UNIVERSITE DE ROUEN

U.F.R. de Psychologie, Sociologie et Sciences de l'Education

Benoit LAINÉ
(97002541)

Maîtrise de Psychologie
Option Psychologie Cognitive

EVALUATION COMPORTEMENTALE DES EFFETS D'UNE MAUVAISE DISTRIBUTION DES NEUROFILAMENTS - IMPLICATIONS POUR LES MALADIES NEURODEGENERATIVES

Sous la direction de :

Monsieur le Professeur Robert LALONDE
Laboratoire de Neurobiologie de l'apprentissage
Faculté des Sciences
76821 Mont-Saint-Aignan Cedex

Avec la collaboration du :

Laboratoire INSERM EPI 9906
Faculté de Médecine, Pharmacie
76183 Rouen Cedex

Septembre 2002

REMERCIEMENTS

à

Monsieur le Professeur Robert Lalonde
(Université de Rouen)

Mademoiselle Martine Dubois
(Université de Rouen)

Madame le Professeur Catherine Strazielle
(Université Henri Poincaré, Nancy)

Monsieur le Professeur Joël Eyer
(Université d'Angers)

Laboratoire INSERM EPI 9906

SOMMAIRE

INTRODUCTION **6**

I. CONTEXTE THEORIQUE **8**

I.A. LES BASES BIOLOGIQUES (EYER & PETERSON, 1994) 8
I.B. LES TROIS GRANDES MALADIES NEURODEGENERATIVES 9
I.C. DISCUSSION SUR LES TESTS UTILISES 12
I.D. LES ETUDES PRECEDENTES 15
I.E. HYPOTHESES 16

II. MATERIELS ET METHODES **17**

II.A. SUJETS 17
II.B. MATERIEL 17
II.C. PROCEDURE 20
II.D. VARIABLES, PLAN D'EXPERIENCE 24
II.E. ANALYSES STATISTIQUES 25

III. RESULTATS **26**

III.A. TESTS DE L'EXPLORATION 26
III.B. TESTS DE L'ANXIETE 27
III.C. TESTS DE LA COORDINATION MOTRICE 28
III.D. TEST DE L'ORIENTATION SPATIALE 28

IV. INTERPRETATION & DISCUSSION **30**

V. CONCLUSION **36**

BIBLIOGRAPHIE **38**

ANNEXES **40**

QUELQUES RAPPELS DE CYTOLOGIE ET DE GENETIQUE 41
SCHEMAS DU MATERIEL UTILISE 42
TABLEAUX 45
GRAPHIQUES 51

ABREVIATIONS

FM	Mouvements de déplacement rapides (*fast movements*)
FR	Mouvements de redressement rapides (*fast rears*)
FS	Mouvements stéréotypés rapides (*fast stereotyped movements*)
MA	Maladie d'Alzheimer
MP	Maladie de Parkinson
MT.. (1 à 7)	Temps de mouvement (*movement time*) n°..
NFH	Neurofilaments à lourd poids moléculaire (*neurofilaments heavy*)
NFH-LacZ	Neurofilaments lourd (NFH) – β-galactosidase (LacZ)
NS	Non significatif
SLA	Sclérose Latérale Amyotrophique
SM	Mouvements de déplacement lents (*slow movements*)
SR	Mouvements de redressement lents (*slow rears*)
SS	Mouvements stéréotypés lents (*slow stereotyped movements*)

RESUME

Il existe plusieurs manières d'étudier les maladies neurodégénératives. Nous avons choisi de travailler avec des animaux transgéniques et plus précisément avec la souris NFH-LacZ de souche DBA/2. Nous nous sommes intéressés aux conséquences comportementales de l'expression de la protéine de fusion NFH-LacZ (neurofilament lourd – β-galactosidase) dans l'organisme de cette souris. La protéine NFH-LacZ va en effet s'accumuler dans les neurones, perturbant ainsi les neurofilaments dont la protéine NFH endogène fait partie et perturbant aussi le transport intracellulaire des organites selon l'état actuel de la recherche en biologie. Cette manipulation ne mime donc pas une maladie en particulier mais permet d'étudier les maladies neurodégénératives en général.

Divers tests ont été utilisés visant à évaluer directement le comportement exploratoire, la coordination motrice, l'anxiété et la navigation spatiale, et indirectement la curiosité, l'apprentissage et les mémoires à court et à long terme. La coordination motrice est atteinte par le transgène, mais non l'exploration, la curiosité, l'anxiété, la navigation spatiale, l'apprentissage et les mémoires. Nous trouvons en effet que les animaux transgéniques chutent plus facilement dans ces tests, faisant ainsi baisser leurs autres performances.

Malgré les effets « planché » de la souche DBA/2 auxquels nous avons été confrontés (par exemple nous ne pouvons pas affirmer que les souris témoins se rappellent l'emplacement de la plate-forme dans la piscine de Morris) et malgré l'absence de paralysie, nous pouvons conclure que les symptômes de nos souris transgéniques sont plus proches de ceux de la Sclérose Latérale Amyotrophique que de ceux de la Maladie d'Alzheimer ou de la Maladie de Parkinson.

Introduction

Les maladies neurodégénératives sont actuellement un souci majeur de santé publique. Elles touchent en effet une population en constante augmentation : la population âgée. De plus, ces maladies ne bénéficient que rarement d'un traitement, plus rarement encore d'un traitement efficace. C'est pourquoi leur étude est aujourd'hui une priorité de la recherche.

Pour faciliter ces études, il est possible d'utiliser des modèles animaux. En effet, certains symptômes peuvent être reproduits chez un animal particulier et si celui-ci présente un grand nombre de symptômes imitant ceux d'une maladie humaine, il devient modèle animal de ladite maladie. Les études comportementales ont l'avantage d'être moins coûteuses, de bénéficier du vieillissement rapide de certains animaux de laboratoire, et d'avoir moins de contraintes éthiques, rendant ainsi possible l'étude de phénomènes pour lesquels il est impossible de « rendre » le sujet dans le même état que celui dans lequel on l'a « emprunté ».

La recherche médicale fournit nombre d'animaux dont les symptômes physiques sont de plus en plus proches des symptômes humains, mais il est évidant qu'une amélioration des symptômes psychiatriques et cognitifs est attendue chez l'homme : la population ne cautionnera jamais un traitement qui n'apporte pas d'amélioration de la vie quotidienne. Les études comportementales sont donc une étape ultérieure de la validation d'un animal comme modèle d'une maladie par la recherche des symptômes comportementaux (moteurs et cognitifs) engendrés par la manipulation effectuée sur l'animal. Ensuite, elles permettent aussi d'évaluer les effets d'un nouveau traitement sur les symptômes psychiatriques et cognitifs.

La grande limite de cette méthode est l'impossibilité d'étudier les troubles du langage ou les fonctions cognitives de très haut niveau. Mais l'apprentissage, les mémoires à court et à long terme et l'orientation spatiale sont facilement évaluées dans les recherches animales.

Notre étude s'inscrit dans le prolongement de deux autres études menées par M. Lalonde et Mlle Dubois sur les souris NFH-LacZ (neurofilament lourd – β-galactosidase) et visant à y rechercher les conséquences comportementales de l'expression du transgène NFH-LacZ (Lalonde, Dubois, Strazielle & Eyer, 1999 ; Dubois, Strazielle, Eyer & Lalonde, 2002). Cet animal transgénique n'est le modèle d'aucune maladie humaine : le transgène NFH-LacZ est un pur produit du géni-génétique et sa principale conséquence est une accumulation de neurofilaments dans les corps cellulaires des neurones. Cependant le cas est intéressant car l'on trouve aussi des dysfonctionnements des neurofilaments dans les maladies d'Alzheimer, de Parkinson et dans la Sclérose Latérale Amyotrophique.

Les deux premières études ne trouvant pas exactement les mêmes résultats, il y a une interaction entre le transgène et le génome sauvage. Il est donc nécessaire de tester différentes souches de souris de manière à séparer les conséquences directement causées par le transgène de celles issues d'une interaction. Nous avons aussi voulu savoir si le transgène NFH-LacZ a des effets sur l'anxiété des animaux.

I. Contexte théorique

I.A. Les bases biologiques *(Eyer & Peterson, 1994)*

Le cytosquelette est l'un des multiples composants de la cellule. Il en existe trois types : les microtubules, les filaments d'actine et les filaments intermédiaires. Dans les neurones, les filaments intermédiaires sont appelés « neurofilaments », ils ont un diamètre de 10nm et sont constitués de l'association de trois types de protéines : NFL, NFM et NFH (respectivement neurofilaments à poids moléculaire faible, moyen et lourd). La protéine NFH est principalement synthétisée lorsque les axones ont atteint leur cible, c'est-à-dire après la naissance.

Les rôles des neurofilaments ne sont pas encore bien définis bien qu'il semble qu'ils soient impliqués dans le contrôle du diamètre axonal. Il semblerait aussi qu'ils interagissent avec les microtubules qui ont sous leur responsabilité le transport intracellulaire, notamment l'approvisionnement des boutons synaptiques en neurotransmetteurs. Perturber les neurofilaments pourrait donc perturber le transport cellulaire, une activité vitale pour la cellule.

Pour étudier la conséquence d'une mauvaise distribution des neurofilaments, nous utilisons la protéine NFH-LacZ, fusion de la protéine NFH endogène légèrement tronquée et de la protéine β-galactosidase (issue de la bactérie *Escherichia Coli*). Initialement cette manipulation avait pour but de visualiser la répartition de la protéine NFH dans les neurones. Mais la conséquence a été une accumulation filamenteuse de protéines NFH-LacZ dans le soma, une protéine NFH normale hypophosphorilée, une baisse de la concentration des protéines NFL et NFM, une réduction du diamètre axonal et aussi une dégénérescence des cellules de Purkinje du cervelet. Pour plus de détails sur la partie cytologique et génétique se référer aux annexes p40.

I.B. Les trois grandes maladies neurodégénératives

Les symptômes neuropathologiques des souris NFH-LacZ ressemblent à ceux décrits dans plusieurs maladies neurodégénératives principalement au niveau des inclusions intracellulaires : il est fréquemment décrit des altérations du cytosquelette. Nous présenterons donc les trois principales maladies neurodégénératives : la Maladie d'Alzheimer, la Maladie de Parkinson et la Sclérose Latérale Amyotrophique.

I.B.1. La Maladie d'Alzheimer

La description princeps de la Maladie d'Alzheimer (MA) a été publiée il y a près d'un siècle (Alzheimer, 1907). Son diagnostic nécessite aujourd'hui encore une analyse histologique du cerveau et donc que le patient soit décédé. Les trois signes histologiques sont la présence de plaques séniles (ou plaques amyloïdes) constituées principalement du peptide β-amyloïde (Aβ), la présence de dégénérescences neurotangulaires (NFT) qui sont des amas de protéines τ (tau) hyperphosphorilées bloquant l'activité des microtubules auxquels ces protéines sont liées, et la présence d'une perte neuronale, réduisant ainsi le volume cérébral.

Les symptômes cliniques sont principalement d'ordre cognitif : déficit de l'attention, des fonctions exécutives, du langage, de la mémoire et des fonctions visuo-spatiales. Il est à noter que la mémoire implicite est relativement préservée. Ces atteintes apparaissent plus ou moins précocement dans la maladie et sont aussi plus ou moins sévères d'un patient à l'autre. (Dubois, Tounsi, Michon & Deweez, 1997 ; Traykov, Marcie, Dalla Barba & Boller, 1999)

Le lien entre la MA et les protéines NFH a été récemment mis en évidence : Hashimoto, Nakamura, Tsujio, Tanimukai, Kudo & Takeda (1999) ont remarqué que les patients atteints de MA avaient en proportion plus de protéines NFH hyperphosphorilées que les témoins en plus de la classique hyperphosphorilation de la protéine τ. Dowjat, Wisniewski & Wisniewski

(2001) montrent que la protéine présenéline-1 (PS1) dont la mutation est responsable de la majorité des cas familiaux précoces de MA, semble influencée l'assemblage de la protéine NFH sur les neurofilaments. Une explication pourrait venir de l'étude d'Ahlijanian, Barreueta, Williams, Jakowski, Kowsz, McCarthy, Coskran, Carlo, Seymour, Burkhardt, Nelson & McNeish (2000) qui, par la suractivation d'une seule enzyme (l'enzyme cdk5), hyperphosphorilisent les protéines NFH et les protéines τ, et provoquent des dysfonctionnements du cytosquelette principalement dans l'amygdale, le thalamus, l'hypothalamus et le cortex ; des régions reliées avec le système limbique et donc avec le réseau anatomique de la mémoire.

Notre manipulation ne provoque pas une hyperphosphorilation mais une hypophosphorilation des protéines NFH. En effet, comme le processus de phosphorilation a normalement lieu dans les axones, et comme la protéine NFH s'accumule dans le soma, elle reste dans un état hypophosphorilé. (Eyer & Peterson, 1994)

I.B.2. La Maladie de Parkinson

La fréquence de la Maladie de Parkinson (MP) est de 1/400 pour l'ensemble de la population mais de 1/200 après 40 ans. La MP débute en moyenne à 55±11 ans et est familiale dans environ 10% des cas. Les symptômes n'apparaissent qu'une fois 80% des neurones des *loci niger* et *cœruleus* dégénérés. Il y a trois symptômes fondamentaux : tremblement au repos, akinésie (rareté et lenteur des mouvements) et hypertonie plastique (rigidité parkinsonienne et attitude générale en flexion) (Cambier, Masson & Dehen, 1994). En plus de ces trois symptômes moteurs, nous pouvons ajouter : une fréquence plus élevée de dépression, une parésie faciale émotionnelle (absence d'expression spontanée des émotions) et des signes neuropsychologiques. Taylor & Saint-Cyr (1995) exposent ces signes neuropsychologiques dans leur article : déficits de la mémoire à court terme, de

l'apprentissage procédural, des fonctions visuo-spatiales (orientation spatiale, création d'une carte mentale) et des fonctions exécutives (planification d'une suite d'action, adaptation à une nouvelle situation, utilisation d'une heuristique par essai-erreur). En bref, le patient parkinsonien a une difficulté à gérer les nouvelles informations ce que l'on retrouve particulièrement dans l'utilisation de stratégie que le patient parkinsonien a été « contraint » d'élaborer lui-même.

Au niveau cellulaire, on trouve des corps de *Lewy,* inclusions neuronales cytoplasmiques, formant des filaments constitués d'α-synucléine anormale aussi bien chez les patients familiaux que sporadiques. (Takahashi & Wakabayashi, 2001) D'ailleurs Tu, Robinson, de Snoo, Eyer, Peterson, Lee & Trojanowski (1997) considère que les inclusions intracellulaires provoquées par l'accumulation de protéine NFH-LacZ sont comparables aux corps de Lewy.

I.B.3. La Sclérose Latérale Amyotrophique ou Maladie de Charcot

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est l'une des maladies neurodégénératives les plus fréquentes dans le monde occidental et la plus grave après la Maladie de Creutfeld-Jacob. Elle touche principalement des adultes entre 40 et 60 ans, héréditairement pour environ 5% d'entre eux. Son issue est fatale en deux à cinq ans après le diagnostic sans possibilité de guérison.

La SLA se caractérise par une dégénérescence des neurones moteurs, soit des neurones des aires motrices du cortex cérébral, soit des motoneurones de la moelle épinière unilatéralement dans un premier temps. Puis elle atteint les deux populations de neurones bilatéralement.

Au début de la SLA, les symptômes sont vagues : chutes, dyspraxie, dysarthrie, crampes, hyposthénie (diminution des forces), tremblements. La dégénérescence des motoneurones entraînera ensuite les symptômes suivant : atrophie et hypotonie musculaire, hyposthénie, dystonie (contractions involontaires et durables des muscles), diminution des réflexes,

dysphagie (déglutition difficile), dysarthrie, dyspnée (respiration difficile), et la dégénérescence des neurones des aires motrices entraînera une rigidité musculaire et une labilité émotionnelle (baisse de la capacité à contrôler ses émotions). Cependant les patients atteints de la SLA ne sont pas atteints de démence. (ALS Society of Canada, *A Manual for people living with ALS*, http://www.als.ca)

I.C. Discussion sur les tests utilisés

La plupart des tests comportementaux que nous utilisons sont fondés sur la curiosité naturelle des souris et sur leur exploration systématique d'un nouvel environnement, motivée par la recherche d'une issue. Les tests d'exploration servent ainsi à vérifier si les deux groupes de souris explorent pareillement leur environnement. Leurs résultats sont capitaux pour la suite de l'expérimentation, car si un groupe explore moins que l'autre, on peut se demander si de moins bonnes performances dans le labyrinthe en croix surélevé ou dans la piscine de Morris ne seraient pas dues à un déficit de l'exploration plutôt qu'à une anxiété plus élevée ou à une moins bonne navigation visuo-spatiale. Les tests d'exploration servent aussi à contrôler que les animaux n'ont pas de difficulté à se déplacer dans leur environnement, ce qui porterait aussi préjudice aux résultats des autres tests.

Le labyrinthe en T a une place particulière dans les tests exploratoires : la fréquence du comportement alternant (spontané) mesure aussi bien la curiosité que la mémoire à court terme (car le rappel est immédiat). En effet, si la souris est curieuse et qu'elle se rappelle de ce qu'elle a déjà exploré, alors elle ira dans le bras précédemment obstrué. Nous nous trouvons dans la même position que lors de l'évaluation de la mémoire ou de l'apprentissage : ces deux aptitudes sont inexorablement inter-reliées.

Les tests d'anxiété se basent sur la méfiance nécessaire des animaux envers leurs prédateurs. Ainsi un milieu éclairé et dégagé est un facteur anxiogène chez la souris, d'autant plus quand les possibilités de fuite sont bloquées (par exemple, bras surélevé dans le labyrinthe en croix). La présence humaine visible accentue aussi l'anxiété des animaux.

Les résultats des deux essais d'un test d'anxiété ne s'interprètent pas de la même manière : le premier essai évalue l'anxiété tandis que le deuxième la curiosité. Par exemple, dans le labyrinthe en croix surélevé, on dira au premier essai que plus une souris entre dans les bras ouverts et moins elle est anxieuse, et au deuxième essai que plus elle entre dans les bras ouverts et plus elle est curieuse. En effet, la souris ayant déjà explorer les bras ouverts au premier essai ne sera pas tentée de s'y risquer une fois de plus. Ces deux interprétations différentes sont validées par les données psychopharmaceutiques : la prise d'un anxiolytique (dont le plus connu est le diazépam [valium®]) augmente le nombre d'entrées dans les bras ouverts le premier jour, mais non le deuxième, comparé à des animaux témoins (Pellow, Chopin, File, Briley 1985).

Dans le test de l'émergence, validé au niveau psychophysiologique, on dira au premier essai que plus une souris reste longtemps dans l'enceinte cloisonnée, un lieu où elles sont à l'abris des regards et dans une pénombre relative, et plus elle est anxieuse. Au deuxième essai, on dira que plus une souris sort vite de l'enceinte et plus elle est curieuse.

Les tests de coordination sont des tests difficiles sur le plan physique. Marcher sur une poutre sans en tomber, surtout au moment de se retourner, nécessite un sens certain de l'équilibre. Le test du rotarod est un peu plus difficile en demandant équilibre et endurance. En effet, si la souris arrête de marcher, elle tombe. Le test du cintre est sûrement le plus complexe : il demande force, endurance et agilité. La fuite vers le bas étant bloquée par la hauteur du dispositif (bien que certaines souris l'aient fait en utilisant leur queue pour

minimiser la hauteur), les souris n'ont pas d'autre choix que de monter pour atteindre le crochet de fixation du cintre ou d'attendre dans une position inconfortable.

Le labyrinthe aquatique de Morris (Morris, Garrud, Rawlins & O'Keefe, 1982) est un test très utilisé dans la recherche animale et permet d'évaluer les fonctions visuo-spatiales des animaux grâce à une phase de rappel. En effet, si la souris a appris la localisation de la plate-forme, nous pensons qu'elle restera plus longtemps dans le quadrant d'où nous avons retirée la plate-forme qu'elle ne l'aurait fait par hasard. Si c'est le cas, alors la souris se rappelle qu'il y avait une plate-forme et où elle était, et prouve ainsi qu'elle est capable de s'orienter dans la piscine par la création d'une « carte mentale ». Ici encore la mesure de l'orientation spatiale est indissociable de celle de la mémoire à long terme (car le rappel est différé d'un jour). Mais il y a d'autres variables qui peuvent affecter les résultats : la vision, l'exploration (recherche d'une issue), la coordination motrice (nage), l'anxiété (milieu dangereux). Il est donc nécessaire de recourir aux autres tests présentés afin de savoir si les déficits observés sont réellement imputables à des troubles de la mémoire ou de l'orientation spatiale.

Un moyen d'évaluer la mémoire à long terme séparément de l'orientation visuo-spatiale est d'observer la baisse de l'exploration des souris dans les openfields. En effet, on peut interpréter cette baisse par le souvenir de la souris d'avoir déjà exploré ce lieu. C'est ce que l'on appelle l'habituation, c'est-à-dire la baisse de l'activité des animaux suite à la présentation répétitive d'un même stimulus.

Avec les tests utilisés, il est aussi possible d'évaluer les capacités d'apprentissage des souris. En effet, une augmentation des performances au fil des essais dans le test du rotarod permet de dire que l'animal est capable d'apprentissage procédural. De même, une augmentation des performances dans la phase d'apprentissage de la piscine de Morris permet de dire que l'animal est capable d'apprentissage, mais peut-on encore parler d'apprentissage procédural lorsqu'il y a création d'une « carte mentale ».

I.D. Les études précédentes

Lalonde et al. (1999) ont évalué les effets sur le comportement de l'expression du transgène NFH-LacZ chez les souris de souche B6C3 âgée de 3 mois et de 12-20 mois. Nous en indiquons ici les principaux résultats :

- Les souris NFH-LacZ ont un poids normal, une exploration horizontale normale mais présentent un déficit de l'exploration verticale. Dans une tâche de rappel immédiat, seules les souris NFH-LacZ âgées ne se rappellent pas.
- Dans des tests de coordination motrice, les souris NFH-LacZ ont de moins bonnes performances que les souris témoins surtout quand elles sont âgées. Dans certains tests, elles tombent plus vite, dans d'autres plus souvent.
- Enfin, dans le test de la piscine de Morris, seules les souris NFH-LacZ jeunes se rappellent moins bien que les témoins jeunes de la localisation de la plate-forme. Pour les souris âgées, la non-différence est due aux faibles performances des souris contrôles. Par contre, dans les essais avec plate-forme visible, les deux groupes de souris NFH-LacZ montrent de moins bonnes performances ; ceci témoigne d'un déficit visuel en lien avec la réduction du diamètre axonal dans le nerf optique.

Après la fin de mes expérimentations, une deuxième étude réalisée par les mêmes chercheurs fût publiée (Dubois et al., 2002). Il s'agit du même transgène mais sur deux autres souches : les souris C3H et FVB :

- Contrairement à l'étude de Lalonde et al. (1999), les souris NFH-LacZ des deux souches sont plus légères que les souris contrôles correspondantes. Cependant, comme dans l'étude précédente, Dubois et al. (2002) trouvent que les souris NFH-LacZ ont une exploration verticale anormale et une exploration horizontale normale. De même, les souris

transgéniques ne se distinguent pas des souris témoins dans la tâche de rappel immédiat, bien qu'aucun des deux groupes de souris FVB ne se distinguent d'une réponse aléatoire.

- La coordination motrice est aussi atteinte par l'expression du transgène NFH-LacZ. Mais contrairement à l'étude de Lalonde et al. (1999), le test du cintre ne distingue pas les souris NFH-LacZ des souris contrôles.
- Enfin, l'orientation spatiale, évaluée dans la piscine de Morris, ne montre pas de différence entre les souris NFH-LacZ et les souris contrôles. De plus, tous les groupes se rappellent la localisation de la plate-forme. Ces résultats ne reproduisent donc pas ceux de Lalonde et al. (1999).

De ces deux études, nous pouvons en déduire que les souris NFH-LacZ sont défavorisées dans les tests demandant un certain sens de l'équilibre et de la coordination motrice, rappelant un début de SLA chez l'homme. (Dubois et al., 2002)

I.E. Hypothèses

Nous posons donc l'hypothèse suivante :

« L'introduction du transgène NFH-LacZ dans le génome de la souris modifie ses performances à des tests comportementaux. »

Je résumerais les hypothèses opérationnelles ainsi :

« Nous nous attendons à retrouver les résultats communs des études de Lalonde et al. (1999) et de Dubois et al. (2002) présentés ci-dessus, et donc à un déficit de l'exploration verticale et de la coordination motrice. »

« Pour les tests d'anxiété, nous nous attendons à ce que les souris NFH-LacZ soient plus anxieuses que les souris témoins. »

II. Matériels et Méthodes

II.A. Sujets

La création et l'élevage de souris transgéniques NFH-LacZ étant relativement longs, nous avons choisi des souris DBA/2 car elles étaient disponibles pour une étude comportementale dans le laboratoire de M. Eyer (Université d'Angers). Cependant ce choix s'inscrit parfaitement dans l'étude des conséquences de l'expression du transgène NFH-LacZ chez des souris de souches différentes.

Vingt-quatre souris âgées de six à huit mois, nées et élevées dans des conditions standards à l'Université d'Angers ont donc été transférées à l'Université de Rouen. Trois ont dû être éliminées pour décès (suite à des batailles entre souris) ou paralysie (suite à une chute). Notre étude comprend finalement dix souris transgéniques (quatre mâles et six femelles) et onze souris témoins (cinq mâles et six femelles). Nous ne nous intéressons pas à la différence mâle/femelle ; c'est pourquoi le ratio mâles/femelles est aussi équilibré que possible.

Nos sujets avaient de l'eau et de la nourriture à volonté. Le cycle jour-nuit était de deux fois douze heures avec ouverture des lumières à 7h00. Nous pouvons aussi remarquer que les souris NFH-LacZ tremblaient, signe de troubles neurologiques.

II.B. Matériel

Afin de mesurer les différentes performances comportementales, nous avons utilisé plusieurs tests (cf. annexes p40).

L'openfield est une enceinte cloisonnée par quatre murs en plastique blanc opaque de 54×30×25cm, dont le fond est divisé en 18 carrés de 9×10cm délimités d'un trait noir. Les quatre carrés centraux sont marqués d'une croix noire.

L’openfield automatisé est un plan horizontal (45×45cm) en plastique noir, muni de paroi de 30cm en plexiglas transparent et de deux rangées de capteurs. La première (*h*=2,5cm) enregistre les mouvements au sol, et la deuxième (*h*=6cm) les redressements. L’appareil sépare aussi les mouvements lents des mouvements rapides, et les mouvements de déplacement des mouvements stéréotypés. La distance entre deux capteurs est de 2,5cm.

Le labyrinthe en T se compose de trois bras disposés comme dans un T. Le bras vertical (30×10cm) donne accès à deux bras horizontaux (30×10cm), un droit et un gauche, et munis de porte en plastique blanc. Les parois mesurent 20cm de haut. Tout ce dispositif est en contreplaqué peint en blanc.

Le labyrinthe en croix surélevé est constitué de quatre bras placés en croix de dimensions 27×5cm chacun. Deux bras, dits cloisonnés, opposés, sont munis de parois de 14cm de haut. Les deux autres, dits ouverts, opposés également, n’ont pas de paroi mais sont munis un rebord de 3mm de haut afin d’éviter les chutes inopportunes. Tout ce dispositif est en plastique beige et est situé à 35cm au dessus du sol.

Le test d’émergence est une petite enceinte cloisonnée en plastique (12×6,5×7,5cm) de la forme d’un soulier ouvert sur le dessus et percée en trois endroits. Celle-ci est placée au centre d’un openfield de dimension 36,5×23×17,5cm en plastique blanc opaque.

La poutre statique est un mât cylindrique en bois de 2,3cm de diamètre et de 110cm de long. Elle est recouverte d’un ruban adhésif rugueux (afin d’augmenter l’adhérence des souris) et est divisée en 11 segments de 10cm chacun. Chacune des deux extrémités est munie

d’un mur en carton alvéolé de 25×25cm centré sur la poutre. Le dispositif est placé à 35cm au dessus d’un tapis épais afin d’amortir les chutes.

Le cintre est l’objet du même nom suspendu à 50cm au dessus d’un tapis épais. Plus techniquement, il est constitué de trois segments en fil d’acier de 2mm de diamètre, l’un horizontal de 40cm de long, les deux autres oblique de 20cm de long et décrivant un angle de 35° avec l’horizontal. Les milieux des deux barres obliques et des deux demi-barres horizontales sont marqués d’un trait noir sur un ruban adhésif blanc.

Le rotarod est un mât cylindrique de 3cm de diamètre et de 5cm de long. Les deux extrémités du mât sont munies d’une paroi de 11cm de haut en plastique blanc. Le haut du mât est à 18cm d’une plaque en plastique blanc qui arrête le chronomètre l’animal tombant. Il tourne à 4 $tr.min^{-1}$ au début de l’essai et à 40 $tr.min^{-1}$ à la fin, soit une augmentation d’un tour par minute toutes les 3,2s environ.

La piscine de Morris (ou labyrinthe aquatique de Morris) est une bassine ronde en plexiglas opaque, de 84cm de diamètre à la surface de l’eau, de 20cm de profondeur et de 23cm de paroi. La température de l’eau est maintenue à 23°C, c'est-à-dire pas trop froide pour ne pas mettre en danger les souris mais pas trop chaude pour qu’elles soient motivées à rechercher une issue. Une plate-forme en plastique grillagé jaune de 8cm de diamètre est placée dans le bassin, juste sous la surface de l’eau (0,5cm). Elle est dissimulée en couvrant l’eau d’une épaisseur de lentilles jaunes. Les indices visuels sont naturellement présents dans la pièce (angle, affiche, tuyaux, néon) : ils facilitent l’orientation des animaux. La piscine est filmée et est divisée en quatre quadrants sur l’écran de contrôle grâce aux quatre points cardinaux.

Pour les essais avec plate-forme visible, le niveau de l'eau a été baissé afin de faire émergée la plate-forme à 0,5cm au dessus du niveau de l'eau. Un mât vertical rouge a été posé sur la plate-forme pour la rendre plus visible. Les autres paramètres sont identiques à ceux décrits précédemment.

II.C. Procédure

Trois jours avant le début des expérimentations, les souris ont été numérotées. Deux jours après, elles ont été pesées et ont passé une partie du protocole SHIRPA (Rogers, Fisher, Brown, Peters, Hunter & Martin, 1997 ; Rogers, Jones, Nelson, Jones, Quilter, Robinson & Hagan, 1999) avec M. Lalonde, ces tests ne faisant pas partie de mon étude. Toutes ces manipulations ont permis aux souris de s'habituer à être manipulées.

Les tests ont été présentés individuellement aux animaux, le matin (9h00 – 13h00) le plus souvent et dans un local aménagé à cet effet dans l'animalerie du bâtiment de recherche de l'U.F.R. de médecine, pharmacie. Nous faisions toujours passer les souris dans le même ordre : les souris contrôles femelles, les souris NFH-LacZ femelles, les souris contrôles mâles et enfin les souris NFH-LacZ mâles. Nous apportions la cage des souris femelles dans le local quelques minutes avant le début des tests, puis celle des mâles quand vinrent leurs tours.

L'ordre des tests a été le même pour tous les animaux et a été organisé du moins au plus stressant. Pour les tests nécessitant plusieurs essais par jour, une pause d'au moins dix minutes a été laissée aux souris entre deux essais.

Tout le matériel qui en avait besoin a été nettoyé entre chaque souris. Les labyrinthes, les openfields et les deux enceintes cloisonnées ont cependant été systématiquement nettoyés. Il n'a pas été utilisé d'alcool, les propriétés enivrantes des vapeurs d'éthanol n'étant pas à démontrer.

L'**activité exploratoire** est mesurée à l'aide du labyrinthe en T et des deux openfields.

L'openfield a été effectué les jours I à III à raison d'un essai par jour. Nous plaçons la souris toujours dans le même angle de l'openfield (cf. annexes, schéma 1 p41) et la laissons explorer pendant 300s. Nous notons séparément le nombre d'entrées dans les rectangles de la périphérie et le nombre d'entrées dans les rectangles centraux.

L'openfield automatisé a été effectué les jours IV à VI à raison d'un essai par jour. Nous plaçons la souris au centre de l'openfield (cf. annexes, schéma 2 p41) et la laissons explorer pendant 300s. Nous relevons les nombres de mouvements de déplacement (M), stéréotypés (S) et de redressement (R) en séparant les mouvements rapides (F), supérieurs à $10cm.s^{-1}$, des mouvements lents (S), inférieur à $10cm.s^{-1}$. Nous obtenons donc six mesures : FM, FS, FR, SM, SS et SR. Les mouvements stéréotypés sont opposés aux mouvements de déplacement et correspondent à des mouvements de toilettage ou d'hésitation. De plus, nous considérons les mouvements mesurés et non les mouvements réels des souris.

Le labyrinthe en T a été effectué à raison d'un essai par jour, au début des jours I à X. Chaque essai comporte d'abord un « choix forcé » : La souris est placée au pied du bras vertical (cf. annexes, schéma 3 p41), l'accès à l'un des deux bras horizontaux étant bloqué (le bras droit les jours impairs, le bras gauche les jours pairs). Une fois la souris entrée dans le seul bras horizontal accessible, nous en fermons la porte et l'y laissons 60s. Puis vient le « choix libre » : la souris est replacée au pied du bras vertical, mais cette fois-ci les deux bras horizontaux sont accessibles. Il n'y a aucune mesure sur le choix forcé. Nous notons la latence de choix et l'alternance, c'est-à-dire si la souris est allée dans le bras précédemment inaccessible. La latence maximale d'un essai est de 60s, mais nous laissons la souris rejoindre l'un des bras horizontaux avant de la retirer.

L'**anxiété** est mesurée à l'aide du labyrinthe en croix surélevé et du test de l'émergence.

Le labyrinthe en croix surélevé a été effectué les jours VII et VIII à raison d'un essai par jour. Chaque essai dure 300s. L'animal est placé au centre du dispositif (cf. annexes, schéma 4 p42) et nous relevons le nombre d'entrées dans les bras ouverts et dans les bras cloisonnés, et la durée passée dans les bras ouverts et dans les bras cloisonnés. Puis nous calculons le pourcentage d'entrées et le pourcentage de temps passés dans les bras ouverts avec la formule suivante : $\frac{ouvert}{ouvert + cloisonné} \times 100$.

Le test de l'émergence est aussi réalisé sur deux jours, les jours IX et X, à raison d'un essai par jour d'une durée maximum de 300s. Nous plaçons la souris dans l'enceinte cloisonnée (cf. annexes, schéma 5 p 42). Ayant ce test en deux exemplaires, deux souris passaient en même temps. Nous mesurons la latence « deux pattes » (deux-pattes) et la latence « quatre pattes » (quatre-pattes), c'est-à-dire le temps mit par la souris pour sortir deux ou quatre pattes.

La **coordination motrice** est évaluée à l'aide de la poutre, du cintre et du rotarod.

Le test de la poutre est effectué le jour XI uniquement. Il comporte quatre essais de 60s, séparés par une pause d'au moins 15min. L'animal est placé au centre de la poutre (cf. annexes, schéma 6 p42) et nous mesurons le nombre de segments traversés (critère des quatre pattes), la latence de chute et le nombre de chutes. Les résultats des quatre essais sont sommés.

Le test du cintre est effectué le jour XII uniquement. Nous suspendons la souris au centre de la barre horizontale (cf. annexes, schéma 7 p43), en prenant garde à ce que les quatre pattes de l'animal soient agrippées au cintre. Il comporte quatre essais de 60s, espacés d'au moins

15min et qui seront sommés. Nous relevons neuf mesures : le nombre de chute, la latence de chute et sept temps de mouvement (TM) :

- TM1 : le museau de la souris atteint le quart de la barre horizontale.
- TM2 : le museau atteint l'extrémité de la barre horizontale.
- TM3 : la souris a deux pattes sur la barre oblique.
- TM4 : la souris a trois pattes sur la barre oblique.
- TM5 : la souris a quatre pattes sur la barre oblique.
- TM6 : le museau de la souris atteint la moitié de la barre oblique.
- TM7 : le museau atteint le sommet du cintre (haut de la barre oblique).

La souris est retirée après avoir atteint TM7.

Le rotarod est effectué les jours XIII à XV. Il comporte quatre essais par jour, d'une durée maximum de 120s et espacé d'au moins 10min. La souris est placée sur le haut du mât (cf. annexes, schéma 8 p43), le museau dirigé dans le sens contraire de la rotation. Puis l'accélération de la rotation est enclenchée. Nous mesurons la latence de chute. Aucune des souris n'a atteint les 120s. Initialement, nous mesurions aussi le temps de marche mais, ne différant pas suffisamment de la latence de chute, nous n'avons pas retenu cette mesure.

L'**orientation spatiale** est mesurée à l'aide du labyrinthe aquatique de Morris les jours XVI à XXI. Pendant les vingt essais d'apprentissage répartis sur les cinq premiers jours, la plate-forme est placée dans le quadrant nord-est (cf. annexes, schéma 9 p43). Chaque jour, les souris partent des quatre points cardinaux, toujours dans le même ordre : nord, est, sud et ouest. Ces quatre performances sont sommées afin d'éviter l'effet du point de départ. Une pause d'au moins dix minutes a été accordée aux souris entre deux essais. Nous mesurons le nombre d'entrées dans les quadrants (critère corps entier) et le temps mis par la souris pour grimper sur la plate-forme, le temps maximum imparti étant de 60s.

Le jour XXI, la tâche de rappel et les quatre essais avec plate-forme visible sont effectués. Dans la tâche de rappel, la plate-forme est retirée et l'animal est déposé au nord. Nous le laissons nager pendant 60s. Nous mesurons le temps passé dans le quadrant cible, c'est-à-dire le quadrant où il y avait précédemment la plate-forme.

Pour les quatre essais avec plate-forme visible, nous utilisons la même procédure que dans la phase d'acquisition, mais la plate-forme émerge à 0,5cm au dessus de la surface et est surmontée d'un manche de tournevis en plastique rouge translucide. Afin d'éviter l'effet de l'apprentissage, la plate-forme est placée dans le quadrant sud-ouest.

II.D. Variables, Plan d'expérience

Nous manipulons quatre **variables indépendantes** dans notre étude : le facteur « Gène » (G_2) à deux modalités : groupe transgénique v/s groupe contrôle, le facteur « Test » (T_9) à neuf modalités : les neuf tests présentés ci-dessus, le facteur « Essai » (E) et le facteur « Jour » (J) dont les nombres de modalités sont variables. Notre nombre de sujets varie lui-aussi avec les tests suite au décès de quelques souris.

Le **plan d'expérience** est donc : $\underline{\mathbf{S}} < \mathbf{G_2} > \times \mathbf{T_9}$

Plus précisément, nous obtenons $\underline{\mathbf{S}} < \mathbf{G_2} > \times \mathbf{J_3}$ dans les deux openfields, $\underline{\mathbf{S}} < \mathbf{G_2} > \times \mathbf{J_2}$ dans les deux tests d'anxiété, $\underline{\mathbf{S}} < \mathbf{G_2} > \times \mathbf{J_3} < \mathbf{E_4} >$ dans le rotarod, $\underline{\mathbf{S}} < \mathbf{G_2} > \times \mathbf{J_5}$ dans la phase d'apprentissage de la piscine de Morris et $\underline{\mathbf{S}} < \mathbf{G_2} >$ dans les autres tests.

Pour ce qui est des **variables dépendantes**, nous pouvons les résumer en une seule : la performance comportementale.

II.E. Analyses statistiques

Les évaluations du facteur « Gène » ont été réalisées avec le test *t* de Student (non appareillé) ou le test non-paramétrique *U* de Mann & Whitney, même en cas de mesures répétées (dans ce cas les essais sont moyennés ou sommés).

Les évaluations de l'effet du facteur « Jour » a été réalisées avec le *F* de Fisher-Snedecor (ANOVA) pour mesure répétée ou le test non-paramétrique F de Friedman (noté $F_{n,v}$). Les évaluations des différences entre les performances des deux jours extrêmes ont été réalisées avec le test *t* de Student (comparaison à la norme 0) ou le test non-paramétrique *U* de Mann & Whitney (comparaison à un groupe théorique construit sur une différence nulle).

Pour l'alternance spontanée et la phase de rappel de la piscine de Morris, une comparaison de chacun des groupes à un comportement aléatoire a été réalisée avec le *U* de Mann & Whitney (comparaison à un groupe théorique construit sur un comportement aléatoire : 50% d'alternance et 25% de temps passé dans le quadrant cible).

Quand il l'a été possible, les effets d'interactions entre les facteurs « Gène » et « Jour » ont été testés avec un *F* de Fisher-Snedecor mais aucun n'est significatif.

Les résultats ont été jugés significatifs quand le seuil *p* correspondant était inférieur à .05.

III. Résultats

Poids (cf. annexes, tableau 1 p 44)

Les souris NFH-LacZ sont significativement plus légères que les souris témoins (t_{20}=3,30, p=0,003).

III.A. Tests de l'exploration

Openfield (cf. annexes, tableaux 1 p44 et 2 p48, figure 1 p50)

Deux des souris femelles normales n'ont pas pu être testées : elles courraient en boucle à une vitesse rendant impossible la prise des données. Paradoxalement, elles ne posèrent aucun problème dans les autres tests.

Le facteur « Gène » n'est pas significatif dans ce test (centre : t_{18}=0,01, NS ; périphérie : t_{18}=0,26, NS), mais le facteur « Jour » l'est (centre : $F_{2,36}$=9,36, p=0,0005 ; périphérie : $F_{2,36}$=5,34, p=0,009), en ce que les souris explorent moins le dispositif au fil des jours, sans interaction entre les deux facteurs (centre : $F_{2,36}$=0,13, NS ; périphérie : $F_{2,36}$=0,13, NS).

Au centre, chacun des deux groupes est significativement moins actif le jour 3 que le jour 1 (NFH-LacZ : t_{18}=2,27, p=0,004 ; témoins : t_{18}=3,24, p=0,005) mais à la périphérie, seul le groupe contrôle l'est (NFH-LacZ : t_{18}=1,79, p=0,09 NS ; témoins : t_{18}=2,34, p=0,031).

Openfield automatisé (cf. annexes, tableaux 1 p44 et 2 p48, figure 2 p50)

Dans ce test, aucun effet d'interaction « Gène × Jour » n'est significatif (FM : $F_{2,40}$=0,35 ; SM : $F_{2,40}$=1,75 ; FS : $F_{2,40}$=0,90 ; SS : $F_{2,40}$=1,15 ; FR : $F_{2,40}$=1,04 ; SR : $F_{2,40}$=0,19 ; NS). Le facteur « Gène » a un effet significatif que pour les mouvements stéréotypés lents (t_{20}=2,26, p=0,035), en ce que les souris NFH-LacZ font moins de mouvements stéréotypés lents que les souris contrôles, et le facteur « Jour » que pour les déplacements rapides ($F_{22,2}$=11,54,

p<0,003) et les déplacements lents ($F_{2,40}$=7,32, p=0,003), en ce que les souris se déplacent moins le jour 2 que les deux autres. Un autre résultat important est qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes pour les redressements rapides (t_{20}=0,23, NS), lents (t_{20}=1,08, NS) ou sur la somme des deux (t_{20}=0,87, NS).

Les souris contrôles font également moins de déplacements lents le jour 3 que le jour 1 (t_{20}=2,76, p=0,012).

Labyrinthe en T (cf. annexes, tableaux 1 p45 et 3 p49).

Etonnement, les souris contrôles n'alternent pas plus que le hasard ($U_{12,12}$=54 , NS) alors que les souris NFH-LacZ le font ($U_{10,10}$=10 , p=0,002). Toutefois, il ne peut être montré de différence entre les deux groupes ni sur le comportement alternant (t_{20}=0,25, NS) ni sur la latence de choix (t_{20}=0,73, NS).

III.B. Tests de l'anxiété

Labyrinthe en croix surélevé (cf. annexes, tableau 1 p45, figure 3 p52)

Il ne peut être mis en évidence aucune différence entre les deux groupes dans ce test sur aucune des mesures que ce soit le premier jour (nombre d'entrées dans les bras ouverts : t_{20}=1,93, p=0,07 NS ; fréquence d'entrées dans les bras ouverts : t_{20}=0,36, NS ; fréquence de temps passé dans les bras ouverts : t_{20}=0,38, NS) ou le deuxième (nombre d'entrées dans les bras ouverts : t_{20}=1,29, NS ; fréquence d'entrées dans les bras ouverts : t_{20}=-1,01, NS ; fréquence de temps passé dans les bras ouverts : t_{20}=-0,15, NS).

Test de l'émergence (cf. annexes, tableau 1 p45, figure 4 p52)

Les souris contrôles sortent significativement plus vite que les souris NFH-LacZ le premier jour (latences deux-pattes : $U_{10,12}$=22, p=0,012 ; quatre-pattes : $U_{10,12}$=21, p=0,010), mais non le deuxième (latences deux-pattes : $U_{10,12}$=50,5, NS ; quatre-pattes : $U_{10,12}$=51,5, NS).

III.C. Tests de la coordination motrice

Poutre (cf. annexes, tableau 1 p46)

Dans ce test, les souris NFH-LacZ tombent plus vite ($U_{10,12}$=13, p=0,002), plus souvent ($U_{10,12}$=16, p=0,004) et enjambent moins de segments ($U_{10,12}$=8, p=0,0006) que les souris témoins.

Cintre (cf. annexes, tableau 1 p46, figure 5 p53)

Les souris transgéniques sont significativement moins performantes que les souris contrôles sur les cinq derniers temps de mouvement : MT1 (t_{20}=-0,16, NS), MT2 (t_{20}=-0,20, NS), MT3 ($U_{10,12}$=16, p=0,004), MT4 ($U_{10,12}$=14,5, p=0,003), MT5 ($U_{10,12}$=15,5, p=0,003), MT6 ($U_{10,12}$=17, p=0,004), MT7 ($U_{10,12}$=24,5, p=0,019), sur la latence de chute (t_{20}=3,45, p=0,002) et sur le nombre de chutes (t_{20}=-4,26, p=0,0004).

Rotarod (cf. annexes, tableaux 1 p46 et 2 p48, figure 6 p53)

Les souris NFH-LacZ tombent significativement plus vite que les souris témoins (t_{19}=2,20, p=0,040). Les performances des souris augmentent aussi significativement au fil des essais ($F_{11,209}$=9,34, p=1.10^{-12}), sans interaction « Jour × Essai » ($F_{11,209}$=0,79, NS).

Les performances du jour 3 sont significativement meilleures que celles du jour 3 pour les deux groupes (contrôles : t_{10}=-6,11, p=0,0001 ; NFH-LacZ : t_9=-3,15, p=0,012).

III.D. Test de l'orientation spatiale

Piscine de Morris (cf. annexes, tableaux 1 p47, 2 p48 et 3 p49, figures 7 et 8 p54)

Dans la phase d'apprentissage, l'effet du facteur « Gène » n'est pas significatif (quadrants : t_{19}=0,35, NS ; latence : t_{19}=0,68, NS), mais le facteur « Jour » l'est (quadrants : $F_{4,76}$=4,09, p=0,005 ; latence : $F_{4,76}$=5,75, p=0,0004), en ce que les performances des souris augmentent

avec les essais, sans interaction entre les deux facteurs (quadrants : $F_{4,76}$=1,59, NS ; latence : $F_{4,76}$=0,86, NS).

Les performances augmentent significativement entre les jours 1 et 5 pour les deux groupes pour le nombre de quadrants traversés (contrôles : t_{10}=3,04, p=0,01 ; NFH-LacZ : t_9=3,59, p=0,006) et pour la latence de sortie de l'eau (contrôles : t_{10}=4,20, p=0,002 ; NFH-LacZ : t_9=5,15, p=0,0006). Les souris ont donc appris l'existence et la localisation de la plate-forme.

Dans la phase de rappel, malgré 34±4% de temps passé dans le quadrant cible, les souris témoins ne distinguent pas d'un comportement aléatoire ($U_{11,11}$=33, p=0,07 NS). Avec 26±4% de temps passé dans le quadrant cible, les souris NFH-LacZ ont un comportement quasi parfaitement aléatoire ($U_{10,10}$=50, NS). Cependant il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes (t_{19}=1,43, NS).

Dans la phase avec plate-forme visible, les souris NFH-LacZ ne se distinguent pas significativement des souris contrôles (quadrants : t_{19}=-0,41, NS ; latence : t_{19}=-0,47, NS).

IV. Interprétation & Discussion

Afin d'évaluer les conséquences comportementales d'une mauvaise distribution des neurofilaments, nous avons choisi des souris NFH-LacZ. Ces souris transgéniques présentent en effet des accumulations filamenteuses de protéines NFH-LacZ dans le corps cellulaire des neurones, conduisant à des perturbations des neurofilaments. Or on montre des perturbations des neurofilaments dans les maladies neurodégénératives telles que la Maladie d'Alzheimer ou la Maladie de Parkinson.

Deux études comportementales sur des conséquences de l'expression du transgène NFH-LacZ dans l'organisme de souris ont déjà été menées sur trois souches différentes (Lalonde et al., 1999 ; Dubois et al., 2002). Leurs résultats différant sur certains points, il était nécessaire d'investiguer sur une autre souche ; nous avons donc choisi de tester la souris DBA/2, disponible pour une étude à l'Université d'Angers. L'anxiété n'ayant pas été évaluée dans les deux précédentes études, nous avons voulu savoir si les souris NFH-LacZ sont plus anxieuses que les souris normales. Nous avons aussi voulu savoir si les capacités d'apprentissage et de mémorisation des souris NFH-LacZ étaient comparables ou non à celles des souris normales.

Nous trouvons d'abord que les souris NFH-LacZ sont plus légères que les souris normales, contrairement à Lalonde et al. (1999) mais en accord avec Dubois et al. (2002). Nous pouvons donc penser que les souris NFH-LacZ ont plus de difficultés à accéder à la nourriture que leurs consœurs témoins pendant leur développement. (Dubois et al., 2002)

Nous trouvons aussi que les souris NFH-LacZ ont une activité exploratoire, une curiosité et des capacités visuelles normales.

En effet, nous ne trouvons pas de différence entre les souris transgéniques et les souris contrôles dans le labyrinthe en T et dans l'openfield. Pour l'openfield automatisé, les souris NFH-LacZ sont moins actives que les souris normales uniquement pour les mouvements stéréotypés lents, mesurant principalement les mouvements d'hésitation. Les souris NFH-LacZ ont donc un comportement exploratoire normal.

Pour ce qui est de la curiosité, nous ne pouvons pas affirmer que les performances entre les deux groupes de souris des deuxièmes jours de passation des deux tests d'anxiété sont différentes. Les souris NFH-LacZ ont donc une curiosité normale.

Pour ce qui est des capacités visuelles, aucune différence n'a pu être établie dans la phase avec plate-forme visible de la piscine de Morris. Les souris transgéniques ont donc des capacités visuelles normales.

Nous ne pouvons donc pas affirmer que les souris NFH-LacZ explorent moins leur environnement, sont moins curieuses ou ont des capacités visuelles moindres que les souris contrôles. Ces résultats sont d'une importance capitale étant donné que la majorité des autres tests utilisés nécessitent une exploration de la part des animaux, et donc de la curiosité et une vision normale.

Nous trouvons aussi que les souris NFH-LacZ ne sont pas moins anxieuses que les souris contrôles. En effet, les performances des souris dans le labyrinthe en croix surélevé (jour 1) et dans la partie centrale de l'openfield (une zone anxiogène de l'appareil) ne permettent pas de distinguer les deux groupes. Pour le test de l'émergence, nous pouvons expliquer les différences obtenues par le déficit de la coordination motrice et non parce qu'elles sont plus anxieuses. En effet, l'espace à l'intérieur de la boîte étant petit, nous pouvons légitimement penser que les souris NFH-LacZ ont eu des difficultés à se tourner à l'intérieur. Notre hypothèse d'une plus grande anxiété chez les souris NFH-LacZ est donc infirmée.

Nous trouvons aussi que les souris NFH-LacZ ont des déficits de la coordination motrice. En effet, la poutre, le rotarod et une partie des mesures du cintre permettent de distinguer les deux groupes de souris. Pour le test du cintre, les souris NFH-LacZ obtiennent des scores normaux uniquement pour les deux premiers temps de mouvement (MT1 et MT2), deux objectifs relativement faciles à atteindre. Les souris NFH-LacZ ont donc clairement des troubles de la coordination motrice.

Nous trouvons aussi que les souris NFH-LacZ n'ont pas de déficit de l'orientation spatiale comparée aux souris témoins. En effet, les souris transgéniques ne se différencient des souris témoins dans aucune des mesures réalisées dans la piscine de Morris, en particulier dans la latence de la phase de rappel.

Comme nous venons de le voir, l'expression du transgène NFH-LacZ dans l'organisme des souris entraîne uniquement des troubles de la coordination motrice se traduisant en particulier par plus de chute. Ceci nous fait donc penser à une dyspraxie chez l'homme.

Les deux études antérieures de Lalonde et al. (1999) et Dubois et al. (2002), réalisées sur le même transgène sur trois autres fonds génétiques, ont aussi obtenu des troubles de la coordination motrice. Mais nous pouvons mettre en évidence quelques différences.

Contrairement à Lalonde et al. (1999) et à Dubois et al. (2002), nos souris NFH-LacZ ne réalisent pas moins de redressements que les souris contrôles dans l'openfield automatisé, même en sommant les deux types de redressements. En effet, les deux précédentes études mesuraient les redressements dans l'openfield sans distinction entre les redressements lents et

rapides. Cet openfield étant étroit (99×18cm) et en bois, il est possible que les souris y soient plus motivées à explorer les parois pour savoir ce qu'il y a derrière les parois, contrairement à notre openfield automatisé où les parois sont en plexiglas parfaitement transparentes.

Aucune des trois études ne trouve les mêmes résultats dans le test du cintre. Dubois et al. (2002) ne trouve aucun effet du facteur « Gène ». Lalonde et al. (1999) et nous trouvons des chutes plus rapides et plus fréquentes chez les souris NFH-LacZ, mais nous trouvons des résultats exactement inverses pour les temps de mouvement : Lalonde et al. (1999) trouvent que les deux groupes se distinguent sur MT1 et MT2, et nous sur MT3, MT4, MT5, MT6 et MT7. Ce test nécessitant force et endurance musculaire, les analyses musculaires réalisées dans les prochains mois par Madame Strazielle (Université de Nancy) nous permettront de mieux comprendre ces résultats.

Dans les deux études précédentes, les déficits observés dans le rotarod sont surtout présents dans les premiers essais. Dans notre étude nous trouvons aussi le même type de courbes (cf. annexes, figure 6 p53) mais dans les deux premiers essais, les souris NFH-LacZ ont des performances normales. Les faibles performances des souris DBA/2 normales au début du test du rotarod masquent donc les déficits que l'on aurait pu observer chez les souris NFH-LacZ.

Seule l'étude de Lalonde et al. (1999) montre des différences entre les souris NFH-LacZ et les souris contrôles dans les phases de rappel et avec plate-forme visible. Les souris NFH-LacZ B6C3 ont donc un déficit des capacités visuelles. Or à lui seul, un déficit des capacités visuelles permet d'expliquer un déficit des capacités visuo-spatiales.

La principale différence entre notre étude et celles de Lalonde et al. (1999) et Dubois et al. (2002) porte donc sur la mesure de l'exploration verticale, mais il est plausible que cette différence soit la conséquence d'une différence de matériel.

Dans cette étude, nous avons aussi évalué les capacités d'apprentissage (procédurale et non-procédural), de mémorisation (à court et à long terme) et d'orientation spatiale des souris.

Pour l'apprentissage procédural évalué dans le rotarod, les souris NFH-LacZ ont une courbe d'apprentissage légèrement décalée dans le temps par rapport à celle des souris témoins, toutefois sans différence au niveau des performances initiales et finales (cf. annexes, figure 6 p53). Le transgène NFH-LacZ retarde donc l'acquisition d'une tâche procédurale sans effet sur les performances initiales et finales des souris DBA/2.

Pour l'apprentissage non-procédural, les souris NFH-LacZ ne se distinguent pas des souris contrôles dans la phase d'apprentissage du labyrinthe aquatique de Morris. De plus, il n'y a pas de décalage dans le temps. Les souris NFH-LacZ ont donc des capacités d'apprentissage non-procédurale normales.

Au niveau de la mémoire à court terme, contrairement aux souris NFH-LacZ, nos souris contrôles n'alternent pas plus qu'elles ne l'auraient fait par hasard dans le labyrinthe en T. Le fait que les souris DBA/2 n'alternent pas est connu puisque Gerlai (2001) trouve ce même résultat malgré un nombre d'animaux plus important, mais celui que les souris NFH-LacZ alternent pose problème. Le fait de faire passer les souris NFH-LacZ systématiquement après les souris contrôles a peut-être permis aux souris transgéniques d'être plus éveillées et/ou

moins stressées par le transport de la cage que les souris témoins, et donc d'avoir de meilleures performances.

Au niveau de la mémoire à long terme, les deux groupes de souris sont moins actifs le troisième jour de passation que le premier dans l'openfield. Mais la baisse de l'activité des souris dans l'openfield automatisé est beaucoup plus rare (cf. annexes, tableau 2 p48). De plus, alors que les souris contrôles approchent le seuil de significativité dans la phase de rappel de la piscine de Morris, les souris NFH-LacZ ne restent pas plus longtemps dans le quadrant cible qu'elles ne l'auraient fait par hasard. Il semblerait donc que les souris NFH-LacZ aient une mémoire à long terme moins efficace que les souris témoins, mais en l'absence de différence significative entre les deux groupes, je préfère conclure que les souris NFH-LacZ ont une mémoire à long terme normale.

Au niveau de l'orientation visuo-spatiale, les deux groupes de souris ayant appris la localisation et l'existence d'une plate-forme, les résultats de la phase de rappel sont pertinents : aucun des deux groupes ne reste dans le quadrant cible plus longtemps qu'il ne l'aurait fait par hasard. Nous ne pouvons donc pas affirmer que les souris se rappellent la localisation et/ou l'existence d'une plate-forme. Nous pouvons en effet penser que les mauvaises performances des souris sont liées à leur mémoire à long terme peu efficace.

Les variables « psychologiques » ne permettent donc pas de différencier les souris NFH-LacZ des souris normales. Nous pouvons donc penser que les souris transgéniques n'ont pas de troubles « cognitifs ».

Tous ces résultats nous amènent donc à dire que les souris NFH-LacZ ne présentent qu'un poids plus léger et des troubles de la coordination motrice principalement à cause de chutes prématurées. Elles ont aussi plus de difficulté dans l'acquisition d'une tâche procédurale, toutefois sans en changer la performance maximale.

V. Conclusion

Afin d'étudier les conséquences comportementales d'une mauvaise distribution des neurofilaments, nous avons choisi des souris transgéniques NFH-LacZ de souche DBA/2. L'utilisation d'une souche différente de celles utilisées dans les études de Lalonde et al. (1999) et Dubois et al. (2002) nous permet de connaître plus précisément les conséquences directes de l'expression du transgène NFH-LacZ dans l'organisme des souris et de repérer les éventuelles interactions entre le transgène et le génome sauvage.

Dans notre étude, nous trouvons que les souris NFH-LacZ sont plus légères que les souris contrôles et qu'elles présentent des troubles sélectifs de la coordination motrice. En effet, nous ne pouvons pas affirmer que les souris NFH-LacZ ont des déficits de l'exploration, de l'apprentissage, de la mémoire, des capacités visuelles ou de l'orientation visuo-spatiale. De plus, elles ne sont ni plus anxieuses, ni moins curieuses que les souris témoins.

Sur les quatre souches de souris NFH-LacZ qui ont subi des tests comportementaux, nous pouvons conclure que l'introduction du transgène NFH-LacZ dans le génome de ces animaux entraîne des déficits de la coordination motrice, se traduisant principalement par un manque

d’équilibre. Cette dyspraxie, l’absence de troubles « cognitifs » obtenue sur trois des quatre souches et le fait que les souris NFH-LacZ jeunes ne tremblent pas (Lalonde et al., 1999) nous font donc penser aux premiers symptômes de la SLA.

Cependant, la manipulation effectuée sur les souris NFH-LacZ étant complètement artificielle, elle ne peut reproduire les symptômes neuronaux présent dans la SLA, dont on ignore encore presque tous. Donc, même si elles montrent des symptômes comportementaux proches de ceux de la SLA, les souris NFH-LacZ ne peuvent être considérées comme un modèle animal de la Slérose Latérale Amyotrophique.

Bibliographie

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, D. (1997). Le cytosquelette. In : *La cellule* (pp. 787-861). Paris : Flammarion.

Ahlijanian, M.K., Barreueta, N.X., Williams, R.D., Jakowski, A., Kowsz, K.P., McCarthy, S., Coskran, T., Carlo, A., Seymour, P.A., Burkhardt, J.E., Nelson, R.B., McNeish, J.D. (2000). Hyperphosphorylated tau and neurofilament and cytoskeletal disruptions in mice overexpressing human p25, an activator of cdk5. *PNAS, 97(6),* 2910-2915.

ALS Society of Canada. *A Manual for people living with ALS*. http://www.als.ca

Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch- Gerichtliche Medezin*. E. Schultze, O. Snell (eds), Vol LXIV, *64*, 146-8. (Traduction française in *Alzheimer Actualité* (1989), n°33, Paris : Fondation IPSEN)

Cambier, J., Masson, M., Dehen, H. (1994) Syndromes Parkinsoniens. In: *Neurologie* (pp. 335-352). Paris : Masson.

Dowjat, W.K., Wisniewski, H., Wisniewski, T. (2001). Alzheimer's disease presenilin-1 expression modulates the assembly of neurofilaments. *Neuroscience, 103(1),* 1-8.

Dubois, B., Tounsi, H., Michon, A., Deweer, B. (1997). Les déficits cognitifs dans la maladie d'Alzheimer. In : J.M. Besson, M.H. Bassant, B. Calvino, J. Epelbaum, F. Forette, M. Lamour, C. Pierrot-Deseilligny, Y. Christen (eds), *De la neurophysiologie à la Maladie d'Alzheimer, Symposium en hommage à Yvon Lamour* (pp. 182-197). Marseille : Solal.

Dubois, M., Strazielle, C., Eyer, J., Lalonde, R. (2002). Sensorimotor functions in transgenic mice expressing the neurofilament/heavy-LacZ fusion protein on two genetic backgrounds. *Neuroscience, 112(2),* 447-545.

Eyer, J., Peterson, A. (1994). Neurofilament-deficient axons and perikaryal aggregates in viable transgenic mice expressing a neurofilament-β-galactosidase fusion protein. *Neuron, 12*, 389-405.

Gerlai, R. (2001). Behavioral tests of hippocampal function: simple paradigms complex problems. *Behavioural Brain Research, 125*, 269-277.

Hashimoto, R., Nakamura, Y., Tsujio, I., Tanimukai, H., Kudo, T., Takeda, M. (1999). Quantitative analysis of neurofilament proteins in Alz brain by enzyme linked immunosorbent assay system. *Psychiatry and Clinical Neurosciences, 53*, 587-591.

Lalonde, R., Dubois, M., Strazielle, C., Eyer, J. (1999). Motor coordination and spatial orientation are affected by neurofilament maldisttribution: correlations with regional brain activity of cytochrome oxidase. *Exp Brain Res, 126*, 223-234.

Morris, R.G.M., Garrud, P., Rawlins, J.N.P., O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature, 297*, 681-683.

Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods, 14(3),* 149-67.

Rogers, D.C., Fisher, E.M.C., Brown, S.D.M., Peters, J., Hunter, A.J., Martin, J.E. (1997). Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mammalian Genome, 8,* 711-713.

Rogers, D.C., Jones, D.N.C., Nelson, P.R., Jones, M., Quilter, C.A., Robinson, T.L., Hagan, J.J., 1999. Use of SHIRPA and discriminant analysis to characterise marked differences inthe behavioral phenotype of six inbred mouse strains. *Behavioural Brain Research, 105,* 207-217.

Takahashi, H., Wakabashi, K. (2001). The cellular pathology of Parkinson's disease. *Neuropathology, 21(4),* 315-22.

Taylor, A.E., Saint-Cyr, J.A. (1995). The neuropsychology of Parkinson's disease. *Brain and cognition, 28,* 281-296.

Traykov, L., Marcie, P., Dalla Barba, G., Boller, F. (1999). La neuropsychologie de la maladie d'Alzheimer. *Rev Neurol (Paris), 155,* 4S, 38-43.

Tu, P.-H., Robinson, K.A., de Snoo, F., Eyer, J., Peterson, A., Lee, V.M.-Y., Trojanowski, J.Q. (1997). Selective degeneration of Purkinje cells with Lewy boby-like inclusions in aged NFHLACZ transgenic mice. *The Journal of Neuroscience, 17(3),* 1064-1074.

ANNEXES

Quelques rappels de cytologie et de génétique

1. Le Cytosquelette

Le cytosquelette est l'un des multiples composants de la cellule. Il a été improprement nommé ainsi car c'est tout ce qui reste d'une cellule après plusieurs rinçages avec des solutions contenant divers sels.

Il y a en réalité trois types de cytosquelettes : les filaments d'actine, les microtubules, les filaments intermédiaires.

Les filaments d'actine ressemblent à un grillage et permettent à la cellule de garder sa forme tridimensionnelle.

Les microtubules assurent tout le trafic intracellulaire, y compris dans les axones neuronaux. On peut les comparer à des rails. Ils transportent tout ce que la cellule a besoin de déplacer.

Les filaments intermédiaires sont une classe hétérogène du cytosquelette. Dans les cellules musculaires par exemple, ils assurent les contractions. Dans d'autres cellules, leurs rôles ne sont pas clairement définis. (Alberts, Bray, Lewis, Raff, Roberts & Watson, 1997)

2. Les Neurofilaments

Dans les neurones, les filaments intermédiaires sont nommés « neurofilaments ». Leurs rôles ne sont pas encore vraiment connus, même si quelques recherches confirment l'hypothèse d'un rôle de contrôle du diamètre axonal. Il est aussi quasiment clair que des dysfonctions des neurofilaments se retrouvent dans diverses neuropathies (Maladies d'Alzheimer et de Parkinson entre autre)

Ils sont constitués de trois types de protéines : la NFH (neurofilament à haut poids moléculaire), la NFL (neurofilament à faible poids moléculaire) et la NFM (neurofilament à poids moléculaire moyen). La NFL et la NFM sont co-synthétisées pendant la croissance axonale, et le sont donc principalement pendant la vie intra-utérine. Dès que l'axone a atteint sa cible, la NFH est synthétisée en plus grand nombre et va se lier à la NFL. Dans le neurone mature, les neurofilaments (d'une épaisseur de 10 nm) sont un assemblage de NFL, de NFM et de NFH. Les neurofilaments se retrouvent dans tout le neurone, c'est-à-dire dans le corps cellulaire, les dendrites et l'axone, mais dans l'axone, ils semblent développer des interactions inter-filament et leur densité devient plus grande.

Les neurofilaments interagiraient donc avec les microtubules et auraient ainsi un rôle dans le transport axonal. (Eyer & Peterson, 1994)

3. La Protéine de fusion « NFH-LacZ »

Afin de pouvoir étudier le rôle de la NFH sur le comportement, la protéine β-galactosidase (LacZ) lui a été greffée par géni-génétique, créant ainsi la protéine de fusion NFH-LacZ. Le gène obtenu a été intégré au génome de la souris obtenant ainsi une souris transgénique NFH-LacZ. La conséquence de l'introduction du transgène est une accumulation de neurofilaments dans le soma des neurones par rapport aux souris contrôles, une protéine NFH normale hypophosphorilée, une baisse de la concentration des protéines NFL et NFM, une réduction du diamètre axonal, et aussi une dégénérescence des cellules de Purkinje (dans le cervelet). (Eyer & Peterson, 1994)

Schémas du matériel utilisé

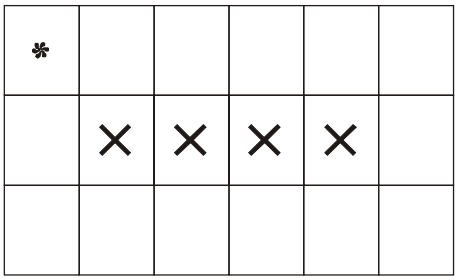

Schéma 1 : L’openfield.

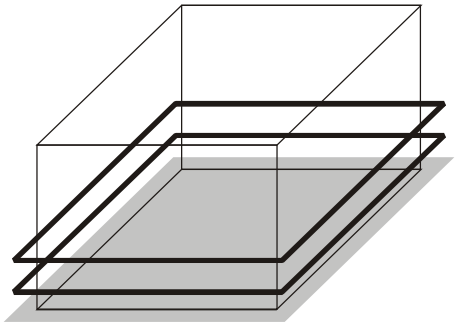

Schéma 2 : L’openfield automatisé.

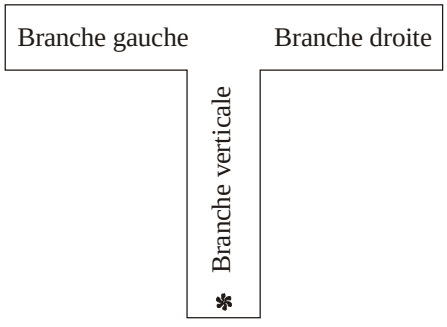

Schéma 3 : Le labyrinthe en T.

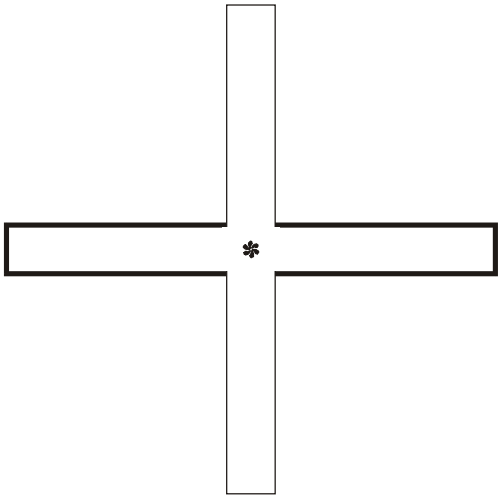

Schéma 4 : Le labyrinthe en croix surélevé.

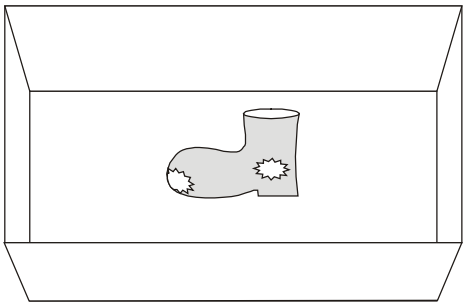

Schéma 5 : Le test de l’émergence.

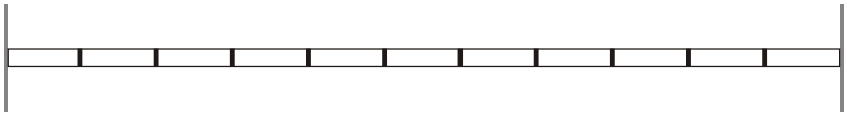

Schéma 6 : La poutre.

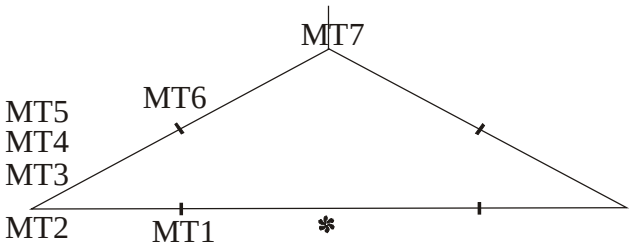

Schéma 7 : Le cintre.

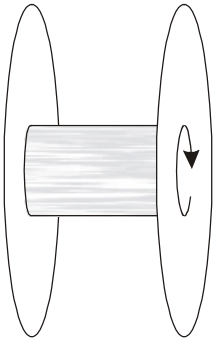

Schéma 8 : Le rotarod.

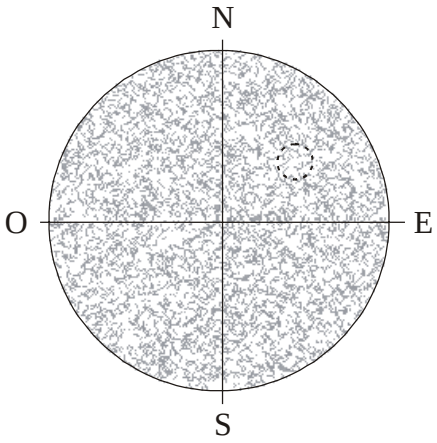

Schéma 9 : La piscine de Morris.

Tableaux

Tableau 1 : Moyennes (± erreurs standards moyennes) et médianes des scores obtenus par les souris contrôles et les souris NFH-LacZ pour toutes les mesures effectuées. (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$)
Pour le calcul du p de la différence entre les deux groupes, il a été préféré le test du t de Student (moyenne en noir), mais quand les distributions étaient très différentes de la distribution normale, nous avons utilisé le test du U de Mann & Whitney (médiane en noir).

	Contrôles		NFH-LacZ		
	Moyenne	Médiane	Moyenne	Médiane	Seuil *p*
Poids	**24±1,0**	23,5	**19±0,7**	19	***p=0,003*** **
Exploration, Activité motrice					
Openfield (Nombre de segments traversés)					
Centre	5±1	4	6±2	3	*p=0,913*
Jour 1	9±2	7	9±3	9	*p=0,790*
Jour 2	4±1	3	4±2	1	*p=0,323*
Jour 3	3±1	1	4±2	2	*p=0,819*
Périphérie	67±6	64	64±10	66	*p=0,800*
Jour 1	83±8	88	76±16	76	*p=0,707*
Jour 2	61±8	51	62±8	63	*p=0,954*
Jour 3	59±9	52	56±10	55	*p=0,777*
Openfield automatisé (Nombre de mouvements mesurés)					
Déplacements rapides	357±138	154	231±103	136	*p=0,262*
Jour 1	463±218	236,5	281±120	132	*p=0,291*
Jour 2	254±99	96	190±123	68,5	*p=0,323*
Jour 3	353±119	199	222±97	122,5	*p=0,210*
Déplacements lents	141±19	124	124±25	127	*p=0,587*
Jour 1	166±15	158	141±32	152	*p=0,476*
Jour 2	130±25	86	98±23	88,5	*p=0,371*
Jour 3	128±20	123	132±25	122,5	*p=0,884*
Mouvements stéréotypés rapides	242±31	227	233±54	236	*p=0,885*
Jour 1	262±46	194,5	208±50	218,5	*p=0,437*
Jour 2	229±36	253	271±88	180	*p=0,692*
Jour 3	236±32	229	221±48	220,5	*p=0,804*
Mouvements stéréotypés lents	**71±5**	69	**51±8**	57	***p=0,035****
Jour 1	**78±7**	73,5	**51±9**	51,5	***p=0,025****
Jour 2	71±7	70,5	49±9	52,5	*p=0,054*
Jour 3	65±7	61	54±8	58	*p=0,308*

Tableau 1 (suite)	Contrôles		NFH-LacZ		
	Moyenne	Médiane	Moyenne	Médiane	Seuil *p*
Redressements rapides	3±0,5	3	3±1	2	*p=0,822*
Jour 1	3±1	3,5	2±1	0,5	*p=0,274*
Jour 2	2±1	1,5	3±1	2	*p=0,551*
Jour 3	4±1	4	3±1	2,5	*p=0,665*
Redressements lents	11±1	11	9±2	6	*p=0,294*
Jour 1	13±1	12,5	10±3	7,5	*p=0,346*
Jour 2	10±2	8	7±2	5	*p=0,335*
Jour 3	11±1	9,5	9±2	9	*p=0,505*
Labyrinthe en T					
Alternance (en %)	57±6	55	65±3	70	*p=0,255*
Latence (par essai)	15±4	9	11±2	14	*p=0,474*
Anxiété					
Labyrinthe en croix surélevé					
Nombre d'entrées dans les bras ouverts					
Jour 1	1,3±0,4	1,5	1,0±0,5	0	*p=0,591*
Jour 2	0,2±0,2	0	0,3±0,2	0	*p=0,623*
Nombre d'entrées dans les bras fermés					
Jour 1	7±1	6,5	5±0,9	4	*p=0,068*
Jour 2	5±1	4,5	3±0,8	2	*p=0,212*
Fréquence d'entrées dans les bras ouverts (en %)					
Jour 1	14±4	18	11±5	0	*p=0,726*
Jour 2	0,9±0,9	0	3±3	0	*p=0,324*
Temps passé dans les bras ouverts					
Jour 1	16±5	9,5	20±10	0	*p=0,724*
Jour 2	0,7±0,7	0	1,0±0,7	0	*p=0,739*
Temps passé dans les bras fermés					
Jour 1	284±5	290,5	280±10	300	*p=0,724*
Jour 2	299±0,7	300	299±0,7	300	*p=0,739*
Fréquence de temps passé dans les bras ouverts (en %)					
Jour 1	5±2	3	6±3	0	*p=0,704*
Jour 2	0,2±0,2	0	0,3±0,2	0	*p=0,883*
Test de l'émergence					
Latence « deux pattes »					
Jour 1	29±25	**2**	46±29	**12,5**	***p=0,012****
Jour 2	28±25	3	7±3	3,5	*p=0,531*
Latence « quatre pattes »					
Jour 1	29±25	**2**	69±38	**13**	***p=0,010****
Jour 2	29±25	3	9±4	3,5	*p=0,575*

Tableau 1 (suite)	Contrôles		NFH-LacZ		
	Moyenne	Médiane	Moyenne	Médiane	Seuil *p*
Coordination motrice					
Poutre					
Segments	**66±10**	64,5	**14±3**	17,5	***p=0,0002******
Latence	**220±7**	234	**127±20**	111	***p=0,0001******
Nombre de chutes	**0,6±0,2**	0,5	**3±0,4**	3	***p=0,0003******
Cintre					
MT1	34±7	23	36±9	23	*p=0,875*
MT2	83±15	74,5	88±21	64	*p=0,840*
MT3	135±17	**144**	203±20	**240**	***p=0,004****
MT4	161±16	**172**	227±13	**240**	***p=0,003****
MT5	173±15	**186**	227±12	**240**	***p=0,003****
MT6	185±15	**196**	235±5	**240**	***p=0,004****
MT7	207±15	**222**	235±5	**240**	***p=0,019****
Latence	**176±17**	192	**98±14**	83,5	***p=0,002****
Nombre de chutes	**2±0,4**	1,5	**4±0,2**	4	***p=0,0004******
Rotarod					
Latence	**35±1**	34	**26±4**	24	***p=0,040****
Essai 1	15±2	15	13±3	9,5	*p=0,518*
Essai 2	23±4	28	15±6	6	*p=0,289*
Essai 3	**35±4**	40	**19±6**	12,5	***p=0,040****
Essai 4	37±5	37	23±7	20	*p=0,117*
Essai 5	29±4	27	18±4	15	*p=0,059*
Essai 6	**39±4**	40	**23±6**	27	***p=0,031****
Essai 7	35±4	34	28±6	29	*p=0,349*
Essai 8	37±4	34	33±6	36	*p=0,549*
Essai 9	35±1	35	28±3	26	*p=0,056*
Essai 10	42±2	43	33±6	26	*p=0,185*
Essai 11	44±3	44	36±5	36,5	*p=0,178*
Essai 12	42±5	39	41±5	40,5	*p=0,824*

Tableau 1 (suite)	Contrôles		NFH-LacZ		
	Moyenne	Médiane	Moyenne	Médiane	Seuil *p*
Orientation spatiale					
Labyrinthe aquatique de Morris					
Phase d'acquisition					
Nombre de quadrants traversés	33±3	34	32±3	31	*p=0,732*
Jour 1	41±5	37	39±2	37	*p=0,643*
Jour 2	44±6	46	31±4	29,5	*p=0,126*
Jour 3	28±3	32	32±5	34,5	*p=0,449*
Jour 4	28±4	28	32±6	24,5	*p=0,529*
Jour 5	27±4	22	27±3	29	*p=0,959*
Latence	107±9	106	114±1	118	*p=0,593*
Jour 1	138±13	149	146±10	144,5	*p=0,655*
Jour 2	135±19	135	117±20	118,5	*p=0,537*
Jour 3	89±10	93	112±16	111,5	*p=0,238*
Jour 4	92±18	63	101±22	64,5	*p=0,471*
Jour 5	79±11	71	97±9	101	*p=0,231*
Phase de rappel					
Latence	20±2	20	15±2	15	*p=0,167*
Plate-forme visible					
Nombre de quadrants traversés	18±3	14	20±3	20	*p=0,685*
Latence	50±13	31	58±10	49,5	*p=0,645*

Tableau 2 : Comparaison entre les deux jours extrêmes pour les tests qui le permettent chez les souris contrôles et les souris NFH-LacZ indépendamment. Il est présenté soit la différence moyenne soit la différence médiane en fonction du test de signification utilisé [*t* de Student ou *U* de Mann & Whitney (comparaison à un groupe théorique)]. (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$)

	Contrôles		NFH-LacZ	
	Différence	Seuil *p*	Différence	Seuil *p*
Exploration, Activité motrice				
Openfield (Nombre de segments traversés)				
Centre				
Jour 1 – Jour 3 (moyenne)	**6±2**	***p*=0,005****	**5±2**	***p*=0,036***
Périphérie				
Jour 1 – Jour 3 (moyenne)	**24±10**	***p*=0,031***	20±11	*p*=0,091
Openfield automatisé (Nombre de mouvements mesurés)				
Déplacements rapides				
Jour 1 – Jour 3 (médiane)	67	*p*=0,166	-13,5	*p*=0,130
Déplacements lents				
Jour 1 – Jour 3 (médiane)	**40**	***p*=0,0005*****	-6,5	*p*=0,130
Mouvements stéréotypés rapides				
Jour 1 – Jour 3 (médiane)	5	*p*=0,488	-12	*p*=0,450
Mouvements stéréotypés lents				
Jour 1 – Jour 3 (médiane)	14	*p*=0,166	-3	*p*=1,000
Redressements rapides				
Jour 1 – Jour 3 (médiane)	0,5	*p*=0,729	**-1,5**	***p*=0,023***
Redressements lents				
Jour 1 – Jour 3 (médiane)	1	*p*=0,083	0	*p*=1,000
Coordination motrice				
Rotarod (somme des latences des quatre essais à l'intérieur des jours)				
Jour 1 – Jour 3 (moyenne)	**-53±9**	***p*=0,0001*****	**-61±21**	***p*=0,012***
Orientation spatiale				
Labyrinthe aquatique de Morris				
Phase d'acquisition				
Nombre de quadrants traversés				
Jour 1 – Jour 5 (moyenne)	**15±5**	***p*=0,012***	**12±3**	***p*=0,006****
Latence				
Jour 1 – Jour 5 (moyenne)	**59±14**	***p*=0,0018****	**49±9**	***p*=0,0006*****

Tableau 3 : Comparaison des souris contrôles et des souris NFH-LacZ à un groupe théorique de même effectif et représentant un comportement parfaitement aléatoire. (* $p<0,05$; ** $p<0,01$)
Le groupe théorique ayant une variance nulle, le test du *U* de Mann & Whitney est impératif.

	Contrôles		NFH-LacZ	
	Médiane (Q1-Q3)	Seuil *p*	Médiane (Q1-Q3)	Seuil *p*
Labyrinthe en T (alternance)				
Alternance	55 (45-72)	*p*=0,299	**70 (60-70)**	***p*=0,002***
Phase de rappel du Labyrinthe aquatique de Morris				
Latence	20 (15-26)	*p*=0,071	15 (11-20)	*p*=1,000

Graphiques

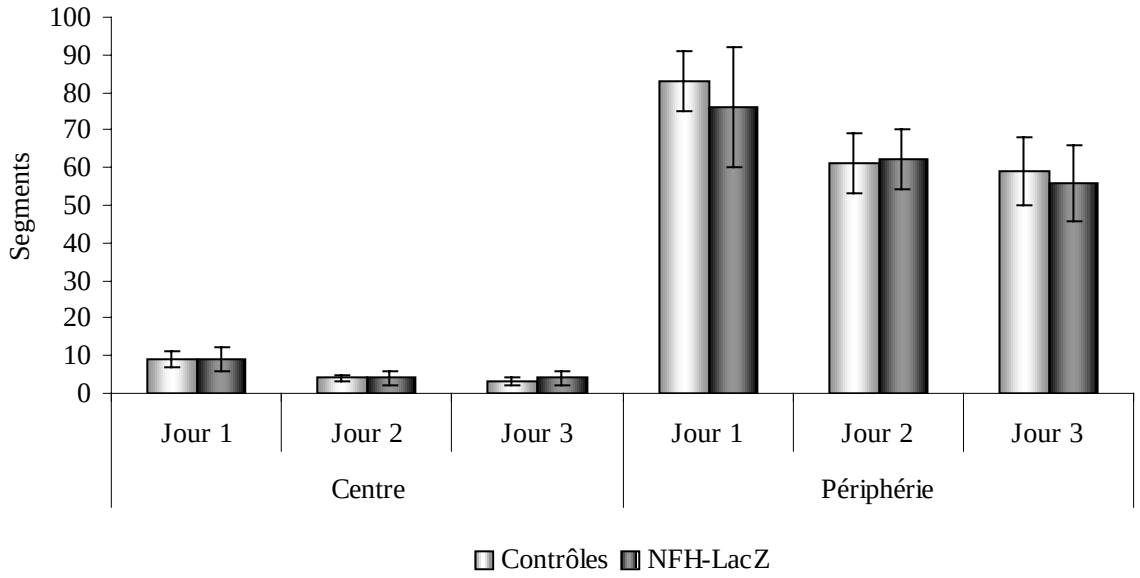

Figure 1 : **Openfield**. Nombre moyen (± erreurs standards moyennes) de segments franchis par les souris contrôles et les souris NFH-LacZ les jours 1, 2 et 3 au centre et à la périphérie.

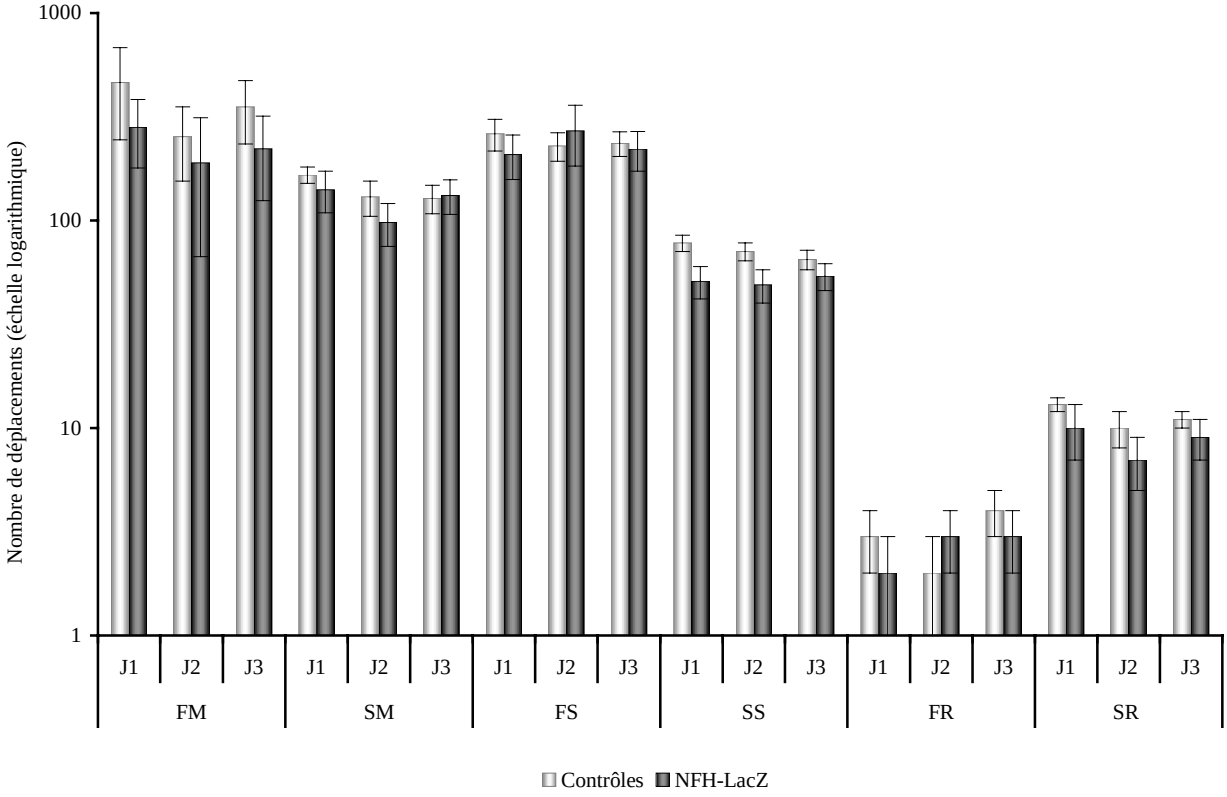

Figure 2 : **Openfield automatisé**. Nombre de déplacements moyen (± erreurs standards moyennes) effectué par les souris contrôles et les souris NFH-LacZ les jours 1, 2 et 3. (FM = Mouvements de déplacement rapides, SM = Mouvements de déplacement lents, FS = Mouvements stéréotypés rapides, SS = Mouvements stéréotypés lents, FR = Redressements rapides, SR = Redressements lents.)

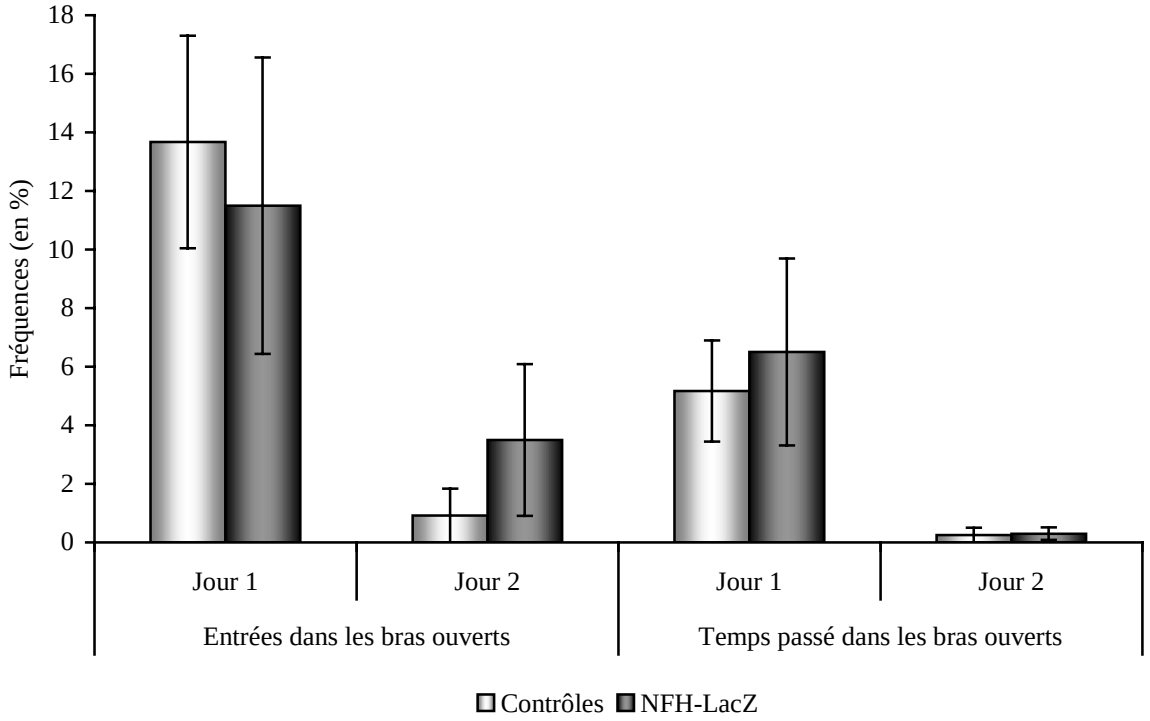

Figure 3 : **Labyrinthe en croix surélevé**. Fréquences moyennes (± erreurs standards moyennes) d'entrées et de temps passé dans les bras ouverts chez les souris contrôles et les souris NFH-LacZ les jours 1 et 2.

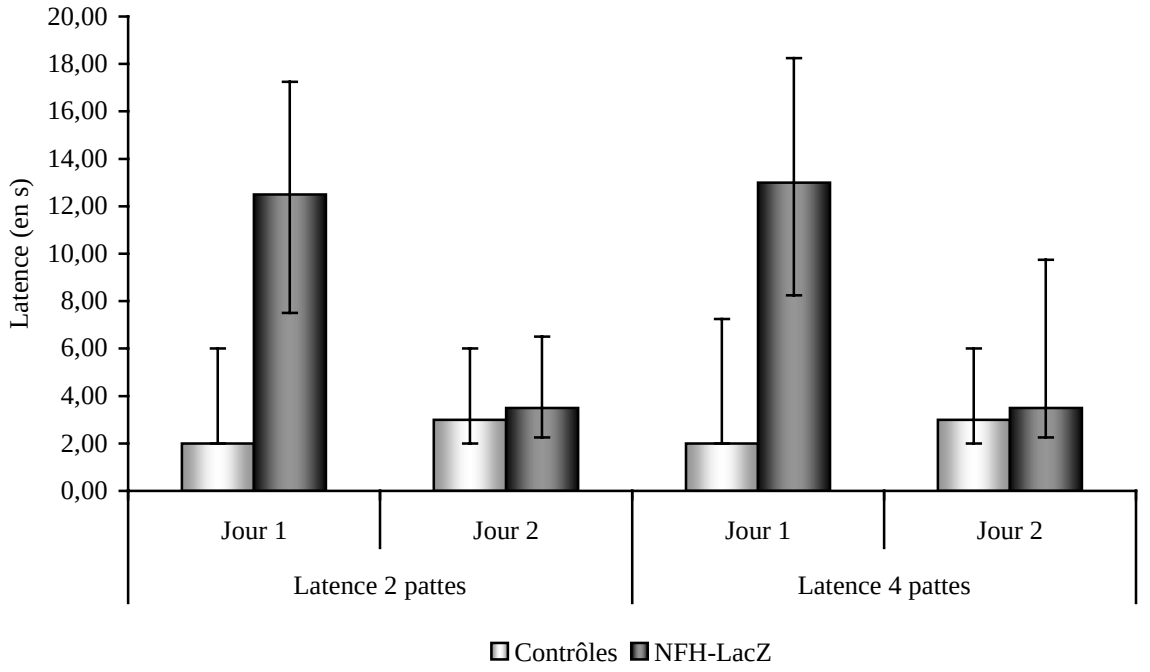

Figure 4 : **Test de l'émergence**. Latences médianes (Q1-Q3) « 2 pattes » et « 4 pattes » chez les souris contrôles et les souris NFH-LacZ les jours 1 et 2.

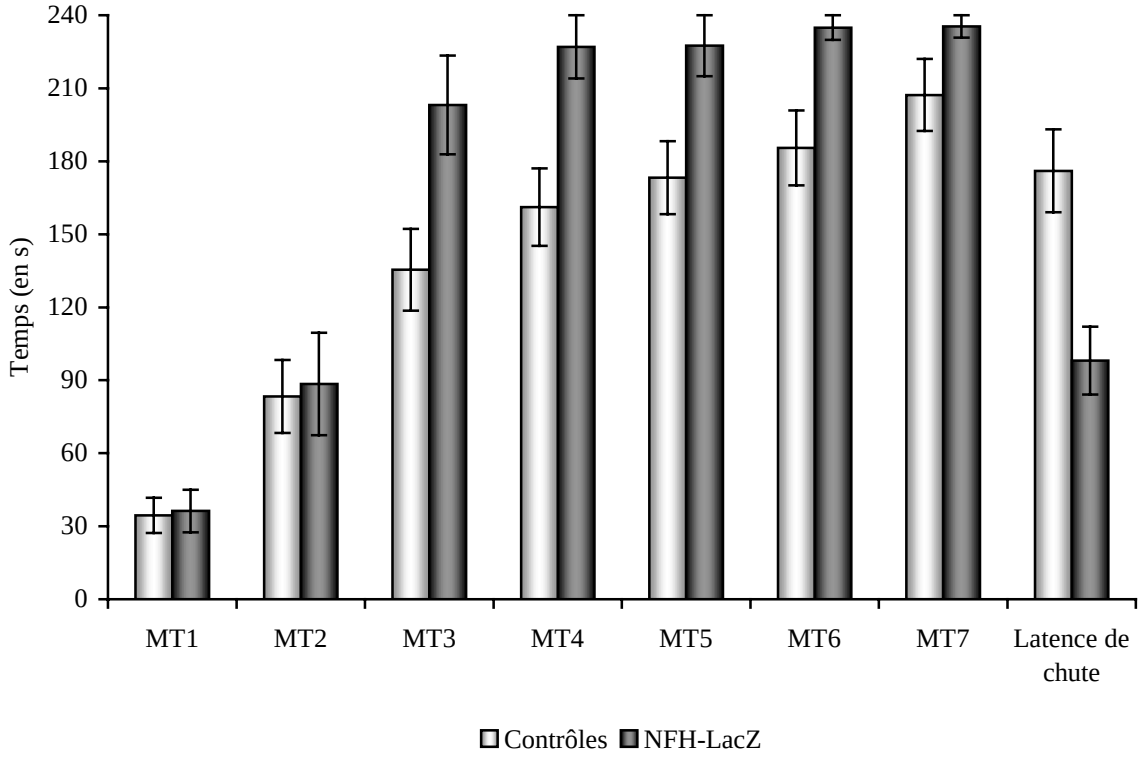

Figure 5 : **Test du cintre**. Temps de réaction moyen (± erreurs standards moyennes) de MT1 à MT7 et Latence de chute moyenne (± erreurs standards moyennes) chez les souris contrôles et les souris NFH-LacZ.

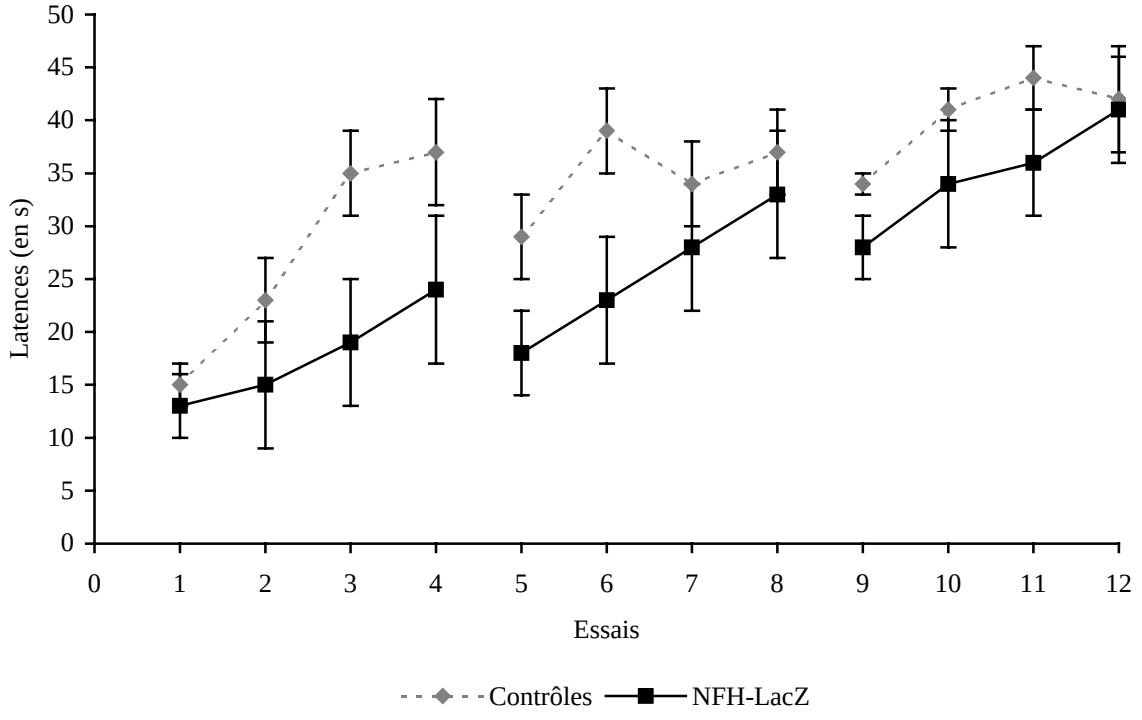

Figure 6 : **Rotarod**. Latences moyennes (± erreurs standards moyennes) de chute chez les souris contrôles et NFH-LacZ pour chacun des douze essais du test.

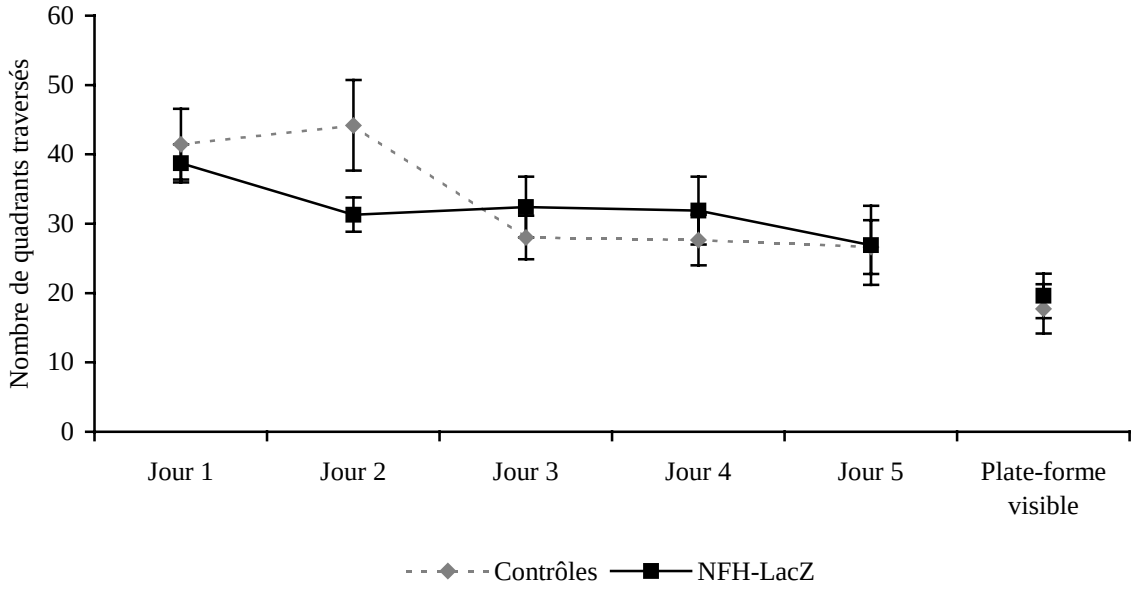

Figure 7 : **Piscine de Morris**. Nombre moyen (± erreurs standards moyennes) de quadrants traversés par les souris contrôles et les souris NFH-LacZ pendant la phase d'apprentissage et la phase avec plate-forme visible.

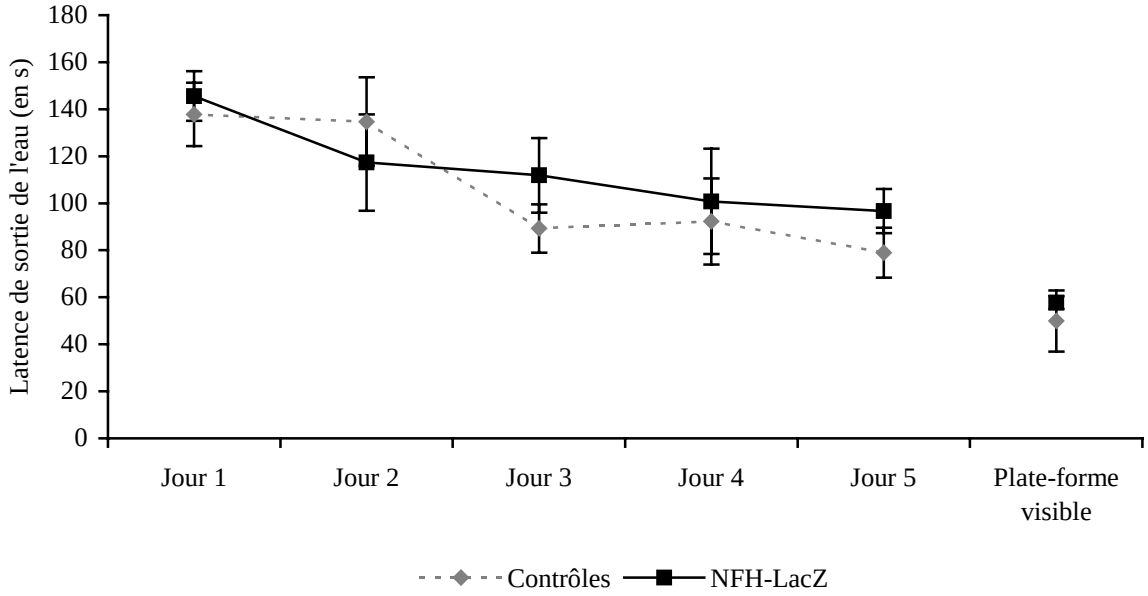

Figure 8 : **Piscine de Morris**. Latences moyennes (± erreurs standards moyennes) de sortie de l'eau chez les souris contrôles et les souris NFH-LacZ pendant la phase d'apprentissage et la phase avec plate-forme visible.