Jr. (2000b) Impaired recovery of noradrenaline levels in apolipoprotein E-deficient mice after N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine lesion. *Neuroscience* 95: 353-358.
- Raber J (2007) Role of apolipoprotein E in anxiety. *Neural Plast* 2007: 91236.
- Raber J (2008) AR, apoE, and cognitive function. *Horm Behav* 53: 706-715.
- Raber J, Akana SF, Bhatnagar S, Dallman MF, Wong D, Mucke L (2000a) Hypothalamic-pituitary-adrenal dysfunction in Apoe(-/-) mice: possible role in behavioral and metabolic alterations. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20: 2064-2071.
- Raber J, Bongers G, LeFevour A, Buttini M, Mucke L (2002) Androgens protect against apolipoprotein E4-induced cognitive deficits. *J Neurosci* 22: 5204-5209.

- Raber J, Huang Y, Ashford JW (2004) ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. *Neurobiol Aging* 25: 641-650.
- Raber J, Wong D, Buttini M, Orth M, Bellosta S, Pitas RE, Mahley RW, Mucke L (1998) Isoform-specific effects of human apolipoprotein E on brain function revealed in ApoE knockout mice: increased susceptibility of females. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10914-10919.
- Raber J, Wong D, Yu GQ, Buttini M, Mahley RW, Pitas RE, Mucke L (2000b) Apolipoprotein E and cognitive performance. *Nature* 404: 352-354.
- Reed T, Carmelli D, Swan GE, Breitner JC, Welsh KA, Jarvik GP, Deeb S, Auwerx J (1994) Lower cognitive performance in normal older adult male twins carrying the apolipoprotein E epsilon 4 allele. *Arch Neurol* 51: 1189-1192.
- Rema V, Armstrong-James M, Ebner FF (2003) Experience-dependent plasticity is impaired in adult rat barrel cortex after whiskers are unused in early postnatal life. *J Neurosci* 23: 358-366.
- Ribot T (1881) *Les maladies de la mémoire*. Editions L'Harmattan.
- Robertson J, Curley J, Kaye J, Quinn J, Pfankuch T, Raber J (2005) apoE isoforms and measures of anxiety in probable AD patients and ApoE^{-/-} mice. *Neurobiology of aging* 26: 637-643.
- Rodgers RJ, Dalvi A (1997) Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev* 21: 801-810.
- Rogers DC, Fisher EM, Brown SD, Peters J, Hunter AJ, Martin JE (1997) Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm Genome* 8: 711-713.
- Rogers DC, Jones DN, Nelson PR, Jones CM, Quilter CA, Robinson TL, Hagan JJ (1999) Use of SHIRPA and discriminant analysis to characterise marked differences in the behavioural phenotype of six inbred mouse strains. *Behav Brain Res* 105: 207-217.
- Rogers DC, Peters J, Martin JE, Ball S, Nicholson SJ, Witherden AS, Hafezparast M, Latcham J, Robinson TL, Quilter CA, Fisher EM (2001) SHIRPA, a protocol for behavioral assessment: validation for longitudinal study of neurological dysfunction in mice. *Neurosci Lett* 306: 89-92.
- Roozendaal B, McEwen BS, Chattarji S (2009) Stress, memory and the amygdala. *Nature reviews Neuroscience* 10: 423-433.
- Roses AD (1994) Apolipoprotein E affects the rate of Alzheimer disease expression: beta-amyloid burden is a secondary consequence dependent on APOE genotype and duration of disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 53: 429-437.
- Roses AD (1996a) The Alzheimer diseases. *Curr Opin Neurobiol* 6: 644-650.
- Roses AD (1996b) Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. *Annu Rev Med* 47: 387-400.
- Rossner S, Ueberham U, Schliebs R, Perez-Polo JR, Bigl V (1998) The regulation of amyloid precursor protein metabolism by cholinergic mechanisms and neurotrophin receptor signaling. *Prog Neurobiol* 56: 541-569.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301: 805-809.
- Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ, et al. (1993) Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43: 1467-1472.
- Schaefer EJ, Lichtenstein AH, Lamon-Fava S, Contois JH, Li Z, Rasmussen H, McNamara JR, Ordovas JM (1995) Efficacy of a National Cholesterol Education Program Step 2 diet in normolipidemic and hypercholesterolemic middle-aged and elderly men and women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 1079-1085.

- Schipper HM (2009) Apolipoprotein E: Implications for AD neurobiology, epidemiology and risk assessment. *Neurobiol Aging*.
- Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D, Roses AD (1993) Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9649-9653.
- Scoville WB, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20: 11-21.
- Scoville WB, Milner B (2000) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. 1957. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 12: 103-113.
- Selkoe DJ (1998) The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* 8: 447-453.
- Selkoe DJ (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81: 741-766.
- Selkoe DJ (2004) Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann Intern Med* 140: 627-638.
- Sherva R, Baldwin CT, Inzelberg R, Vardarajan B, Cupples LA, Lunetta K, Bowirrat A, Naj A, Pericak-Vance M, Friedland RP, Farrer LA (2011) Identification of novel candidate genes for Alzheimer's disease by autozygosity mapping using genome wide SNP data. *J Alzheimers Dis* 23: 349-359.
- Siegel JA, Benice TS, Van Meer P, Park BS, Raber J (2011) Acetylcholine receptor and behavioral deficits in mice lacking apolipoprotein E. *Neurobiol Aging* 32: 75-84.
- Siegel JA, Haley GE, Raber J (2010) Apolipoprotein E isoform-dependent effects on anxiety and cognition in female TR mice. *Neurobiol Aging*.
- Simpson JM, Gil-Mohapel J, Pouladi MA, Ghilan M, Xie Y, Hayden MR, Christie BR (2010) Altered adult hippocampal neurogenesis in the YAC128 transgenic mouse model of Huntington disease. *Neurobiol Dis*.
- Slotnick B (2001) Animal cognition and the rat olfactory system. *Trends Cogn Sci* 5: 216-222.
- Squire LR (1993) The hippocampus and spatial memory. *Trends Neurosci* 16: 56-57.
- Squire LR (2004) Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem* 82: 171-177.
- Squire LR (2009) Memory and brain systems: 1969-2009. *J Neurosci* 29: 12711-12716.
- Squire LR, Knowlton B, Musen G (1993) The structure and organization of memory. *Annu Rev Psychol* 44: 453-495.
- Squire LR, Zola SM (1998) Episodic memory, semantic memory, and amnesia. *Hippocampus* 8: 205-211.
- St George-Hyslop PH, Petit A (2005) Molecular biology and genetics of Alzheimer's disease. *C R Biol* 328: 119-130.
- Stalder M, Phinney A, Probst A, Sommer B, Staufenbiel M, Jucker M (1999) Association of microglia with amyloid plaques in brains of APP23 transgenic mice. *Am J Pathol* 154: 1673-1684.
- Steinerman JR, Irizarry M, Scarneas N, Raju S, Brandt J, Albert M, Blacker D, Hyman B, Stern Y (2008) Distinct pools of beta-amyloid in Alzheimer disease-affected brain: a clinicopathologic study. *Arch Neurol* 65: 906-912.
- Strittmatter WJ, Roses AD (1995) Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 4725-4727.
- Strittmatter WJ, Roses AD (1996) Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci* 19: 53-77.
- Struble RG, Price DL, Jr., Cork LC, Price DL (1985) Senile plaques in cortex of aged normal monkeys. *Brain Research* 361: 267-275.
- Sullivan PM, Mezdour H, Aratani Y, Knouff C, Najib J, Reddick RL, Quarfordt SH, Maeda N (1997) Targeted replacement of the mouse apolipoprotein E gene with the common human APOE3

- allele enhances diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis. *J Biol Chem* 272: 17972-17980.
- Sullivan PM, Mezdour H, Quarfordt SH, Maeda N (1998) Type III hyperlipoproteinemia and spontaneous atherosclerosis in mice resulting from gene replacement of mouse Apoe with human Apoe*2. *J Clin Invest* 102: 130-135.
- Swerdlow NR, Braff DL, Geyer MA (1999) Cross-species studies of sensorimotor gating of the startle reflex. *Ann N Y Acad Sci* 877: 202-216.
- Swerdlow NR, Geyer MA (1998) Using an animal model of deficient sensorimotor gating to study the pathophysiology and new treatments of schizophrenia. *Schizophr Bull* 24: 285-301.
- Tagliari B, Tagliari AP, Schmitz F, da Cunha AA, Dalmaz C, Wyse AT (2011) Chronic variable stress alters inflammatory and cholinergic parameters in hippocampus of rats. *Neurochemical research* 36: 487-493.
- Tang BL (2005) Alzheimer's disease: channeling APP to non-amyloidogenic processing. *Biochem Biophys Res Commun* 331: 375-378.
- Taupin P, Gage FH (2002) Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res* 69: 745-749.
- Teasdale GM, Nicoll JA, Murray G, Fiddes M (1997) Association of apolipoprotein E polymorphism with outcome after head injury. *Lancet* 350: 1069-1071.
- Terry RD (1963) The Fine Structure of Neurofibrillary Tangles in Alzheimer's Disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 22: 629-642.
- Thews KH (1977) *La Science du Comportement*.
- Thompson A, Boekhoorn K, Van Dam AM, Lucassen PJ (2008) Changes in adult neurogenesis in neurodegenerative diseases: cause or consequence? *Genes Brain Behav* 7 Suppl 1: 28-42.
- Trommer BL, Shah C, Yun SH, Gamkrelidze G, Pasternak ES, Stine WB, Manelli A, Sullivan P, Pasternak JF, LaDu MJ (2005) ApoE isoform-specific effects on LTP: blockade by oligomeric amyloid-beta1-42. *Neurobiology of disease* 18: 75-82.
- Trommer BL, Shah C, Yun SH, Gamkrelidze G, Pasternak ES, Ye GL, Sotak M, Sullivan PM, Pasternak JF, LaDu MJ (2004) ApoE isoform affects LTP in human targeted replacement mice. *Neuroreport* 15: 2655-2658.
- Tulving E, Markowitsch HJ (1998) Episodic and declarative memory: role of the hippocampus. *Hippocampus* 8: 198-204.
- Utermann G, Langenbeck U, Beisiegel U, Weber W (1980) Genetics of the apolipoprotein E system in man. *Am J Hum Genet* 32: 339-347.
- van der Staay FJ, Bouger P, Lehmann O, Lazarus C, Cosquer B, Koenig J, Stump V, Cassel JC (2006) Long-term effects of immunotoxic cholinergic lesions in the septum on acquisition of the cone-field task and noncognitive measures in rats. *Hippocampus* 16: 1061-1079.
- van Gaalen MM, Steckler T (2000) Behavioural analysis of four mouse strains in an anxiety test battery. *Behav Brain Res* 115: 95-106.
- van Meer P, Acevedo S, Raber J (2007) Impairments in spatial memory retention of GFAP-apoE4 female mice. *Behav Brain Res* 176: 372-375.
- Vance JE, Hayashi H (2010) Formation and function of apolipoprotein E-containing lipoproteins in the nervous system. *Biochim Biophys Acta* 1801: 806-818.
- Veinbergs I, Mallory M, Sagara Y, Masliah E (2000) Vitamin E supplementation prevents spatial learning deficits and dendritic alterations in aged apolipoprotein E-deficient mice. *The European journal of neuroscience* 12: 4541-4546.
- Veinbergs I, Van Uden E, Mallory M, Alford M, McGiffert C, DeTeresa R, Orlando R, Masliah E (2001) Role of apolipoprotein E receptors in regulating the differential in vivo neurotrophic effects of apolipoprotein E. *Exp Neurol* 170: 15-26.

- Vemuri P, Wiste HJ, Weigand SD, Knopman DS, Shaw LM, Trojanowski JQ, Aisen PS, Weiner M, Petersen RC, Jack CR, Jr. (2010) Effect of apolipoprotein E on biomarkers of amyloid load and neuronal pathology in Alzheimer disease. *Annals of neurology* 67: 308-316.
- Walker LC, Kitt CA, Struble RG, Wagster MV, Price DL, Cork LC (1988) The neural basis of memory decline in aged monkeys. *Neurobiology of aging* 9: 657-666.
- Wall PM, Messier C (2002) Infralimbic kappa opioid and muscarinic M1 receptor interactions in the concurrent modulation of anxiety and memory. *Psychopharmacology* 160: 233-244.
- Walsh DM, Hartley DM, Kusumoto Y, Fezoui Y, Condron MM, Lomakin A, Benedek GB, Selkoe DJ, Teplow DB (1999) Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J Biol Chem* 274: 25945-25952.
- Wang JM, Irwin RW, Brinton RD (2006) Activation of estrogen receptor alpha increases and estrogen receptor beta decreases apolipoprotein E expression in hippocampus in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 16983-16988.
- Weisgraber KH (1994) Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Adv Protein Chem* 45: 249-302.
- Weisgraber KH, Roses AD, Strittmatter WJ (1994) The role of apolipoprotein E in the nervous system. *Curr Opin Lipidol* 5: 110-116.
- Wetzel R, Shivaprasad S, Williams AD (2007) Plasticity of amyloid fibrils. *Biochemistry* 46: 1-10.
- Williams JW, Plassman BL, Burke J, Benjamin S (2010) Preventing Alzheimer's disease and cognitive decline. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)* 1-727.
- Willner P (1997) Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)* 134: 319-329.
- Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R (1987) Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl)* 93: 358-364.
- Wixted JT (2004) The psychology and neuroscience of forgetting. *Annu Rev Psychol* 55: 235-269.
- Yeomans JS, Li L, Scott BW, Frankland PW (2002) Tactile, acoustic and vestibular systems sum to elicit the startle reflex. *Neurosci Biobehav Rev* 26: 1-11.
- Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H (2011) APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain* 4: 3.
- Zigova T, Betarbet R, Soteres BJ, Brock S, Bakay RA, Luskin MB (1996) A comparison of the patterns of migration and the destinations of homotopically transplanted neonatal subventricular zone cells and heterotopically transplanted telencephalic ventricular zone cells. *Dev Biol* 173: 459-474.
- Zola-Morgan S, Squire LR (1993) Neuroanatomy of memory. *Annu Rev Neurosci* 16: 547-563.