



HAL
open science

Validation d'un modèle murin de schizophrénie pour améliorer la recherche de nouveaux traitements : approche psychopharmacologique, en imagerie et en électrophysiologie

Solenn Percelay

► **To cite this version:**

Solenn Percelay. Validation d'un modèle murin de schizophrénie pour améliorer la recherche de nouveaux traitements : approche psychopharmacologique, en imagerie et en électrophysiologie. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2021. Français. NNT : 2021NORMC403 . tel-03213644

HAL Id: tel-03213644

<https://theses.hal.science/tel-03213644>

Submitted on 30 Apr 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité PHARMACIE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Validation d'un modèle murin de schizophrénie pour améliorer la recherche de nouveaux traitements. Approche psychopharmacologique, en imagerie et en électrophysiologie

**Présentée et soutenue par
Solenn PERCELAY**

**Thèse soutenue publiquement le 26/03/2021
devant le jury composé de**

Mme GWENAELLE LE PEN	Chargé de recherche HDR, INSERM	Rapporteur du jury
M. MICHAËL NAASSILA	Professeur des universités, Université Amiens Picardie Jules Verne	Rapporteur du jury
M. ALAIN LOUILOT	Chargé de recherche, Université de Strasbourg	Membre du jury
Mme VALENTINE BOUET	Maître de conférences HDR, Université Caen Normandie	Directeur de thèse
M. MICHEL BOULOUARD	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Co-directeur de thèse
Mme SONIA DOLLFUS	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Président du jury

Thèse dirigée par VALENTINE BOUET et MICHEL BOULOUARD, Mobilités : vieillissement, pathologie, santé - COMETE



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



Normandie de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



COMETE
UMR 1075 UNICAEN / INSERM

Valorisations scientifiques

Publications

- ❖ Jozet-Alves, C., **Percelay, S.**, & Bouet, V. (2019). Olfactory laterality is valence-dependent in mice. *Symmetry*, 11(9), 1129.
- ❖ **Percelay, S.**, Since, M., Lagadu, S., Freret, T., Bouet, V., & Boulouard, M. (2020). Antipsychotic lurasidone: Behavioural and pharmacokinetic data in C57BL/6 mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 172933.
- ❖ Bouet V., **Percelay S.**, Leroux E., Diarra B., Leger M., Delcroix N., Andrieux A., Dollfus S., Freret T., Boulouard M. (2020). A new 3-hit mouse model of schizophrenia built on genetic, early and late factors. *Schizophrenia Research*. 2020 <https://doi.org/10.1016/j.schres.2020.11.043> [Sous presse]
- ❖ **Percelay S.**, Billard J.-M., Freret T., Andrieux, A., Boulouard M., Bouet V. Functional dysregulations in CA1 hippocampal networks of a 3-hit mouse model of schizophrenia. [Soumis à *International Journal of Molecular Sciences*].
- ❖ **Percelay S.**, Turnbull N., Freret T., Bouet V., Boulouard M. Combination of MAP6 deficit, maternal separation and MK801 in female mice: a 3-hit animal model of neurodevelopmental disorder with cognitive deficits. [Soumis à *Behavioural Brain Research*]
- ❖ **Percelay S.**, Boulouard M., Jozet-Alves C., Bouet V. Assessing olfactory laterality in mice: new tool in preclinical psychiatric study. [En cours de préparation pour *Nature protocols*]

Congrès internationaux : communications affichées

- ❖ **Percelay, S.**, Freret, T., Diarra, B., Delcroix, N., Leroux, E., et al. (2018). Schizophrenia: validity of a 3-hit mouse model. 11th Federation of European Neuroscience Societies Forum of Neurosciences, Berlin, Germany. 2018. hal02135529.
- ❖ **Percelay, S.**, Bouet, V., Billard, J.-M., Freret, T., Boulouard, B. (2019). New 3-hit model of schizophrenia: behavioral and electrophysiological investigations. LARC-Neuroscience, Nantes, France.

Congrès nationaux : communications affichées

- ❖ **Percelay, S.**, Bouet, V., Freret, T., Boulouard, M. (2018). New mouse model of schizophrenia: "3 hits" model, genetic and environmental factors. XXIème journées de l'Ecole Doctorale normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement, Rouen, France. hal02135458.
- ❖ **Percelay, S.**, Bouet, V., Freret, T., Boulouard, M. (2019). Combining adverse factors to build a new 3-hit model of schizophrenia. XXIIème journées de l'Ecole Doctorale normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement, Caen, France. hal-02135476.
- ❖ Bouet, V., **Percelay, S.**, Turnbull, N., Freret, T., Boulouard, M. (2019). Mimicking schizophrenia symptoms in mice by combining factors: genetic, early environmental stress and late pharmacological conditioning. Société des Neusociences, Marseille, France.
- ❖ Menager, F., **Percelay, S.**, Freret, T., Boulouard, M., Billard, J.M., et al. (2019). Altering glutamate transmission in combination with an early post-natal stress to mimic schizophrenia in male and female mice. Journée Normande de Recherche Biomédicale, Caen, France. hal-02363095.

Médiation/vulgarisation scientifique

- ❖ **Mars 2018** : Participation au concours Ma Thèse en 180 secondes, finale normande. (medihal-02149301) <https://www.youtube.com/watch?v=HqKvHaStqGo>
- ❖ **Octobre 2018** : Gestion du projet et élaboration d'un stand pour la Fête de la science "Capacités du cerveau : L'homme, un animal comme les autres !"
- ❖ **Octobre 2018** : Article dans le journal Prisme n°8 (<http://recherche.unicaen.fr/actualites/prisme-le-journal-de-la-recherche/>) ; réalisation d'un portrait Bref
- ❖ **Janvier – juin 2019** : encadrement d'apprentis chercheurs (un binôme de collégien et lycéen accueillis 3h par mois au laboratoire)
- ❖ **Avril 2019** : Interview dans l'émission "Le Labo" de Radio Tou'Caen
- ❖ **Juin 2019** : congrès EcolySciences (présentation des travaux des apprentis chercheurs)
- ❖ **Octobre 2019** : Dispositif "Rencontre avec de jeunes chercheurs" (discussion avec des collégiens) dans le cadre de la Fête de la science
- ❖ **Octobre 2019** : MasterDocs (discussion avec des étudiants en master)
- ❖ **Décembre 2019** : Ambassadrice Déclics (rencontre avec des lycéens)
- ❖ **Edition 2020** : Eclairéuse Déclics
- ❖ **Février 2021** : Atelier des chercheur·se·s (rencontre avec des lycéens)
- ❖ **Edition 2021** : Participation à la 3^{ème} édition de Sciences en Bulles

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier vivement les membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail de thèse :

Madame Gwenaëlle Le Pen et Monsieur Mickael Naassila, qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être les rapporteurs de cette thèse.

Madame Sonia Dollfus et Monsieur Alain Louilot, qui m'ont fait l'honneur de participer à ce jury en tant qu'examineurs.

Un grand merci à mes directeurs de thèse, Valentine Bouet et Michel Boulouard, que je tiens en haute estime. Valentine, merci de m'avoir donné cette chance. Michel, merci d'avoir fait confiance à Valentine. Je vous dois à tous deux une grande part de la scientifique que je suis devenue.

Valentine, nous avons partagé beaucoup d'animaux durant ces quelques années, pour certains gustativement également... Je n'ai jamais oublié ton investissement pendant notre installation en Normandie, merci pour tout ce que tu as fait pour nous ! Sans ce soutien le beurre doux aurait eu raison de mon moral.

Michel, je crois que nous nous sommes finalement plutôt bien entendus malgré mon caractère breton et une certaine tendance à amplifier les clichés en présence d'autochtones normands. Merci pour ta disponibilité, tu as toujours pu te libérer pour consacrer du temps à mes travaux.

Vous cultivez tous deux une ambiance festive et amicale qui a rendu cette thèse extrêmement agréable, je n'aurais pas pu envisager de meilleures conditions que celles que vous m'avez fournies. Merci également de m'avoir permis de développer mon appétence pour la médiation scientifique, j'ai beaucoup appris grâce à cette liberté que vous m'avez donnée.

Je souhaite maintenant remercier Jean-Marie Billard, qui m'a tout appris en matière d'électrophy. Pour un chercheur qui a choisi de ne pas faire d'enseignement tu es très pédagogique et l'apprentissage réalisé en ta présence me sera à jamais profitable. Merci pour le partage de nos goûts musicaux, Dick Annegarn, Mireille et le père Ubu m'ont soutenu à plusieurs reprises durant cette thèse.

Thomas, merci pour les bières du vendredi soir et l'impulsion à présenter nos travaux lors des réunions du vendredi, même si tu auras peut-être remarqué qu'en tant que bretonne qui se respecte je n'ai jamais moins envie de faire quelque chose que lorsqu'on l'exige.

Merci à tous ceux qui ont partagé LE bureau des doctorants ! Du côté Ethos comme du côté Comete. Pierre, avec qui j'ai partagé mon premier congrès (et quel congrès !), Katia, Lou, Nawel, Guillaume (merci pour la découverte du Nautilus live), Elpidio, Eva, Candice et Caroline ! Un petit clin d'œil pour les repas-Kaamelot arrosés de jus de mangue pour essayer de rattraper le manque de culture d'un togolais.

Merci pour ces échanges interculturels, avec les doctorants déjà cités mais aussi tous ceux de Comete avec qui on a partagé quelques repas. Beaucoup de découvertes gustatives entre le Togo, l'Algérie, la Tunisie, la Russie, ... Et la Bretagne !

Merci à tous les membres du GMPc, toutes équipes de recherche confondues, pour ces bons moments scientifiques et festifs passés au laboratoire.

Merci bien sûr à tous les membres de Comete, pour tous ces échanges, rares mais agréables, pour les formations très instructives, pour le partage des connaissances scientifiques, pour les galettes des rois...

Hervé, merci pour ce vol parabolique ! Merci à tous ceux présents (Eric, Mathieu, Nicolas, Justin, Arslane, Martin, Marin) qui ont tous contribué à la bonne humeur générale.

Merci à ma famille, dont je me suis un peu séparée pendant cette thèse, je vais peut-être revenir sur la terre de mes ancêtres prochainement, qui sait ? Je pense évidemment à mes parents, qui ne s'attendaient sûrement pas à lire ces mots un jour quand je leur ai annoncé que je voulais faire une fac de psycho. Mais aussi à tous les membres de cette famille vaste et aimante. Je ne vous dirais jamais assez le bonheur que j'ai de vous avoir.

Un petit coucou de la terre à ma grand-mère, qui je pense aurais aimé être présente à ma soutenance, même si elle aurait eu du mal à se souvenir des premiers mots de chaque phrase en arrivant à la fin.

Merci Morgan, pour ta sérénité nonchalante. Ce trait de caractère rend toute chose plus facile à appréhender et à dépasser.

« All models are wrong, but some are useful. »

G. Box

Liste des abréviations

5HT	5-HydroxyTryptamine
ACP	Analyse en Composantes Principales
aCSF	artificial CerebroSpinal Fluid
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AMPA	Alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazole Propionic Acid
ANOVA	Analysis Of Variance
AP	AntiPsychotique
APA	Activité Physique Adaptée
C57BL/6	C57 BLack 6
CA	Corne d'Ammon
CB	CannaBinoïde
CBD	CannaBiDiol
CENOMEXA	Comité d'Ethique NOrmandie en Matière d'EXpérimentation Animale
CNV	Copy Number Variant
COWAT	Controlled Oral Word Association
CPF	Cortex Pré Frontal
CPT	Continuous Performance Task
CTQ	Childhood Trauma Questionnaire
CURB	Centre Universitaire de Ressources Biologiques
DISC1	Disrupted In SCHizophrenia 1
DMT	N,N-dimethyltryptamine
DSM	Diagnostic and Statistilal Manual of mental disorders
EEG	ElectroEncephaloGramme
ErbB4	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 4 ¹
FA	Fractional anisotropy
FDA	US Food and Drug Administration
FDR	False discovery rate
fEPSP	field Excitatory PostSynaptic Potentials
GABA	Gamma-AminoButyric Acid
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein

¹ Epidermal growth factor receptor nom dérivé d'un oncogène viral homologue erythroblastic leukemia viral oncogene

GWASs	Genome-Wide Association Studies
HD	Hippocampe Dorsal
HFS	High Frequency Stimulation
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HVLT	Hopkins Verbal Learning Test
HVLT	Hippocampe Ventral
IL	Indice de Latéralité
IRM	Imagerie à Résonance Magnétique
KO	Knock-Out
LCR	Liquide Céphalo Rachidien
LSD	Acide D-lysergique ²
LTP	Long term potentiation
MAM	MethylAzoxyMethanol acetate
MAP	Microtubule-Associated Protein
MD	Mean Diffusivity
MHC	Major Histocompatibility Complex
MK801	5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine
MMN	MisMatch Negativity
MS	Maternal Separation
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NPAS3	Neuronal PAS domain protein 3
NRG	NeuReGulin
Nurr 1	Nuclear receptor related 1
PAG	PeriAqueductal Gray
PANSS	Positive and Negative Syndrome Scale
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCP	Phencyclidine
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCT	Potentialisation à Court Terme
PGES	ProstaGlandin E Synthase

² Issu de l'allemand LysergSäureDiethylamid.

PLG	L-prolyl-L-leucyl-glycinamide
PLT	Potentialisation à Long Terme
PND	Post-Natal Day
PPF	Pulse-Paired-Facilitation
PPI	PrePulse Inhibition
RD	Radial Diffusivity
RR	Risque Relatif
RSPv	RetroSPlenial area, ventral part
rTMS	repetitive Transcranial Magnetic Stimulation
SNP	Single Nucleotide Polymorphisme
SR	Sérine Racémase
STP	Short Term Potentiation
TBS	Theta Burst Stimulation
THC	Δ -9-TétraHydroCannabinol
VA	Volée Afférente
WAIS	Wechsler Adult Intelligence Scale
WISC	Wechsler Intelligence Scale for Children
WT	Wild Type

Liste des figures

Figure 1 : Effet du genre sur les catégories de symptômes.....	4
Figure 2 : Effet du genre sur l'âge d'apparition des symptômes.....	5
Figure 3 : Prévalence des tentatives de suicide chez les schizophrènes.....	7
Figure 4 : Comparaison des DSM IV et V	9
Figure 5 : Vue générale des facteurs génétiques et environnementaux	10
Figure 6 : Prévalence génétique.....	11
Figure 7 : Facteurs exogènes et endogènes de risque périnatal	14
Figure 8 : Items du CTQ.....	18
Figure 9 : Traumatismes durant l'enfance.....	20
Figure 10 : Origine multifactorielle	24
Figure 11 : Modèle d'étiologie à 3 facteurs	24
Figure 12 : PANSS	29
Figure 13 : Images d'IRM anatomique	32
Figure 14 : Principe de l'imagerie de diffusion	34
Figure 15 : Images d'IRM fonctionnel : tâche de mémoire	35
Figure 16 : Images d'IRM fonctionnel : réseau de repos.....	37
Figure 17 : Voies de neurotransmission	40
Figure 18 : Dates de mise sur le marché des antipsychotiques.....	45
Figure 19 : Propriétés pharmacodynamiques réceptorielles des antipsychotiques	47
Figure 20 : Effets secondaires des antipsychotiques	47
Figure 21 : Validités des modèles animaux	50
Figure 22 : Modèle multifactoriel à 2 facteurs.	51
Figure 23 : Éléments clefs du phénotype	56
Figure 24 : Open field et actimétrie.	73
Figure 25 : Tests d'approche/évitement et de préférence au sucre.....	76
Figure 26 : Tests de reconnaissance d'objet et de place, d'alternance spontanée, de piscine de Morris et de la boîte noire et blanche	78
Figure 27 : Corner test et test de la téralité olfactive	80
Figure 28 : Test du PPI.	81
Figure 29 : Electrophysiologie : préparation des tranches.....	83
Figure 30 : Electrophysiologie : poste de travail.....	85
Figure 31 : Electrophysiologie : potentiel extracellulaire	86
Figure 32 : Electrophysiologie : PPF	87
Figure 33 : Electrophysiologie : STP et LTP	88
Figure 34 : Immunohistochimie	91
Figure 35 : Imagerie.	92
Figure 36 : Arbre décisionnel des tests statistiques utilisés.....	93
Figure 37 : Etude préliminaire : effectifs et design expérimental	158
Figure 38 : Etude préliminaire : PPI.....	160
Figure 39 : Article 5 : photographies de l'étude en immunohistochimie	178
Figure 40 : Article 5 : résultats de l'étude en immunohistochimie	179

Liste des tableaux

Tableau 1 : Taux de consommation de drogues	22
Tableau 2 : Déficits cognitifs	28
Tableau 3 : Article 1 : comparaison des groupes 2-hit et 3-hit.....	156
Tableau 4 : Article 5 : effectifs des données complémentaires	178
Tableau 5 : Synthèse des principaux éléments associés au phénotype de schizophrénie.....	202

Table des matières

Valorisations scientifiques.....	
Médiation/vulgarisation scientifique.....	
Remerciements.....	
Liste des abréviations.....	
Liste des figures	
Liste des tableaux.....	
Table des matières.....	
1. Introduction.....	1
1.1 Avant-propos : la schizophrénie	3
1.2 Les caractéristiques de la schizophrénie	3
1.2.1 Prévalence homme / femme.....	3
1.2.2 Age d'apparition	5
1.2.3 Risques de suicide.....	6
1.2.4 Les types de schizophrénies.....	8
1.3 L'étiologie.....	10
1.3.1 Prévalences génétiques	11
1.3.2 Facteurs environnementaux	13
1.3.2.1 Facteurs environnementaux prénataux.....	13
1.3.2.2 Facteurs environnementaux postnataux	17
1.3.2.3 Facteurs environnementaux tardifs	20
1.3.3 Facteurs épigénétiques	23
1.4 Les symptômes comportementaux (triade)	25
1.4.1 Symptômes positifs.....	27
1.4.2 Symptômes négatifs	27
1.4.3 Déficits cognitifs	28
1.4.4 Autres symptômes.....	28
1.5 Les atteintes physiopathologiques.....	31
1.5.1 Atteintes anatomiques	31
1.5.2 Asymétrie	33
1.5.3 Connectivité cérébrale	33
1.5.4 Neurotransmission	38
1.5.4.1 Système dopaminergique	38
1.5.4.2 Système glutamatergique	39

1.5.4.3	Système GABAergique.....	41
1.5.4.4	Système sérotoninergique	41
1.5.5	Plasticité cérébrale	41
1.5.5.1	Neurogenèse.....	42
1.5.5.2	Plasticité fonctionnelle.....	42
1.5.6	Inflammation.....	43
1.6	Traitements.....	43
1.6.1	Traitements non médicamenteux	43
1.6.1.1	Thérapie électro convulsive	44
1.6.1.2	Stimulation Magnétique Trans-crânienne (rTMS).....	44
1.6.1.3	Activité physique	44
1.6.1.4	Psychothérapie	44
1.6.2	Traitements médicamenteux (antipsychotiques).....	45
1.7	Les modèles animaux	47
1.7.1	Les modèles animaux de schizophrénie.....	49
1.7.2	Validité d'apparence.....	52
De 1970 à 1980 :	symptômes de type positif	53
De 1980 à 1990 :	élargissement de la gamme des symptômes comportementaux	53
De 1990 à 2000 :	l'inhibition sensorielle	54
De 2000 à 2010 :	études mécanistiques	54
De 2010 à aujourd'hui :	vers des caractérisations comportementales et physiologiques de plus en plus larges	55
1.7.3	Validité de construction.....	56
De 1970 à 1980 :	les premières études.....	56
De 1980 à 1990 :	L'hypothèse neurodéveloppementale	57
De 1990 à 2000 :	l'hippocampe, structure cible	57
De 2000 à 2010 :	l'hypothèse d'interactions gènes x environnement	58
De 2010 à aujourd'hui :	les modèles multifactoriels	58
1.7.4	Validité de prédiction	59
De 1970 à 1980 :	clozapine et halopéridol.....	60
De 1980 à 1990 :	effets secondaires.....	60
De 1990 à 2000 :	nouvelles cibles	60
De 2000 à 2010 :	symptômes négatifs et déficits cognitifs.....	61
De 2010 à aujourd'hui :	comparaisons antipsychotiques typiques et atypiques.....	61
1.8	Objectifs	63
2.	Méthodologie générale.....	67
2.1	Animaux	69

2.1.1	Reproduction et modification génétique	69
2.1.2	Hébergement	69
2.1.3	Ethique	70
	L'éthique en expérimentation animale.....	70
2.1.4	Génotypage	71
2.1.5	Séparation maternelle.....	71
2.1.6	Traitements pharmacologiques	71
	2.1.6.1 THC.....	71
	2.1.6.2 MK801.....	72
	2.1.6.3 Lurasidone	72
2.2	Tests comportementaux	72
2.2.1	Tests mesurant les symptômes de type positif	73
	2.2.1.1 Open field.....	73
	2.2.1.2 Actimétrie.....	73
2.2.2	Tests mesurant les symptômes de type négatif	74
	2.2.2.1 Tests de comportement social (interaction sociale et reconnaissance sociale)	74
	2.2.2.2 Test de préférence au sucrose (Eagle et al., 2016)	75
2.2.3	Tests mesurant les performances cognitives	76
	2.2.3.1 Reconnaissance d'objet	76
	2.2.3.2 Reconnaissance de place	77
	2.2.3.3 Alternance spontanée	77
	2.2.3.4 Piscine de Morris (Brandeis et al., 1989; Morris, 1981)	77
	2.2.3.5 Boîte noire et blanche (LE810 Letica, Bioseb®, France)	78
2.2.4	Tests mesurant la latéralité motrice et sensorielle.....	79
	2.2.4.1 Test du coin	79
	2.2.4.2 Latéralité olfactive.....	79
2.2.5	Test mesurant l'inhibition du sursaut	80
2.3	Electrophysiologie extracellulaire	81
2.3.1	Préparation des coupes d'hippocampe	81
2.3.2	Enregistrement des potentiels de champs extracellulaires.....	82
2.3.3	Protocoles de stimulation	85
	2.3.3.1 Etude de la transmission synaptique basale ou AMPA.....	85
	2.3.3.2 Etude de la plasticité synaptique	87
2.4	Immunohistochimie.....	89
2.4.1	Perfusion / fixation.....	89
2.4.2	Préparation des coupes.....	89
2.4.3	Marquage des neurones positifs à parvalbumine	89
2.4.4	Montage et scan des lames.....	90

2.4.5	Extraction des zones d'intérêt et comptage des neurones à parvalbumine	90
2.5	Imagerie.....	91
2.6	Analyses statistiques.....	92
3.	Résultats.....	95
3.1	Publications.....	97
3.2	Evaluation de la validité d'apparence	99
3.2.1	Article 1 : A New 3-Hit Mouse Model of Schizophrenia Built on Genetic, Early and Late Factors.....	100
3.2.1.1	Supplementary results 1	111
3.2.1.2	Supplementary results 2	112
3.2.1.3	Résumé de l'article 1.....	113
3.2.2	Article 2 : Functional dysregulations in CA1 hippocampal networks of a 3-hit mouse model of schizophrenia	114
3.2.2.1	Résumé de l'article 2.....	127
3.2.3	Article 3 : Olfactory laterality is valence-dependent in mice	128
3.2.3.1	Résumé de l'article 3.....	141
3.2.4	Article 4 : Assessing olfactory laterality in mice: new tool in preclinical psychiatric study.....	142
3.2.4.1	Résumé de l'article 4.....	153
3.2.5	Résumé de l'évaluation de la validité d'apparence.....	154
3.3	Evaluation de la validité de construction	156
3.3.1	Étude préliminaire.....	158
3.3.1.1	Résumé de l'étude préliminaire	161
3.3.2	Article 5 : Combination of MAP6 deficit, maternal separation and MK801 in female mice: a 3-hit animal model of neurodevelopmental disorder with cognitive deficits.....	162
3.3.2.1	Résultats complémentaires.....	178
3.3.2.2	Résumé de l'article 5.....	180
3.3.3	Poster : Altering glutamate transmission in combination with an early post-natal stress to mimic schizophrenia in male and female mice	181
3.3.3.1	Résumé du poster	183
3.3.4	Résumé de l'évaluation de la validité de construction.....	184
3.4	Les modalités d'une validation de prédiction.....	186
3.4.1	Article 6 : Antipsychotic lurasidone: Behavioural and pharmacokinetic data in C57BL/6 mice.....	187
3.4.1.1	Résumé de l'article 6.....	196
4.	Discussion générale.....	199
4.1	Validité d'apparence du modèle 3-hit.....	201
4.2	Validité de construction	207
4.2.1	Facteur génétique	207

4.2.1.1 MAP6.....	207
4.2.1.2 DISC1.....	208
4.2.1.3 SR.....	208
4.2.2 Facteur environnemental précoce : la séparation maternelle	209
4.2.3 Facteur pharmacologique tardif	211
4.2.4 Interactions entre facteurs	212
4.3 Validité de prédiction.....	214
4.4 Qu'est-ce qu'un bon modèle de schizophrénie ?.....	217
4.4.1 Des constructions de plus en plus complexes pour des résultats de plus en plus prometteurs ?.....	217
4.4.2 Et si on cultivait la variabilité ?	218
4.4.3 Est-ce que les symptômes psychiatriques peuvent être réellement modélisés chez le rongeur ?	224
4.4.3.1 Oui : avec certains dispositifs	224
4.4.3.2 Les limites du modèle souris.....	225
4.4.3.3 Les limites des modèles rongeurs	226
4.5 Les 3R et le modèle 3-hit	227
4.6 Perspectives	228
5. Conclusion	232
Bibliographie.....	236

1. Introduction

1. Introduction

1. Introduction

1.1 Avant-propos : la schizophrénie

Le terme "schizophrénie" provient du grec « σχίζειν » (*schizein*), signifiant fractionnement, et « φρήν » (*phrèn*), désignant l'esprit. C'est le psychiatre suisse Eugen Bleuler qui l'utilise en premier et qui caractérise la pathologie en 1911.

La schizophrénie est une maladie psychiatrique fortement invalidante qui touche entre 0,7 et 1% de la population mondiale. De nombreux schizophrènes font au moins une tentative de suicide et des hospitalisations sont souvent nécessaires (Krebs, 2020), ce qui implique un fort coût sociétal concernant cette pathologie. Elle se distingue des autres psychoses notamment par un déclenchement tardif des symptômes, au moment de l'adolescence. Les manifestations de cette maladie sont multiples et variables d'un patient à l'autre, ainsi le terme "spectre de la schizophrénie" apparaît donc maintenant dans le DSM V (« *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* »), manuel de référence qui est parfois utilisé pour aider au diagnostic de la maladie (American Psychiatric Association, 2013).

1.2 Les caractéristiques de la schizophrénie

1.2.1 Prévalence homme / femme

Le ratio de prévalence homme / femme pour la schizophrénie est aux environs de 1,42 (Aleman et al., 2003; Lee et al., 2018). Il existe des différences homme / femme dans l'âge d'apparition qui est plus tardif chez les femmes, ainsi que dans le type et la gravité des symptômes. Les hommes ont en effet des symptômes plus sévères que les femmes, et cette accentuation de la sévérité des symptômes chez les hommes est plus prononcée pour les symptômes négatifs (voir Figure 1).

1. Introduction

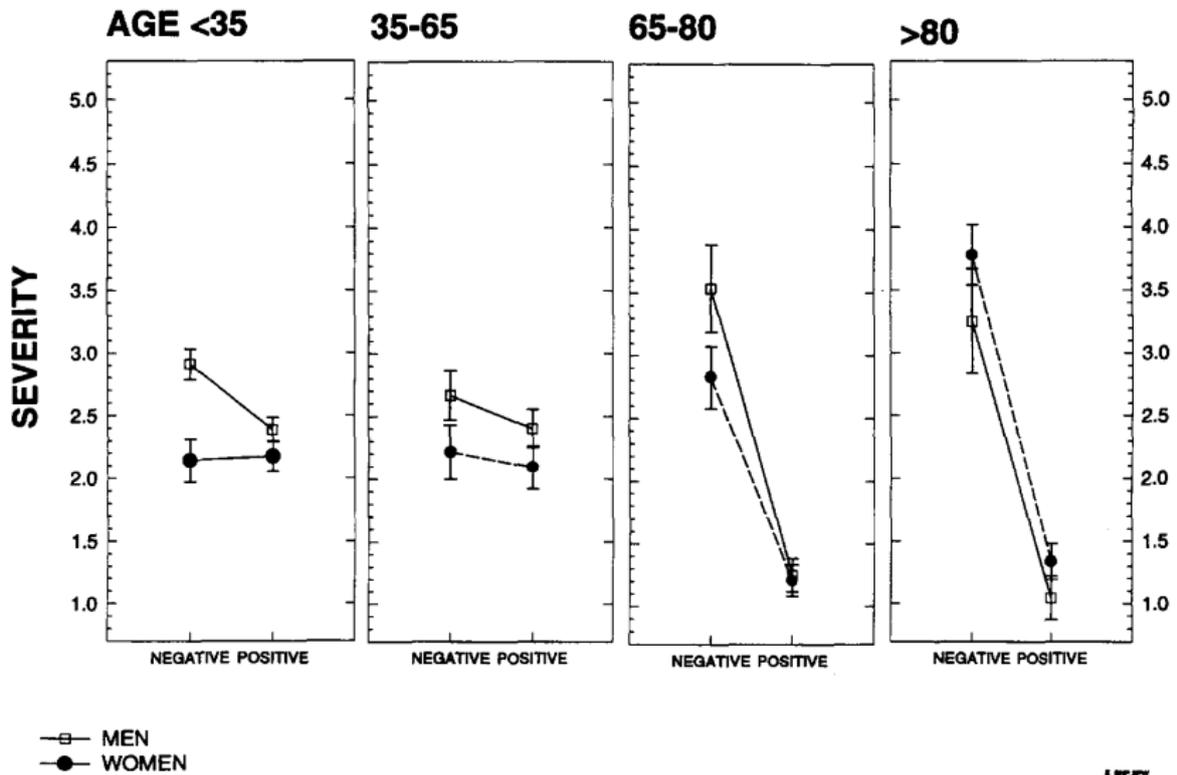


Figure 1 : Gravité des symptômes positifs et négatifs de schizophrénie en fonction de l'âge et du genre. Issu de Gur et al., 1996.

Les pics d'âge d'apparition des premiers symptômes correspondent à la puberté pour les hommes, à la puberté et la ménopause pour les femmes (voir Figure 2).

1. Introduction

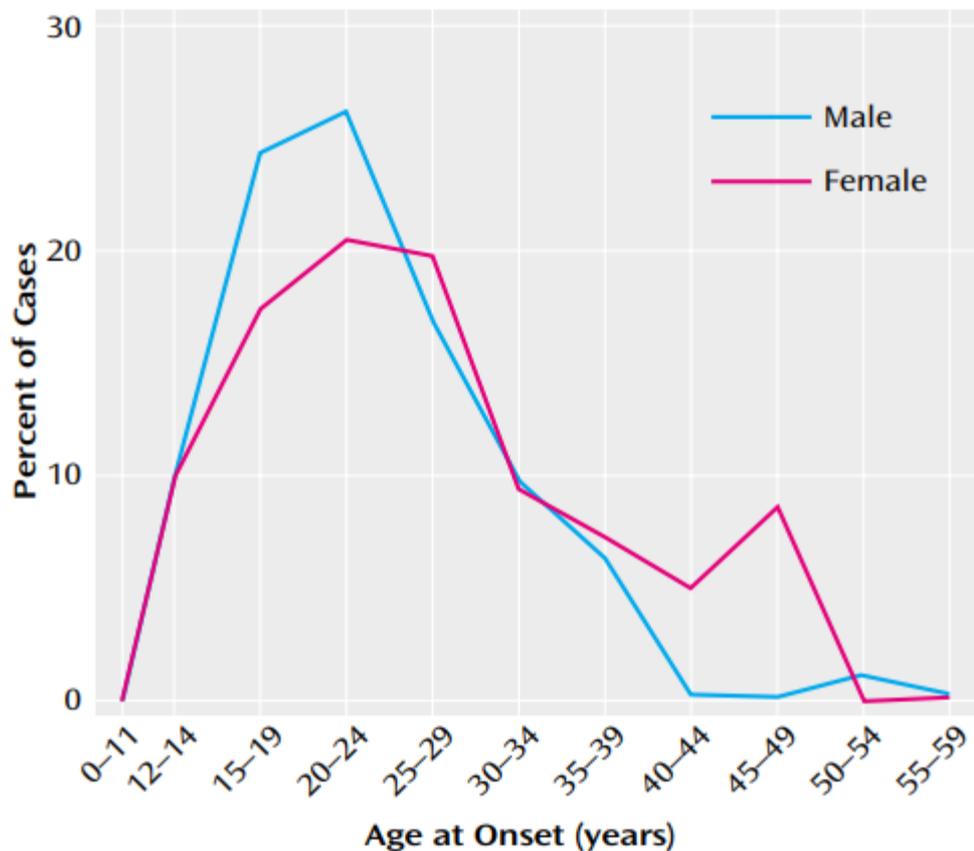


Figure 2 : Âge d'apparition des premiers symptômes chez les schizophrènes en fonction du genre. Issu de Hafner et al., 1993; Stevens, 2002.

Les hommes et les femmes ne sont donc pas égaux face à la schizophrénie, en effet il existe des différences développementales liées au genre, et des différences psychosociales (ex : davantage de consommation de drogues chez les hommes (Seeman, 2019)).

1.2.2 Age d'apparition

La schizophrénie se déclare le plus souvent à l'adolescence, entre 15 et 25 ans. Cette période s'étire jusqu'à 35 ans pour les femmes. La schizophrénie débute souvent sous une forme atténuée, avec des symptômes négatifs et cognitifs comme un retrait social et un déclin cognitif. Ces premiers symptômes peuvent précéder de plusieurs années l'apparition de symptômes positifs (Fusar-Poli et al., 2012; Krebs, 2020).

Définir l'âge d'apparition de la maladie n'est donc pas évident. La première hospitalisation est un critère utilisé pour définir cet âge, mais elle est influencée par le type de symptômes. L'apparition de bouffées délirantes ou d'un comportement agressif est synonyme d'hospitalisations quasi systématiques, alors que les troubles cognitifs ou les symptômes

1. Introduction

dépressifs apparaissent de manière plus insidieuse et le délai entre les premières observations des proches et l'hospitalisation peut être de plusieurs années. Ce moment de première hospitalisation est également modulé par la capacité des proches à détecter les symptômes et à les considérer comme tels (Delisi, 1992). Une phase prodromique³ est parfois détectable chez des enfants, cependant les ratios d'évolution vers une schizophrénie avérée après avoir détecté ces symptômes précoces ne dépassent pas 50% (Broome et al., 2005).

1.2.3 Risques de suicide

Les patients atteints de schizophrénie se distinguent de la population par un risque de mort prématurée 3,7 fois plus important que la population générale et leur espérance de vie est diminuée de 16 ans pour les femmes et de 19 ans pour les hommes en comparaison avec la population générale. Les suicides sont en grande partie responsables de ces chiffres. Dans la population mondiale, le taux de suicide est de 11,4 pour 100 000 personnes, avec des disparités entre les pays, le moins touché étant l'Arabie Saoudite avec un taux de 0,4 et le plus touché le Guyana avec un taux de 44,2 (OMS, 2014). Globalement, le taux de suicide chez les schizophrènes est d'environ 5% (Hor & Taylor, 2010; Palmer et al., 2005). Le risque de suicide augmente lorsque qu'une tentative a déjà échoué. Le taux de tentatives de suicide chez les schizophrènes est de 1,9% à Taiwan (taux le plus bas) et de 55,1% aux Etats Unis (taux le plus élevé). De nombreux facteurs influent sur le risque de tentative de suicide. Les symptômes dépressifs, une histoire familiale de suicide, les hospitalisations multiples, la consommation de drogue et des symptômes psychotiques plus sévères sont des facteurs augmentant le risque de tentative de suicide chez les schizophrènes. La méta-analyse de Lu et al. en 2019 a montré un taux de tentatives de suicide global de 26,8%. Lors de la phase prodromique le taux est de 7,5%, et le moment du déclenchement de la maladie est le plus propice aux suicides avec un taux de 45,9%.

³ Dans le cadre de la schizophrénie, une phase prodromique se caractérise par des symptômes moins intenses, moins fréquents et / ou moins durables que lorsque la pathologie est établie. Ces symptômes sont peu spécifiques (changement de comportement et d'intérêt, retrait social, arrêt des activités habituelles, idées étranges comme le sentiment de télépathie, idées de persécution ou encore préoccupations mystiques ou philosophiques marquées, perceptions altérées...) et ils sont associés à des difficultés cognitives (Krebs, 2020).

1. Introduction

La Figure 3 montre l'hétérogénéité observée entre les études et un taux de suicide plus élevé lors du déclenchement de la maladie.

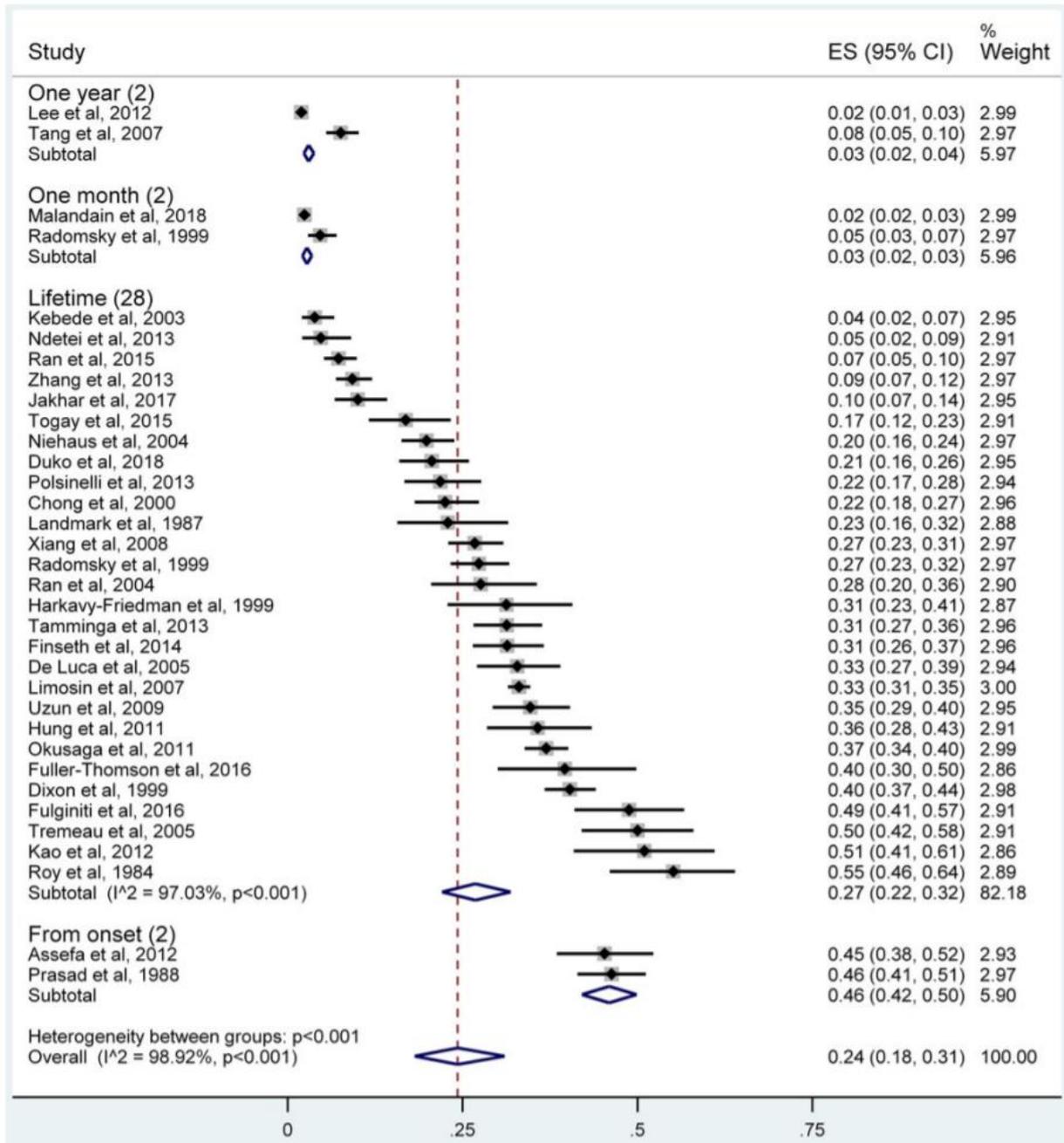


Figure 3 : Prévalence des tentatives de suicide chez les schizophrènes, durant un an, un mois, la totalité de la vie et au moment du déclenchement de la maladie. Les Odds ratio sont calculés pour chaque étude et leur intervalle de confiance (95%) est indiqué par les lignes horizontales. La ligne verticale en pointillés représente une absence de risque plus élevé pour les schizophrènes, à gauche de cette ligne une diminution du risque et à droite une augmentation du risque de suicide chez les schizophrènes. Issu de Lu et al., 2019.

1.2.4 Les types de schizophrénies

La schizophrénie se manifeste par des symptômes divers qui présentent une grande variabilité entre les patients (Harding, 1988). Les psychiatres se basent sur différents outils pour établir le diagnostic de schizophrénie. Le DSM recense les troubles mentaux, leurs symptômes, et les critères de nombre, de gravité, de durée de ces symptômes nécessaires pour poser le diagnostic. La dernière version en date de ce manuel est le DSM-V publié en 2013. La définition de la schizophrénie y est modifiée par rapport à la version précédente datant de 2000 (De Beaurepaire, 2014). Les symptômes caractéristiques évoluent peu entre les deux versions du DSM, à l'exception de la précision dans le DSM V portant sur l'obligation d'observer au moins l'un des symptômes suivants : délires, hallucinations ou discours désorganisé, ce qui n'était pas nécessaire pour poser le diagnostic dans le DSM IV, l'identification d'une catatonie et de symptômes négatifs pouvant suffire. Une note était ajoutée dans le DSM IV sur des symptômes précis pouvant suffirent en eux-mêmes à poser le diagnostic (voir Figure 4).

Dans le DSM IV, la catégorie de la schizophrénie s'intitule « *Schizophrenia and other psychotic disorders* », le terme « *spectrum* » a été ajouté dans le DSM V « *Schizophrenia spectrum and other psychotic disorders* » (voir Figure 4), attestant de la préoccupation grandissante de prendre en compte l'hétérogénéité de cette pathologie (Center for Behavioral Health Statistics and Quality, 2016). La schizophrénie fait partie de la catégorie qui inclut également la schizotypie, le trouble délirant, le trouble psychotique bref, et le trouble schizophréniforme.

1. Introduction

DSM-IV	DSM-5
Disorder Class: Schizophrenia and Other Psychotic Disorders	Disorder Class: Schizophrenia Spectrum and Other Psychotic Disorders
A. <i>Characteristic symptoms</i> : Two (or more) of the following, each present for a significant portion of time during a 1-month period (or less if successfully treated):	A. Two (or more) of the following, each present for a significant portion of time during a 1-month period (or less if successfully treated). At least one of these must be (1), (2), or (3):
1. delusions	
2. hallucinations	
3. disorganized speech (e.g., frequent derailment or incoherence)	1–4. SAME
4. grossly disorganized or catatonic behavior	
5. negative symptoms (i.e., affective flattening, alogia, or avolition)	5. Negative symptoms (i.e., diminished emotional expression or avolition).
Note: Only one Criterion A symptom is required if delusions are bizarre or hallucinations consist of a voice keeping up a running commentary on the person's behavior or thoughts, or two or more voices conversing with each other.	

Figure 4 : Comparaison des DSM IV et V sur le premier critère de diagnostic : les symptômes caractéristiques. Issu du Center for Behavioral Health Statistics and Quality, 2016.

La classification de la schizophrénie, ou des schizophrénies, fait l'objet de réflexions actuelles sous-tendues par les avancées du monde scientifique que ce soit sur les plans clinique et / ou préclinique. La mise en évidence de cette variabilité entre les patients est ancienne ; Bleuler, dans son traité qui décrit la pathologie en 1911, mettait déjà l'accent sur la variabilité des symptômes et la difficulté de classer les patients dans une ou plusieurs catégories (Bleuler, 1911). En 1988, le professeur en psychiatrie Harding a également abordé ce sujet dans une revue (Harding, 1988). Plus récemment, le professeur Dollfus dans son ouvrage intitulé « Les schizophrénies », ne considère pas la schizophrénie comme une maladie unique mais comme un groupe d'affections mentales (Dollfus, 2019).

1. Introduction

1.3 L'étiologie

Bien que de nombreux facteurs aient été montrés comme jouant un rôle dans la pathogénie de la schizophrénie (voir Figure 5), son étiologie exacte est encore à présent inconnue.

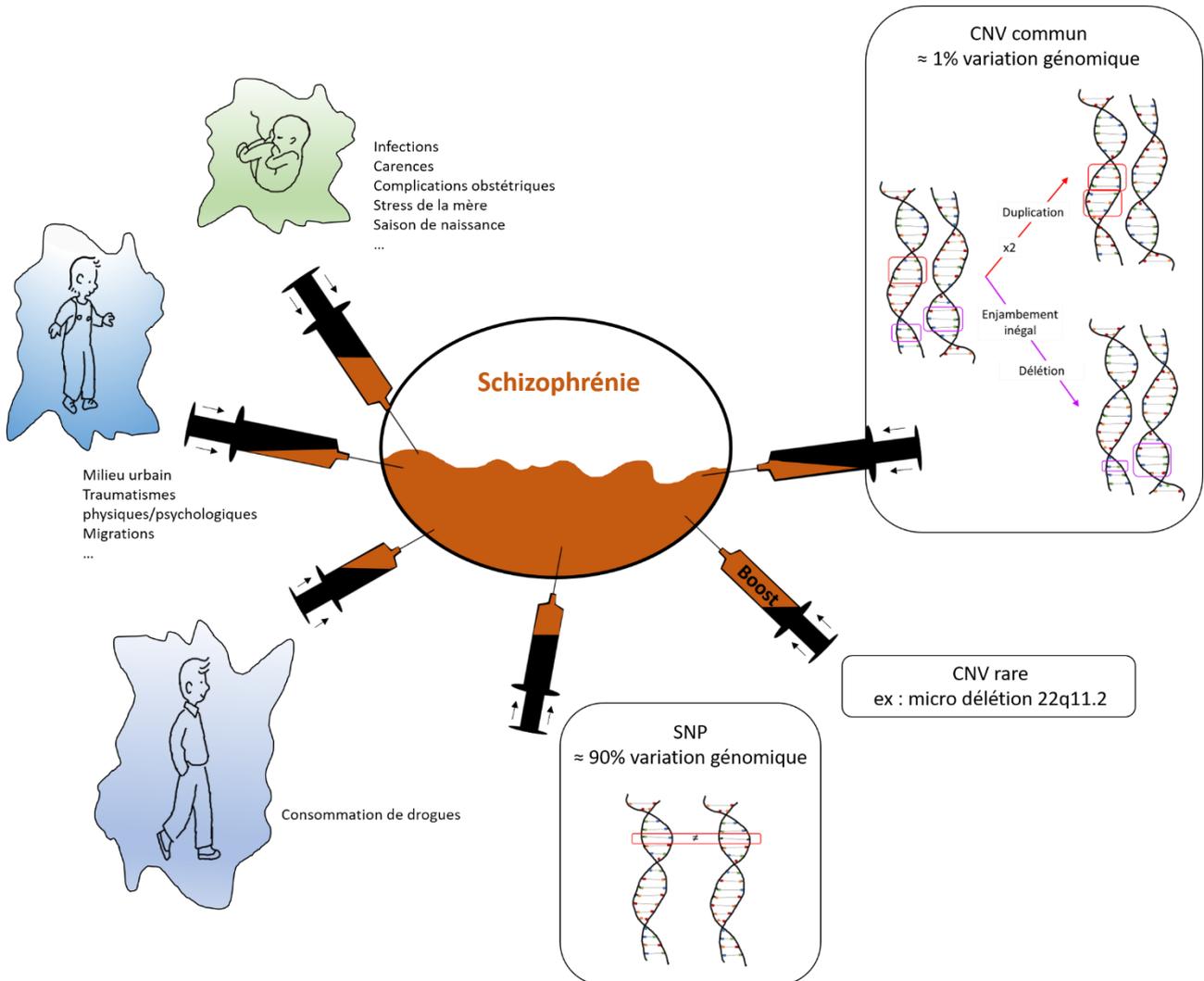


Figure 5 : Vue générale des facteurs environnementaux et génétiques impliqués dans la schizophrénie. A gauche, les facteurs environnementaux avec de haut en bas l'âge périnatal, l'enfance et l'adolescence. A droite, les modifications génétiques avec de haut en bas les « Copy Number Variant » (CNV) communs puis rares (associés à la pathologie au travers des études d'hybridation génomique comparatives) et les « Single Nucleotide Polymorphisme » (SNP) (associés à la schizophrénie via les études GWAS pour « Genome-Wide Association Studies »).

1.3.1 Prévalences génétiques

L'étude du lien entre les gènes et la schizophrénie a débuté par le constat que la pathologie était retrouvée plus fréquemment chez les membres d'une même famille (voir *Figure 6*) (Schultz et al., 2007). Des études réalisées sur des jumeaux ont pu étayer cette hypothèse en différenciant l'apport génétique de l'apport environnemental avec des individus élevés par leur famille biologique et leurs jumeaux adoptés (Tsuang et al., 1999). Avoir un cousin germain touché par la maladie induit un risque d'être touché de 2%, alors que si c'est un jumeau homozygote, le risque est de 49%, ce qui démontre une part génétique évidente mais également une part environnementale puisque le risque n'est pas de 100% en ayant un jumeau homozygote atteint de la maladie (voir *Figure 6*, Gottesman, 1991).

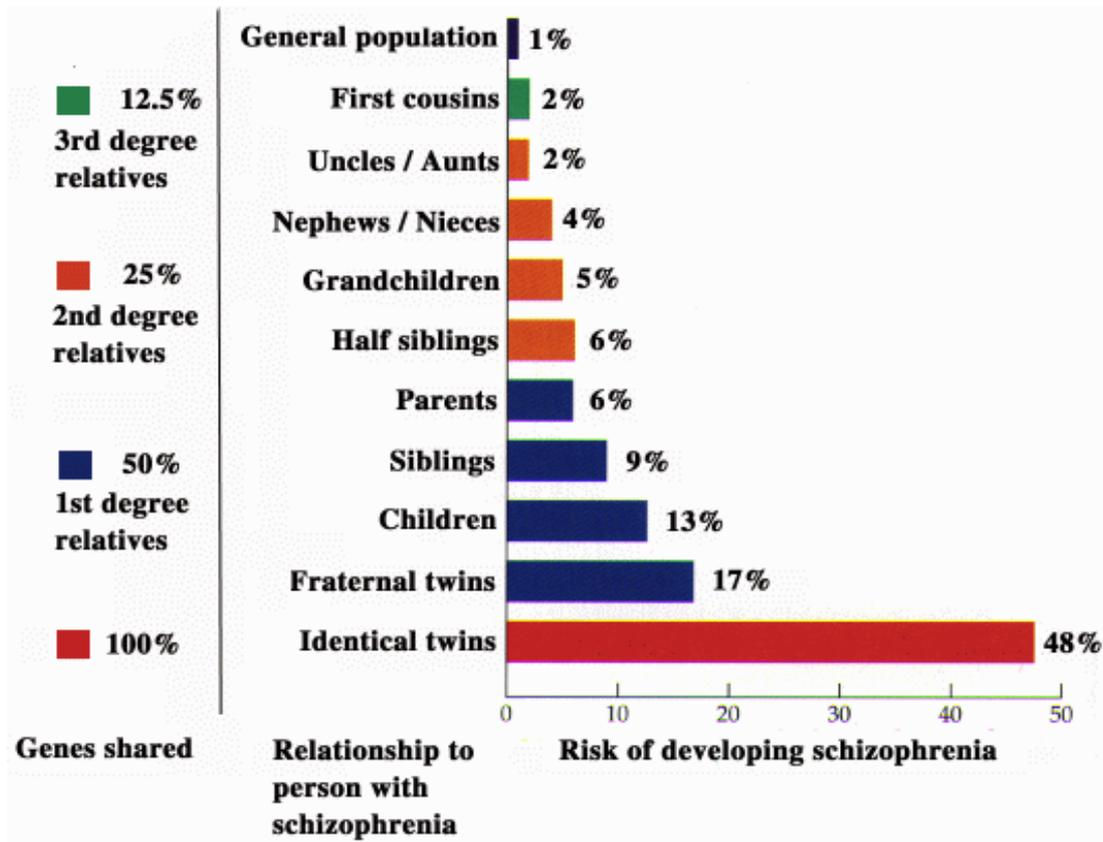


Figure 6 : Risque de développer une schizophrénie en fonction de la quantité de gènes partagés. Issu de Gottesman, 1991.

La part génétique de cette pathologie étant démontrée, de nombreuses études ont tenté de définir précisément quels éléments du génome étaient impliqués. Pour cela, des études pangénomiques d'association GWAS (« *Genome-Wide Association Study* ») et des études d'hybridation génomique comparative ou CGH array (« *Comparative Genomic Hybridation array* ») ont été mises en œuvre pour identifier respectivement des *loci* porteurs de SNP

1. Introduction

(« *Single Nucleotide Polymorphisme* ») et de CNV (« *Copy Number Variant* »). Le nombre de ces variations génétiques est accru chez les schizophrènes (International Schizophrenia Consortium, 2009; Smeland et al., 2020), ainsi que la présence de CNV *de novo* (qui n'ont pas été transmis) (Vorstman et al., 2018; Xu et al., 2008). De plus, certains CNV rares sont hautement associés à la schizophrénie, c'est par exemple le cas de la micro-délétion 22q11.2 qui augmente d'environ 20 fois le risque de schizophrénie (Bassett et al., 2017; Cleynen et al., 2020; McDonald-McGinn et al., 2017).

A l'heure actuelle, il existe de nombreux gènes identifiés comme augmentant le risque de développer la pathologie, cependant aucun gène n'est identifié comme systématiquement présent chez les patients schizophrènes.

Les études épidémiologiques tentent d'établir des liens directs entre symptômes et gènes. Cependant, définir un symptôme n'est pas aisé et plusieurs facteurs peuvent faire évoluer ses définitions (différentes versions du DSM, variabilité inter-cliniciens, différents types de questionnaire).

Malgré l'hétérogénéité des observations faites sur la prévalence génétique de la schizophrénie, certaines grandes lignes peuvent en être tirées. En effet, de nombreux gènes de vulnérabilité qui ont été mis en évidence ont une action sur les récepteurs NMDA, ce qui sous-tend une implication du système de neurotransmission glutamatergique dans cette pathologie (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomic, 2014). Cette hypothèse va être étayée par d'autres approches comme l'imagerie et l'histologie (Balu, 2016).

Parmi les gènes identifiés dans les études GWAS, certains sont impliqués dans la production de facteurs de croissance, les mécanismes d'inflammation, la modulation du rythme circadien, mais également dans certains systèmes de neurotransmission comme les systèmes dopaminergique, glutamatergique, sérotoninergique et GABAergique (Polygenicpathways, 2011). Des gènes codants pour l'architecture neuronale sont également impliqués, comme le gène MAP6 (Shimizu et al., 2006) qui code pour la stabilisation des microtubules et joue un rôle dans la plasticité synaptique et le développement cérébral (Deloulme et al., 2015). Le gène permettant d'encoder la synthèse de la serine racémase (enzyme impliquée dans la transmission glutamatergique) a également été associé à une légère augmentation du risque de schizophrénie (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomic, 2014). Le gène codant pour la sous-unité alpha7 du récepteur nicotinique (chromosome 15q13-14) serait par ailleurs

1. Introduction

impliqué dans le défaut d'inhibition neuronale (défaut d'inhibition de l'onde P50⁴ des potentiels évoqués auditifs (Houy & Thibaut, 2007) ou comportementale (inhibition du réflexe de sursaut) (Callahan et al., 2014; Freedman et al., 2001; Li et al., 2019; Potasiewicz et al., 2017).

1.3.2 Facteurs environnementaux

De nombreux facteurs de risque environnementaux, décrits ci-après, ont été démontrés lors d'études épidémiologiques. Une part importante de ces risques est centrée sur le stress *in utero*, périnatal, ou durant la petite enfance. Ces facteurs de risques comprennent des atteintes directes du fœtus ou du bébé (infection prénatale, carences nutritionnelles, complications obstétriques, comme l'hypoxie par exemple) mais aussi de la mère (stress de la mère *via* différents facteurs : décès du père, guerre, inondations *etc.*) (Debnath et al., 2015). Il existe également des facteurs de risque au moment de l'enfance et de l'adolescence (abus physiques ou sexuels, vie en milieu urbain, migration, consommation de drogues) (Davies et al., 2020; Mäki et al., 2005; Stilo & Murray, 2019).

1.3.2.1 Facteurs environnementaux prénataux

Dans une revue de la littérature publiée en 2015, Debnath *et al.* décrivent les facteurs de risque prénataux associés à la schizophrénie (Debnath et al., 2015). Ils y sont séparés en deux groupes, les facteurs endogènes et les facteurs exogènes. La *Figure 7* résume l'ensemble de ces facteurs en les associant à certains mécanismes impliqués dans la schizophrénie.

⁴ Paramètre de l'inhibition sensorielle mesuré avec un EEG. Deux *stimuli* auditifs identiques (le premier étant le *stimulus* conditionnant et le second le *stimulus* test) sont diffusés à un intervalle d'environ 500ms, la réponse électrique sous forme d'un potentiel évoqué s'obtient 40 à 80ms après chaque *stimulus* (d'où l'appellation onde P50, pour environ 50ms après la stimulation). L'amplitude des deux réponses est mesurée et un ratio est calculé : amplitude *stimulus* test / amplitude *stimulus* conditionnant. Chez les sujets sains ce ratio est d'au moins 50%, l'amplitude de la réponse au *stimulus* test étant plus faible que celle de la réponse au *stimulus* conditionnant, révélant un filtrage sensoriel (Houy & Thibaut, 2007).

1. Introduction

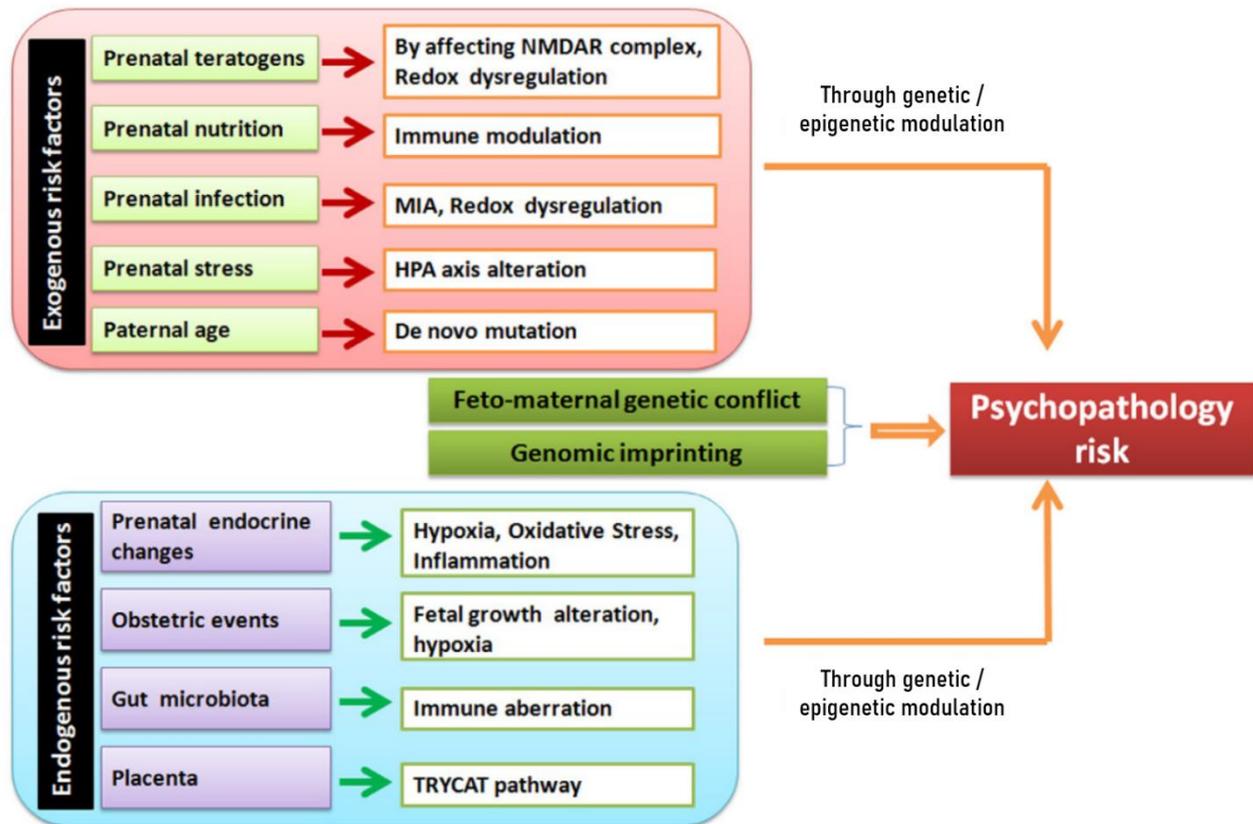


Figure 7 : Facteurs exogènes et endogènes de risque périnataux associés à la schizophrénie, mécanismes impliqués et modulation génétique et épigénétique. MIA : « Maternal Immune Activation » ; HPA : « hypothalamic-pituitary-adrenocortical » ; TRYCAT : « TRYptophan CATabolites ». Adapté de Debnath et al., 2015.

Les facteurs endogènes comprennent :

Les complications obstétricales : qui peuvent être un retard de croissance fœtale (indiqué par un poids, une circonférence du crâne, ou une taille plus faible que la moyenne à la naissance) et / ou une hypoxie (dont le risque est modulé par des gènes également impliqués dans la schizophrénie) (Afe et al., 2019; Korovaitseva et al., 2019; Lipner et al., 2020; Pugliese et al., 2019; Wortinger et al., 2019).

Les altérations du microbiote du système gastro-intestinal : la colonisation du système gastro-intestinal par des microorganismes est un processus évolutif qui influence de nombreuses autres fonctions (homéostasie, angiogenèse, fonction immunitaire, développement du système nerveux central), particulièrement durant la vie fœtale (Heiss & Olofsson, 2019; Hillemecher et al., 2018).

1. Introduction

La composition du placenta : une perturbation des apports nutritionnels et hormonaux *via* le placenta peut être délétère pour le développement du système nerveux central du fœtus. Un déficit de la conversion du tryptophane en sérotonine par le placenta (Goeden et al., 2016) peut mener à des altérations du système sérotoninergique, avec une altération de certains faisceaux d'axones, des mécanismes de division cellulaire et de l'organisation en couches du néocortex (Tsukada et al., 2019).

Le système endocrinien : une concentration anormale d'hormones pendant des fenêtres temporelles critiques de l'embryogenèse peut être tératogène. Un diabète maternel peut induire une hyperglycémie fœtale, ce qui peut entraîner une hypoxie tissulaire (Hornberger, 2006), une légère inflammation chronique (Pantham et al., 2015) et une augmentation du stress oxydatif, avec de possibles conséquences en terme d'altérations neurodéveloppementales (Guest & Guest, 2018).

Les facteurs exogènes comprennent :

La présence d'agents neurotoxiques ou tératogènes : les polluants organiques persistants, les métaux lourds, les radiations ionisantes, la consommation de tabac (Hunter et al., 2020), de cocaïne, d'alcool par la mère (Bodnar et al., 2018, 2020) peuvent affecter le développement précoce du cerveau du fœtus. De plus, des travaux ont montré qu'une exposition prénatale au plomb augmentait le risque de schizophrénie (Kponee-Shovein et al., 2020), et il en va de même pour une exposition à des antalgiques de type aspirine durant la grossesse (Gunawardana et al., 2011; Sørensen et al., 2004).

La malnutrition prénatale : une malnutrition prénatale entraîne des déficits du développement cérébral à long terme et un risque plus élevé de schizophrénie (Susser et al., 2008). La malnutrition prénatale entraîne aussi une diminution du volume intracrânien, que l'on peut observer chez les schizophrènes. Une carence en vitamines, particulièrement en vitamine D (qui influence le fonctionnement du système immunitaire (Van Etten & Mathieu, 2005)⁵) a été également associée à une augmentation du risque de schizophrénie (Lisi et al., 2020).

⁵ Le récepteur nucléaire à la vitamine D3 est exprimé par les cellules présentatrices d'antigènes et les lymphocytes T activés.

1. Introduction

L'infection prénatale : une infection de la mère par certains pathogènes entraîne une réponse immunitaire inflammatoire qui induit un stress oxydatif pouvant conduire à des anomalies neurodéveloppementales (Karlsson & Dalman, 2019). Certains agents infectieux (*Toxoplasma gondii*, cytomégalovirus, rubéole, influenza, *etc.*) peuvent également traverser le placenta et affecter directement le fœtus en développement (Burgdorf et al., 2019; Karlsson & Dalman, 2019; Kępińska et al., 2020; Lucchese et al., 2020; Torrey & Yolken, 2017).

Le stress prénatal : l'exposition à des hormones dont la sécrétion est accrue par l'induction d'un stress, peut contribuer à des déficits structurels et fonctionnels de l'hippocampe. L'exposition à des glucocorticoïdes exogènes provenant de la mère, influence directement le neurodéveloppement fœtal, la plasticité cérébrale et l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien (Ellman et al., 2019; Koenig et al., 2002).

L'âge avancé du père : ce facteur augmenterait le risque de développer une schizophrénie de par l'augmentation constante avec l'âge du nombre de mutations *de novo* des spermatozoïdes (Debnath et al., 2015; Kong et al., 2012). Cependant des résultats récents contredisent ce point (Weiser et al., 2020). L'âge avancé du père semble être également un facteur qui augmente le risque de développer des troubles autistiques (Reichenberg et al., 2012).

Le lieu de naissance et la saison de naissance ont également été montrés comme étant des facteurs qui modulent le risque de schizophrénie. C'est le cas d'une naissance en milieu urbain ou le fait de vivre dans un milieu urbain qui augmentent le risque de schizophrénie (Gasse et al., 2019; Solmi et al., 2020). Des études épidémiologiques ont également montré que les patients schizophrènes naissent davantage en hiver que la population générale (10 à 15% de plus) (Ferreira et al., 2020; Verdoux, 2004). La saison de naissance est également en lien étroit avec l'exposition aux facteurs de risque environnementaux (maladies infectieuses, température, durée de la photopériode, apports nutritionnels, *etc.*) (Karlsson et al., 2019; Szöke et al., 2019).

1.3.2.2 Facteurs environnementaux postnataux

Les traumatismes se produisant durant l'enfance constituent un facteur de risque largement étudié dans le cadre de la schizophrénie (Han et al., 2019; Kraan et al., 2015; McLaughlin et al., 2020; Morgan & Fisher, 2007; Mørkved et al., 2020; Popovic et al., 2019; Read et al., 2005). Ces traumatismes incluent des maltraitances physiques et psychologiques, des abus sexuels durant l'enfance, un manque de figure parentale, un divorce, une consommation de substance addictive par les parents et la pauvreté (Davis et al., 2016). L'évaluation des traumatismes peut se faire par des questionnaires comme le CTQ (« *Childhood Trauma Questionnaire* ») qui comprend 28 items portant sur les abus physiques, émotionnels et sexuels, et la négligence physique et émotionnelle. Les participants répondent sur une échelle de Likert à 5 points afin de différencier différents niveaux de sévérité, avec une réponse pouvant varier de « jamais vrai » à « très souvent vrai » (Bernstein et al., 1994). Ce questionnaire peut être accompagné d'un entretien, et peut comprendre un item « fourre-tout » dans lequel les participants peuvent décrire un autre type de maltraitance (Rosenman & Rodgers, 2004) (voir Figure 8). Les traumatismes durant l'enfance les plus souvent rapportés chez les schizophrènes sont la négligence émotionnelle et l'abus émotionnel⁶ (respectivement rapportés par 65 et 60% des schizophrènes), ainsi que la négligence physique (40%), les abus sexuels (32%) et les abus physiques (25%) (Larsson et al., 2013).

⁶ Un abus émotionnel correspond à des agressions verbales pouvant altérer l'estime de soi ou le bien être d'un enfant, mais aussi à tout comportement humiliant, dégradant ou insultant de la part d'une personne adulte vers un enfant (Etain et al., 2010).

1. Introduction

Item ^a	Factor Loading
Factor I: Physical and emotional abuse (23 items)	
People in my family hit me so hard that it left me with bruises or marks.	0.75
The punishments I received seemed cruel.	0.73
I was punished with a belt, a board, a cord, or some other hard object.	0.68
Someone in my family yelled and screamed at me.	0.68
People in my family said hurtful or insulting things to me.	0.67
Factor II: Emotional neglect (16 items)	
I felt like there was someone in my family who wanted me to be a success. ^b	0.74
There was someone in my family who helped me feel that I was important or special. ^b	0.73
My family was a source of strength and support. ^b	0.67
People in my family felt close to each other. ^b	0.67
Someone in my family believed in me. ^b	0.66
Factor III: Sexual abuse (six items)	
I believe that I was sexually abused.	0.88
Someone molested me.	0.88
Someone tried to make me do sexual things or watch sexual things.	0.86
Someone tried to touch me in a sexual way or tried to make me touch them.	0.84
Someone threatened to hurt me or tell lies about me unless I did something sexual with them.	0.78
Factor IV: Physical neglect (11 items)	
There was enough food in the house for everyone. ^b	0.61
I lived in a group home or a foster home.	0.61
I had to wear dirty clothes.	0.59
I was living on the streets by the time I was a teenager or even earlier.	0.51
I knew that there was someone to take care of me and protect me. ^b	0.49

^aEach item begins with the phrase "When I was growing up," and is rated on a 5-point Likert-type scale. Response options are "never true," "rarely true," "sometimes true," "often true," and "very often true."

^bReverse-coded item.

Figure 8 : Items du CTQ. Chaque item est associé à un coefficient de corrélation (« factor loading ») indiquant la force du lien entre ce facteur et la pathologie étudiée. Issu de Bernstein et al., 1994.

1. Introduction

Les traumatismes durant l'enfance ont été associés à des troubles de mémoire, d'apprentissage et d'attention (Alameda et al., 2015; Lupien et al., 2009; Majer et al., 2010). Popovic et al. (2019) proposent trois voies pathophysiologiques possibles entre les traumatismes durant l'enfance, considérés comme un stress environnemental, et la schizophrénie (Popovic et al., 2019). La première se base sur l'effet neurobiologique du stress qui active l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien qui, à son tour, stimulerait le système de neurotransmission dopaminergique (McEwen et al., 1986), largement impliqué dans la schizophrénie. La seconde voie porte sur une prévalence génétique qui augmenterait la sensibilité au stress. La présence de certains gènes (COMT⁷ (Green et al., 2014), FKBP5⁸ (Green et al., 2015), 5-HTTLPR⁹ (Aas et al., 2012), *etc.*) modulerait en effet la réponse à un traumatisme durant l'enfance ainsi que l'intensité des symptômes schizophréniques (Popovic et al., 2019). La dernière voie porte sur la régulation épigénétique, puisqu'un stress environnemental peut mener à une hypo-méthylation de l'ADN et à une altération de certaines histones, ce qui perturberait l'expression de certains gènes (voir Figure 9).

⁷ Catechol-O-methyltransferase

⁸ FK506 binding protein 5

⁹ promoter region of the SLC6A4/5-HTT serotonin transporter

1. Introduction

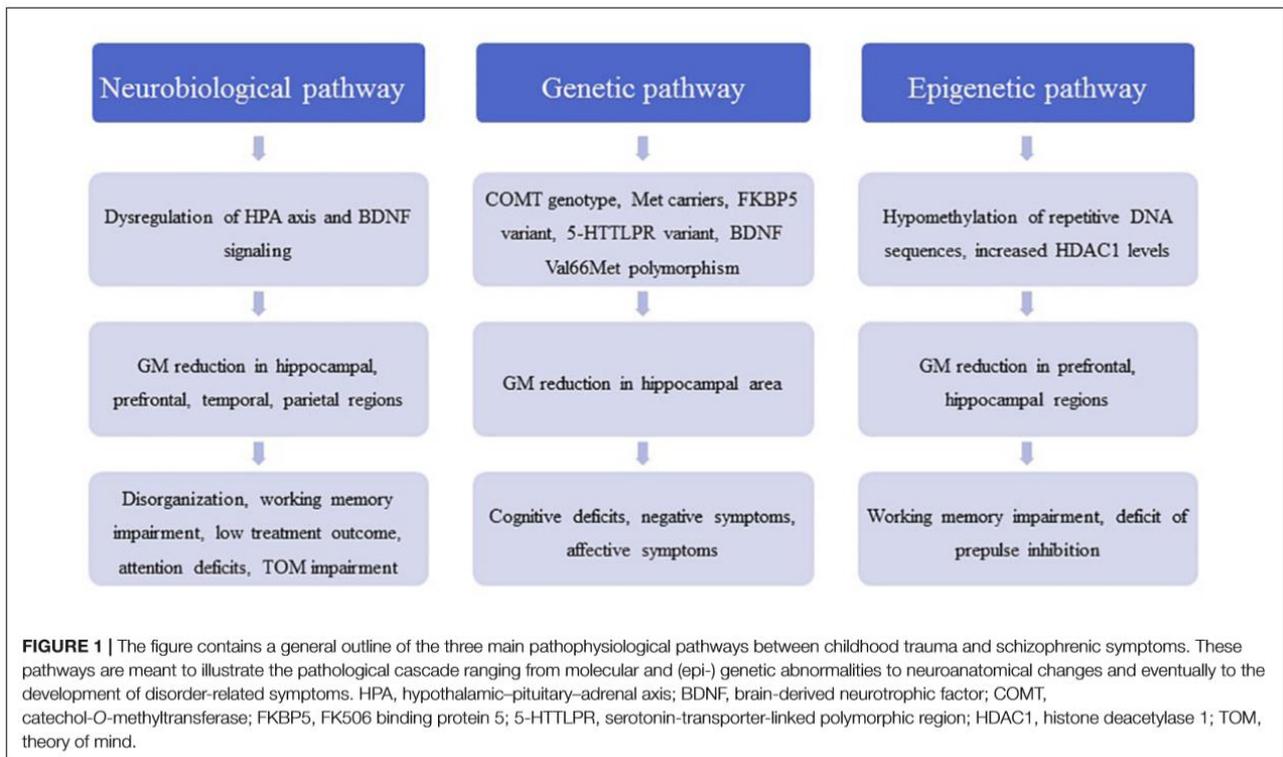


Figure 9 : Voies pathophysiologiques reliant les traumatismes durant l'enfance et la schizophrénie GM : « Grey Matter ». Issu de Popovic et al., 2019.

Par ces trois voies, les traumatismes durant l'enfance mèneraient notamment à des troubles cognitifs corrélés à une diminution du volume hippocampique (Popovic et al., 2019).

1.3.2.3 Facteurs environnementaux tardifs

1.3.2.3.1 Consommation de drogues

Une corrélation entre schizophrénie et consommation de drogue (tabac, alcool, cannabis, stimulants, opiacés, sédatifs, ecstasy, hallucinogènes, etc.) a été largement montrée (Andréasson et al., 1987; Caponnetto et al., 2020; Chen et al., 2003; Gayer-Anderson et al., 2020; Hughes et al., 1986; Jones et al., 2020; Murrie et al., 2020; Olayinka et al., 2020). Cependant, un lien de causalité entre la consommation de ces différentes drogues et la schizophrénie n'est pas avérée. En effet, selon certains auteurs, la consommation de drogue, notamment le tabac et le cannabis, pourrait être liée à une forme d'automédication de la part des schizophrènes, qui leur permettrait d'atténuer certains de leurs symptômes (Quigley & MacCabe, 2019; Van Dijk et al., 2012). L'arrêt de la consommation de tabac chez les schizophrènes est souvent difficile, notamment à cause de leur peur de voir augmenter les symptômes négatifs (Castle et al., 2019)). Quattrone et al. montrent d'une part que la durée de consommation de cannabis est corrélée avec une augmentation de l'intensité des

1. Introduction

symptômes positifs, d'autre part qu'une consommation importante de cannabis est associée à une diminution de l'intensité des symptômes négatifs chez des patients présentant un premier épisode de psychose (Quattrone et al., 2020). Des études avancent également l'hypothèse d'une relation de causalité bidirectionnelle entre consommation de drogues (notamment tabac, cannabis et alcool) et schizophrénie (Quigley & MacCabe, 2019). Un support génétique commun expliquerait cette relation (Evangelou et al., 2019), ainsi que des modifications épigénétiques. Ce dernier point a été avancé suite à des études cliniques (Smith et al., 2020) ainsi que des résultats précliniques, notamment ceux d'une étude montrant une diminution de la méthylation dans l'hippocampe et le cortex frontal chez des souris dont la mère avait reçu de la nicotine durant la gestation (Buck et al., 2020). D'autres études soutiennent l'hypothèse qu'une consommation d'alcool, de tabac ou de cannabis sont des facteurs de risque de la schizophrénie (Beaudoin et al., 2020; Gogos et al., 2019; Takeuchi et al., 2020).

Dans sa revue, Volkow *et al.* (2009) rapportent une grande variabilité des taux de consommation de drogue chez les schizophrènes. Par exemple, concernant le cannabis, les schizophrènes sont entre 17 et 80,3% à avoir consommé du cannabis durant le dernier mois, ce qui est supérieur aux chiffres observés dans la population générale, qui sont compris entre 5,8 et 16,4%. Bien que le cannabis soit souvent ciblé dans les études sur la schizophrénie, les consommations de nicotine et d'alcool sont également beaucoup plus élevées dans cette population de malades en comparaison avec la population générale (Volkow, 2009). Le pourcentage de fumeurs est de 25,6% dans la population générale alors qu'il atteint 60 à 90% dans la population des schizophrènes (voir Tableau 1).

1. Introduction

Tableau 1 : Comparaison des taux de consommation de 4 substances différentes (nicotine, cannabis, alcool, cocaïne) à travers plusieurs études entre des patients schizophrènes et la population générale. Issu de Volkow, 2009.

Abused Substance	Schizophrenia Patients		General Adult Population	
	Reported Rate of Use (Range From Various Studies)	Reported <i>DSM-IV</i> Abuse or Dependence (Range From Various Studies)	Rate of Use (Past month for ages 18 or older) (NSUDH) (SAMHSA 2008)	<i>DSM-IV</i> Dependence in Past Year
Nicotine	60%–90% ^{3–5a}	28.5% ^{6b}	25.9%	12.8% ⁷
Cannabis	17%–80.3% ^{8–10c}	50.8% ⁸	5.8%–16.4%	0.5% ^{11,12}
Alcohol	21%–86% ^{8,13–15d}	43.1%–65% ^{8,16}	2.9%–17.9% ^e	5.1% ^{11,12}
Cocaine	—	23% ¹⁶	0.7%–1.7%	0.09% ^{11,12f}

Note: Prevalence ranges are merely intended to illustrate the consistency of the trend in this population because they represent diverse sampling methods among studies done with different adult populations and measures of abuse. The average rates of use and abuse or dependence in the general adult population were derived from the 2007 National Survey on Drug Use and Health¹⁷ and secondary analyses of the 2000–2002 National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions^{11,12} and are not intended to provide control baselines but as expedient markers for general comparison. *DSM-IV*, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (Fourth Edition); NSUDH, National Survey on Drug Use & health; SAMHSA, Substance Abuse and Mental Health Services Administration.

^aCurrent daily smokers.

^bBased on a calculated odds ratio of 2.8 higher than in controls.

^cPast month.

^dAlcohol misuse, abuse, or disorder.

^eHeavy use.

^fStimulants.

Dans la revue de Nielsen et al. (2017) s'intéressant au lien entre consommation de drogues et schizophrénie, c'est la consommation de cannabis qui présente l'association la plus élevée avec la schizophrénie, suivie par celle d'alcool. Quelle que soit la drogue étudiée, après ajustement des valeurs par de nombreuses variables environnementales et à l'exception de la cocaïne, une consommation entraîne une augmentation significative du risque relatif de présenter une schizophrénie. Dans cette étude, il ressort que le genre n'a pas d'impact sur le risque de schizophrénie associé à la consommation de drogue (Nielsen et al., 2017).

En conclusion, bien que le lien entre consommation de cannabis et schizophrénie ait été mis en évidence dans plusieurs études, le lien de causalité n'est pas encore clairement démontré (Arseneault et al., 2002; Dervaux et al., 2003; Di Forti et al., 2019; Rubino & Parolaro, 2014).

1.3.2.3.2 Migrations et facteurs sociaux

Les phénomènes migratoires de populations représentent un autre facteur qui augmente le risque de développer une schizophrénie. Une méta-analyse de Selten et al. en 2020 montre un risque relatif autour de 2 pour les individus qui subissent une migration, ce qu'il signifie

1. Introduction

qu'ils ont deux fois plus de risque d'être schizophrènes que la population globale. Plusieurs facteurs viennent moduler ce risque relatif, comme la couleur de peau, le pays de destination, le pays d'arrivée ou encore le niveau de développement du pays d'origine. Les individus à la peau noire présentent un risque relatif de 4,19 alors que ceux ayant la peau blanche ont un risque relatif de seulement 1,65. Les migrants issus d'un pays développé ont un risque relatif plus élevé que ceux issus d'un pays en voie de développement (respectivement 2,54 et 1,66). Le risque relatif est très similaire pour les hommes et les femmes (respectivement 2,25 et 2,26). Les personnes qui migrent ont donc un risque relatif global de 2,55 mais leurs enfants ont également davantage de risques d'être schizophrènes par rapport à la population globale avec un risque relatif de 1,78 (Selten et al., 2019). Pour expliquer cet impact de la migration sur le risque de schizophrénie, ainsi que sa modulation par des facteurs comme la couleur de peau, l'hypothèse privilégiée est que tout désavantage social induit une augmentation du risque de schizophrénie. L'appartenance à une classe sociale minoritaire (couleur de peau, religion, sexualité, etc.) induit un désavantage social qui se traduit par une augmentation de la transmission dopaminergique en réponse au stress (Selten et al., 2019).

1.3.3 Facteurs épigénétiques

L'épigénétique est « l'étude des changements dans l'activité des gènes, n'impliquant pas de modification de la séquence d'ADN et pouvant être transmis lors des divisions cellulaires » (Bourc'his, 2015). Plusieurs mécanismes sont impliqués, notamment la méthylation des histones qui modifie l'état de condensation de la chromatine ce qui module l'activation de la transcription des gènes.

Comme mentionné précédemment, l'étiologie précise de la schizophrénie est encore actuellement inconnue, malgré la mise en évidence de prévalences génétiques et de facteurs de risque environnementaux. Des études s'accordent sur l'hypothèse d'une origine multifactorielle de la schizophrénie, avec une base génétique rendant l'individu vulnérable, à laquelle s'ajoutent des facteurs environnementaux précoces puis tardifs, qui déclencheraient l'apparition de la maladie (Ellenbroek, 2003; Fusar-Poli et al., 2017; Millan et al., 2016) (voir *Figure 10* et *Figure 11*).

1. Introduction

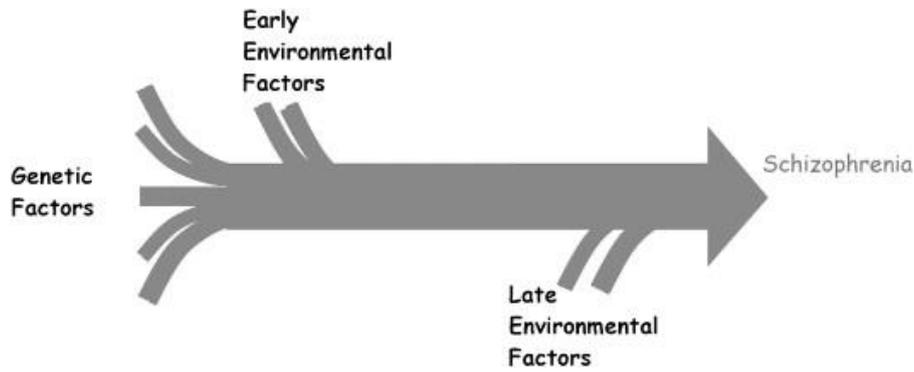


Figure 10 : Schéma illustrant l'hypothèse d'une origine multifactorielle de la schizophrénie avec la présence initiale de facteurs génétiques auxquels viendraient se cumuler des facteurs environnementaux précoces, puis tardifs, aboutissant in fine au développement de la pathologie. Issu de Ellenbroek, 2003.

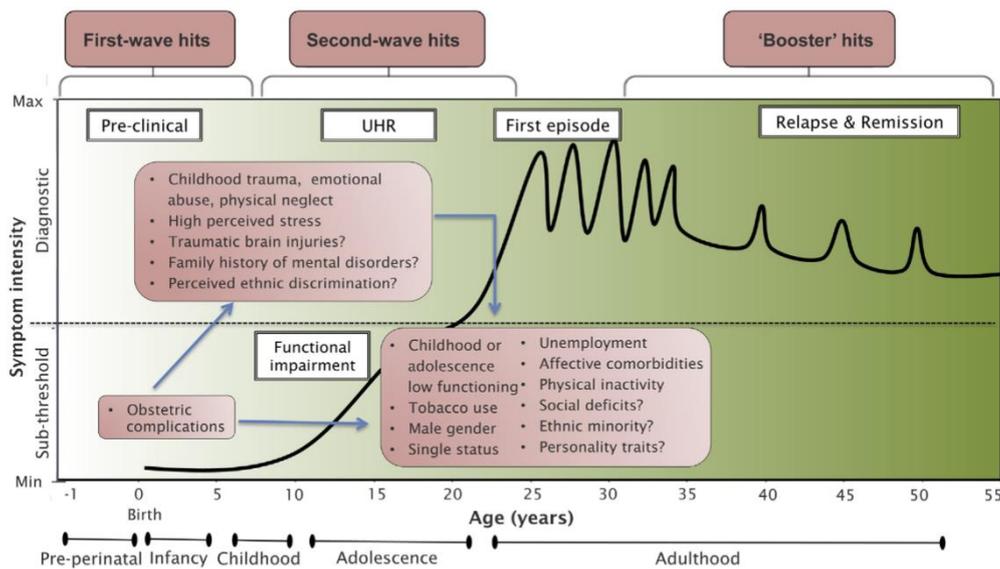


Figure 11 : Schéma d'un modèle d'apparition et de progression de la schizophrénie utilisant 3 facteurs. UHR : « ultra high-risk ». Issu de Fusar-Poli et al., 2017, adapté de Millan et al., 2016.

L'étude des mécanismes épigénétiques est un champ intéressant dans la recherche de l'étiologie de la schizophrénie (Latusz & Maćkowiak, 2020; Tao et al., 2020). Une revue de Misiak *et al.* (Misiak et al., 2018) a utilisé les données de 51 études s'intéressant à l'association de gènes candidats et de facteurs environnementaux. Dans cette revue, le facteur environnemental le plus représenté est le traumatisme durant l'enfance (15,6% des études). Ce facteur de risque est également largement étudié dans le cadre de la schizophrénie (Baudin, 2018; Cancel, 2018), ce qui est également le cas de l'usage de

1. Introduction

cannabis (39,2% des études dans la revue de Misiak *et al.*) (Manson, 2005; Tiziana Rubino & Parolaro, 2016).

Des modulations des mécanismes épigénétiques, par exemple au niveau de la méthylation de régions non codantes de l'ADN, ou encore de l'état de condensation de la chromatine, ont également été mises en évidence chez les schizophrènes (Gusev *et al.*, 2019; Mendizabal *et al.*, 2019).

1.4 Les symptômes comportementaux (triade)

Les principaux symptômes de la schizophrénie se classent couramment en 3 types : les symptômes positifs, négatifs et les déficits cognitifs.

La distinction positif-négatif a été décrite par Jackson en 1875 (Jackson, 1875) au sujet de plusieurs pathologies comme l'épilepsie, l'aphasie ou encore les pathologies cérébrovasculaires. Il décrit les symptômes négatifs comme une paralysie des fonctions nerveuses (« hors de combat ») et les symptômes positifs comme un mécanisme de compensation des symptômes négatifs. Ainsi, l'un ne peut exister sans l'autre.

Ce concept réapparaît avec De Clérambault en 1942 (De Clérambault, 1942). Il décrit les symptômes négatifs comme résultants de phénomènes inhibiteurs et s'observant par un retrait social, une perplexité, un déficit d'attention. Les symptômes positifs sont décrits comme indépendants des symptômes négatifs et s'apparentant à des phénomènes d'intrusions (irruptions de pensées non contrôlée). Ils s'observent *via* les hallucinations et les idées délirantes (Berrios, 1985). Cette dernière description se rapproche beaucoup de celles utilisées actuellement. Bleuler, en 1911 a décrit des symptômes fondamentaux et accessoires comprenant certains éléments associés ensuite aux symptômes négatifs (ex : négativisme¹⁰, abêtissement affectif, aboulie) et aux symptômes positifs (idées délirantes, stéréotypies, délire hallucinatoire) (Bleuler, 1911). Concernant les symptômes cognitifs, Bleuler en décrivait déjà certains dans « *Dementia Praecox* ou Groupe des schizophrénies » en 1911. Bien que la classification utilisée par Bleuler ne regroupe pas les symptômes cognitifs dans une seule catégorie, la définition actuelle peut être retrouvée dans son ouvrage. Bleuler décrit ainsi des troubles des associations, observés généralement par le

¹⁰ « On rassemble sous le nom de négativisme une série de symptômes qui ont tous en commun le fait qu'une réaction dont on aurait pu attendre qu'elle ait un sens positif se déroule dans un sens négatif : les malades ne veulent rien faire de ce qu'on attend d'eux (négativisme passif), ou bien ils font le contraire, ou du moins quelque chose d'autre (négativisme actif). » (Bleuler, 1911)

1. Introduction

langage ; il décrit également des troubles de l'attention et un manque d'adaptabilité. Les déficits de mémoire apparaissent moins clairement puisqu'il distingue la schizophrénie des psychoses organiques par l'absence de « trouble direct de la mémoire », tout en décrivant l'observation d'hypermnésie semblable aux symptômes observés chez les autistes atteints du syndrome d'Asperger. Ces symptômes cognitifs sont classés dans les symptômes fondamentaux, qui sont constitués des troubles des associations et de l'affectivité et qui sont absents d'autres pathologies. Dans les symptômes accessoires, plus visibles et plus à même de conduire à une hospitalisation, Bleuler décrit des troubles de la mémoire qui vont des réminiscences imposées (qu'il relie aux hallucinations) à des lacunes, voire des amnésies pouvant être antérogrades. La variabilité inter et intra individuelle de ces symptômes est mise en avant. Les troubles du langage peuvent être reliés aux troubles de la mémoire dans le sens où les déficits cognitifs observés chez les patients sont souvent des troubles de la mémoire sémantique, qui nécessite ces deux fonctions.

Ainsi, tous les symptômes considérés actuellement comme étant représentatifs de la schizophrénie étaient décrits, parfois sous des formes différentes, par Bleuler.

Tout comme dans cet ouvrage, Le DSM ne classe pas les symptômes de la schizophrénie selon ces trois catégories mais sous la forme de liste de symptômes, classés selon leur importance. Concernant les études précliniques, la catégorisation en trois principales sous-catégories est largement utilisée et fait l'objet d'un consensus de vocabulaire, il est donc utile de les décrire précisément ici.

Les symptômes positifs et négatifs sont classiquement mesurés en clinique au moyen d'une échelle de quantification appelée PANSS (« *Positive And Negative Syndrome Scale* »). Elle permet, encore aujourd'hui, de les détailler et les quantifier (Germain et al., 2019).

1. Introduction

1.4.1 Symptômes positifs

Les symptômes positifs décrits dans la PANSS en 1987 (Kay et al., 1987) sont :

- Délires
- Désorganisation de la pensée (« *conceptual disorganisation* »)
- Hallucinations
- Excitation
- Grandiloquence (« *grandiosity* ») qui peut être associée aux « manières¹¹ » décrites par Bleuler dans la catégorie des symptômes accessoires
- Méfiance, comportements suspicieux
- Hostilité

En 1991, Andreasen et Flaum décrivent les mêmes types de symptômes, parfois avec des termes légèrement différents (par exemple ils utilisent « les troubles de la pensée formelle », ce qui s'approche de la précédente définition de « désorganisation de la pensée ») en y ajoutant certains éléments comme les comportements bizarres (Andreasen & Flaum, 1991).

1.4.2 Symptômes négatifs :

Les symptômes négatifs décrits dans la PANSS en 1987 (Kay et al., 1987) sont :

- Eoussement affectif
- Retrait émotionnel
- Appauvrissement social
- Retrait social apathique passif
- Difficultés de la pensée abstraite
- Manque de fluidité et de débit de la conversation
- Pensées stéréotypées

¹¹ « Les manières sont des remaniements frappants d'actes ordinaires », il s'agit d'un comportement artificiel, non adapté à la situation. (Bleuler, 1911)

1. Introduction

En 1991, Andreasen et Flaum décrivent les symptômes négatifs de manière similaire à la PANSS, bien que les termes utilisés diffèrent légèrement (par exemple l'« asociabilité » peut être comparée au « retrait social apathique passif » de la PANSS). Certains éléments sont ajoutés comme la baisse d'attention et l'anhédonie (Andreasen & Flaum, 1991). Ces symptômes ont un rôle de plus en plus important dans le diagnostic de schizophrénie et leur quantification doit s'améliorer avec l'utilisation de nouvelles échelles (Dollfus & Lyne, 2017).

1.4.3 Déficits cognitifs

Les déficits cognitifs sont responsables d'une baisse importante de la qualité de vie des patients schizophrènes. Ils sont également un frein à la prise des traitements (Guo et al., 2019). Ils sont mesurés *via* différents tests psychométriques indiqués dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Principales fonctions cognitives altérées dans la schizophrénie et tests psychométriques permettant de les mesurer.

Fonction	Test	Référence
Aphasie	COWAT : "Controlled Oral Word Association Test"	Benton & Hamscher, 1978
Langage	WISC : "Wechsler Intelligence Scale for Children"	Wechsler, 1974
Attention	WAIS : "Wechsler Adult Intelligence Scale"	Wechsler, 1991
	CPT : "Continuous Performance Task"	Cornblatt & Keilp, 1994
Mémoire verbale	HVLT : "Hopkins Verbal Learning Test"	Brandt & Benedict, 1991
Dextérité manuelle	Grooved pegboard test	Lafayette Instrument Company, 1989
Mémoire de travail	SDR : "Spatial Delayed Response"	Lyons-Warren et al., 2004
Flexibilité mentale	Wisconsin card sorting test	Kongs et al., 2000

1.4.4 Autres symptômes

De nombreux autres symptômes observés chez les schizophrènes ne sont pas classables dans l'une ou l'autre de ces trois catégories. Il s'agit notamment des troubles anxiodépressifs, des symptômes agressifs, d'une désorientation, d'un sentiment de culpabilité, d'un retard moteur, *etc.* La PANSS regroupe certains de ces symptômes dans la catégorie « *General Psychopathology Scale* », voir Figure 12 (Kay et al., 1987).

1. Introduction

Individual scale items

Positive Scale

- Delusions
- Conceptual disorganization
- Hallucinatory behavior
- Excitement
- Grandiosity
- Suspiciousness
- Hostility
- Scale total

Negative Scale

- Blunted affect
- Emotional withdrawal
- Poor rapport
- Passive-apathetic social withdrawal
- Difficulty in abstract thinking
- Lack of spontaneity & flow of conversation
- Stereotyped thinking
- Scale total

General Psychopathology Scale

- Somatic concern
- Anxiety
- Guilt feelings
- Tension
- Mannerisms & posturing
- Depression
- Motor retardation
- Uncooperativeness
- Unusual thought content
- Disorientation
- Poor attention
- Lack of judgment & insight
- Disturbance of volition
- Poor impulse control
- Preoccupation
- Active social avoidance
- Scale total

Figure 12 : La PANSS distingue les symptômes positifs et négatifs, et une troisième catégorie plus générale comprenant des symptômes ne pouvant être placés dans les deux catégories précédentes. Issu de Kay et al., 1987.

1. Introduction

Plusieurs marqueurs physiologiques permettant de discriminer les schizophrènes d'une population saine peuvent être mesurés sur des électroencéphalogrammes (EEG) (Owens et al., 2016). L'amplitude de l'onde P300¹² diminue chez les schizophrènes par rapport à la population générale, la pathologie entraîne également une diminution de l'inhibition de l'onde P50, une augmentation du nombre de saccades incorrectes et une augmentation de la latence de réponse pour les saccades correctes (paradigme des antisaccades¹³), ainsi qu'une diminution des potentiels évoqués induits par des *stimuli* déviants dans la tâche de négativité de discordance¹⁴ (Owens et al., 2016).

Un symptôme particulièrement intéressant est le défaut d'inhibition qui peut être mesuré à différents niveaux : comportemental (inhibition du réflexe de sursaut) ou neuronal (défaut d'inhibition de l'onde P50 des potentiels évoqués auditifs). L'onde P50 se mesure objectivement par la mesure d'ondes cérébrales modulées par des *stimuli* auditifs (Houy & Thibaut, 2007). Des études de jumeaux ont montré une héritabilité de ce déficit, et une étude génétique (Freedman et al., 2001) a montré que ce déficit serait lié au *locus* du gène codant pour la sous-unité α -7 du récepteur nicotinique (chromosome 15q13-14). Des études chez le rat (Callahan et al., 2014; Potasiewicz et al., 2017) et chez la souris (Li et al., 2019) ont montré qu'une stimulation du récepteur nicotinique α -7 de l'acétylcholine (par un agoniste ou une modulation allostérique) avait un effet protecteur sur le défaut d'inhibition du réflexe de sursaut.

¹² Il s'agit d'une mesure considérée comme un index de plusieurs capacités cognitives réalisée grâce à un EEG. Un *stimulus* auditif génère un potentiel évoqué à un intervalle de 300ms (400-500ms pour les *stimuli* visuels). La latence de la réponse est considérée comme un indice indirect de la durée des opérations cognitives, et son amplitude comme un indice de l'aspect énergétique de ces opérations (Hansenne, 2000).

¹³ Il s'agit d'une mesure des capacités d'inhibition d'une réponse réflexe et de production d'une réponse contrôlée. Les dispositifs utilisés peuvent être l'oculographie et l'électro-oculogramme. Le participant doit fixer un point au centre d'un écran, ce point se déplace à gauche ou à droite de manière imprévisible et le participant doit diriger son regard vers le côté opposé au déplacement du point. Les saccades oculaires correctes et incorrectes (mesure des capacités d'inhibition), ainsi que la latence des saccades correctes (mesure de l'efficacité de la production d'une réponse contrôlée) sont mesurées (Hallett & Adams, 1980 ; Munoz & Everling, 2004).

¹⁴ Il s'agit d'une mesure du fonctionnement de la mémoire auditive réalisée grâce à un EEG. Une série de *stimuli* auditifs identiques est interrompue de manière imprévisible par un *stimulus* auditif déviant (en durée ou en sonorité). Les *stimuli* déviants génèrent un potentiel évoqué avec une amplitude supérieure duquel est soustrait le potentiel évoqué répondant à un *stimulus* non déviant. La différence entre ces deux réponses est plus importante chez les sujets sains en comparaison aux schizophrènes (Naaatnen, 1992).

1. Introduction

L'étude du défaut d'inhibition, dans le cadre de la prévalence génétique de la schizophrénie, mais aussi pour l'étude plus large de cette pathologie, est particulièrement intéressante d'un point de vue translationnel. En effet, un défaut d'inhibition peut être mesuré chez des humains mais aussi chez des rongeurs (en utilisant d'autres modalités sensorielles et d'autres systèmes de mesure) ce qui apporte un outil essentiel à la mise en place et la caractérisation de modèles animaux, étape essentielle à la compréhension et au traitement d'une pathologie.

1.5 Les atteintes physiopathologiques

De nombreuses modifications de l'organisme ont été montrées chez les schizophrènes. La plupart de ces modifications portent sur le système nerveux central mais l'organisme dans son entier peut aussi être sujet à des dérèglements, notamment du système immunitaire. Concernant le système nerveux central on observe des modifications de l'anatomie, de l'asymétrie, de la connectivité et de la plasticité.

1.5.1 Atteintes anatomiques

Il existe un dimorphisme sexuel concernant les atteintes anatomiques des schizophrènes. Des modifications morphologiques du cerveau sont observées, cependant elles sont probablement dues au développement cérébral, influencé différemment en fonction des hormones et donc du genre (Abel et al., 2010).

Des modifications structurales centrales ont été mises en évidence dans la schizophrénie, et en particulier pendant la phase chronique. Une diminution d'environ 3% du volume du cerveau entier a été identifiée et cette diminution est plus importante dans la matière grise (2%) que dans la matière blanche (1%) (Kim et al., 2017). Des études en IRM par régions d'intérêt, montrent notamment un élargissement du système ventriculaire (voir Figure 13) et une réduction du volume de la matière grise corticale et sous-corticale des lobes frontaux et temporaux, et du système limbique.

1. Introduction

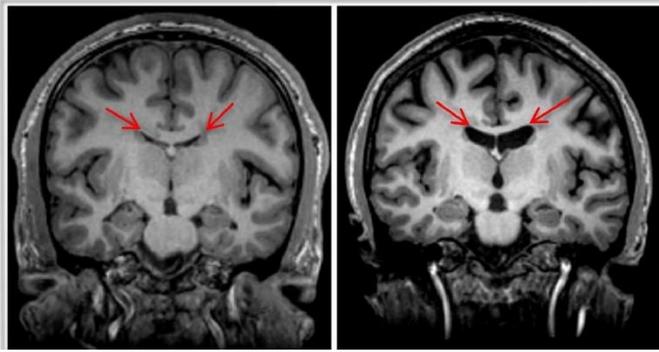


Figure 13 : Vue coronale d'images anatomiques IRM représentatives d'un sujet témoin (gauche) et d'un patient ayant montré un premier épisode schizophrénique (droite). Les flèches pointent le corps calleux, dont le volume est réduit chez le patient schizophrène, et les ventricules latéraux, dont le volume est augmenté chez le patient schizophrène (del Re et al., 2019).

Des techniques d'imagerie, notamment morphométriques, ont permis d'étudier plus précisément les structures cérébrales touchées dans la pathologie. Ainsi, les schizophrènes présentent notamment une réduction des volumes de matière grise au niveau de l'hippocampe, de l'amygdale, de l'*insula* (ou cortex insulaire), du thalamus, du cortex cingulaire antérieur et des *gyrus* parahippocampique, frontal moyen, post-central et temporal supérieur (Glahn et al., 2008). Un autre aspect à souligner concernant ces anomalies structurales est leur progression avec la durée de la pathologie, en particulier dans le lobe temporal (Vita et al., 2012). Les différences de volume entre les schizophrènes et la population générale sont donc de plus en plus importantes au cours de l'évolution de la pathologie. Les antipsychotiques (AP) aggravent également ces différences de volume (Fusar-Poli et al., 2013). Toutefois, cette évolution est retrouvée même chez les patients non traités par ces neuroleptiques (mais dans une moindre mesure) en particulier dans le noyau caudé et le thalamus (Hajima et al., 2013).

1. Introduction

1.5.2 Asymétrie

Des différences en termes de symétrie des hémisphères cérébraux ont également été observées chez les patients schizophrènes (Dollfus et al., 2005). L'asymétrie normale de certaines régions temporales supérieures (plus volumineuses à gauche, notamment pour les zones impliquées dans le langage) est gommée chez les schizophrènes (Dollfus et al., 2002; Royer et al., 2015; Stephan-Otto et al., 2020). Récemment, DeRamus et al. (DeRamus et al., 2020) ont identifié des différences de latéralité au niveau des régions temporales du cerveau chez les schizophrènes.

Ces modifications de latéralisation cérébrale sont reflétées par des modifications des latéralités motrices et sensorielles des schizophrènes. En effet, la proportion de « non droitiers » (c'est-à-dire des individus gauchers, non latéralisés, ou faiblement droitiers) est plus élevée dans cette population (Dragovic & Hammond, 2005).

1.5.3 Connectivité cérébrale

Des troubles de la connectivité cérébrale ont également été mis en évidence dans la schizophrénie grâce à des techniques d'imagerie de diffusion et d'IRM fonctionnelle (Niznikiewicz et al., 2003; Owens et al., 2016; Skåtun et al., 2018).

L'IRM de diffusion explore les micro-mouvements des molécules d'eau. La diffusion de ces molécules peut être libre (comme dans le liquide céphalo-rachidien (LCR)) ou restreinte (par les membranes cellulaires, les macromolécules, les fibres...) (voir *Figure 14*). Elle peut s'effectuer dans toutes les directions de l'espace (diffusion isotrope) ou de façon préférentielle dans une direction donnée (diffusion anisotrope) comme dans les fibres nerveuses. La microarchitecture particulière des fibres nerveuses est à l'origine d'une anisotropie de diffusion, en particulier dans la substance blanche cérébrale : la diffusion des molécules d'eau est privilégiée dans le sens des fibres et restreinte perpendiculairement aux fibres. En réalisant des acquisitions d'imagerie de diffusion dans plusieurs directions, on peut extraire des variables telles que le coefficient d'anisotropie fractionnelle (FA « *Fractional Anisotropy* »), les valeurs de diffusivités radiale et moyenne (RD « *Radial Diffusivity* », MD « *Mean Diffusivity* »).

1. Introduction

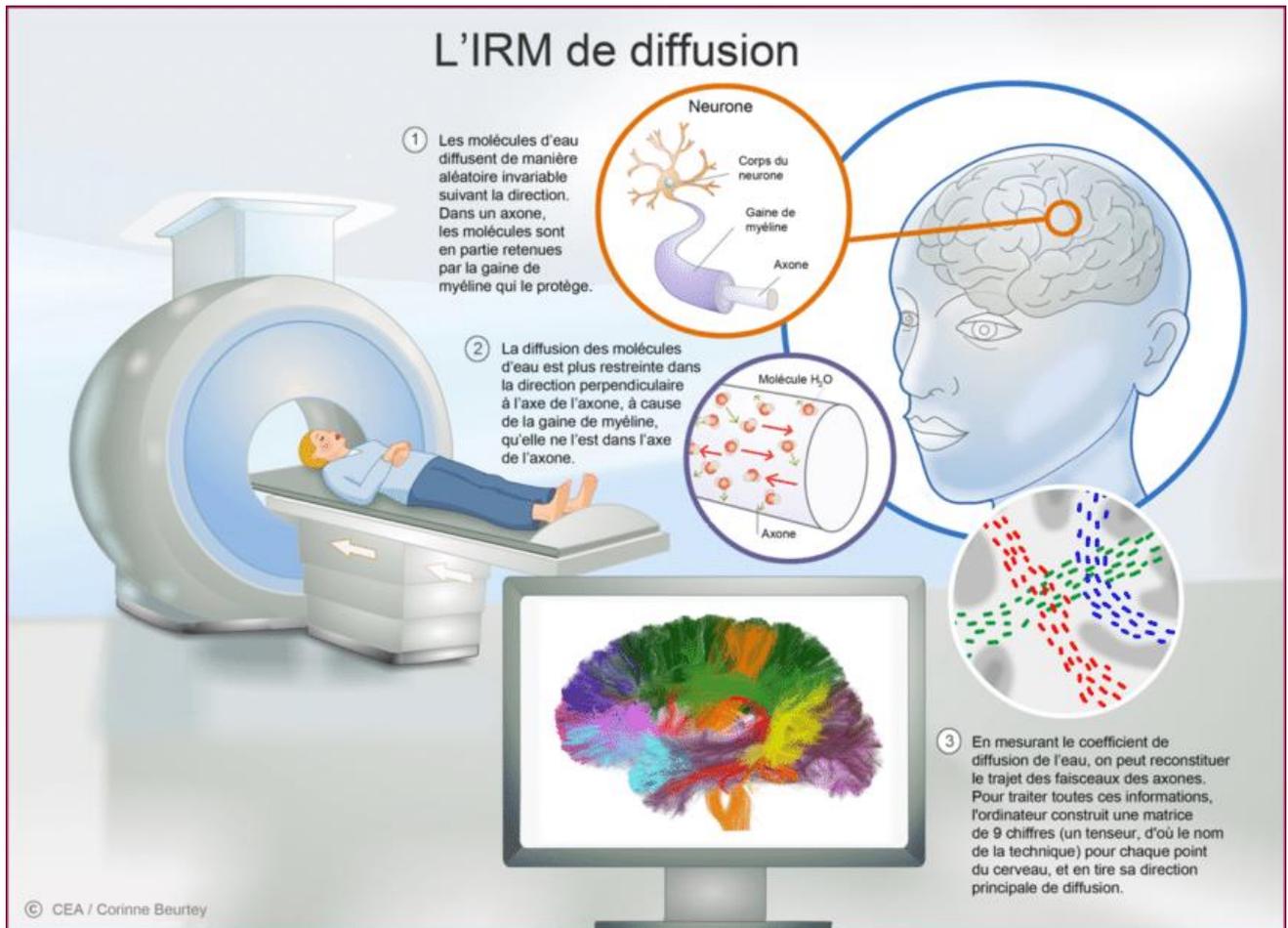


Figure 14 : Brève description du principe de l'imagerie de diffusion. Schéma réalisé par Corinne Beurtey, CEA.

Des anomalies de diffusion généralisées de la substance blanche ont été mises en évidence dans la schizophrénie (Chiappelli et al., 2015; Kochunov et al., 2014, 2017; Vitolo et al., 2017), notamment chez des patients ayant présenté un premier épisode de psychose et non traités par les neuroleptiques (Alvarado-Alanis et al., 2015; Cheung et al., 2008; Ebdrup et al., 2016; Pérez-Iglesias et al., 2010; Serpa et al., 2017). Ces anomalies de diffusion concernaient notamment le corps calleux (del Re et al., 2019; Kubicki et al., 2005; Madigand et al., 2019). Cependant, des résultats contradictoires concernant certains paramètres de diffusion ont été rapportés. Ainsi, chez des patients ayant montré au moins un premier épisode psychotique, les valeurs de FA ont été rapportées comme augmentées (Schmidt et al., 2015) notamment dans le corps calleux (Saito et al., 2017), diminuées (Epstein et al., 2014; Katagiri et al., 2015) notamment dans la région latérale du putamen droit et du lobe temporal supérieur gauche (Bloemen et al., 2010), ou non modifiées (Peters et al., 2008). Les causes de ces différences de résultats ne sont pas claires mais pourraient être en lien avec l'utilisation antérieure d'AP par les sujets inclus dans ces études (Ebdrup et al., 2016;

1. Introduction

Leroux et al., 2018; Szeszko et al., 2014) ou l'utilisation de protocoles d'imagerie différents (Kelly et al., 2018). Récemment, Zhao et al (Zhao et al, 2018) ont montré des perturbations de connectivité chez des patients schizophrènes impliquant en particulier le corps calleux et les circuits thalamo-corticaux, ces anomalies étant significativement associées avec la durée de la pathologie. L'importance du rôle de cette boucle thalamo-corticale dans la pathophysiologie de la schizophrénie a été confirmée par d'autres études récentes (Hua et al, 2019 ; Zhang et al, 2019).

La technique d'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) permet de cartographier l'activité fonctionnelle du cerveau. Le principe consiste à mesurer l'oxygénation du tissu (rapport oxyhémoglobine / désoxyhémoglobine), qui augmente localement dans les aires les plus actives.

Dans l'étude de la schizophrénie, l'IRMf a permis de déceler un hypofonctionnement du cortex préfrontal (CPF) pendant la réalisation de tâches explorant les fonctions exécutives et cognitives, en particulier celles testant les performances de mémoire de travail. En effet, les déficits de mémoire de travail sont associés à une modification du pattern d'activation (ou un engagement « inefficace ») du CPF dorsal chez les patients (Bolkan et al., 2017). Une autre étude a montré une activation aberrante du CPF lors d'une tâche de mémoire de travail (Manoach et al., 2000) (voir Figure 15).

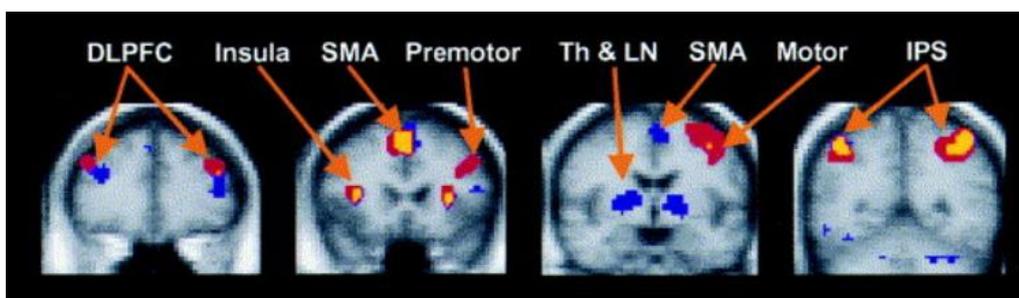


Figure 15 : Représentation en coupes coronales des structures cérébrales activées lors d'une tâche de mémoire de travail chez des patients schizophrènes (en rouge), chez des témoins (en bleu) et les activations communes dans les deux groupes (en jaune). DLPFC : "dorsolateral prefrontal cortex" ; SMA : "supplementary motor area" ; Th : thalamus ; LN : "lentiform nucleus" ; IPS : "intraparietal sulcus". Il peut être observé une variation de la localisation des régions activées en particulier au niveau du cortex préfrontal dorsolatéral, de l'aire motrice supplémentaire, du noyau lentiforme et du thalamus. Issu de Manoach et al., 2000.

1. Introduction

Concernant l'hippocampe, une hyperactivation de cette structure ainsi qu'un couplage anormal hippocampe-CPF ont été observés chez des patients schizophrènes au cours de la réalisation de tests cognitifs (Goldberg et al., 1994; Meyer-Lindenberg et al., 2005) et en particulier lors de tests à faible charge cognitive (Holt et al., 2005; Malaspina et al., 2004; Tregellas et al., 2009).

Deux études ont montré une hyperactivation de l'aire CA1 de l'hippocampe durant la phase prodromale (Talati et al., 2014), suivie d'une propagation de l'hyperactivation au subiculum lors de la transition psychotique (Schobel et al., 2013). Certaines études rapportent, par exemple, que les schizophrènes diffèrent des individus sains par des différences de stratégies, correspondant soit à l'utilisation d'autres régions cérébrales que celles impliquées habituellement soit à une modulation différente de ces dernières (Niznikiewicz et al., 2003). Une hypothèse de développement de la schizophrénie propose que les altérations de connectivité cérébrale conduiraient à une mauvaise communication entre les différentes régions cérébrales (Friston, 1998), et que ceci pourrait être sous-tendu par des altérations de la substance blanche (Skudlarski et al., 2010).

Cette hypothèse pourrait permettre de comprendre les phénomènes hallucinatoires. En effet, une réduction de la connectivité fonctionnelle des réseaux de l'audition et du langage pourrait être liée à l'apparition d'hallucinations auditives résistantes aux traitements (Karbassforoushan & Woodward, 2012). Il semblerait en effet que la déconnection entre la région cingulaire antérieure et le cortex temporal postérieur induise une déconnection entre la pensée verbalisée et le contrôle conscient, ce qui entraînerait une mauvaise attribution des pensées internes considérées comme provenant de l'extérieur par le patient (voir revue Karbassforoushan & Woodward, 2013).

Des études portant sur le réseau de repos ont également montré un lien avec la pathologie. Ce réseau de repos correspond à un ensemble de régions cérébrales pouvant être anatomiquement éloignées qui s'activent de façon synchrone en l'absence de réalisation de tâche, c'est-à-dire lorsqu'on laisse aller librement ses pensées (Alves et al., 2019; de Schotten, 2019). Ces régions s'activent conjointement en l'absence de tâche à réaliser, ce qui signifie qu'elles forment un réseau fonctionnel.

1. Introduction

Une réduction de la connectivité fonctionnelle du réseau de repos a été mise en avant chez les schizophrènes (Dong et al., 2018; Forlim et al., 2020), plus particulièrement dans le CPF (Karbasforoushan & Woodward, 2012; Li et al., 2019) (voir *Figure 16*). Ce défaut de connectivité est corrélé avec des déficits cognitifs (Adhikari et al., 2019; Jimenez et al., 2019).

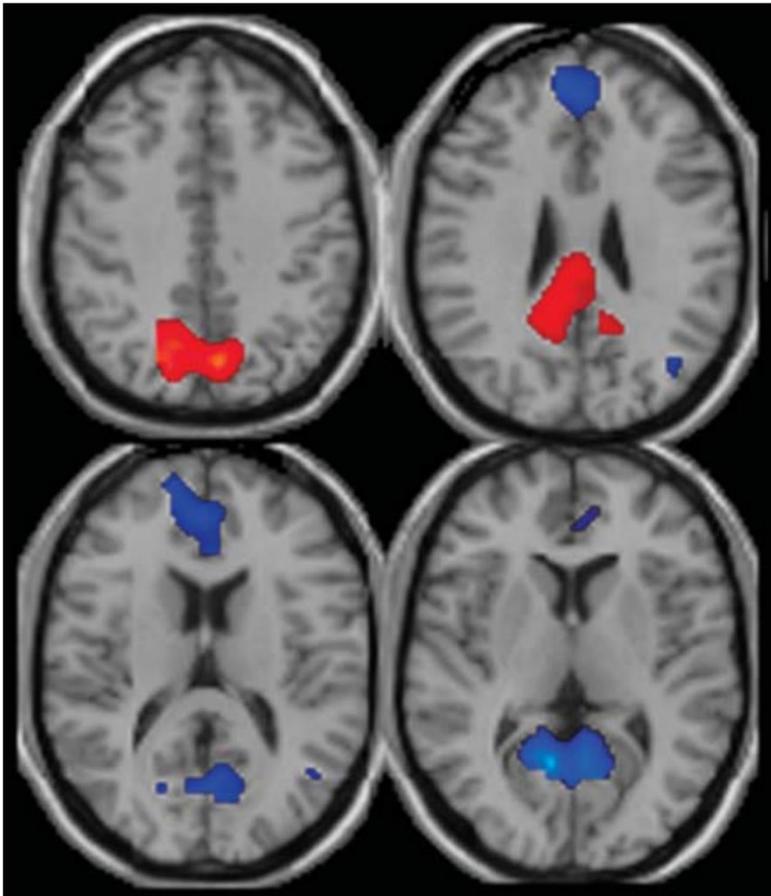


Figure 16 : Observation en imagerie fonctionnelle de l'activation des régions cérébrales formant le réseau de repos chez un groupe de sujets contrôles et chez un groupe de patients schizophrènes. Les régions du réseau de repos dont l'activation est supérieure chez les témoins en comparaison aux schizophrènes sont en rouge. A l'inverse, les régions qui sont davantage activées par les schizophrènes sont en bleu. On observe une sur activation chez les schizophrènes du cortex cingulaire et du gyrus frontal (Garrity et al., 2007).

Globalement, les principales modifications cérébrales observées dans la schizophrénie sont : une diminution de volume de structures cérébrales (notamment l'hippocampe), une augmentation de volume des ventricules cérébraux, des modifications de l'activation de certaines structures (CPF, hippocampe), des défauts de connectivité inter régions (régions frontales et temporales), une altération de la diffusion (corps calleux), des perturbations du réseau de repos (élargissement des zones concernées, réduction d'activation). Ces

1. Introduction

altérations structurales et fonctionnelles chez les schizophrènes ont essentiellement été mises en relation avec les déficits cognitifs (réduction du volume et de l'activation du CPF et de l'hippocampe) et la présence d'hallucinations (défaut de connectivité entre les zones du langage et les régions frontales).

1.5.4 Neurotransmission

Plusieurs systèmes de neurotransmission semblent jouer un rôle dans la physiopathologie de la schizophrénie. Au fil des années, ces systèmes ont été étudiés en commençant par le système dopaminergique, puis glutamatergique, sérotoninergique et GABAergique. Une revue des hypothèses liées à ces différents systèmes est présentée dans ce chapitre. D'autres systèmes de neurotransmission semblent également impliqués dans la physiopathologie de la schizophrénie, notamment les systèmes cholinergique (Moran et al., 2019; Raedler et al., 2007), endocannabinoïde (Tao et al., 2020), noradrénergique (Maletic et al., 2017) et peptidergique (Rodríguez et al., 2020). A titre d'exemple, concernant le système cholinergique, des données récentes suggèrent que les récepteurs α -7 nicotiques pourraient constituer une cible thérapeutique innovante de la schizophrénie (Xie et al., 2020).

1.5.4.1 Système dopaminergique

Historiquement, le premier système mis en cause fut le système dopaminergique (DA) (Bowers, 1974). L'hypothèse dopaminergique de la schizophrénie concerne deux voies dopaminergiques : la voie méso-limbique et la voie méso-corticale. La première voie présenterait un hyperfonctionnement, activant ainsi excessivement le système limbique (avec une transmission augmentée au niveau des récepteurs D_2 et D_3 postsynaptiques) et ayant pour conséquence les symptômes positifs. La seconde voie présenterait un hypofonctionnement, activant alors insuffisamment le CPF et provoquant des symptômes négatifs et des déficits cognitifs. Cette hypothèse est schématisée dans la

Figure 17 (Schwartz et al., 2012).

L'hypothèse dopaminergique concernant la voie méso-limbique est étayée par l'efficacité clinique des antipsychotiques (AP) antidopaminergiques, vis-à-vis des symptômes positifs. Les symptômes négatifs et les déficits cognitifs ne sont pas améliorés (mais plutôt aggravés) par ces traitements, ce qui renforce la seconde partie de l'hypothèse dopaminergique concernant la voie méso-corticale (Krogmann et al., 2020; Murphy et al., 2006).

1.5.4.2 Système glutamatergique

L'hypothèse d'un hypofonctionnement glutamatergique a été avancée suite à la constatation de l'apparition de symptômes psychotiques chez des individus sains ayant consommé des substances antagonistes des récepteurs ionotropes NMDA (ex : kétamine, PCP) (Krystal et al., 1999; Pradhan, 1984). L'hypothèse glutamatergique suggère un hypofonctionnement des récepteurs NMDA (Coyle, 1996). Plus particulièrement, un hypofonctionnement des récepteurs NMDA présents sur les interneurones GABAergiques corticaux mène à une suractivation, *via* la projection glutamatergique descendante, de la voie dopaminergique méso-limbique, induisant des symptômes positifs (voir

Figure 17 (1)). La suractivation de la voie glutamatergique descendante inhibe la voie dopaminergique méso-corticale *via* les interneurones GABAergiques du mésencéphale, ce qui peut entraîner des symptômes négatifs et des déficits cognitifs (voir

Figure 17 (2)) (Schwartz et al., 2012).

1. Introduction

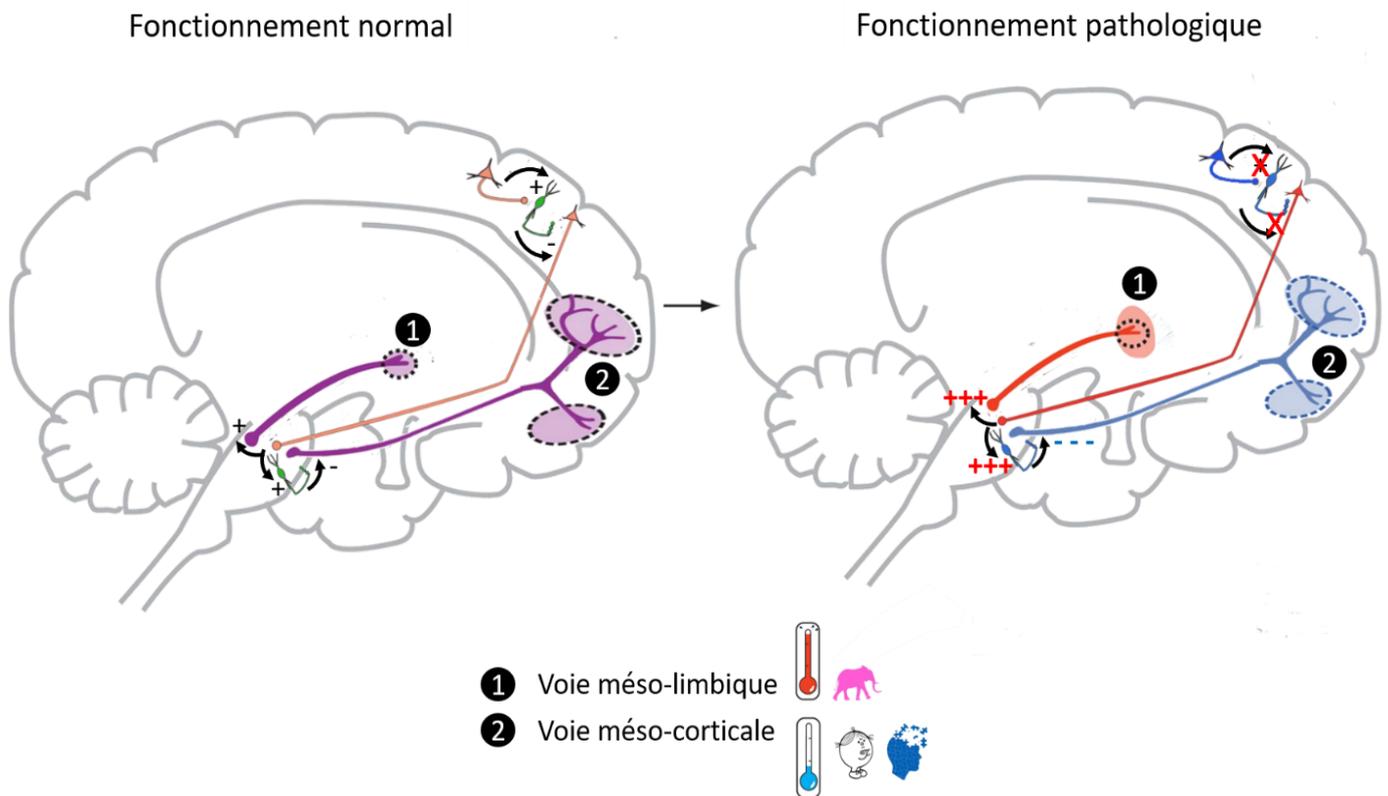


Figure 17 : Schéma représentant différentes voies de neurotransmission impliquées dans la schizophrénie. Deux principales voies dopaminergiques (en violet) et leur interaction avec le système glutamatergique (en orange) et GABAergique (en vert) dans leur fonctionnement normal (à gauche) et pathologique (à droite). La schizophrénie se caractériserait par un fonctionnement pathologique de ces systèmes : hypofonctionnement (en bleu) et hyperfonctionnement (en rouge). La voie dopaminergique méso-limbique (1) qui distribue la dopamine de l'aire tegmentale ventrale au système limbique serait en hyperfonctionnement dans la schizophrénie ce qui induirait les symptômes positifs. Cet hyperfonctionnement peut être issu d'un hypofonctionnement glutamatergique qui entraîne une diminution de l'inhibition GABAergique sur les neurones dopaminergiques. La voie dopaminergique méso-corticale (2) qui distribue la dopamine de l'aire tegmentale ventrale au cortex frontal serait en hypofonctionnement dans la schizophrénie, ce qui induirait les symptômes négatifs et les déficits cognitifs. De la même façon que pour la voie méso-limbique, les neurones glutamatergiques centraux seraient surstimulés, entraînant ainsi un hypofonctionnement dopaminergique sous-cortical via des interneurons GABAergiques mésencéphaliques. Adapté de Schwartz et al., 2012.

1. Introduction

1.5.4.3 Système GABAergique

Que ce soit par des études cliniques ou précliniques, le rôle du neurotransmetteur GABA a été mis en évidence dans la physiopathologie de la schizophrénie (Nakazawa et al., 2012; Yang & Tsai, 2017), en particulier des perturbations des interactions GABA-dopamine (Benes, 2015). Les interneurons GABA parvalbumine-positifs, particulièrement ceux du sous-type chandelier, pourraient être particulièrement affectés dans le cas de la schizophrénie et d'autres maladies psychiatriques (Benes et al, 2007 ; Taylor et al, 2019). Par ailleurs, des altérations touchant ces interneurons situés dans le CPF pourraient être à l'origine de la diminution des performances de la mémoire de travail observée dans cette pathologie (Dienel and Lewis, 2019, Gonzalez-Burgos et al, 2015).

1.5.4.4 Système sérotoninergique

La sérotonine est un neurotransmetteur qui, de par l'organisation de ses voies centrales (innervation de l'ensemble du cerveau) et de sa pharmacologie (action due à l'interaction avec 14 sous-types de récepteurs différents) joue un rôle modulateur et régulateur de nombreux autres systèmes de neurotransmission. L'hypothèse sérotoninergique de la schizophrénie est fondée sur le fait qu'une transmission sérotoninergique excessive à partir du noyau dorsal du raphé (DRN pour « *Dorsal Raphe Nucleus* ») en réponse au stress (Eggers, 2012), pourrait perturber la fonction des neurones corticaux. Ainsi, le DRN serait suractivé sur une longue période de temps. La transmission sérotoninergique serait donc intensifiée dans le cortex cérébral (plus particulièrement le cortex cingulaire antérieur et le lobe frontal dorso-latéral) ce qui pourrait être une cause des symptômes de la pathologie (Eggers, 2013).

1.5.5 Plasticité cérébrale

La plasticité cérébrale est définie comme l'ensemble des mécanismes au cours desquels le cerveau est capable de se modifier en réorganisant les connexions et les réseaux neuronaux, dans la phase embryonnaire du développement ou lors d'apprentissages (Inserm, 2020). Elle peut être structurelle (neurogenèse, synaptogenèse, etc.) ou fonctionnelle (potentialisation à long et court terme, respectivement PLT et PCT) et concerner les neurones ou la glie. La modification de plusieurs formes de plasticité cérébrale serait impliquée dans la schizophrénie, c'est le cas notamment de la neurogenèse et de la PLT.

1.5.5.1 Neurogenèse

La neurogenèse adulte est largement démontrée chez plusieurs espèces de mammifères dont l'humain, notamment dans l'hippocampe (Boldrini et al., 2018; Moreno-Jiménez et al., 2019; Sorrells et al., 2018). Concernant la schizophrénie, plusieurs éléments faisant le lien entre modifications de la neurogenèse hippocampique et cette pathologie peuvent être avancés (Schoenfeld & Cameron, 2015). L'hippocampe est une structure impliquée dans la schizophrénie (Antonova et al., 2004; Tamminga et al., 2010), notamment parce qu'elle présente une réduction de volume chez les patients (Nelson et al., 1998). De plus, cette structure est impliquée dans des fonctions qui sont altérées dans la schizophrénie, notamment la mémoire. Des études précliniques montrent une diminution de la neurogenèse dans plusieurs modèles de schizophrénie chez les rongeurs. Par exemple chez les animaux « *knock-out* » (KO) des gènes DISC (« *Disrupted in schizophrenia 1* ») (Duan et al., 2007) et NPAS3 (« *Neuronal PAS domain protein 3* ») (Kamnasaran et al., 2003; Pieper et al., 2005), chez des animaux ayant subi une lésion néonatale de l'hippocampe ventral (Tian et al., 2016), chez le modèle MAM (Flagstad et al., 2005; Johnston & Coyle, 1979)). De plus, l'administration de certains antipsychotiques chez ces modèles animaux semble pouvoir induire un effet neurogénique (Schoenfeld & Cameron, 2015; Toro & Deakin, 2007) qui pourrait participer aux effets bénéfiques du traitement.

1.5.5.2 Plasticité fonctionnelle

L'électrophysiologie permet d'explorer des formes de plasticité fonctionnelle, notamment les mécanismes de PLT basée sur la transmission glutamatergique. Cette forme de plasticité, considérée comme le mécanisme sous-tendant l'apprentissage et la formation de nouveaux souvenirs, s'observe par l'augmentation des réponses des récepteurs NMDA post synaptiques après l'induction d'un *stimulus* conditionnant (à haute fréquence), et ce à long-terme.

Chez les schizophrènes on observe une réduction de la PLT dans le cortex (Frantseva et al., 2008; Hasan et al., 2011). Dans les études précliniques la PLT est mesurée le plus souvent dans l'hippocampe grâce à des électrodes implantées. Elle est diminuée dans plusieurs modèles animaux de schizophrénie, par exemple après un isolement social (Roberts & Greene, 2003), une délétion du gène dysbidin-1 (Glen et al., 2014), ou un traitement avec du MK801 (un antagoniste des récepteurs NMDA) (Manahan-Vaughan et al., 2008)).

1.5.6 Inflammation

Plusieurs études montrent qu'une altération du fonctionnement du système immunitaire pourrait être impliquée à plusieurs niveaux dans la schizophrénie. Tout d'abord, des études ont montré une association entre certains gènes (ex : un polymorphisme du MHC pour « complexe d'histocompatibilité majeur » (Yu et al., 2017)) impliqués dans la régulation des réponses inflammatoires et le risque de développer une schizophrénie (Miller & Goldsmith, 2019). Ce risque est également augmenté en présence d'infections prénatales (Brown & Derkits, 2010). De plus, les schizophrènes présentent des modifications des marqueurs d'inflammation cérébrale mises en évidence par des études *post-mortem*, notamment au niveau des cellules gliales (ex : expression de GFAP (« *glial fibrillary acidic protein* »)), des cytokines et de la cascade de l'acide arachidonique (ex : concentrations de la protéine PGES (« *prostaglandin E synthase*»)) (Trépanier et al., 2016). Un dernier point sous-tendant l'implication des phénomènes inflammatoires dans la schizophrénie est la diminution des symptômes psychotiques, notamment positifs, après administration d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (Nitta et al., 2013). Miller et Goldsmith ont étudié la possibilité d'utiliser l'inflammation comme biomarqueur de la schizophrénie dans une récente revue de la littérature dans laquelle ils mettent l'accent sur l'hétérogénéité de ce phénomène chez les schizophrènes. Ils proposent un schéma d'explication potentiel des mécanismes reliant les processus d'inflammation et la schizophrénie. Leur hypothèse met en jeu une interaction entre une altération de l'allostase et des mécanismes épigénétiques qui induisent une inflammation d'abord périphérique puis centrale (Miller & Goldsmith, 2019).

1.6 Traitements

Avant l'utilisation de traitements médicamenteux, les psychoses étaient prises en charge par des actes invasifs comme la thérapie électro convulsive. Les patients pouvaient également être contraints physiquement par des camisoles de force.

Les premiers antipsychotiques sont apparus dans les années 50 et les recherches se poursuivent encore actuellement pour améliorer ces traitements médicamenteux. En parallèle et à partir du 21^{ème} siècle, des traitements non médicamenteux sont étudiés. Les chapitres ci-dessous décrivent les différents traitements non médicamenteux existants, puis un historique du développement des antipsychotiques.

1.6.1 Traitements non médicamenteux

1. Introduction

1.6.1.1 Thérapie électro convulsive

Cette thérapie est utilisée pour le traitement de la schizophrénie depuis les années 40, elle consiste en l'administration répétée de courant électrique sur le crâne. Une certaine efficacité a été démontrée, avec une variabilité importante entre les patients et des résultats plus encourageants dans certains sous types de la pathologie comme la schizophrénie catatonique (Gralnick, 1946; Palmer et al., 1951). Ce traitement est abandonné avec l'arrivée des antipsychotiques, puis réapparaît dans les années 60 pour traiter les patients résistants à ces traitements médicamenteux (Fink & Sacklem, 1996; Krepela et al., 2019).

1.6.1.2 Stimulation Magnétique Trans-crânienne (rTMS)

La rTMS a montré son efficacité pour le traitement des hallucinations auditives dès 1999 par Hoffman (Hoffman et al., 1999). Cette stimulation non invasive peut être réalisée à basse (1Hz) ou haute fréquence (>5Hz) avec un effet respectif de diminution et d'augmentation de l'excitabilité corticale ce qui permettrait de traiter les symptômes positifs et négatifs de la schizophrénie (Poulet et al., 2010). Ce traitement non médicamenteux est utilisé actuellement pour soigner les patients, bien que les résultats restent hétérogènes (Dollfus et al., 2016; Sciortino et al., 2021).

1.6.1.3 Activité physique

L'utilisation de programmes d'activité physique adapté (APA) chez les schizophrènes permet d'améliorer leur santé physique et mentale. A cause des effets secondaires des antipsychotiques qui induisent souvent une prise de poids (Correll et al., 2015) et une sédentarité plus importante chez les schizophrènes (Von Hausswolff-Juhlin et al., 2009), cette population est particulièrement à risque de développer des pathologies cardiovasculaires (De Hert et al., 2011) ce qui accroît l'intérêt de l'utilisation de programmes APA (Chalfoun et al., 2016; Vancampfort et al., 2015). L'APA permet d'améliorer les symptômes positifs, négatifs (Dauwan et al., 2016; Firth et al., 2015) et les déficits cognitifs (Firth et al., 2017).

1.6.1.4 Psychothérapie

La psychothérapie consiste en une rencontre entre un patient et un thérapeute (généralement psychologue ou psychiatre) et peut se définir par une procédure permettant de modifier les sensations, la cognition, les attitudes et les comportements gênants pour le

1. Introduction

patient (traduction issue de la définition de Hans Strupp en 1978) (Strupp, 1978). Cette technique est utilisée depuis le 20^{ème} siècle, d'abord comme traitement principal de la schizophrénie puis pour traiter les symptômes résiduels après l'apparition des antipsychotiques (Dickerson & Lehman, 2006). Diverses formes existent comme la thérapie cognitivo-comportementale, la thérapie familiale, l'approche psychanalytique, *etc.* Les effets sont variables selon le patient, la technique utilisée et le praticien. Cependant, des bénéfices apparaissent comme un support émotionnel permettant une meilleure gestion de la pathologie, une amélioration des stratégies d'adaptation et une diminution des symptômes (Dickerson & Lehman, 2006).

1.6.2 Traitements médicamenteux (antipsychotiques)

Bien que les premiers traitements médicamenteux de la schizophrénie aient été mis sur le marché dans les années 1950 et que de nouvelles molécules continuent d'être développées et commercialisées (voir Figure 18), l'efficacité des antipsychotiques actuellement sur le marché reste parcellaire. En effet, certains patients (environ 30%) présentent une résistance aux traitements (Lindenmayer, 2000; Sheitman & Lieberman, 1998). De plus, ces traitements ne prennent pas en charge certains symptômes (en particulier les symptômes négatifs et les déficits cognitifs) et ont même des effets délétères sur ces derniers (Bost, 2016; Tandon, 2002).

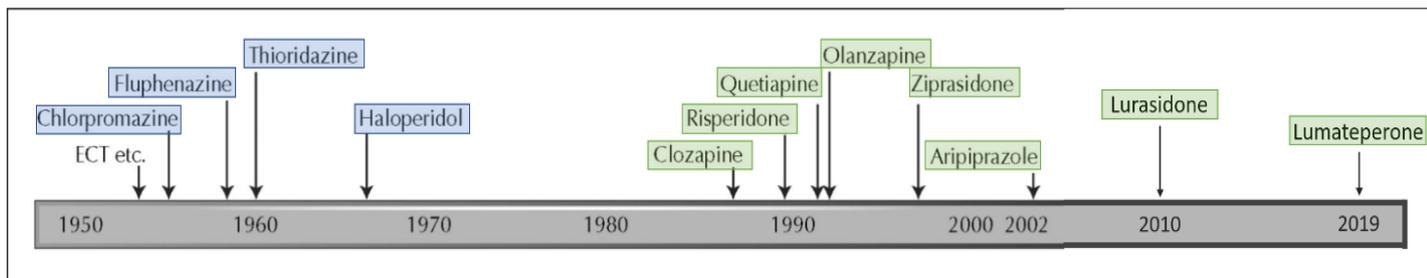


Figure 1. Current antipsychotic therapies. First-generation conventional versus second-generation atypical antipsychotic drugs. ECT—electroconvulsive therapy.

Figure 18 : Dates de mise sur le marché des principaux antipsychotiques aux USA. Adapté de Tandon, 2002 (Greenwood et al., 2020; Jaeschke et al., 2016).

Les premiers antipsychotiques (dits typiques ou de première génération), appelés aussi neuroleptiques (en 1955, Jean Delay et Pierre Deniker créent le nom de neuroleptique « qui prend », « qui saisit » le nerf, ou « ayant une action neurologique »), ont été utilisés pour la première fois dans le traitement des psychoses avec la chlorpromazine (commercialisée en 1952, sous le nom de spécialité Largactil®) qui permettait de réduire l'agitation des patients et les symptômes aigus comme les hallucinations. D'un point de vue pharmacodynamique,

1. Introduction

ces antipsychotiques de première génération sont caractérisés, en particulier, par une affinité importante et un antagonisme compétitif vis-à-vis des récepteurs dopaminergiques D_2 , responsables de l'activité neuroleptique. C'est également cette action qui entraîne des effets secondaires extrapyramidaux (tremblements et dyskinésies) et une hyperprolactinémie (responsable notamment de dysfonctionnements sexuels, d'une gynécomastie chez les hommes ou d'irrégularités menstruelles chez les femmes). Jusqu'à l'apparition de la clozapine (premier antipsychotique atypique, mis sur le marché en 1971 en Europe), les schizophrènes étaient donc pris en charge par des molécules fortement sédatives aux doses thérapeutiques et ayant le défaut de générer des effets secondaires de type parkinsonien mais aussi d'amplifier les symptômes négatifs et les déficits cognitifs. L'arrivée des antipsychotiques de seconde génération (ou atypiques) a permis d'obtenir la même efficacité de traitement tout en réduisant également les symptômes négatifs (Miyamoto et al., 2012). Cette action clinique différente de celle des premiers neuroleptiques est liée à un profil pharmacodynamique différent, associant à l'antagonisme des récepteurs dopaminergiques D_2 une affinité importante vis-à-vis d'autres récepteurs d'autres systèmes de neurotransmission et en particulier des récepteurs sérotoninergiques $5-HT_{2A}$ (voir Figure 19). Chaque antipsychotique a des propriétés pharmacologiques distinctes et des effets secondaires différents (voir Figure 20). Il est donc nécessaire d'adapter le dosage pour chacun d'eux en fonction du profil des patients et de leur tolérance vis-à-vis de ces molécules.

Les déficits cognitifs sont mieux pris en charge par les antipsychotiques atypiques que par les antipsychotiques typiques (Mortimer, 1997), mais les symptômes de type négatif ne sont pas améliorés et nécessitent donc davantage de recherches (Ellenbroek & Cools, 2000; Winship et al., 2019). En parallèle du développement des antipsychotiques basés sur un antagonisme des récepteurs D_2 et $5-HT_{2A}$, d'autres pistes sont explorées. Par exemple celle de certains neuropeptides tels que la neurotensine ou la cholécystokinine, qui modulent le système dopaminergique et améliorent les déficits d'inhibition du réflexe de sursaut (Feifel et al., 1999). D'autres molécules comme des stabilisateurs de l'humeur, des agonistes du récepteur nicotinique $\alpha-7$, ou des modulateurs du système glutamatergique sont également étudiées (Amitai & Markou, 2010; Brown et al., 2014; Cannon et al., 2013; Gastambide et al., 2013; Hoffman & Basurto, 2014). Le système de neurotransmission nicotinique fait l'objet d'une revue de la littérature qui place les agonistes nicotiniques comme candidats médicaments (Tizabi, 2007).

1. Introduction

La lurasidone, commercialisée en France depuis 2014 (sous le nom de Latuda©) apporte une nouvelle propriété d'antagonisme du récepteur 5-HT₇ pouvant permettre de contrebalancer les déficits cognitifs (Enomoto et al., 2008; Horiguchi et al., 2016; Rajagopal, Massey, et al., 2016).

Système	Récepteur	Chlorpromazine	Fluphenazine	Thioridazine	Haloperidol	Clozapine	Risperidone	Quetiapine	Olanzapine	Ziprasidone	Aripiprazole	Lurasidone
Dopaminergique	D1	↓	↓	↓	?	?	?	?	?	?	?	?
Dopaminergique	D2	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓ & partial ↑	↓
Sérotoninergique	5HT1A	↓	?	?	?	?	?	?	?	↑	?	partial ↑
Sérotoninergique	5HT1D	?	?	?	?	?	?	?	?	↓	?	?
Sérotoninergique	5HT2A	↓	?	↓	?	↓	↓	↓	↓	↓	↓ & partial ↑	↓
Sérotoninergique	5HT7	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	↓
Adrénurgique	α1	↓	?	↓	?	X	?	?	?	?	X	?
Adrénurgique	α2	?	?	?	?	X	?	?	?	?	X	↓
Histaminique	H1	↓	?	?	?	X	?	?	?	?	X	?

Figure 19 : Propriétés pharmacodynamiques réceptorielles des principaux antipsychotiques. Informations issues de DrugBank.ca (DrugBank, 2020i, 2020b, 2020f, 2020j, 2020e, 2020c, 2020d, 2020h, 2020g, 2020k, 2020a). ↑ : agoniste ; ↓ : antagoniste ; ? : non connu ; X : inactif.

	Amisulpride	Aripiprazole	Chlorpromazine	Clozapine	Haloperidol	Lurasidone	Olanzapine	Quetiapine	Risperidone	Ziprasidone
Weight gain	0.2	0.17	0.55	0.65	0.09	0.1	0.74	0.43	0.42	0.1
Extrapyramidal side-effects	1.6	1.2	2.65	0.3	4.76	2.46	1	1.01	2.09	1.61
Prolactin increase	inf.0.7*	-0.22	0.16	na	0.7	0.34	0.14	-0.05	1.23	0.25
QTc prolongation	0.66	0.01	na	na	0.11	-0.1	0.22	0.17	0.25	0.41
Sedation	1.42	1.84	7.56	8.82	2.76	2.45	3.34	3.76	2.45	3.8

Figure 20 : Illustration des effets secondaires de certains antipsychotiques couramment utilisés en comparaison à un placebo (de vert : proche des effets du placebo, à rouge : effets secondaires importants). Utilisation des moyennes de Odds ratio et des différences standardisées de moyennes (Leucht et al., 2013). Na : information manquante ; * : information issue d'une seule étude.

1.7 Les modèles animaux

Une étape essentielle du développement de nouveaux médicaments est l'utilisation de modèles animaux de pathologies humaines. En effet, les molécules candidates doivent être administrées à des animaux. Non seulement pour évaluer leurs propriétés pharmacologiques et toxicologiques, mais aussi pour évaluer leur efficacité à améliorer des symptômes. Dans ce cadre, il est nécessaire de développer des modèles animaux présentant des symptômes s'apparentant à la pathologie humaine étudiée afin de mesurer l'efficacité des candidats médicaments. L'utilisation de modèles animaux a également un autre rôle, qui prend une grande importance dans les pathologies à l'étiologie inconnue comme la schizophrénie, celui d'améliorer la compréhension des mécanismes qui régissent la maladie. Un modèle doit tendre vers une bonne reproductibilité des résultats obtenus, qui

1. Introduction

ne doivent pas varier entre les environnements, les choix des protocoles de tests, et les espèces utilisées.

Pour évaluer la qualité d'un modèle animal, il est possible de se référer aux trois types de validité :

- Validité d'apparence (« *face validity* ») : un modèle doit tendre vers un isomorphisme avec la pathologie étudiée. C'est-à-dire que le modèle animal doit présenter des symptômes identiques à ceux de la pathologie humaine, malgré les différences anatomiques et physiologiques. Dans le cadre de la schizophrénie, avoir une bonne validité d'apparence correspond, d'une part, au fait d'observer des symptômes comportementaux dits de type positif et négatif (ce terme « de type » est utilisé pour rendre compte de l'impossibilité d'attester de la réelle correspondance entre les symptômes animaux et les symptômes humains) et des déficits cognitifs. D'autre part, au fait d'observer des marqueurs anatomiques et fonctionnels correspondant à la pathologie. On peut observer par exemple une altération des systèmes de neurotransmissions dopaminergique, glutamatergique et GABAergique, notamment une diminution de la densité des interneurons à parvalbumine ; des altérations morphologiques comme une diminution du volume des hippocampes et une augmentation du volume des ventricules latéraux ; une altération de la myélinisation, notamment des fibres du corps calleux, *etc.* (Winship et al., 2019).
- Validité de construction (« *construct validity* ») : ce critère porte sur la construction du modèle, qui doit correspondre à la construction de la pathologie étudiée. Dans le cadre de la schizophrénie, l'étiologie étant inconnue, avoir une bonne validité de construction correspond au fait de prendre en compte l'étiologie multifactorielle de la pathologie et d'utiliser des éléments conditionnant qui s'apparentent aux facteurs qui augmentent les risques d'être schizophrène.
- Validité de prédiction (« *predictive validity* ») : un modèle doit tendre vers une sensibilité aux traitements existants telle que retrouvée chez les humains atteints de la pathologie. C'est-à-dire que l'utilisation de médicaments prescrits en clinique doit contrer les symptômes s'apparentant à la maladie sur le modèle animal, dans la limite de l'analogie inter-espèce. Dans le cadre de la schizophrénie, avoir une bonne validité de prédiction correspond au fait de pouvoir améliorer les symptômes observés par l'administration d'antipsychotiques, dans la limite du spectre d'action de ces médicaments. Cependant, les antipsychotiques actuels n'étant que peu ou

1. Introduction

pas efficaces sur les symptômes négatifs et les déficits cognitifs, il est donc difficile d'évaluer la validité de prédiction sur ces types de symptômes.

1.7.1 Les modèles animaux de schizophrénie

Même si des pistes prometteuses existent en matière de traitement de la schizophrénie, notamment avec la lurasidone (Meltzer et al., 2020), il est nécessaire de poursuivre les recherches à ce sujet. Le développement de nouveaux médicaments suit un processus très encadré permettant une sécurisation des molécules mises sur le marché.

Le développement d'un modèle animal de schizophrénie est par nature complexe, voire même impossible, d'abord parce que l'étiologie de la pathologie est inconnue. Comment peut-on alors induire une pathologie dont on ne connaît pas la cause ? Heureusement, il est possible de mimer les facteurs de risques dont un certain nombre sont connus, qu'ils soient génétiques, lésionnels, environnementaux ou encore pharmacologiques pour essayer de provoquer des symptômes semblables chez l'animal. Une autre difficulté s'impose, celle de la détection des symptômes. En effet, il existe une grande variabilité de symptômes au sein de la schizophrénie ainsi qu'une grande variabilité inter-individuelle vis-à-vis de ces symptômes, le diagnostic est donc complexe. De plus, ce diagnostic repose très souvent par la modalité verbale (ex : tests psychométriques) qui ne peut être employée chez l'animal. Il faut donc utiliser diverses approches, comme des tests comportementaux pouvant mesurer des fonctions qui s'apparentent à celles qui sont perturbées chez les schizophrènes, ou encore des mesures physiologiques pouvant mettre en évidence des altérations structurales / fonctionnelles à différents niveaux (moléculaire, cellulaire, macroscopique) qui sont observées chez les patients. Pour pallier à la variabilité des symptômes de la schizophrénie et avoir une réelle opportunité de modéliser cette pathologie, l'utilisation de certaines espèces est préférée. En effet, la grande majorité des modèles animaux de pathologies humaines, dont les modèles de schizophrénie, est réalisée chez le rongeur, ce qui permet, *via* un hébergement très standardisé et des animaux génétiquement proches (ce point est exacerbé lors de l'utilisation d'animaux consanguins) de réduire la variabilité entre les animaux. La *Figure 21* représente les différents éléments permettant d'évaluer les trois types de validité d'un modèle de schizophrénie.

1. Introduction

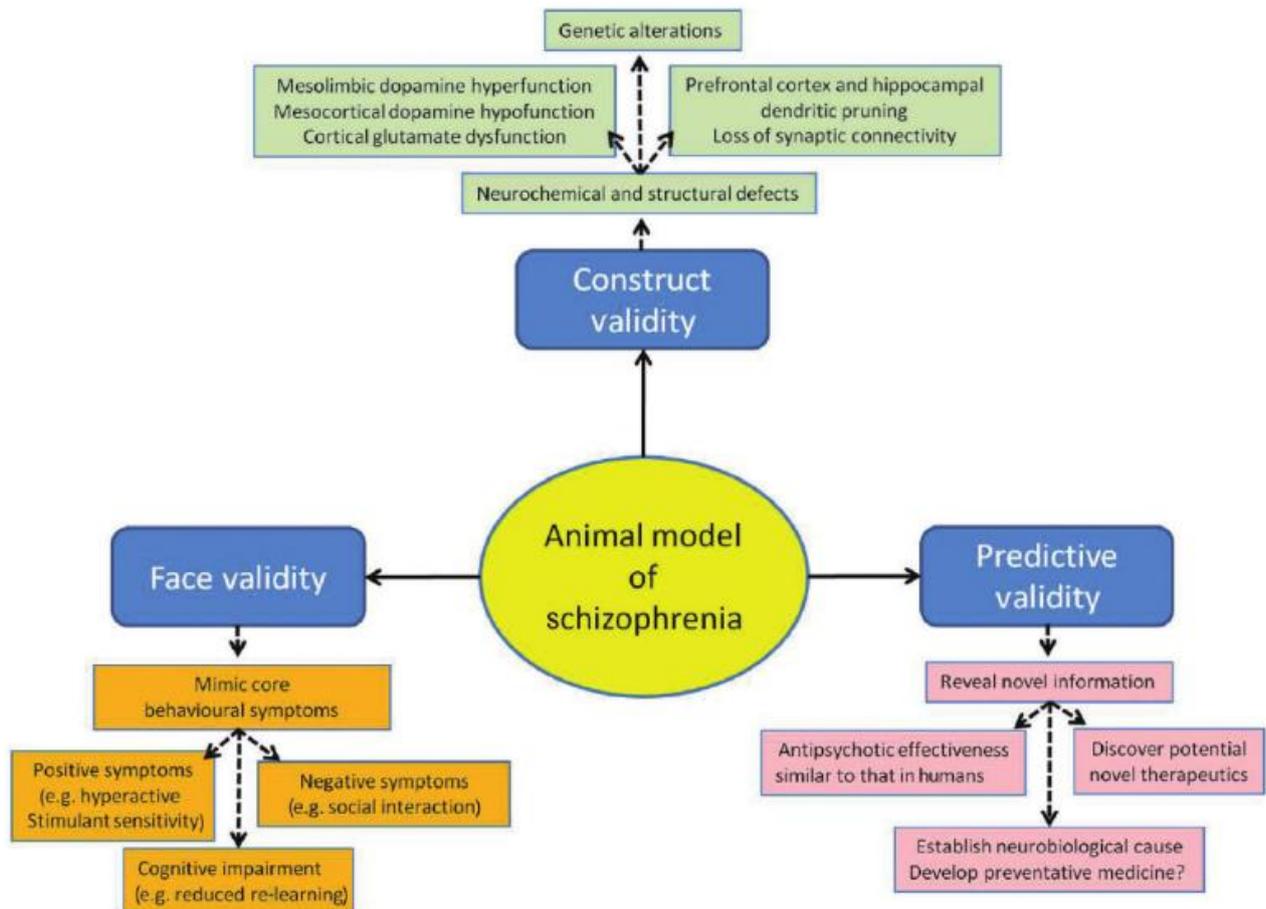


Figure 21 : Schéma présentant les éléments comportementaux, neurochimiques et structuraux clefs permettant d'évaluer la validité des modèles animaux de schizophrénie et présentant un caractère translationnel. Issu de Jones et al., 2011.

Malgré ces obstacles, de nombreux modèles animaux de la schizophrénie existent. Ils ont chacun des avantages et des inconvénients et présentent différents niveaux d'adéquation aux critères imposés par les trois types de validité. Un exemple de construction de modèle de schizophrénie est présenté sur la Figure 22.

1. Introduction

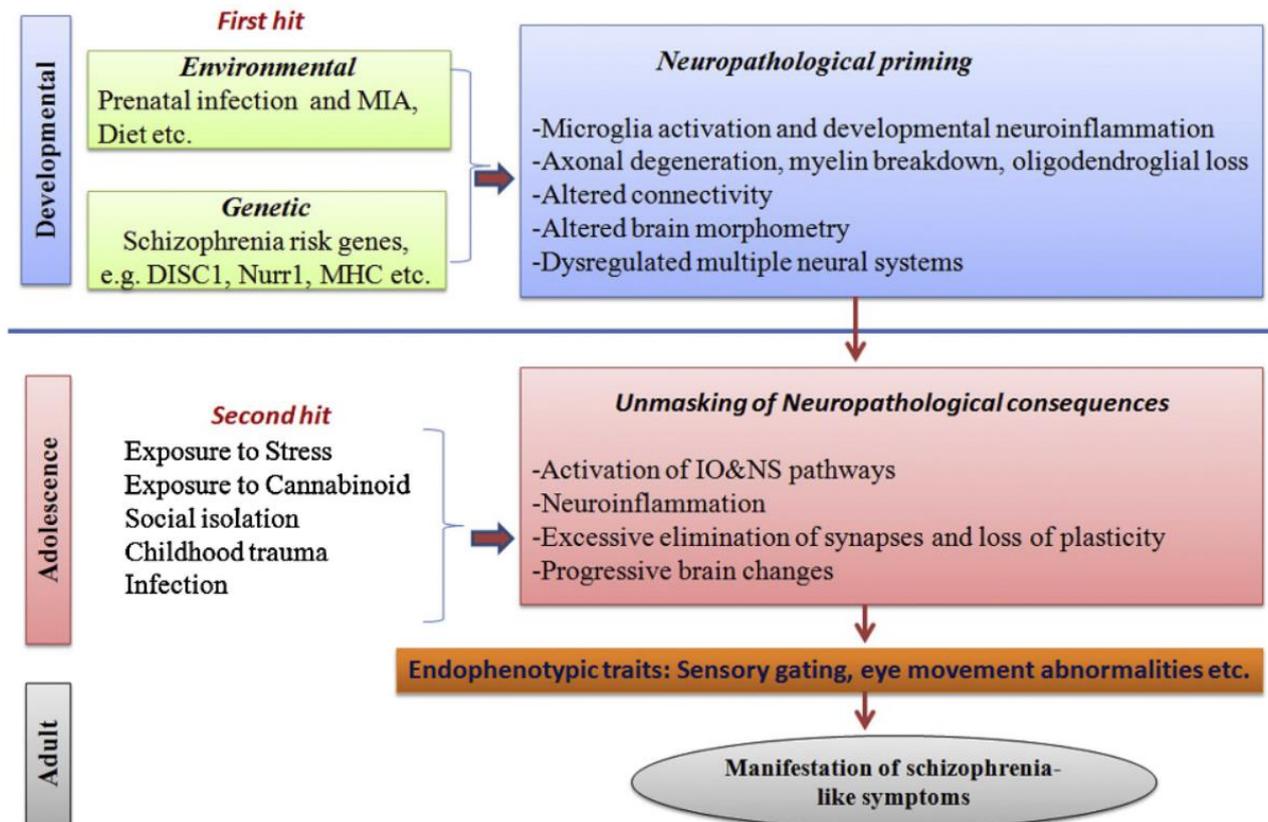


Figure 22 : Schéma d'un modèle multifactoriel de schizophrénie prenant en compte 2 facteurs. MIA : « prenatal immune activation » ; DISC1 : « disrupted in schizophrenia 1 » ; Nurr1 : « nuclear receptor related 1 » ; MHC : « major histocompatibility complex » ; IO&NS pathway : Immune-inflammatory and Oxidative pathway and Nitrosative Stress pathway. Issu de Debnath et al., 2015.

Les premières études portant sur des modèles animaux de schizophrénie ont été publiées dans les années 1970 et le nombre de modèles étudiés n'a cessé d'augmenter depuis. Une revue chronologique de la littérature des modèles animaux de schizophrénie est présentée ci-dessous, sous l'angle des trois types de validité.

1.7.2 Validité d'apparence

Ce type de validité, appelée aussi phénoménologique, renvoie à l'isomorphisme entre les symptômes et marqueurs biologiques observés dans une pathologie chez l'humain et les symptômes et marqueurs mimés chez les animaux. Certains symptômes sont très difficiles à observer chez les animaux puisqu'une grande partie du diagnostic de schizophrénie se fait sur la base d'entretiens cliniques ou de tests psychométriques utilisant la fonction langagière. Des tests comportementaux sont donc utilisés pour quantifier certains comportements qui sont associés aux symptômes positifs et négatifs de la schizophrénie. On utilise alors chez l'animal les termes de symptômes « de type » positif et « de type » négatif. Les symptômes positifs comprennent les hallucinations et pensées délirantes, observables *via* le langage chez les humains. Ces symptômes seraient provoqués par une hyperdopaminergie méso-limbique qui induit une hyperlocomotion et des stéréotypies chez l'animal. Ces deux éléments sont donc considérés comme des symptômes de type positif (Jones et al., 2011). Les symptômes négatifs correspondent à des déficits sociaux et un appauvrissement émotionnel, voire un état de type dépressif. Chez l'animal, des tests sociaux peuvent être utilisés chez les espèces sociales comme les rongeurs (rat, souris) ou les primates (marmouset). Des tests de désespoir comportemental (test de suspension par la queue pour les rongeurs) ou d'anhédonie (test de préférence au sucrose) permettent d'observer des symptômes de type négatif. Concernant les déficits cognitifs, de nombreux tests permettent de mesurer les fonctions mnésiques (mémoire de travail, mémoire à long terme, mémoire spatiale, cognition sociale, *etc.*) et exécutives chez l'animal (Jones et al., 2011). La quantification de neurotransmetteurs, l'observation anatomique et fonctionnelle du système nerveux central aux niveaux moléculaire, cellulaire et systémique, sont autant d'outils permettant d'attester de la bonne validité d'apparence des modèles animaux. Le développement des techniques d'imagerie, notamment avec les imageurs petits animaux, est un élément essentiel pour l'étude des modèles animaux de schizophrénie. Avec l'avènement de techniques d'expérimentation de plus en plus riches et complexes, la recherche des symptômes mimant ceux de la schizophrénie a évolué au cours du temps.

De 1970 à 1980 : symptômes de type positif

Les premiers modèles animaux de schizophrénie dans les années 1970 utilisaient des agents pharmacologiques. L'évaluation des symptômes et déficits portait principalement sur les symptômes de type positif, avec une attention particulière sur l'hyperlocomotion et les stéréotypies (Borison & Diamond, 1978; Borison et al., 1977; Boullin, 1979; Ridley et al., 1979; Sudilovsky, 1975). Cependant, certaines études de la même période évaluaient déjà les déficits sociaux (Gambill & Kornetsky, 1976; Ridley et al., 1979).

De 1980 à 1990 : élargissement de la gamme des symptômes comportementaux

A partir des années 1980, des études de biochimie apparaissent, avec diverses méthodes de quantification des neurotransmetteurs, de leurs enzymes, leurs métabolites et leurs précurseurs (Donaldson et al., 1982; Mamelak et al., 1985; Vilkov et al., 1983). D'autres méthodes d'observation du système nerveux central sont utilisées, comme des mesures anatomiques (ex : élargissement des ventricules cérébraux (Kline & Reid, 1985)) ou fonctionnelles (mesure de la consommation cérébrale de glucose (Orzi et al., 1983; Sokoloff et al., 1977)). A cette époque, les analyses comportementales se focalisent toujours essentiellement sur l'hyperlocomotion et les stéréotypies (Ellenbroek et al., 1989; Kline & Reid, 1985; Kokkinidis & Anisman, 1981). Des analyses de plus en plus fines des comportements sociaux viennent s'ajouter (Ellenbroek et al., 1989). On observe aussi des mesures des processus d'inhibition, d'apprentissage et d'attention (Braff & Geyer, 1980; Oades, 1982; Weiner et al., 1984), des comportements agressifs et des processus impliqués dans les émotions (ex : tests de conditionnement aversif) (Kline & Reid, 1985; Weiner et al., 1984). Certaines études mettent en relation les mesures comportementales et physiologiques (Ellenbroek et al., 1989; Kline & Reid, 1985).

De 1990 à 2000 : l'inhibition sensorielle

Dans les années 1990, des études comportementales complémentaires sont développées. Le filtrage sensoriel, notamment mesuré grâce à l'inhibition du réflexe de sursaut, devient un élément clef pour attester de la validité d'un modèle animal de schizophrénie (Basińska, 1994; Lipska et al., 1995; Swerdlow et al., 1995). Les dosages de neurotransmetteurs se poursuivent, ainsi que les observations anatomiques ou fonctionnelles (les techniques principalement utilisées sont l'histologie et l'électrophysiologie). L'hippocampe est une zone particulièrement ciblée (Feldon & Weiner, 1992; Scheibel & Conrad, 1993) et fait l'objet d'études qui mettent en relation les mesures comportementales et physiologiques (Bertolino, 1999; Feldon & Weiner, 1992), notamment des déficits d'apprentissage et de mémoire corrélés à des altérations du lobe temporal médian (Arnold, 1997). Les études portant sur les neurotransmetteurs suivent l'avancée des technologies et s'intéressent à des cibles précises, comme par exemple le récepteur glutamatergique ionotrope AMPA dont l'activation est responsable d'une réduction d'inhibition sensorimotrice *via* le système dopaminergique (Wan et al., 1995).

De 2000 à 2010 : études mécanistiques

A partir de 2000, les études précliniques mettent en œuvre de plus en plus de techniques d'observation du système nerveux central et de son fonctionnement. Cela permet d'améliorer la validité d'apparence puisque les correspondances entre humain et animal sont plus évidentes au niveau mécanistique qu'au niveau comportemental. La dopamine fait toujours l'objet d'études, notamment dans le cadre de l'inhibition latente qui est altérée par une administration d'amphétamine (Weiner, 2003). On découvre également que le système sérotoninergique est également impliqué dans la schizophrénie, avec une diminution de la concentration de sérotonine dans le cervelet suite à une infection prénatale (Winter et al., 2008). D'autres cibles sont étudiées, comme par exemple la molécule d'adhésion cellulaire neureguline 1 (NRG1) et son récepteur ErbB4 dont les concentrations sont augmentées dans l'hippocampe et le CPF dans un modèle d'administration chronique de MK801 chez le rat (Feng et al., 2010).

De 2010 à aujourd'hui : vers des caractérisations comportementales et physiologiques de plus en plus larges

L'observation d'un déficit au test d'inhibition sensorielle continue d'être un élément clef pour valider un modèle de schizophrénie (Khan & Powell, 2018). Par ailleurs, la recherche de déficits lors des tests comportementaux mesurant les performances de sociabilité et de mémoire, attestent que la recherche préclinique dans le domaine de la schizophrénie inclut la mise en évidence des symptômes de type négatif et les déficits cognitifs, qui sont des symptômes contre lesquels les antipsychotiques sont peu efficaces (Jones et al., 2011). Une diminution de la densité des interneurons GABAergique à parvalbumine devient également l'un des éléments histopathologiques clefs des modèles de schizophrénie. On observe par exemple une diminution de cette densité dans le CPF et l'hippocampe dans un modèle d'infection prénatale associée à un stress précoce et dans un modèle d'exposition prénatale à l'acétate de méthylazoxyméthanol (MAM) (Du & Grace, 2016; Giovanoli et al., 2014).

Actuellement, les éléments qui déterminent la validité d'apparence des modèles animaux de schizophrénie sont décrits dans la Figure 23 (Winship et al., 2019) et peuvent être résumés ainsi :

- Hyperlocomotion (symptômes de type positif),
- Absence de préférence pour le sucrose et déficits sociaux (symptômes de type négatif),
- Déficiences d'inhibition comportementale et de mémoire (déficiences cognitives),
- Mesures morphologiques et physiologiques comme l'élargissement des ventricules cérébraux, une altération de la morphologie du cortex, du striatum, du thalamus et des aires limbiques, une altération de la myélinisation, des cellules gliales, ou encore des systèmes de neurotransmission.

Tout comme pour la validité de construction, la validité d'apparence des modèles animaux s'affine au fil des ans, notamment avec l'élargissement de la gamme des mesures comportementales aux symptômes de type négatif et aux déficits cognitifs ainsi que les mesures morphologiques et physiologiques.

1. Introduction

Category	Measure	Description
Behavioural	Locomotor activity (positive symptoms)	Vigor of movement in response to a novel environment, stress, or pharmacological challenge (dopamine enhancers, NMDA receptor antagonists) is quantified.
	Sucrose preference (negative symptoms)	Preference for sweetened water over unsweetened water is measured.
	Social interaction (negative and cognitive symptoms)	Time spent in close proximity or direct contact with an unfamiliar or less familiar animal.
	Latent inhibition (attentional processes, cognitive symptoms)	A classical conditioning procedure whereby previously unreinforced stimuli are slower (less efficient) in generating a conditioned response than novel stimuli.
	Memory (cognitive symptoms)	Many tests have been validated to measure various aspects of working memory, declarative memory, recognition memory (visual, spatial, and olfactory domains), and conditioning.
	Reasoning and problem solving (cognitive symptoms)	Tests of behavioural flexibility in response to dynamic environments include set shifting and reversal learning.
	Prepulse inhibition (sensorimotor deficits)	A reduction in the acoustic startle response is typically observed if the startling stimulus is preceded close in time by a low-intensity prepulse.
	Anxiety-like behaviour	Patterns of exploration in environments such as the elevated plus maze, open field, or light-dark box.
Morphological/ physiological	Enlarged lateral ventricles	Measurements of the volume of lateral ventricles using in vivo imaging techniques such as magnetic resonance imaging or postmortem analysis.
	Morphology of cortical, striatal, thalamic, and limbic areas	Includes measures of size/volume of brain areas, numbers of neurons, dendritic changes, and synaptic proteins.
	Myelination	Assessment of the extent of myelination, particularly of cortical axons.
	Glial cells	Changes in microglia, oligodendrocytes, and astrocytes are commonly studied.
	Integrity of extracellular matrix	Alterations in structures such as perineuronal nets and proteins, including reelin.
	Neurotransmitter-related alterations	Effects on dopamine, glutamate, serotonin (5-HT), GABA (notably parvalbumin-containing interneurons), glycine, D-serine, and neuroactive steroids.
Patterns of brain activity	Neural activity, dopamine neuron, activity, and patterns of oscillatory activity are measured using in vitro and in vivo electrophysiology techniques.	

While these measures relate to schizophrenia, it should be noted that none are exclusive for the disorder.¹⁶ See in-text citations for specific references to the measures listed.

GABA, gamma-aminobutyric acid; 5-HT, 5-hydroxytryptamine; NMDA, N-methyl-D-aspartate.

Figure 23 : Paramètres comportementaux et morphologiques / physiologiques attendus dans un modèle de schizophrénie. Issu de Winship et al., 2019.

1.7.3 Validité de construction

Une revue chronologique des modalités de construction des modèles animaux de schizophrénie est décrite ci-après, ce qui comprend les espèces utilisées, les caractéristiques (comme le sexe) des animaux, les types de facteurs utilisés.

De 1970 à 1980 : les premières études

Les premiers modèles ont utilisé le rat comme espèce privilégiée (Braff & Geyer, 1980; Stille & Sayers, 1975) bien que quelques études chez le chat (Sudilovsky, 1975) et les primates (Ridley et al., 1979) aient été également publiées. Ces modèles ont utilisé une approche pharmacologique en administrant des drogues connues pour déclencher des symptômes de type positif telles que l'amphétamine (Gambill & Kornetsky, 1976; Ridley et al., 1979; Sudilovsky, 1975), la morphine (Stille & Sayers, 1975), ou encore le diéthylamide de l'acide lysergique ou LSD (Braff & Geyer, 1980).

1. Introduction

De 1980 à 1990 : L'hypothèse neurodéveloppementale

Dans les années 1980 de nouvelles approches sont apparues, notamment le fait d'administrer des agents pharmacologiques (dopamine, lysophosphatidylcholine, immunoglobuline G) directement dans le cerveau (par voie intraventriculaire, intrathécale) (Dubach & Bowden, 1983; Kline & Reid, 1985; Vilkov et al., 1983). Des modèles lésionnels non pharmacologiques ciblant par exemple l'aire tegmentale ventrale ont également été utilisés (Kirkpatrick & Buchanan, 1990; Oades, 1982). Les toutes premières études prenant en compte l'hypothèse neuro-développementale de la schizophrénie sont également publiées (intoxication néonatale au manganèse chez le rat : Donaldson et al., 1982), bien que les modèles de lésions cérébrales précoces ne soient plus largement utilisés qu'à partir de 1985 (Robert & King, 1988; Weinberger, 1987). Jusqu'en 1980 les modèles pharmacologiques se focalisent sur des administrations aiguës, et les administrations chroniques commencent à être effectuées à partir de 1980 (Braff & Geyer, 1980; Kokkinidis & Anisman, 1981; Orzi et al., 1983).

A partir de 1985, on voit apparaître un nouveau type de modèle animal basé sur la sélection de critères comportementaux. Par exemple des rats ayant une propension plus élevée à la catatonie, symptôme considéré comme modélisant un type de schizophrénie, présentent une augmentation de certains processus oxydatifs ce qui est une piste pour la compréhension des mécanismes impliqués dans cette pathologie (Kamyshanskaia et al., 1990). Les espèces utilisées sont quasiment uniquement des rongeurs (quelques primates, mais rarement (Barsoum et al., 1986; Ellenbroek et al., 1989)) et le modèle de rat traité à l'amphétamine fait l'objet de nombreuses études et critiques (Hollingsworth & Mueller, 1988; Mamelak et al., 1985; Robinson & Becker, 1986; Schmidt et al., 1985), ce qui va mener à des modèles plus proches de la construction de la maladie avec l'essor des modèles neurodéveloppementaux.

De 1990 à 2000 : l'hippocampe, structure cible

C'est dans les années 1990 que l'hippocampe devient une structure cible dans l'étude de la schizophrénie, notamment avec des modèles de lésions chez le rat (Halim & Swerdlow, 2000; Lipska et al., 1995; Schmajuk et al., 2000; Swerdlow et al., 1995). De plus, du fait de la progression des études génétiques qui tentent de sélectionner des gènes d'intérêt (Lipska & Weinberger, 2000; Mc Innes & Freimer, 1995; Niculescu et al., 2001), la souris commence à être utilisée de manière plus importante. En cette fin de XX^{ème} siècle, l'intérêt se porte

1. Introduction

davantage sur la perturbation précoce du système immunitaire chez les schizophrènes, ce qui entraîne l'apparition de modèles animaux d'infection néonatale (Pearce et al., 2000; Solbrig et al., 2000).

La validité de construction des modèles s'améliore, avec l'utilisation des connaissances sur l'aspect neurodéveloppemental de la schizophrénie. Cependant l'aspect multifactoriel de l'étiologie n'est pas encore pris en compte. En effet, les modèles n'utilisent qu'un élément conditionnant, qu'il soit pharmacologique, lésionnel, génétique, *etc.*

De 2000 à 2010 : l'hypothèse d'interactions gènes x environnement

C'est à partir des années 2000 que des modèles associant plusieurs facteurs apparaissent, suite au développement de l'hypothèse d'une étiologie multifactorielle de la schizophrénie qui comprend une interaction entre une prédisposition génétique et un ou plusieurs facteurs environnementaux (voir *Figure 10*) (Ellenbroek, 2003). Entre 2000 et 2010, quelques modèles à deux facteurs apparaissent, ils associent une modification génétique (NRG1 KO, Nurr-null hétérozygote, *etc.*) et un facteur pharmacologique (administration de THC) ou environnemental (isolation post natale, stress prénatal) (Boucher et al., 2007; Eells et al., 2006; Oliver & Davies, 2009).

De 2010 à aujourd'hui : les modèles multifactoriels

La réelle augmentation de la mise au point de ces modèles multifactoriels ne se fait qu'à partir de 2010 (Khan & Powell, 2018; Moran et al., 2016).

Ces modèles d'interaction gène x environnement se rapprochent sensiblement de la connaissance actuelle de l'étiologie de la schizophrénie, leur validité de construction est donc très satisfaisante. L'hypothèse d'une étiologie multifactorielle de la schizophrénie associe une prédisposition génétique à deux facteurs environnementaux, l'un précoce et l'autre tardif (voir *Figure 10*) (Ellenbroek, 2003). Ainsi, si l'on souhaite approcher au maximum des connaissances actuelles de l'étiologie de la schizophrénie, il semble pertinent de mettre au point et utiliser des modèles animaux à plusieurs facteurs, trois selon Ellenbroek (2003), avec notamment : une altération génétique (qui prédispose à la pathologie), un premier facteur environnemental précoce (qui fragilise les individus) et un second tardif (qui déclenche les symptômes). Ce type de modèle existe, mais est très peu représenté dans les études chez les rongeurs, avec uniquement deux exemples dans la littérature (Chen et al., 2011; Kekesi et al., 2015). Récemment, un troisième modèle « 3-

1. Introduction

hit » associant une mutation du gène DISC1 (« *Disrupted in schizophrenia 1* »), séparation maternelle et traitement chronique par la kétamine vient d'être publié (Sultana & Lee, 2020).

La plupart des modèles, notamment concernant les rongeurs, concernent essentiellement des animaux mâles (Feldon & Weiner, 1992; Halim & Swerdlow, 2000; Rajagopal, Massey, et al., 2016; Rots et al., 1996; Winter et al., 2008), l'étude des femelles étant considérée comme plus complexe de par la variabilité induite par les cycles hormonaux. Pourtant, cette variabilité n'est pas plus importante que celle induite par la hiérarchie sociale et les combats de territoire chez les mâles (Arakawa, 2018). De plus, des différences existent entre les hommes et les femmes dans la schizophrénie (Abel et al., 2010; Aleman et al., 2003) et l'étude les deux sexes dans les modèles animaux est encouragée (M Leger & Neill, 2016). Les modèles animaux commencent donc à prendre ce paramètre en compte (Deloulme et al., 2015; Ellenbroek et al., 2000; Ni et al., 2019) ce qui augmente leur validité de construction.

Récemment, le *zebrafish* a commencé à être considéré comme un modèle intéressant de schizophrénie. En effet, il présente plusieurs avantages comme un taux de reproduction élevé, un génome très bien connu et une transparence de son corps à certains stades larvaires qui permet des expérimentations d'imagerie non invasive. Les modèles de schizophrénie utilisant le *zebrafish* peuvent donc être utiles pour étudier l'aspect génétique de la schizophrénie ainsi que certains aspects comportementaux (Gawel et al., 2019).

En 50 ans la construction des modèles animaux de schizophrénie a beaucoup évolué. Les premières études en 1970 utilisaient une administration aiguë d'amphétamine chez le rat, puis en 1980 les administrations chroniques ont commencé à être utilisées. C'est également à cette époque que l'hypothèse neurodéveloppementale de la schizophrénie a été étudiée avec l'utilisation d'interventions précoces dans les modèles animaux. A partir de 1990, l'hippocampe a été une structure particulièrement ciblée et les modèles de schizophrénie ont commencé à délaisser le rat pour favoriser la souris grâce aux possibles manipulations génétiques chez cette espèce. Au début du 21^{ème} siècle, c'est l'hypothèse d'interactions gènes x environnement qui est développée, avec l'apparition des modèles multifactoriels, d'abord à deux facteurs, puis à partir de 2010, quelques modèles à trois facteurs.

1.7.4 Validité de prédiction

Ce type de validité renvoie à la capacité des antipsychotiques à améliorer les symptômes observés dans les modèles animaux de schizophrénie.

1. Introduction

De 1970 à 1980 : clozapine et halopéridol

Dès les années 1970, avec les tout premiers modèles animaux de schizophrénie, les antipsychotiques de première génération étaient utilisés pour tester la capacité des molécules de référence à diminuer ou supprimer les symptômes (souvent les stéréotypies et l'hyperlocomotion) induits par des agents pharmacologiques. Les antipsychotiques utilisées étaient en particulier la clozapine (Stille & Sayers, 1975) et l'haloperidol (Ridley et al., 1979).

De 1980 à 1990 : effets secondaires

Bien que l'observation des effets secondaires chez les patients ait été bien plus précoce (Labhardt, 1954), c'est dans les années 1980 que l'étude de ces effets secondaires des antipsychotiques sur des modèles animaux fait son apparition avec l'évaluation des dyskinésies (Barsoum et al., 1986; Chiu et al., 1985; Gunne et al., 1984; Rajakumar et al., 1987). Des études s'intéressent à des nouvelles molécules qui bloquent l'effet secondaire dyskinésique de l'haloperidol, comme le L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (PLG) (Chiu et al., 1985; Rajakumar et al., 1987). D'autres études portant sur plusieurs systèmes de neurotransmission évaluent les effets de nouvelles molécules pour contrebalancer les effets secondaires des antipsychotiques. Par exemple, l'utilisation d'un agoniste aux récepteurs dopaminergiques D1 est étudiée pour sa capacité à contrebalancer des symptômes de type positif et négatif chez le singe (Ellenbroek et al., 1989). Un autre exemple, le valproate de sodium, un inhibiteur de la GABA transaminase, montre des effets anxiolytiques encourageants (Raevskiï et al., 1985). On peut également citer les agonistes opioïdiques qui diminuent ou annulent les symptômes induits par l'administration d'hallucinogènes (LSD et N,N-diméthyltryptamine (DMT)) chez le rat (Domino, 1986). Ou encore des antagonistes des récepteurs sérotoninergiques 5-HT₂ qui peuvent annuler un déficit d'inhibition du sursaut chez le rat (Geyer & Braff, 1987).

De 1990 à 2000 : nouvelles cibles

Dans les années 1990, plusieurs études sur des modèles pharmacologiques chez le rongeur comparent les effets de différents antipsychotiques, de première et seconde génération, afin d'étudier les mécanismes qui sous-tendent leurs effets (Johansson et al., 1995; Noda et al., 1995; Swerdlow et al., 1998; Tiedtke et al., 1990).

1. Introduction

La clozapine étant le chef de file des antipsychotiques de seconde génération mis sur le marché, cette molécule est largement étudiée (Weiner et al., 1996). Son efficacité à contrebalancer des symptômes comme le déficit d'inhibition du réflexe de sursaut est comparée à des antipsychotiques de première génération (Hoffman, 1992; Mortimer, 1997; Swerdlow et al., 1994). D'autres molécules sont utilisées pour améliorer les déficits induits dans les modèles animaux. Sams-Dodd a testé la capacité de médicaments sédatifs, analgésiques et antidépresseurs à contrebalancer des déficits sociaux et des symptômes de type positif et a montré l'absence d'effet du diazépam, du citalopram, de la méthadone et de la naloxone sur les déficits sociaux (Sams-Dodd, 1998). Certaines études incitent à s'intéresser à la modulation de nouvelles cibles, en ciblant les systèmes sérotoninergique et cholinergique en plus du système dopaminergique (Poirier-Littré, 1992), avec notamment l'étude du blocage du récepteur sérotoninergique 5-HT_{2A} en association avec des agonistes dopaminergiques (Ellenbroek et al., 1996; Martin et al., 1997).

De 2000 à 2010 : symptômes négatifs et déficits cognitifs

Dans les années 2000, le test d'inhibition du réflexe de sursaut fait débat. Ses partisans mettent en avant la possibilité de différencier les antipsychotiques typiques et atypiques. En effet, les déficits induits dans ce test par des antagonistes des récepteurs glutamatergiques sont généralement améliorés uniquement par les antipsychotiques typiques (Moser et al., 2000; Suemaru et al., 2008). De plus, ce test permet de tester des candidats médicaments (neurotensine, acide valproïque) en les comparant aux deux générations d'antipsychotiques (Feifel et al., 2011; Feifel et al., 2004). A l'inverse, les détracteurs du test d'inhibition du réflexe de sursaut dénoncent le défaut de ce test qui ne permet pas d'évaluer les déficits cognitifs et les symptômes de type négatif. Ce qui ne permet pas d'identifier des antipsychotiques qui auraient une action sur ces symptômes (Pratt et al., 2008; Wilson & Terry, 2010).

De 2010 à aujourd'hui : comparaisons antipsychotiques typiques et atypiques

Les symptômes de type négatif sont de plus en plus étudiés (Gururajan et al., 2010; Wilson & Terry, 2010), en utilisant des antipsychotiques typiques (halopéridol, chlorpromazine), atypiques (clozapine, rispéridone) mais aussi d'autres molécules (diazépam et certains agonistes du récepteur nicotinique α -7, notamment) (Becker & Grecksch, 2004; Chindo et al., 2012; Pedersen et al., 2014; Pratt et al., 2008; Rueter et al., 2004). Les déficits cognitifs

1. Introduction

sont également davantage étudiés dans le cadre de la validité de prédiction (Amitai & Markou, 2010; Brown et al., 2014; Cannon et al., 2013; Crawley et al., 2007; Floresco et al., 2005; Gastambide et al., 2013; Hoffman & Basurto, 2014; Kostrzewa et al., 2016; Nakako et al., 2013; Pratt et al., 2008; Wilson & Terry, 2010).

Cependant, les symptômes négatifs et les déficits cognitifs ne sont toujours pas traités d'une manière optimale par les antipsychotiques (Wilson & Terry, 2010; Winship et al., 2019).

A partir de 2010, les modèles animaux multifactoriels font leur apparition mais ils sont encore peu utilisés pour étudier la validité de prédiction. Dans la revue de Moran *et al.* (2016) axée sur les modèles à deux facteurs, seules 7 études sur 29 ont testé la capacité d'antipsychotiques utilisés en clinique à améliorer les symptômes induits, les molécules de référence les plus utilisées étant la clozapine et l'halopéridol, dont les effets respectifs étaient souvent comparés (Moran et al., 2016). Aujourd'hui, il n'existe pas d'études testant la capacité d'agents pharmacologiques à diminuer l'intensité des symptômes psychotiques et des déficits cognitifs induits dans les rares modèles à trois facteurs (Chen et al., 2011; Kekesi et al., 2015; Sultana & Lee, 2020).

Des antipsychotiques nouveaux continuent d'être mis sur le marché, c'est le cas de la lurasidone (LATUDA[®], approuvée en 2010 par la FDA (Jaeschke, et al., 2016)) ou plus récemment de la lumatéperone (CAPLYTA[™], approuvée en 2019 par la FDA (Greenwood et al., 2020)). Leurs propriétés pharmacologiques (notamment l'antagonisme pour les récepteurs 5-HT_{2A}) leur confèrent une efficacité intéressante pour améliorer les symptômes de type négatif et les déficits cognitifs (Horiguchi et al., 2016; Ishiyama et al., 2007; Rajagopal, Massey, et al., 2016) ainsi que des effets secondaires réduits par rapport aux antipsychotiques déjà existants (Citrome, 2012; Greenwood et al., 2020; Jaeschke et al., 2016; Jones et al., 2020; Lieberman et al., 2016; Meyer et al., 2009). Ce sont donc ces nouveaux antipsychotiques qui ont vocation à être utilisés pour évaluer la validité de prédiction des modèles animaux de schizophrénie.

1.8 Objectifs

Au vu de ce qui a été développé dans le chapitre introductif de cette thèse, bien que l'étiologie de la schizophrénie soit multifactorielle, les modèles animaux combinant deux, voire trois facteurs, sont rarement décrits dans la littérature. Les études épidémiologiques ont mis à jour de nombreux facteurs de risque qui nous ont permis de sélectionner des facteurs pertinents pour la mise en place de plusieurs modèles multifactoriels qui ont été évalués lors de cette thèse.

Les antipsychotiques actuels ne prennent pas en charge certains symptômes, en particulier les symptômes négatifs et les déficits cognitifs. Ainsi, l'amélioration des traitements doit nécessairement passer par l'utilisation de modèles animaux pertinents présentant ces déficits. C'est pourquoi l'accent a été mis dans ce travail sur la mesure des symptômes négatifs et des déficits cognitifs.

L'objectif de cette thèse a donc été d'évaluer la pertinence d'un modèle innovant, combiné, de schizophrénie, conçu sur l'association de trois facteurs : une altération génétique, un premier facteur environnemental, précoce, et un second, plus tardif.

L'altération génétique choisie est une délétion partielle du gène MAP6, codant pour la stabilisation des microtubules (Merenlender-Wagner et al., 2010; Powell et al., 2009; Volle et al., 2013). En association avec cette délétion partielle, un stress précoce a été choisi. Celui-ci consiste en une séparation maternelle de 24h lorsque les souriceaux sont âgés de 9 jours (Bouet et al., 2011; Ellenbroek et al., 1998; Rots et al., 1996; Zimmerberg & Shartrand, 1992). Le facteur environnemental tardif consiste en une administration chronique de Δ -9-tetrahydrocannabinol (THC) (l'un des principes psychoactifs du cannabis) durant l'adolescence (du 32^{ème} jour post natal (« *post natal day* » : *PND*) au PND 52) (Khan & Powell, 2018; Moran et al., 2016).

Ce modèle appelé « 3-hit » a été construit en respectant au mieux les connaissances étiologiques de la schizophrénie, lui octroyant une bonne validité de construction. Nous avons évalué de manière approfondie sa validité d'apparence. Sa validité de prédiction a été également abordée de manière moins approfondie.

Concernant la **validité d'apparence**, des études comportementales, immunohistologiques, électrophysiologiques, et en imagerie (IRM) anatomique et de diffusion ont été réalisées. En termes de comportement, des tests ont été réalisés pour évaluer les symptômes de type positif (mesure de l'activité locomotrice), de type négatif (tests sociaux ou mesurant

1. Introduction

l'anhédonie) et les déficits cognitifs (évaluant les performances de mémoires de travail, de reconnaissance, de référence et d'apprentissage) mais également la latéralité olfactive et l'inhibition comportementale avec le test d'inhibition du réflexe de sursaut. Nous avons utilisé l'immunohistochimie pour quantifier la densité d'interneurones GABAergique positifs à parvalbumine, un paramètre cellulaire clef dans l'étude de la schizophrénie. Nous avons utilisé l'imagerie anatomique pour mesurer le volume de structures clefs comme le cortex préfrontal et l'hippocampe. Ainsi que l'imagerie de diffusion pour observer d'éventuelles altérations de l'hippocampe et du corps calleux (**article 1**). Nous avons utilisé l'électrophysiologie *ex vivo* pour étudier le système glutamatergique hippocampique et obtenir des indices physiologiques pouvant être reliés à certaines performances de mémoire pour lesquelles cette structure est impliquée. Nous avons également utilisé cette technique pour étudier le système GABAergique hippocampique dans le modèle 3-hit (**article 2**). Une autre mesure comportementale a été réalisée grâce au développement récent d'un nouveau test (**article 3**) : l'évaluation de la latéralité olfactive des souris 3-hit (**article 4**).

Concernant la **validité de construction**, l'évaluation du modèle 3-hit a été caractérisée en évaluant l'impact de la délétion partielle du gène MAP6 seule (**étude complémentaire ; supplementary results** de l'**article 1**) et sur des animaux ayant subi les deux autres facteurs du modèle 3-hit (**article 1**). Ce modèle sera également comparé à deux autres modèles, l'un à trois facteurs (délétion partielle du gène MAP6, séparation maternelle, administration sub-chronique de MK801 : **article 5**), l'autre à deux facteurs (délétion du gène de la sérine racémase (SR), séparation maternelle : **Poster, François Ménager**).

Concernant la **validité de prédiction**, nous avons choisi d'utiliser un antipsychotique pour évaluer sa capacité à contrebalancer les symptômes observés chez les animaux « 3-hit » : la lurasidone. Le choix s'est porté sur cet antipsychotique de dernière génération pour ses propriétés pro-cognitives avancées dans la littérature. Nous avons réalisé une étude permettant de caractériser les paramètres pharmacocinétiques de cet antipsychotique et son absence d'effets comportementaux délétères chez des animaux témoins (**article 6**).

1. Introduction

Ainsi, afin de caractériser le modèle 3-hit au regard des trois types de validité, nous avons réalisé plusieurs études.

Article 1 :

Pour déterminer la validité d'apparence du modèle 3-hit, et mesurer l'impact du traitement chronique au THC sur les deux autres facteurs, nous avons réalisé une large analyse comportementale ainsi qu'une étude d'imagerie et d'immunohistochimie. Cette étude a fait l'objet d'une publication dans le journal *Schizophrenia Research* en 2020 (Bouet et al., 2020).

Article 2 :

Dans le but d'étayer notre connaissance de la validité d'apparence du modèle 3-hit, notamment avec la comparaison des mâles et des femelles, nous avons réalisé une étude électrophysiologique. Un article est actuellement soumis à *International Journal of Molecular Sciences*.

Article 3 :

Pour adapter les mesures comportementales aux capacités sensorielles des animaux, nous avons développé un nouveau test comportemental permettant de mesurer la latéralité olfactive chez deux souches de souris. Un article portant sur cette étude a été publié dans le journal *Symmetry* (Jozet-Alves et al., 2019).

Article 4 :

Pour caractériser la latéralité olfactive du modèle 3-hit nous avons utilisé le test comportemental développé dans l'article 3. Un article portant sur cette étude est en cours de préparation pour le journal *Nature Protocols*.

Article 5 :

Afin de mesurer l'impact du facteur tardif sur un modèle de schizophrénie à trois facteurs comprenant la délétion partielle du gène MAP6 et une séparation maternelle, nous avons construit un autre modèle à trois facteurs (modèle « 3-M ») qui diffère du modèle 3-hit uniquement par la nature du facteur tardif. Nous avons réalisé une analyse comportementale ainsi qu'une étude en immunohistochimie permettant de mesurer la densité des interneurones GABAergiques à parvalbumine dans des structures cérébrales clefs (hippocampe et cortex préfrontal). Un article portant sur les résultats comportementaux des groupes témoin, 1-hit et 3-M est actuellement soumis à *Behavioural Brain Research*.

1. Introduction

Article 6 :

Pour définir les critères d'évaluation de la validité de prédiction en utilisant la lurasidone, nous avons réalisé une étude préliminaire pharmacocinétique de cet antipsychotique (en collaboration avec le Dr Since, Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie, équipe d'accueil 4258, Université de Caen Normandie) et vérifié son absence d'effets comportementaux délétères.

Cette étude a permis d'approfondir les connaissances sur les propriétés pharmacologiques (en particulier pharmacocinétiques) de la lurasidone dans le modèle murin d'expérimentation, la souris C57BL/6. Ces données nous permettront en particulier d'adapter le mode d'administration chronique de cet antipsychotique lors d'études de validité de prédiction futures. Un article portant sur cette étude a été publié dans le journal *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* en 2020 (Percelay et al., 2020).

Étude complémentaire :

Afin de mesurer l'effet de la délétion partielle du gène MAP6 sans association avec d'autres facteurs, nous avons réalisé une étude comportementale permettant de montrer l'absence d'effet de cette délétion partielle seule sur l'inhibition du réflexe de sursaut et la mémoire à long terme.

Poster :

Pour caractériser un autre modèle de schizophrénie basé sur deux facteurs et utilisant une autre modification génétique (SR KO) associée au protocole de séparation maternelle, nous avons réalisé une étude comportementale (en collaboration avec François Ménager, Master 2). Cette étude a permis d'étudier la validité d'apparence et la validité de construction de ce modèle « 2-hit ».

2. Méthodologie générale

2. Méthodologie générale

2. Méthodologie générale

2.1 Animaux

2.1.1 Reproduction et modification génétique

Lors de ce travail, nous avons utilisé deux souches de souris génétiquement modifiées : les souris hétérozygotes MAP6 et les souris SRKO.

Les animaux utilisés pour les modèles « 3-hit » et « 3-M » sont issus d'un croisement entre des souris C57BL/6 femelles (provenant du laboratoire Janvier Labs, 53940, Le Genest-Saint-Isle) et des mâles hétérozygotes pour le gène MAP6 (maintenus en colonies au Centre Universitaire de Ressources Biologiques (CURB) de l'université de Caen depuis 2012). Cette délétion génétique partielle a été développée par l'Institut des Neurosciences de Grenoble (A. Andrieux) sur la base de croisements entre des souris 129 SvPas (dont le gène MAP6 a été supprimé par le ciblage de l'exon 1) et BALBc provenant du laboratoire Charles River.

Les animaux SRKO utilisés pour le modèle « 2-hit » sont issus de croisements entre des souris mâles et femelles C57BL/6 *Knock-out* (KO) pour le gène SR (Basu et al., 2009). Ces croisements permettent d'obtenir des individus SRKO. Les souris témoins sont des C57BL/6 *Wild Type* (WT) (provenant du laboratoire Janvier Labs).

2.1.2 Hébergement

Les animaux sont maintenus dans des cages standard (polycarbonate, 396mm x 215mm x 172mm) dont la litière est composée de sciure, avec un enrichissement composé de copeaux de carton et d'un abri en papier mâché. Les souris sont hébergées avec leur mère jusqu'au sevrage puis par groupes non-mixtes de 5 individus. La nourriture et l'eau sont disponibles *ad libitum* au sein d'une animalerie ayant un cycle de lumière / obscurité normal (lumière de 7h à 19h) et dont la température est maintenue à 22°C +/- 2. Les animaux sont transférés dans l'animalerie du laboratoire après le sevrage (pour les animaux utilisés pour les modèles « 3-hit » et « 3-M »), ou à l'âge de deux mois (pour les animaux utilisés dans l'article 6 et le poster). Les conditions d'hébergement dans cette animalerie sont similaires à celles du CURB à l'exception du cycle de lumière qui est inversé (lumière de 19h à 7h) afin de pouvoir réaliser les expérimentations lors de la phase d'éveil des animaux. Le transfert d'animalerie est suivi de 2 semaines durant lesquelles les animaux ne réalisent aucun test comportemental.

2. Méthodologie générale

Après le sevrage, les animaux sont identifiés par une puce sous-cutanée placée au niveau du dos sous anesthésie (isoflurane (5% - 2,5%) dans un mélange O₂/N₂O (0,3/0,7)). Au même moment, un prélèvement de tissu (bout de la queue ou poils au niveau de la joue) est réalisé afin de réaliser le génotypage de chaque animal. En effet, j'ai pu au cours de ma thèse raffiner la méthode de prélèvement de tissu afin de prendre en compte au mieux le bien-être animal. Ainsi au début, j'effectuais des prélèvements de queue puis après un an de thèse, j'ai réalisé des prélèvements de poils.

2.1.3 Ethique

Toutes les expériences ont été réalisées en conformité avec la directive du Conseil de l'Union Européenne et approuvées par le Comité d'Ethique Normandie en Matière d'EXpérimentation animale (CENOMEXA), numéros APAFIS#2016120817103795 et APAFIS#20994-2019050617054190_v2.

L'éthique en expérimentation animale

L'utilisation d'animaux est régie par des règles permettant le respect du bien-être animal. Les projets de recherche utilisant des animaux sont soumis à une évaluation par des comités éthiques. Une demande d'autorisation de projet doit être rédigée afin de justifier toutes les interventions qui seront réalisées chez l'animal, en évaluant la souffrance (physique et/ou psychologique), la douleur et l'angoisse, en justifiant le choix de l'espèce, le nombre d'animaux utilisés, et en prouvant que la règle d'or, règle des 3R, de l'éthique en expérimentation animale sera respectée (Inserm, 2020b) :

- **Réduire** le nombre d'animaux,
- **Raffiner** les expérimentations (réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux ; obtenir plus d'informations pertinentes à moindre coût en termes de "mal être" animal),
- **Remplacer** les études *in vivo* par d'autres études (*in vitro*, *in silico*) lorsque cela est possible.

Cette demande d'autorisation de projet est évaluée par un comité d'éthique (dans le cadre de mon travail, il s'est agi du Comité d'Ethique NOrmandie en Matière d'EXpérimentation Animale (CENOMEXA, n°54)) qui autorise le projet, le refuse ou demande des explications supplémentaires ou des modifications. C'est le ministère en charge de l'enseignement supérieur et de la recherche qui délivre les autorisations.

2. Méthodologie générale

Les expérimentations animales ne peuvent se faire sans cette autorisation de projet, et le personnel qui effectue les manipulations et rédige le projet de recherche doit également être détenteur d'une formation à l'expérimentation animale.

2.1.4 Génotypage

Le génotypage est réalisé directement après le prélèvement. L'ADN est extrait en plaçant les échantillons dans 90µL d'une solution de NaOH en bain à sec pendant 10min avant de neutraliser l'effet basique avec 10µL de Tris HCl 1M (pH 0,8). Une PCR (« Polymerase Chain Reaction ») est ensuite réalisée avec les amorces 1-NEO2 (GAT TCC CAC TTT GTG GTT CTA AGT ACT G), 2-STOP-REV (CTG GGA AAA CCA GTG TGG AAA CTG TTA), et 3-STOP-1 (GCA GAT GCC CTC AAC AGG CAA ATC CGG). La révélation se fait dans un gel d'agarose (0,75g pour 50mL de solution) par électrophorèse.

2.1.5 Séparation maternelle

La séparation maternelle est réalisée une seule fois au 9^{ème} jour de vie des souriceaux (Bouet et al., 2011). Le matin, à 9h les deux génitrices sont retirées de la cage contenant les souriceaux et placées dans une autre cage adjacente. Après 24 heures, les mères sont replacées dans la cage contenant les souriceaux. Pour s'abstraire du biais de manipulation de la mère par l'expérimentateur, la condition contrôle consiste en ce même protocole qui dure seulement 20 secondes.

2.1.6 Traitements pharmacologiques

Pour tous les traitements pharmacologiques, l'administration était de 10mL pour 1kg de poids corporel.

2.1.6.1 THC

Le tetrahydrocannabinol (THC, Sigma-Aldrich®, Ref T2386) est solubilisé dans une solution à 3,5% de polysorbate 80 (Tween 80, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Germany) dans du sérum physiologique, à la concentration de 8mg/10ml. Cette solution est administrée par voie intrapéritonéale une fois par jour du 32^{ème} jour de vie des souris à leur 52^{ème} jour.

2. Méthodologie générale

2.1.6.2 MK801

Le MK801 (Sigma-Aldrich©) est mis en solution dans du sérum physiologique à la concentration de 0,05mg/10ml. Ce produit est administré par voie intrapéritonéale une fois par jour durant 5 jours.

2.1.6.3 Lurasidone

La lurasidone hydrochloride (Synthenova®, Hérouville Saint-Clair, France) est solubilisée dans une solution de polysorbate 80 à 0,1% dans du sérum physiologique, à la concentration de 1mg/10ml. Ce produit est administré par voie intrapéritonéale une fois par jour en commençant les injections une semaine avant le début des tests, lesquelles sont ensuite poursuivies pendant toute la durée des tests comportementaux.

2.2 Tests comportementaux

Sur la base des données de la littérature, nous avons choisi une large batterie de tests permettant d'évaluer les symptômes de type positif (actimétrie, *open field*), de type négatif (tests sociaux, anhédonie) et les déficits cognitifs (alternance spontanée, reconnaissance d'objet, reconnaissance de place, piscine de Morris) mais également d'autres paramètres modulés chez les schizophrènes comme la latéralité (motrice et olfactive) et l'inhibition.

Les tests comportementaux ont été réalisés sur l'ensemble des animaux des groupes expérimentaux.

Concernant les tests de la boîte noire et blanche, de la préférence au sucrose, et de la piscine de Morris, les protocoles ont été décrits dans l'article Bouet *et al.*, 2020.

Tous les tests comportementaux ont été réalisés entre 9h et 18h avec au préalable une habituation de 30min à la salle de test. Les souris ont été systématiquement manipulées pendant plusieurs jours avant les tests comportementaux par l'expérimentateur concerné. Les dispositifs expérimentaux ont été nettoyés par une solution d'éthanol à 70% entre chaque passage de souris.

L'ordre de passage dans les différents tests comportementaux a été pseudo-randomisé par groupes expérimentaux.

Tous les tests sont filmés.

2. Méthodologie générale

2.2.1 Tests mesurant les symptômes de type positif

2.2.1.1 *Open field*

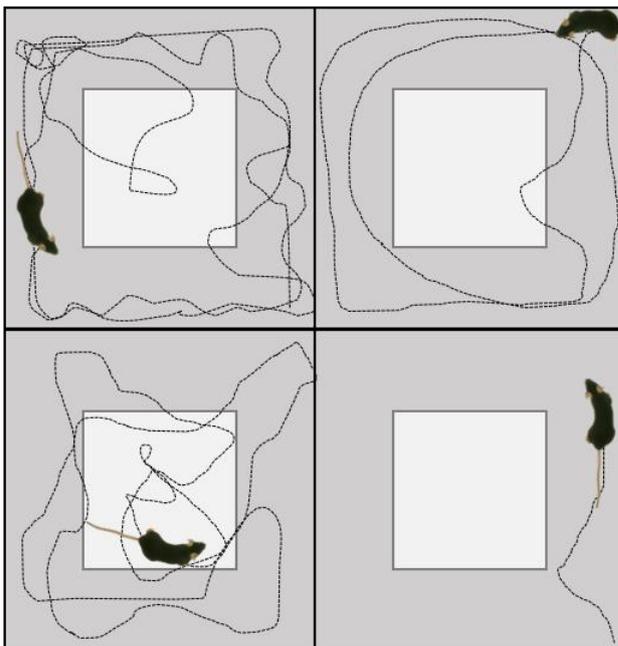
Le dispositif consiste en 4 arènes de 50cm x 50cm x 50cm, ce qui permet de tester 4 souris simultanément. Le plancher infrarouge permet d'enregistrer les animaux en absence de lumière (0lux). L'activité motrice est mesurée par vidéo *tracking* (NOLDUS®, Ethovision) durant les 30min de test.

Ce test permet de mesurer l'activité motrice spontanée. Nous avons souhaité également évaluer le comportement de type anxieux en utilisant la thigmotaxie comme décrit par Prut et Belzung (Prut & Belzung, 2003) (voir Figure 24 A).

2.2.1.2 Actimétrie

L'activité motrice spontanée a été mesurée en environnement restreint grâce à un actimètre automatique (Imetronic®). Les souris ont été placées individuellement durant 1h dans une cage standard (19cm x 11cm x 14cm) équipée de 2 rayons infrarouges. Le nombre d'interruptions des rayons infrarouge par l'animal lors de ses mouvements est enregistré automatiquement et reflète l'activité motrice (Since et al., 2013) (voir Figure 24 B).

A.



B.



Figure 24 : Schéma de l'open field (A) et photographie du dispositif d'actimétrie (B).

2. Méthodologie générale

2.2.2 Tests mesurant les symptômes de type négatif

2.2.2.1 Tests de comportement social (interaction sociale et reconnaissance sociale)

Nous utilisons ici un protocole permettant l'étude chez la souris d'une part, de la sociabilité et d'autre part, de la reconnaissance sociale basée sur la préférence pour la nouveauté. De manière intéressante, des altérations des comportements sociaux caractérisent certains symptômes associés à la schizophrénie (Bouet et al., 2016).

Deux dispositifs ont été utilisés, le premier limitait les interactions et a donc été remplacé en 2019 par le second (voir Figure 25 A).

Le premier dispositif utilisé comporte une chambre de test (27cm x 18cm x 21cm) qui contient trois compartiments interconnectés, ainsi que deux emplacements latéraux (6,5cm x 18cm x 21cm) pour les souris *stimulus* disposées aux extrémités de la chambre de test et séparées de cette dernière par une paroi transparente percée (possibilités de contact visuel et olfactif). La souris testée est placée dans le compartiment central de la chambre de test et est libre de se déplacer dans cette chambre de test (Bouet et al., 2011).

Le second dispositif utilisé comporte une chambre de test (60cm x 40cm x 30cm) qui contient trois compartiments interconnectés (20cm x 40cm x 30cm). Les deux compartiments latéraux contiennent des cages permettant de placer les souris *stimulus* (possibilités de contact visuel, olfactif et tactile). La souris testée est placée dans le compartiment central de la chambre de test puis laissée libre de se déplacer dans toute cette chambre (Crawley, 2007).

Afin de rendre attractive la souris *stimulus* pour la souris testée, on utilise des animaux qui n'ont pas de liens de parenté avec la souris testée (néophilie), et qui sont toujours du même sexe que la souris testée (pour s'affranchir d'une influence liée à l'attractivité sexuelle) (Nadler et al., 2004).

2. Méthodologie générale

2.2.2.1.1 Test de sociabilité

Cette première phase consiste à placer une souris *stimulus* dans une des deux parties latérales du dispositif prévu à cet effet (en alternant le côté utilisé), l'autre restant vide, puis à placer la souris testée au centre du dispositif.

Le temps passé dans le compartiment latéral permettant des interactions avec la souris *stimulus* et le temps passé dans le compartiment le plus éloigné de la souris *stimulus* sont collectés manuellement. Un indice de sociabilité est calculé à partir de ces temps par la formule : $(\text{individu } stimulus) / (\text{individu } stimulus + \text{compartiment vide}) \times 100$. Ce test permet de mesurer plus particulièrement le caractère social des souris (Bouet et al., 2011), un indice significativement supérieur à 50 indiquera une préférence pour le côté où est placée la souris *stimulus*.

2.2.2.1.2 Test de reconnaissance sociale

Cette seconde phase a lieu 30min après le test de sociabilité, délai durant lequel la souris testée est remis dans sa cage (Ferguson et al., 2001; Macbeth et al., 2011). Elle consiste à placer la même souris *stimulus* que celle utilisée lors de la phase de sociabilité dans le compartiment latéral opposé à celui utilisé précédemment (individu familier), et une autre souris *stimulus*, qui n'a jamais été en contact avec la souris testée, dans l'autre compartiment latéral (individu nouveau).

Le temps passé par la souris testée dans les compartiments latéraux du dispositif est mesuré manuellement. Un indice de reconnaissance sociale est calculé avec ces temps : $(\text{individu nouveau}) / (\text{individu nouveau} + \text{individu familier}) \times 100$. Ce test permet de mesurer les performances de mémoire de reconnaissance sociale (Moy et al., 2009), un indice significativement supérieur à 50 indiquera une préférence pour le côté comprenant l'individu nouveau.

2.2.2.2 Test de préférence au sucrose (Eagle et al., 2016)

Les animaux sont placés individuellement dans une cage d'hébergement pour la durée du test. Une première phase consiste en une mesure de consommation d'eau pendant 24h durant laquelle les souris ont accès à deux biberons contenant de l'eau. Ensuite, la seconde phase consiste à proposer deux biberons (eau et solution de sucrose 2%) simultanément pendant 72h à l'individu testé. L'anhédonie est estimée par la mesure du taux de préférence

2. Méthodologie générale

au sucrose, calculé ainsi : $(\text{consommation de solution de sucrose} / \text{consommation totale}) \times 100$ (Pozzi et al., 2014) (voir Figure 25 B).

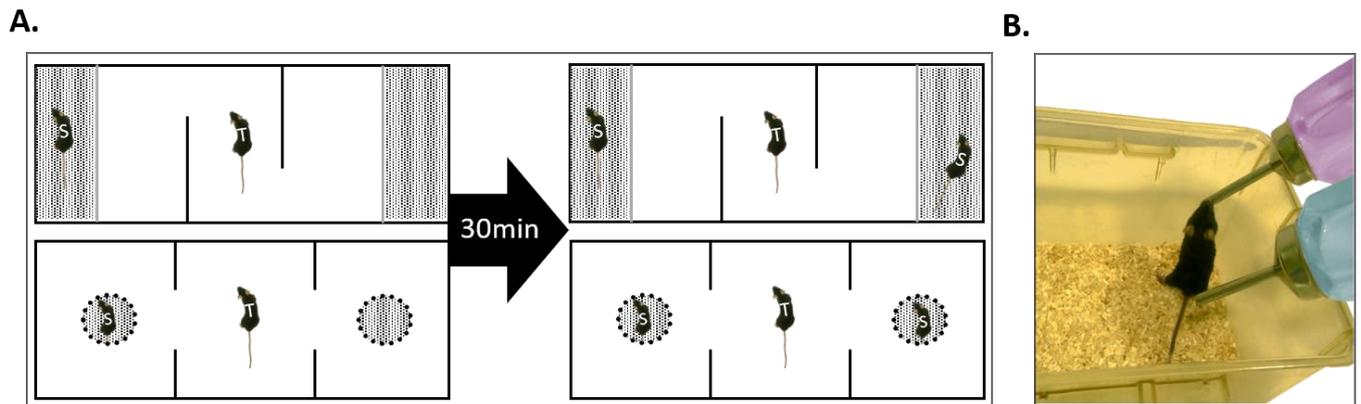


Figure 25 : A. Schéma des deux dispositifs utilisés pour le test d'approche / évitement (en haut : avant 2019 ; en bas : après 2019). S : souris stimulus ; T : souris testée. B. Représentation du test de préférence au sucrose.

2.2.3 Tests mesurant les performances cognitives

2.2.3.1 Reconnaissance d'objet

Ce test est, au même titre que le test de reconnaissance de place (voir ci-dessous), basé sur la préférence innée des rongeurs pour la nouveauté (néophilie).

Une habituation à l'arène (30cm x 30cm x 30cm) et à des objets différents de ceux utilisés pour le test est préalablement réalisée. Le test proprement dit consiste ensuite en une phase d'acquisition durant laquelle la souris peut explorer 2 objets identiques (considérés ensuite comme familiers). Un délai (1h ou 3h) est ensuite instauré avant la phase de rétention qui consiste à placer à nouveau la souris dans l'arène en ayant remplacé l'un des objets familiers par un objet différent (objet nouveau) (voir Figure 26 A). Le temps d'exploration (museau de la souris à moins d'1cm de l'objet) est mesuré manuellement *via* une caméra et un index de discrimination est calculé : $\text{temps (objet nouveau - objet familier)} / \text{temps total d'exploration}$.

L'utilisation de ce protocole permet de mesurer les performances de mémoire de reconnaissance à long terme (Marianne Leger et al., 2013).

2. Méthodologie générale

2.2.3.2 Reconnaissance de place

Une habitude à l'arène (30cm x 30cm x 30cm) et à des objets différents de ceux utilisés pour le test est préalablement réalisée. Ce test consiste en une phase d'acquisition de 10min durant laquelle la souris peut explorer 2 objets identiques placés de manière symétrique. Un délai de 1h est ensuite instauré avant la phase de rétention (10min) qui consiste à placer à nouveau la souris dans l'arène en ayant modifié l'emplacement d'un des objets (objet déplacé) (voir Figure 26 B). Le temps d'exploration (museau de la souris à moins de 1cm de l'objet) est mesuré manuellement et un index de discrimination est calculé : temps (objet déplacé - objet fixe) / temps total d'exploration.

Ce protocole permet de mesurer plus particulièrement les performances de mémoire de reconnaissance spatiale à long terme (Vogel-Ciernia & Wood, 2014).

2.2.3.3 Alternance spontanée

L'alternance spontanée est la tendance à alterner spontanément entre plusieurs options possibles. Ce comportement est basé sur la tendance spontanée des rongeurs à explorer un environnement nouveau et nécessite une mémoire de travail intacte afin de garder en mémoire le choix effectué précédemment pour en faire un nouveau.

Le dispositif utilisé est un labyrinthe en Y dont les 3 branches sont également espacées (22cm x 6,5cm x 10cm) (voir Figure 26 C). La souris testée est placée à l'extrémité d'un des bras et est libre de se déplacer pour une durée de 5min. Le nombre et la séquence des entrées (critère utilisé : franchissement des 4 pattes) dans les bras du labyrinthe sont collectés manuellement. Une alternance est définie par 3 entrées consécutives dans les 3 bras du labyrinthe. Le pourcentage d'alternance est calculé par la formule : (nombre d'alternances / nombre maximum théorique d'alternances) x 100.

Ce test permet notamment de mesurer la mémoire de travail spatiale (Freret et al., 2017).

2.2.3.4 Piscine de Morris (Brandeis et al., 1989; Morris, 1981)

Ce dispositif consiste en une piscine circulaire (120cm de diamètre) remplie avec une eau opaque à 21°C. Une plateforme carrée en plexiglas (13cm x 13cm) est dissimulée à 0,5cm sous la surface sur un emplacement fixe (voir Figure 26 D). Les trajectoires de nage sont enregistrées automatiquement (Ethovision, Noldus®). La phase d'apprentissage consiste en 4 essais par jour (90s par essai, 20s de renforcement, et 1h d'intervalle entre les essais)

2. Méthodologie générale

durant 4 jours consécutifs. L'essai de restitution de l'apprentissage (pas de plateforme, 60s), est réalisé 1h après le dernier essai d'apprentissage (Bouet et al., 2007).

Le paradigme que nous avons mis en œuvre permet d'étudier les performances d'apprentissage et de mémoire spatiale des groupes expérimentaux testés.

2.2.3.5 Boîte noire et blanche (LE810 Letica, Bioseb®, France)

Ce dispositif consiste en deux compartiments, l'un est grand et fortement éclairé (28cm x 27cm x 27cm, 900lux), accolé à un petit compartiment sombre (17cm x 27cm x 27cm, 100lux en lumière rouge). Ce test permet d'évaluer le comportement des souris exposées à la nouveauté et notamment de mesurer le comportement de type anxieux (Costall et al., 1989) (voir Figure 26 E). Il est basé sur la préférence qu'ont les souris pour un environnement sombre et confiné en comparaison à un endroit vaste et éclairé. Chaque animal est placé individuellement au centre du compartiment blanc et est libre de se déplacer dans les 2 compartiments pendant 5min. La latence à entrer dans le compartiment noir, le temps passé dans chaque compartiment et le nombre de transitions entre les deux compartiments sont mesurés (Lelong-Boulouard et al., 2006).

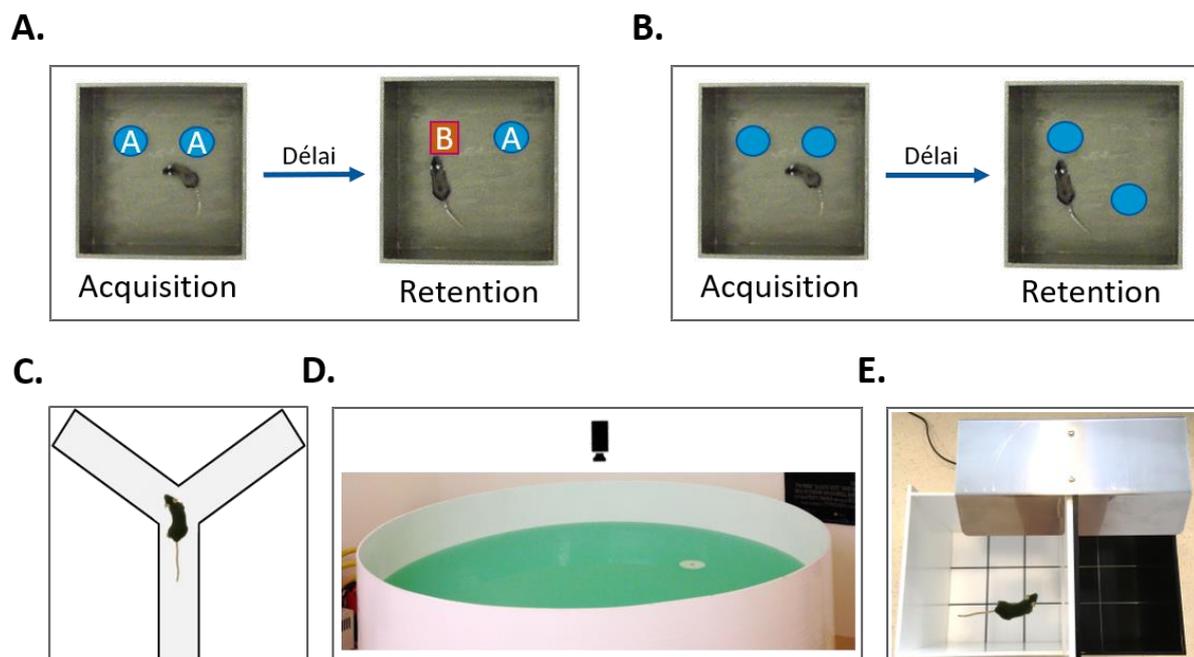


Figure 26 : Schémas des dispositifs utilisés pour les tests de reconnaissance d'objet (A), reconnaissance de place (B), alternance spontanée (C), piscine de Morris (D) et de la boîte noire et blanche (E).

2. Méthodologie générale

2.2.4 Tests mesurant la latéralité motrice et sensorielle

2.2.4.1 Test du coin

Ce test permet d'évaluer la latéralité motrice des animaux, ce qui peut refléter des modifications de la latéralisation du système nerveux central. Le dispositif consiste en 2 murs verticaux (46cm de longueur sur 28cm de hauteur) réunis d'un côté pour former un coin avec un angle de 30°, une ouverture de 0,3cm est conservée. Les souris sont placées individuellement face au coin à égale distance des deux murs (voir Figure 27 A). Lorsque l'animal s'avance dans le coin, il se retourne d'un côté ou de l'autre pour faire demi-tour. Le côté utilisé est noté au cours de 10 essais, permettant le calcul d'un indice de latéralité (IL) individuel : $IL = (\text{Droit} - \text{Gauche}) / \text{nombre d'essais}$ (Bouët et al., 2007).

2.2.4.2 Latéralité olfactive

Ce test permet de mesurer la latéralité olfactive des souris, ce qui peut refléter des modifications de la latéralisation du système nerveux central. Le dispositif décrit ci-dessus pour le test du coin est également utilisé pour tester la latéralité olfactive. J'ai participé à la mise au point de ce test innovant lors de mon stage de Master 1. Une troisième paroi est utilisée pour fermer le dispositif et réduire sa longueur à 20cm. La pointe d'une pipette de 10 μ l est insérée dans la fente entre les deux parois du test, le cône contenant une solution odorante. Les souris sont placées individuellement à l'opposé du coin et sont libres d'explorer durant 10min. Une caméra placée au-dessus de la pipette permet de filmer son extrémité et d'observer la narine utilisée par la souris utilise pour explorer l'odeur (voir Figure 27 B). Un indice individuel de latéralité est ensuite calculé : $IL = (\text{Droit} - \text{Gauche}) / \text{nombre d'essais}$ (Jozet-alves et al., 2019).

2. Méthodologie générale

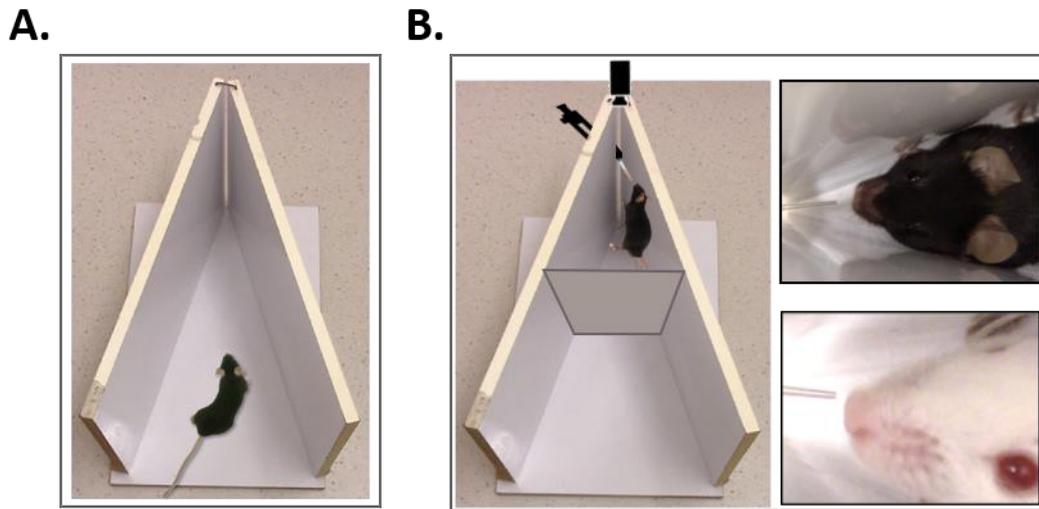


Figure 27 : A. Photographie du dispositif du corner test. B. A gauche, schéma du dispositif du corner test aménagé pour évaluer la latéralité olfactive ; à droite, captures d'écran obtenues grâce à la caméra placée au-dessus du dispositif.

2.2.5 Test mesurant l'inhibition du sursaut

L'inhibition du réflexe de sursaut est considérée comme l'un des indices neurophysiologiques les plus prédictifs pour la recherche translationnelle en psychiatrie. Une altération du PPI (*prepulse inhibition*) a été signalée dans plusieurs maladies psychiatriques, en particulier la schizophrénie, où le PPI est considéré comme un endophénotype de la maladie (Powell et al., 2009).

Les souris sont placées dans un dispositif de mesure du réflexe de sursaut (Imetronic®, France) (voir Figure 28). Le protocole débute par une phase d'acclimatation à un bruit de fond (bruit blanc) de 65dB pendant 10min. Ensuite, 30 essais de *stimuli* sonores ou *pulses* seuls à 85dB sont réalisés pour avoir une information sur l'intensité de sursaut de la souris testée. Puis, plusieurs combinaisons de « *prepulse-pulse* » sont présentées dans un ordre

2. Méthodologie générale

pseudo randomisé (« *prepulse* » : 0dB, 76dB, 80dB, 84dB, d'une durée de 20ms ; délivrés 50 ms avant le « *pulse* », lui-même d'une intensité de 110dB et d'une durée de 40ms).

Pour chaque intensité de *prepulse*, 10 essais sont réalisés. L'intervalle entre les essais est aléatoire et compris entre 8 et 18s. Les animaux sont filmés durant tout le test. L'indice d'inhibition du réflexe de sursaut est calculé par la formule : $(1 - (\text{amplitude du sursaut pour les essais avec } prepulse / \text{amplitude du sursaut pour les essais avec } pulse \text{ seul})) \times 100$. (Valsamis & Schmid, 2011)

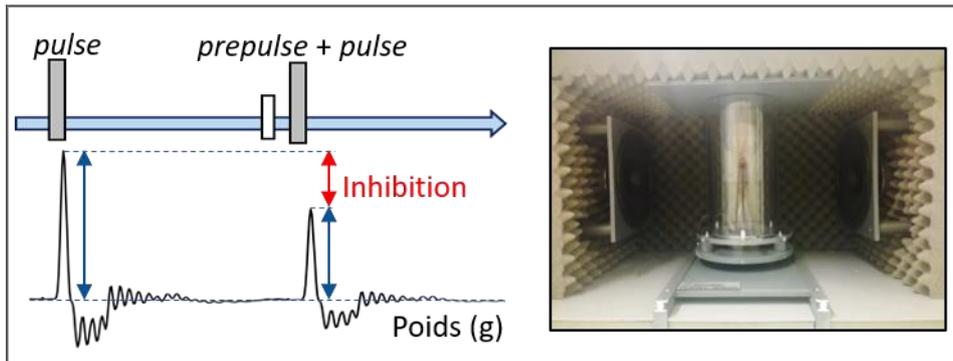


Figure 28 : Dispositif du PPI. A gauche, schéma du mécanisme d'inhibition étudié ; à droite, photographie de l'intérieur du dispositif.

2.3 Electrophysiologie extracellulaire

Les mesures d'électrophysiologie ont été réalisées suivant le protocole décrit par Billard (2010) et Billard et Rouaud (2007) (Billard & Rouaud, 2007; Billard, 2010). Cette technique d'électrophysiologie par enregistrement extracellulaire sur tranches d'hippocampe permet d'étudier plus spécifiquement la transmission excitatrice basale et la plasticité fonctionnelle au niveau de l'arbre dendritique des cellules pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe après une stimulation électrique des afférences glutamatergiques contenues dans les collatérales de Schaeffer.

2.3.1 Préparation des coupes d'hippocampe

Après anesthésie par isoflurane à 5%, les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale puis décapitées. Le cerveau est ensuite rapidement extrait de la boîte crânienne et déposé dans du liquide céphalorachidien artificiel (aCSF) durant 1min à 0°C pour stopper les réactions biochimiques consécutives à la mort de l'animal. L'hippocampe de chaque hémisphère est ensuite extrait (voir Figure 29 A) avant d'être coupé en tranches de 400µm

2. Méthodologie générale

d'épaisseur suivant un plan transversal à l'aide d'un *tissue chopper* de Mc Ilwain® (voir Figure 29 B). Les tranches obtenues sont alors déposées dans une coupelle renfermant de l'aCSF dont la température est maintenue à 28°C et dont le pH est tamponné à 7.4 ($\pm 0,05$) par bullage de carbogène (mélange de 95% O₂ et 5% CO₂).

Avant toute mesure électrophysiologique, les tranches sont maintenues dans ce milieu pendant 45min minimum permettant la récupération progressive des processus biochimiques (voir Figure 29 C). L'aCSF est préparé de façon extemporanée à partir d'une solution mère conservée à 4°C dont la composition est la suivante : NaCl 124mM, KCl 3,5mM, MgSO₄ 1,5mM, NaH₂PO₄ 1,2mM et CaCl₂ 2,5mM. Après dilution au dixième de la solution mère, du glucose et du bicarbonate de sodium sont ajoutés pour atteindre les concentrations suivantes : 11 et 26,2mM respectivement. L'aCSF utilisé présente une osmolarité de 300mosM.

2.3.2 Enregistrement des potentiels de champs extracellulaires

Les tranches d'hippocampe sont placées individuellement dans la cuve d'enregistrement de 1,5cm de diamètre sur 1,2cm de hauteur (correspondant à un volume d'aCSF de 2ml) et précisément positionnées entre deux filets (l'un à petite mailles au-dessous et l'autre à grosses mailles au-dessus pour la stabiliser) pour faciliter l'accès aux emplacements d'enregistrement et de stimulation (voir Figure 29 D). La cuve de mesure est montée sur le plateau d'une loupe binoculaire (Modèle SZ30, Olympus®) et encadrée de deux micromanipulateurs (WPI®MM301R pour l'électrode de stimulation et DC3001L pour l'électrode d'enregistrement). La cuve est alimentée continuellement en aCSF par une pompe (Modèle 77122-14, Masterflex®) à un débit de 1ml/min à partir d'un béccher de 100ml d'aCSF. L'aCSF passe ensuite dans une seconde cuve où il est aspiré par une deuxième pompe assurant ainsi un flux fermé continu.

2. Méthodologie générale

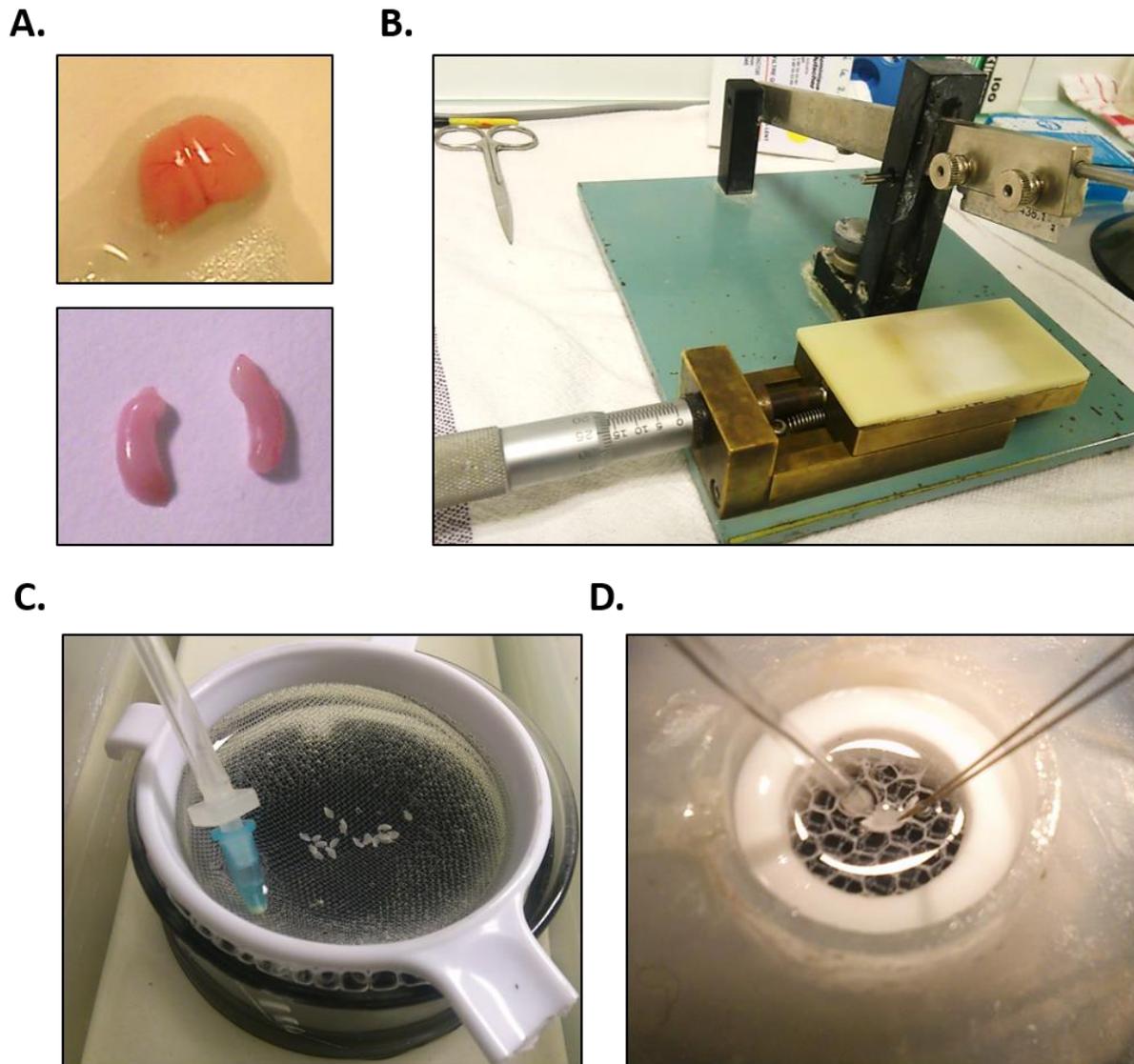


Figure 29 : Electrophysiologie. A. Photographie d'un cerveau de souris sans le cervelet (haut) et d'hippocampes isolés (bas). B. Photographie du tissu chopper permettant l'obtention des tranches d'hippocampe. C. Photographie des tranches en cours de récupération dans le bain-marie permettant le maintien d'une température constante de 28°C. D. Photographie de la cuve d'enregistrement dans laquelle une tranche d'hippocampe est maintenue entre deux filets.

Les enregistrements sont obtenus au moyen de microélectrodes de borosilicate ($\approx 5 \text{ M}\Omega$, PHYMEP® réf : GC-150F-10) obtenues au moyen d'une étireuse de capillaires (Narishige®, PB7) et remplies d'une solution de NaCl 2M. Dans mes expériences, ces électrodes sont placées au niveau de la partie médiane (*stratum radiatum*) de l'arbre dendritique des cellules pyramidales de l'aire CA1 afin de recueillir des potentiels de champ post-synaptiques excitateurs (fEPSPs pour « *field excitatory postsynaptic potentials* ») provoqués par la

2. Méthodologie générale

stimulation électrique des fibres afférentes (collatérales de Schaeffer). Pour ce faire, les *stimuli* sont appliqués entre les deux pôles d'une électrode en acier bipolaire (PHYMEP®, réf : UESMGESEKNNM) dont l'un des pôles est placé dans la tranche tandis que l'autre est situé juste au-dessus dans le bain d'aCSF. Les expérimentations sont pilotées par ordinateur, au moyen du logiciel WinLTP® (Anderson & Collingridge, 2001). Une carte d'interface permet de transmettre les instructions envoyées par l'ordinateur au poste d'électrophysiologie qui est constitué des éléments suivants (voir Figure 30) :

- une boîte de stimulation (Modèle DS2, Digitimer Ltd. ®), elle produit les *stimuli* dont l'intensité et la durée sont contrôlés,
- l'électrode d'enregistrement raccordée à la tête de mesure (Modèle Ext02-B, NPIelectronics®), qui détecte les différences de potentiels extracellulaires générées par la stimulation,
- un système d'acquisition (Modèle Ext02-B, NPIelectronics®), qui analyse et amplifie par 10 le faible signal récupéré par l'électrode d'enregistrement,
- un système de filtres passe-haut et passe-bas et d'amplification supplémentaire (x100) (Modèle AM502, Tektronix®) qui permet d'isoler le signal du bruit de fond et de l'augmenter pour une meilleure quantification,
- un filtre (*humbug*, Questscientific®) qui permet de supprimer spécifiquement les signaux parasites de 50Hz produits par l'alimentation des appareils électriques.

2. Méthodologie générale

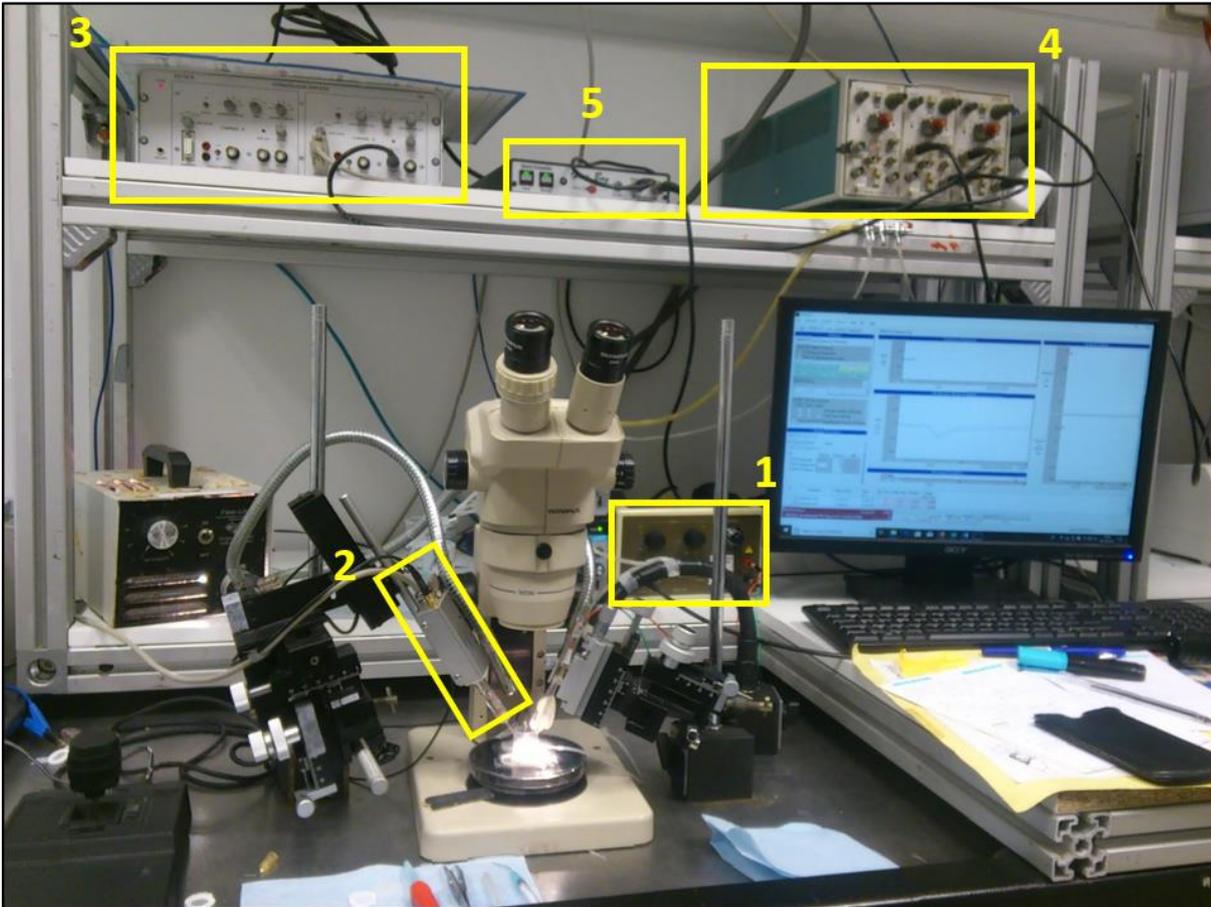


Figure 30 : Photographie du poste de travail d'électrophysiologie comprenant la boîte de stimulation (1), l'électrode d'enregistrement (2), le système d'acquisition (3), un système de filtrage et d'amplification (4) et un humbug (5).

2.3.3 Protocoles de stimulation

Dans l'ensemble des protocoles détaillés ci-après, chaque point de mesure enregistré est obtenu par la moyenne de trois réponses générées à 10s d'intervalle (soit une valeur moyenne déterminée toutes les 30s).

2.3.3.1 Etude de la transmission synaptique basale ou AMPA

L'efficacité de la transmission synaptique basale est déterminée par des stimulations d'intensités croissantes (pouvant aller de 0,3 à 1,8mA) et de durée constante (20 ou 40 μ s) ; deux postes d'expérimentation ont été utilisés et les gammes d'intensité de stimulation ainsi que leur durée diffèrent. Les stimulations électriques induisent une modification du potentiel extracellulaire, se traduisant par l'enregistrement d'un fEPSP correspondant aux

2. Méthodologie générale

modifications ioniques du milieu extracellulaire induites en réponse à la dépolarisation membranaire des cellules pyramidales activées. En amont de ce fEPSP apparaît une déflexion négative plus petite appelée volée afférente (VA), qui visualise la quantité de fibres stimulées. Un indice d'efficacité de la transmission synaptique peut alors être déterminé qui correspond au rapport de la pente du fEPSP sur la pente de la VA (toutes deux exprimées en mV/ms) (voir Figure 31). Cet indice est calculé pour des intensités croissantes de stimulation permettant l'obtention de courbes entrée / sortie (IO pour « *input / output* »). Ces courbes I/O permettent d'évaluer la transmission glutamatergique de base véhiculée par les sous-types AMPA des récepteurs du glutamate et leur comparaison entre les groupes expérimentaux va donner des informations sur de potentielles atteintes de cette transmission.

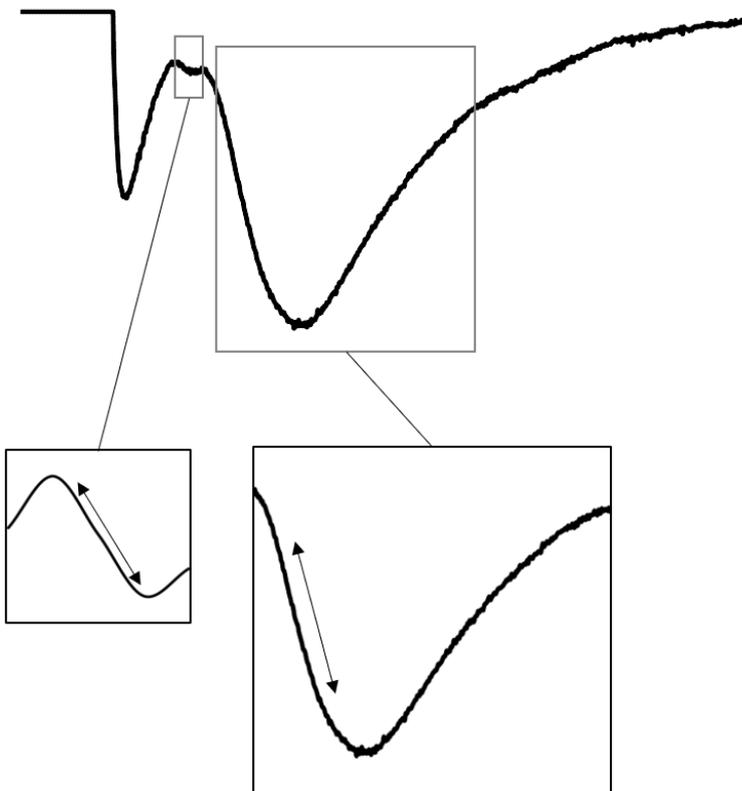


Figure 31 : Représentation des modifications du potentiel extracellulaire après stimulation électrique. En haut, représentation du potentiel extracellulaire entier. En bas, représentation de la VA avec une flèche représentant la pente mesurée (à gauche), et du fEPSP avec une flèche représentant la pente mesurée (à droite).

2. Méthodologie générale

2.3.3.2 Etude de la plasticité synaptique

Nous avons étudié deux formes de plasticité synaptique de la fonctionnalité des réseaux neuronaux du champ CA1 hippocampique, grâce à deux protocoles de stimulations différentes : la « *Pulse-Paired Facilitation* » (PPF), une forme transitoire de plasticité synaptique obtenue par des stimulations appariées et la PLT (ou LTP : « *Long Term Potentiation* »), une forme de plasticité synaptique durable induite par des *stimuli* conditionnant à haute fréquence.

La PPF est une potentialisation de la transmission synaptique qui se produit lorsque deux stimulations sont appliquées successivement dans un très court intervalle de temps (entre 10ms et 1s). Il en résulte une augmentation transitoire du second fEPSP, due à une augmentation de la libération de glutamate par l'élément présynaptique. Cette augmentation est mesurée par un rapport (>1) de la pente du second fEPSP sur la pente du premier. La PPF est calculée après l'application de deux stimulations espacées de 30ms à une intensité fixée de sorte à ce que la pente du premier fEPSP soit proche de 0,05mV/ms. D'éventuels changements dans la valeur de la PPF entre les groupes expérimentaux permettront donc de mettre en évidence des modifications de la libération de glutamate.

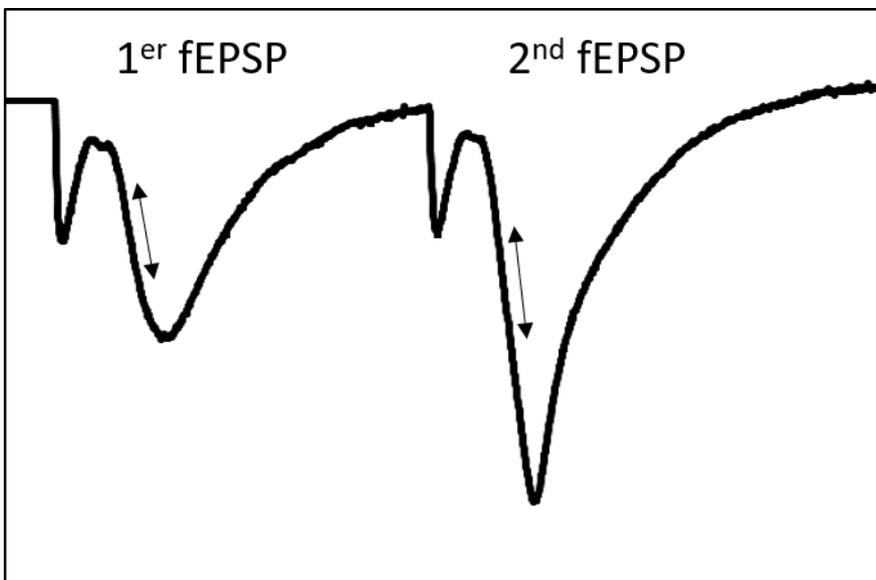


Figure 32 : Représentation d'une PPF avec le 1^{er} fEPSP résultant de la première stimulation et le second résultant de la 2nd stimulation, 30ms après la première. Les flèches représentent les pentes utilisées pour calculer la PPF.

La LTP correspond à une augmentation durable de l'efficacité de la transmission synaptique induite par un stimulus conditionnant. Dans le paradigme expérimental, une stimulation test est réglée pour engendrer au départ un fEPSP avec une pente de

2. Méthodologie générale

0.1mV/ms. Cette réponse test générée toutes les 10s doit être la plus stable possible pendant 15min minimum (variation $\pm 10\%$) afin d'obtenir une ligne de base. Une fois cette ligne acquise, un *stimulus* conditionnant est appliqué. Plusieurs protocoles de stimulation sont sélectionnés pour générer de la LTP. Le premier dénommé HFS pour « *high frequency stimulation* », correspond à l'application d'une stimulation brève mais à haute fréquence (1 train d'impulsions à 100Hz délivré pendant 1s). Le second dit TBS pour « *theta burst stimulation* » est constitué par l'application de 5 trains de 4 impulsions à 100Hz séparés de 200ms, cette séquence étant répétée 4 fois à 10s d'intervalle. Une fois le *stimulus* conditionnant délivré, la stimulation test qui avait initié la ligne de base est reprise et la pente du fEPSP est à nouveau déterminée toutes les 10s pendant 1 heure. La comparaison de cette pente du fEPSP post-tétanique avec la valeur moyenne déterminée pour la ligne de base donne ainsi le niveau de potentialisation généré par le *stimulus* conditionnant. L'utilisation de la pente du fEPSP post-tétanique dans les 15min qui suivent le *stimulus* conditionnant permet de mesurer la « *short term potentiation* » (STP, une forme de plasticité fonctionnelle indépendante de la LTP), et les 15 dernières minutes de l'enregistrement permettent de mesurer la LTP.

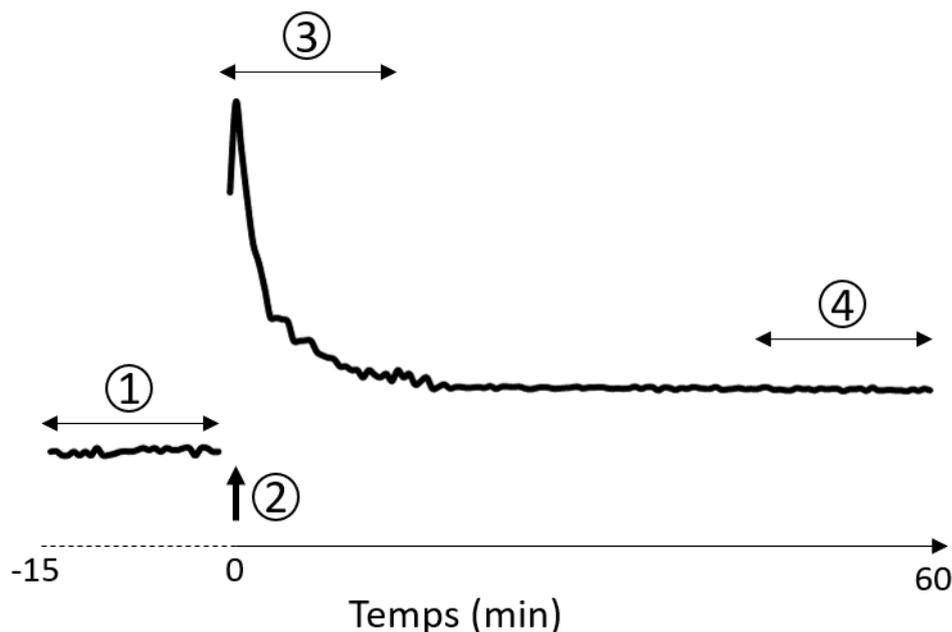


Figure 33 : Représentation d'une LTP avec la ligne de base (1), le stimulus conditionnant (2), la STP (3) et la LTP (4).

Les mesures électrophysiologiques sont réalisées *a minima* sur 5 animaux par groupe expérimental, à raison d'une souris par jour d'enregistrement.

2.4 Immunohistochimie

Cette technique nous a permis de mesurer de potentielles altérations de la transmission GABAergique par la mesure de la densité de neurones positifs à parvalbumine. Les régions cérébrales étudiées sont l'hippocampe dorsal et ventral ainsi que le cortex préfrontal.

2.4.1 Perfusion / fixation

Les souris sont profondément anesthésiées par isoflurane (5%, dans un milieu N₂O/O₂ : 2/1) puis subissent une perfusion intracardiaque d'abord par une solution saline de tampon phosphate (« *phosphate-buffered saline* » PBS 0,1M) contenant un anticoagulant (NaNO₃, 1g/L), puis par une solution de paraformaldéhyde à 4%.

Les cerveaux sont extraits à la suite de la perfusion / fixation (voir Figure 34 A) puis conservés à 4°C dans une solution de paraformaldéhyde à 4%.

2.4.2 Préparation des coupes

Les cerveaux sont coupés selon le plan coronal (épaisseur 40µm) avec un vibratome (Vibratome VT 1000S, LEICA®) (voir Figure 34 B). Les coupes de cerveau comprenant le cortex préfrontal et les hippocampes sont récupérées et conservées à -20°C dans une solution cryoprotectante (PBS 0,1M avec 30% de glycérol et 30% de polyéthylène glycol).

2.4.3 Marquage des neurones positifs à parvalbumine

Les coupes sont rincées dans une solution de PBS 0,1M et incubées dans une solution de PBS 0,1M contenant 0,3% d'H₂O₂, 50% de méthanol, 0,3% de triton pendant 1 heure. Après un rinçage au PBS 0,1M, les coupes sont incubées dans une solution de PBS 0,1M contenant 5% de sérum normal de cheval et 0,3% de triton (X-100), pendant 1h. Ensuite, l'anticorps primaire (monoclonal mouse IgG anti-parvalbumin, 1 :1000, Swant, Switzerland) est ajouté pour une incubation de 48h à 4°C. Après rinçage, les coupes sont incubées avec l'anticorps secondaire (*biotinylated horse anti-mouse IgG*, 1 :200, Vector Laboratories®, UK) pendant 1h30 à température ambiante. Un système de coloration ABC (Vectastain ABC, Vector Laboratories®, UK) est utilisé et l'activité de peroxydase est détectée par une solution de diaminobenzidine (0,05% DAB, 0,01% H₂O₂ dans une solution de PSB 0,1M) (voir Figure 34 C).

2. Méthodologie générale

2.4.4 Montage et scan des lames

Les coupes sont rincées dans une solution de PBS 0,1M puis disposées sur des lames (6 coupes / lame). Ces lames sont déshydratées par bains successifs d'éthanol de concentrations croissantes (70%, 90%, 100%) puis plongées dans un bain d'*histoclear*. Les lamelles sont ensuite fixées avec du ROTI®Histol (Carl Roth, Karlsruhe, Allemagne) (voir Figure 34 D).

2.4.5 Extraction des zones d'intérêt et comptage des neurones à parvalbumine

Le logiciel QuPath® (version 0.1.2) a été utilisé pour détourer les hippocampes dorsaux (bregma de -1,22mm à -2,46mm), les hippocampes ventraux (bregma de -2,46mm à -3,88mm) et le cortex préfrontal (bregma de 1,94mm à 1,42mm) et réaliser un comptage manuel du nombre de neurones à parvalbumine (voir Figure 34 E) afin d'en déduire une densité par mm². L'atlas utilisé la seconde version de « *the mouse brain in stereotaxic coordinates* » par G. Paxinos et B.J. Franklin (Georges & Franklin, 2008).

2. Méthodologie générale

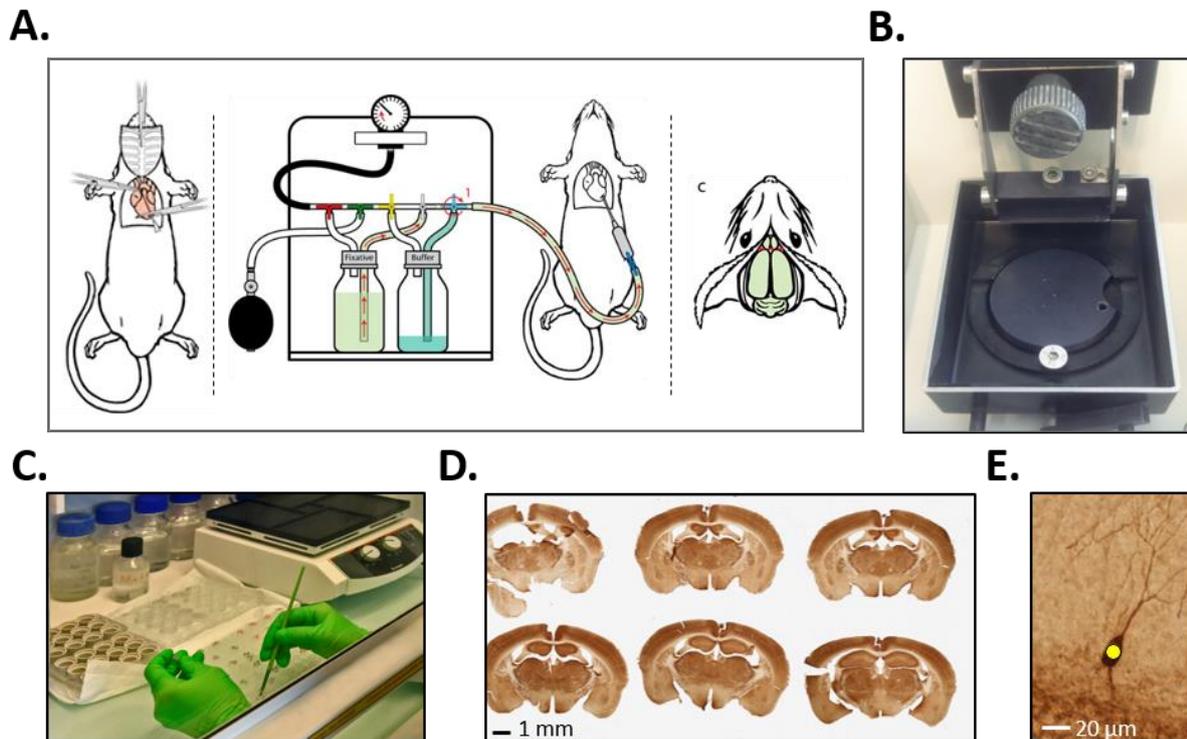


Figure 34 : Etude d'immunohistochimie. A. Schéma de la procédure de perfusion / fixation avec, de gauche à droite, thoracotomie, perfusion intracardiaque et extraction du cerveau. Issu de Gage et al., 2012. B. Photographie du vibratome. C. Photographie d'une étape du protocole de marquage des neurones positifs à parvalbumine. D. Exemple de lame montée et scannée. E. Exemple de neurone positif à parvalbumine pointé pour comptage.

2.5 Imagerie

Les mesures en IRM ont été réalisées avec un imageur 7T Pharmascan (Bruker®, Biospin, Paravision 6.0) (voir Figure 35 A), avec une bobine de surface spécifique pour les souris.

L'atlas utilisé est le « Allen Mouse Brain Atlas » (Lein et al., 2007).

Les images anatomiques (T2) ont été collectées sur des animaux anesthésiés (isoflurane 1-1,5% dans un milieu N₂O/O₂ : 2/1) avec une séquence rapide *spin-echo* de 8min (RARE8, TE=42ms ; TR=5000ms ; 4 moyennages ; FOV 2x2cm² ; 10 tranches contiguës ; matrice : 256x256) (voir Figure 35 B). Les surfaces des hippocampes de 6 images consécutives ont été délimitées manuellement puis multipliées par l'épaisseur de coupe (de 0,5mm) afin d'obtenir des mesures de volume. L'épaisseur corticale a été déterminée par 8 mesures du cortex préfrontal médian (4 mesures de chaque côté, équidistantes de l'axe central) (Piontkewitz et al., 2012) (Duque et al., 2012). Pour les images de diffusion, les animaux ont été profondément anesthésiés (isoflurane 5% dans un milieu N₂O/O₂ : 2/1) puis

2. Méthodologie générale

subissent une perfusion intracardiaque d'abord par une solution saline de tampon phosphate (PBS 0,1M), puis par une solution de paraformaldéhyde à 4%. Les cerveaux sont extraits puis placés dans de la gélatine (2%). Les images de diffusion ont été obtenues à partir de 20 directions et collectées lors d'une séquence de 105min (TE=35ms ; TR=3000 ms ; FOV 14,9x14,9mm² ; 41 coupes continues ; matrix : 128x128 ; facteur b=1000s/mm²). Les cartes de diffusion de la fraction d'anisotropie (FA), des diffusivités radiales et moyennes (respectivement RD et MD, exprimées en mm²/s) ont été extraites sur des surfaces délimitées manuellement.

A.



B.

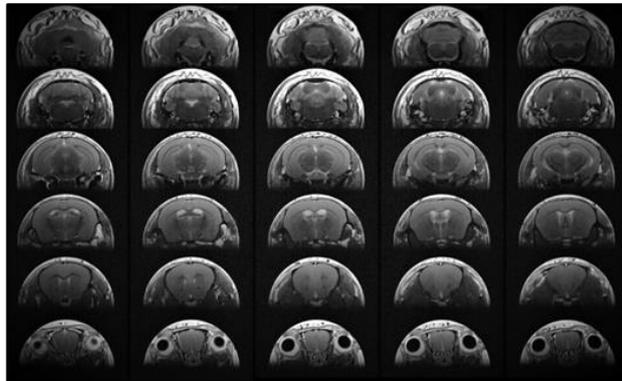


Figure 35 : A. Photographie de l'IRM utilisé (issu de cyceron.fr). B. Exemple d'images T2 acquises post-mortem sur un cerveau de souris conservé dans son crâne.

2.6 Analyses statistiques

Les données ont été analysées avec le logiciel R 3.4.2 (Free Software Foundation, Vienna, Austria; R Development Core team 2009). La normalité des données a été vérifiée par un test de Shapiro. Concernant les données distribuées normalement, les différences intergroupes ont été analysées au moyen d'analyses de variance ANOVAs. Si une différence significative était détectée et si le nombre de groupes expérimentaux était supérieur à 2, un test post-hoc était réalisé avec un ajustement de Tukey. Les comparaisons à des valeurs de référence ont été réalisées avec des tests t pour données non appariées. L'effet de l'administration d'agents pharmacologiques avec comparaison avant / après l'administration ont été réalisés avec des tests t pour données appariées.

Concernant les données non distribuées normalement, les différences intergroupes ont été analysées au moyen d'ANOVAs avec permutations (aovp). Si une différence significative est détectée et si le nombre de groupes expérimentaux est supérieur à 2, un test post-hoc était réalisé (tests t avec permutations) avec la méthode d'ajustement FDR (« *False*

2. Méthodologie générale

discovery rate »). Les comparaisons à des valeurs de référence ont été réalisées avec des tests de Wilcoxon pour données non appariées. L'effet de l'administration d'agents pharmacologiques avec prise de données avant et après l'administration a été mesuré au moyen de tests de Wilcoxon pour données appariées.

Les packages du logiciel R (3.6.2) utilisés sont : lme4, lsmeans, car, lattice, LmPerm, RVAideMemoire, ggplot2, tdisplay, nparLD (voir *Figure 36*).

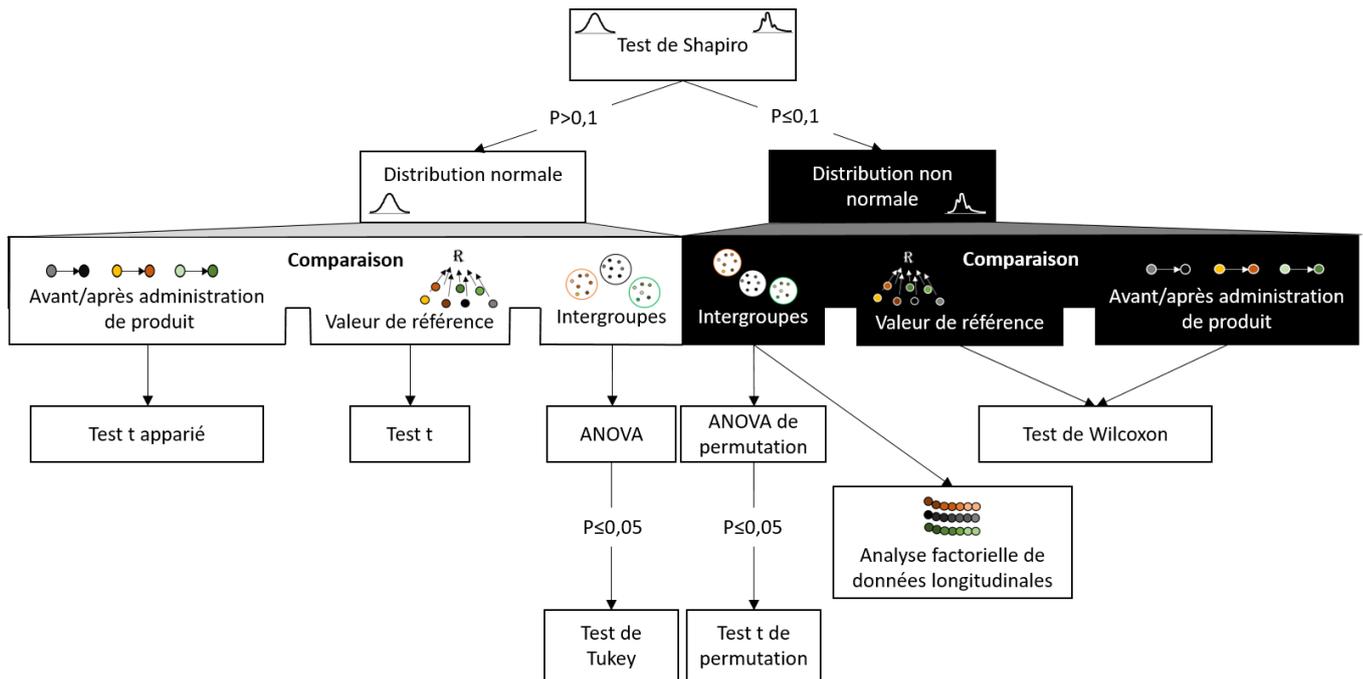


Figure 36 : Arbre décisionnel des tests statistiques utilisés.

3. Résultats

3. Résultats

3.1 Publications

Article 1 :

Bouet V., **Percelay S.**, Leroux E., Diarra B., Leger M., Delcroix N., Andrieux A., Dollfus S., Freret T., Boulouard M. (2020). A new 3-hit mouse model of schizophrenia built on genetic, early and late factors. *Schizophrenia Research*. 2020
<https://doi.org/10.1016/j.schres.2020.11.043> [Sous presse]

Article 2 :

Percelay S., Billard J.-M., Freret T., Andrieux, A., Boulouard M., Bouet V. Functional dysregulations in CA1 hippocampal networks of a 3-hit mouse model of schizophrenia.
[Soumis à *International Journal of Molecular Sciences*].

Article 3 :

Jozet-Alves, C., **Percelay, S.**, & Bouet, V. (2019). Olfactory laterality is valence-dependent in mice. *Symmetry*, 11(9), 1129.

Article 4 :

Percelay S., Boulouard M., Jozet-Alves C., Bouet V. Assessing olfactory laterality in mice: new tool in preclinical psychiatric study. [En cours de préparation pour *Nature protocols*]

Article 5 :

Percelay S., Turnbull N., Freret T., Bouet V., Boulouard M. Combination of MAP6 deficit, maternal separation and MK801 in female mice: a 3-hit animal model of neurodevelopmental disorder with cognitive deficits. [Soumis à *Behavioural Brain Research*]

Article 6 :

Percelay, S., Since, M., Lagadu, S., Freret, T., Bouet, V., & Boulouard, M. (2020). Antipsychotic lurasidone: Behavioural and pharmacokinetic data in C57BL/6 mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 172933.

3. Résultats

3.2 Evaluation de la validité d'apparence

Ce type de validité, appelée aussi phénoménologique, renvoie à l'isomorphisme entre les symptômes et marqueurs biologiques observés dans une pathologie chez l'humain et les symptômes et marqueurs mimés chez les animaux.

L'évaluation de la validité d'apparence d'un modèle de schizophrénie peut se faire par des approches comportementales et physiologiques qui sont complémentaires. Les tests comportementaux permettent d'évaluer les symptômes de type positif (hyper locomotion et stéréotypies), de type négatif (anhédonie, retrait social) et les déficits cognitifs (mémoire de travail, mémoire à long terme, apprentissage). Ces trois types de symptômes sont généralement recherchés afin d'obtenir une validité d'apparence satisfaisante. Les mesures physiologiques (électrophysiologie, immunohistochimie, imagerie) permettent d'identifier des marqueurs d'altérations présentes chez les schizophrènes qui renforcent la validité d'apparence du modèle. Ces mesures physiologiques permettent également de comprendre les mécanismes sous tendant les déficits comportementaux observés.

Nous avons évalué la validité d'apparence du modèle 3-hit à travers un large panel de tests comportementaux permettant de mesurer des symptômes de type positif, négatif et des déficits cognitifs, mais aussi la latéralité olfactive. Des analyses en imagerie, immunohistochimie et électrophysiologie apportent des informations sur les mécanismes qui sous-tendent les déficits observés.

Ainsi, les quatre premiers articles concernent nos travaux qui se sont attachés à analyser cette validité d'apparence. L'article 1 consiste en la première caractérisation de la validité d'apparence du modèle 3-hit. L'article 2 permet d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes qui sous-tendent les déficits observés dans l'article 1.

L'article 3 est la première description d'un test de latéralité olfactive chez la souris, il nous a permis d'évaluer ce comportement chez les animaux 3-hit dans l'article 4.

3. Résultats

3.2.1 Article 1 : A New 3-Hit Mouse Model of Schizophrenia Built on Genetic, Early and Late Factors

Valentine Bouet^a, Solenn Percelay^a, Elise Leroux^d, Boubacar Diarra^a, Marianne Léger^a, Nicolas Delcroix^c, Annie Andrieux^b, Sonia Dollfus^{d,e}, Thomas Freret^a, Michel Boulouard^a

^a Normandie Université, UNICAEN, INSERM, COMETE, CYCERON, CHU CAEN, 14000 Caen, France

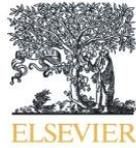
^b Univ. Grenoble Alpes, Inserm U1216, CEA, Grenoble Institut Neurosciences, 38000 Grenoble, France

^c CNRS, UMS 3408, GIP CYCERON, Bd Henri Becquerel, BP5229, 14074 Caen cedex, France

^d Normandie Université, UNICAEN, EA 7466 ISTS, GIP Cyceron, 14000 Caen, France

^e CHU de Caen, Service de Psychiatrie Adulte, 14000 Caen, France

Schizophrenia Research. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2020.11.043>



Contents lists available at ScienceDirect

Schizophrenia Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/schres

A new 3-hit mouse model of schizophrenia built on genetic, early and late factors

Valentine Bouet^{a,*}, Solenn Percelay^a, Elise Leroux^d, Boubacar Diarra^a, Marianne Léger^a, Nicolas Delcroix^c, Annie Andrieux^b, Sonia Dollfus^{d,e}, Thomas Freret^{a,1}, Michel Boulouard^{a,1}

^a Normandie Université, UNICAEN, INSERM, COMETE, CYCERON, CHYU CAEN, 14000 Caen, France

^b Univ. Grenoble Alpes, Inserm U1216, CEA, Grenoble Institut Neurosciences, 38000 Grenoble, France

^c CNRS, UMS 3408, GIP CYCERON, Bd Henri Becquerel, BP5229, 14074 Caen cedex, France

^d Normandie Université, UNICAEN, EA 7466 ISTS, GIP Cyceron, 14000 Caen, France

^e CHU de Caen, Service de Psychiatrie Adulte, 14000 Caen, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 January 2020

Received in revised form 12 November 2020

Accepted 23 November 2020

Available online xxx

Keywords:

Psychosis

MAP6

Multiple-hit

Stress

Memory

Sociability

ABSTRACT

Whether the etiology of schizophrenia remains unknown, its multifactorial aspect is conversely now well admitted. However, most preclinical models of the disease still rely on a mono-factorial construction and do not allow to discover unequivocal treatments, particularly for negative and cognitive symptoms. The main interaction factors that have been implicated in schizophrenia are a genetic predisposition and unfavorable environmental factors. Here we propose a new animal model combining a genetic predisposition (1st hit: partial deletion of *MAP-6* (*microtubule-associated protein*)) with an early postnatal stress (2nd hit: 24 h maternal separation at postnatal day 9), and a late cannabinoid exposure during adolescence (3rd hit: tetrahydrocannabinol THC from post-natal day 32 to 52; 8 mg/kg/day). The 2-hit mice displayed spatial memory deficits, decreased cortical thickness and fractional anisotropy of callosal fibers. The 3-hit mice were more severely affected as attested by supplementary deficits such a decrease in spontaneous activity, sociability-related behavior, working memory performances, an increase in anxiety-like behavior, a decrease in *hippocampus* volume together with impaired integrity of *corpus callosum* fibers (less axons, less myelin). Taken together, these results show that the new 3-hit model displays several landmarks mimicking negative and cognitive symptoms of schizophrenia, conferring a high relevance for research of new treatments. Moreover, this 3-hit model possesses a strong construct validity, which fits with gene x environment interactions hypothesis of schizophrenia. The 2-hit model, which associates maternal separation with THC exposure in wild-type mice gives a less severe phenotype, and could be useful for research on other forms of psychiatric diseases.

© 2020 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Affecting 1% of worldwide population, schizophrenia is the most frequent chronic psychosis. Patients may present several symptoms (positive and negative symptoms and cognitive deficits), with varying intensities and outcomes (Davidson and McGlashan, 1997). In human, sex ratio is 1.4 for schizophrenia (60% men, 40% women), men being affected earlier and with more severe symptoms (more negative symptoms and cognitive deficits), and more structural and functional brain abnormalities (Leger and Neill, 2016; Leung and Chue, 2000). While etiology is not fully understood, it is now undoubted that schizophrenia results from complex gene x environment interactions (Millan et al.,

2016; van Os et al., 2010). Further, among possible causes of the disease, most clinicians agree on the long-standing model of 'stress vulnerability'. It suggests that individuals possess different levels of vulnerability to schizophrenia, determined by a combination of biological, social and psychological factors. A genetic vulnerability could be revealed and would favored schizophrenia appearance in case of an association with early stress (alimentary deficiency during pregnancy, mother stress ...) and late environmental factors (urban birth, heavy cannabis use ...) (Di Forti et al., 2019; Millan et al., 2016).

Efficiency of currently market drugs is only symptomatic. Besides, they mostly target positive symptoms, while negative and cognitive symptoms are often ignored (Murphy et al., 2006). Among the main possible explanations is the relevance of the animal models and, consequently, the lack of confidence of clinicians in the efficiency of drugs that emerge from animal experiments. Overall, there is a consensus for refinement of preclinical research (Burrows and Hannan, 2016; Moore, 2010). Indeed, good construct validity in animal models of

* Corresponding author at: Normandie Université, UNICAEN, INSERM, COMETE, Boulevard Henri Becquerel, campus Horowitz, 14032 Caen, France.

E-mail address: valentine.bouet@unicaen.fr (V. Bouet).

¹ Both authors equally contributed to the study.

<https://doi.org/10.1016/j.schres.2020.11.043>

0920-9964/© 2020 Published by Elsevier B.V.

Please cite this article as: V. Bouet, S. Percelay, E. Leroux, et al., A new 3-hit mouse model of schizophrenia built on genetic, early and late factors, *Schizophrenia Research*, <https://doi.org/10.1016/j.schres.2020.11.043>

schizophrenia is mandatory (Jones et al., 2011; Young et al., 2012) and could be achieved by resorting multiple interventions (Ellenbroek, 2003; Sullivan et al., 2012). Unfortunately, 2- or 3-hit interventions are rarely investigated in preclinical research (Hida et al., 2013). Herein, we aimed at characterizing a mouse model of schizophrenia based on the combination of three factors: genetic alteration, early stressing event and a late environmental factor. Among candidate genes having been so far associated to schizophrenia, MAP6 revealed several interests (Marchisella et al., 2016; Schloss and Lau, 2012; Shimizu et al., 2006). The gene encoding MAP6 proteins is localized in the human 11q14 chromosomal region containing many susceptibility genes for schizophrenia (Lewis et al., 2003) and polymorphisms in gene MAP6 have been associated with schizophrenia (Shimizu et al., 2006). MAP6 protein expression has been shown to be altered in schizophrenia (Choi et al., 2009) as well as in autism (Wei et al., 2016). Indeed, at the biological level, MAP6 (microtubule-associated protein 6, also known as *stop* for stable-tubule-only-polypeptide) belongs to genes involved in neuron architecture, synaptic plasticity and brain development (Deloulme et al., 2015). Whether full deletion of *map6* gene ($MAP6^{-/-}$) induces several dysfunctions considered as landmarks of schizophrenia (glutamatergic and dopaminergic neurotransmission alterations), neuronal disconnection and severe behavioral defects (Bouvrais-Veret et al., 2008; Brenner et al., 2007; Gimenez et al., 2017) heterozygous mice ($MAP6^{+/-}$) appear contrastingly only slightly affected with cognitive and social impairments (Merenlender-Wagner et al., 2014, 2010; Volle et al., 2013). $MAP6^{+/-}$ mice were thus proposed as a translational animal model for the genetic ultra-high-risk states of schizophrenia (Volle et al., 2013). The validity of the model was supported by the exacerbation, through severe early stressful events (chronic maternal deprivation from PND 2 to 14) of the phenotype of $MAP6^{+/-}$ mice which become then markedly altered (notably in locomotor reactivity to either acute mild stress or psychostimulant challenge) (Volle et al., 2013). Hence, whether $MAP6^{+/-}$ mice enabled promising results, in line with the stress vulnerability theory, their reactivity to a combination of an early stress event with late environmental factor remains to be investigated. Early stress event can be achieved through a 24 h maternal separation when pups age of 9 days (Ellenbroek et al., 1998). This model induces an altered brain neurotransmission (Marco et al., 2015), associated with exacerbated behavioral responses to pharmacological potentiation of dopaminergic system (Rots et al., 1996; Zimmerberg and Shartrand, 1992). Besides, it induces a social withdrawal in adult mice (Bouet et al., 2011) (one of the negative symptoms of schizophrenia). Finally, considering late environmental factor, growing number of evidences from epidemiological studies argues that consumption of THC (from cannabis) particularly during adolescence is associated with a two-fold increased risk of later psychotic disorder (Arseneault et al., 2002; Di Forti et al., 2019; Rubino and Parolaro, 2014). In preclinical studies, persistent changes in cognitive and emotional processes were described in adult animals after a chronic THC treatment during adolescence (Cha et al., 2006; Rubino et al., 2009). Therefore, three groups of animals were constituted: wild type mice with no environmental manipulation (control mice, $n = 13$), wild type mice submitted to both maternal separation and tetrahydrocannabinol exposure (THC from PND32 to 52) (2-hit group, $n = 12$), and heterozygous $MAP6^{+/-}$ mice submitted to maternal separation and THC exposure (3-hit group, $n = 7$). The possible differences that can be obtained between males and females in such a sophisticated model, as previously reported (Kekesi et al., 2015), would have introduced again another factor. Therefore only males were used in the present study. Several behavioral tests have been selected to assess positive-like (actimeter and open field), negative-like (approach avoidance, anhedonia), and cognitive-like symptoms (spontaneous alternation, Morris water maze). Moreover, high and low resolution (*ex-vivo* and *in-vivo*, respectively) magnetic resonance imaging (MRI) were performed to assess anatomical changes (volume, thickness, and fibers integrity of white matter) in 3 different regions of interest (*hippocampus*, parietal cortex and *corpus callosum*) (Wolf et al., 2008).

Finally, given that GABA neurotransmission has been shown to be affected in schizophrenia (Gonzalez-Burgos et al., 2011; Nakazawa et al., 2012), and that investigating parvalbumin cells (PV+ cells) is particularly relevant in preclinical, neurodevelopmental, models of schizophrenia (Schmidt and Mimics, 2015), we performed immunohistochemistry to label and measure PV+ cells density of GABAergic interneurons in *hippocampus* and prefrontal cortex (Du and Grace, 2016; Giovanoli et al., 2014; Nakazawa et al., 2012; Volk and Lewis, 2014). Our study showed that the partial deletion of *map6* gene, combined to an early stress (maternal separation) and to a chronic exposure to THC during adolescence, induced memory impairments and social behavior disorders that mimic some signs of schizophrenia. This behavioral phenotype came with structural alterations in *corpus callosum* fibers and a decrease in cortical thickness.

2. Methods

2.1. Animals

Heterozygous $MAP6^{+/-}$ male mice and their wild type littermates $MAP6^{+/+}$ were generated from C57Bl6/129SvPas F1 animals (Andrieux et al., 2002). $MAP6^{+/-}$ males were mated with C57Bl6 females and pups were thereafter bred in standard laboratory cages ($n = 5$ per cage). All animals were housed in a normal 12 h light-dark room (light on at 8 am), with regulated temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) and humidity ($55 \pm 10\%$), and with free access to food and water. At weaning, end tail collection was performed in all mice under anesthesia (isoflurane 5%), for genotyping as previously described (Volle et al., 2013). Experiments were performed in accordance with French and European Economic Community guidelines for the care and use of laboratory animals (2010/63/UE) and authorized under the No. APAFIS#8203-2016120817103795v4.

2.2. Animal groups and treatments

At 9 days of age (PND9), litters were separated from their dam and placed in a nearby cage during 20 s (control group) or 24 h (early environmental stress) (Bouet et al., 2011). From P32 to P52, mice received daily intraperitoneal injection of either vehicle (3.5% Tween 80 in serum solution) or tetrahydrocannabinol (THC; 8 mg/kg, subcutaneous, Sigma Aldrich®) and assigned to either control or 2-hit group, and respectively 3-hit group (Fig. 1). Such a treatment has been shown to induce behavioral and neurotransmitter systems alterations in genetically modified mice (COMT KO) (Behan et al., 2012; O'Tuathaigh et al., 2010). There was no significant mortality related to any of the three hits or to their combination.

2.3. Behavioral assessment

After a one-week washout period, a set of behavioral tests was performed (Fig. 1) by an experimenter blind to group genotype and/or treatment.

2.3.1. Black and white box

Black and white box (LE810, Leticia®) was used to assess anxiety-like behavior (Lelong-Boulouard et al., 2006). The apparatus consisted in a large white illuminated compartment (28 cm \times 27 cm \times 27 cm, 900 lx) connected by a small opening to a small dark compartment (17 cm \times 27 cm \times 27 cm, 100 lx, red light). Mice were free to explore for 5 min during which the time spent in each box and the number of transitions between the two were recorded.

2.3.2. Actimeter

Spontaneous locomotor activity was measured in a restrained environment through an automated actimeter (Imetronic®) (Since et al., 2013). Mice were individually placed in standard cages

	1 st hit Gene susceptibility	2 nd hit Early stress	3 rd hit Environmental exposure		Behaviour	In vivo	Euthanasia	Post-mortem analyses	
Age (days)		0	9-10	32-52	52-59	60-180	180	182	
		Birth	Maternal separation	THC	Washout				
Control n=13	Wild Type		20s	Vehicle					
2-hit n=12	Wild Type		24h	THC treatment 8mg/kg/day				Ex vivo MRI	
3-hit n=7	MAP6 +/-		24h	THC treatment 8mg/kg/day		In vivo MRI		Immuno- histochemistry	
					P60 White and dark box P67 Actimetry P74 Open field P77 Spontaneous alternation P82 Approach-avoidance P110 Sucrose preference P124 Nesting behavior P150-153 Morris water maze				

Fig. 1. Experimental design and animal groups setting (MAP6: microtubule-associated protein, THC: tetrahydrocannabinol, MRI: magnetic resonance imaging).

(19 cm × 11 cm × 14 cm), under two lines of infrared beams. Numbers of beam crossing reflecting locomotor activity were automatically counted during 1 h.

2.3.3. Open field

Mice were individually placed for 30 min in a white and squared (50 cm × 50 cm × 50 cm) open arena. Total travelled distance and percentage of time spent in the center part of the arena were automatically collected (Ethovision, Noldus®).

2.3.4. Y-maze task

Y-maze task was used as previously described (Bazin et al., 2009), to assess spatial working memory. Each mouse was placed for 5 min in the maze, consisting of three equally spaced arms (each sized 22 cm × 6.5 cm × 10 cm) made of black-painted wood. Number and sequence of arm entries (four-paw criterion), as well as number of rearing were collected. Alternation percentage was calculated by the formula: number of alternation / (total number of entries - 2) × 100.

2.3.5. Approach avoidance task

Approach avoidance task allowed assessing social behavior (Bouet et al., 2011). Briefly, the apparatus consisted of a testing compartment (27 cm × 18 cm × 21 cm) with three interconnected chambers and a compartment for the stimulus animal (6.5 cm × 18 cm × 21 cm), the two being separated by a transparent plastic perforated wall to ensure visual and olfactory communication. The tested mouse was placed in the center of the testing compartment and the stimulus mouse was placed in the other compartment for 5-min. The stimulus animal was a 45 days old mouse, different for each trial. The time spent by the tested mouse in each of the three parts (i.e. close, middle, or far from the stimulus mouse) was collected during 5 min. Sociability index was calculated by the formula: (time spent close to the stimulus mouse) - (time spent in the opposite compartment from the stimulus mouse).

2.3.6. Sucrose preference test (Pozzi et al., 2014)

Animals were placed one by cage for the duration of the experiment. After measurement of water intake on a 24 h period, two bottles (water and sucrose 2%) were simultaneously proposed during a 72 h period. Anhedonia was estimated through sucrose preference, calculated with the following formula: (sucrose solution intake / total intake) × 100.

2.3.7. Nesting behavior (Deacon, 2006)

Mice were individually housed for this test, performed just after the previous one. One hour before the dark phase, mice were provided one Nestlet each (without any other enrichment item). The morning after,

the nests were assessed and a score between 0 and 5 was attributed (Deacon, 2006).

2.3.8. Morris water maze (MWM)

Morris water maze (MWM) consists of a circular maze (120 cm diameter), filled with 21 °C opaque water (Bouet et al., 2007). A squared Plexiglas platform (13 cm × 13 cm) was hidden 0.5 cm below the surface of water in a fixed position. Swim paths were automatically monitored (Ethovision, Noldus®). Learning phase consisted in 4 trials/day (90 s each, 20 s of reinforcement and 1 h inter-trial interval) during 5 consecutive days. A probe trial (no platform, 60 s) was performed 1 h after the final trial of learning session.

2.3.9. MRI examinations

MRI examinations were performed on a 7 T Pharmascan (Bruker®, Biospin, Paravision 6.0), with a mouse brain specific surface coil. To ensure mechanical constraints of the skull for anatomical measures, anatomical T2-weighted images were collected in anesthetized animals (isoflurane: 1-1.5% in N₂O/O₂: 2/1) through a 8 min fast spin-echo sequence (RARE8, TE = 42 ms; TR = 5000 ms; 4 averages; FOV 2 cm × 2 cm; 10 contiguous slices; matrix: 256 × 256). Surface of bilateral hippocampus on 6 consecutive images was manually delineated and multiplied by slice thickness (0.5 mm) for volume measurements. Cortical thickness was determined through 8 measures within the medial parietal cortex (4 on each side, equidistant from middle plane), as previously described (Duque et al., 2012). Thereafter, mice (n = 5/group) were deeply anesthetized with isoflurane (5%) and transcardially perfused with phosphate buffer saline (PBS 0.1 M) followed by a 4% paraformaldehyde solution. Brains extracted from the skull were embedded in gelatin (2%). Diffusion-weighted images were obtained from 20 directions, which were collected through 105 min sequence (TE = 35 ms; TR = 3000 ms; FOV 14.9 mm × 14.9 mm; 41 contiguous slices; matrix: 128 × 128; factor b = 1000s/mm²). Diffusion maps of anisotropy fractional (FA) as well as radial and mean diffusivities (RD and MD in mm²/s, respectively) were extract in the surface of the manually delineated (FSL software®) corpus callosum of each mouse. Loss of integrity was characterized by decreased FA (axonal degeneration) as well as increased RD and MD (demyelination) (Beaulieu, 2002; Leroux et al., 2013).

2.4. Immunohistochemistry

After being used for ex vivo MRI, brains were coronally sectioned (40 µm thickness) on a vibratome apparatus (VT1000S, Leica®). Free-floating sections were washed in PBS 0.1 M and incubated 1 h in 0.3% H₂O₂/50% methanol/0.3% triton in PBS 0.1 M. After rinsing, sections were incubated 1 h in 5% normal horse serum/0.3% Triton X 100 in

PBS 0.1 M before adding 1:1000 primary antibody (monoclonal mouse IgG anti-parvalbumin, Swant®) for 48 h, 4 °C incubation. After rinsing, sections were incubated for 90 min at room temperature with 1:200 secondary antibody (biotinylated horse anti-mouse IgG, Vector Laboratories®). ABC staining system (Vectastain ABC, Vector Laboratories®) was used for staining and peroxidase activity was detected with diaminobenzidine solution (0.05% DAB/0.01% H₂O₂ in PSB 0.1 M). Sections were scanned on Aperio high-resolution scanner (ScanScope®). Density of PV+ cells was counted in sub-regions of bilateral prefrontal cortex (Infralimbic IL, prelimbic PrL and cingulate CgL) and of bilateral dorsal hippocampus (cornu ammonis CA1, CA2–3 and dentate gyrus GD) (Paxinos and Franklin, 2012).

2.5. Statistics

Statistical analyses were performed with JMP® to detect differences between the three groups control, 2-hit, and 3-hit (see Fig. 1). Except for the MWM for which ANOVA followed by post-hoc test were performed (Fisher PLSD), all data were analyzed with Kruskal-Wallis followed by Dunn's Multiple Comparison Test. Wilcoxon Signed Rank Test was used to compare data to a theoretical value. We conducted intra-group Pearson correlation analyses in the three groups (3-hit, 2-hit and control) to assess possible relationships between brain morphometry data (cortical thickness, volume of the hippocampus and values of FA and RD in corpus callosum) with behavioral data (total distance and percentage of time spent in the center of open field, time spent in the white box, alternation percentage in Y-maze, sociability index and time spent in target quadrant of MWM), which were significantly different between groups ($p < 0.05$) or with a strong tendency ($p < 0.065$).

3. Results

3.1. Behavioral assessment

3.1.1. Anxiety-like behavior

The number of transitions between the two boxes differed between groups (Kruskal-Wallis, $p = 0.043$, Fig. 2A). The activity in 2-hit and 3-hit was lower than controls but the large variability observed in the 2-hit group data probably account for an absence of significant difference between pairs of groups with the Dunn's test. Time spent in the white box did not differ between groups (Kruskal-Wallis, $p = 0.303$) attesting for no increased anxiety-like behavior.

3.1.2. Spontaneous activity

In the actimeter box, the number of infrared beam interruptions did not differ between animal groups (Kruskal-Wallis, p value = 0.733). On the contrary, when animals were tested in the open field arena, there was a global difference between groups (Kruskal-Wallis, $p = 0.021$). Dunn's Test revealed a lower horizontal activity for 3-hit animals compared to control ($p = 0.008$) and to 2-hit ($p = 0.021$) animals (Fig. 2B). Moreover, the percentage of time spent in the center of the open field differed between groups (Kruskal-Wallis, $p = 0.028$). Further Dunn's multiple comparison showed a decrease in percentage of time spent in the center for 3-hit animals compared to controls ($p = 0.002$) (Fig. 2C).

3.1.3. Spontaneous alternation

The number of visited arms in the Y-maze did not differ between groups (Kruskal-Wallis, $p = 0.189$). Global analysis did not show a difference in spontaneous alternation between groups (see Fig. 2D) ($p = 0.464$). The number of rearing in the Y-maze did not differ between groups (Kruskal-Wallis, $p = 0.206$). However, Wilcoxon signed rank test revealed that control and 2-hit animals had significant memory performances (i.e. alternation significantly above theoretical value of 50%; respectively, medians of 63.2 and 65.0%; $p = 0.025$; 0.010), but not 3-

hit animals (55.6% and $p = 0.218$). The 3-hit therefore displayed deficits in the alternation task.

3.1.4. Approach avoidance

Although no group difference was observed for the sociability index (Fig. 2E, Kruskal-Wallis, $p = 0.122$), only control animals displayed a value significantly above zero (Wilcoxon signed rank test, $p = 0.036$). Although sociability index was very close to the threshold for 2-hit animals ($p = 0.054$), 3-hit animals did not prefer the compartment close to the stimulus mouse (negative sociability index, not different from zero $p = 0.578$). Hence, while it was normal and close-to-normal for control and 2-hit animals, respectively, social behavior was severely impaired in 3-hit mice.

3.1.5. Sucrose preference

There was no difference between groups in total water intake (Kruskal-Wallis, $p = 0.286$). Besides, when the choice between water and 2% sucrose was given, all groups had a similar behavior (no difference between groups: Kruskal-Wallis, $p = 0.106$) and significantly preferred sucrose (Wilcoxon signed rank test, control: $p < 0.0001$, 2-hit: $p < 0.001$; 3-hit: $p = 0.031$).

3.2. Nesting behavior

Mice built nests with the cotton Nestlet during the dark phase. All the three groups obtained scores above 4 and there was no global difference between the groups (Kruskal-Wallis, $p = 0.128$).

3.3. Morris water maze

Spatial learning performances revealed a significant time-dependent decrease in distance travelled to reach platform (ANOVA, time effect $p < 0.0001$), but neither groups difference (group effect $p = 0.882$), nor interaction between the two ($p = 0.998$) (Fig. 2F). Even if groups' performances appear similar (with a decrease of the time to reach the platform over trials), further analysis of individual performance showed different proportions of animals within three groups which still displayed a maximum latency to find the platform at the last day of learning (D5): 7.6% in controls, 25% in 2-hit, and 28.5% in 3-hit. Those animals ceased swimming and floated until the limit obtaining a low distance but a high latency, particularly the two last days of learning (D4 and D5). Besides, this floating behavior was increasing along trials. Concerning the time in quadrants during probe test, performed 1 h after the last learning trial, there was a global difference between the groups (ANOVA, group effect $p = 0.006$), a global difference between quadrants ($p < 0.001$), and no significant interaction ($p = 0.147$) (Fig. 2G). Fisher PLSD revealed differences between control and 2-hit ($p = 0.002$) and between control and 3-hit ($p = 0.036$), but not between 2-hit and 3-hit ($p = 0.526$). Moreover, the comparison of the time spent in target quadrant with the theoretical value of 15 s showed that only control animals stayed more than 15 s in the target quadrant (univariate t -test, $p = 0.011$ for control, $p = 0.267$ and $p = 0.398$ for 2-hit and 3-hit groups, respectively) (Fig. 2H). Therefore, only control animals had significant reference memory performances 1 h after the last learning trial even if all groups had similar performances during learning.

3.4. Immunohistochemistry

There was no group difference in the density of PV+ cells, neither in the prefrontal cortex, nor in the hippocampus ($p = 0.961$ and 0.402, respectively). Furthermore, there was no group difference whatever the sub-region considered in each of these brain structures (IL: $p = 0.532$; PrL: $p = 0.811$; CgL: $p = 0.543$; CA1: $p = 0.311$; CA2–3: $p = 0.691$; GD: $p = 0.618$) (Fig. 3A and B).

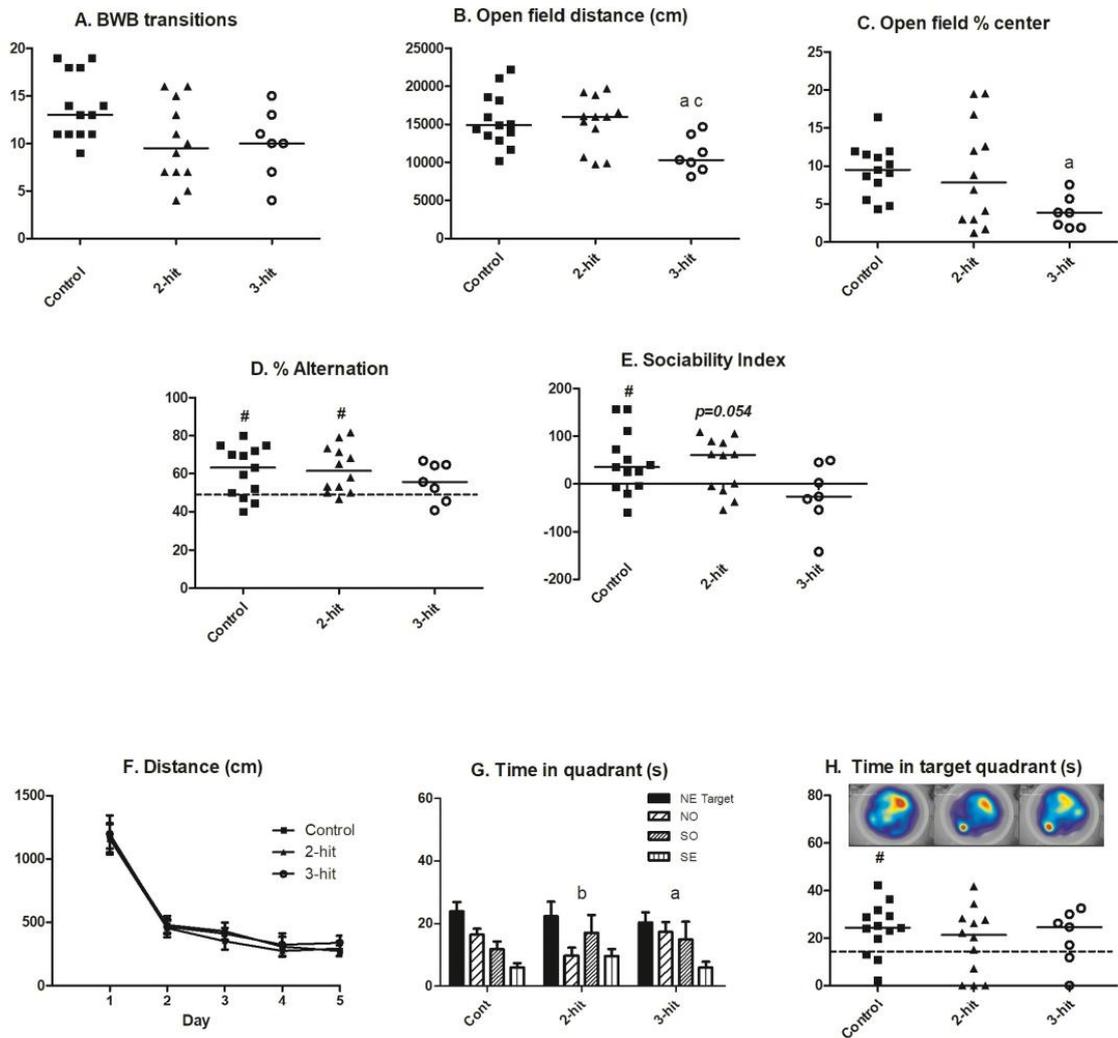


Fig. 2. Behavioral effects of 2-hit and 3-hit combinations. A. Number of transitions in the black and white box (BWB). B. Distance (cm) covered in open field during 30 min. C. Percentage of time in the center of the open field. D. Percentage of alternation percentage in Y-maze (horizontal broken: 50%). E. Sociability index. F. Distance (cm) travelled in the MWM across days of learning. G. Time spent in each quadrant (s) during the probe test of MWM. H. Time spent in the target quadrant (s) during the probe test of MWM (horizontal broken: 15 s). # indicates a significant difference from 50% (D), from 0 (E), or from 15 s (H). Intergroups differences ($p < 0.05$) were signed as a (control vs 3-hit), b (control vs 2-hit), and c (2-hit vs 3-hit). Data are scatter dot plot and median for A, B, C, D, E, H, and mean \pm SEM for F and G.

3.5. Brain morphometry

A statistical group difference was observed for cortical thickness ($p = 0.037$, Fig. 3C), with 2-hit and 3-hit groups significantly smaller than control group (Wilcoxon, $p = 0.035$ and $p = 0.045$ respectively). Besides, the p value obtained when hippocampal volumes were compared between the groups, $p = 0.065$ was close to the threshold (Fig. 3D), with 3-hit group displaying smaller hippocampal volume than 2-hit group ($p = 0.022$). White matter imaging revealed a significant group difference in *corpus callosum* FA and RD values ($p = 0.036$ and $p = 0.048$, respectively) (Fig. 3E and F). Both 2-hit and 3-hit groups showed lower FA values compared to control groups ($p = 0.037$ and $p = 0.037$, respectively), whereas only 3-hit group showed a significant increase in RD compared to control ($p = 0.037$) (Fig. 3E and F).

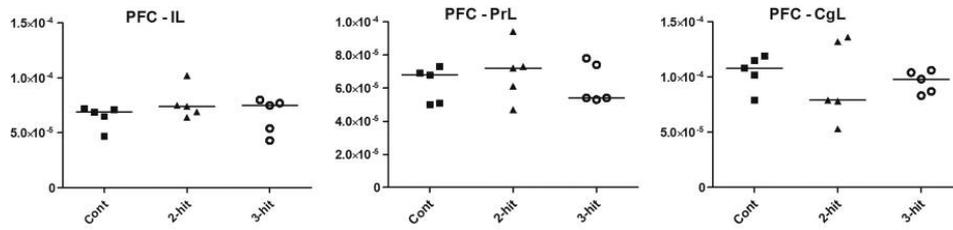
3.6. Correlations

Correlations analyses showed a significant, negative correlation between RD values in corpus callosum and sociability index ($p = 0.0037$, $r = -0.98$; r : correlation coefficient) in 2-hit group. All others correlations for each group were not significant.

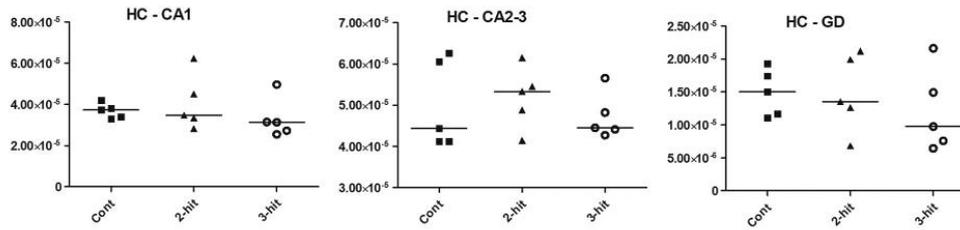
4. Discussion

The aim of the study was to characterize the phenotype of mice submitted to three different hits known to be risk factors for the development of schizophrenia. The combination of a partial deletion of MAP6 (1st hit) with an early life stress (caused by maternal separation, 2nd hit) and a chronic exposure to THC during adolescence (3rd hit) induced

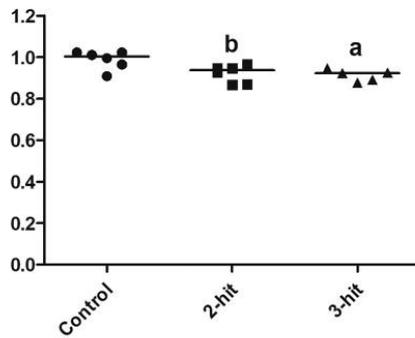
A. PV+ cells in prefrontal cortex



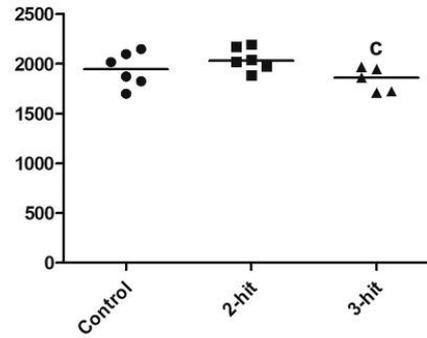
B. PV+ cells in hippocampus



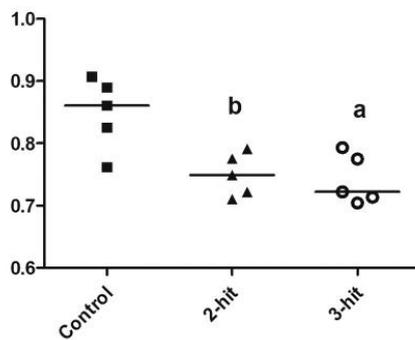
C. Cortical thickness (mm)



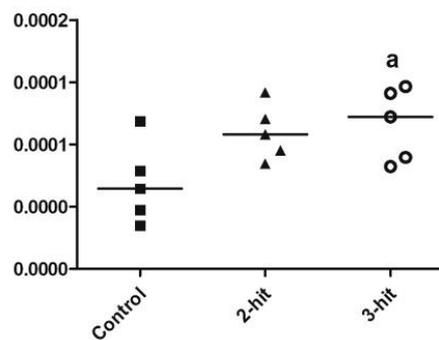
D. Hippocampus volume (μm^3)



E. Fractional Anisotropy (FA)



F. Radial Diffusivity (RD)



behavioral deficits that mimic some signs of schizophrenia. Indeed, our results showed an increased anxiety only in few tests (decreased time in the center in open field, decreased activity in black and white box and open field) suggesting the 3-hit mice are probably more sensitive to stressing environments than control mice. Indeed, the fact that a difference between groups was observed in open field and in black and white box but not in actimeter suggests that animals' emotionality, and particularly state anxiety, is different between control and 3-hit animal, more than spontaneous activity *per se*. In open field, and black and white box, the environment is considered to be aversive because of the light and the unknown environment (Lezak et al., 2017; Bourin, 2015). In the actimeter, the environment is more familiar for the animal because the box is small, surmounted by a rooftop, and, moreover, because the test duration is long (1 h) novelty and related stress decrease with time (Lister, 1990). The 3-hit mice also displayed a decreased index of sociability and working memory deficits as well as long-term memory spatial impairments (and, in another cohort of 3-hit animals, deficit in PPI, see Supplementary data 2). Imaging study revealed alterations in *corpus callosum* fibers and a decrease in cortical thickness. To our knowledge, even if additional experiment has to be performed, this is the first study presenting such a construct validity in a mouse model, based on the most recent multifactorial theories of schizophrenia (Millan et al., 2016). Combining factors is one of the major issues to build an animal model of schizophrenia with a powerful validity (Ayhan et al., 2016; Robertson et al., 2006; Winship et al., 2019). Our hypothesis was that the genetic deletion would induce an increased vulnerability to the two other factors. The first hit, considered herein, is a partial deletion of *map6*. Microtubule-associated proteins have a fundamental role in neuronal growth, brain connectivity, synaptic vesicles structure and both short- and long-term plasticity (Andrieux et al., 2002; Deloulme et al., 2015; Gimenez et al., 2017; Peris et al., 2018). Previous study using heterozygous *MAP6^{+/-}* mice (Merenlender-Wagner et al., 2010; Powell et al., 2007; Volle et al., 2013) reported deficits in social interaction and learning and a slight impairment in sensorimotor gating without drastic alteration in global activity. In another cohort of *MAP6^{+/-}* mice (Supplementary data 1), we did not observe deficits in spontaneous alternation, sociability, anxiety- and depressive-like behavior. Taken together, these observations are consistent with data obtained in our study, and confirm the slight influence of the 1st hit (partial genetic deletion) to social deficits. Interestingly, Volle et al. (2013) also showed that *MAP6^{+/-}* mice are more sensitive to an early stress induced by maternal deprivation (daily for 6 h between postnatal days 2 and 14). The second hit, maternal separation, is known to increase dopaminergic system functioning (Ellenbroek et al., 1998), increase anxiety level, and decrease social behavior (Bouet et al., 2011; Rentesi et al., 2013), such as observed in 3-hit animals. Concerning the 3rd hit, *i.e.* adolescence chronic THC exposure, animals studies showed that it induced deficits in PPI and in working and spatial memory (Quinn et al., 2008; Renard et al., 2014; Rubino et al., 2009; Schneider and Koch, 2003), in social interaction (Boucher et al., 2007; Zamberletti et al., 2012), and in anxiety level (O'Shea et al., 2004). More precisely, chronic THC (or cannabinoid agonists) exposure during adolescence has been shown to cause cognitive - learning and memory - deficits (working memory, object recognition), in connection with impaired structural and synaptic plasticity in brain regions (Ballinger et al., 2015; Keeley et al., 2015b; O'Tuathaigh et al., 2012). Besides, social behavior and hedonia are also affected (Renard et al., 2016). Interestingly, as reported herein, spatial memory performances in the Morris water maze task seem to be relatively preserved by cannabinoid exposure (at least the learning phase), and data on anxiety-related behavior are controversial (Keeley et al., 2015a). Those effects, or part of them, could be involved in the deficits observed in 3-hit animals.

In our conditions, it was not possible to identify all the interactions between factors that take place in the 3-hit mice. However, comparison between 2-hit and 3-hit groups showed a possible genetic vulnerability to the two supplementary environmental factors. The ending phenotype of the 3-hit would be the results of interactions between factors. In regards to literature, it is realistic to consider interactions between genetic and environmental factors, and particularly that the partial deletion of *map6* induces a more pronounced vulnerability to the two additional factors (Volle et al., 2013). This is indeed what is suggested by most behavioral results obtained here (3-hit are impaired but not 2-hit except for the MWM) and by the alterations in volume of the *hippocampus* and radial diffusivity in the *corpus callosum* (decreased in 3-hit but not in 2-hit animals). First, as already shown (Powell et al., 2007), the genetic deletion in itself does not affect the volume of the *hippocampus*. Second, the combination of maternal separation with THC exposure does not affect neither the volume of the *hippocampus* (2-hit). However, in 3-hit animals, the volume of *hippocampus* decreased, accounting for a genetic vulnerability rendering more sensitive to the two subsequent factors. For other parameters, the vulnerability does not change the story, *i.e.* 2-hit and 3-hit displayed similar deficits. This was the case for probe test performances in the MWM, cortical thickness, and fractional anisotropy in *corpus callosum*. Consequently, these three parameters could be impaired because of maternal separation and/or THC exposure. Interestingly, social index negatively correlated with radial diffusivity index in 2-hit group, but not in control or in 3-hit groups. Thus, in 2-hit group, animals having the lowest sociability index (the most behaviorally impaired) are those having the highest RD value in the *corpus callosum* (*i.e.* the lowest myelination index). This result suggests that altered callosal fibers are associated with social behavior impairments. A parallel can be done with clinical symptoms; indeed, an increase in radial diffusivity in the *corpus callosum* has been recently related to socio-functional indices in schizophrenic patients (Koshiyama et al., 2018). Surprisingly, no significant correlation was observed in 3-hit animals. But, one should note that - contrary to 2-hit animals - integrity of *corpus callosum* was significantly altered in 3-hit group. Such structural atrophy would have prevented any chances to highlight correlation with behavioral parameters (Deloulme et al., 2015). Even if the respective effects of these two different hits could not be inferred from our study, it is possible that maternal separation and chronic THC, and interactions between the two, have impaired cognitive performances as previously reported with other factors combined with THC (Cha et al., 2006; Daskalakis et al., 2013; Rodríguez et al., 2017). Indeed, Zamberletti et al. (2012) showed that maternally deprived rats became more sensitive to a further THC exposure during adolescence. Interactions between genetics and effects of THC have ever been reported, for instance by the observation of strain differences for the effects of THC (Deiana et al., 2007; Keeley et al., 2015b), some strains being more sensitive than others. This has been also observed in animals with deletion of other genes particularly relevant for schizophrenia, *i.e.* Neuregulin 1 (Andrieux et al., 2002; Boucher et al., 2007), COMT (Behan et al., 2012; O'Tuathaigh et al., 2010; O'Tuathaigh et al., 2012), DISC-1 (Ballinger et al., 2015). These experiments argue for the potential genetic vulnerability for the effects of cannabis. Even if there are several studies on the effects of two hits, investigations on the effects of three different hits are very scarce. To our knowledge, only three publications (two in rats, one in mice) reported combination of three different hits. Chen et al. (2011) combined repeated maternal separation to avoidance conditioning procedure and PCP administrations in rats, and observed complex interactions, such as alteration PPI by some hits, but prevention by other hits. Kekesi et al. (2015) combined in rats selected breeding based on pain sensitivity to subchronic ketamine and isolation after weaning, which lead to deleterious effects on cognition, particularly in

Fig. 3. Effects of 2-hit and 3-hit combination on parvalbumin-positive cells (PV+) density and imaging parameters. A and B. Density of parvalbumin-positive cells in the prefrontal cortex and hippocampus, respectively. C and D. Parietal cortical thickness and volume of the hippocampus from *in vivo* anatomical images (T2). E and F. Values of fractional anisotropy (FA) and radial diffusivity (RD) in *corpus callosum* from post-mortem diffusion-weighted images. Data are scatter dot plot and median. Same conventions as in Fig. 2.

males. Finally, Sultana and Lee (2020), combined in mice a genetic mutation (affecting DISC1), to repeated maternal separation and ketamine injections, and reported that the genetic component is predominant to induce schizophrenia-like behavioral phenotypes. These studies are not directly comparable to ours because the hits are quite different, but they highlight the complexity of interactions between factors, some of them being suspected to render more vulnerable to other subsequent hits, while some of them being suspected to promote resilience by preparing to future challenges, as described by Daskalakis et al. (2013).

To conclude, we report here an innovative 3-hit animal model of schizophrenia that could be helpful for schizophrenia research. Given this is a first investigation, further studies are needed to reinforce its knowledge. This model mimics negative-like symptoms (decreased activity in open field, increased stress and anxiety, social withdrawal) and cognitive dysfunctioning (working memory, long term reference memory), in association with a decrease in cortical thickness and impaired integrity of *corpus callosum* fibers. This 3-hit model presents a high construct validity, in relation with epidemiological data. Thereafter, other issues inherent to animal model obtained by combination construct could now be raised, notably the question of respective contribution of each factor to the ending phenotype. However, this innovative 3-hit mouse model based on vulnerability-stress hypothesis (van Os and Kapur, 2009) constitutes to date a powerful tool to mimic a schizophrenia phenotype characterized by predominance of negative and cognitive symptoms. The 2-hit model, which associates environmental stresses, gives a less severe phenotype, and could be useful for research on schizophrenia but also other forms of psychiatric diseases (Pugliese et al., 2019). The new 3-hit model presents satisfying construct and phenomenological validities, and further studies are needed to confirm these results and to bring a predictive validity to the model by assessing the effects of typical and atypical antipsychotics.

Funding

This work was supported by the Union nationale de familles et amis de personnes malades et/ou handicapées psychiques (UNAFAM) and Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (FRC) (grant 2016).

Declaration of competing interest

The authors have declared that there are no conflicts of interest in relation to the subject of this study.

Acknowledgements

Authors wish to thank Virgile Delaunay and Thomas Corbett for help in behavioral experiments.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.schres.2020.11.043>.

References

Andrieux, A., Salin, P.A., Vernet, M., Kujala, P., Baratier, J., Gory-Fauré, S., Bosc, C., Pointu, H., Proietto, D., Schweitzer, A., Denarier, E., Klumperman, J., Job, D., 2002. The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. *Genes Dev.* 16, 2350–2364. <https://doi.org/10.1101/gad.223302>.

Arseneault, L., Cannon, M., Poulton, R., Murray, R., Caspi, A., Moffitt, T.E., 2002. Cannabis use in adolescence and risk for adult psychosis: longitudinal prospective study. *BMJ* 325, 1212–1213.

Ayhan, Y., McFarland, R., Pletnikov, M.V., 2016. Animal models of gene-environment interaction in schizophrenia: a dimensional perspective. *Prog. Neurobiol.* <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.10.002>.

Ballinger, M.D., Saito, A., Abazy, B., Taniguchi, Y., Huang, C.H., Ito, K., Zhu, X., Segal, H., Jaaro-Peled, H., Sawada, A., Mackie, K., Pletnikov, M.V., Kamiya, A., 2015. Adolescent cannabis exposure interacts with mutant DISC1 to produce impaired adult emotional memory. *Neurobiol. Dis.* <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.06.006>.

Bazin, M.-A., Kihel, L., El, Boulouard, M., Bouët, V., Rault, S., 2009. The effects of DHEA, 3 β -hydroxy-5 α -androstane-6,17-dione, and 7-amino-DHEA analogues on short term and long term memory in the mouse. *Steroids* 74, 931–937. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2009.06.010>.

Beaulieu, C., 2002. The basis of anisotropic water diffusion in the nervous system - a technical review. *NMR Biomed.* 15, 435–455. <https://doi.org/10.1002/nbm.782>.

Behan, A.T., Hryniewiecka, M., O'Tuathaigh, C.M.P., Kinsella, A., Cannon, M., Karayiorgou, M., Gogos, J.A., Waddington, J.L., Cotter, D.R., 2012. Chronic adolescent exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol in COMT mutant mice: impact on indices of dopaminergic, endocannabinoid and GABAergic pathways. *Neuropsychopharmacology* <https://doi.org/10.1038/npp.2012.24>.

Boucher, A.A., Arnold, J.C., Duffy, L., Schofield, P.R., Micheau, J., Karl, T., 2007. Heterozygous neuregulin 1 mice are more sensitive to the behavioural effects of Δ 9 -tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacology* <https://doi.org/10.1007/s00213-007-0721-3>.

Bouët, V., Freret, T., Toutain, J., Divoux, D., Boulouard, M., Schumann-Bard, P., 2007. Sensorimotor and cognitive deficits after transient middle cerebral artery occlusion in the mouse. *Exp. Neurol.* 203, 555–567. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.09.006>.

Bouët, V., Lecrux, B., Tran, G., Freret, T., 2011. Effect of pre- versus post-weaning environmental disturbances on social behaviour in mice. *Neurosci. Lett.* 488, 221–224. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.11.033>.

Bourin, M., 2015. Animal models for screening anxiolytic-like drugs: a perspective. *Dialogues Clin. Neurosci.* 17 (3), 295–303. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2015.17.3/mbourin> PMID: 26487810; PMCID: PMC4610614.

Bouvrain-Veret, C., Weiss, S., Hanoun, N., Andrieux, A., Schweitzer, A., Job, D., Hamon, M., Giros, B., Martres, M.P., 2008. Microtubule-associated STOP protein deletion triggers restricted changes in dopaminergic neurotransmission. *J. Neurochem.* 104, 745–756. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05025.x>.

Brenner, E., Sonnewald, U., Schweitzer, A., Andrieux, A., Nehlig, A., 2007. Hypoglutamatergic activity in the STOP knockout mouse: a potential model for chronic untreated schizophrenia. *J. Neurosci. Res.* 85, 3487–3493. <https://doi.org/10.1002/jnr.21200>.

Burrows, E.L., Hannan, A.J., 2016. Cognitive endophenotypes, gene-environment interactions and experience-dependent plasticity in animal models of schizophrenia. *Biol. Psychol.* 116, 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2015.11.015>.

Cha, Y.M., White, A.M., Kuhn, C.M., Wilson, W.A., Swartzwelder, H.S., 2006. Differential effects of delta-9-THC on learning in adolescent and adult rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 83, 448–455. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.03.006>.

Chen, J., Wang, Z., Li, M., 2011. Multiple "hits" during postnatal and early adulthood periods disrupt the normal development of sensorimotor gating ability in rats. *J. Psychopharmacol.* <https://doi.org/10.1177/0269881109354929>.

Choi, K.H., Zepp, M.E., Higgs, B.W., Weickert, C.S., Webster, M.J., 2009. Expression profiles of schizophrenia susceptibility genes during human prefrontal cortical development. *J. Psychiatry Neurosci.* 34, 450–458.

Daskalakis, Nikolaos P., Bagot, R.C., Parker, K.J., Vinkers, C.H., de Kloet, E.R., 2013. The three-hit concept of vulnerability and resilience: toward understanding adaptation to early-life adversity outcome. *Psychoneuroendocrinology* <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.06.008>.

Davidson, L., McGlashan, T.H., 1997. The varied outcomes of schizophrenia. *Can. J. Psychiatr.* 42, 34–43. <https://doi.org/10.1177/070674379704200105>.

Deacon, R.M.J., 2006. Assessing nest building in mice. *Nat. Protoc.* <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.170>.

Deiana, S., Fattore, L., Sabrina Spano, M., Cossu, G., Porcu, E., Fadda, P., Fratta, W., 2007. Strain and schedule-dependent differences in the acquisition, maintenance and extinction of intravenous cannabinoid self-administration in rats. *Neuropharmacology* <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.09.007>.

Deloume, J.-C., Gory-Fauré, S., Mauconduit, F., Chauvet, S., Jonckheere, J., Boulan, B., Mire, E., Xue, J., Jany, M., Maucler, C., Deparis, A.A., Montigon, O., Daoust, A., Barbier, E.L., Bosc, C., Deglon, N., Brocard, J., Denarier, E., Le Brun, I., Pernet-Gallay, K., Vilgrain, I., Robinson, P.J., Lahrech, H., Mann, F., Andrieux, A., 2015. Microtubule-associated protein 6 mediates neuronal connectivity through Semaphorin 3E-dependent signalling for axonal growth. *Nat. Commun.* 6, 7246. <https://doi.org/10.1038/ncomms8246>.

Di Forti, M., Quattrone, D., Freeman, T.P., Tripoli, G., Gayer-Anderson, C., Quigley, H., Rodriguez, V., Jongsma, H.E., Ferraro, L., La Cascia, C., La Barbera, D., Tarricone, I., Berardi, D., Szöke, A., Arango, C., Tortelli, A., Velthorst, E., Bernardo, M.M., Del-Ben, C.M., Menezes, P.R., Selten, J.-P., Jones, P.B., Kirkbride, J.B., Rutten, B.P., de Haan, L., Sham, P.C., van Os, J., Lewis, C.M., Lynskey, M., Morgan, C., Murray, R.M., Amoretti, S., Arrojo, M., Baudin, G., Beards, S., Bernardo, M.M., Bobes, J., Bonetto, C., Cabrera, B., Carracedo, A., Charpeaud, T., Costas, J., Cristofalo, D., Cuadrado, P., Diaz-Caneja, C.M., Ferchiou, A., Franke, N., Frijda, F., Garcia Bernardo, E., Garcia-Portilla, P., González, E., Hubbard, K., Jamain, S., Jiménez-López, E., Leboyer, M., López Montoya, G., Lorente-Rovira, E., Marcelino Loureiro, C., Marrazzo, G., Martínez, C., Matteis, M., Messchaert, E., Moltó, M.D., Nacher, J., Olmeda, M.S., Parellada, M., González Peñas, J., Pignon, B., Rapado, M., Richard, J.-R., Rodríguez Solano, J.J., Roldán Díaz, L., Ruggeri, M., Sáiz, P.A., Sánchez, E., Sanjuán, J., Sartorio, C., Schürhoff, F., Seminerio, F., Shuhama, R., Sidel, L., Stilo, S.A., Termorshuizen, F., Tosato, S., Tronche, A.-M., van Dam, D., van der Ven, E., EU-GEI WP2 Group, S. Arrojo, M., Baudin, G., Beards, S., Bernardo, M.M., Bobes, J., Bonetto, C., Cabrera, B., Carracedo, A., Charpeaud, T., Costas, J., Cristofalo, D., Cuadrado, P., Diaz-Caneja, C.M., Ferchiou, A., Franke, N., Frijda, F., Garcia Bernardo, E., Garcia-Portilla, P., González, E., Hubbard, K., Jamain, S., Jiménez-López, E., Leboyer, M., López Montoya, G., Lorente-Rovira, E., Marcelino Loureiro, C., Marrazzo, G., Martínez, C., Matteis, M., Messchaert, E., Moltó, M.D., Nacher, J., Olmeda, M.S., Parellada, M., González Peñas, J., Pignon, B., Rapado, M., Richard, J.-R., Rodríguez Solano, J.J., Roldán Díaz, L., Ruggeri, M., Sáiz, P.A., Sánchez, E., Sanjuán, J., Sartorio, C., Schürhoff, F., Seminerio, F., Shuhama, R., Sidel, L., Stilo, S.A., Termorshuizen, F., Tosato, S., Tronche, A.-M., van Dam, D., van der Ven, E., 2019. The contribution of

- cannabis use to variation in the incidence of psychotic disorder across Europe (EU-GEI): a multicentre case-control study. *Lancet Psychiatry* 6, 427–436. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(19\)30048-3](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(19)30048-3).
- Du, Y., Grace, A.A., 2016. Loss of parvalbumin in the hippocampus of MAM schizophrenia model rats is attenuated by peripubertal diazepam. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 19, pyw065. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyw065>.
- Duque, A., Coman, D., Carlyle, B.C., Bordner, K.A., George, E.D., Papademetris, X., Hyder, F., Simen, A.A., 2012. Neuroanatomical changes in a mouse model of early life neglect. *Brain Struct. Funct.* 217, 459–472. <https://doi.org/10.1007/s00429-011-0350-9>.
- Ellenbroek, B.A., 2003. Animal models in the genomic era: possibilities and limitations with special emphasis on schizophrenia. *Behavioural Pharmacology* <https://doi.org/10.1097/01.fbp.0000087736.21047.3c>.
- Ellenbroek, B.A., van den Kroonenberg, P.T., Cools, A.R., 1998. The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. *Schizophr. Res.* 30, 251–260.
- Gimenez, U., Boulan, B., Mauconduit, F., Turel, F., Leclercq, M., Denarier, E., Brocard, J., Gory-Fauré, S., Andrieux, A., Lahrech, H., Deloume, J.C., 2017. 3D imaging of the brain morphology and connectivity defects in a model of psychiatric disorders: MAP6-KO mice. *Sci. Rep.* 7, 10308. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10544-2>.
- Giovanni, S., Weber, L., Meyer, U., 2014. Single and combined effects of prenatal immune activation and peripubertal stress on parvalbumin and reelin expression in the hippocampal formation. *Brain Behav. Immun.* 40, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.04.005>.
- Gonzalez-Burgos, G., Fish, K.N., Lewis, D.A., 2011. GABA neuron alterations, cortical circuit dysfunction and cognitive deficits in schizophrenia. *Neural Plast.* <https://doi.org/10.1155/2011/723184>.
- Hida, H., Mouri, A., Noda, Y., 2013. Behavioral phenotypes in schizophrenic animal models with multiple combinations of genetic and environmental factors. *J. Pharmacol. Sci.* 121, 185–191.
- Jones, C.A., Watson, D.J.C., Fone, K.C.F., 2011. Animal models of schizophrenia. *Br. J. Pharmacol.* 164, 1162–1194. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01386.x>.
- Keeley, R.J., Bye, C., Trow, J., McDonald, R.J., 2015a. Strain and sex differences in brain and behaviour of adult rats: learning and memory, anxiety and volumetric estimates. *Behav. Brain Res.* <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.10.039>.
- Keeley, R.J., Trow, J., Bye, C., McDonald, R.J., 2015b. Part II: strain- and sex-specific effects of adolescent exposure to THC on adult brain and behaviour: variants of learning, anxiety and volumetric estimates. *Behav. Brain Res.* <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.01.001>.
- Kekesi, G., Petrowszki, Z., Benedek, G., Horvath, G., 2015. Sex-specific alterations in behavioral and cognitive functions in a “three hit” animal model of schizophrenia. *Behav. Brain Res.* <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.02.015>.
- Koshiyama, D., Fukunaga, M., Okada, N., Morita, K., Nemoto, K., Yamashita, F., Yamamori, H., Yasuda, Y., Fujimoto, M., Kelly, S., Jahanshad, N., Kudo, N., Azechi, H., Watanabe, Y., Donohoe, G., Thompson, P.M., Kasai, K., Hashimoto, R., 2018. Role of frontal white matter and corpus callosum on social function in schizophrenia. *Schizophr. Res.* <https://doi.org/10.1016/j.schres.2018.07.009>.
- Leger, M., Neill, J.C., 2016. A systematic review comparing sex differences in cognitive function in schizophrenia and in rodent models for schizophrenia, implications for improved therapeutic strategies. *Neurosci. Biobehav. Rev.* <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.06.029>.
- Lelong-Boulouard, V., Quentin, T., Moreaux, F., Debruyne, D., Boulouard, M., Coquerel, A., 2006. Interactions of buprenorphine and dipotassium clorazepate on anxiety and memory functions in the mouse. *Drug Alcohol Depend.* 85, 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2006.03.017>.
- Leroux, E., Delcroix, N., Alary, M., Razafimandimby, A., Brazo, P., Delamillieure, P., Dolfus, S., 2013. Functional and white matter abnormalities in the language network in patients with schizophrenia: a combined study with diffusion tensor imaging and functional magnetic resonance imaging. *Schizophr. Res.* 150, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2013.07.016>.
- Lister, R.G., 1990. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol. Ther.* 46 (3), 321–340. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(90\)90021-s](https://doi.org/10.1016/0163-7258(90)90021-s) PMID: 2188266.
- Leung, A., Chue, P., 2000. Sex differences in schizophrenia, a review of the literature. *Acta Psychiatr. Scand. Suppl.* <https://doi.org/10.1111/j.0065-1591.2000.0ap25.x>.
- Lewis, C.M., Levinson, D.F., Wise, L.H., Delisi, L.E., Straub, R.E., Hovatta, I., Williams, N.M., Schwab, S.G., Pulver, A.E., Faraone, S.V., Brzustowicz, L.M., Kaufmann, C.A., Garver, D.L., Gurling, H.M.D., Lindholm, E., Coon, H., Moises, H.W., Byerley, W., Shaw, S.H., Mesen, A., Sherrington, R., O'Neill, F.A., Walsh, D., Kendler, K.S., Ekelund, J., Pausio, T., Lonnqvist, J., Peltonen, L., O'Donovan, M.C., Owen, M.J., Wildenauer, D.B., Maier, W., Nestadt, G., Blouin, J.L., Antonarakis, S.E., Mowry, B.J., Silverman, J.M., Crowe, R.R., Cloninger, C.R., Tsuang, M.T., Malaspina, D., Harkavy-Friedman, J.M., Svrakic, D.M., Bassett, A.S., Holcomb, J., Kalsi, G., McQuillin, A., Brynjolfsson, J., Sigmundsson, T., Petursson, H., Jazin, E., Zoega, T., Helgason, T., 2003. Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet.* <https://doi.org/10.1086/376549>.
- Lezak, K.R., Missig, G., Carlezon Jr, W.A., 2017. Behavioral methods to study anxiety in rodents. *Dialogues Clin. Neurosci.* 19 (2), 181–191. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2017.19.2/wcarlezon> PMID: 28867942; PMCID: PMC573562.
- Marchisella, F., Coffey, E.T., Hollos, P., 2016. Microtubule and microtubule associated protein anomalies in psychiatric disease. *Cytoskeleton* <https://doi.org/10.1002/cm.21300>.
- Marco, E.M., Llorente, R., López-Gallardo, M., Mela, V., Llorente-Berzal, Á., Prada, C., Viveros, M.-P., 2015. The maternal deprivation animal model revisited. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 51, 151–163. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.01.015>.
- Merenlender-Wagner, A., Pikman, R., Giladi, E., Andrieux, A., Gozes, I., 2010. NAP (davunetide) enhances cognitive behavior in the STOP heterozygous mouse—a microtubule-deficient model of schizophrenia. *Peptides* 31, 1368–1373. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.04.011>.
- Merenlender-Wagner, A., Shemer, Z., Touloumi, O., Lagoudaki, R., Giladi, E., Andrieux, A., Grigoriadis, N.C., Gozes, I., 2014. New horizons in schizophrenia treatment: autophagy protection is coupled with behavioral improvements in a mouse model of schizophrenia. *Autophagy* 10, 2324–2332. <https://doi.org/10.4161/15548627.2014.984274>.
- Millan, M.J., Andrieux, A., Bartzokis, G., Cadenhead, K., Dazzan, P., Fusar-Poli, P., Gallinat, J., Giedd, J., Grayson, D.R., Heinrichs, M., Kahn, R., Krebs, M.-O., Leboyer, M., Lewis, D., Marin, O., Marin, P., Meyer-Lindenberg, A., McGorry, P., McGuire, P., Owen, M.J., Patterson, P., Sawa, A., Spedding, M., Uhlhaas, P., Vaccarino, F., Wahlstedt, C., Weinberger, D., 2016. Altering the course of schizophrenia: progress and perspectives. *Nat. Rev. Drug Discov.* 15, 485–515. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.28>.
- Moore, H., 2010. The role of rodent models in the discovery of new treatments for schizophrenia: updating our strategy. *Schizophr. Bull.* 36, 1066–1072. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbq106>.
- Murphy, B.P., Chung, Y.-C., Park, T.-W., McGorry, P.D., 2006. Pharmacological treatment of primary negative symptoms in schizophrenia: a systematic review. *Schizophr. Res.* 88, 5–25. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2006.07.002>.
- Nakazawa, K., Zsiros, V., Jiang, Z., Nakao, K., Kolata, S., Zhang, S., Belforte, J.E., 2012. GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology. *Neuropharmacology* <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.022>.
- O'Shea, M., Singh, M.E., McGregor, I.S., Mallet, P.E., 2004. Chronic cannabinoid exposure produces lasting memory impairment and increased anxiety in adolescent but not adult rats. *J. Psychopharmacol.* <https://doi.org/10.1177/0269881104047277>.
- O'Tuathaigh, C.M., Hryniewiecka, M., Behan, A., Tighe, O., Coughlan, C., Desbonnet, L., Cannon, M., Karayiorgou, M., Gogos, J.A., Cotter, D.R., Waddington, J.L., 2010. Chronic adolescent exposure to Δ -9-tetrahydrocannabinol in COMT mutant mice: impact on psychosis-related and other phenotypes. *Neuropsychopharmacology* 35, 2262–2273. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.100>.
- O'Tuathaigh, C.M.P., Clarke, G., Walsh, J., Desbonnet, L., Petit, E., O'Leary, C., Tighe, O., Clarke, N., Karayiorgou, M., Gogos, J.A., Dinan, T.G., Cryan, J.F., Waddington, J.L., 2012. Genetic vs. pharmacological inactivation of COMT influences cannabinoid-induced expression of schizophrenia-related phenotypes. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* <https://doi.org/10.1017/S1461145711001581>.
- Paxinos, G., Franklin, K., 2012. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*.
- Peris, L., Bisbal, M., Martínez-Hernández, J., Saoudi, Y., Jonckheere, J., Rolland, M., Sebastian, M., Brocard, J., Denarier, E., Bosc, C., Guerin, C., Gory-Fauré, S., Deloume, J.C., Lanté, F., Arnal, I., Buisson, A., Goldberg, Y., Blanchoin, L., Delphin, C., Andrieux, A., 2018. A key function for microtubule-associated-protein 6 in activity-dependent stabilisation of actin filaments in dendritic spines. *Nat. Commun.* 9, 3775. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05869-z>.
- Powell, K.J., Hori, S.E., Leslie, R., Andrieux, A., Schellinck, H., Thorne, M., Robertson, G.S., 2007. Cognitive impairments in the STOP null mouse model of schizophrenia. *Behav. Neurosci.* 121, 826–835. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.121.5.826>.
- Pozzi, L., Pollak Dorocic, I., Dorocic, I.P., Wang, X., Carlen, M., Meletis, K., 2014. Mice lacking NMDA receptors in parvalbumin neurons display normal depression-related behavior and response to antidepressant action of NMDAR antagonists. *PLoS One* 9, e83879. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083879>.
- Pugliese, V., Bruni, A., Carbone, E.A., Calabrò, G., Cermanara, G., Sampogna, G., Luciano, M., Steardo, L., Fiorillo, A., Garcia, C.S., De Fazio, P., 2019. Maternal stress, prenatal medical illnesses and obstetric complications: risk factors for schizophrenia spectrum disorder, bipolar disorder and major depressive disorder. *Psychiatry Res.* <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2018.11.023>.
- Quinn, H.R., Matsumoto, I., Callaghan, P.D., Long, L.E., Arnold, J.C., Gunasekaran, N., Thompson, M.R., Dawson, B., Mallet, P.E., Kasher, M.A., Matsuda-Matsumoto, H., Iwazaki, T., McGregor, I.S., 2008. Adolescent rats find repeated Delta(9)-THC less aversive than adult rats but display greater residual cognitive deficits and changes in hippocampal protein expression following exposure. *Neuropsychopharmacology* 33, 1113–1126. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301475>.
- Renard, J., Krebs, M.O., Le Pen, G., Jay, T.M., 2014. Long-term consequences of adolescent cannabinoid exposure in adult psychopathology. *Front. Neurosci.* 8, 361. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00361>.
- Renard, J., Rushlow, W.J., Laviolette, S.R., 2016. What can rats tell us about adolescent cannabis exposure? *Insights Can. J. Psychiatry*. <https://doi.org/10.1177/0706743716645288>.
- Rentesi, G., Antoniou, K., Marselos, M., Syrrou, M., Papadopoulou-Daifotis, Z., Konstandi, M., 2013. Early maternal deprivation-induced modifications in the neurobiological, neurochemical and behavioral profile of adult rats. *Behav. Brain Res.* <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.01.040>.
- Robertson, G.S., Hori, S.E., Powell, K.J., 2006. Schizophrenia: an integrative approach to modelling a complex disorder. *J. Psychiatry Neurosci.* 31, 157–167.
- Rodriguez, G., Neugebauer, N.M., Yao, K.L., Meltzer, H.Y., Csernansky, J.G., Dong, H., 2017. Δ -9-tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC) administration after neonatal exposure to phenylcyclidine potentiates schizophrenia-related behavioral phenotypes in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2017.06.010>.
- Rots, N.Y., de Jong, J., Workel, J.O., Levine, S., Cools, A.R., De Kloet, E.R., 1996. Neonatal maternally deprived rats have as adults elevated basal pituitary-adrenal activity and enhanced susceptibility to apomorphine. *J. Neuroendocrin.* 8, 501–506.
- Rubino, T., Parolaro, D., 2014. Cannabis abuse in adolescence and the risk of psychosis: a brief review of the preclinical evidence. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 52, 41–44. <https://doi.org/10.1016/j.pnpb.2013.07.020>.
- Rubino, T., Realini, N., Braidà, D., Guidi, S., Capurro, V., Viganò, D., Guidali, C., Pinter, M., Sala, M., Bartesaghi, R., Parolaro, D., Viganò, D., Guidali, C., Pinter, M., Sala, M., Bartesaghi, R., Parolaro, D., 2009. Changes in hippocampal morphology and neuroplasticity induced by adolescent THC treatment are associated with cognitive

- impairment in adulthood. *Hippocampus* 19, 763–772. <https://doi.org/10.1002/hipo.20554>.
- Schloss, P., Lau, T., 2012. STOP-in the name of mood: microtubule-associated proteins in mood and cognition. *J. Neurochem.* <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07614.x>.
- Schmidt, M.J., Mirmics, K., 2015. Neurodevelopment, GABA system dysfunction, and schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* <https://doi.org/10.1038/npp.2014.95>.
- Schneider, M., Koch, M., 2003. Chronic pubertal, but not adult chronic cannabinoid treatment impairs sensorimotor gating, recognition memory, and the performance in a progressive ratio task in adult rats. *Neuropsychopharmacology* 28, 1760–1769. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300225>.
- Shimizu, H., Iwayama, Y., Yamada, K., Toyota, T., Minabe, Y., Nakamura, K., Nakajima, M., Hattori, E., Mori, N., Osumi, N., Yoshikawa, T., 2006. Genetic and expression analyses of the STOP (MAP6) gene in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 84, 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2006.03.017>.
- Since, M., Freret, T., Nee, G., Terme, T., Vanelle, P., Boulouard, M., 2013. New orally effective 3-(2-nitro)phenylpropanamide analgesic derivatives: synthesis and antinociceptive evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* 69, 728–734. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.08.041>.
- Sullivan, P.F., Daly, M.J., O'Donovan, M., 2012. Genetic architectures of psychiatric disorders: the emerging picture and its implications. *Nat. Rev. Genet.* 13, 537–551. <https://doi.org/10.1038/nrg3240>.
- Sultana, R., Lee, C.C., 2020. Expression of behavioral phenotypes in genetic and environmental mouse models of schizophrenia. *Front. Behav. Neurosci.* <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.00029>.
- van Os, J., Kapur, S., 2009. Schizophrenia. *Lancet* 374, 635–645. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60995-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60995-8).
- van Os, J., Kenis, G., Rutten, B.P.F., 2010. The environment and schizophrenia. *Nature* 468, 203–212. <https://doi.org/10.1038/nature09563>.
- Volk, D.W., Lewis, D.A., 2014. Early developmental disturbances of cortical inhibitory neurons: contribution to cognitive deficits in schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 40, 952–957. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbu111>.
- Volle, J., Brocard, J., Saoud, M., Gory-Faure, S., Brunelin, J., Andrieux, A., Suaud-Chagny, M.-F., 2013. Reduced expression of STOP/MAP6 in mice leads to cognitive deficits. *Schizophr. Bull.* 39, 969–978. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbs113>.
- Wei, H., Sun, S., Li, Y., Yu, S., 2016. Reduced plasma levels of microtubule-associated STOP/MAP6 protein in autistic patients. *Psychiatry Res.* <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2016.08.024>.
- Winship, I.R., Dursun, S.M., Baker, G.B., Balista, P.A., Kandravicius, L., Maia-de-Oliveira, J.P., Hallak, J., Howland, J.G., 2019. An overview of animal models related to schizophrenia. *Can. J. Psychiatr.* <https://doi.org/10.1177/0706743718773728>.
- Wolf, R.C., Höse, A., Frasch, K., Walter, H., Vasic, N., 2008. Volumetric abnormalities associated with cognitive deficits in patients with schizophrenia. *Eur. Psychiatry* 23, 541–548. <https://doi.org/10.1016/j.eurpsy.2008.02.002>.
- Young, J.W., Amitai, N., Geyer, M.A., 2012. Behavioral Animal Models to Assess Pro-cognitive Treatments for Schizophrenia. , pp. 39–79 https://doi.org/10.1007/978-3-642-25758-2_3.
- Zamberletti, E., Prini, P., Speziali, S., Gabaglio, M., Solinas, M., Parolaro, D., Rubino, T., 2012. Gender-dependent behavioral and biochemical effects of adolescent delta-9-tetrahydrocannabinol in adult maternally deprived rats. *Neuroscience* <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.11.038>.
- Zimmerberg, B., Shartrand, A.M., 1992. Temperature-dependent effects of maternal separation on growth, activity, and amphetamine sensitivity in the rat. *Dev. Psychobiol.* 25, 213–226. <https://doi.org/10.1002/dev.420250306>.

3. Résultats

3.2.1.1 *Supplementary results 1*

Effect of partial genetic deletion MAP6^{+/-} on mice behavior.

		WT	MAP 6 +/-	<i>pvalue</i>
Actimetry	Crossed beams nb/1h	235.8±102.2	315.0±127.5	0.142
	Rearing nb	16±19.7	23±17.8	0.456
White and dark box	Boxes entries	17.6±5.5	18.7±7.8	0.720
	% Time in white box	22.6±10.4	23.6±9.2	0.820
Elevated plus maze	Arm entries	16.9±6.6	16.1±7.4	0.801
	% Time in open arms	5.6±3.9	5.7±3.5	0.924
Y-maze	Arm entries	17.9±5.7	17.1±3.4	0.705
	Rearing nb	14.5±5.9	17.0±8.3	0.446
	% Alternation	65±9.1 [#]	58.4±13.2 [#]	0.209
Forced swimming test	Immobility (s)	82.0±52.1	99.0±28.2	0.363
Approach-avoidance	Sociability index	63.4±92.4 [#]	47.9±71.8 [#]	0.680

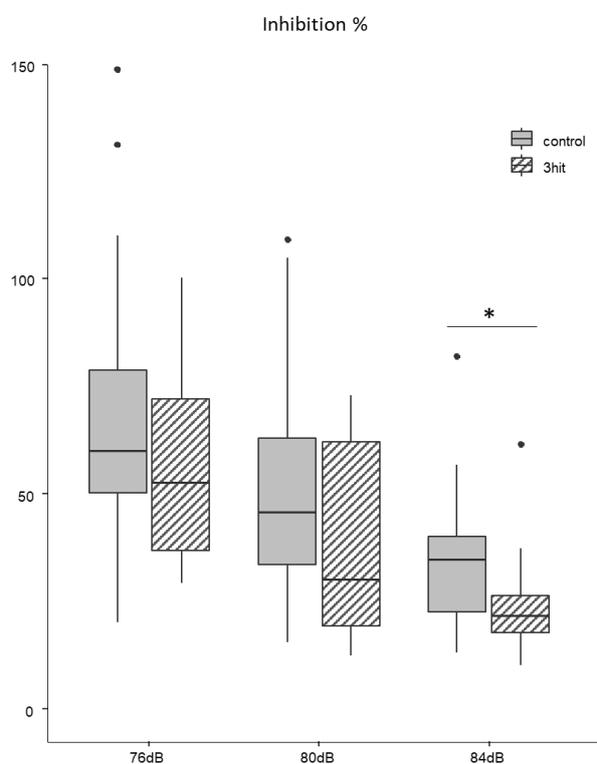
Behavioral data collected from WT and MAP 6^{+/-} mice (n=10 in each group). There was no significant difference between the groups whatever the behavior considered (spontaneous activity, anxiety-related behavior, depressive-like behavior or sociability). # indicates significantly above the theoretical value (50 for alternation %, 0 for sociability index (univariate t-test)). nb = number.

Those data indicate that the partial deletion of MAP 6 gene had no significant effect on behaviors that were assessed with 2-hit and 3-hit in the main part of the article.

3. Résultats

3.2.1.2 Supplementary results 2

There was a global decrease of prepulse inhibition according to the increase in prepulse intensity (ANOVA with permutations $p < 0.0001$, see Figure below) and a difference between each prepulse intensities (post hoc analysis with permutation test, $p < 0.01$) (see figure). Concerning intergroup comparison, ANOVA with permutations highlighted a global decrease in PPI in the 3-hit group ($p < 0.005$). With the highest intensity, i.e. 84dB, the 3-hit mice showed a decrease in prepulse inhibition compared to controls (Wilcoxon test, 76dB $p = 0.22$; 80dB $p = 0.12$; 86dB $p = 0.01$).



Percentage of inhibition according to prepulse intensity in control and 3-hit mice. Significant global group effect (ANOVA with permutations, $p < 0.005$) and intensity effect (ANOVA with permutations $p < 0.0001$); and a difference between control and 3-hit mice with 84dB (*: Wilcoxon test, $p < 0.05$). Data are represented by boxplots with horizontal black lines as median, first and third quartiles. The outer lines represent the range of scores or 1.5 box-lengths from the median.

3.2.1.3 Résumé de l'article 1

L'objectif de cette étude était de caractériser le phénotype du modèle 3-hit *via* plusieurs approches. Un large panel de tests comportementaux a été réalisé, permettant d'évaluer les symptômes de type positif, de type négatif et les déficits cognitifs. Une étude en imagerie anatomique avait pour but de mesurer des modifications de volume de structures impliquées dans la schizophrénie (hippocampe, cortex préfrontal), l'imagerie à tenseur de diffusion nous a permis d'évaluer la qualité de la substance blanche dans certaines zones cibles (hippocampe, corps calleux). Une étude en immunohistochimie permettant de mesurer la densité de neurones GABAergiques à parvalbumine dans l'hippocampe et le corps calleux a également été réalisée. Cette étude a montré un phénotype de type schizophrénique chez les animaux 3-hit, avec des symptômes de type négatif (déficit de sociabilité), des déficits cognitifs (déficit de mémoire de travail et de référence), augmentation de l'anxiété. De plus, des modifications structurales et fonctionnelles ont été montrées dans des structures cérébrales clefs dans la physiopathologie de cette maladie (altérations des fibres du corps calleux, diminution du volume hippocampique, diminution de l'épaisseur corticale).

Le modèle 3-hit présente donc, en plus d'une forte validité de construction, une validité d'apparence intéressante pour l'étude de la schizophrénie.

L'étude relatée dans l'article 2 avait pour objectif d'approfondir nos connaissances sur la validité d'apparence de ce modèle en utilisant une approche fonctionnelle : l'électrophysiologie *ex vivo*.

3. Résultats

3.2.2 Article 2 : Functional dysregulations in CA1 hippocampal networks of a 3-hit mouse model of schizophrenia

Solenn Percelay^a, Jean-Marie Billard^a, Thomas Freret^a, Annie Andrieux^b, Michel Boulouard^a, Valentine Bouet^a

^a Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, COMETE, CYCERON, CHU Caen, 14000, Caen, France

^b Univ Grenoble Alpes, Inserm U1216, CEA, Grenoble Institut Neurosciences, 38000, Grenoble, France

Soumis à *International Journal of Molecular Sciences*, special issue « *Modeling Neurological Disorders in Experimental Animals: New Insights and Emerging Roles* ».

Article

Functional dysregulations in CA1 hippocampal networks of a 3-hit mouse model of schizophrenia.

Solenn Percelay^{a,*}, Jean-Marie Billard^a, Thomas Freret^a, Annie Andrieux^b, Michel Boulouard^a and Valentine Bouet^a

^a Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, COMETE, CYCERON, CHU Caen, 14000, Caen, France

^b Univ Grenoble Alpes, Inserm U1216, CEA, Grenoble Institut Neurosciences, 38000, Grenoble, France

* Correspondence: solenn.percelay@unicaen.fr; Tel.: 0231566872 Université de Caen Normandie - UFR Santé - Campus 5 Boulevard Henri Becquerel – Bâtiment GMPc – Unité COMETE U1075 14032 Caen cedex 5

Abstract: For a better translation from treatment designs of schizophrenia to clinical efficiency, there is a crucial need to refine preclinical animal models. In order to consider the multifactorial nature of the disorder, a new mouse model associating three factors (genetic susceptibility - partial deletion of the MAP6 gene, early-life stress - maternal separation and pharmacological treatment – chronic Δ -9-tetrahydrocannabinol during adolescence) has recently been described. While this model depicts a schizophrenia-like phenotype, the neurobiological correlates remain unknown. Synaptic transmission and functional plasticity of the CA1 hippocampal region of male and female 3-hit mice were therefore investigated using electrophysiological recordings on hippocampus slice. While basal excitatory transmission remained unaffected, NMDA receptor (NMDAr)-mediated long-term potentiation (LTP) triggered by theta-burst (TBS) but not by high-frequency (HFS) stimulation was impaired in 3-hit mice. Isolated NMDAr activation was not affected or even increased in female 3-hit mice, revealing a sexual dimorphism. Considering that the regulation of LTP is more prone to inhibitory tone if triggered by TBS than by HFS, the weaker potentiation in 3-hit mice suggests a deficiency of intrinsic GABA regulatory mechanisms. Indeed, NMDAr activation was increased by GABA_A receptor blockade in wild-type but not in 3-hit mice. This electrophysiological study highlights dysregulations of functional properties and plasticity in hippocampal networks of 3-hit mice, one of the mechanisms suspected to contribute to the pathophysiology of schizophrenia. It also shows differences between males and females, supporting the sexual dimorphism observed in the disorder. Combined with the previously reported study, the present data reinforce the face validity of the 3-hit model that will help to consider new therapeutic strategies for psychosis.

Keywords: psychiatric disorder, hippocampus, functional plasticity, long term potentiation, NMDA receptor

1. Introduction

Schizophrenia is a debilitating pathology that affects approximately 1% of the population. It is characterized by symptoms described as positive and negative, accompanied by cognitive deficits [1]. While treatments with typical and atypical antipsychotics are relevant for positive symptoms, they are questioned for negative symptoms and poorly effective for cognitive impairments [2,3]. One major obstacle for the development of potent new treatments against schizophrenia is the absence of relevant and fully recognized animal models of the disorder. Indeed, even if a wide range of rodent models already exists, their construct validity may be questioned since they are mostly based on one sole risk factor [4–6]. Using a sole factor does not fit with the idea that schizophrenia would result from a combination of genetic vulnerability and neurodevelopmental insults affecting neurotransmission systems [7]. It has been therefore recommended to use animal models with the highest construct validity respecting this multifactorial origin [8–11]. In this context, a 3-hit mouse model has recently been described, which associates a genetic susceptibility with an early developmental stress and a late pharmacological insult [12]. More precisely, a partial deletion of the microtubule-associated protein MAP6 gene, a transient maternal separation (for 24h at the age of 9-days) and a chronic administration of Δ -9-tetrahydrocannabinol (THC, 8mg/kg daily during adolescence) have been associated [13–15], postulating that the three factors will combine and synergize to trigger the mimicking-disorder. A recent investigation indicated that this 3-hit model displays some key-elements of the negative- and

3. Résultats

cognitive-like deficits expected: sociability deficit and cognitive deficits such as working memory impairment and alteration of reference memory, and a decrease in hippocampus volume [12]. Knowing whether changes in functional properties of synapses occur in 3-hit mice represents a major milestone to progress our knowledge of the pathophysiology of schizophrenia. In addition, investigating males and females in order to take into account the sexual dimorphism reported in patients, which is rarely done in animal models, is of importance [16,17].

The present study reveals alterations of both glutamate and GABA-mediated regulation of functional plasticity at CA3/CA1 hippocampal synapses of 3-hit mice that are differentially expressed in males and females. Together with the recently provided characterization, our functional analysis argues to consider the 3-hit conditioning as a relevant strategy to investigate schizophrenia-related phenotype.

2. Materials and Methods

Experiments were performed in accordance with French and European Economic Community guidelines for the care and use of laboratory animals (2010/63/UE, project n° 2019050617054190_v2, date of approval 2019/09/18). All efforts were made to minimize the number of animals used as well as their suffering. In the present study, a total of 42 mice were used, 14 males and 10 females Wild Type (WT), and 6 males and 12 females 3-hit.

2.1. Genetic susceptibility

Heterozygous MAP6 (MAP6+/-) and WT mice were obtained from breeding between male MAP6+/- mice (129svPas/C57BL/6 strain, from Centre Universitaire de Ressources Biologiques de l'Université de Caen Normandie (CURB), France) and female WT mice (C57BL/6 strain, from Janvier Labs, France). Animals were kept in groups of 3 to 5 individuals in a reversed 12h/12h light/dark cycle (light on at 19p.m., off at 7a.m.), with regulated temperature (21±1°C) and humidity (55±10%). Food and water were given ad libitum. At weaning, mice were identified with a subcutaneous chip placed under anaesthesia (isoflurane (5%-2.5%) in an O₂/N₂O mixture (0.3/0.7)), and tail sampling was performed for genotyping [18].

2.2. Maternal separation (MS)

Half of the litters were separated from their mother for a single period of 24h at the 9th post-natal day (PND9). The mothers were removed and individually placed near the pups in another cage from 9:00a.m. to 9:00a.m. the following day. Then, the mothers were returned to their litters and left undisturbed until weaning. Control mice were submitted to the same protocol but separated for only 20s [14,19].

2.3. Δ -9-tetrahydrocannabinol treatment

Tetrahydrocannabinol (THC, Sigma Aldrich®) was dissolved in a vehicle saline solution (0.9%) with polysorbate 80 (Tween 80, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany, 3.5%) to obtain a final dose of 8mg/kg [20]. The 3-hit mice received daily intraperitoneal THC solution (at 5:00pm) from PND32 to PND52 while WT mice received the vehicle (3.5% Tween 80 in saline solution).

2.4. Ex vivo electrophysiology

Between PND140 to PND256, mice were anaesthetised with isoflurane and decapitated. The brain was rapidly removed from the skull and placed in chilled (-3 to 0°C) artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing 124mM NaCl, 3mM KCl, 1.5mM MgSO₄, 2.5mM CaCl₂, 26.2mM NaHCO₃, 1.2mM NaH₂PO₄, and 11mM glucose. Transverse slices (400µm thick) of both ventral and dorsal part of the hippocampus were obtained with a slicer (Mc Ilwain®) and placed in aCSF in a holding chamber, at 28°C, for at least one hour before recordings [21]. A slice was then transferred to a submersion-type recording chamber and continuously perfused at room temperature with aCSF equilibrated with 95% O₂, 5% CO₂. Extracellular recordings were obtained from glass micropipettes (2-5MΩ) filled with 2M NaCl positioned in the dendritic field of the CA1 hippocampal area. Presynaptic fibre volleys (PFVs) and non-N-methyl-D-aspartate (NMDA)-mediated field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were evoked in control aCSF by electrical stimulation of the Schaffer collaterals/commissural pathway located in the stratum radiatum. The slope of three successive PFVs and fEPSPs was determined using Win LTP software [22–24]. To evaluate the level of synaptic activation, an index of synaptic efficacy (Ise) corresponding to the fEPSP/PFV ratio was calculated and plotted against stimulus intensity (300,

3. Resultats

400 and 500 μ A). Paired-pulse facilitation (PPF) of synaptic transmission was then induced to investigate possible changes in presynaptic mechanisms of glutamate release using paired pulse with inter-stimulus interval of 30ms. PPF was determined as the ratio of the slope of the second response over that of the first fEPSP. In addition, specific NMDA receptor (NMDAr) activation was evaluated by recording fEPSPs pharmacologically isolated from slices perfused with aCSF containing low Mg^{2+} (0.1mM) and supplemented with the non-NMDAr antagonist 2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzoquinoline-7-sulfonamide (NBQX, 10 μ M). The effects of exogenous application of the NMDAr co-agonist D-serine (100 μ M) or the GABA_A receptor antagonist bicuculline (10 μ M) were assessed by comparing the fEPSP/PFV ratio before and 15min after the addition of the drug to the aCSF.

In order to investigate long-term potentiation (LTP) of synaptic transmission, a test stimulus was applied every 10s in control medium and adjusted to get a fEPSP with a baseline slope of 0.1V/s. The averaged slope of 3 fEPSPs was measured for 15min before the delivery of a high-frequency stimulation (HFS), consisting of 1 burst at 100Hz pulses delivered for 1s. In another set of experiments, a theta-burst stimulation (TBS) was delivered, consisting of 4 successive sequences at 0.1Hz of 5 bursts separated from each other by 200ms (5Hz). Each burst was constituted of 4 impulses at 100Hz [25]. In both HFS and TBS-related experiments, testing with single pulse was then resumed for 60min to determine the level of LTP.

All pharmacological agents were diluted directly in the perfusion medium from stock solutions prepared in distilled water. All drugs were purchased from Tocris Bioscience® (Bristol, UK).

3. Results

3.1. Basal synaptic transmission

The synaptic efficacy of basal non-NMDAr-mediated neurotransmission, assessed by Ise for 3 increasing stimulus intensities, was not statistically different in 3-hit mice compared to WT mice (Figure 1A).

3.2. Paired-pulse facilitation

Basal neurotransmission closely depends on presynaptic release of glutamate, which was assessed by the paired-pulse facilitation paradigm (see Figure 1B, insert). As illustrated in Figure 1B, PPF ratio was not statistically different between WT and 3-hit mice.

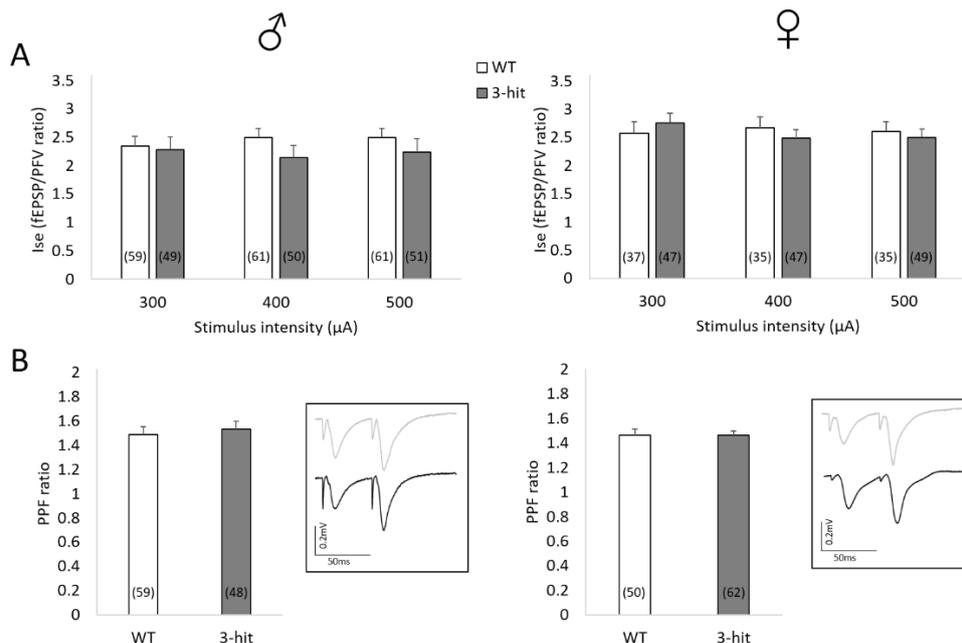


Figure 1. Basal synaptic transmission in CA1 hippocampal area is not impaired in 3-hit mice. A. Index of synaptic efficacy Ise (fEPSP/PFV ratio) in WT and 3-hit mice, males (left) and females (right), with increasing

3. Resultats

stimulus intensity. B. Paired pulse facilitation (PPF) ratio in WT and 3-hit mice, males (left) and females (right). In the insert, traces recorded are shown: WT (grey line) and 3-hit (black line) male (left) and a female (right) mouse. The number of slices used in each group is indicated in histogram bars. Represented data are Mean \pm SEM.

3.3. Functional plasticity

HFS-related conditioning stimulation induced LTP in WT and 3-hit mice of both genders (Figure 2A) since the differences between the baseline and the last 15min of recordings were significant in all experimental groups ($p < 0.001$). The magnitude of HFS-induced LTP was not different between WT and 3-hit male (WT: 129.4 \pm 8.0% of baseline vs 3-hit: 130.2 \pm 9.6%, mean \pm SEM; neither group effect, time effect or time \times group interaction) and female mice (WT: 123.9 \pm 6.7% of baseline vs 3-hit: 132.7 \pm 10.9%, mean \pm SEM; neither group effect, time effect or time \times group interaction) (Figure 2A).

TBS also induced a long-lasting potentiation of synaptic transmission of both WT and 3-hit groups (Figure 2B). Indeed, statistical analysis between the baseline and the last 15min of recordings showed a significant increase in fEPSP magnitude in all experimental groups ($p < 0.001$). However, in contrast to HFS, when intergroup comparison was considered, the magnitude of TBS-induced LTP was significantly lower in the 3-hit group than in the WT. This decrease was found in both males (WT: 138.8 \pm 8.9% of baseline vs 3-hit: 122.8 \pm 6.2%, mean \pm SEM; group effect $p < 0.001$, neither time effect or time \times group interaction) and females (WT: 141.5 \pm 9.6% of baseline vs 3-hit: 134.0 \pm 4.6%, mean \pm SEM; group effect $p < 0.001$, neither time effect or time \times group interaction) (Figure 2B).

Statistical differences for the two paradigms of conditioning stimulations were also found for the first 10min post tetanus. After HFS, a significant increase in this short-term potentiation (STP) occurred in 3-hit males ($p < 0.001$) but not in 3-hit females (Figure 2A). On the contrary, STP was significantly decreased in male and female 3-hit mice compared to WT after TBS ($p < 0.001$), as observed for LTP expression (Figure 2B).

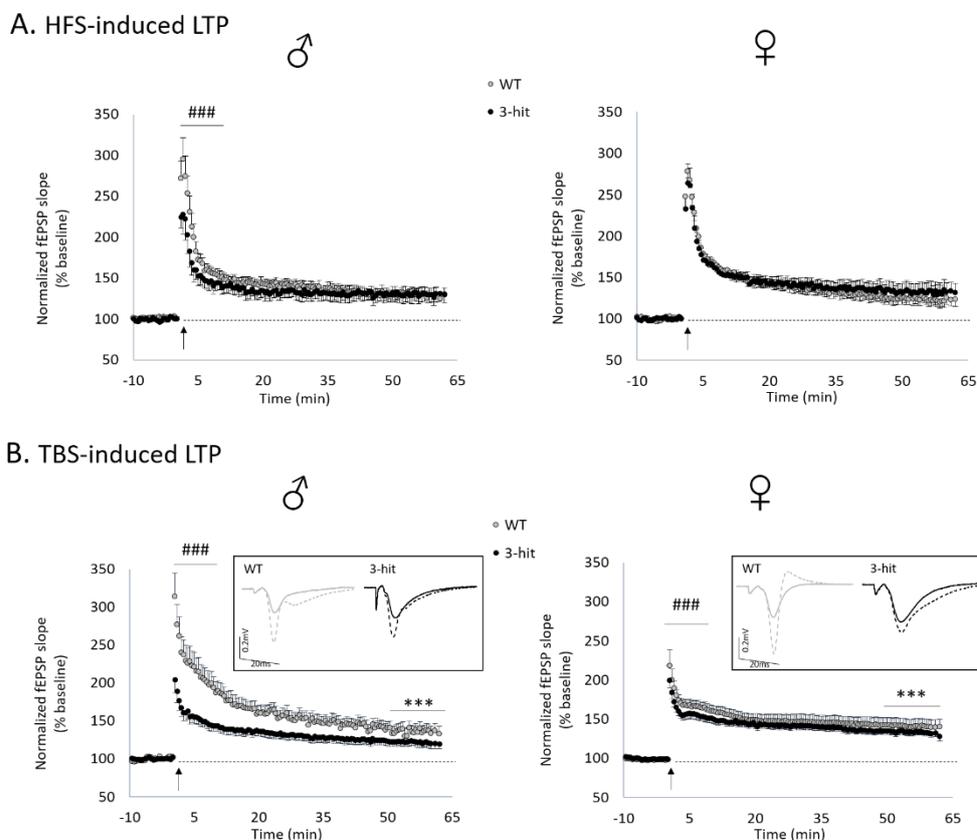


Figure 2. Functional plasticity is altered in 3-hit mice according to stimulation protocols, gender and/or the timing of potentiation. A. Time-course of theta-burst stimulation (TBS)-induced LTP in WT and 3-hit mice, males (left) (WT: n=26 slices vs 3-hit group n=13 slices) and females (right) (WT: n=35 slices vs 3-hit: n=21 slices). In the insert,

3. Résultats

examples of traces recorded in a WT and a 3-hit mouse before (filled line) and 60min after (dashed line) the conditioning stimulation. B. Time-course of high frequency stimulation (HFS)-induced LTP in WT and 3-hit mice, males (left) (WT: n=13 slices vs 3-hit group n=11 slices) and females (right) (WT: n=13 slices vs 3-hit: n=12 slices). Represented data are Mean±SEM; non-parametric permutation test (group and time effect), group effect ***: $p < 0.001$ (last 15min). ANOVA with permutation tests for STP, group effect ###: $p < 0.001$ (first 10min).

3.4. NMDAr activation

In low magnesium aCSF supplemented with NBQX, long-lasting fEPSPs specifically mediated by NMDAr were isolated (Figure 3A). Interestingly, a sexual dimorphism was observed since the Ise was not impacted in 3-hit males compared to WT regardless of the intensity of stimulation, whereas it was significantly higher in females ($p < 0.001$), indicating a specific gender-related enhancement of NMDAr activation (Figure 3B).

In the CA1 hippocampal area, NMDAr activation requires the binding of the co-agonist D-serine in addition to glutamate [26]. Since the basal excitatory neurotransmission was not affected in 3-hit mice, one may consider that synaptic availability of glutamate was not impacted in those animals. An altered occupancy of the NMDAr co-agonist binding site by D-serine could then induce changes in NMDAr activation. To test this possibility, a saturating concentration of D-serine (100 μ M) was added to the aCSF [27]. Consequently, a significant increase in Ise was observed in all experimental groups regardless of the intensity of stimulation ($p < 0.05$) (Figure 4A). The percentage increase by exogenous D-serine was similar in male and female WT and 3-hit mice (Figure S1A), indicating that the occupancy level of the NMDAr glycine binding sites was not impacted by the 3-hit conditioning. Besides, it is interesting to note that in this condition of maximal recruitment of NMDAr, no statistical differences in the Ise was found between WT and 3-hit male mice whereas it remained significantly higher in 3-hit females (Figure S2) ($p < 0.05$), suggesting that the synaptic NMDAr density could be altered in the 3-hit model depending on the gender.

We found that HFS- and TBS-induced LTP were differentially impacted in male and female 3-hit mice. Considering that the regulation by GABA inhibitory tone is different for the expression of these two forms of long-lasting synaptic potentiation [28], we looked for changes in inhibition by comparing the effects of pharmacological GABA_A receptor blockade on NMDAr activation. Adding the GABA_A receptor antagonist bicuculline (10 μ M) to the low Mg²⁺ and NBQX-supplemented aCSF increased the Ise in both male and female WT groups regardless of the intensity of stimulation (Figure 4B and S1B). On the contrary, the Ise was not impacted by bicuculline administration in both male and female 3-hit mice (Figure 4B and S1B) suggesting a decrease in the inhibitory tone in the animal model.

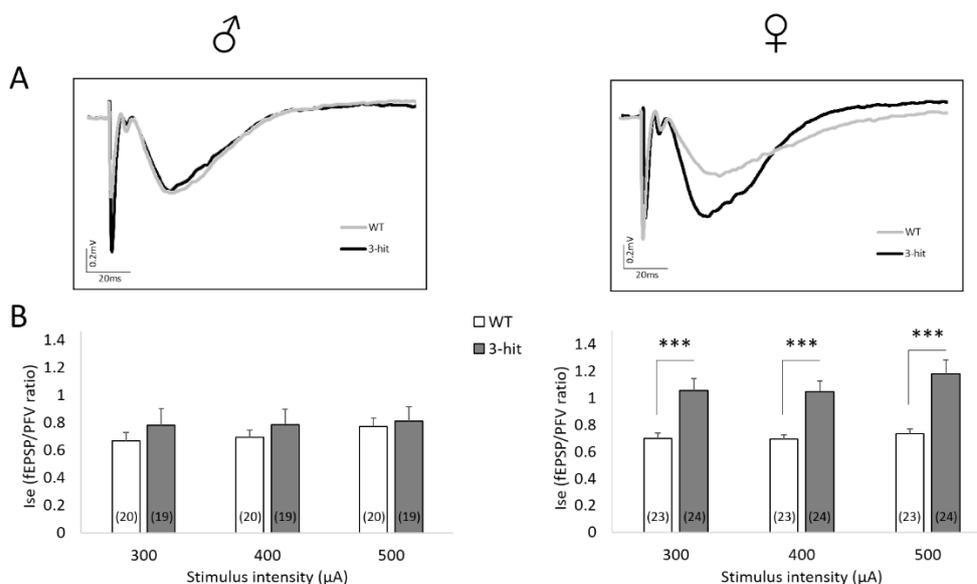


Figure 3. A. NMDAr activation is specifically enhanced in female 3-hit mice. Superimposed traces of long lasting NMDAr-induced fEPSPs recorded in a slice from a male (left) and a female (right), WT (grey line) and a 3-hit (black line) mouse. B. NMDAr-mediated synaptic efficacy ratio Ise (fEPSP/VA ratio) in WT and 3-hit male (left)

3. Resultats

and female (right) mice with increasing stimulus intensity. Number of slices per group is indicated in histogram bars. Represented data are Mean±SEM; ANOVA or ANOVA with permutation tests, ***: $p < 0.001$.

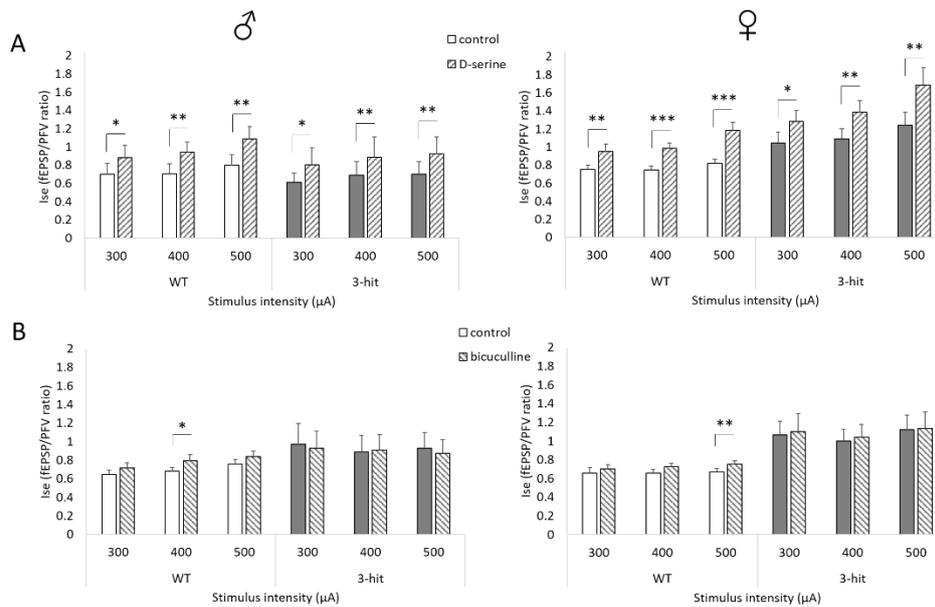


Figure 4. Responsiveness of NMDAr activation to bicuculline but not D-serine is altered in 3-hit mice. A. Index of NMDAr-mediated synaptic efficacy Ise (fEPSP/PFV ratio) determined in slices from WT and 3-hit male (left) and female (right) mice, with increasing stimulus intensity, in control vs D-serine supplemented aCSF (males: WT: $n=18$ slices vs 3-hit: $n=20$ slices; females: WT: $n=12$ slices vs 3-hit: $n=10$ slices). B. Index of NMDAr-mediated synaptic efficacy Ise (fEPSP/PFV ratio) determined in slices from WT and 3-hit male (left) and female (right) mice, with increasing stimulus intensity, in control vs bicuculline supplemented aCSF (males: WT: $n=11$ slices vs 3-hit: $n=9$ slices; females: WT: $n=13$ slices vs 3-hit: $n=12$ slices). Represented data are Mean±SEM; Paired t-tests or Wilcoxon paired t tests, *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

4. Discussion

This electrophysiological study investigated the 3-hit model of schizophrenia-like phenotype that has been recently described [12] associating three major risk factors including a genetic susceptibility, an early stressful event and a late pharmacological insult. We report selective functional deficits (dysregulation of NMDAr- and GABA-related processes) in male and female 3-hit mice that recapitulate several neurotransmission system alterations that have been related to the schizophrenia-like phenotype, thus reinforcing the face validity of the animal model [7,29,30].

The 3-hit model was based on a combination of genetic, environmental and pharmacological risk factors. Each of these factors is not known to be sufficient per se to reproduce all aspects of the disorder, but are supposed to generate a more extensive pathology if they are associated [31]. Although a lot of studies showed a substantial role of genetic susceptibility on schizophrenia prevalence [32,33], whether one particular gene locus in the patients' genome is essential remains unknown. In the 3-hit model, a partial deletion of the MAP6 gene, which regulates the intracellular microtubule organization [13,34] was selected rather than a complete knock-out, considering that heterozygous MAP6 mice present slight cognitive and social deficits [18,35,36]. Indeed, complete deletion of MAP6 drives severe behavioral and functional disturbances mimicking symptoms of psychosis [13,37,38]. Besides, environmental perturbations in childhood have been correlated to a stronger risk to develop a psychiatric disease [39,40]. An early maternal separation in rodents thus disturbs brain development and adult behavior [14,19,41]. Furthermore, a decrease in social interaction after maternal separation for 24h was reported in mice [14]. Therefore, maternal separation at PND9 for 24h was retained for the 3-hit model. Finally, THC administrations from PND32 to PND52 were used as a third factor in the 3-hit model since cannabis increases the risk of developing psychotic-like symptoms in case of chronic consumption during adolescence [42,43]. In rodents, deleterious

3. Résultats

effects of adolescent cannabinoid exposure have been reported on adult behavior (see review [44]), and THC administration affects long-term memory and increases anxiety states [15]. Besides, THC adolescent exposure is widely used in rodent schizophrenia models as a single factor [45] or in combination with another factor [17].

The present electrophysiological study first indicates that the 3-hit conditioning does not significantly affect the basal synaptic transmission mediated by non-NMDAR, i.e. AMPA subtype of glutamate receptors, in CA1 hippocampal networks. This is strengthened by the absence of changes in PPF indicating that presynaptic release of glutamate is not altered.

Regarding functional plasticity, contradictory results exist in the literature. Transcranial magnetic stimulation showed a reduced LTP-like plasticity in the cortex of schizophrenic patients [46,47]. In rodent models of schizophrenia, some studies reported a weaker hippocampal LTP after social isolation [48], deletion of dysbindin-1 [49] or treatment with the NMDAR antagonist MK801 [50], whereas an increase in LTP has been reported after deletion of DISC1 [51]. Besides, no change was found in rats after prenatal injection of methylazoxymethanol acetate, a neurodevelopmental model of schizophrenia [52]. Finally, different consequences on functional plasticity depending on stimulation protocols have been reported [25], more particularly in rodent models of schizophrenia [53,54]. In the present study, we observed changes in the expression of functional plasticity in 3-hit mice depending not only on the strength of the conditioning stimulation but also on the gender of the animals and/or the type of plasticity (STP vs LTP). Indeed, HFS-induced LTP was unchanged in 3-hit mice, whereas the expression of TBS-induced long-lasting potentiation was depressed regardless of the gender of the animals. This last result is consistent with Chalkiadaki et al. [55] investigating a developmental model of schizophrenia using methylazoxymethanol administration during gestation in mice. One striking difference between the HFS and TBS stimulation paradigms is the impact of GABA modulation that is critical for TBS but not HFS-induced LTP to be expressed [28]. In contrast to WT, we found that NMDAR activation in 3-hit mice was not affected by GABA receptor blockade with the GABA_A antagonist bicuculline, suggesting a failure of inhibitory influences in CA1 neuronal networks. In control conditions, presynaptic GABA_B autoreceptors are critically involved in the TBS-induced LTP allowing a long lasting potentiation to develop by substantially diminishing GABA release [28]. If GABA availability is compromised in 3-hit mice, we could speculate that a weaker activation of GABA_B autoreceptors could promote a potent inhibition to persist during the TBS delivery, thus reducing the expression of subsequent LTP. Specific changes in GABA_B receptor activation now need to be determined in 3-hit mice. However, since MAP6 knock-out mice showed a decrease in vesicle density in presynaptic terminals in the CA1 area [13], alteration of presynaptic release during the TBS delivery cannot be definitively ruled out, although there were no changes in the PPF paradigm of glutamate release in 3-hit mice.

It is interesting to note that the impaired GABA regulation of hippocampal network functioning could be linked to an attenuated PPI response [56,57]. This key behavioral feature, that characterizes animal models of schizophrenia, has been recently described in 3-hit mice (see supplementary data of Bouet et al (2020)) [12] and represent a behavioral correlate to the present functional deregulation, also seen in MAP6 knock-out mice [58].

Besides, we found that HFS-induced LTP was not altered in 3-hit mice. In this paradigm of much stronger conditioning stimulation than the TBS, the contribution of GABA regulation is minimized and the number of NMDAR per se located at synaptic connections is the critical parameter that governs the magnitude of the potentiation. Interestingly, a greater maximal isolated NMDAR activation was found in 3-hit mice but only in females, possibly reflecting a higher synaptic receptor density. Gender-related differences are gaining more and more importance in preclinical studies [16,17], and some sexual dimorphisms have been shown in hippocampal plasticity [59–62]. Even if synaptic NMDAR activity increased in female 3-hit mice, this facilitation did not change the level of HFS-induced LTP. Besides, we showed that only male but not female 3-hit mice displayed a lower short-term potentiation in the HFS protocol. Whether STP and LTP are two independent forms of functional plasticity, and may be associated with distinct aspects of memory formation, remains an open issue [63]. But their differential alterations could contribute, at least in part, to the sexual dimorphism associated with schizophrenia-like cognitive deficits. Indeed, whatever the direction in changes affecting the expression of functional plasticity in neuronal networks of 3-hit mice, it is interesting to note that they parallel with alterations of hippocampus-related behaviors. In fact, these mice display working and

3. Résultats

reference memory impairments, sociability deficits and PPI impairments [12], that were currently associated with hippocampal structural alterations and dysfunctions [56,57,64–68].

In conclusion, we provide evidence of functional impairments of hippocampal networks (inhibitory dysregulation and impaired glutamate-related synaptic plasticity) in 3-hit mice displaying deficits generally associated with the pathophysiology of schizophrenia [46–50,69,70]. Multifactorial models such as the 3-hit model used here, certainly represent the future for preclinical studies of psychiatric disorders and therefore appear as the best strategy for the development of more relevant human medication, notably those targeting the GABAergic and glutamatergic systems.

Author Contributions: Conceptualization, Jean-Marie Billard, Thomas Freret, Michel Boulouard and Valentine Bouet; Data curation, Solenn Percelay and Jean-Marie Billard; Writing – original draft, Solenn Percelay and Jean-Marie Billard; Writing – review & editing, Solenn Percelay, Jean-Marie Billard, Thomas Freret, Annie Andrieux, Michel Boulouard and Valentine Bouet.

Funding: This work was supported by the University of Caen Normandy, Normandy Region, INSERM and UNAFAM. The authors declare no conflict of interest.

Institutional Review Board Statement: Experiments were performed in accordance with French and European Economic Community guidelines for the care and use of laboratory animals (2010/63/UE, project n° 2019050617054190_v2, date of approval 2019/09/18).

Acknowledgments: We are grateful to Nicole Turnbull, as native English-speaker, who accepted to proofread the present manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Supplementary Materials:

Appendix A

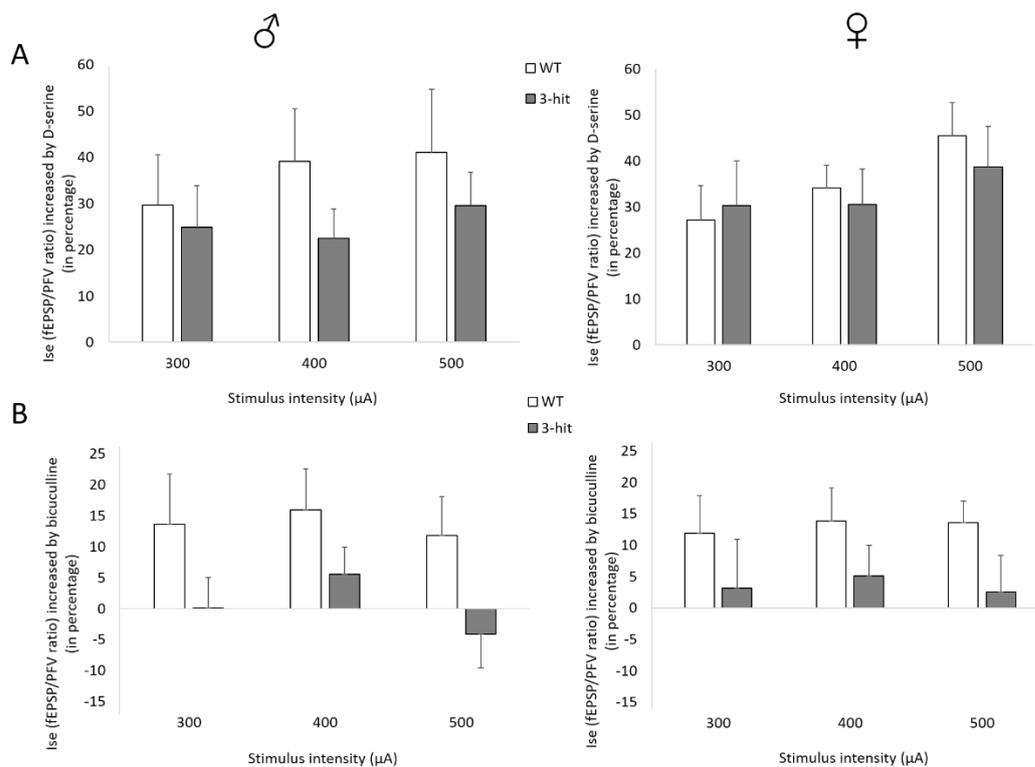


Figure S1. Increase in NMDAr activation by exogenous bicuculline but not D-serine is lower in 3-hit mice. A. Percentage increase in the index of NMDA-r-mediated synaptic efficacy Ise (fEPSP/PFV ratio) in WT and 3-hit slices from male (left) and female (right) mice with increasing stimulus intensity in control vs D-serine supplemented aCSF (males: WT: n=18 slices vs 3-hit: n=20 slices; females: WT: n=12 slices vs 3-hit: n=10 slices). B. Percentage increase in the index of NMDAr-mediated synaptic efficacy Ise (fEPSP/PFV ratio) in WT and 3-hit slices from male (left) and female (right) mice with increasing stimulus intensity in control vs bicuculline

3. Résultats

supplemented aCSF (males: WT: n=11 slices vs 3-hit: n=9 slices; females: WT: n=13 slices vs 3-hit: n=12 slices). Represented data are Mean±SEM; ANOVA or ANOVA with permutation tests, *: p<0.05; **: p<0.01, ***: p<0.001.

Appendix B

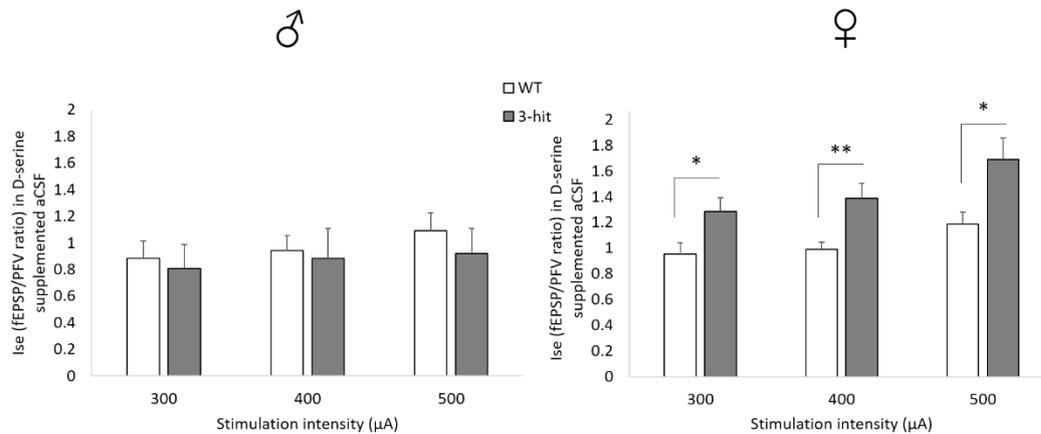


Figure S2. Maximal synaptic NMDAr activation is higher in female 3-hit mice. Index of NMDAr-mediated synaptic efficacy Ise (fEPSP/VA ratio) in hippocampal slices from WT and 3-hit from male (left) and female (right) mice with increasing stimulus intensity in D-serine supplemented aCSF (males: WT: n=18 slices vs 3-hit: n=20 slices; females WT: n=12 slices vs 3-hit: n=10 slices). Represented data are Mean±SEM; ANOVA or ANOVA with permutation tests, *: p<0.05; **: p<0.01.

References

1. J. Addington, D. Addington, E. Maticka-Tyndale, Cognitive functioning and positive and negative symptoms in schizophrenia, *Schizophr. Res.* 5 (1991) 123–134. [https://doi.org/10.1016/0920-9964\(91\)90039-T](https://doi.org/10.1016/0920-9964(91)90039-T).
2. B.P. Murphy, Y.C. Chung, T.W. Park, P.D. McGorry, Pharmacological treatment of primary negative symptoms in schizophrenia: A systematic review, *Schizophr. Res.* 88 (2006) 5–25. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2006.07.002>.
3. A. Krogmann, L. Peters, L. von Hardenberg, K. Bödeker, V.B. Nöhles, C.U. Correll, Keeping up with the therapeutic advances in schizophrenia: a review of novel and emerging pharmacological entities, *Cambridge Univ. Press.* 24 (2020) 41–68. <https://doi.org/10.1017/S109285291900124X>.
4. V. Bouet, M. Boulouard, T. Freret, Animal Models of Schizophrenia: An Update, in: *Adv. Schizophr. Res.*, 2016. www.openaccessbooks.com.
5. B.A. Ellenbroek, M.A. Riva, Early maternal deprivation as an animal model for schizophrenia, *Clin. Neurosci. Res.* 3 (2003) 297–302. [https://doi.org/10.1016/S1566-2772\(03\)00090-2](https://doi.org/10.1016/S1566-2772(03)00090-2).
6. C. Jones, D. Watson, K. Fone, Animal models of schizophrenia, *Br. J. Pharmacol.* 164 (2011) 1162–1194. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01386.x>.
7. M.J. Millan, A. Andrieux, G. Bartzokis, K. Cadenhead, P. Dazzan, P. Fusar-Poli, J. Gallinat, J. Giedd, D.R. Grayson, M. Heinrichs, R. Kahn, M.O. Krebs, M. Leboyer, D. Lewis, O. Marin, P. Marin, A. Meyer-Lindenberg, P. McGorry, P. McGuire, M.J. Owen, P. Patterson, A. Sawa, M. Spedding, P. Uhlhaas, F. Vaccarino, C. Wahlestedt, D. Weinberger, Altering the course of schizophrenia: Progress and perspectives, *Nat. Rev. Drug Discov.* 15 (2016) 485–515. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.28>.
8. M. Yanagi, S. Southcott, J. Lister, C.A. Tamminga, Animal models of schizophrenia: Emphasizing construct validity, 1st ed., Elsevier Inc., 2012. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394596-9.00012-3>.
9. P. Moran, J. Stokes, J. Marr, G. Bock, L. Desbonnet, J. Waddington, C. O'Tuathaigh, Gene × Environment Interactions in Schizophrenia: Evidence from Genetic Mouse Models, *Neural Plast.* (2016). <https://doi.org/10.1155/2016/2173748>.
10. Y. Ayhan, R. McFarlan, M. V. Pletnikov, Animal models of gene–environment interaction in schizophrenia: A dimensional perspective, *Prog. Neurobiol.* 136 (2016) 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.10.002>.
11. I.R. Winship, S.M. Dursun, G.B. Baker, P.A. Balista, L. Kandratavicius, J.P. Maia-de-Oliveira, J. Hallak, J.G. Howland, An Overview of Animal Models Related to Schizophrenia, *Can. J. Psychiatry.* 64 (2019) 5–17. <https://doi.org/10.1177/0706743718773728>.
12. V. Bouet, S. Percelay, E. Leroux, B. Diarra, M. Léger, N. Delcroix, A. Andrieux, S. Dollfus, T. Freret, M. Boulouard, A new 3-hit mouse model of schizophrenia built on genetic, early and late factors, *Schizophr. Res.* (2020). <https://doi.org/10.1016/j.schres.2020.11.043>.

3. Résultats

13. A. Andrieux, P.A. Salin, M. Vernet, P. Kujala, J. Baratier, S. Gory-Fauré, C. Bosc, H. Pointu, D. Proietto, A. Schweitzer, E. Denarier, J. Klumperman, D. Job, The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders, *Genes Dev.* 16 (2002) 2350–2364. <https://doi.org/10.1101/gad.223302>.
14. V. Bouet, B. Lecrux, G. Tran, T. Freret, Effect of pre- versus post-weaning environmental disturbances on social behaviour in mice, *Neurosci. Lett.* 488 (2011) 221–224. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.11.033>.
15. M. Murphy, S. Mills, J. Winstone, E. Leishman, J. Wager-Miller, H. Bradshaw, K. Mackie, Chronic Adolescent Δ 9 -Tetrahydrocannabinol Treatment of Male Mice Leads to Long-Term Cognitive and Behavioral Dysfunction, Which Are Prevented by Concurrent Cannabidiol Treatment, *Cannabis Cannabinoid Res.* 2 (2017) 235–246. <https://doi.org/10.1089/can.2017.0034>.
16. M. Leger, J.C. Neill, A systematic review comparing sex differences in cognitive function in schizophrenia and in rodent models for schizophrenia, implications for improved therapeutic strategies, *Neurosci Biobehav Rev.* 68 (2016) 979–1000. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.06.029>.
17. A.L. Dunn, P.T. Michie, D.M. Hodgson, L. Harms, Adolescent cannabinoid exposure interacts with other risk factors in schizophrenia: a review of the evidence from animal models, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 116 (2020) 202–220. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.06.028>.
18. J. Volle, J. Brocard, M. Saoud, S. Gory-Faure, J. Brunelin, A. Andrieux, M.F. Suaud-Chagny, Reduced expression of STOP/MAP6 in mice leads to cognitive deficits, *Schizophr. Bull.* 39 (2013) 969–978. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbs113>.
19. B.A. Ellenbroek, P.T.J.M. van den Kroonenberg, A.R. Cools, The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats, *Schizophr. Res.* 30 (1998) 251–260. [https://doi.org/10.1016/S0920-9964\(97\)00149-7](https://doi.org/10.1016/S0920-9964(97)00149-7).
20. M. O'Tuathaigh, C. M. Hryniewiecka, A. Behan, O. Tighe, C. Coughlan, L. Desbonnet, Chronic adolescent exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol in COMT knockout mice: impact on phenotypes relevant to psychosis., *Neuropsychopharmacology.* 35 (2010) 2262–2273. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.100>.
21. B. Potier, F. Poindessous-Jazat, P. Dutar, J.M. Billard, NMDA receptor activation in the aged rat hippocampus, *Exp. Gerontol.* 35 (2000) 1185–1199. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(00\)00122-4](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00122-4).
22. W.W. Anderson, G.L. Collingridge, The LTP Program: A data acquisition program for on-line analysis of long-term potentiation and other synaptic events, *J. Neurosci. Methods.* 108 (2001) 71–83. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(01\)00374-0](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(01)00374-0).
23. W.W. Anderson, G.L. Collingridge, Capabilities of the WinLTP data acquisition program extending beyond basic LTP experimental functions, *J. Neurosci. Methods.* 162 (2007) 346–356. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.12.018>.
24. P. Lecouflet, C.M. Roux, B. Potier, M. Leger, E. Brunet, J.-M. Billard, P. Schumann-Bard, T. Freret, Interplay between 5-HT₄ Receptors and GABAergic System within CA1 Hippocampal Synaptic Plasticity, *Cereb. Cortex.* (2020). <https://doi.org/10.1093/cercor/bhaa253>.
25. J. Larson, E. Munkácsy, Theta-Burst LTP HHS Public Access, *Brain Res.* 1621 (2015) 38–50. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.10.034>.
26. H. Wolosker, D-Serine Regulation of NMDA Receptor Activity, *Sci. STKE.* 356 (2006). <https://doi.org/10.1126/stke.3562006pe41>.
27. G. Junjaud, E. Rouaud, F. Turpin, J.P. Mothet, J.M. Billard, Age-related effects of the neuromodulator D-serine on neurotransmission and synaptic potentiation in the CA1 hippocampal area of the rat, *J. Neurochem.* 98 (2006) 1159–1166. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03944.x>.
28. N. Gong, Y. Li, G.Q. Cai, R.F. Niu, Q. Fang, K. Wu, Z. Chen, L.N. Lin, L. Xu, J. Fei, T. Le Xu, GABA transporter-1 activity modulates hippocampal theta oscillation and theta burst stimulation-induced long-term potentiation, *J. Neurosci.* 29 (2009) 15836–15845. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4643-09.2009>.
29. R.A. McCutcheon, J.H. Krystal, O.D. Howes, Dopamine and glutamate in schizophrenia: biology, symptoms and treatment, *World Psychiatry.* 19 (2020) 15–33. <https://doi.org/10.1002/wps.20693>.
30. M.Y. Xu, A.H.C. Wong, GABAergic inhibitory neurons as therapeutic targets for cognitive impairment in schizophrenia, *Acta Pharmacol. Sin.* 39 (2018) 733–753. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.172>.
31. R. Sultana, C.C. Lee, Expression of Behavioral Phenotypes in Genetic and Environmental Mouse Models of Schizophrenia, *Front. Behav. Neurosci.* 14 (2020) 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.00029>.
32. M. Tsuang, Schizophrenia: Genes and environment, *Biol. Psychiatry.* 47 (2000) 210–220. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(99\)00289-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(99)00289-9).
33. Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomic, Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci, *Nature.* 511 (2014) 421–427. <https://doi.org/10.1038/nature13595>.
34. J.C. Deloulme, S. Gory-Fauré, F. Mauconduit, S. Chauvet, J. Jonckheere, B. Boulan, E. Mire, J. Xue, M. Jany, C. Maucler, A.A. Deparis, O. Montigon, A. Daoust, E.L. Barbier, C. Bosc, N. Deglon, J. Brocard, E. Denarier, I. Le Brun, K. Pernet-Gallay, I. Vilgrain, P.J. Robinson, H. Lahrech, F. Mann, A. Andrieux, Microtubule-associated protein 6 mediates neuronal connectivity through Semaphorin 3E-dependent signalling for axonal growth, *Nat. Commun.* 6 (2015). <https://doi.org/10.1038/ncomms8246>.

3. Résultats

35. A. Merenlender-Wagner, R. Pikman, E. Giladi, A. Andrieux, I. Gozes, NAP (davunetide) enhances cognitive behavior in the STOP heterozygous mouse-A microtubule-deficient model of schizophrenia, *Peptides*. 31 (2010) 1368–1373. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.04.011>.
36. A. Merenlender-Wagner, Z. Shemer, O. Touloumi, R. Lagoudaki, E. Giladi, A. Andrieux, N.C. Grigoriadis, I. Gozes, New horizons in schizophrenia treatment: Autophagy protection is coupled with behavioral improvements in a mouse model of schizophrenia, *Autophagy*. 10 (2014) 2324–2332. <https://doi.org/10.4161/15548627.2014.984274>.
37. C. Bouvrais-Veret, S. Weiss, N. Hanoun, A. Andrieux, A. Schweitzer, D. Job, M. Hamon, B. Giros, M.P. Martres, Microtubule-associated STOP protein deletion triggers restricted changes in dopaminergic neurotransmission, *J. Neurochem.* 104 (2008) 745–756. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05025.x>.
38. E. Brenner, U. Sonnewald, A. Schweitzer, A. Andrieux, A. Nehlig, Hypoglutamatergic Activity in the STOP Knockout Mouse: a Potential Model for Chronic Untreated Schizophrenia, *J. Neurosci. Res.* 85 (2007) 3487–3493 (2007). <https://doi.org/10.1002/jnr>.
39. D.M. Anglin, P.R. Cohen, H. Chen, Duration of early maternal separation and prediction of schizotypal symptoms from early adolescence to midlife, *Schizophr. Res.* 103 (2008) 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2008.02.016>.
40. P. Mäki, J. Veijola, M. Joukamaa, E. Läärä, H. Hakko, P.B. Jones, M. Isohanni, Maternal separation at birth and schizophrenia - A long-term follow-up of the Finnish Christmas Seal Home Children, *Schizophr. Res.* 60 (2003) 13–19. [https://doi.org/10.1016/S0920-9964\(02\)00203-7](https://doi.org/10.1016/S0920-9964(02)00203-7).
41. J. Vetulani, Early maternal separation: A rodent model of depression and a prevailing human condition, *Pharmacol. Reports.* 65 (2013) 1451–1461. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(13\)71505-6](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(13)71505-6).
42. M. Di Forti, D. Quattrone, T.P. Freeman, G. Tripoli, C. Gayer-Anderson, H. Quigley, V. Rodriguez, H.E. Jongsma, L. Ferraro, C. La Cascia, D. La Barbera, I. Tarricone, D. Berardi, A. Szöke, C. Arango, A. Tortelli, E. Velthorst, M. Bernardo, C.M. Del-Ben, P.R. Menezes, J.P. Selten, P.B. Jones, J.B. Kirkbride, B.P. Rutten, L. de Haan, P.C. Sham, J. van Os, C.M. Lewis, M. Lynskey, C. Morgan, R.M. Murray, S. Amoretti, M. Arrojo, G. Baudin, S. Beards, M. Bernardo, J. Bobes, C. Bonetto, B. Cabrera, A. Carracedo, T. Charpeaud, J. Costas, D. Cristofalo, P. Cuadrado, C.M. Díaz-Caneja, A. Ferchiou, N. Franke, F. Frijda, E. García Bernardo, P. Garcia-Portilla, E. González, K. Hubbard, S. Jamain, E. Jiménez-López, M. Leboyer, G. López Montoya, E. Lorente-Rovira, C. Marcelino Loureiro, G. Marrazzo, C. Martínez, M. Matteis, E. Messchaert, M.D. Moltó, J. Nacher, M.S. Olmeda, M. Parellada, J. González Peñas, B. Pignon, M. Rapado, J.R. Richard, J.J. Rodríguez Solano, L. Roldán Díaz, M. Ruggeri, P.A. Sáiz, E. Sánchez, J. Sanjuán, C. Sartorio, F. Schürhoff, F. Seminerio, R. Shuhama, L. Sideli, S.A. Stilo, F. Termorshuizen, S. Tosato, A.M. Tronche, D. van Dam, E. van der Ven, The contribution of cannabis use to variation in the incidence of psychotic disorder across Europe (EU-GEI): a multicentre case-control study, *The Lancet Psychiatry.* 6 (2019) 427–436. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(19\)30048-3](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(19)30048-3).
43. J. Renard, M.O. Krebs, G. Le Pen, T.M. Jay, Long-term consequences of adolescent cannabinoid exposure in adult psychopathology, *Front. Neurosci.* 8 (2014) 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00361>.
44. T. Rubino, D. Parolaro, The impact of exposure to cannabinoids in adolescence: Insights from animal models, *Biol. Psychiatry.* 79 (2016) 578–585. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.07.024>.
45. E. Zamberletti, T. Rubino, Impact of the endocannabinoid system manipulation on neurodevelopmental processes relevant to schizophrenia, *Biol. Psychiatry Cogn. Neurosci. Neuroimaging.* (2020). <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2020.06.013>. [In press, Corrected Proof].
46. A. Hasan, M.A. Nitsche, B. Rein, T. Schneider-Axmann, B. Guse, O. Gruber, P. Falkai, T. Wobrock, Dysfunctional long-term potentiation-like plasticity in schizophrenia revealed by transcranial direct current stimulation, *Behav. Brain Res.* 224 (2011) 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.05.017>.
47. M. V. Frantseva, P.B. Fitzgerald, R. Chen, B. Möller, M. Daigle, Z.J. Daskalakis, Evidence for impaired long-term potentiation in schizophrenia and its relationship to motor skill learning, *Cereb. Cortex.* 18 (2008) 990–996. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhm151>.
48. L. Roberts, J.R.T. Greene, Post-weaning social isolation of rats leads to a diminution of LTP in the CA1 to subiculum pathway, *Brain Res.* 991 (2003) 271–273. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.08.022>.
49. W.B. Glen, B. Horowitz, G.C. Carlson, T.D. Cannon, K. Talbot, J.D. Jentsch, A. Lavin, Dysbindin-1 loss compromises NMDAR-dependent synaptic plasticity and contextual fear conditioning, *Hippocampus.* 24 (2014) 204–213. <https://doi.org/10.1002/hipo.22215>.
50. D. Manahan-Vaughan, D. von Haebler, C. Winter, G. Juckel, U. Heinemann, A Single Application of MK801 Causes Symptoms of Acute Psychosis, Deficits in Spatial Memory, and Impairment of Synaptic Plasticity in Rats, *Hippocampus.* 18 (2008) 125–134. <https://doi.org/10.1002/hipo>.
51. C.A. Booth, J.T. Brown, A.D. Randall, Neurophysiological modification of CA1 pyramidal neurons in a transgenic mouse expressing a truncated form of disrupted-in-schizophrenia 1, *Eur. J. Neurosci.* 39 (2014) 1074–1090. <https://doi.org/10.1111/ejn.12549>.
52. T.M. Sanderson, M.C. Cotel, M.J. O'Neill, M.D. Tricklebank, G.L. Collingridge, E. Sher, Alterations in hippocampal excitability, synaptic transmission and synaptic plasticity in a neurodevelopmental model of schizophrenia, *Neuropharmacology.* 62 (2012) 1349–1358. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.08.005>.

3. Résultats

53. L.J. Drew, K.L. Stark, K. Fénelon, M. Karayiorgou, A.B. Macdermott, J.A. Gogos, Evidence for altered hippocampal function in a mouse model of the human 22q11.2 microdeletion, *Mol. Cell. Neurosci.* 47 (2011) 293–305. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2011.05.008>.
54. T. Nomura, Y. Oyamada, H.B. Fernandes, C.L. Remmers, J. Xu, H.Y. Meltzer, A. Contractor, Subchronic phencyclidine treatment in adult mice increases GABAergic transmission and LTP threshold in the hippocampus, *Neuropharmacology.* 100 (2016) 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.04.012>.
55. K. Chalkiadaki, A. Velli, E. Kyriazidis, V. Stavroulaki, V. Vouvoutsis, E. Chatzaki, M. Aivaliotis, K. Sidiropoulou, Development of the MAM model of schizophrenia in mice: Sex similarities and differences of hippocampal and prefrontal cortical function, *Neuropharmacology.* 144 (2019) 193–207. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.10.026>.
56. J. Hauser, U. Rudolph, R. Keist, H. Möhler, J. Feldon, B.K. Yee, Hippocampal $\alpha 5$, subunit-containing GABAA receptors modulate the expression of prepulse inhibition, *Mol. Psychiatry.* 10 (2005) 201–207. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001554>.
57. W.N. Zhang, T. Bast, J. Feldon, Prepulse inhibition in rats with temporary inhibition/inactivation of ventral or dorsal hippocampus, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73 (2002) 929–940. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(02\)00936-X](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(02)00936-X).
58. R.L. Fradley, G.F. O'Meara, R.J. Newman, A. Andrieux, D. Job, D.S. Reynolds, STOP knockout and NMDA NR1 hypomorphic mice exhibit deficits in sensorimotor gating, *Behav. Brain Res.* 163 (2005) 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.05.012>.
59. A. Jain, G.Z. Huang, C.S. Woolley, Latent sex differences in molecular signaling that underlies excitatory synaptic potentiation in the hippocampus, *J. Neurosci.* 39 (2019) 1552–1565. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1897-18.2018>.
60. N. Brandt, R. Vierk, L. Fester, M. Anstötz, L. Zhou, L.F. Heilmann, S. Kind, P. Steffen, G.M. Rune, Sex-specific Difference of Hippocampal Synaptic Plasticity in Response to Sex Neurosteroids, *Cereb. Cortex.* 30 (2020) 2627–2641. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhz265>.
61. W. Wang, A.A. Le, B. Hou, J.C. Lauterborn, C.D. Cox, E.R. Levin, G. Lynch, C.M. Gall, Memory-related synaptic plasticity is sexually dimorphic in rodent hippocampus, *J. Neurosci.* 38 (2018) 7935–7951. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0801-18.2018>.
62. N.A.V. Derks, H.J. Krugers, C.C. Hoogenraad, M. Joëls, R. Angela Sarabdjitsingh, Effects of early life stress on synaptic plasticity in the developing hippocampus of male and female rats, *PLoS One.* 11 (2016) 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164551>.
63. J. Lisman, Glutamatergic synapses are structurally and biochemically complex because of multiple plasticity processes: Long-term potentiation, long-term depression, short-term potentiation and scaling, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 372 (2017). <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0260>.
64. R. Nguyen, M.D. Morrissey, V. Mahadevan, J.D. Cajanding, M.A. Woodin, J.S. Yeomans, K. Takehara-Nishiuchi, J.C. Kim, Parvalbumin and GAD65 interneuron inhibition in the ventral hippocampus induces distinct behavioral deficits relevant to schizophrenia, *J. Neurosci.* 34 (2014) 14948–14960. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2204-14.2014>.
65. M.E. Glover, S.M. Clinton, Of rodents and humans: A comparative review of the neurobehavioral effects of early life SSRI exposure in preclinical and clinical research, *Int. J. Dev. Neurosci.* 51 (2016) 50–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2016.04.008>.
66. A.P. Yonelinas, The Hippocampus Supports High-Resolution Binding in the Service of Perception, Working Memory and Long-Term Memory, *Behav. Brain Res.* 1 (2013) 34–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.05.030>.
67. G. Neves, S.F. Cooke, T.V.P. Bliss, Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: A neural network approach to causality, *Nat. Rev. Neurosci.* 9 (2008) 65–75. <https://doi.org/10.1038/nrn2303>.
68. J. Bures, A.A. Fenton, Y. Kaminsky, L. Zinyuk, Place cells and place navigation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 343–350. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.1.343>.
69. S.F. Taylor, I.F. Tso, GABA abnormalities in schizophrenia: A methodological review of in vivo studies, *Schizophr. Res.* 167 (2015) 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2014.10.011>.
70. K. Nakazawa, V. Zsiros, Z. Jiang, K. Nakao, S. Kolata, S. Zhang, J.E. Belforte, GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology, *Neuropharmacology.* 62 (2012) 1574–1583. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.022>.

3.2.2.1 Résumé de l'article 2

L'objectif de cette étude était de caractériser l'intégrité des systèmes de transmission glutamatergique et GABAergique ainsi que la plasticité fonctionnelle dans l'hippocampe du modèle 3-hit *via* une analyse électrophysiologique. L'utilisation d'animaux mâles et femelles nous a permis d'observer des différences en fonction du sexe, ce qui peut refléter le dimorphisme observé chez les schizophrènes. Nous avons montré des altérations des systèmes de neurotransmissions glutamatergique et GABAergique ainsi qu'un dysfonctionnement de la plasticité fonctionnelle (diminution de la PLT) au sein de l'hippocampe des animaux 3-hit. La régulation des mécanismes d'inhibition semble également affectée, ce qui peut être corrélé au déficit d'inhibition comportementale (inhibition du réflexe de sursaut) observé dans le modèle 3-hit (voir *3.2.1.2 Supplementary results 2* de l'article 1).

Cette étude apporte des informations mécanistiques nouvelles qui renforcent la validité d'apparence du modèle de schizophrénie 3-hit.

L'article 3 suivant est la première description d'un test de latéralité olfactive chez la souris, il nous a permis d'évaluer ce comportement chez les animaux 3-hit dans l'article 4.

3. Résultats

3.2.3 Article 3 : Olfactory laterality is valence-dependent in mice

Christelle Jozet-Alves^a, Solenn Percelay^b, Valentine Bouet^b

^a UMR EthoS 6552, Normandie Univ, UNICAEN, University of Rennes, CNRS, 14000 Caen, France

^b COMETE, Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, GIP CYCERON, 14000 Caen, France

Symmetry. 2019. 11(9), 1129; <https://doi.org/10.3390/sym11091129>



Olfactory Laterality Is Valence-Dependent in Mice

Christelle Jozet-Alves, Solenn Percelay, Valentine Bouet

► **To cite this version:**

Christelle Jozet-Alves, Solenn Percelay, Valentine Bouet. Olfactory Laterality Is Valence-Dependent in Mice. *Symmetry*, MDPI, 2019, 11 (9), pp.1129. 10.3390/sym11091129 . hal-02279643

HAL Id: hal-02279643

<https://hal-normandie-univ.archives-ouvertes.fr/hal-02279643>

Submitted on 5 Sep 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Article

Olfactory Laterality Is Valence-Dependent in Mice

Christelle Jozet-Alves ^{1,*}, Solenn Percelay ² and Valentine Bouet ²¹ UMR EthoS 6552, Normandie Univ, UNICAEN, University of Rennes, CNRS, 14000 Caen, France² COMETE, Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, GIP CYCERON, 14000 Caen, France

* Correspondence: christelle.alves@unicaen.fr

Received: 9 August 2019; Accepted: 29 August 2019; Published: 5 September 2019



Abstract: (1) Background: Although olfaction is the predominant sensory modality in rodents, studies focusing on lateralisation of olfactory processing remain scarce, and they are limited to the exploration of brain asymmetries. This study aimed to test whether outbred and inbred mice (NMRI and C57BL/6J mice strains) show nostril-use preference in processing olfactory *stimuli* differing in terms of emotional valence under unrestrained conditions. (2) Methods: Five odour *stimuli* were used in the study: vanilla, female urine, garlic, rat, distilled water. We measured the number of times mice used their left or right nostril for each testing session. (3) Results: We here showed that mice preferentially used their right nostril when sniffing attractive *stimuli* (female urine, vanilla), and their left nostril when sniffing aversive *stimuli* (rat odour). Results were consistent for both strains. (4) Conclusions: Surprisingly, the results obtained seem opposite to the valence theory assessing that the left and the right hemispheres are dominant in processing *stimuli* with a positive and a negative valence, respectively. It remains to be determined whether this valence-dependent pattern is specific or not to olfaction in mice. These new findings will be important to better understand how both hemispheres contribute to odour processing in rodents.

Keywords: olfactory laterality; *Mus musculus*; valence theory; emotional processing

1. Introduction

Although olfaction is the predominant sensory modality in rodents, influencing a large array of behaviours (e.g., mating, intra-specific communication, predation, predator detection) [1], research into olfactory laterality remains scarce. The basic circuit of the olfactory system begins with the sensory olfactory neurons located in the nose epithelium. The axons of these neurons project ipsilaterally to the olfactory bulb (OB) [2]. Then, these neurons send their axons ipsilaterally to the olfactory cortical areas: the anterior olfactory nucleus, the olfactory tubercle (OT), the piriform cortex (PC), the amygdala, and the lateral entorhinal cortex [3]. Bilateral convergence occurs at most central olfactory structures via the anterior commissure [4] and via commissural fibres originating in layer II of the PC [5]. In mice, a zone of the main OB is dedicated to aversive odours processing (e.g., predators, spoiled food [6]). Indeed, mutant mice devoid of glomerular structures in this zone are still able to detect and learn these odours but not to behave adaptively. The firing rate of OT neurons in mice during an odour discrimination task is sensitive to the associative outcome of conditioned odours [7]. In anaesthetised rats, an electrophysiological study suggests that the recruitment of OT neurons might be directly dependent on the biological significance of the odour [8]. Bilateral comparisons can be used by rats to accurately report the direction of odour gradients [9]. Anterior PC responds to odours delivered to either the ipsilateral or contralateral naris [10]; and following unihinally training, memory can be accessible via either nostril [11,12].

The limited air exchange between the two nasal pathways associated with the strongly ipsilateral primary pathway may allow asymmetry in olfactory processing (Table 1). In rats, Litaudon and

colleagues [13] have recently shown a positive correlation between behavioural responsiveness to an odour and the activation of olfactory cortical areas (i.e., anterior PC and lateral amygdala) located in the left hemisphere. The odours used in this study were chosen to be neutral: i.e., inducing neither spontaneous aversion nor preference at the group level. Dantzer and colleagues [14] have shown that left-bulbectomised rats do not behave adaptively in response to the odour of a stressed conspecific, while being still able to discriminate between stressed and unstressed conspecifics (i.e., increase in plasma corticosterone in the first case, not in the second). These authors have suggested that the left hemisphere takes charge of behaviour in response to emotionally negative social odours. When considering olfactory learning, a study in rats has shown a highly significant lateralisation of translocation of enzyme protein kinase C from the cytosol to the membrane in the left PC [15]. More recently, Cohen and colleagues [16] showed a transient interhemispheric asymmetry in the anterior PC oscillatory activity at the initial stages of an odour discrimination task. This asymmetry was mainly the result of an enhanced event-related oscillatory activity in the left than in the right anterior PC. Interhemispheric coherence was recovered when rats started to succeed in the task. More recently, Cohen and Wilson [17] showed that this left bias in the anterior PC was associated with a right bias in the orbitofrontal cortex. The authors suggested that this functional lateralisation may enhance circuit specialisation for increased efficiency in tasks requiring behavioural flexibility.

Table 1. Review of the studies on lateralisation of olfactory processing in rodents. OB: olfactory bulb; PC: piriform cortex.

Species/Strain/Sex	Brain Structure	Side	Measure	Reference
Rats/Long Evans males	anterior PC	LEFT	Enhanced beta frequency band oscillations during the first stages of odour discrimination learning Performance-and context-dependent asymmetry	[16]
Rats/Long Evans males	anterior PC orbitofrontal cortex	LEFT RIGHT	Enhanced odour-evoked activity during initial stages of odour discrimination learning	[17]
Rats/Sprague Dawley females	PC	LEFT	Olfactory-learning specific lateralisation of translocation of enzyme protein kinase C from cytosol to membrane	[15]
Rats/Wistar males	OB	LEFT	Absence of adaptive response to the odour of a stressed conspecific when lesioned	[14]
Rats/Wistar males	anterior PC lateral amygdala	LEFT	Activation correlated with behavioural responsiveness	[13]

Most studies have focused on brain correlates of olfactory processing in rodents, but none has focused on nostril-use preference when exposed to different olfactory *stimuli* under unrestrained conditions. These behavioural asymmetries have mainly been studied in horses and dogs. In both species, right nostril is preferentially used when first exposed to novel olfactory stimuli whatever their emotional valence (horses: stallion faeces in a plastic bag [18]; dogs: vaginal secretion, lemon, veterinary sweat odour and adrenaline [19]). While the results are non-significant (possibly because of a visual inspection conducted first), de Boyer des Roches and colleagues [20] showed a slight tendency (67% of individuals) to use the right nostril rather than the left one to sniff a novel object for the first time. Taken as a whole, these studies suggest that novelty associated with arousal is processed by the right hemisphere. This is also consistent with the decrease in the right bias when mares were exposed 24 h later to the same stallion faeces [18]. In horses, a right nostril bias was observed after repeated exposure to adrenaline and urine of oestrous mares [21]. The higher the increase of cardiac activity, the higher the

preference to use the right nostril at last. The authors suggested that the right hemisphere is involved in the analysis of intense emotion and sexual behaviour. In dogs, a shift towards the use of the left nostril was observed with repeated exposure to food odour, while the right nostril was still preferentially used for aversive *stimuli* (veterinary sweat odorants and adrenaline [19]). More recently, Siniscalchi and colleagues [22] also showed a right nostril use bias when exposed to the conspecific odour of a dog placed in a stressful situation (i.e., left alone for 5 min in an unfamiliar environment). The right nostril use preference for aversive *stimuli* (adrenaline in horses: [21]; veterinary sweat odorants, adrenaline, and odour of an isolated congener in dogs [19,22]) appears consistent with the hypothesis of the involvement of the right hemisphere in processing intense emotional *stimuli* [23]. Concerning the shift towards the use of the left nostril for food, the results are consistent with a left hemisphere involvement when performing routine behaviours in non-stressful conditions [23]. However, it should be noticed that Siniscalchi and colleagues [21] did not observe such a left bias in horses exposed to food odour.

Considering the lack of data concerning olfactory laterality in rodents in literature, the aim of this study was to test: (1) whether mice show nostril asymmetries in processing olfactory *stimuli* differing in terms of emotional valence under unrestrained conditions; (2) whether the strain of mice tested (NMRI strain and C57BL/6) affects either the direction or the strength of asymmetries in odour processing. Two different mice strains were chosen for this study: the NMRI (Naval Medical Research Institute) outbred strain and the C57BL/6J inbred strain. The NMRI strain is frequently used in many fields of general biology as well as in pharmacological studies, and C57BL/6J is the most widely used inbred strain.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Experiments were performed on two-month-old male Naval Medical Research Institute mice (NMRI; $n = 20$) and on two-month-old male C57BL/6J mice ($n = 20$), purchased from Janvier Laboratories (Le Genest-Saint-Isle, France). Mice were housed per five in standard polycarbonate cages ($42 \times 29 \times 15$ cm). They were maintained on a reversed 12 h L-D cycle (lights on at 7:00 pm) with food and water *ad libitum*, constant temperature (22 ± 2 °C) and humidity ($55 \pm 10\%$). Behavioural tests were undertaken between 09:00 am and 04:00 pm. Animals were acclimatised to the experimental room 30 min before testing. All experiments were carried out in accordance with the Directive of the European Council (2010/63/EU), the French regulation regarding the protection of animals used for scientific purposes, and the regional ethics committee (Comité d’Ethique NOmandie en Matière d’Experimentation Animale, CENOMEXA; agreement number 54).

2.2. Apparatus and Odour Stimuli

The corner-shaped apparatus consisted of two vertical boards ($30 \text{ cm} \times 20 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$) attached on one side (angle of 30°), and a third board used to close the apparatus on the other side and reduce the length of the apparatus to 20 cm (Figure 1). A small opening (width 0.3 cm) between the boards allowed the experimenter to insert the tip of a 10 μL -pipette containing an odour *stimulus* (length of the tip inserted in the apparatus was 1.7 cm long). According to preliminary experiments, the optimum height of the tip of the pipette, which allows a clear assessment of the nostril used during sniffing, was 10.5 cm and 8.5 cm for NMRI and C57BL/6J mice, respectively. A video camera was placed above the corner of the apparatus.

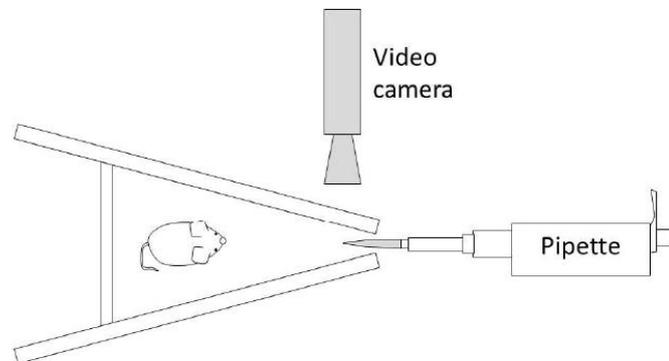


Figure 1. Apparatus used to test olfactory lateralisation in mice. The tip of the pipette filled with 10 μ L of one of the five odour *stimuli* is inserted through the slit before placing the mouse in the apparatus.

Five odour *stimuli* were used in the study: (1) vanilla; (2) odour of female NMRI mice or female C56BL/6J mice (according to the strain of the tested mouse); (3) garlic; (4) rat odour; (5) distilled water. The vanilla odour was prepared by mixing five drops of concentrated vanilla flavouring (Déco'Relief®, France) in 20 mL of distilled water. Garlic odour was prepared by mixing 2.4 g of mashed garlic in 60 mL of distilled water for 10 min. Female mice odour was prepared by mixing 35 g of female-soiled bedding with 300 mL of distilled water for 30 min. Rat odour was prepared by mixing 45 g of rat-soiled bedding with 300 mL of distilled water for 30 min. All odour *stimuli* (pure distilled water included) were aliquoted in Eppendorf tubes (0.5 mL), and stored at -20 °C until testing.

2.3. Procedure

At the beginning of a test session, the tip of the pipette was filled with 10 μ L of one of the five odour *stimuli* and inserted in the apparatus. The tested mouse was then placed at the opposite side of the apparatus, facing the tip of the pipette. The test session lasted 10 min. The behaviour of the mouse was recorded continuously during olfactory inspection for subsequent analysis. Each individual was tested with one odour per day, over five consecutive days. The five odour *stimuli* were presented in random order. The tip of the pipette was changed between each tested individual. All video recordings were analysed by two blind experimenters (unaware of the identity of the tested mouse, and of the odour *stimulus*). The first nostril used at the beginning of a testing session and the number of times a mouse used its left or right nostril (L and R, respectively) during odour sniffing was noted for each testing session (Figure 2). When the use of one or the other nostril could not be clearly stated by the experimenters, the data point was discarded.



Figure 2. (a) Image of an NMRI mouse using its right nostril to sniff the odour presented; (b) Image of a C57BL/6J mouse using its left nostril to sniff the odour presented.

2.4. Data Analysis

A repeated-measures two-way ANOVA (with odour *stimuli* as a repeated factor, and strain as an independent factor) was conducted to compare the mean number of sniffs during testing sessions, and effect size was computed (ges: generalised Eta-squared measure of effect size). Benjamini–Hochberg post-hoc tests were used to make subsequent pairwise comparisons.

Binomial tests were used to determine whether a nostril (i.e., left or right) was used more frequently for the first sniff at the beginning of a testing session for each odour, and each strain. Cochran tests were run in each strain to determine whether the proportion of mice using their right or left nostril first were different according to the odour tested. Confidence intervals and odds ratio are available in Tables S1–S3.

A Laterality Index (LI) was calculated for each test session for each mouse, according to the formula: $LI = (R - L)/(R + L)$. LI is a continuous variable ranging from +1 to −1. Positive values would thus indicate a preference to use the right nostril, and negative values a preference to use the left nostril. Absolute values of laterality indexes (absLI) were calculated for each test session for each mouse to assess laterality strength. absLI is a continuous variable ranging from 0 to 1. A value of 1 would indicate that the mouse was always using the same nostril during the test session, a value of 0 would indicate that the number of times a mouse used its left or right nostril was the same during the test session (i.e., no preference). To analyse LI and absLI results, only animals that had sniffed the tip of the pipette at least 6 times during a training session were considered. This criterion was used as it is the lowest value for which it is possible to obtain a significant result using a binomial test to test nostril preference (i.e., if an individual is using the same nostril six times out of six sniffs, it is preferentially using this nostril: binomial test: $p = 0.03$). Significant departures from chance level (0) were estimated by running two-tailed one-sample t -tests on LI for each odour in each strain. p -values obtained were corrected according to the Benjamini–Hochberg procedure in each strain. As the number of mice was different according to the odour presented (see above criterion of inclusion), it was impossible to run a repeated-measures two-way ANOVA (with odour *stimuli* as the repeated factor, and strain as the independent factor) to compare the mean LI or absLI during testing sessions. Then, Welch two-sample t -tests were used to compare LI or absLI between the two strains for each tested odour. Confidence intervals and effect size (Cohen's d) for mean comparisons are available in Tables S4–S7.

Data analyses were conducted using R software (Free Software Foundation, Vienna, Austria; R Development Core team 2009). The statistically significant threshold was $\alpha < 0.05$.

3. Results

The mean number of sniffs during a session was significantly different between odours, but not between strains, and no interaction was observed (two-ways ANOVA: odours: $F = 40.36$, $p < 0.001$, ges = 0.40); strains: $F = 1.43$, $p = 0.24$, ges = 0.01; odours/strains: $F = 0.73$, $p = 0.57$, ges = 0.01; (Figure 3). Pairwise comparisons showed that the number of sniffs was lower during female and rat odour sessions compared to the other odour sessions (female or rat, compared to vanilla, water, or garlic: all pairwise comparisons: $p < 0.001$), but not different between female and rat odour sessions (female/rat: $p = 0.27$). The mean number of sniffs during water sessions was not different in comparison with vanilla odour sessions ($p = 0.68$) but was lower compared to garlic odour sessions ($p = 0.02$). The number of sniffs during vanilla and garlic odour sessions was not different ($p = 0.13$).

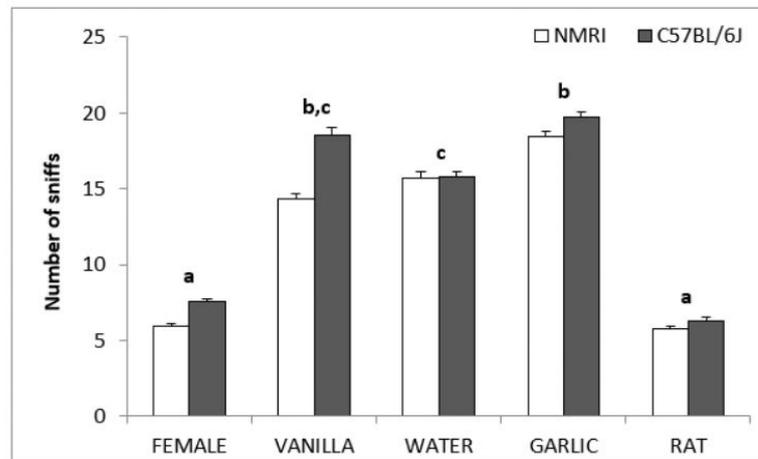


Figure 3. Number of sniffs (mean \pm s.e.m) directed to the tip of the pipette during a session. Different letters indicate statistical differences between odours (Benjamini–Hochberg pairwise comparisons).

We found no nostril-use preference at the group level at the beginning of a session, whatever the strain or the odour (binomial tests: NMRI: female and vanilla: $p = 0.50$; water, garlic, rat: $p = 0.26$; C57BL/6J: female: $p = 0.82$; vanilla: $p = 0.50$; water, garlic: $p = 1$; rat: $p = 0.26$; Figure 4). The first nostril used was not significantly different according to the odour whatever the strain considered (Cochran test: NMRI: $Q = 6.25$, $df = 4$, $p = 0.18$; CR7BL/6J: $Q = 3.82$, $df = 4$, $p = 0.43$).

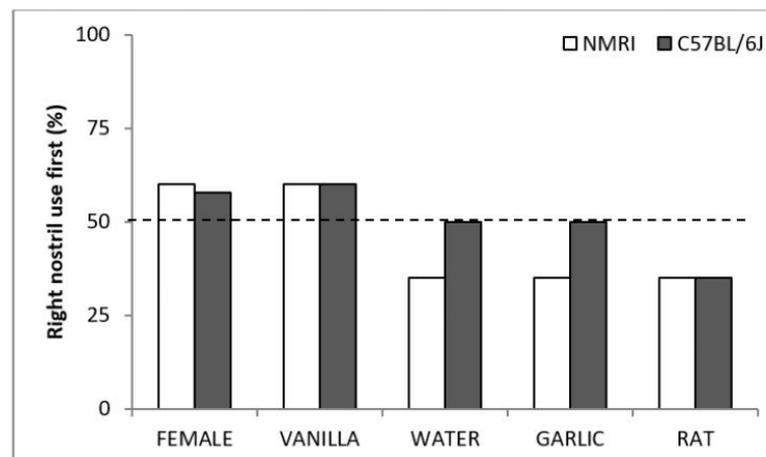


Figure 4. Percentage of mice using their right nostril to first smell the tip of the pipette filled with the odour stimulus at the beginning of a testing session. The dotted line indicates the theoretical expected distribution (50%).

During a testing session, the number of times mice used their right and left nostril choices were not significantly different from random when tested with distilled water (one-sample t -tests, Benjamini–Hochberg correction: NMRI: $t = -0.23$, $df = 17$, $p = 0.82$; C57BL/6J: $t = -0.68$, $df = 19$, $p = 0.51$; Figure 5) or garlic odour (NMRI: $t = -1.8$, $df = 19$, $p = 0.15$; C57BL/6J: $t = -1.13$, $df = 19$, $p = 0.34$). However, mice were more likely to use their right nostril when tested with female mice odour (NMRI:

$t = 3.45$, $df = 8$, $p = 0.04$; C57BL/6J: $t = 3.68$, $df = 15$, $p = 0.01$). C57BL/6J mice were more likely to use their left nostril when tested with rat odour, and NMRI mice also tended to preferentially use their left nostril (NMRI: $t = -2.54$, $df = 8$, $p = 0.07$; C57BL/6J: $t = -3.52$, $df = 10$, $p = 0.01$). Although NMRI mice displayed no nostril preference when exposed to vanilla odour, C57BL/6J mice tended to preferentially use their right nostril (NMRI: $t = 0.92$, $df = 17$, $p = 0.46$; C57BL/6J: $t = 2.10$, $df = 19$, $p = 0.08$). Whatever the odour considered, no difference between the two strains was observed (Welch two-sample t -tests: female: $t = 0.59$, $df = 22.54$, $p = 0.56$; vanilla: $t = 0.95$, $df = 35.90$, $p = 0.35$; water: $t = -0.30$, $df = 35.61$, $p = 0.77$; garlic: $t = 0.26$, $df = 36.41$, $p = 0.80$; rat: $t = -0.76$, $df = 17.89$, $p = 0.46$). Concerning absLI, whatever the odour considered, no difference in laterality strength was observed between the two strains (Welch two-sample t -tests: female: $t = 0.93$, $df = 22.71$, $p = 0.36$; vanilla: $t = 1.34$, $df = 35.89$, $p = 0.19$; water: $t = 0.75$, $df = 30.20$, $p = 0.46$; garlic: $t = 1.22$, $df = 37.99$, $p = 0.23$; rat: $t = 0.99$, $df = 17.70$, $p = 0.33$).

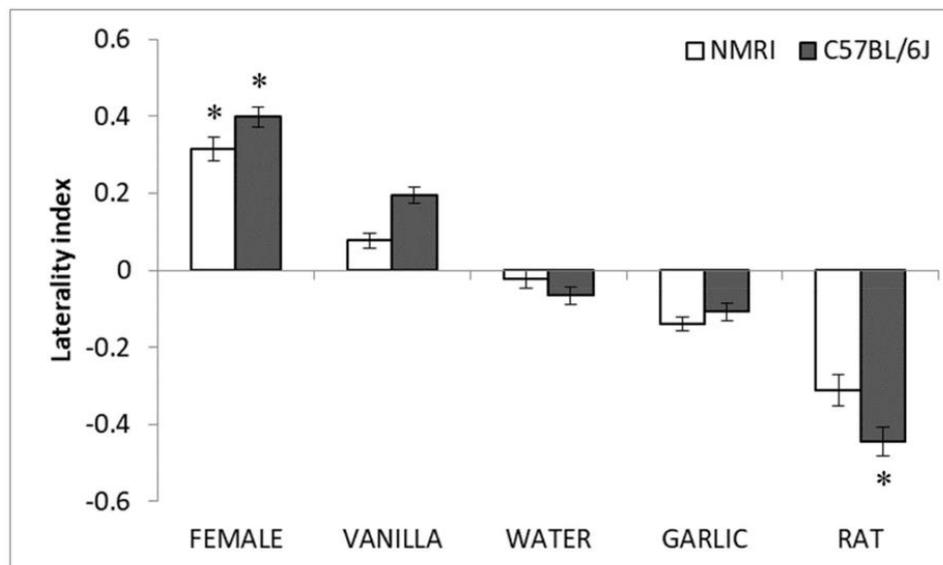


Figure 5. Laterality indexes (mean \pm s.e.m) obtained for each odour in the two mice strains tested. One-sample t -tests: *: $p < 0.05$.

4. Discussion

In this study, we showed for the first time that mice display preferential nostril use according to the odour presented. During sniffing of female urine, mice preferentially used their right nostril. On the contrary, during sniffing of rat odour, mice preferentially used their left nostril. Finally, when tested with a neutral solution (i.e., distilled water) or garlic odour, no nostril-use preference was observed.

Here, mice have not shown any initial preference to use their right or left nostril independently of the valence of the odour presented, as it has been shown in other species. Indeed, in both horses and dogs, during the initial presentation of an odour, individuals preferentially use their right nostril whatever its emotional valence [18,19]. It has been suggested that, in mammals, the right hemisphere attends to novel *stimuli*. In our study, odour spreading inside the apparatus might explain the absence of stimulus-independent nostril-use preference when first approaching the tip of the pipette. Indeed, when placed in the apparatus, both visual and olfactory explorations are undertaken by tested individuals, and they might have already identified the type of odour they are exposed to, before starting to come close to the tip of the pipette. This is consistent with the fact that, even if not

significantly different from random, the percentage of mice using their right nostril is above 50% for female urine and vanilla for which they display a right-nostril use preference when considering the whole session, and under 50% for rat odour for which they display a left-nostril use preference when considering the whole session. To test whether mice consistently use one of their nostrils to initially explore a new odour *stimulus*, further studies may require an air extractor below the tip of the pipette.

Given that olfactory information ascends mainly ipsilaterally from each nostril to the primary olfactory cortex in the same hemisphere in mammals [24], the pattern of nostril use observed suggests an involvement of the right hemisphere for processing female urine. Although female urine has been shown to activate predominantly the posterodorsal medial amygdala in male mice [25], we do not know whether this activation is higher on the right side. Here, the right-nostril use preference for processing female odour is consistent with literature commonly pointing to a right hemisphere bias for processing social *stimuli*. In horses, a right-nostril use preference was observed when they were exposed to stallion faeces [18], or oestrous mares [21]. This right hemisphere bias for processing social *stimuli* has also been shown in the visual modality in a large array of non-human mammals (*Odobenidae*, *Equidae*, *Cervidae*, *Bovidae*, *Macropodidae*) [26]. In most species studied (both aquatic and terrestrial mammals), infants preferentially position themselves to keep their mother in their left visual field (i.e., right hemisphere involvement), than in their right visual field.

The left-nostril preference, when exposed to rat odour, suggests an involvement of the left hemisphere for negative emotional processing. Indeed, exposing C57BL/6J mice to a rat elicits anxiety responses (e.g., greater immobility) and increased plasma corticosterone levels [27]. In literature, rats are both described as predators and competitors of mice, their density negatively affecting mice abundance [28]. Conversely, rat eradication can greatly increase mice population [29]. As right hemisphere dominance is commonly described in mammals for negative emotional processing [30], we might have expected mice to display a right nostril preference when exposed to rat odour. However, asymmetric processing of stressful *stimuli* seems to depend on numerous factors (e.g., brain structure considered, sex of tested individuals [31], nature of the stressor, length of stress exposure, delay post-stress) in rodents. If we consider the olfactory bulb which allows mice to display adaptive behaviours when exposed to innate aversive odours (e.g., predator, spoiled food [6]), its integrity on the left side is critical to behave adaptively in response to the odour of a stressed conspecific (rats [14]). The amygdala also seems responsible for some innate olfactory behavioural responses, as rats with lesioned amygdala show reduced freezing compared to sham-lesioned congeners when facing an immobile predator [32]. At a brain level, a right hemisphere potentiation (between the central amygdala and periaqueductal gray) was observed at 11 to 12 days post-stress, but not at 1st day post-stress [33–35]. In rats exposed to a restraint stress, changes in dopamine activation shift from a greater left-sided (at 15 min) toward a greater right-sided effect (from 30 min) in the medial prefrontal cortex [36]. Taken as a whole, it seems that the two hemispheres might contribute differentially to the behavioural response to stressors, and the right hemisphere might be particularly important in long term response to stressors. That might be consistent with the fact that the left hemisphere is primarily involved during the initial stages of different olfactory tasks in rats (Table 1).

In our study, the odours of vanilla and garlic, both potential food items, were initially chosen for their expected emotional valence: respectively, attractive and aversive odours. Indeed, it has been shown that mice are attracted to vanilla flavour [37] and that conversely, garlic odour has been described as aversive for mice [38]. Detecting pleasant and unpleasant odours is particularly adaptive as they are important signs of potential resources in mice [1]. Both odours were actively explored during the test sessions, much more than female and rat odours. However, only a statistical trend for right nostril-use preference was observed for vanilla in C57BL/6J mice. Surprisingly, we were expecting a left-nostril use preference when exposed to a pleasant odour to be consistent with the hypothesis of left hemisphere dominance to process positive emotions [39]. This result associated to the left-nostril preference when exposed to rat odour might indicate an asymmetric pattern of olfactory processing that might be different in mice than in other mammals studied: with positive (female urine, vanilla)

and negative (rat) odours preferentially processed by the right and the left hemisphere, respectively. As it is the first time nostril-use preference has been tested in rodents, further studies will be helpful to better determine whether this pattern is common in rodents, or specific to *Mus musculus*.

This study describes for the first time nostril-use preference in rodents, and more specifically in mice. The absence of strain effect (excepting for vanilla) suggests that this pattern might be commonly shared by different mice strains. Further studies will be useful now to determine whether the specific pattern of olfactory lateralisation observed, is specific to the sensory modality studied (i.e., olfaction) or more generally the reflect of emotional lateralisation in mice. Better understanding asymmetric processing of emotional *stimuli* in mice (commonly used to model human pathologies) might provide important insights into environmental conditions and developmental mechanisms that may alter behavioural and brain asymmetries as observed in different neuropsychiatric disorders in humans.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-8994/11/9/1129/s1>: Supplementary data (S1 S7).

Author Contributions: Conceptualisation, C.J.-A., V.B.; Data collection and analyses, S.P.; Original draft preparation, C.J.-A.; Review and editing, all three authors.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: We warmly thank all interns who have participated in behavioural analyses: Sophia Belmokadem, Iris Lemerrier, Andréa Lemoine, Julie Libercier, and Mélina Savary.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Knaden, M.; Hansson, B.S. Mapping odor valence in the brain of flies and mice. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2014**, *24*, 34–38. [[CrossRef](#)]
2. De Castro, F. Wiring olfaction: The cellular and molecular mechanisms that guide the development of synaptic connections from the nose to the cortex. *Front. Neurosci.* **2009**, *3*, 4. [[CrossRef](#)]
3. Price, J.L. The central olfactory and accessory olfactory system. In *Neurobiology of Taste and Smell*; Finger, T.E., Silver, W.L., Eds.; Wiley: New York, NY, USA, 1987; pp. 179–203.
4. Schwob, J.E.; Price, J.L. The development of axonal connections in the central olfactory system of rats. *J. Comp. Neurol.* **1984**, *223*, 177–202. [[CrossRef](#)]
5. Haberly, L.B.; Price, J.L. Association and commissural fiber systems of the olfactory cortex of the rat. I. Systems originating in the piriform cortex and adjacent areas. *J. Comp. Neurol.* **1978**, *178*, 711–740. [[CrossRef](#)]
6. Kobayakawa, K.; Kobayakawa, R.; Matsumoto, H.; Oka, Y.; Imai, T.; Ikawa, M.; Okabe, M.; Ikeda, T.; Itoharu, S.; Kikusui, T.; et al. Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb. *Nature* **2007**, *450*, 503. [[CrossRef](#)]
7. Gadziola, M.A.; Tylicki, K.A.; Christian, D.L.; Wesson, D.W. The olfactory tubercle encodes odor valence in behaving mice. *J. Neurosci.* **2015**, *35*, 4515–4527. [[CrossRef](#)]
8. Rampin, O.; Bellier, C.; Maurin, Y. Electrophysiological responses of rat olfactory tubercle neurons to biologically relevant odours. *Eur. J. Neurosci.* **2012**, *35*, 97–105. [[CrossRef](#)]
9. Parthasarathy, K.; Bhalla, U.S. Laterality and symmetry in rat olfactory behavior and in physiology of olfactory input. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 5750–5760. [[CrossRef](#)]
10. Wilson, D.A. Binocular interactions in the rat piriform cortex. *J. Neurophysiol.* **1997**, *78*, 160–169. [[CrossRef](#)]
11. Kucharski, D.; Hall, W.G. New routes to early memories. *Science* **1987**, *238*, 786–788. [[CrossRef](#)]
12. Kucharski, D.; Arnold, H.M.; Hall, W.G. Unilateral conditioning of an odor aversion in 6-day-old rat pups. *Behav. Neurosci.* **1995**, *109*, 563. [[CrossRef](#)]
13. Litaudon, P.; Bouillot, C.; Zimmer, L.; Costes, N.; Ravel, N. Activity in the rat olfactory cortex is correlated with behavioral response to odor: A microPET study. *Brain Struct. Funct.* **2017**, *222*, 577–586. [[CrossRef](#)]
14. Dantzer, R.; Tazi, A.; Bluthé, R.M. Cerebral lateralization of olfactory-mediated affective processes in rats. *Behav. Brain Res.* **1990**, *40*, 53–60. [[CrossRef](#)]

15. Olds, J.L.; Bhalla, U.S.; McPhie, D.L.; Lester, D.S.; Bower, J.M.; Alkon, D.L. Lateralization of membrane-associated protein kinase C in rat piriform cortex: Specific to operant training cues in the olfactory modality. *Behav. Brain. Res.* **1994**, *61*, 37–46. [\[CrossRef\]](#)
16. Cohen, Y.; Putrino, D.; Wilson, D.A. Dynamic cortical lateralization during olfactory discrimination learning. *J. Physiol.* **2015**, *593*, 1701–1714. [\[CrossRef\]](#)
17. Cohen, Y.; Wilson, D.A. Task-correlated cortical asymmetry and intra-and inter-hemispheric separation. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 14602. [\[CrossRef\]](#)
18. Mc Greevy, P.D.; Rogers, L.J. Motor and sensory laterality in thoroughbred horses. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2005**, *92*, 337–352. [\[CrossRef\]](#)
19. Siniscalchi, M.; Sasso, R.; Pepe, A.M.; Dimatteo, S.; Vallortigara, G.; Quaranta, A. Sniffing with the right nostril: Lateralization of response to odour stimuli by dogs. *Anim. Behav.* **2011**, *82*, 399–404. [\[CrossRef\]](#)
20. De Boyer des Roches, A.; Richard-Yris, M.A.; Henry, S.; Ezzaoui, M.; Hausberger, M. Laterality and emotions: Visual laterality in the domestic horse (*Equus caballus*) differs with objects' emotional value. *Physiol. Behav.* **2008**, *94*, 487–490. [\[CrossRef\]](#)
21. Siniscalchi, M.; Padalino, B.; Aubé, L.; Quaranta, A. Right-nostril use during sniffing at arousing stimuli produces higher cardiac activity in jumper horses. *Laterality* **2015**, *20*, 483–500. [\[CrossRef\]](#)
22. Siniscalchi, M.; d'Ingeo, S.; Quaranta, A. The dog nose "KNOWS" fear: Asymmetric nostril use during sniffing at canine and human emotional stimuli. *Behav. Brain. Res.* **2016**, *304*, 34–41. [\[CrossRef\]](#)
23. Rogers, L.J.; Vallortigara, G.; Andrew, R.J. *Divided Brains: The Biology and Behaviour of Brain Asymmetries*; Cambridge University Press: New York, NY, USA, 2013.
24. Royet, J.P.; Plailly, J. Lateralization of olfactory processes. *Chem. Senses* **2004**, *29*, 731–745. [\[CrossRef\]](#)
25. Kikusui, T.; Kajita, M.; Otsuka, N.; Hattori, T.; Kumazawa, K.; Watarai, A.; Nagasawa, M.; Inutsuka, A.; Yamanaka, A.; Matsuo, N. Sex differences in olfactory-induced neural activation of the amygdala. *Behav. Brain Res.* **2018**, *346*, 96–104. [\[CrossRef\]](#)
26. Karenina, K.; Giljov, A.; Ingram, J.; Rowntree, V.J.; Malashichev, Y. Lateralization of mother–infant interactions in a diverse range of mammal species. *Nat. Ecol. Evol.* **2017**, *1*, 0030. [\[CrossRef\]](#)
27. Anisman, H.; Hayley, S.; Kelly, O.; Borowski, T.; Merali, Z. Psychogenic, neurogenic, and systemic stressor effects on plasma corticosterone and behavior: Mouse strain-dependent outcomes. *Behav. Neurosci.* **2001**, *115*, 443–54. [\[CrossRef\]](#)
28. Choquenot, D.; Ruscoe, W.A. Mouse population eruptions in New Zealand forests: The role of population density and seedfall. *J. Anim. Ecol.* **2000**, *69*, 1058–1070. [\[CrossRef\]](#)
29. Caut, S.; Casanovas, J.G.; Virgos, E.; Lozano, J.; Witmer, G.W.; Courchamp, F. Rats dying for mice: Modelling the competitor release effect. *Austr. Ecol.* **2007**, *32*, 858–868. [\[CrossRef\]](#)
30. Leliveld, L.M.; Langbein, J.; Puppe, B. The emergence of emotional lateralization: Evidence in non-human vertebrates and implications for farm animals. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2013**, *145*, 1–14. [\[CrossRef\]](#)
31. Sullivan, R.M.; Dufresne, M.M.; Waldron, J. Lateralized sex differences in stress-induced dopamine release in the rat. *NeuroReport* **2009**, *20*, 229–232. [\[CrossRef\]](#)
32. Blanchard, D.C.; Blanchard, R.J. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **1972**, *81*, 281–290. [\[CrossRef\]](#)
33. Adamec, R.E.; Blundell, J.; Collins, A. Neural plasticity and stress induced changes in defense in the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2001**, *25*, 721–744. [\[CrossRef\]](#)
34. Adamec, R.E.; Blundell, J.; Burton, P. Phosphorylated cyclic AMP response element binding protein expression induced in the periaqueductal gray by predator stress: Its relationship to the stress experience, behavior and limbic neural plasticity. *Prog Neuro Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2003**, *27*, 1243–1267. [\[CrossRef\]](#)
35. Adamec, R.; Blundell, J.; Burton, P. Role of NMDA receptors in the lateralized potentiation of amygdala afferent and efferent neural transmission produced by predator stress. *Physiol. Behav.* **2005**, *86*, 75–91. [\[CrossRef\]](#)
36. Carlson, J.N.; Fitzgerald, L.W.; Keller, R.W., Jr.; Glick, S.D. Side and region dependent changes in dopamine activation with various durations of restraint stress. *Brain Res.* **1991**, *550*, 313–318. [\[CrossRef\]](#)
37. Ohl, F.; Roedel, A.; Binder, E.; Holsboer, F. Impact of high and low anxiety on cognitive performance in a modified hole board test in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Eur. J. Neurosci.* **2003**, *17*, 128–136. [\[CrossRef\]](#)

3. Résultats

38. Young, J.W.; Kerr, L.E.; Kelly, J.S.; Marston, H.M.; Spratt, C.; Finlayson, K.; Sharkey, J. The odour span task: A novel paradigm for assessing working memory in mice. *Neuropharmacology* **2007**, *52*, 634–645. [[CrossRef](#)]
39. Davidson, R.J. Emotion and affective style: Hemispheric substrates. *Psychol. Sci.* **1992**, *3*, 39–43. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

3.2.3.1 Résumé de l'article 3

Il existe de nombreux tests comportementaux pour évaluer les latéralités motrice (ex : test du coin) et sensorielle (ex : tests de préférence visuelle). Ces derniers portent souvent sur une modalité visuelle ou tactile. Cependant, un grand nombre de mammifères, dont les rongeurs, présentent des performances olfactives bien plus développées que celles des humains. Ainsi, l'utilisation d'autres modalités sensorielles, telles que la vision chez ces espèces peut être inadaptée puisqu'elle peut être altérée chez certaines souches de souris.

L'utilisation de l'olfaction présente donc des avantages pour mesurer la latéralité olfactive des rongeurs, mais aucun test comportemental n'était jusque-là décrit pour évaluer la latéralité *via* l'olfaction. En s'inspirant d'un protocole développé sur des chiens, nous avons mis au point un nouveau test de latéralité olfactive chez des souris C57BL/6 et NMRI.

Nous avons observé une préférence des souris pour l'utilisation de leur narine droite pour explorer les odeurs à valence positive, à l'inverse on observe une préférence pour l'utilisation de la narine gauche pour explorer les odeurs à valence négative. Ces résultats confèrent à ce test des perspectives d'application intéressantes à des modèles de pathologies, en particulier la schizophrénie, dans laquelle on observe une modification de la latéralité cérébrale.

L'article 4 suivant consiste en la caractérisation de la latéralité olfactive des souris 3-hit dans le test décrit précédemment.

3. Résultats

3.2.4 Article 4 : Assessing olfactory laterality in mice: new tool in preclinical psychiatric study

Solenn Percelay^a, Michel Boulouard^a, Christelle Jozet-Alves^b, Valentine Bouet^a

^a Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, COMETE, CYCERON, CHU Caen, 14000, Caen, France

^b UMR EthoS 6552, Normandie Univ, UNICAEN, University of Rennes, CNRS, 14000 Caen, France

Nature Protocols [en cours de préparation]

Assessing olfactory laterality in mice: new tool in preclinical psychiatric study.

Solenn Percelay^{a,*}, Michel Boulouard^a, Christelle Jozet-Alves^{b,‡}, Valentine Bouet^{a,‡}

^a Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, COMETE, CYCERON, CHU Caen, 14000, Caen, France

^b UMR EthoS 6552, Normandie Univ, UNICAEN, University of Rennes, CNRS, 14000 Caen, France

* Correspondence: solenn.percelay@unicaen.fr; Tel.: 0231566872 Université de Caen Normandie - UFR Santé - Campus 5
Boulevard Henri Becquerel – Bâtiment GMPc – Unité COMETE U1075 14032 Caen cedex 5

[‡] Last authors contributed equally

Abstract: Laterality is mostly tested in rodents through motor function (preferred paw), but scarcely through sensory modality. We describe here a protocol to assess olfactory laterality in mice on the basis of a preferred use of right versus left nostril for odor stimuli that differed in terms of emotional valence. The apparatus is composed of two vertical boards, attached on one side with an angle of 30°, spaced to introduce a micropipette containing an odor stimulus (mice soiled litter, vanilla, garlic, rat soiled litter, cat soiled litter, or distilled water). The mouse is placed, freely-moving, for 10-min and videotaped from above to allow a posteriori analysis of left/right nostril uses. The odors are randomly assessed for each mouse (1 odor per day), allowing to test 20 mice within one week. As an example application, we show deficits of olfactory laterality in a new mouse model of schizophrenia pointing brain asymmetries.

1. Introduction

Laterality has been investigated in several animal species¹⁻⁴ for diverse reasons, from evolutionary purpose (adaptive processes) to biomedical research, given that laterality reflects brain asymmetries, and can consequently reveal brain dysfunction. Asymmetries in brain function have been assessed in healthy animal, after brain lesion (trauma, stroke, etc.) or even in models of psychiatric diseases (psychosis)^{5,6}. Investigating brain asymmetries in mice is gaining importance because they represent more than 60% of species used in research and because the mouse is the most-used species for genetic engineering. How assessing brain laterality in mice through behavioral tests has been described in several tasks. However, most of these tasks consists in observing the preferred paw to perform a particular movement (collecting a reward with the paw for instance⁷), or observing a postural or rotational asymmetry⁸. Several sensory modalities have been investigated in mice, and in particular, tactile sensitivity (adhesive removal⁹), vision (touch screen¹⁰), and audition (ultrasonic communication calls¹¹). Olfactory laterality has been essentially studied in chicks, horses and dogs¹⁻³. Strikingly, even is olfaction is the most predominant sensory modality in rodents^{12,13}, a method to assess olfaction laterality in rodent is not yet described, and would benefit to many fields of research (biomedical research, evolutionary sciences, ethology, etc.).

The present protocol was designed to measure a nostril-use preference in processing olfactory stimuli differing in terms of emotional valence. We used two strains of mice (C57BL/6 and NMRI12), and a new 3-hit mouse model of schizophrenia. The test of olfactory laterality presented here has been described in horses and dogs^{3,14}. The protocol is adaptable to all other strains of mice by adjusting the position of the pipette containing odors, and to rats by increasing the apparatus size and the height of the pipette.

Animals need to be habituated to the apparatus and procedure before the testing takes place. Thereafter, mice are placed individually in the corner test for 10-min free exploration of the environment and the odorant pipette. To closely explore the stimulus, the mouse must rear, and points its nose to the pipette. The behavior is videotaped from above with a great quality for collection of the nostril use. Several odors can be tested, with one odor per session and one session per day. A control odor, which correspond to solvent use for preparation of odor stimuli, must be use. When pathological models are tested, the same control group than other behavioral procedures is needed. It is preferable

3. Résultats

that the same experimenter, holder of a certificate for animal experimentations, conducts the entire experiment to limit diversity of olfactory bias and increase variability in animal handling. This protocol needs highly standardized environmental conditions, with limited odors and sounds. Video camera setting and light must be finely adjusted and maintained throughout the sessions. A minimum of 64 lux is necessary to obtain good quality video images.

2. Applications

Studying olfactory laterality in rodents would benefit to many fields of research. Indeed, several dimensions are concern: sensory (olfactory functions), brain asymmetries (psychiatry, stroke, trauma), emotion (odor valency, hedonism), genetic (laterality involvement), stress (may adjust laterality strength), cognition (learning, memorization). These numerous applications vary from fundamental to applicable researches with biomedical use.

In psychotic patients, abnormal brain lateralization has been described^{15,16}. The classical measure of brain lateralization, which is indirectly obtained by the study of handedness, showed a less lateralized pattern and/or larger proportion of left-handed persons in schizophrenia patients than in global population^{17,18}. Some other tests bring information about lateralization in schizophrenia, as the Grooved Pegboard Test (a manipulative dexterity test¹⁹), visual attention test²⁰, cued movement task²¹, or the mental number line test²². These behavioral observations are windows on brain asymmetry. In preclinical context, a left-preference motor bias have been demonstrate in rats submitted to early life stress, a model of psychosis²⁴.

Animal models of schizophrenia represent an essential key to go deeper in mechanisms of such a complex and misunderstood pathology. It is important to improve behavioral testing to address complex cognitive functions, and adapt it to the species used. Rodents, and particularly mice, are more and more often chosen to model schizophrenia for experimental research, particularly because genetic manipulations are highly useful²³. In rodents, olfaction is one of the most important sensory input to distinguish congeners, predators, food, to locate in space, and more widely to control behavior¹³. Consequently, assessing olfactory laterality in mice could bring a very innovative tool to characterize several dimensions of behaviors related to lateralization. And, for instance, highlight schizophrenia-related deficits of brain asymmetry as can be expected in animal models of psychosis.

3. Materials

Experiments were performed in accordance with French and European Economic Community guidelines for the care and use of laboratory animals (2010/63/UE) and authorized under the N°APAFIS#8203-2016120817103795v4.

3.1. Reagents

Two-month-old male Naval Medical Research Institute mice (NMRI; N=20) and on two-month-old male C57BL/6J mice (N=20), were purchased from Janvier Laboratories (Le Genest-Saint-Isle, France). Three to five-month-old C57BL/6 mice (N=20) were purchased from CURB (Centre Universitaire de Ressources Biologiques, Caen, France). Animals were housed in standard cages with free access to food and water, maintained on a reversed light-dark cycle (12-12h, light on at 7 p.m.), with constant temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) and humidity ($55 \pm 10\%$).

Six odor stimuli were prepared, filtered (with exception for vanilla odor), aliquoted in Eppendorf tubes (0.5mL), and stored at -20°C until use. Vanilla odor was prepared by mixing five drops of concentrated vanilla favoring (Déco'Relief®, France) in 20mL of distilled water. Garlic odor was prepared by mixing 2.4g of mashed garlic in 60mL of distilled water (room temperature) for 10min. Mice soiled litter odor was prepared by mixing 35g of soiled bedding with 300mL of distilled water for 30min. Male and female soiled bedding was used separately to present a mice soiled litter odor of the other gender than the tested mouse. Rat soiled litter odor was prepared by mixing 45g of rat-soiled bedding with 300mL of distilled water for 30min. Cat soiled litter odor was prepared by mixing 45g of cat-soiled bedding with 300mL of distilled water for 30min. Control odor was distilled water. Odor stimuli must be used at room temperature, accordingly, aliquoted must be unfrozen about one hour before experiments. In standard animal facilities conditions, mice are naive to odors (excepted for mice urine if males and females are maintained in the same room).

3. Résultats

CRITICAL Mice and rat bedding (aspen wood) was changed twice a week, then, soiled bedding corresponded to 3 days use in standard cages, with 3 to 5 animal per cage (for mice), with 1 to 2 animal per cage (for rats) and with a only cat per litter. The collection is carried out where there is the most fecal boli.

Clean litters must be tested to avoid the litter odor effect. No differences between water odor and litters odors (aspen wood and cat litter), have been shown in our experiments whatever the parameter considered.

3.2. Equipment

- Corner-shaped apparatus²⁵: two vertical boards (30×20×1cm) attached on one side (angle of 30°) with a small opening (width 0.3cm), and a third board used to close the apparatus on the other side and reduce the length of the apparatus to 20cm.

- A 10µL-pipette with corresponding tips (minimum length 1.7cm).

- A high-definition video camera (1080p) with high-frequency frame rate (100 images/sec), placed above the corner of the apparatus (focus must be made on the pipette tips ending).

- A shelf to maintain the micropipette. Tip height is determined by the height of mouse's snout in a rearing position allowing to reach the tip (height of 8.6cm for C57BL/6 mice, and of 10.5cm for NMRI mice). **CRITICAL** We used a tower of Lego® bricks, which allows adapting the height to any another mice strain/size.

- A classic tally counter for video analysis.

3.3. Reagents setup

3.3.1. 3-hit schizophrenia model

Based on theoretical etiology of schizophrenia which considered complex interactions between genetic predisposition, early and late environmental factor^{26,27}, the 3-hit mice model consists on a triple factor association, as described in²⁸. In this model the genetic factor is a partial deletion of the MAP6 gene, combined with an early maternal separation and a chronic THC administration during adolescence.

The 3-hit mice were heterozygous MAP6+/- mice generated from MAP6-/- C57BL/6/129SvPas F1 animals²⁹, mated with C57BL/6 females. At 9 day of age, litters were separated from their dam and placed in a nearby cage during 24h³⁰. From P32 to P52, mice received daily intraperitoneal injection or tetrahydrocannabinol³¹ (THC 8 mg/kg from Sigma Aldrich®, and 3.5% Tween 80 in saline solution). A 1-week washout was respected after later environmental factor to avoid acute effect of THC exposure.

3.3.1. Experimental control

Control mice were wild type littermates (MAP6+/+). Maternal separation was performed in the same way than 3-hit mice but elapsed only 20s, and control condition of THC exposure consisted in daily intraperitoneal injection of vehicle (3.5% Tween 80 in saline solution). At weaning, end tail collection was performed in all mice under anesthesia (isoflurane 5%), for genotyping³².

CAUTIUS To limit diversity of olfactory bias, using of strong smell beauty products is prohibited and experimenter must habituate mice to his own body odor.

3.3. Equipment setup

Corner test apparatus must be placed in the center of the experimental room, and care has to be taken to avoid any eventual lateralization bias (door and light position, possible objects placed on a side and not the other, such as posters walls, computer, garbage, etc.). The room has to be uniformly lightened (in our conditions, room luminosity was of 64 lux). The shelf that maintains the micropipette must be attached to the ground, and the pipette has to be placed on a very precise position for each trial (adjusting height and length of the tip, Figure 1). Parameters setting of the camera have to be adjusted and stabilized to obtain locked focus, contrast and brightness and a perfect image of the tip of the micropipette. **CRITICAL** To maintained a good positioning of the objects along the sessions, the positioning of each elements can be tagged on the floor (chalk or adhesive tape).

3. Résultats

Before each trial, the complete apparatus (corner test apparatus, shelf for the micropipette, and micropipette) has to be cleaned with 70% ethanol. Each tip is thrown away after use. Reuse a tip is not recommended because mice touch the tip with their snout or paws and can let an odor, that could induce a bias. Moreover, a new tip containing fresh odor solution is necessary for each trial to be sure of the same stimulus strength for all mice. **CRITICAL** Do not use too much alcohol solution for cleaning to avoid prominent odor; apparatus must be dry when a mouse is tested.

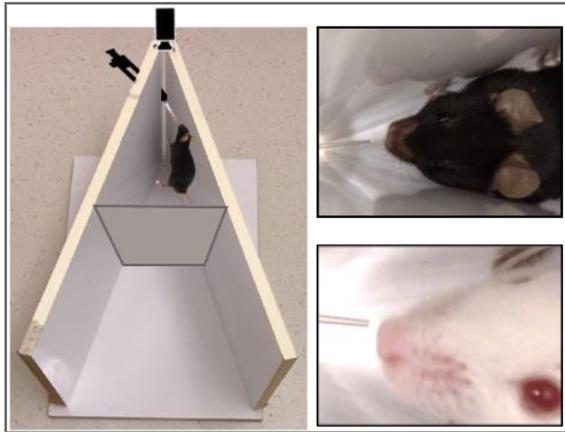


Figure 1. Left. Corner -shaped apparatus with camera and pipette representation, the mouse rears to smell the tip. Right. Vue of the camera allowing to determine which nostril is used, example from a C57BL/6 mouse which use the left nostril at top and from a NMRI mouse using the right nostril at down.

4. Procedure

Acclimating mice to the testing box TIMING 1min

1- The animal cage has to be transferred from the animal facility to the testing room at least 30min before starting the experiment to allow habituation to the new environment.

Troubleshooting

Be careful to avoid any olfactory bias in the testing room, and for instance, the place where the cages are positioned. If cages are placed on the right or the left of the apparatus, the tested mouse could be disturbed by the congener's odor.

Install the stimulus TIMING 1min

2- Take 10 μ L of odor stimulus with the micropipette and place it on the shelf obtain appropriate height and length of the tip filled with odor.

Testing phase TIMING 10min

3- Place the mouse to be tested in the apparatus, farthest from the tip, for free exploration of the environment and the odor for 10min.

Troubleshooting

If the mouse jump on the walls and go out the apparatus, use higher walls and adjust camera setting. Such a behavior has not been observed in NMRI and C57BL/6 in our experiments, but could probably occur with other strain or in particular experimental conditions (stress, use of pharmacological compounds, etc.).

Removing phase TIMING 1min

4- Take gently the mouse and put in the home cage.

Manual video analysis TIMING 5min

5- Take a tally counter in each hand and watch the video (an adapted software with possibility of speed modification is recommended: BORIS, NOLDUS© Ethovision, VLC). When the mouse smells the tip (nostril less than 1mm) with the right nostril, click with the right hand, and do the same with the left hand when the mouse uses the left nostril.

Troubleshooting

3. Résultats

To avoid any left-right confusion during video analysis make sure that the right nostril contacts with the tip are counted by the right hand and vice versa. Otherwise, reverse the videotape, or do not forget to inverse results if camera positioning induces a reversed effect between the right of the video and the right of the mouse.

5. Data collection

For each animal and trial, two parameters can be collected: first nostril use (for each session), and number of right and left nostril use. With the first nostril use, a percentage of right nostril use first can be determined for each experimental group and odor stimulus. Binomial tests could be done to determine whether a nostril was used more frequently for the first sniff for each odor, and each experimental group. Cochran tests could be run in each experimental group to determine whether the proportion of mice using their right or left nostril first is different according to the odor tested. With the second parameter, the total number of sniffs is determined for each experimental group and odor stimulus. If an animal sniffed the tip of the pipette less than 6 times during a session, it has to be excluded. This criterion has been defined as the lowest value for which it is possible to obtain a significant result using a binomial test¹². With the total number of sniffs for each individual and each odor stimulus, a repeated-measures two-way ANOVA (with odor stimuli as a repeated factor, and strain as an independent factor) could be conducted to compare the mean number of sniffs during testing sessions, by calculating as well the effect size (ges: generalized Eta-squared measure of effect size). Benjamini–Hochberg post-hoc tests could be used to make subsequent pairwise comparisons.

A laterality index (LI) is calculated for each test session for each mouse, according to the formula: $LI = (R - L) / (R + L)$ ¹². Absolute values of laterality indexes (absLI) is considered in the same way. LI and absLI are continuous variable ranging from -1 to 1 and 0 to 1, and reflect direction and strength of laterality, respectively. Significant departures from chance level (0) could be tested by running two-tailed one-sample t-tests on LI for each odor in each group. P-values obtained should be corrected according to the Benjamini–Hochberg procedure in each group. The statistically significant threshold is $\alpha < 0.05$.

6. Anticipated results

About the study of Jozet-Alves et al¹² comparing two strains, no preferences have been shown for the first nostril use (Figure 2 A, left and tables). Whereas the total number of sniffs differ between odors but not strains, with more sniffs when mice explore vanilla, water and garlic odors in comparison with mice and rat odors (Figure 2 A, right). No strains difference appears concerning LI and AbsLI whatever the odor tested (Figure 3 A, histograms and LI / AbsLI comparison to chance level tables). The two strains use preferentially the right nostril to smell mice odor and the left nostril to smell rat odor, only C57BL/6J mice use preferentially the right nostril to smell vanilla odor (Figure 3 A, left and “LI comparisons to chance level” tables). AbsLI do not differ between odors or strains (Figure 3 A, right and “AbsLI comparisons to chance level” table).

In the present study, in contrast with the study of Jozet-Alves et al¹², one preference to use the right nostril for the first sniff have been shown in control group (Figure 2 B, left and tables). No other significant difference appears concerning the first nostril use. Results about total number of sniffs are also deviating from¹² without statistical differences between odors. No statistical differences between groups have been demonstrated for this parameter (Figure 2 B, right). LI indexes show a preference to use the left nostril for 3-hit mice, but no more significant nostril preferences. A difference between groups for cat odor have been demonstrated with a higher preference to use the left nostril for 3-hit group (Figure 3 A, left and “LI comparisons to chance level” tables). Concerning AbsLI, according to¹², no difference with the reference value or between groups was shown (see Figure 3 B, right and “AbsLI comparisons to chance level” table).

These two experiments demonstrated no difference between two strains of mice commonly use in laboratory, and an increase of left nostril preference in a multifactorial murine schizophrenia model.

Some differences between the study of Jozet-Alves et al¹² and control group of the present study appears, particularly with the total number of sniffs. Several explanations could be highlight, with in first the use of two gender only in the second study, and in second the strain of control mice with is a

3. Résultats

cross between C57BL/6 mice and C57BL/6/129SvPas. Experimenters was also different; this environmental bias could become important in behavioral tests using olfactory modality.

These results on 3-hit mice model of schizophrenia showed that this innovating method to assess olfactory laterality is efficient to highlight valence-dependent laterality disturbances. Behavioral laterality reflect cerebral lateralization, and olfaction is the predominant sensory modality used by rodents¹³. Then, the present method to assess olfactory laterality is a new tool to improve knowledge on laterality dysfunctions that have to be evidenced in animal models of schizophrenia, as observed in human^{15,16,33}.

This test has the advantage to address another interesting aspect a behavior that is largely investigated in brain research, i.e. hedonia. Anhedonia is a common symptom in depression, anxiety, traumatic stress, schizophrenia³⁴⁻³⁶, a negative-like symptom currently looked for in animal models of schizophrenia^{35,37}, and can be measured in animal models by the sucrose preference test^{37,38}. However, this protocol uses only palatable drinking stimulus that does not cover the large number of modalities concerned by anhedonia in schizophrenia. In the present protocol, positive value stimuli can also be interpreted a sign of anhedonia, giving the possibility to highlight a lack of interest for positive stimuli. This could be performed by using social and food odors, that bring another element of conventional anhedonia measurement.

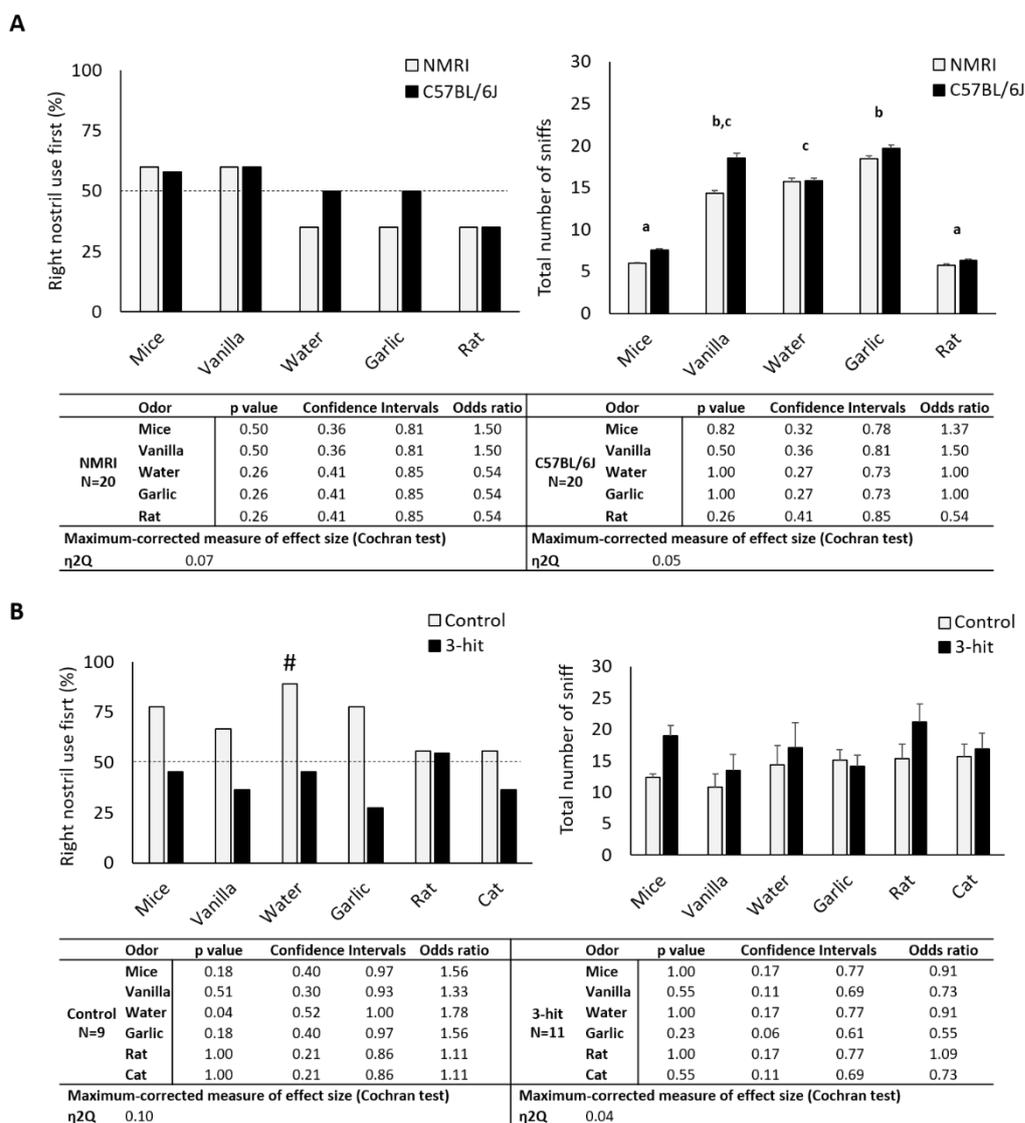


Figure 2. Left: Percentage of mice using their right nostril to first smell the tip of the pipette filled with the odor stimulus at the beginning of a testing session. The dotted line indicates the theoretical expected distribution (50%). Cochran tests do not show significant differences according to the odor, whatever the group (A. NMRI: Q=6.25,

3. Resultats

df=4, $p=0.18$; C57BL/6J: $Q=3.82$, df=4, $p=0.43$)¹² B. control group: $Q=4.4$; df=5, $p=0.49$; 3-hit group: $Q=1.99$, df=5, $p=0.85$). Binomial tests do not show nostril-use preference at the group level at the beginning of a session concerning the study of Jozet-Alves et al. (A) whereas control mice show a right first nostril preference for water odor in the present study, binomial tests *: $p<0.05$ (B). Right: Number of sniffs (mean \pm s.e.m) directed to the tip of the pipette during a session (with exclusion criteria of 6 sniff minimum per session). Two-ways ANOVAs follow by Benjamini-Hochberg pairwise comparisons show statistical difference between odors in the study of Jozet-Alves et al.¹² (A, odors: $F=40.36$, $p<0.001$, $ges=0.40$; strains: $F=1.43$, $p=0.24$, $ges=0.01$; odors/strains: $F=0.73$, $p=0.57$, $ges=0.01$), whereas no statistical differences were shown in the present study (B, odors: $F=1.65$, $p=0.16$, $ges=0.10$; groups: $F=2.71$, $p=0.13$, $ges=0.07$; odors/groups: $F=0.80$, $p=0.56$, $ges=0.05$).

Tables: Right nostril use first: proportion of mice compared to random nostril use of 50% (binomials tests: p values, confidence intervals and odds ratio); effect size of comparisons of first nostril used for each odor (Cochran test: maximum-corrected measure of effect size: η^2Q). A, Study of Jozet-Alves et al.¹²; B, the present study.

3. Resultats

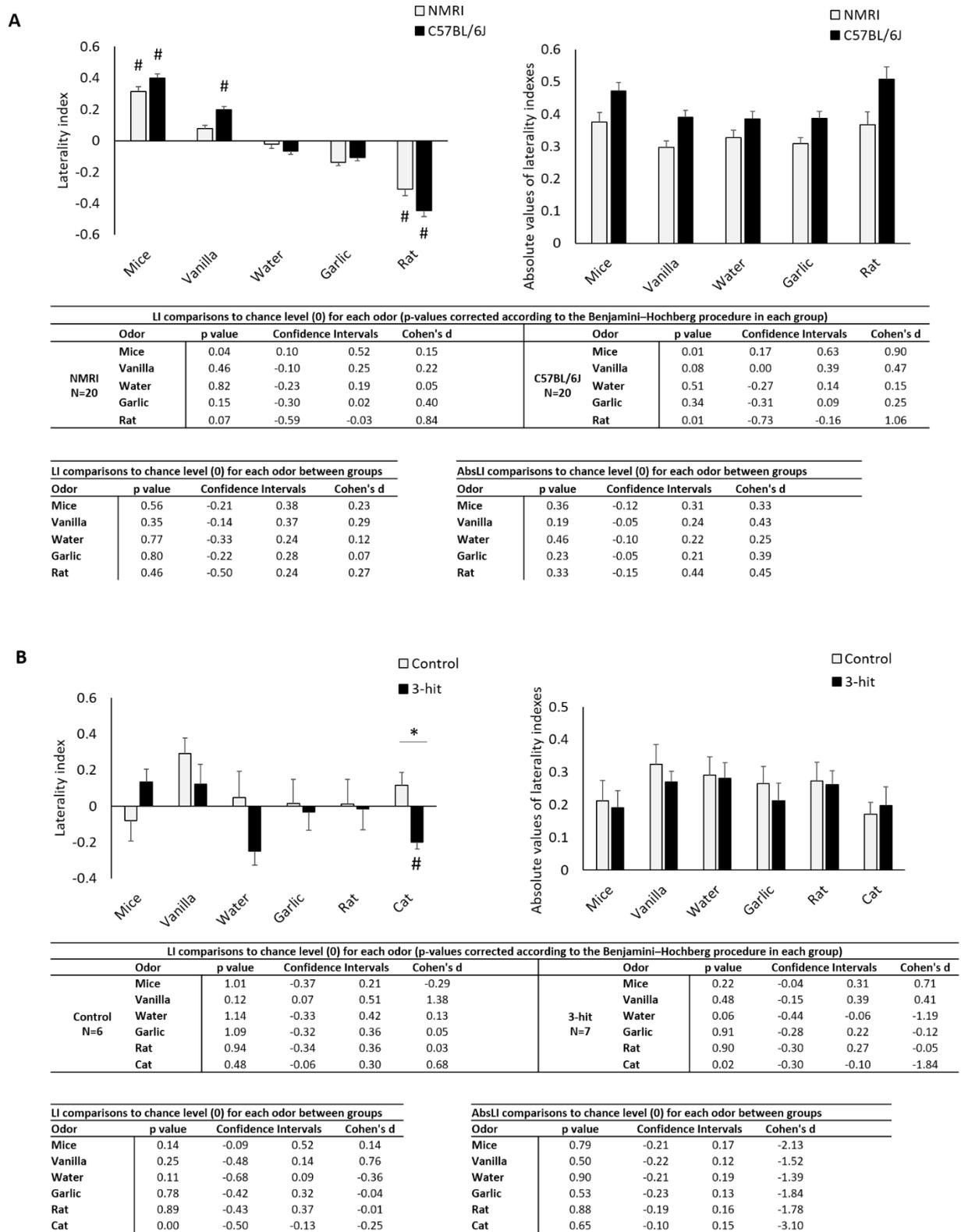


Figure 3. Left: Mean±s.e.m of LI obtained for each odor. One-sample t-tests in comparison to chance level (0) follow by Benjamini-Hochberg correction show some nostril preference in both studies, #: p<0.05. Welch two-sample t-tests do not show statistical differences between the two strains (A), but show a statistical difference between groups for cat odor (t=-3.88, df=8.16, p=0.00), *: p<0.05 (B). Right: Mean±s.e.m of AbsLI obtained for each odor. One-sample t-tests in comparison to chance level (0) follow by Benjamini-Hochberg correction, #: p<0.05. Comparison between groups: welch two-sample t-tests, *: p<0.05. Tables: IL comparison to chance level (right) and between groups (right down); AbsLI comparison between groups (left down). T-tests p values, confidence intervals and odds ratio.

3. Résultats

A, study of Jozet-Alves et al. ¹²; B, the present study.

To conclude, the olfactory laterality test is relevant for several reasons: because olfaction is the most appropriate sensory modality in rodents, because it is a quick and efficient test with few equipment and skill needed, because it assesses olfactory laterality, and because in addition, it involves valence of new compounds. According to this, it is valuable for brain research study, even to assess sensory processes, but also troubles of brain lateralization and hedonic behavior.

In case of massive behavioral deficits, eventually occur after brain lesion, a reduction of odor stimuli number (with only a positive valence stimulus, one negative valence stimulus, and the control odor) could bring sufficient information on olfactory laterality, and reduce test duration. However, choice of palatable or social component should be defined with cautious.

References

1. Vallortigara, G. & Andrew, R. J. Olfactory lateralization in the chick. *Neuropsychologia* 32, 417–423 (1994).
2. Siniscalchi, M., d'Ingeo, S. & Quaranta, A. The dog nose 'KNOWS' fear: Asymmetric nostril use during sniffing at canine and human emotional stimuli. *Behav. Brain Res.* 304, 34–41 (2016).
3. McGreevy, P. D. & Rogers, L. J. Motor and sensory laterality in thoroughbred horses. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 92, 337–352 (2005).
4. Rogers, L. J., Vallortigara, G. & Andrew, R. J. *Divided brains: the biology and behaviour of brain asymmetries.* Cambridge Univ. Press (2013) doi:10.1080/1357650x.2013.833214.
5. Boklage, C. E. Schizophrenia, brain asymmetry development, and twinning: cellular relationship with etiological and possibly prognostic implications. *Biol Psychiatry* 12, 19–35 (1977).
6. Cowell, P. E., Fitch, R. H. & Denenberg, V. H. Laterality in animals: Relevance to schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 25, 41–62 (1999).
7. Baird, A. L., Meldrum, A. & Dunnett, S. B. The staircase test of skilled reaching in mice. *Brain Res. Bull.* 54, 243–250 (2001).
8. Zhang, L. et al. A test for detecting long-term sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia. *J. Neurosci. Methods* 117, 207–214 (2002).
9. Bouet, V. et al. The adhesive removal test: A sensitive method to assess sensorimotor deficits in mice. *Nat. Protoc.* 4, 1560–1564 (2009).
10. Horner, A. E. et al. The touchscreen operant platform for testing learning and memory in rats and mice. *Nat. Protoc.* 8, 1961–1984 (2013).
11. Ehret, G. Left hemisphere advantage in the mouse brain for recognizing ultrasonic communication calls. *Nature* 325, 249–251 (1987).
12. Jozet-alves, C. et al. Olfactory Laterality Is Valence-Dependent in Mice To cite this version: HAL Id: hal-02279643 SS symmetry Olfactory Laterality Is Valence-Dependent in Mice. 11, (2019).
13. Knaden, M. & Hansson, B. S. Mapping odor valence in the brain of flies and mice. *Curr. Opin. Neurobiol.* 24, 34–38 (2014).
14. Siniscalchi, M. et al. Sniffing with the right nostril: Lateralization of response to odour stimuli by dogs. *Anim. Behav.* 82, 399–404 (2011).
15. Okada, N. et al. Abnormal asymmetries in subcortical brain volume in schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 21, 1460–1466 (2016).
16. Xie, W. et al. Functional brain lateralization in schizophrenia based on the variability of resting-state fMRI signal. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 86, 114–121 (2018).
17. Satz, P. & Green, M. F. Atypical handedness in schizophrenia: Some methodological and theoretical issues. *Schizophr. Bull.* 25, 63–78 (1999).
18. Dragovic, M. & Hammond, G. Handedness in schizophrenia: A quantitative review of evidence. *Acta Psychiatr. Scand.* 111, 410–419 (2005).
19. Lafayette Instrument Company. *Grooved Pegboard Instruction Manual, Model 32025.* (1989).
20. Posner, M. I., Inhoff, A. W., Friedrich, F. J. & Cohen, A. Isolating attentional mechanisms: A cognitive-anatomical analysis. *Psychobiology* 15, 107–112 (1987).
21. Downing, M. E., Phillips, J. G., Bradshaw, J. L., Vaddadi, K. S. & Pantelis, C. Cue dependent right hemineglect in schizophrenia: A kinematic analysis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 65, 454–459 (1998).
22. Cavézian, C. et al. Exaggerated leftward bias in the mental number line of patients with schizophrenia. *Brain Cogn.* 63, 85–90 (2007).

3. Résultats

23. Mundorf, A., Matsui, H., Ocklenburg, S. & Freund, N. Asymmetry of turning behavior in rats is modulated by early life stress. *Behav. Brain Res.* 393, (2020).
24. Moran, P. et al. Gene × Environment Interactions in Schizophrenia: Evidence from Genetic Mouse Models. *Neural Plast.* (2016) doi:10.1155/2016/2173748.
25. Bouët, V. et al. Sensorimotor and cognitive deficits after transient middle cerebral artery occlusion in the mouse. *Exp. Neurol.* 203, 555–567 (2007).
26. Ellenbroek, B. A. Animal models in the genomic era: Possibilities and limitations with special emphasis on schizophrenia. *Behav. Pharmacol.* 14, 409–417 (2003).
27. Yanagi, M., Southcott, S., Lister, J. & Tamminga, C. A. Animal models of schizophrenia: Emphasizing construct validity. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* vol. 105 (Elsevier Inc., 2012).
28. Bouet, V. et al. A new 3-hit mouse model of schizophrenia built on genetic, early and late factors. *Schizophr. Res.* (2020) doi:10.1016/j.schres.2020.11.043.
29. Andrieux, A. et al. The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. *Genes Dev.* 16, 2350–2364 (2002).
30. Bouet, V., Lecrux, B., Tran, G. & Freret, T. Effect of pre- versus post-weaning environmental disturbances on social behaviour in mice. *Neurosci. Lett.* 488, 221–224 (2011).
31. O’Tuathaigh, C. M. Hryniewiecka, M., Behan, A., Tighe, O., Coughlan, C. & Desbonnet, L. Chronic adolescent exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol in COMT knockout mice: impact on phenotypes relevant to psychosis. *Neuropsychopharmacology* 35, 2262–2273 (2010).
32. Volle, J. et al. Reduced expression of STOP/MAP6 in mice leads to cognitive deficits. *Schizophr. Bull.* 39, 969–978 (2013).
33. Sommer, I., Aleman, A., Ramsey, N., Bouma, A. & Kahn, R. Handedness, language lateralisation and anatomical asymmetry in schizophrenia. *Br. J. Psychiatry* 178, 344–351 (2001).
34. Andreasen, N. C. & Flaum, M. Schizophrenia: The characteristic symptoms. *Schizophr. Bull.* 17, 27–49 (1991).
35. Germain, N. et al. A systematic literature review identifying associations between outcomes and quality of life (QoL) or healthcare resource utilization (HCRU) in schizophrenia. *J. Med. Econ.* 22, 403–413 (2019).
36. Craske, M. G., Meuret, A. E., Ritz, T., Treanor, M. & Dour, H. J. Treatment for Anhedonia: A Neuroscience Driven Approach. *Depress. Anxiety* 33, 927–938 (2016).
37. Miyamoto, Y. & Nitta, A. Behavioral phenotypes for negative symptoms in animal models of schizophrenia. *J. Pharmacol. Sci.* 126, 310–320 (2014).
38. Liu, M.-Y. et al. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. *Nat. Protoc.* 13, 1686–1698 (2018).

3.2.4.1 Résumé de l'article 4

La latéralité sensorielle et / ou motrice est un reflet de la latéralisation des hémisphères cérébraux. Dans la schizophrénie, on observe des modifications de cette latéralisation cérébrale avec des anomalies de l'asymétrie observée normalement chez les individus sains (ex : proportion plus importante d'individus gauchers que dans la population normale). L'utilisation du test de latéralité olfactive présenté dans l'article 3 a été appliqué à des animaux 3-hit. Nous avons observé une plus grande préférence pour l'utilisation de la narine gauche chez ces animaux par rapport à des animaux témoins, ce qui peut refléter une modification de la latéralisation cérébrale. Ce test permet donc de mettre en évidence une modification de latéralité olfactive reflétant probablement une différence d'asymétrie sur la base de la valence des odeurs.

3.2.5 Résumé de l'évaluation de la validité d'apparence

Pour évaluer la validité d'apparence, nous avons caractérisé le phénotype du modèle 3-hit par des approches comportementales, d'imagerie, d'immunohistochimie et d'électrophysiologie. Nous avons observé de nombreux éléments clefs du phénotype schizophrénique (Winship et al., 2019) : des symptômes de type négatif, des déficits cognitifs, de l'anxiété, des modifications de la latéralité olfactive, ainsi qu'une diminution de l'épaisseur corticale et du volume de l'hippocampe, une altération des fibres du corps calleux, des altérations des systèmes de neurotransmission glutamatergique et GABAergique au sein de l'hippocampe. Ces éléments constituent une base solide pour attester de la bonne validité d'apparence de ce modèle de schizophrénie. En effet, les rares modèles de schizophrénie à trois facteurs chez le rongeur ne disposent pas d'une caractérisation aussi large de leur phénotype (Chen et al., 2011; Kekesi et al., 2015; Sultana & Lee, 2020).

Les articles présentés ci-dessus apportent chacun des résultats permettant de caractériser la validité d'apparence du modèle 3-hit. Ces résultats sont discutés indépendamment dans chacun des articles et une analyse plus globale sera réalisée dans le chapitre « Discussion générale ».

3. Résultats

3.3 Evaluation de la validité de construction

Pour évaluer la validité de construction d'un modèle multifactoriel, plusieurs approches peuvent être utilisées. La comparaison d'un groupe à deux facteurs avec un groupe à trois facteurs apporte des informations sur l'utilité de l'ajout de ce troisième facteur comme réalisé dans l'article 1.

La première étude (article 1) a permis de comparer des animaux 2-hit (ayant subi une séparation maternelle et des injections de THC) à des animaux 3-hit (qui présentent en plus de ces deux facteurs une délétion partielle du gène MAP6). Le modèle 3-hit présente certaines altérations n'apparaissant pas chez les animaux 2-hit (test de l'*open field*, sociabilité) alors que d'autres sont constantes chez ces deux groupes (test de la piscine de Morris, épaisseur corticale et altération des fibres du corps calleux) (voir Tableau 3). Le phénotype moins altéré des animaux 2-hit peut être utile pour étudier d'autres maladies psychiatriques ou des formes moins sévères de schizophrénie. Cela montre l'importance de l'utilisation de trois facteurs puisque l'utilisation de deux facteurs présente un phénotype « de type schizophrénique léger » pouvant encore être modulé par l'ajout d'un facteur pour obtenir un phénotype « de type schizophrénique plus marqué ». L'ajout du troisième facteur permet donc de renforcer le phénotype du modèle, avec notamment un effet sur les symptômes de type négatif. Une administration chronique de THC chez la souris C57BL/6 peut induire une augmentation de l'anxiété dans les tests de l'*open field* et de la boîte noire et blanche (Long et al., 2010) même si l'impact de ce facteur sur l'anxiété reste controversé (Keeley et al., 2015).

*Tableau 3 : Principaux résultats décrits dans l'article 1 présentés sous la forme de comparaison entre les groupes 2-hit et témoin, 3-hit et témoin, puis 2-hit et 3-hit. = : pas de différence ; ↓ : diminution ; ↑ : augmentation ; NS : non significatif ; * : le pourcentage d'individus de chaque groupe présentant une latence maximale à trouver la plate-forme le dernier jour d'apprentissage diffère (7.6% des témoins, 25% des 2-hit et 28.5% des 3-hit) bien que des tests de χ^2 ne montrent aucune différence significative.*

3. Résultats

Symptômes / déficits	Test	Variable mesurée	2-hit vs témoins	3-hit vs témoins	2-hit vs 3-hit
Positifs	Open field	Distance parcourue	=	↓	↓
		%age de temps passé dans le centre	=	↓	↓ NS
Anxiété	Boite noire et blanche	Nombre de transitions	↓ NS	↓ NS	=
	Alternance spontanée	Mémoire de travail	=	↓	=
Mémoire	Piscine de Morris	Performances de mémoire	↓	↓	=
		Latence	↑*	↑*	=
Négatifs	Approche / évitement	Sociabilité	=	↓	↓
Imagerie	Structure	Variable mesurée	2-hit vs témoins	3-hit vs témoins	2-hit vs 3-hit
Anatomique	Hippocampe	Volume	=	=	↓
	Cortex pariétal médian	Épaisseur	↓	↓	=
De diffusion	Corps calleux	FA	↓	↓	=

L'étude indépendante des effets d'un seul facteur peut permettre de connaître l'influence possible de chacun des facteurs indépendamment. L'étude préliminaire présentée ci-dessous avait pour but d'évaluer l'effet d'un facteur génétique seul tout en évaluant son potentiel de synergie avec des agents pharmacologiques.

Cela a également été réalisé avec les études de nouveaux modèles de schizophrénie, l'un à 3 facteurs (3-M, décrit dans l'article 5), l'autre à 2 facteurs (2-hit, décrit dans le poster).

3. Résultats

3.3.1 Étude préliminaire

L'objectif de cette étude était, d'une part de valider le protocole d'utilisation du PPI en utilisant des molécules reconnues pour diminuer ou augmenter l'inhibition du sursaut, d'autre part de valider le protocole de reconnaissance d'objet. Des animaux présentant une délétion partielle du gène MAP6 (1^{er} « hit » du modèle 3-hit) ont été utilisés pour évaluer l'effet de cette délétion génétique partielle sur les tests de mémoire et de filtrage sensoriel, avec l'hypothèse qu'une délétion partielle serait insuffisante pour observer des déficits. Quarante souris mâle et femelle ont été utilisées dans cette étude, permettant d'observer un éventuel effet du sexe dans les deux tests comportementaux utilisés. Les tests comportementaux ont été réalisés lorsque les animaux étaient âgés de 3 à 6 mois. Le test de reconnaissance d'objet n'a pas été précédé d'habituation au dispositif et aux objets, et le délai intersession utilisé était d'1h. Le test du PPI a été réalisé sur les 4 groupes expérimentaux 30min après administration de chlorpromazine (3mg/kg, i.p.), d'amphétamine (2,5mg/kg, i.p.) ou de sérum physiologique, chaque individu a donc réalisé ce test trois fois (avec un intervalle de 48h minimum entre chaque traitement et test). L'ordre des administrations a été randomisé (voir Figure 37).

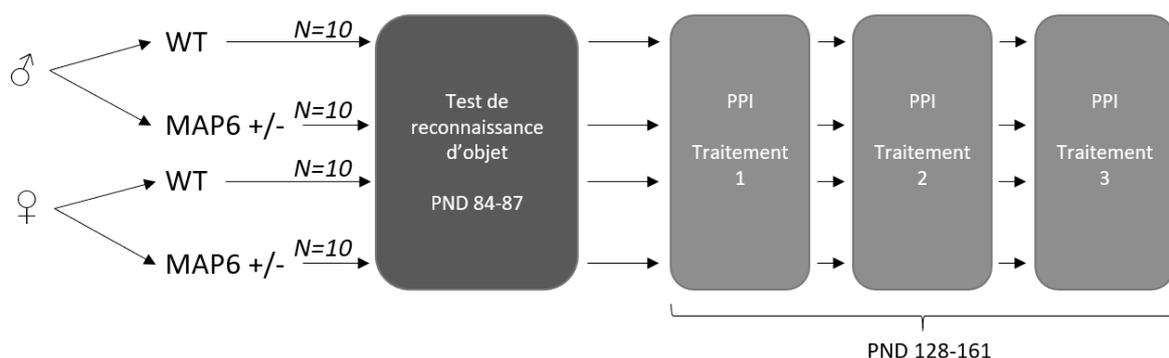


Figure 37 : Effectifs et design expérimental de l'étude préliminaire.

Le gène MAP6 est associé à la schizophrénie, par l'augmentation de son polymorphisme et l'altération de l'expression de ses protéines chez les schizophrènes, ainsi que par sa localisation sur la région chromosomique 11q11 qui contient plusieurs gènes associés à cette pathologie (Choi et al., 2009; Lewis et al., 2003; Shimizu et al.,

3. Résultats

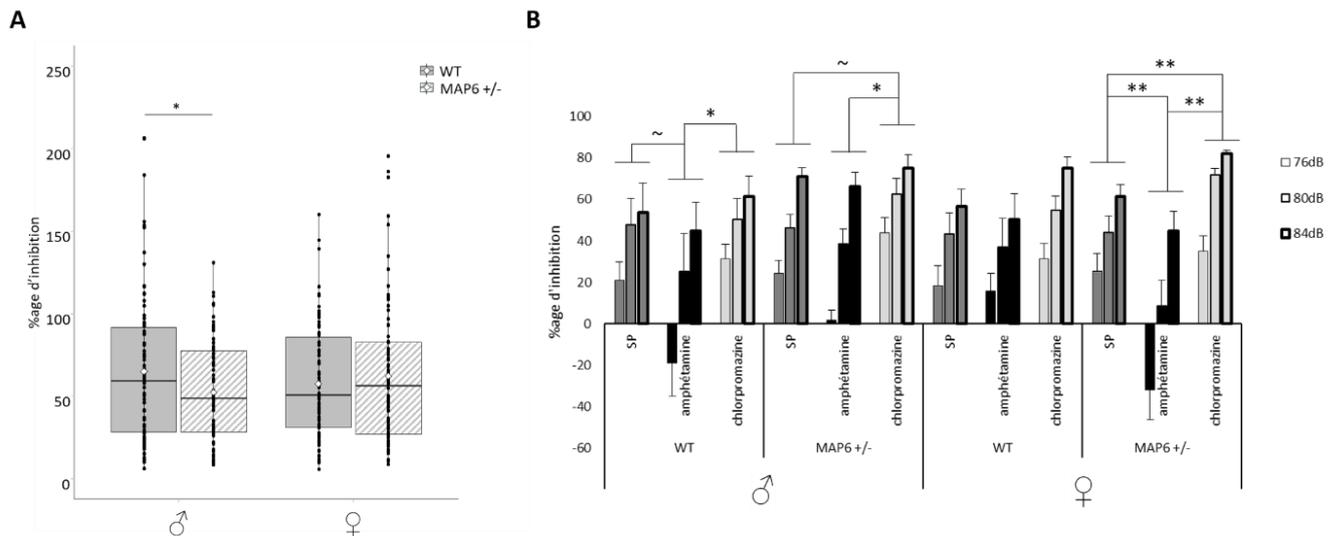
2006). Ce gène est impliqué dans la stabilité de la structure des microtubules et donc dans l'architecture neuronale, la plasticité synaptique et le développement cérébral (Deloulme et al., 2015). La délétion totale de ce gène diminue l'inhibition du réflexe de sursaut (Volle et al., 2013) et diminue les performances de mémoire à long terme lors du test de reconnaissance d'objet (Fournet et al., 2012). Certaines études ont montré, chez des souris mâles uniquement, qu'une délétion partielle pouvait induire des déficits de reconnaissance d'objet (Merenlender-Wagner et al., 2010, 2014).

Concernant le test de reconnaissance d'objet, nous n'avons pas observé de différences intergroupes dans ce test (ANOVA, effet génotype, effet sexe, interaction génotype x sexe : $p > 0,05$). Aucun des groupes ne présente de performances significatives de mémoire de reconnaissance (pas de différence significative de l'indice de reconnaissance par rapport à 0). Ce résultat nous a conduit à modifier le protocole du test de reconnaissance d'objet en ajoutant une session d'habituation, essentielle pour obtenir des performances significatives pour le groupe témoin, pour les expérimentations futures (Marianne Leger et al., 2013).

Une analyse globale des résultats au test du PPI a révélé un effet du traitement et de l'intensité du *prepulse* (ANOVA avec permutation, $p < 0,001$), aucun effet du génotype et du sexe et aucune interaction entre les facteurs ($p > 0,05$). L'effet d'augmentation de l'inhibition induit par la chlorpromazine (Shi et al., 2003) et l'effet de diminution de l'inhibition induit par l'amphétamine (Kinkead et al., 2005) ont bien été observés dans cette étude, ce qui nous permet de valider le protocole utilisé pour ce test.

Des différences inter sexe sont révélées car seuls les mâles présentent un effet du génotype ($p < 0,05$) ; en effet, les mâles MAP6 +/- présentent un pourcentage d'inhibition inférieur aux mâles WT (voir Figure 38 A). On observe également un effet du traitement plus important chez les femelles MAP6 +/- que chez les femelles témoins (révélé par l'interaction significative génotype x traitement uniquement chez les femelles) (voir Figure 38 B).

3. Résultats



*Figure 38 : Résultats du test du PPI. A. Pourcentage d'inhibition en fonction du sexe et du génotype. Boîtes à moustache dont les lignes noires horizontales représentent la médiane et les premier et troisième quartiles, les lignes extérieures représentent la gamme des résultats ou 1,5 fois la longueur de boîte à moustaches à partir de la médiane. Les losanges blancs montrent les moyennes. ANOVA avec permutation, * : $p < 0,05$. B. Pourcentages d'inhibition en fonction du genre, du génotype, du traitement et de l'intensité de prepulse. Moyennes +/- SEM, ~ : $p < 0,1$, * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$.*

Le phénotype MAP6+/- a donc un effet modéré sur l'inhibition du réflexe de sursaut (uniquement chez les mâles). Nous avons également montré que cette délétion partielle peut induire une vulnérabilité aux traitements (chez les femelles).

3.3.1.1 Résumé de l'étude préliminaire

Ainsi, l'utilisation de mâles et de femelles est nécessaire pour l'étude d'un modèle de schizophrénie utilisant cette délétion génétique partielle, ce premier facteur peut permettre un effet de synergie avec des facteurs exogènes. Les résultats de cette étude préliminaire suggèrent que le choix de cette délétion génétique partielle est pertinent dans l'objectif de construction d'un modèle multifactoriel de schizophrénie.

L'évaluation de la validité de construction d'un modèle multifactoriel passe également par la caractérisation de l'effet indépendant de chaque facteur, en plus de l'effet de l'addition de ces facteurs. Cette évaluation a été réalisée sur un autre modèle à trois facteurs, le modèle 3-M présenté dans l'article 5 suivant.

3. Résultats

3.3.2 Article 5 : Combination of MAP6 deficit, maternal separation and MK801 in female mice: a 3-hit animal model of neurodevelopmental disorder with cognitive deficits

Solenn Percelay*, Thomas Freret, Nicole Turnbull, Valentine Bouet¹, Michel Boulouard¹

Normandie Université, UNICAEN, INSERM, COMETE, CYCERON, CHU Caen, 14000, Caen, France

* Corresponding author: solenn.percelay@unicaen.fr

¹ Last authors contributed equally

Behavioural Brain Research [En cours de révision]

Article

Combination of MAP6 deficit, maternal separation and MK801 in female mice: a 3-hit animal model of neurodevelopmental disorder with cognitive deficits.

Solenn Percelay^{a,*}, Thomas Freret^a, Nicole Turnbull, Valentine Bouet¹, Michel Boulouard¹

Normandie Université, UNICAEN, INSERM, COMETE, CYCERON, CHU Caen, 14000, Caen, France

* Corresponding author: solenn.percelay@unicaen.fr

¹ Last authors contributed equally

Abstract: Schizophrenia is a major psychiatric disease still lacking efficient treatment, particularly for cognitive deficits. To go further in research of new treatments that would encompass all the symptoms associated with this pathology, preclinical animal models need to be improved. To date, the aetiology of schizophrenia is unknown, but there is increasing evidence to highlight its multifactorial nature. We built a new neurodevelopmental mouse model gathering a triple factor combination (3-M): a genetic factor (partial deletion of MAP6 gene), an early stress (maternal separation) and a late pharmacological factor (MK801 administration, 0.05 mg/kg, i.p., daily for 5 days). The effects of each factor and of their combination were investigated on several behaviours including cognitive functions.

While each individual factor induced slight deficits in one or another behavioural test, 3-M conditioning induces a wider phenotype with hyperlocomotion and cognitive deficits (working memory and social recognition). This study confirms the hypothesis that genetic, environmental and pharmacological factors, even if not deleterious by themselves, could act synergistically to induce a deleterious behavioural phenotype. It moreover encourages the use of such combined models to improve translational research on neurodevelopmental disorders.

Keywords: psychosis; glutamate; environment; genetics

1. Introduction

Schizophrenia is a neurodevelopmental disorder affecting approximately 1% of the population, with an unknown aetiology. Most symptoms can be distinguished in 3 categories: positive symptoms (hallucinations, delirium), negative symptoms (social withdrawal, anhedonia), and cognitive deficits such as memory issues and altered executive functions [1,2]. Antipsychotic drugs which are currently in use to treat patients are only symptomatic and not curative. Besides, they do not cover the entirety of symptoms, including cognitive deficits. Moreover, negative symptoms and cognitive deficits are often not supported or sometimes even worsened by antipsychotics [3,4]. There is, therefore, a crucial need to improve treatments' efficiency, particularly for cognitive functions, which necessarily goes through the refinement of animal models.

Even if few two-factor [5,6] and rare three-factor [7–10] animal models of schizophrenia have been developed, most existing models are based on a single intervention (genetic deletion, adverse environmental exposure, pharmacological modulation etc.), suffering thus from a lack of construct validity given the commonly admitted multifactorial aspect of schizophrenia aetiology [11–14]. Actually, the combination of a genetic predisposition with early and late factor has been described as a key requirement for an animal model with high construct validity [15].

Herein, we designed and characterised a new mouse model of neurodevelopmental disorder based on the combination of three factors (3-M). This 3-M model combined: a partial deletion of the MAP6 gene (Microtubule-Associated Protein 6, also called Stable-Tubule-Only-Polypeptide, STOP), a 24h maternal separation of 9-days old pups as the early environmental factor, and then a sub-chronic intraperitoneal administration of MK801 (dizocilpine, a non-competitive N-Methyl-D-Aspartate receptor antagonist NMDAR) in early adulthood as the late pharmacological factor. All these risks factors were selected for their potential to favour the development of a psychosis-like phenotype.

3. Résultats

MAP6 alterations have been detected in schizophrenic patients [16,17]. Further, in animals studies, unlike the strong behavioural deficits displayed by full knock-out MAP6 mice [18–21], a partial deletion (heterozygous mice) leads to a very mild phenotype of schizophrenia-like symptoms [22,23]. Finally, this partial deletion has been described to increase susceptibility to stress factors, such as maternal separation [10,23]. Childhood trauma is known to be a major risk factor of psychiatric disorders, including schizophrenia [24,25]. In rodents, maternal separation conducts to the emergence of some behaviours related to schizophrenia-like phenotype [26–28]. Moreover, maternal separation induces long-term alteration of glutamatergic and dopaminergic neurotransmission [29]. Finally, as the pharmacological factor, repetitive administration of the NMDAR antagonist MK801 was chosen. Indeed, glutamatergic neurotransmission and more particularly that mediated by NMDAR, is disturbed in schizophrenia [30–33]. Therefore, sub-anaesthetic doses of NMDAR antagonists, such as ketamine [34], have been largely employed as experimental models of psychosis in humans [35–37], as well as in rodents (see per reviews [11,38]). Herein, we chose a low dose (0.05mg/kg) of MK801 with subchronic administration (5 days) [39–42] (see per review [43]).

The effects of the three factors, taken apart or in combination, were assessed through a set of behavioural tests, covering some aspects of schizophrenia-like symptoms (positive-like - locomotion, negative-like - sociability and cognitive deficits – recognition and working memories) [44].

The choice for female over male mice in this single-sex study is supported by several arguments. Firstly, the more important social hierarchy in males than in females groups increases behavioural variability [41,45]. Secondly, sociability assessment is less biased in female mice considering that males display a high territoriality [46], and could possibly display fighting behaviour. Lastly, a higher behavioural sensitivity of female rodents to MK-801 has been reported [47].

While each individual factor induced slight deficits in one or another test, none of them was able to mimic all behavioural aspects of schizophrenia related symptoms. Conversely, through a potential synergistic effect, 3-M conditioning induces deficits, representative of phenotypes of neurodevelopmental disorder. Indeed, 3-M mice displayed an increased locomotor activity (positive-like phenotype), a deficit in social recognition task and in working memory task (cognitive-like phenotype).

2. Materials and Methods

Animal experiments were performed in accordance with the ARRIVE guidelines and the EU Directive 2010/63/EU for animal experiments (project n° 2016120817103795). All efforts were made to minimise the number of animals used as well as their suffering.

2.1. Animals

Heterozygous MAP6 (MAP6^{+/-}) female mice and their Wild Type (WT) littermates were obtained from crossing C57BL6/129SvPas F1 males [21] (bred in Centre Universitaire de Ressources Biologiques, Unicaen, France) with C57BL/6 females (Janvier Labs, France). After weaning, mice were shortly anaesthetised (5% isoflurane in an O₂/N₂O mixture (0.3/0.7) for identification procedures with a subcutaneous chip and tail sampling for genotyping [23]. Animals were kept in standard laboratory cages in groups of 3 to 5 individuals, with mixed genotypes and treatments per cage, in a reversed 12h/12h light/dark cycle (light on at 19:00 p.m., off at 7:00 a.m.), with regulated temperature (21±1°C) and humidity (55±10%). Food and water were given ad libitum. Enrichment consisted of craft paper and a small scrap paper igloo.

2.2. Maternal separation (MS)

When aged 9 days (post-natal day PND9), half of the litters was separated from their mother for 24h. Mothers were removed and individually placed in a cage close to the pups' cage, from 9:00a.m. to 9:00a.m., the day after. Then, the mothers were returned to their litters and left undisturbed until weaning. Control mice were submitted to the same protocol, with only 20s of separation [26,27].

2.3. MK801 treatment

MK801 (Sigma-Aldrich®, Ref#M107) was dissolved in a vehicle saline solution (0.9%) for a final intraperitoneal administration dose of 0.05mg/kg [41,42] in a volume of 10mL/kg. Administrations were performed daily for five consecutive days. Control animals received the vehicle saline solution.

2.4. Animal groups

3. Résultats

Forty-eight female mice, aged two-month, were allocated to the animal groups according to the experimental design depicted on Figure 1.

	1 st M Gene susceptibility		2 nd M Early stress	3 rd M Environmental exposure	Behaviour
Age (days)		0	9-10	60-65	66-89
		Birth	Maternal separation		
Control n=9	Wild Type		20s	Vehicle	Open field
MAP6+/- n=8	MAP6+/-		20s	Vehicle	Spontaneous alternation
MS n=14	Wild Type		24h	Vehicle	Approach-avoidance
MK801 n=9	Wild Type		20s	MK801 treatment 0.05mg/ kg/day	Social novelty preference
3-M n=8	MAP6+/-		24h	MK801 treatment 0.05mg/ kg/day	Object recognition

Figure 1. Animal groups and experimental design.

2.5. Behavioural assessment

Animals were handled daily for 5min during the week preceding the experiments. Behaviour was assessed through several tests, from the day after the last MK801 injection and performed in the following order: open field, spontaneous alternation, sociability, social recognition and object recognition. For all behavioural tests, animal cages were placed in the experimental room 30min before the test.

Open field test

Locomotor activity was assessed in a squared (50x50x50cm) open field arena for 30min, through video tracking (NOLDUS®, Ethovision). The parameters collected were the total distance travelled and the time spent in the centre of open field [48].

Spontaneous alternation test

Spatial working memory performances were assessed by spontaneous alternation behaviour in a single-session Y-maze test [49,50]. The maze consisted of three equally spaced arms (22x6.5x10cm) made of black painted wood. Each mouse was individually placed at the end of one arm, facing the ending wall, and allowed to freely explore the maze during a 5min session. The number of rearings as well as the number and the sequence of arm entries were recorded. An arm entry was scored when all four feet crossed into the arm. Alternation behaviour was defined as consecutive entries into three different arms. The percentage was calculated by the formula: (number of alternations/maximum theoretical number of alternations) ×100.

Sociability and social recognition tests

Briefly, the apparatus consisted of three interconnected compartments (27x18x21cm), with two lateral side chambers (6.5x18x21cm) [26]. Those two chambers were separated from the compartments by transparent perforated walls to ensure visual, auditory, and olfactory contact. Two successive trials were performed to assess sociability behaviour [26], and social recognition performance [51,52]. For the first trial, the tested mouse was individually placed in the central compartment of the apparatus. A 45-day-old female mouse (stimulus mouse unknown from the tested mouse) was randomly placed in one of the two lateral chambers. Time spent in each compartment (close and far from the stimulus mouse) was collected for 5min, before replacing the mouse in its home cage [53,54]. A sociability index was

3. Résultats

calculated as follows: $[(\text{time spent close to the stimulus mouse}) - (\text{time spent far from the stimulus mouse})] / [(\text{time spent close to the stimulus mouse}) + (\text{time spent far from the stimulus mouse})] \times 100$ [26]. After 30min elapsed, the tested mouse was placed again in same conditions, while a novel stimulus mouse placed in the opposed lateral chamber. Time spent in each compartment (close to the previously encountered mouse and close to the novel stimulus mouse) was collected for 5min and a social recognition index was calculated as follows: $[(\text{time spent close to the novel stimulus mouse}) - (\text{time spent far from the novel stimulus mouse})] / [(\text{time spent close to the novel stimulus mouse}) + (\text{time spent far from the novel stimulus mouse})] \times 100$ [51].

Object recognition test

For four consecutive days, animals were habituated to the arena (30x30x20cm) and to the presence of an object as follows: the first day, all mice from the same cage were placed together in the arena for 10min. The 2nd, 3rd and 4th day, each mouse was placed alone for 5min. The 4th day, an object, different from those used in the test, was placed in the centre of the arena. For the test sessions, towers of Lego® bricks and Falcon® tissue culture flasks filled with sand were used [55]. The 5th day, the object recognition test was performed in two sessions (10min each, inter-session interval ITI: 1h) [52,55] (see per review [56]). For the acquisition session (1st session), the mouse was free to explore two identical objects placed in the apparatus (tower or flask, random), before being replaced in its home cage. For the retention session (2nd session), the mouse was placed with an object identical to one of the objects used during acquisition session («familiar object»), the other being new to the mouse («novel object»). Object exploration time was instantly collected manually when the mouse was oriented toward the object at a distance of 1cm or less, touching or sniffing the object (exclusion criteria: total exploration < 5s). Objects were cleaned with 70% ethanol after each session. A discrimination index was calculated as follows: $(\text{exploration time of the novel object} - \text{exploration time of the familiar object}) / (\text{total exploration time})$. Due to exclusion criteria, one mouse from the MS group was excluded from the analysis.

2.6. Statistical analyses

Data analyses were conducted using R software 3.4.2 (Free Software Foundation, Vienna, Austria; R Development Core team 2009). Data normality was assessed using the Shapiro test. When data were normally distributed, intergroup comparisons were performed with ANOVA and Tukey method for post hoc analysis, comparison to a reference value was performed with two-sample t tests. When data were not normally distributed, intergroup comparisons were performed using ANOVA with permutation test and t test with permutation for post hoc analysis, comparison to a reference value was performed with Wilcoxon tests. Concerning open field test, statistical analysis was carried out using the nparLD package for non-parametric analysis of group and time effects. Group comparisons within each 5-min interval were analysed using previously described method. The significance level was set as 0.05 for all statistical analyses.

3. Results

3.1. Open field test

Distance travelled in the open field was significantly different between groups (ANOVA F4, 43=2.638, P=0.037), and there was a significant time effect (ANOVA F5, 42=6.177, P<0.001, no group x time interaction). Post-hoc analysis revealed that the 3-M group travelled more distance than the control group and the MS group (pairwise test, respectively: P=0.02 and 0.01) (Figure 2.A). Looking at time course of activity for each 5min interval, a statistical group difference was observed at the first two 5min (ANOVA, F4, 43=4.560, 2.764, 1.471, 1.812, 1.787, and 1.581; P=0.004, 0.039, 0.228, 0.144, 0.149 and 0.197, for 0-5min, 5-10min, 10-15min, 15-20min, 20-25min and 25-30min, respectively). For the first 5min interval, the 3-M group travelled a longer distance than the control, MS and MK801 groups (Tukey's method, respectively: P=0.004, 0.005 and 0.022). During the second 5min interval, 3-M locomotor activity was only higher than the control group (Tukey's method, P=0.026) (Figure 2.B).

Time spent in the centre of the open field did not globally differ between groups (ANOVA F4, 43= 1.701, P=0.15), a time effect appears (ANOVA F5, 42=11.876, P<0.01, no group x time interaction) (Figure 2.C). Interestingly, a focus on the first 5-min interval revealed significant difference between

3. Resultats

groups (ANOVA $F_{4, 43}=5.537$, $P=0.001$). Indeed, the 3-M group spent more time in the centre of the open field than both the control and the MS group (Tukey's method, respectively: $P=0.001$ and 0.005). A trend towards significant differences was also noticed between 3-M and MAP6+/- and between control and MK801 groups (Tukey's method, respectively: $P=0.062$ and 0.051) (Figure 2. D).

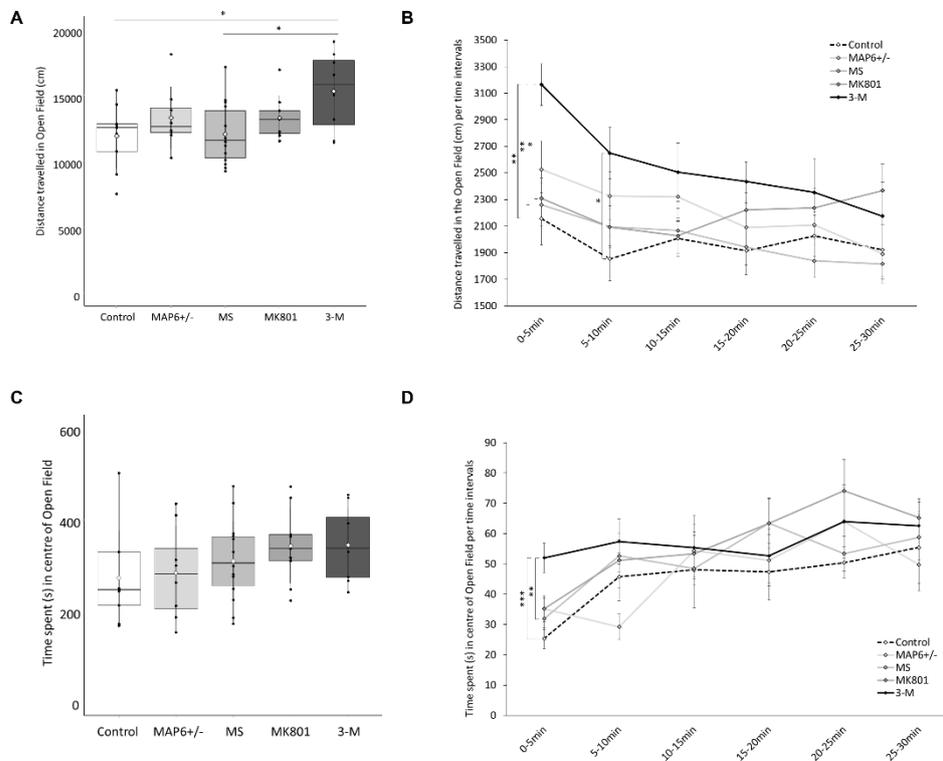


Figure 2. Open field parameters in control, 1-hit (MAP6+/-: partial deletion of MAP6 gene; MS: maternal separation; 3-M (MAP6+/- x MS x MK801:) mice. (A) Total distance travelled in the open field during 30min. (B) Distance travelled during each 5min interval of the open field session. (C) Total time spent in the centre of the open field over 30min. (D) Time spent in the centre of the open field during each 5min interval. For A and C, data are boxplots with horizontal black lines as the median, first and third quartiles; the outer lines represent the range of scores or 1.5 box-lengths from the median; white diamonds indicate the means, vertical black lines indicate the standard deviation. Intergroup comparisons use non-parametric ANOVA-type test statistic with Box approximation followed by tests for pairwise comparisons; *: $p<0.05$. For B and D, data are Mean \pm SEM. Intergroup comparisons use ANOVA or ANOVA with permutation followed by Tukey's method or permutation t test: *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$.

3.2. Spontaneous alternation test

The number of arm entries in the Y-maze was significantly different between groups (ANOVA, $F_{4, 43}=2.734$, $P=0.041$). Post-hoc revealed a trend towards an increased number of arm entries for the 3-M group compared to the MS group (Tukey's method, $P=0.066$) (Figure 3.A). There was no difference between groups for the number of rearings (ANOVA $F_{4, 43}=0.783$, $P=0.543$). Concerning spontaneous alternation behaviour, there was no difference in alternation percentages between groups (ANOVA $F_{4, 43}=0.469$, $P=0.758$). However, only the control and MS groups displayed a percentage significantly above chance value, 50% (t test, $P=0.018$ and 0.002 , for control and MS respectively). While the MK801 group was close to the significant value (t test, $P=0.061$), MAP6+/- and 3-M groups did not display an alternation percentage above 50% (t test, $P>0.05$) (Figure 3.B).

3.3. Sociability test

The sociability index was not different between groups (ANOVA $F_{4, 43}=0.229$, $P=0.921$), and none of the groups displayed a sociability index above 0 (t test, $p>0.05$) (Figure 3.C).

3. Resultats

3.4. Social recognition test

The social recognition index significantly differed between groups (ANOVA with permutations, $P=0.014$). Although there was no significant difference by inter-group comparisons, a tendency for a higher social recognition for control group compared to the MAP6+/-, MK801 and 3-M groups was observed (permutation t test, $P=0.053$, 0.053 and 0.053 , respectively). Further, only the control group showed a social recognition index significantly above the reference value of 0 (t test, $P=0.001$) (Figure 3.D).

3.5. Object recognition test

There was no global difference in the object recognition index between groups (ANOVA $F_{4, 42}=1.190$, $P=0.329$). However, except the MK801 group (t test, $P=0.148$), all other groups displayed an object recognition index significantly above 0 (t test, respectively: $P=0.003$, 0.009 , 0.001 , 0.015 for control, MAP6+/-, MS and 3-M groups, respectively) (Figure 3.E). With regard to exploration times, while no group difference was observed during the acquisition session (ANOVA $F_{4, 42}=1.897$, $P=0.129$), the control group explored more than the MS group during the retention session (ANOVA, $F_{4, 42}=3.260$, $P=0.02$; followed by Tukey's method, $P=0.012$) (Figure 3.F).

3. Résultats

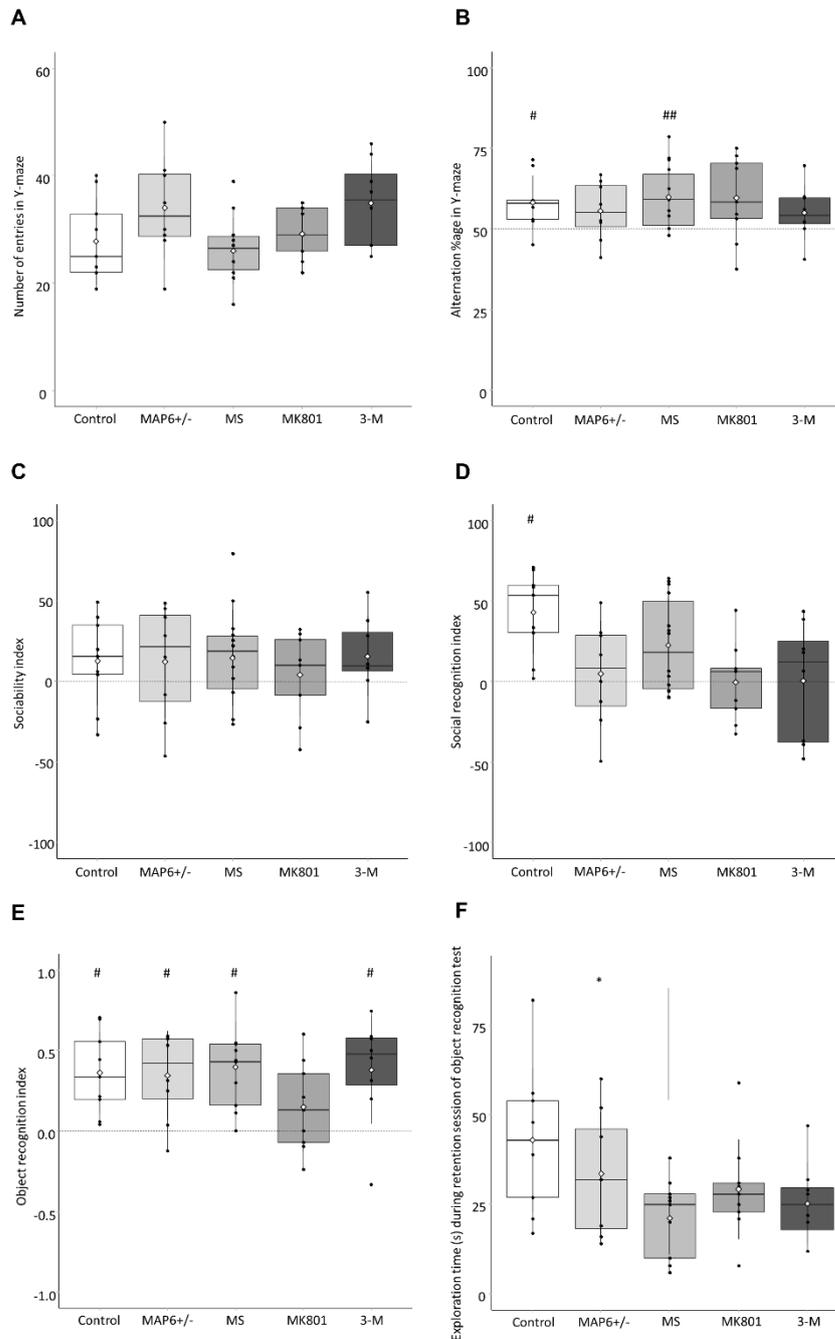


Figure 3. Behavioural phenotype assessed in control, 1-hit (partial deletion of MAP6 gene: MAP6+/-; maternal separation: MS; MK801 administration: MK801) and 3-hit (partial deletion of MAP6 gene, maternal separation MK801 administration: 3-M) mice. (A) Number of entries in the Y-maze. (B) Alternation percentage in the Y-maze. (C) Sociability index. (D) Social recognition index. (E) Object recognition index. (F) Exploration time during the retention session of the object recognition test. Data are boxplots with horizontal black lines as the median, first and third quartiles; the outer lines represent the range of scores or 1.5 box-lengths from the median, white diamonds indicate the means, vertical black lines indicate the standard deviation. Intergroup comparison uses ANOVA or ANOVA with permutation followed by Tukey's method or permutation t test: *: $p < 0.05$. Comparison to a reference value using a t test or Wilcoxon test: #: $p < 0.05$.

4. Discussion

3. Résultats

We assessed herein the behavioural phenotype of a new mouse model of neurodegenerative disorder displaying a high construct validity based on complex interactions between genetic, environmental, and pharmacological factors (3-M). The 3-M mice displayed an increased locomotor activity considered reflective of positive-like phenotype, a deficit in social recognition and in working memory arguing for cognitive-like deficits. The behavioural phenotype displayed shows promising face validity of the 3-M murine model, supporting arguments for its use as a model of neurodevelopmental disorders. While submitted to only one factor, i.e. 1-hit, animals were not severely affected showing thus an incomplete phenotype reflecting only some aspects of the pathology. Indeed, whatever the factor considered, mice submitted to only one of them did not show any increase in locomotor activity, indicating no positive-like symptoms. However, each 1-hit group displayed a less specifically altered behavioural profile than 3-M group. Thus, while both MAP6^{+/-} and MS groups showed working memory deficits, only the MK801 group showed a deficit in the object recognition task. Similarly, only the MS group spent less time than the control group exploring objects during the object recognition task. Each factor alone induces specific phenotype, suggesting that some deficits observed in the 3-M group could be more related to one or the other factors. For instance, deficits in working memory could be due to the genetic deletion or to the MK801 administration given that they are observed in the MAP6^{+/-} and MK801 groups. Conversely, the increased locomotor activity was observed only in the 3-M group, and not in any of the 1-hit groups, which indicates a synergistic effect (possibly between 2 or 3 factors) for this positive-like symptom to occur.

Although historically designed to assess emotionality in rodents [57], the open field test is now also widely used to measure spontaneous locomotor activity (distance travelled). Herein, the 3-M group displayed an increase in locomotor activity. Additionally, during the first five minutes, 3-M mice displayed an increase in time spent in the centre part of the open field. This last measurement is considered to reflect anxiety level [48,58–60]. Of note, mice were tested in a darkened room that could decrease the anxiety effect of the centre part in comparison with a classical lighted room [48]. Besides, the time spent in centre part of the open field can also be considered to be related to behavioural inhibition. Indeed, a longer time spent in the centre part is reflective of a decrease in behavioural inhibition [61]. For example, an increased locomotion and longer time spent in the centre zone of the open field has been observed in mice submitted to a chronic stress [62]. Thence, instead of concluding to a decrease of anxiety level, a potential alteration of behavioural inhibition could underlie the increased time spent in the centre of the open field. The novelty effect present in the open field, which measures anxiety/inhibition, may be more relevant during the first part of the test [63]. That could explain the progressive disappearance of significant differences in the time spent in centre of the open field between groups according to time in the open field. However, time spent in centre zone of the open field is usually measured for 5min [48,58]. Using the 30min test for the assessment of distance travelled (spontaneous activity) and only the first 5min for the time spent in centre zone (anxiety-related behaviour) remains consistent.

Unexpectedly, we did not observe a social preference in the sociability test whatever the group considered, and neither differences between groups. This was not expected for the control group given that C57BL/6 mice are supposed to be able to discriminate the side containing the congener from the empty one with a similar protocol [64]. Our results can be explained by our testing apparatus that differed slightly from that used by Moy and collaborators [64] (a compartment separated by a drilled transparent wall versus small grid cages containing the stimulus mouse). Moreover, the stimulus mice used came from the same animal facility, possibly rendering the olfactory discrimination not obvious or attractive enough.

To determine the cognitive status of animals, working and recognition memories capacities were appraised through spontaneous alternation, novel object recognition and social recognition tests. In the spontaneous alternation test, although no group difference was evidenced, the 3-M group showed working memory impairments, in comparison with a random level (as well as the MAP6^{+/-} group, the MK801 group only shows a trend). Working memory deficit is amongst the core cognitive symptoms in schizophrenia patients [65,66] and thus necessarily sought in animal models of this disease [6,7,67]. We did observe deficits in social but not in object recognition memory in the 3-M group. Long-term memory impairments are less frequently reported in schizophrenic patients than working memory deficits [68,69] and in animal models as well [67]. Therefore, deficits in working memory (rather than

3. Résultats

in long-term memory) appear as a stronger indicator of the face validity of an animal model of schizophrenia. Quite interestingly, MK801 animals did display a deficit in the novel object recognition test. Thus, it could be that either MAP6 partial deletion, maternal separation or both, have afforded 3-M mice to present a kind of resilience that preserves recognition memory performances. At least for maternal separation, such beneficial effect has already been reported, with notably a positive impact on the long-term object location test [70,71].

Surprisingly, sociability of the MS group did not differ from the control group. Several arguments can be proposed to explain this absence of difference. Thus, while we used female C57BL/6 mice, the experiment from Bouet and colleagues was performed on NMRI male mice [26]. Further, Bondar and colleagues showed an increase sociability in female C57BL/6 submitted to a maternal separation protocol [72]. However, the experimental protocol of maternal separation reported by Bondar, was quite different. Indeed, contrarily to the 24h single separation protocol we used, Bondar and colleagues performed repeated and short (3h) daily separations (PND2 to PND14) [72]. Regarding the cognitive assessment, we reported no deficit either in recognition or working memory, as observed for spontaneous alternation by Bouet and colleagues with the same protocol [26]. A deficit in recognition memory has been previously described using the novel object recognition test in rats submitted to a 24h maternal separation protocol at PND9 [73,74] as well as in C57BL/6 male mice after a chronic maternal separation protocol (3h per day, from PND1 to PND21) [75]. Differences in animal model, separation protocol and/or sex could account for this discrepancy.

The late factor was a chronic administration of MK801 ranging from 0.2 to 0.3mg/kg in rodents, described as a pharmacological way to induce schizophrenia-like phenotype [76–78] (see per reviews [11,38]). Such administrations induce several behavioural modifications in rodents, mimicking positive-like phenotype with hyperlocomotion and stereotypies [79,80], negative-like phenotype with decreased social interactions [40,81,82] and cognitive deficits with impairments of working, long-term, and spatial memory [40,81,83] (see per review [84]). Herein, a low, sub efficient, dose of MK801 (0.05mg/kg) was chosen to avoid a direct effect, but to allow possible synergistic effects with other factors. Thonnard and colleagues used 0.1mg/kg (i.p. acute administration), considered as a “relatively low-dose” and demonstrated weak effects on locomotion and cognition [41]. Besides, using the same strain, sex and administration protocol, Wu and colleagues reported that a dose above 0.1mg/kg induced an increased locomotor activity [42]. In a chronic protocol similar to ours, five days of 0.3 or 0.6mg/kg i.p., MK801 administration did not disturb locomotion or cognition in male mice except for some specific variables (decrease number of rearings and time exploring displaced objects in object recognition task) with the highest dose [85]. Surprisingly, a low dose of MK801 chronic administration at 0.05mg/kg induced object and social recognition deficits in our experiment, as well as working memory deficits (in the spontaneous alternation task). Deficits observed after MK801 administration with such a low dose, not reported elsewhere, could be explained by the sex of mice. Indeed, an increased sensitivity to MK801 administration has been showed in female rats compared to male in a locomotor test [47]. However, no sex differences were found in mice concerning cognitive performances after MK801 administration [86]. Whatever the sex of mice, acute i.p. administration of 0.05mg/kg MK801 did not modify locomotion [87–92]. Moreover, increased locomotion and stereotypies appears in C57BL/6 male mice only from 0.3mg/kg after i.p. acute administration [42]. While acute 0.05mg/kg of MK801 is enough to induce memory deficits in the novel object recognition test in rats [93–95], a minimal dose of 0.2mg/kg seems necessary to induce such deficits in mice [39,43]. However, lack of effect of chronic i.p. administration of 0.25mg/kg of MK801 (7 days) has been shown by Rodrigues Da Silva in C57BL/6 mice in social interaction and novel object recognition tests [40]. Even if we did not expect any change in locomotor activity, the effect of MK801 chronic administration could be explained by the experimental design of our study. Indeed, in da Silva and colleagues study, mice were tested in the novel object recognition test 14 days after the last injection [40]. In the present study, we started to test mice the day after the last MK801 injection and deficits appeared in social novelty preference and novel object recognition tests. The behavioural effects of chronic MK801 administration seem therefore to be time-dependent. Indeed, while a low dose (0.05mg/kg) induced deficits the day after the last administration in the present study, and a stronger dose (0.25mg/kg) did not induce a deficit 14 days after the last administration [40]. Repeating behavioural assessment 2 weeks after the end of treatment could be interesting to understand how the duration of the washout period affects behavioural results.

3. Résultats

This single-sex study would be strengthened by a sex comparison, as suggested by several authors for research on animal models of schizophrenia [96–101]. Moreover, male mice could display a different phenotype, as regard to the gender differences in schizophrenic patients and in other animal models of schizophrenia [96,102].

5. Conclusion

Behavioural data revealed a synergistic effect of the three factors, which is consistent with the multifactorial aetiology of schizophrenia and brings a strong construct validity to the 3-M model. 3-M mice showed positive-like phenotype (hyperlocomotion) and cognitive deficits (working memory and social recognition).

Further behavioural investigations, particularly sensorimotor gating, a key component of schizophrenia-like phenotype need to be performed. Moreover, the study of 2-hit groups will bring supplementary information about factors interact to induce the synergistic effect. Our study therefore suggests that the 3-M model is powerful as a new model of neurodevelopmental disorder with a strong construct validity, according to the multifactorial nature of the schizophrenia pathology, and a promising face validity.

CRedit author statement:

Solenn Percelay: Writing- Original draft preparation, Formal analysis, Methodology

Nicole Turnbull: Data Curation, Writing - review & editing

Thomas Freret: Conceptualization, Writing - review & editing

Valentine Bouet: Conceptualization, Writing - review & editing, Methodology, Supervision

Michel Boulouard: Conceptualization, Writing - review & editing, Methodology, Supervision

Declarations of interest: none

Funding

This work was supported by the University of Caen Normandy, Normandy Region, INSERM and UNAFAM/FRC.

References

- [1] J. Addington, D. Addington, E. Maticka-Tyndale, Cognitive functioning and positive and negative symptoms in schizophrenia, *Schizophr. Res.* 5 (1991) 123–134. [https://doi.org/10.1016/0920-9964\(91\)90039-T](https://doi.org/10.1016/0920-9964(91)90039-T).
- [2] R.S. Kahn, I.E. Sommer, R.M. Murray, A. Meyer-Lindenberg, D.R. Weinberger, T.D. Cannon, M. O'Donovan, C.U. Correll, J.M. Kane, J. Van Os, T.R. Insel, Schizophrenia, *Nat. Rev. Dis. Prim.* 1 (2015). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.67>.
- [3] A.K. Rajagopalan, W.K. Bache, S.Z. Chen, E. Bojdani, K.J. Li, New-generation Antipsychotics and Cardiovascular Risk, *Curr. Treat. Options Psychiatry.* 6 (2019) 154–163. <https://doi.org/10.1007/s40501-019-00173-z>.
- [4] R. Tandon, Safety and tolerability: How do newer generation “atypical” antipsychotics compare?, *Psychiatr. Q.* 73 (2002) 297–311. <https://doi.org/10.1023/A:1020464017021>.
- [5] A. Khan, S.B. Powell, Sensorimotor Gating Deficits in “Two-Hit” Models of Schizophrenia Risk Factors, *Schizophr Res.* 198 (2018) 68–83. <https://doi.org/doi:10.1016/j.schres.2017.10.009>.
- [6] P. Moran, J. Stokes, J. Marr, G. Bock, L. Desbonnet, J. Waddington, C. O'Tuathaigh, Gene × Environment Interactions in Schizophrenia: Evidence from Genetic Mouse Models, *Neural Plast.* (2016). <https://doi.org/10.1155/2016/2173748>.
- [7] R. Sultana, C.C. Lee, Expression of Behavioral Phenotypes in Genetic and Environmental Mouse Models of Schizophrenia, *Front. Behav. Neurosci.* 14 (2020) 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.00029>.
- [8] J. Chen, Z. Wang, M. Li, Multiple “hits” during postnatal and early adulthood periods disrupt the normal development of sensorimotor gating ability in rats, *J. Psychopharmacol.* 25 (2011) 379–392. <https://doi.org/10.1177/0269881109354929>.
- [9] G. Kekesi, Z. Petrovszki, G. Benedek, G. Horvath, Sex-specific alterations in behavioral and cognitive functions in a “three hit” animal model of schizophrenia, *Behav. Brain Res.* 284 (2015) 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.02.015>.

3. Résultats

- [10] V. Bouet, S. Percelay, E. Leroux, B. Diarra, M. Léger, N. Delcroix, A. Andrieux, S. Dollfus, T. Freret, M. Boulouard, A new 3-hit mouse model of schizophrenia built on genetic, early and late factors, *Schizophr. Res.* (2020). <https://doi.org/10.1016/j.schres.2020.11.043>.
- [11] V. Bouet, M. Boulouard, T. Freret, *Animal Models of Schizophrenia: An Update Advances in Schizophrenia Research*, *Adv. Schizophr. Res.* (2016) 10. www.openaccessbooks.com.
- [12] M.J. Millan, A. Andrieux, G. Bartzokis, K. Cadenhead, P. Dazzan, P. Fusar-Poli, J. Gallinat, J. Giedd, D.R. Grayson, M. Heinrichs, R. Kahn, M.O. Krebs, M. Leboyer, D. Lewis, O. Marin, P. Marin, A. Meyer-Lindenberg, P. McGorry, P. McGuire, M.J. Owen, P. Patterson, A. Sawa, M. Spedding, P. Uhlhaas, F. Vaccarino, C. Wahlestedt, D. Weinberger, Altering the course of schizophrenia: Progress and perspectives, *Nat. Rev. Drug Discov.* 15 (2016) 485–515. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.28>.
- [13] J. Davis, H. Eyre, F.N. Jacka, S. Dodd, O. Dean, S. McEwen, M. Debnath, J. McGrath, M. Maes, P. Amminger, P.D. McGorry, C. Pantelis, M. Berk, A review of vulnerability and risks for schizophrenia: Beyond the two hit hypothesis, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 65 (2016) 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.03.017>.
- [14] C. Wilson, A. V. Terry, Neurodevelopmental animal models of schizophrenia: Role in novel drug discovery and development, *Clin. Schizophr. Relat. Psychoses.* 4 (2010) 124–137. <https://doi.org/10.3371/CSRP.4.2.4>.
- [15] B.A. Ellenbroek, Animal models in the genomic era: Possibilities and limitations with special emphasis on schizophrenia, *Behav. Pharmacol.* 14 (2003) 409–417. <https://doi.org/10.1097/01.fbp.0000087736.21047.3c>.
- [16] H. Shimizu, Y. Iwayama, K. Yamada, T. Toyota, Y. Minabe, K. Nakamura, M. Nakajima, E. Hattori, N. Mori, N. Osumi, T. Yoshikawa, Genetic and expression analyses of the STOP (MAP6) gene in schizophrenia, *Schizophr. Res.* 84 (2006) 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2006.03.017>.
- [17] K.H. Choi, M.E. Zepp, B.W. Higgs, C.S. Weickert, M.J. Webster, Expression profiles of schizophrenia susceptibility genes during human prefrontal cortical development, *J. Psychiatry Neurosci.* 34 (2009) 450–458.
- [18] C. Bouvrais-Veret, S. Weiss, N. Hanoun, A. Andrieux, A. Schweitzer, D. Job, M. Hamon, B. Giros, M.P. Martres, Microtubule-associated STOP protein deletion triggers restricted changes in dopaminergic neurotransmission, *J. Neurochem.* 104 (2008) 745–756. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05025.x>.
- [19] E. Brenner, U. Sonnewald, A. Schweitzer, A. Andrieux, A. Nehlig, Hypoglutamatergic Activity in the STOP Knockout Mouse: a Potential Model for Chronic Untreated Schizophrenia, *J. Neurosci. Res.* 85 (2007) 3487–3493 (2007). <https://doi.org/10.1002/jnr>.
- [20] J.C. Deloulme, S. Gory-Fauré, F. Mauconduit, S. Chauvet, J. Jonckheere, B. Boulan, E. Mire, J. Xue, M. Jany, C. Maucler, A.A. Deparis, O. Montigon, A. Daoust, E.L. Barbier, C. Bosc, N. Deglon, J. Brocard, E. Denarier, I. Le Brun, K. Pernet-Gallay, I. Vilgrain, P.J. Robinson, H. Lahrech, F. Mann, A. Andrieux, Microtubule-associated protein 6 mediates neuronal connectivity through Semaphorin 3E-dependent signalling for axonal growth, *Nat. Commun.* 6 (2015). <https://doi.org/10.1038/ncomms8246>.
- [21] A. Andrieux, P.A. Salin, M. Vernet, P. Kujala, J. Baratier, S. Gory-Fauré, C. Bosc, H. Pointu, D. Proietto, A. Schweitzer, E. Denarier, J. Klumperman, D. Job, The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders, *Genes Dev.* 16 (2002) 2350–2364. <https://doi.org/10.1101/gad.223302>.
- [22] A. Merenlender-Wagner, R. Pikman, E. Giladi, A. Andrieux, I. Gozes, NAP (davunetide) enhances cognitive behavior in the STOP heterozygous mouse-A microtubule-deficient model of schizophrenia, *Peptides.* 31 (2010) 1368–1373. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.04.011>.
- [23] J. Volle, J. Brocard, M. Saoud, S. Gory-Faure, J. Brunelin, A. Andrieux, M.F. Suaud-Chagny, Reduced expression of STOP/MAP6 in mice leads to cognitive deficits, *Schizophr. Bull.* 39 (2013) 969–978. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbs113>.
- [24] T. Kraan, E. Velthorst, F. Smit, L. de Haan, M. van der Gaag, Trauma and recent life events in individuals at ultra high risk for psychosis: Review and meta-analysis, *Schizophr. Res.* 161 (2015) 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2014.11.026>.
- [25] O. Agid, B. Shapira, J. Zislin, M. Ritsner, B. Hanin, H. Murad, T. Troudart, M. Bloch, U. Heresco-Levy, B. Lerer, Environment and vulnerability to major psychiatric illness: A case control study of early parental loss in major depression, bipolar disorder and schizophrenia, *Mol. Psychiatry.* 4 (1999) 163–172. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000473>.
- [26] V. Bouet, B. Lecrux, G. Tran, T. Freret, Effect of pre- versus post-weaning environmental disturbances on social behaviour in mice, *Neurosci. Lett.* 488 (2011) 221–224. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.11.033>.
- [27] B.A. Ellenbroek, P.T.J.M. van den Kroonenberg, A.R. Cools, The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats, *Schizophr. Res.* 30 (1998) 251–260. [https://doi.org/10.1016/S0920-9964\(97\)00149-7](https://doi.org/10.1016/S0920-9964(97)00149-7).

3. Resultats

- [28] E.M. Marco, R. Llorente, M. López-gallardo, V. Mela, Á. Llorente-berzal, C. Prada, M. Viveros, The maternal deprivation animal model revisited, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 51 (2015) 151–163. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.01.015>.
- [29] M.M. Odeon, A.E. Salatino, G.B. Acosta, Consequences of Postnatal Stress: Maternal Separation in Rats Induces Long-Lasting Changes on Glutamate Transporters, *Clin. Exp. Pharmacol.* 3 (2013). <https://doi.org/10.4172/2161-1459.1000121>.
- [30] A. Adell, Brain NMDA receptors in schizophrenia and depression, *Biomolecules.* 10 (2020) 1–27. <https://doi.org/10.3390/biom10060947>.
- [31] J. Kantrowitz, D.C. Javitt, Glutamatergic transmission in schizophrenia: from basic research to clinical practice, *Curr. Opin. Psychiatry* 25 (2012) 96–102. <https://doi.org/doi:10.1097/YCO.0b013e32835035b2>.
- [32] Y. Liu, D. Lin, B. Wu, W. Zhou, Ketamine abuse potential and use disorder, *Brain Res. Bull.* 126 (2016) 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.05.016>.
- [33] R.C. Roberts, L.A. McCollum, K.E. Schoonover, S.J. Mabry, J.K. Roche, A.C. Lahti, Ultrastructural evidence for glutamatergic dysregulation in schizophrenia, *Schizophr. Res.* (2020). <https://doi.org/10.1016/j.schres.2020.01.016>.
- [34] C. Stevenson, Ketamine: a review, *Updat. Anaesth.* 20 (2005) 25–29.
- [35] S.S. Kalsi, D.M. Wood, P.I. Dargan, The epidemiology and patterns of acute and chronic toxicity associated with recreational ketamine use, *Emerg. Health Threats J.* 4 (2011). <https://doi.org/10.3402/ehth.v4i0.7107>.
- [36] A.R. Powers, M.G. Gancsos, E.S. Finn, P.T. Morgan, P.R. Corlett, Ketamine-Induced Hallucinations, *Psychopathology.* 48 (2015) 376–385. <https://doi.org/10.1159/000438675>.
- [37] K. Beck, G. Hindley, F. Borgan, C. Ginestet, R. McCutcheon, S. Brugger, N. Driesen, M. Ranganathan, D.C. D'Souza, M. Taylor, J.H. Krystal, O.D. Howes, Association of Ketamine With Psychiatric Symptoms and Implications for Its Therapeutic Use and for Understanding Schizophrenia: A Systematic Review and Meta-analysis, *JAMA Netw. Open.* 3 (2020) e204693. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.4693>.
- [38] D. Cadinu, B. Grayson, G. Podda, M.K. Harte, N. Doostdar, J.C. Neill, NMDA receptor antagonist rodent models for cognition in schizophrenia and identification of novel drug treatments, an update, Elsevier Ltd, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.11.045>.
- [39] M. Nilsson, S. Hansson, A. Carlsson, M.L. Carlsson, Differential effects of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 on different stages of object recognition memory in mice, 149 (2007) 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.07.019>.
- [40] N.R. da Silva, F.V. Gomes, A.B. Sonego, N.R. da Silva, F.S. Guimarães, Cannabidiol attenuates behavioral changes in a rodent model of schizophrenia through 5-HT_{1A}, but not CB₁ and CB₂ receptors, *Pharmacol. Res.* 156 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104749>.
- [41] D. Thonnard, E. Dreesen, Z. Callaerts-Vegh, R. D'Hooge, NMDA receptor dependence of reversal learning and the flexible use of cognitively demanding search strategies in mice, *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry.* 90 (2019) 235–244. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.12.003>.
- [42] J. Wu, H. Zou, J.A. Strong, J. Yu, X. Zhou, Q. Xie, G. Zhao, M. Jin, L. Yu, Bimodal effects of MK-801 on locomotion and stereotypy in C57BL/6 mice, *Psychopharmacology (Berl).* 177 (2005) 256–263. <https://doi.org/10.1007/s00213-004-1944-1>.
- [43] J.C. Neill, S. Barnes, S. Cook, B. Grayson, N.F. Idris, S.L. McLean, S. Snigdha, L. Rajagopal, M.K. Harte, Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia: Focus on NMDA receptor antagonism, *Pharmacol. Ther.* 128 (2010) 419–432. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.07.004>.
- [44] I.R. Winship, S.M. Dursun, G.B. Baker, P.A. Balista, L. Kandratavicius, J.P. Maia-de-Oliveira, J. Hallak, J.G. Howland, An Overview of Animal Models Related to Schizophrenia, *Can. J. Psychiatry.* 64 (2019) 5–17. <https://doi.org/10.1177/0706743718773728>.
- [45] H. Arakawa, Ethological approach to social isolation effects in behavioral studies of laboratory rodents, *Behav. Brain Res.* 341 (2018) 98–108. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.12.022>.
- [46] K. Kondrakiewicz, M. Kostecki, W. Szadzińska, E. Knapska, Ecological validity of social interaction tests in rats and mice, *Genes, Brain Behav.* 18 (2019) 1–14. <https://doi.org/10.1111/gbb.12525>.
- [47] P. Andiné, N. Widermark, R. Axelsson, G. Nyberg, U. Olofsson, E. Mårtensson, M. Sandberg, Characterization of MK-801-induced behavior as a putative rat model of psychosis, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290 (1999) 1393–1408.
- [48] L. Prut, C. Belzung, The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review, *Eur. J. Pharmacol.* 463 (2003) 3–33. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01272-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X).
- [49] M.A. Bazin, L. El Kihel, M. Boulouard, V. Bouët, S. Rault, The effects of DHEA, 3 β -hydroxy-5 α -androstane-6,17-dione, and 7-amino-DHEA analogues on short term and long term memory in the mouse, *Steroids.* 74 (2009) 931–937. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2009.06.010>.

3. Résultats

- [50] T. Freret, V. Lelong-boulouard, P. Lecouflet, K. Hamidouche, F. Dauphin, M. Boulouard, Co-modulation of an allosteric modulator of nicotinic receptor-cholinesterase inhibitor (galantamine) and a 5-HT₄ receptor agonist (RS-67333): effect on scopolamine-induced memory deficit in the mouse, *Psychopharmacology (Berl)*. 234 (2017) 2365–2374. <https://doi.org/10.1007/s00213-017-4664-z>.
- [51] S.S. Moy, J.J. Nadler, N.B. Young, R.J. Nonneman, A.W. Grossman, D.L. Murphy, A.J. D'Ercole, J.N. Crawley, T.R. Magnuson, J.M. Lauder, Social approach in genetically engineered mouse lines relevant to autism, *Genes, Brain Behav.* 8 (2009) 129–142. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2008.00452.x>.
- [52] S. Percelay, M. Since, S. Lagadu, T. Freret, V. Bouet, M. Boulouard, Antipsychotic lurasidone: Behavioural and pharmacokinetic data in C57BL/6 mice, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 194 (2020) 172933. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2020.172933>.
- [53] J.N. Ferguson, J.M. Aldag, T.R. Insel, L.J. Young, Oxytocin in the Medial Amygdala is Essential for Social Recognition in the Mouse, 21 (2001) 8278–8285.
- [54] A.H. Macbeth, J.S. Edds, W.S. Young, Housing conditions and stimulus females: a robust social discrimination task for studying male rodent social recognition, *Nat. Protoc.* 4 (2011) 1574–1581. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.141>.
- [55] M. Leger, A. Quiedeville, V. Bouet, B. Haelewyn, M. Boulouard, P. Schumann-Bard, T. Freret, Object recognition test in mice, *Nat. Protoc.* 8 (2013) 2531–2537. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.155>.
- [56] B. Grayson, M. Leger, C. Piercy, L. Adamson, M. Harte, J.C. Neill, Assessment of disease-related cognitive impairments using the novel object recognition (NOR) task in rodents, *Behav. Brain Res.* 285 (2015) 176–193. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.10.025>.
- [57] C.S. Hall, Drive and emotionality: factors associated with adjustment in the rat, *J. Comp. Psychol.* 17 (1934) 89–108. <https://doi.org/10.1037/h0073676>.
- [58] N. Sestakova, A. Puzserova, M. Kluknavsky, I. Bernatova, Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: Methodological aspects and role of nitric oxide, *Interdiscip. Toxicol.* 6 (2013) 126–135. <https://doi.org/10.2478/intox-2013-0020>.
- [59] L. Sun, L. Min, H. Zhou, M. Li, F. Shao, W. Wang, Adolescent social isolation affects schizophrenia-like behavior and astrocyte biomarkers in the PFC of adult rats, *Behav. Brain Res.* 333 (2017) 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.07.011>.
- [60] M.U. Woloszynowska-Fraser, P. Wulff, G. Riedel, Parvalbumin-containing GABA cells and schizophrenia: Experimental model based on targeted gene delivery through adeno-associated viruses, *Behav. Pharmacol.* 28 (2017) 630–641. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000360>.
- [61] T.B. Halene, R.S. Ehrlichman, Y. Liang, E.P. Christian, G.J. Jonak, T.L. Gur, J.A. Blendy, H.C. Dow, E.S. Brodtkin, F. Schneider, R.C. Gur, S.J. Siegel, Assessment of NMDA receptor NR1 subunit hypofunction in mice as a model for schizophrenia, *Genes, Brain Behav.* 8 (2009) 661–675. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2009.00504.x>.
- [62] H. Ito, M. Nagano, H. Suzuki, T. Murakoshi, Chronic stress enhances synaptic plasticity due to disinhibition in the anterior cingulate cortex and induces hyper-locomotion in mice, *Neuropharmacology.* 58 (2010) 746–757. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.12.011>.
- [63] E. Choleris, A.W. Thomas, M. Kavaliers, F.S. Prato, A detailed ethological analysis of the mouse open field test: Effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25 (2001) 235–260. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(01\)00011-2](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(01)00011-2).
- [64] S.S. Moy, J.J. Nadler, N.B. Young, R.J. Nonneman, S.K. Segall, G.M. Andrade, J.N. Crawley, T.R. Magnuson, Social approach and repetitive behavior in eleven inbred mouse strains, 191 (2008) 118–129. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.03.015>.
- [65] D. Piskulic, J.S. Olver, T.R. Norman, P. Maruff, Behavioural studies of spatial working memory dysfunction in schizophrenia: A quantitative literature review, *Psychiatry Res.* 150 (2007) 111–121. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2006.03.018>.
- [66] S. Takahashi, S. Ukai, A. Kose, T. Hashimoto, J. Iwatani, M. Okumura, T. Tsuji, K. Shinosaki, Reduction of cortical GABAergic inhibition correlates with working memory impairment in recent onset schizophrenia, *Schizophr. Res.* 146 (2013) 238–243. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2013.02.033>.
- [67] A. Nikiforuk, Assessment of cognitive functions in animal models of schizophrenia, *Pharmacol. Reports.* 70 (2018) 639–649. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2018.01.009>.
- [68] C.S. Carter, D.M. Barch, R.W. Buchanan, E. Bullmore, J.H. Krystal, J. Cohen, M. Geyer, M. Green, K.H. Nuechterlein, T. Robbins, S. Silverstein, E.E. Smith, M. Strauss, T. Wykes, R. Heinsen, Identifying Cognitive Mechanisms Targeted for Treatment Development in Schizophrenia: An Overview of the First Meeting of the Cognitive Neuroscience Treatment Research to Improve Cognition in Schizophrenia Initiative, *Biol. Psychiatry.* 64 (2008) 4–10. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.03.020>.
- [69] S.J. Diemel, D.A. Lewis, Neurobiology of Disease Alterations in cortical interneurons and cognitive function in schizophrenia, *Neurobiol. Dis.* (2018) 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.06.020>.

3. Résultats

- [70] N. Makena, K. Bugarith, V.A. Russell, Maternal separation enhances object location memory and prevents exercise-induced MAPK/ERK signalling in adult Sprague-Dawley rats, *Metab. Brain Dis.* 27 (2012) 377–385. <https://doi.org/10.1007/s11011-012-9298-6>.
- [71] L.S. Own, P.D. Patel, Maternal behavior and offspring resiliency to maternal separation in c57bl/6 mice, *Horm. Behav.* 63 (2013) 411–417. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.11.010>.
- [72] N.P. Bondar, A.A. Lepeshko, V. V Reshetnikov, Effects of Early-Life Stress on Social and Anxiety-Like Behaviors in Adult Mice: Sex-Specific Effects Natalya, *Behav. Neurol.* (2018).
- [73] A. Llorente-Berzal, V. Mela, E. Borcel, M. Valero, M. López-Gallardo, M.P. Viveros, E.M. Marco, Neurobehavioral and metabolic long-term consequences of neonatal maternal deprivation stress and adolescent olanzapine treatment in male and female rats, *Neuropharmacology.* 62 (2012) 1332–1341. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.07.031>.
- [74] E.M. Marco, M. Valero, O. De La Serna, B. Aisa, E. Borcel, M.J. Ramirez, M.P. Viveros, Maternal deprivation effects on brain plasticity and recognition memory in adolescent male and female rats, *Neuropharmacology.* 68 (2013) 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.08.014>.
- [75] M. Furukawa, T. Tsukahara, K. Tomita, H. Iwai, T. Sonomura, S. Miyawaki, T. Sato, Neonatal maternal separation delays the GABA excitatory-to-inhibitory functional switch by inhibiting KCC2 expression, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 493 (2017) 1243–1249. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.09.143>.
- [76] Z. Rogóż, A. Wąsik, E. Lorenc-Koci, Combined treatment with aripiprazole and antidepressants reversed some MK-801-induced schizophrenia-like symptoms in mice, *Pharmacol. Reports.* 70 (2018) 623–630. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2018.02.022>.
- [77] A.K. Kraeuter, N. Archambault, M. van den Buuse, Z. Sarnyai, Ketogenic diet and olanzapine treatment alone and in combination reduce a pharmacologically-induced prepulse inhibition deficit in female mice, *Schizophr. Res.* 212 (2019) 221–224. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2019.08.002>.
- [78] S.J. Jeon, E. Kim, J.S. Lee, H.K. Oh, J. Zhang, Y. Kwon, D.S. Jang, J.H. Ryu, Maslinic acid ameliorates NMDA receptor blockade-induced schizophrenia-like behaviors in mice, *Neuropharmacology.* 126 (2017) 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.09.014>.
- [79] I. Feinstein, M.F. Kritzer, Acute NMDA Receptor Hypofunction induced by MK801 Evokes Sex-Specific Changes in Behaviors Observed in Open Field Testing in Adult Male and Proestrus Female Rats, *Neuroscience.* 228 (2013) 200–214. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.10.026>.
- [80] A.M. Bradford, K.M. Savage, D.N.C. Jones, M. Kalinichev, Validation and pharmacological characterisation of MK-801-induced locomotor hyperactivity in BALB/C mice as an assay for detection of novel antipsychotics, *Psychopharmacology (Berl).* 212 (2010) 155–170. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-1938-0>.
- [81] M. Tanaka, A. Kunugi, A. Suzuki, N. Suzuki, M. Suzuki, H. Kimura, Preclinical characterization of AMPA receptor potentiator TAK-137 as a therapeutic drug for schizophrenia, *Pharmacol. Res. Perspect.* 7 (2019) 1–13. <https://doi.org/10.1002/prp2.479>.
- [82] P. Cieślak, A. Radulska, I. Pelikant-Matecka, A. Płoska, L. Kalinowski, J.M. Wierońska, Reversal of MK-801-induced disruptions in social interactions and working memory with simultaneous administration of LY487379 and VU152100 in mice, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20112781>.
- [83] J. Brown, L. Rueter, M. Zhang, Predictive validity of a MK-801-induced cognitive impairment model in mice: implications on the potential limitations and challenges of modeling cognitive impairment associated with schizophrenia preclinically., *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 49 (2014) 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.11.008>.
- [84] F.J. Van Der Staay, K. Rutten, C. Erb, A. Blokland, Effects of the cognition impairer MK-801 on learning and memory in mice and rats &, *Behav. Brain Res.* 220 (2011) 215–229. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.01.052>.
- [85] S. Mandillo, A. Rinaldi, A. Oliverio, A. Mele, Repeated administration of phencyclidine, amphetamine and MK-801 selectively impairs spatial learning in mice: A possible model of psychotomimetic drug-induced cognitive deficits, *Behav. Pharmacol.* 14 (2003) 533–544. <https://doi.org/10.1097/00008877-200311000-00006>.
- [86] M. Lainiola, C. Procaccini, A.M. Linden, mGluR3 knockout mice show a working memory defect and an enhanced response to MK-801 in the T- and Y-maze cognitive tests, *Behav. Brain Res.* 266 (2014) 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.03.008>.
- [87] A. Haj-Mirzaian, S. Ostadhadi, N. Kordjazy, A.R. Dehpour, S. Ejtemaei Mehr, Opioid/NMDA receptors blockade reverses the depressant-like behavior of foot shock stress in the mouse forced swimming test, *Eur. J. Pharmacol.* 735 (2014) 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.03.053>.
- [88] A. Haj-Mirzaian, S. Amiri, N. Kordjazy, M. Rahimi-Balaei, A. Haj-Mirzaian, H. Marzban, A. Aminzadeh, A.R. Dehpour, S.E. Mehr, Blockade of NMDA receptors reverses the depressant, but not anxiogenic effect of adolescence social isolation in mice, *Eur. J. Pharmacol.* 750 (2015) 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.01.006>.

3. Résultats

- [89] N. Kordjazy, A. Haj-Mirzaian, S. Amiri, S. Ostadhadi, H. Amini-Khoei, A.R. Dehpour, Involvement of N-methyl-d-aspartate receptors in the antidepressant-like effect of 5-hydroxytryptamine 3 antagonists in mouse forced swimming test and tail suspension test, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 141 (2016) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.11.009>.
- [90] S. Ostadhadi, A. Norouzi-Javidan, M. Chamanara, R. Akbarian, M. Imran-Khan, M. Ghasemi, A.R. Dehpour, Involvement of NMDA receptors in the antidepressant-like effect of tramadol in the mouse forced swimming test, *Brain Res. Bull.* 134 (2017) 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.07.016>.
- [91] E. Poleszak, S. Wośko, A. Serefko, A. Szopa, A. Właż, B. Szewczyk, G. Nowak, P. Właż, Effects of ifenprodil on the antidepressant-like activity of NMDA ligands in the forced swim test in mice, *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry.* 46 (2013) 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.06.001>.
- [92] M. van den Buuse, J.K. Low, P. Kwek, S. Martin, A. Gogos, Selective enhancement of NMDA receptor-mediated locomotor hyperactivity by male sex hormones in mice, *Psychopharmacology (Berl)*. 234 (2017) 2727–2735. <https://doi.org/10.1007/s00213-017-4668-8>.
- [93] M. V. King, A.J. Sleight, M.L. Woolley, I.A. Topham, C.A. Marsden, K.C.F. Fone, 5-HT₆ receptor antagonists reverse delay-dependent deficits in novel object discrimination by enhancing consolidation - An effect sensitive to NMDA receptor antagonism, *Neuropharmacology.* 47 (2004) 195–204. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.03.012>.
- [94] M.N.M. De Lima, D.C. Laranja, E. Bromberg, R. Roesler, N. Schröder, Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats, *Behav. Brain Res.* 156 (2005) 139–143. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.05.016>.
- [95] J.C. Neill, S. Barnes, S. Cook, B. Grayson, N.F. Idris, S.L. McLean, S. Snigdha, L. Rajagopal, M.K. Harte, Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia: Focus on NMDA receptor antagonism, *Pharmacol. Ther.* 128 (2010) 419–432. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.07.004>.
- [96] M. Leger, J.C. Neill, A systematic review comparing sex differences in cognitive function in schizophrenia and in rodent models for schizophrenia, implications for improved therapeutic strategies, *Neurosci Biobehav Rev.* 68 (2016) 979–1000. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.06.029>.
- [97] A. Eltokhi, B. Kurpiers, C. Pitzer, Behavioral tests assessing neuropsychiatric phenotypes in adolescent mice reveal strain- and sex-specific effects, *Sci. Rep.* 10 (2020) 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67758-0>.
- [98] N. Goel, T.L. Bale, Examining the intersection of sex and stress in modelling neuropsychiatric disorders, *J. Neuroendocrinol.* 21 (2009) 415–420. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2009.01843.x>.
- [99] B.J. Prendergast, K.G. Onishi, I. Zucker, Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 40 (2014) 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.01.001>.
- [100] R.M. Shansky, C.S. Woolley, Considering sex as a biological variable will be valuable for neuroscience research, *J. Neurosci.* 36 (2016) 11817–11822. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1390-16.2016>.
- [101] R.A. Hill, Sex differences in animal models of schizophrenia shed light on the underlying pathophysiology, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 67 (2016) 41–56. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.10.014>.
- [102] R.E. Gur, R.G. Petty, B.I. Turetsky, R.C. Gur, Schizophrenia throughout life: Sex differences in severity and profile of symptoms, *Schizophr. Res.* 21 (1996) 1–12. [https://doi.org/10.1016/0920-9964\(96\)00023-0](https://doi.org/10.1016/0920-9964(96)00023-0).

3. Résultats

3.3.2.1 Résultats complémentaires

Une étude immunohistochimique a été réalisée afin de quantifier la densité des interneurons GABAergiques à parvalbumine dans l'hippocampe et le cortex préfrontal (voir Figure 39).

Les effectifs utilisés dans cette étude sont présentés dans le Tableau 4. Nous avons utilisé cinq groupes : un groupe témoin (« *control* »), trois groupes 1-hit (délétion partielle du gène MAP6 : « MAP6+/- » ; séparation maternelle : « MS » ; administration de MK801 : « MK801 »), et un groupe à trois facteurs (délétion partielle du gène MAP6, séparation maternelle, administration de MK801 : « 3-M »).

Tableau 4 : Effectifs utilisés lors du protocole d'immunohistochimie réalisé après la caractérisation comportementale du modèle 3-M (article 5).

Groupes	HD	HV	CPF
Control	6	7	8
MAP6+/-	5	5	4
MS	10	8	11
MK801	8	8	8
3-M	8	7	6

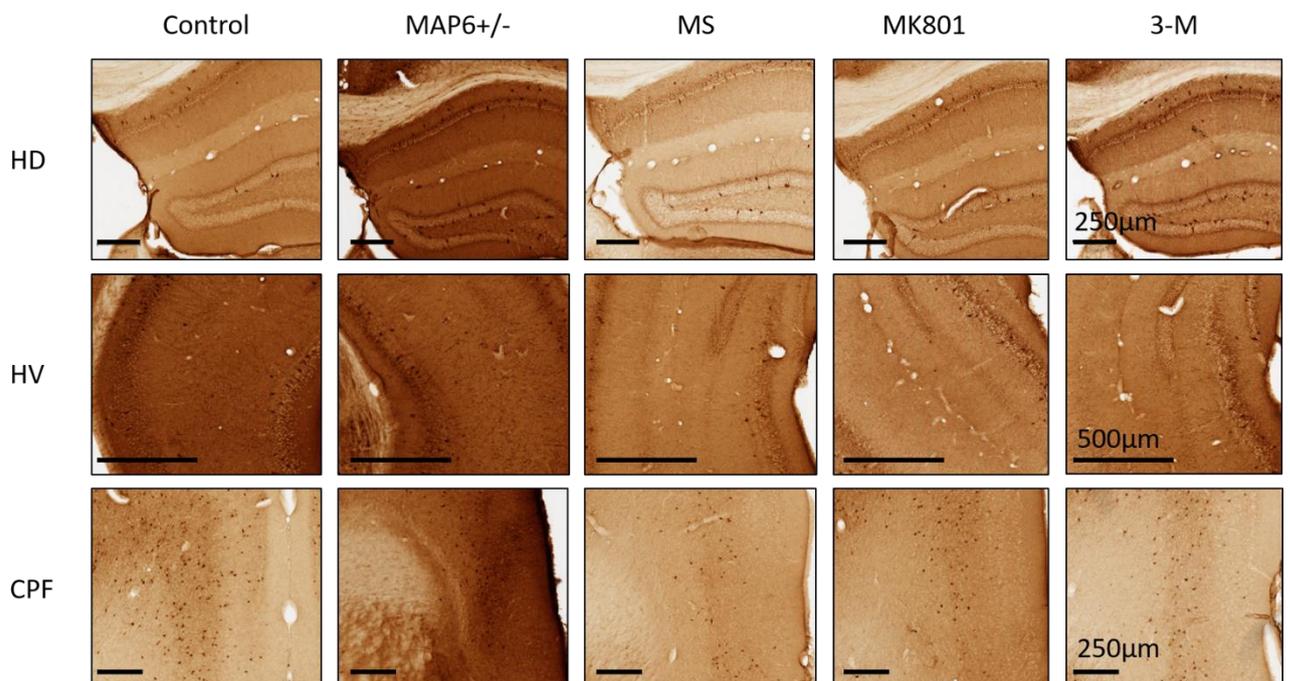


Figure 39 : Photographies illustrant l'immunoréactivité à la parvalbumine dans l'hippocampe dorsal (HD), l'hippocampe ventral (HV) et le cortex préfrontal (CPF) pour les 5 groupes expérimentaux.

3. Résultats

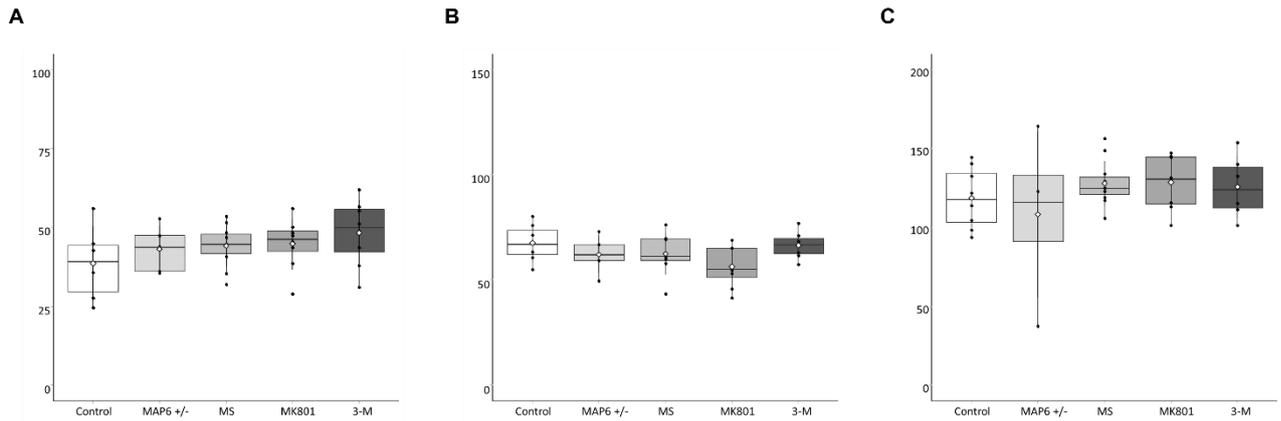


Figure 40 : Densité de neurones GABAergiques à parvalbumine (exprimée en neurones / mm²) dans l'hippocampe dorsal (A), l'hippocampe ventral (B) et le cortex préfrontal (C). Boîtes à moustache dont les lignes noires horizontales représentent la médiane et les premier et troisième quartiles, les lignes extérieures représentent la gamme des résultats ou 1,5 fois la longueur de boîte à moustaches à partir de la médiane. Les losanges blancs montrent les moyennes.

Aucune différence intergroupe n'a été décelée concernant les densités de neurones GABAergiques à parvalbumine dans l'hippocampe et le cortex préfrontal (ANOVAs, $p > 0.05$) (voir Figure 40).

3.3.2.2 Résumé de l'article 5

L'étude comportementale d'un autre modèle multifactoriel de schizophrénie 3-M (dont le facteur pharmacologique tardif diffère du modèle du modèle 3-hit) a montré un effet de synergie des 3 facteurs, et non une addition des déficits observés chez les animaux soumis à un seul facteur.

Dans le but de connaître l'importance du facteur génétique, nous avons choisi de le modifier en remplaçant la délétion partielle du gène MAP6 par une autre modification génétique : la délétion totale du gène de la sérine racémase (SR). Un modèle de schizophrénie à deux facteurs (SR KO et séparation maternelle (MS pour « *maternal separation* »)) a été caractérisé en évaluant l'effet de chaque facteur indépendamment et en association. Cette étude préliminaire est présentée dans le poster suivant.

3. Résultats

3.3.3 Poster : Altering glutamate transmission in combination with an early post-natal stress to mimic schizophrenia in male and female mice

François Ménager, Solenn Percelay, Thomas Freret, Michel Boulouard, Jean-Marie Billard, Valentine Bouet

Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, COMETE, GIP CYCERON, 14000 Caen, France

Journée Normande de Recherche biomédicale. 2019.

3. Résultats

Altering glutamate transmission in combination with an early post-natal stress to mimic schizophrenia in male and female mice



F. Menager, S. Percelay, T. Freret, M. Boulouard, JM. Billard, V. Bouet
Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, COMETE, GIP CYCERON, 14000 Caen, France



Schizophrenia

1% population, onset 15-25 years
Multifactorial: genetic x environmental factors
Symptoms: positive, negative, cognitive
Debilitating disease → heavy costs

Treatments: not efficient on negative and cognitive symptoms, multiple side-effects

Crucial need to refine treatments

- Improving validity of animal models of schizophrenia
- Combining genetic x environmental factors

Total Serine racemase deletion
Coyle et al., 2018



Maternal separation
PND9-24h

Ellenbroek et al., 1998; Bouet et al., 2011



C57Bl6 male and female mice

Altered glutamate transmission:

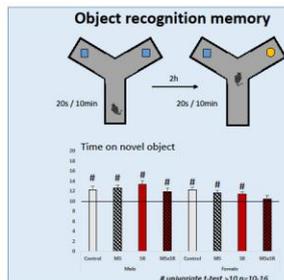
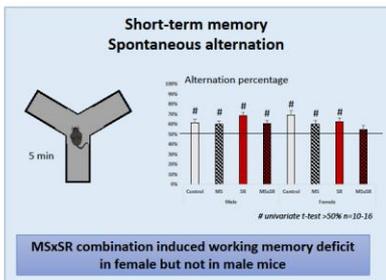
➢ Serine racemase KO mice *SRKO*

Early stress:

➢ Maternal separation *MS*

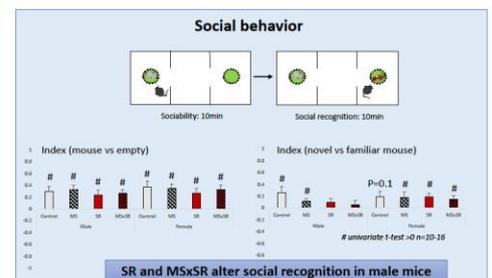
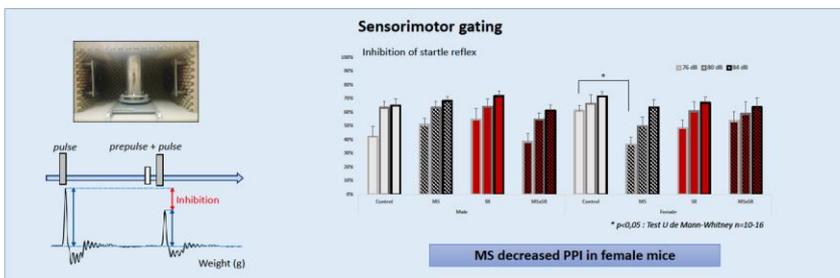
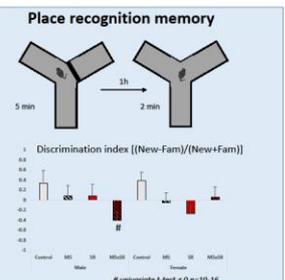
Behavioural testing

- Anxiety-like behavior
- Short and long-term memory
- Social behavior
- Sensory-motor gating



Object recognition: MSxSR combination altered performances in female mice

Place recognition: MSxSR combination altered performances in male mice



Summary of the results

1-hit
SR

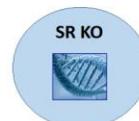


- Locomotor activity in all experiments
- Place recognition
- Social recognition

1-hit
MS



- Place recognition
- Prepulse Inhibition



2-hit

X



- Activity
- Social recognition in male mice
- Working memory in female mice
- PPI in female mice
- Anxiety-related behavior
- Place recognition performances
- Object recognition performances in female mice
- Neophobia in males

2-hit animal models gathers several deficits considered as hallmarks of schizophrenia.

Serine racemase deletion induces an **increase in activity**, promotes **social memory troubles**, and contributes to a **higher sensitivity** to maternal separation.

Maternal separation mostly contributes to **sensorimotor gating deficits**.

2-hit model differentially affect males and females.

Because some deficits (working memory, object recognition, social recognition) appears only in 2-hit mice, combining factors may help in improving validity of animal models of schizophrenia.

Moreover, combining factors reveals differences between males and females, probably accounting for gender vulnerability/resilience differences.

3.3.3.1 Résumé du poster

Cette étude complémentaire réalisée par François Ménager (Master 2) a eu pour but d'évaluer le phénotype comportemental d'un nouveau modèle de schizophrénie à deux facteurs (2-hit) : une délétion totale du gène SR (Coyle & Balu, 2018) associée à une séparation maternelle de 24h à PND9 (Bouet et al., 2011; Ellenbroek et al., 1998). Une évaluation comportementale comprenant des tests de mémoire (de travail avec le test d'alternance spontanée, de reconnaissance d'objet et de reconnaissance de place), des tests de sociabilité (test d'approche / évitement pour évaluer la sociabilité et la reconnaissance sociale) et une mesure de l'inhibition du réflexe de sursaut avec le test du PPI. L'activité motrice a également été évaluée dans les tests de mémoire et de sociabilité. Des animaux 2-hit ont été utilisés et chaque facteur a également été évalué indépendamment.

Cette étude a permis de montrer certaines altérations comportementales chez les animaux ne présentant qu'un facteur. En effet, la séparation maternelle (MS) diminue l'inhibition du réflexe de sursaut chez les femelles ; la délétion du gène SR altère la reconnaissance sociale chez les mâles. Un phénomène de synergie entre les deux facteurs apparaît puisque certains déficits ne sont observés qu'avec la combinaison de la délétion du gène SR et la MS. On observe dans le groupe 2-hit un déficit de mémoire de travail et de mémoire de reconnaissance uniquement chez les femelles ; une préférence pour le bras familier lors du test de reconnaissance de place d'objet uniquement chez les mâles.

Cette étude met aussi en évidence une augmentation de la résilience avec l'ajout de facteurs. Le test du PPI montre cet effet avec une diminution de l'inhibition chez les animaux MS mais pas chez les animaux 2-hit.

L'intérêt d'utiliser les deux sexes lors de l'étude de modèles de schizophrénie est à nouveau conforté par les différences observées ici.

3.3.4 Résumé de l'évaluation de la validité de construction

La validité de construction a été évaluée en étudiant certains facteurs séparément et en comparant plusieurs modèles multifactoriels élaborés au laboratoire. Nous avons montré que certaines altérations présentes dans le modèle 3-hit apparaissent grâce à un effet de synergie. C'est le cas de la réduction du volume de l'hippocampe, visible chez les souris 3-hit, alors que la délétion génétique partielle d'une part et l'association d'une séparation maternelle et de l'administration de THC d'autre part, n'induisent pas cette diminution (Bouet et al., 2020; Powell et al., 2007). La comparaison de plusieurs modèles multifactoriels, notamment les modèles 3-hit et 3-M qui ne diffèrent que par le facteur pharmacologique, permet d'associer certains types de symptômes à une modification d'un système de neurotransmission. Ainsi, c'est dans le modèle 3-M que la transmission glutamatergique a été altérée (par le MK801) et que l'on retrouve des symptômes de type positif.

Dans la littérature, les autres modèles à trois facteurs qui ont été rapportés ont été effectués chez le rat pour deux d'entre eux (Chen et al., 2011; Kekesi et al., 2015), ce qui rend difficile une comparaison directe. Un autre modèle à trois facteurs chez la souris, construit selon la même organisation que nos modèles 3-hit et 3-M, a permis de mettre en évidence certaines altérations similaires à celles que nous avons observé (notamment le déficit d'inhibition du réflexe de sursaut observé dans le test du PPI) (Sultana & Lee, 2020). Ce type de modèle ouvre une nouvelle voie prometteuse pour l'avancée des recherches sur la schizophrénie.

Une discussion autour de l'impact de chaque facteur, ainsi que leurs interactions, dans les modèles multifactoriels de schizophrénie est développée dans le chapitre « Discussion générale ».

3. Résultats

3.4 Les modalités d'une validation de prédiction

Après avoir étudié les validités d'apparence et de construction d'un modèle multifactoriel de schizophrénie chez les souris C57BL/6, nous nous sommes intéressés à sa validité de prédiction. En effet, la pertinence d'un modèle doit-être évaluée par la capacité des molécules déjà présentes sur le marché à réduire ou supprimer les symptômes observés chez ce modèle. Un modèle de schizophrénie est donc jugé comme valide d'un point de vue pharmacologique si les symptômes mesurés sont améliorés par l'administration d'un antipsychotique de référence.

Comme décrit dans l'introduction, les antipsychotiques utilisés actuellement, dits de seconde génération, ont comme effet secondaire l'aggravation de problèmes cognitifs dus à la maladie. Il paraît donc peu fiable de tester la validité de prédiction d'un modèle de schizophrénie, au moins pour les aspects négatifs et cognitifs, avec ces molécules. Un nouvel antipsychotique de seconde génération, la lurasidone, est caractérisé par un profil pharmacodynamique (profil de liaison vis-à-vis de différents récepteurs) qui suggère un gain d'efficacité pour les symptômes cognitifs associés à la schizophrénie (Bruijnzeel et al., 2015). Cette molécule, déjà mise sur le marché et ayant une réelle efficacité en tant qu'antipsychotique, semble constituer un bon candidat pour la validation de prédiction du modèle développé ici.

L'évaluation de l'effet de l'administration de lurasidone sur des animaux témoins a été associée à une étude sur la pharmacocinétique de cet antipsychotique. Ces résultats sont décrits dans l'article 6.

3. Résultats

3.4.1 Article 6 : Antipsychotic lurasidone: Behavioural and pharmacokinetic data in C57BL/6 mice.

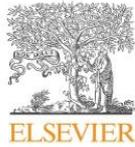
Solenn Percelay^{a,*}, Marc Since^{b,c}, Stéphanie Lagadu^b, Thomas Freret^a, Valentine Bouet^a and Michel Boulouard^a.

^a Normandie Université, UNICAEN, INSERM, COMETE, GIP CYCERON, 14000 Caen, France

^b Plateforme de Recherche et d'Innovation en Spectrométrie de Masse et Métabolomique PRISMM, Normandie Université, UNICAEN, Comprehensive Cancer Center F. Baclesse, 14000 Caen, France

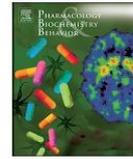
^c Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie, Normandie Université, UNICAEN, CERMN, 14000 Caen, France

Pharmacol. Biochem. Behav. 2020 May 1; 194.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2020.172933>



Contents lists available at ScienceDirect

Pharmacology, Biochemistry and Behavior

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pharmbiochembeh

Antipsychotic lurasidone: Behavioural and pharmacokinetic data in C57BL/6 mice

Solenn Percelay^{a,*}, Marc Since^{b,c}, Stéphanie Lagadu^b, Thomas Freret^a, Valentine Bouet^a, Michel Boulouard^a^a Normandie Université, UNICAEN, INSERM, COMETE, GIP CYCERON, 14000 Caen, France^b Plateforme de Recherche et d'Innovation en Spectrométrie de Masse et Métabolomique PRISMM, Normandie Université, UNICAEN, Comprehensive Cancer Center F. Baclesse, 14000 Caen, France^c Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie, Normandie Université, UNICAEN, CERMN, 14000 Caen, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Lurasidone
Schizophrenia
Pharmacokinetic
Sociability
Cognitive deficits
Mice

ABSTRACT

Lurasidone is an atypical antipsychotic that has been shown to be effective in reversing schizophrenia-related cognitive impairment. The development of new preclinical models of schizophrenia is a key for improving treatments of cognitive symptoms. This study investigated the effects of chronic lurasidone treatment in C57BL/6 male mice via intraperitoneal injection (1 mg/kg daily at 5 p.m. for 5 weeks). A large battery of behavioural tests was performed (between 9 a.m. and 5 p.m.), which is currently used to assess face validity in animal models of psychiatric diseases. Overall, lurasidone did not interfere with behavioural performances, which characterises very good tolerance to such a high dose. Moreover, pharmacokinetic parameters after i.p. and oral administration were measured. Mean transit time (MTT) values were 1.91 h (1 mg/kg acute i.p.) and 1.74 h (8.3 mg/kg acute oral), respectively, and relative bioavailability comparing these two routes of administration was 19.8%. This last result gives important data to adapt oral chronic administration of lurasidone with a more ethical perspective in comparison with chronic i.p. injections. This study brings tools to improve pharmacological validity of preclinical models of psychiatric diseases, and to adapt dosage of antipsychotics according to the route used.

1. Introduction

Lurasidone (LATUDA®) is an atypical antipsychotic, recently approved by the US Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of bipolar depression and schizophrenia (Pan et al., 2016). Lurasidone acts as an antagonist of dopamine D₂, serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT₇, adrenergic α₂ receptors, and a partial agonist of 5-HT_{1A} receptors (Ishibashi et al., 2010; Yuen et al., 2012). Preclinical studies suggested that lurasidone exhibits a peculiar property to reverse schizophrenia-related cognitive impairment (e.g. learning and memory deficits) (Ishiyama et al., 2007; Rajagopal et al., 2016a; Horiguchi et al., 2016). This is a key point because first generation of antipsychotics has side effects, particularly on cognitive impairments. Assessments of anti-amnesic or procognitive properties of lurasidone have been mostly performed after an acute administration, in rat models of glutamatergic hypofunction (induced by dizocilpine or phencyclidine) (Yuen et al., 2012; Ishiyama et al., 2007; Enomoto et al., 2008; Horisawa et al., 2011; Horiguchi et al., 2011; Miyauchi et al., 2016). It should be noted

that surprisingly few studies have been carried out in mice (in particular C57BL/6 strain, one of the most frequently used in preclinical research). This is in sharp contrast to the known genetic component of the disease (Millan et al., 2016) and the fact that transgenic mice lines are the most easily generated and therefore accessible. In addition, most studies report effects of acute administration of lurasidone (Yuen et al., 2012; Ishiyama et al., 2007; Enomoto et al., 2008; Horisawa et al., 2011; Horiguchi et al., 2011; Miyauchi et al., 2016), while only very few studies involved chronic treatment (Luoni et al., 2017; Cates et al., 2013; Stan et al., 2015). But schizophrenia remains to this day an incurable disease, and patients are in fact under symptomatic drugs treatment for life. Effects of lasting repeated administration need therefore to be investigated in preclinical models to enable a relevant clinical translation.

Our study aims to assess the behavioural effects of chronic (5 weeks, 1 mg/kg daily) lurasidone treatment in mice through a battery of tests. Starting after the first week treatment, the following behaviours were assessed: spontaneous activity, anxiety-like behaviour, working and

* Corresponding author.

E-mail address: solenn.percelay@unicaen.fr (S. Percelay).<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2020.172933>

Received 26 February 2020; Received in revised form 16 April 2020; Accepted 17 April 2020

Available online 01 May 2020

0091-3057/ © 2020 Published by Elsevier Inc.

long-term memory, sociability and social memory, and prepulse inhibition of the startle reflex (model of attentional deficit). These parameters are currently used to assess schizophrenia-like symptoms in preclinical models. Another objective of the experiment was to measure pharmacokinetic (PK) parameters after an acute administration to calculate the equivalent doses (intraperitoneal (i.p.) versus per os route (p.o.)) in order to use oral administration in drinking water for later studies, and therefore to improve ethical considerations in animal experimentation.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Experimental procedures were performed in accordance with French and European Economic Community guidelines for the care and use of laboratory animals (2010/63/UE, project no. 2016120817103795). All efforts were made to minimise the number of animals used as well as their suffering. Experiments were performed on 60 C57BL/6 male mice, provided by the local animal facility (Centre Universitaire de Ressources Biologiques, University of Caen Normandy, France). Animals were kept in standard laboratory cages in groups of 3 to 5 individuals under a reversed 12 h/12 h light/dark cycle (light on at 7 p.m.), with controlled temperature (21 ± 1 °C) and humidity ($55 \pm 10\%$). Food and water were given *ad libitum*. Enrichment consisted in crinkle cut shredded paper and a cardboard house.

For the behavioural experiment, 20 mice were used (10 control and 10 lurasidone-treated mice). They were identified after weaning with a subcutaneous chip placed under anaesthesia (isoflurane (5%–2.5%) in an O₂/N₂O mixture (0.3/0.7)). Behavioural assessment was performed between the ages of 8 and 12 weeks. Animals were weighed weekly.

For the pharmacokinetic study, 40 mice of 3 months of age were used (20 mice for i.p. and p.o. administration, with 5 mice for each timing 30 min, 1 h, 2 h, 4 h).

2.2. Pharmacological treatment

2.2.1. Lurasidone formulation and administration

Lurasidone hydrochloride (Synthenova®, Hérouville Saint-Clair, France) was ground in a mortar, mixed with polysorbate 80 (Tween 80®, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Germany) (for a final concentration of 0.1%) and dissolved in a vehicle saline solution (0.9%) at 0.1 g/L. Dose used for i.p. route (1 mg/kg) was based on previous acute and chronic studies (Luoni et al., 2017; Rajagopal et al., 2016b; Huang et al., 2017), while the dose used (8.3 mg/kg) for oral route was based on preliminary laboratory studies.

For behavioural experiments, lurasidone was daily administered intraperitoneally at 5 p.m. (after any evaluation to avoid an acute effect), during a 5 weeks period. Lurasidone solution was regularly prepared for 3-days needs (while kept in-between days at 4 °C), and then renewed (see below results for formulation and controls).

Lurasidone solution was daily administered intraperitoneally at 5 p.m. one week before starting behavioural assessment until the end of the experiment (therefore, after four weeks of behavioural assessment, total treatment duration equal to 5 weeks). Control animals received the vehicle (saline solution, 0.9%).

2.2.2. Formulation control

Lurasidone quantification in formulation was obtained by high-performance liquid chromatography (HPLC-DAD). Standard samples were prepared from a stock solution of lurasidone at 1054 µg/mL in acetonitrile (ACN)/water (50–50 v/v %). Calibrators were fixed at 6.58, 13.175, 26.35, 52.7, 79.05, 105.4 µg/mL by dilution in water. Then, 800 µL was mixed in vial with 200 µL ACN before injection into the chromatographic system.

The apparatus was composed by an Agilent binary pump 1290, an

autosampler 1290 and a diode array UV detector 1260 (Agilent technologies®, Santa Clara, CA, USA). The column used was a reversed phase column C18 (Ultra, 5 µm, 2.1 × 50 mm) (Restek Corp®, Bellefonte, PA, USA). The column was maintained at 30 °C. The injection volume and the run-to-run time were 0.5 µL and 3 min, respectively. The flow rate was 0.6 mL/min and the detection wavelength was 315 nm. The mobile phase was initially composed of a mixture of 85% water containing 0.1% (v/v) formic acid (A) and 15% ACN (B). Then, the composition reached 90% of B after 2 min by applying a linear gradient, maintained for 1 min and returned to the initial conditions for 1 min. The retention time of lurasidone was 1.20 min. Linearity was observed in the range from 6.58 to 105.4 µg/mL with a determination coefficient higher than 0.9999. The quantification limit was estimated at 1.40 µg/mL based on the standard deviation of the y-intercept of regression line and the slope (ICH, 2005). Solution samples (400 µL) were diluted with 400 µL of water and 200 µL of ACN before injection.

2.3. Behavioural assessment

Mice behaviour was assessed with a battery of tests, performed in the displayed order below. Of note, animals were handled daily for 5 min the previous week of experiments. Further, animals' cages were placed in the testing room at least 30 min before any behavioural tasks. Finally, testing room was dimly enlightened (around 20 lx for spontaneous alternation, approach avoidance, object recognition tests or even in full darkness for PPI and open field tests). All tests were performed during the day between 9 a.m. and 5 p.m., and the lurasidone administration was performed every day at 5 p.m. Apparatuses were cleaned with 70% ethanol after each animal. All behavioural measurements were performed by an observer blind to the treatment.

A check of health indicators was performed. Thus, the measurement of the evolution of body weight was carried out every week.

2.3.1. Open field

Locomotor activity was video tracked for 30 min in a squared (50 cm × 50 cm × 50 cm) open field arena (NOLDUS®, Ethovision). Path length and mean speed were measured in the centre zone and total arena (Prut and Belzung, 2003).

2.3.2. Spontaneous alternation

Spatial short-term working memory performances were assessed by recording spontaneous alternation behaviour in a single-session Y-maze test (Freret et al., 2017). The maze consisted in three equally spaced arms (22 cm × 6.5 cm × 10 cm) made of grey plastic material. Each mouse was individually placed at the end of one arm facing the wall and allowed to freely explore the maze during a 5-min session. The number and the sequence of arm entries were recorded. An arm entry was scored when all four feet crossed into the arm. Alternation behaviour is defined as consecutive entries into three different arms. The percentage of alternation was calculated by the formula: (number of alternations / (number of arm entries - 2)) * 100. Alternation percentages were compared for each group to the reference value of 50%, which corresponds to a random exploration of the maze.

2.3.3. Sociability and social recognition

Social behaviour was assessed according to Bouet et al. (2011). Briefly, the apparatus for approach-avoidance test (27 cm × 18 cm × 21 cm) consisted in three interconnected chambers. The two extreme chambers (6.5 cm × 18 cm × 21 cm) were used to place the *stimulus* mouse (novel/familiar) and were separated from the central chamber by a transparent, perforated wall to ensure visual and olfactory contact (Bouet et al., 2011). The central chamber was divided in three equal compartments, the most lateral ones being either close to or far from the *stimulus* mouse. Social behaviour was assessed during the first trial. To this end, an unknown 60 days old male mouse (called *stimulus* mouse) was placed in one of the two extreme chambers (left or

right, randomly order between mice). Trial starts when the tested mouse was placed in the central chamber and lasts for 5 min during which time spent by testing mouse in each compartment was measured. At the end, the mouse was returned to its home cage (Ferguson et al., 2001; Macbeth et al., 2011), and tested again in a second trial 30 min after to assess social recognition.

During this second trial, the same, previously encountered, *stimulus* mouse (now considered as familiar) was placed in one of the two chambers, and a novel, unknown, *stimulus* mouse was placed in the empty opposite chamber. Sociability and social recognition index (1st and 2nd trial, respectively) were calculated as follows: (time spent in the compartment close to the novel *stimulus* mouse – time spent in the compartment far from the novel *stimulus* mouse) / (sum of time spent in the extremes compartments, i.e. close + far from the novel *stimulus* mouse) * 100 (Bouet et al., 2011; Moy et al., 2009). Indexes were compared to the reference value of 50, which corresponds to an equal exploration of the two compartments.

2.3.4. Object recognition test

For four consecutive days, animals were habituated to the arena (50 cm × 50 cm × 50 cm) and to objects. The first day, all mice from the same cage were placed together in the arena for 10 min. From the 2nd to the 4th day, each mouse was placed alone in the apparatus for 5 min. On the 4th day, an object, different from those used in the test was placed in the centre of the arena. On the 5th day, the object recognition test was performed in two sessions (10 min each, inter-session interval ISI: 1 h). For the acquisition session (first session), the mouse was placed with two identical objects in the apparatus, before being replaced in its home cage. For the retention session (second session), the mouse was placed with an object identical to one of the objects used during acquisition session (“familiar object”), the other being new to the mouse (“novel object”). Object exploration was defined by the time the mouse was oriented toward the object at a distance of 1 cm or less, touching or sniffing the object (exclusion criteria: total exploration < 5 s). Exploration times were recorded manually and a discrimination index was calculated as follows: (exploration time of novel object – exploration time of familiar object) / (total exploration time) * 100. Discrimination indexes were compared to the reference value of 50, which corresponds to an equal exploration of both objects. The objects used were towers of LEGO® and little plastic bottles filled with sand.

2.3.5. PPI

Mice were placed in the startle reflex chamber (Imetronic®, France) and first acclimated to a 65dB white-noise background for 10 min. Then 30 trials of pulses at 85 dB were delivered to habituate the animal to the test and obtain less variable intra-individual results (Valsamis and Schmid, 2011). Mice were thereafter presented with combinations of prepulse-pulse trials (prepulse: 0, 76, 80, 84 dB, duration: 20 ms; 50 ms prior to the pulse alone (110 dB, duration 40 ms)) in a pseudo-random order. Ten trials of each prepulse intensity were delivered. Inter-trial intervals were comprised between 8 and 18 s. Animals were filmed throughout the protocol in case of *a posteriori* checking needed. The PPI was calculated as follows: (1 – (startle response magnitude of prepulse trials / startle response magnitude of startle-only trials)) * 100.

2.4. Pharmacokinetic study

2.4.1. Blood sample preparation

Pharmacokinetic study was performed using a terminal blood sampling method (cardiac puncture) under anaesthesia (Hoff, 2000). The mice used in this study were randomly divided in two groups of 20 mice (lurasidone 1 mg/kg i.p., lurasidone 8.3 mg/kg p.o.). Blood samples were collected via intracardiac puncture into heparinised tubes at 0.5, 1, 2, or 4 h after administration (n = 5). Plasma samples were separated immediately by centrifugation at 4 °C, 3000g for 10 min. The supernatant plasma fraction was stored at – 80 °C for further analysis.

2.4.2. Solutions

Lurasidone was first dissolved in methanol at 1054 mg/mL and dextromethorphan HBr, the internal standard (IS), in ACN/water (50–50 v/v %) at 1288 mg/mL. All working solutions were diluted in ACN/water (50–50 v/v %).

2.4.3. Sample treatment

Each aliquot (100 µL) of plasma sample was mixed and incubated 30 min with 10 µL of IS (dextromethorphan, 10 ng/mL). Calibrators were prepared using the same procedure with a mix containing IS at the same concentration and lurasidone to yield 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 and 1000 ng/mL as the final concentration. The proteins precipitation was obtained by adding 300 µL of cold ACN and incubating during 20 min at 4 °C. The mixture was then centrifuged (21,100g, 10 min), then filtered through a 0.2 µm PTFE filter before injection.

2.4.4. Chromatographic conditions

Chromatography separation was conducted on a Nexera X² system coupled with a tandem mass spectrometer LCMS-8030 (Shimadzu, Kyoto, Japon) under the following conditions: the column was an Acquity HSS T3 (100 × 1 mm; 1.8 µm) (Waters®, Millford, MA, USA) maintained at 50 °C; the injection volume was 0.6 µL, flow rate was 0.3 mL/min for 5 min; the mobile phase was initially composed of 10% ACN and 90% of aqueous acetic acid solution at 0.1% (v/v). It was maintained for 0.4 min, then a linear gradient was applied to reach 90% ACN at 3.30 min and to decrease to 10% within 5 min.

The MS/MS detection was performed by electrospray ionization (ESI) source operated in positive mode. Multiple Reaction Monitoring (MRM) was used for the detection and quantification of precursor to product ion transition. Two MRM transitions (qualifier and quantifier) were used for lurasidone and IS (Table 1). The capillary voltage and source temperature were maintained at 4.5 kV and 350 °C, respectively, whereas desolvation temperature was 250 °C. Highly pure nitrogen was used as the desolvation gas (10 L/min) whereas argon gas was used for collision gas pressure (230 kPa).

Blank plasma samples were analysed to check specificity. The calibration curves were drawn by plotting the ratio of the peak high of lurasidone to that of the IS. A quadratic regression with 1/C weighting resulted in standard curves with determination coefficients R² > 0.999 and > 75% of standards with back-calculated concentrations within 15% of their nominal values as recommended by the European medicines agency for bioanalytical methods (Jaki and Wolfsegger, 2018). The limits of quantifications for lurasidone were considered as the lowest concentration of the calibration curve.

Table 1

UHPLC-MS/MS data used for the quantification. In brackets, data of the confirmation ions of lurasidone and IS.

	Retention time (min)	MRM precursor (m/z)	MRM product ion (m/z)	Collision energy (V)
Lurasidone	1.83	493.1	166.1 (109.1)	–43 (–46)
Dextromethorphan (IS)	1.73	272.2	147.2 (213.2)	–31 (–28)

3. Resultats

2.5. Data analysis

Behavioural data were analysed using R software 3.4.2 (Free Software Foundation, Vienna, Austria; R Development Core team 2009). When data were normally distributed (Shapiro test), groups were compared with ANOVA tests (spontaneous alternation, novel object recognition test) or *t*-tests (PPI), and comparisons to reference values were performed with univariate *t*-tests. When data were not normally distributed (Shapiro test), groups were compared with one-way exact permutation tests (body weights, open field test and PPI) or ANOVA tests using permutation tests (sociability and social recognition, spontaneous alternation test, object recognition test), and comparisons to reference values were performed with Wilcoxon tests. Differences were considered significant when the associated *P* value was below 0.05. All animals performed the entire battery of behavioural tests.

Plasmatic lurasidone concentration was plotted with GraphPad® Prism (version 6.01, GraphPad® Software, La Jolla, CA, USA). Main pharmacokinetic parameters were calculated: area under the plasma drug concentration-time curve (AUC_{0-∞}) using the linear trapezoidal method, time to reach the maximum plasma drug concentration (T_{max}), maximum plasma drug concentration (C_{max}) and mean transit time (MTT), by non-compartmental analysis using “R” (R Core Team, 2018) software equipped with “PK” package (Jaki and Wolfsegger, 2018). Relative bioavailability *F* of oral administration versus *i.p.* was calculated according to the following equation: $F = (AUC_{po} / AUC_{ip}) \times (Dose_{ip} / Dose_{po})$.

3. Results

3.1. Formulation and controls

Because lurasidone showed solubilisation difficulties in physiological serum at 1 µg/mL, tween 80 (1%, m/m) a non-ionic surfactant, was added to obtain a micellar solution. The formulation obtained was evaluated by measuring lurasidone concentrations at 0, 24, 48 and 72 h after +4 °C conservation. All concentrations values obtained belonged to [-12%; 0%] interval of the theoretical value. Therefore, our formulation allowed lurasidone to solubilise at 1 µg/mL and be maintained at +4 °C without significant change for 72 h.

3.2. Health indicators

Treatment with lurasidone resulted in no change in the weight growth (Fig. 1).

3.3. Open field

Distance travelled in the open field was not significantly different between groups (ANOVA: in peripheral zone, degrees of freedom $F_{1, 18} = 1.09$, $P = 0.3$; ANOVA permutation model: in arena $P = 0.15$, in

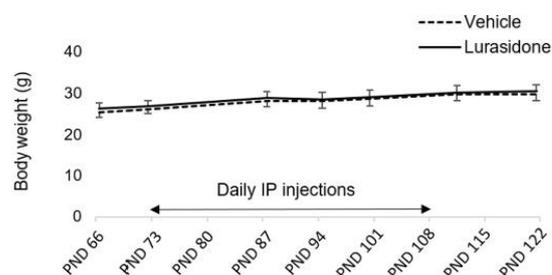


Fig. 1. Effect of chronic lurasidone administration (*i.p.*, 1 mg/kg) on mice body weight. Data represents mean ± SEM.

central zone $P = 0.54$). Similarly, mean speed was not significantly different between groups (ANOVA: in arena $F_{1, 18} = 0.19$, $P = 0.66$, in peripheral zone $P = 0.3$; ANOVA permutation model: in central zone $P = 0.78$). Time in the central zone was not significantly different between groups (ANOVA, $F_{1, 18} = 0.68$, $P = 0.41$) (Fig. 2A and B).

3.4. Spontaneous alternation test

The alternation percentage in the Y-maze was not significantly different between groups (ANOVA, $F_{1, 18} = 0.10$, $P = 0.37$). The comparison of each group with the reference value of 50% showed that control and lurasidone groups had an alternation percentage of $62.1 \pm 5.0\%$ and $60.8 \pm 4.6\%$ (means ± SEM) respectively significantly above 50%, attesting to normal spatial working memory performances ($t = 2.38$, $P = 0.041$; $t = 2.416$, $P = 0.039$, respectively) (Fig. 2C). The number of arm entries in the Y-maze was significantly higher in the lurasidone group than in the control group (ANOVA, $F_{1, 18} = 11.87$, $P = 0.001$).

3.5. Social behaviour and social recognition

3.5.1. Social behaviour

The sociability index was not significantly different between groups (permutation test, $P = 0.24$). The comparison of each group to the reference value of 50% shows that while control group had an index of $52.6 \pm 4.8\%$ (median ± SEM) was not significantly above 50 (*t*-test, $P = 0.198$), the lurasidone group had a sociability index of $60.5 \pm 3.6\%$ (median ± SEM) significantly above 50 (*t*-test, $P = 0.038$) (Fig. 2D), showing a preference for the compartment containing the mouse compared to the empty compartment.

3.5.2. Social recognition

The social recognition index was significantly higher in the control group than in lurasidone group (ANOVA, $F_{1, 18} = 5.62$, $P = 0.023$). The comparison of each group with the reference value of 50% showed that control and lurasidone groups had not a social recognition index significantly above 50, respectively $50.0 \pm 3.4\%$ and $43.7 \pm 4.3\%$ (medians ± SEM), showing that mice from both groups had no preference to explore the compartment with the unfamiliar mouse than that with the familiar mouse (control group: *t*-test, $P = 0.093$; lurasidone group: *t*-test, $P = 0.679$) (Fig. 2E).

3.6. Object recognition test

The recognition index was not significantly different between groups (ANOVA, $F_{1, 18} = 0.36$, $P = 0.87$). The comparison of each group with reference value of 50% shows that all groups had an object recognition index of $60.2 \pm 2.5\%$ and $57.8 \pm 1.6\%$ (means ± SEM) respectively significantly above 50%, attesting to a significant preference to explore the novel object rather than the familiar object (control group: *t*-test, $P < 0.0001$; lurasidone group: *t*-test, $P = 0.00025$) (Fig. 2F).

3.7. PPI

The startle amplitude (pulse alone) did not differ between groups (*t*-test: $P = 0.86$). The percentage of inhibition of the startle reflex was not globally different between groups (ANOVA permutation test: 74 dB prepulse $P = 0.71$; 80 dB prepulse $P = 0.58$; 84 dB prepulse $P = 0.31$) (Fig. 2G and H).

3.8. Pharmacokinetic study

The plasma concentrations of lurasidone after *i.p.* and oral administrations are shown in Fig. 2 and the pharmacokinetic data are presented in Table 2. When lurasidone was administered *i.p.* at the dose of

3. Resultats

S. Perceley, et al.

Pharmacology, Biochemistry and Behavior 194 (2020) 172933

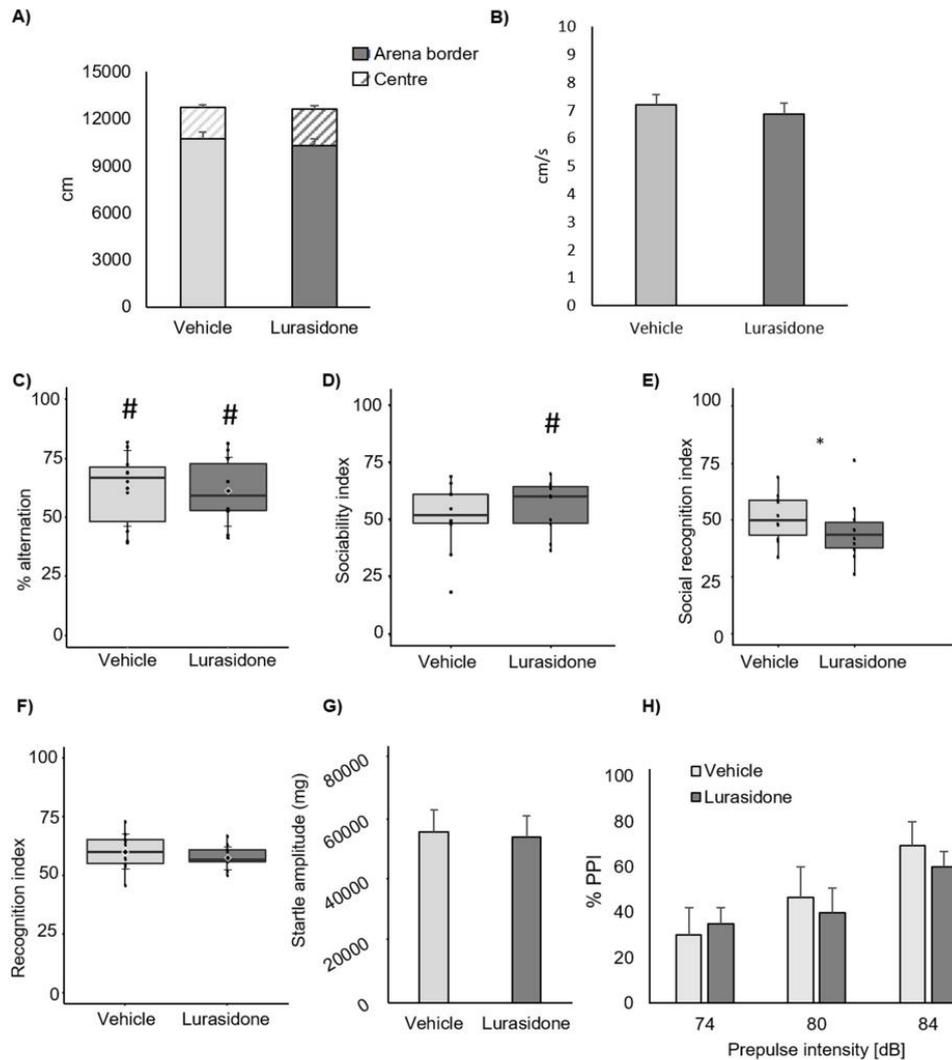


Fig. 2. Lurasidone 1 mg/kg effects on distance moved (A) and mean speed (B) in open field arena; on spontaneous alternation percentage in Y-maze (C), social behaviour index in sociability test (D), social recognition index in social recognition test (E), discrimination percentage in novel object recognition test (F), startle amplitude (G) percent of pre-pulse inhibition (H) in prepulse inhibition test.

A–B: Mean \pm SEM; one-way exact permutation test between groups, $P > 0.05$.

D–E: Boxplots with horizontal black lines as median, first and third quartiles, and the outer lines represent the range of scores or 1.5 box-lengths from the median. ANOVA using permutation tests $P > 0.05$.

C; F: boxplots with horizontal black lines as median, first and third quartiles, and the outer lines represent the range of scores or 1.5 box-lengths from the median. Diamond black marks show the means and small horizontal black lines mark the standard deviations. ANOVA test between groups, $P > 0.05$. Univariate t -tests #: $P < 0.05$.

G: Mean \pm SEM; t -test, $P = 0.86$.

H: Mean \pm SEM; one-way exact permutation test between groups, $P > 0.05$.

*: significant difference between groups: t -test, $P = 0.023$.

1 mg/kg, C_{max} was 52.2 ng/mL, T_{max} was 0.5 h, and MTT was 1.91 ± 0.27 h. Comparatively to i.p. administration, after an 8.3 mg/kg p.o. administration, AUC increased but not as much as C_{max} . Relative bioavailability of oral vs i.p. administration was 19.8%. Therefore, 1 mg/kg i.p. administration corresponds to an equivalent p.o. dose of 5 mg/kg (Fig. 3, Table 2).

4. Discussion

The present study in C5BL/6 mice (a widely used strain for genetic modelling) reports on one hand, the impact of chronic lurasidone treatment on behavioural (and particularly cognitive) performances and, on the other hand, selected pharmacokinetic parameters after

3. Resultats

Table 2
PK data of lurasidone after 1 mg/kg i.p. and 8.3 mg/kg p.o. administration from 0 to 4 h in mice.

Route/dose	C _{max} [ng/mL]	T _{max} [h]	AUC _(0 to last) [ng·h/mL]	AUC _(0 to inf) [ng·h/mL]	MTT (mean transit time) [h]	F relative to i.p. 1 mg/kg (%)
i.p. 1 mg/kg	52.2 ± 30.0	0.5	87.8 ± 11.4	98.9 ± 12.4	1.91 ± 0.27	-
p.o. 8.3 mg/kg	95.7 ± 50.1	1	162.5 ± 18.2	174.3 ± 19.0	1.74 ± 0.17	19.8%

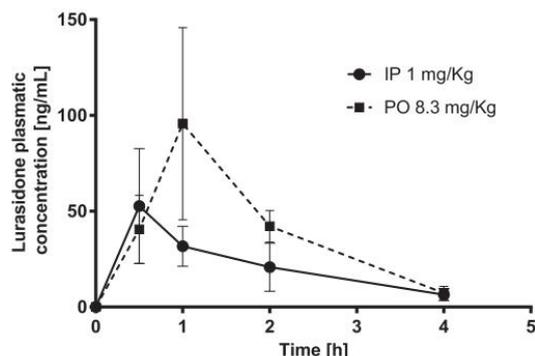


Fig. 3. Pharmacokinetic curves of lurasidone concentration after 1 mg/kg i.p. and 8.3 mg/kg p.o. administration from 0 to 4 h in mice. Results are expressed as mean ± SD (N = 5) at each point.

acute i.p. and oral administrations.

Body weight and alimentary consumption (food and water) are sensitive indices of well-being and consequently of toxic effects. Some antipsychotics, and particularly those of the novel generation, induce body weight changes in humans (Bishara and Taylor, 2008). In animals, Albaugh et al. for instance showed an increase in body weight related to an increase in food intake in rats and mice after olanzapine treatment (Albaugh et al., 2006). In our conditions, daily i.p. lurasidone treatment for 5 weeks did not affect body weight, allowing to rule out any artefacts of this parameter on behavioural results. Our results are consistent with those of Stan et al., who did not observe any effect of chronic (3 weeks) 3 and 10 mg/kg daily lurasidone i.p. administrations on body weight in C57BL/6 mice (Stan et al., 2015).

4.1. Behavioural study

In order to improve expectancies in evaluation of the pharmacological validity of mice models of schizophrenia. The battery of behavioural tests was designed to assess the effects of lurasidone on various parameters after its chronic administration.

Our results showed that chronic lurasidone treatment (administered at the end of each day during 5 weeks) did not severely affect behavioural performances, measured in tests currently used to model positive like-symptoms (PPI and open-field), negative-like symptoms (sociability test) and cognitive-like symptoms (spontaneous alternation and object recognition memory tests) of schizophrenia (Feifel et al., 2016). The sole significant effect observed was altered social recognition in lurasidone-treated animals.

Several studies in rats and mice have shown that acute lurasidone can counterbalance behavioural deficits induced by PCP or MK801 administrations (novel object recognition, Morris water maze, passive avoidance, tail suspension test, forced swimming test, radial arm maze and sociability test) (Rajagopal et al., 2016a; Horiguchi et al., 2016; Horisawa et al., 2011; Horiguchi et al., 2011; Cates et al., 2013; Horisawa et al., 2013). However, effects of chronic administrations of lurasidone in basal conditions, namely without any pharmacologically-induced behavioural deficit, are not known. To our knowledge, only three behavioural studies of chronic administration of lurasidone in

C57BL/6 mice have been reported (Luoni et al., 2017; Cates et al., 2013; Stan et al., 2015). The study of Cates et al. (Cates et al., 2013) implemented a 12-day protocol of daily i.p. administration of lurasidone (0.3 and 3 mg/kg). That of Stan et al. (2015) used a similar route and frequency of administration, but for 3 weeks, at the doses of 3 and 10 mg/kg. The more recent study of Luoni et al. (2017) reports effects of daily oral administration of 1 mg/kg of lurasidone in C57BL/6 mice for 32 days. Given the differences in the experimental design of lurasidone administration between these three studies and ours, comparisons have to be cautious. However, in comparison with results obtained under the same basal conditions in rodents, with acute similar dose ranges, our results are consistent for spontaneous and exploratory activity, and novel object recognition test (Rajagopal et al., 2018; Kołaczowski et al., 2014). PPI is one of the most widely used tests in schizophrenia research to model attentional deficit, but until now, there is no literature data on the effects of lurasidone on PPI in the control animal. The present study is, *de facto*, the first investigation of the effects of chronic administration of lurasidone on sensorimotor gating performances. Some studies revealed that other atypical antipsychotics, for instance olanzapine, chronically administered (8 weeks, 2 mg/kg, twice daily) in control female C57BL/6 mice, do not modify PPI performance, but reverse MK801-induced deficit (Kraeuter et al., 2019). The same holds true with subchronic clozapine (8 days, 3 mg/kg, i.p.) (Maurice-Gélinas et al., 2018) in control male and female C57BL/6 mice. It appears that while the antipsychotic do not alter PPI performances, in one way or another, it can counterbalance PPI deficits in schizophrenia models. Considering the differences in pharmacological profile of the two compounds olanzapine and clozapine, particularly in terms of affinity and activity with respect to dopaminergic and serotonergic receptors, with that of lurasidone (Kondej et al., 2018), it is difficult to link these data closely. However, our data are consistent with literature showing no effect (neither deleterious, nor beneficial) of chronic lurasidone on PPI performances.

Social behaviour (attractivity to/recognition of congeners) is an important indicator used for research into schizophrenia, particularly to emphasise negative-like symptoms.

In sociability tests, some differences were observed between the control and lurasidone-treated animals when compared to the reference value. Indeed, only treated animals showed a significant preference for the side containing the mouse compared to the empty one. Therefore, even if there was no significant difference between groups, lurasidone could improve sociability performances. Literature data on effects of lurasidone on social behaviour are scarce, only two studies to our knowledge, but in line with our results. Indeed, in social interaction test, Wierońska et al. (2015) reported reverse effect of 0.5 mg/kg subcutaneous injection (s.c.) (but not 0.1 mg/kg) of lurasidone on MK-801-induced deficits in rat, and Rajagopal et al. reported reverse effect of 0.3 mg/kg i.p. (but not 0.1 mg/kg) of lurasidone on PCP-induced deficits in mice (Rajagopal et al., 2018).

Social recognition of a novel stimulus mouse did not reveal any significant differences between groups. The absence of preference for the novel mouse compared to the familiar one in the control and in the lurasidone-treated groups was not expected but was due to the protocol used, which slightly differed from that of Moy et al. (2008). Indeed, Moy et al. (2008) showed that the C57BL/6 is a strain that can discriminate the side containing the mouse from the empty side in the sociability test, and is even able to discriminate the side containing a previously encountered mouse from the side containing a new mouse

3. Résultats

S. Perceley, et al.

Pharmacology, Biochemistry and Behavior 194 (2020) 172933

for the social recognition test. Our results can be explained by the duration between the sessions chosen (30 min *versus* immediate), and the shape of the device to the one used by other studies (compartment *versus* small cages), like Moy et al. (2008), Brodtkin et al. (2004), and Nadler et al. (2004).

4.2. Pharmacokinetic study

The pharmacokinetic data of the acute administration of lurasidone after i.p. (1 mg/kg) and oral (8.3 mg/kg) administration in C57BL/6 mice are reported here for the first time. Several studies concern lurasidone administrations on rodents models of psychiatric disease, but unfortunately without investigating the pharmacokinetics of this drug (Ishiyama et al., 2007; Luoni et al., 2017; Cates et al., 2013). We obtained i.p. 1 mg/kg and p.o. 8.3 mg/kg T_{max} of 0.5 and 1 h respectively. Lurasidone MTT was 2 h. In rats, after intravenous (i.v.) administration, MTT was approximately 4.5 h for a dose of 1 mg/kg (Lee et al., 2011). Lee et al. describe a pharmacokinetic study carried out in the Sprague-Dawley rat and reports C_{max} values equal to 0.163, 0.301 and 0.633 $\mu\text{g}/\text{mL}$ after single oral administrations of lurasidone doses equal to 2.5, 5 and 10 mg/kg, respectively (Lee et al., 2011). We have demonstrated C_{max} value after a p.o. administration in C57Bl6 mice equal to 0.096 $\mu\text{g}/\text{mL}$. This difference between species is consistent with the study of Waidyanatha et al., showing a shorter half-life for mice than rats (Waidyanatha et al., 2019). Such a short MTT of the antipsychotic lurasidone in mice is in line with the conclusion of the study of Kapur et al. who reported that the half-life in plasma of five antipsychotics (haloperidol, clozapine, olanzapine, risperidone, and quetiapine) were comparable to those of lurasidone (Kapur et al., 2006). This shows that a single daily injection cannot be sufficient to maintain plasma levels of antipsychotic for the entire day. In human, a single daily administration schedule is well adapted as the lurasidone half-life in human plasma (following oral dosing of a 40 mg tablet) is more prolonged (26.4 h \pm 12.5) (Katteboina et al., 2016). In a preclinical context, this schedule is questionable. Indeed, in rats, after a p.o. 60 mg/kg administration, plasmatic half-life is just 8.42 h (Koo et al., 2011) whereas in mice there is no data are available. Further investigations have to be performed to assess plasmatic levels in mice after oral administration of antipsychotics in a way to improve dosage and administration protocol in rodent models of schizophrenia.

In preclinical studies, drinking water is an interesting way of administration of antipsychotics in rodents because of a good correspondence of this route with that of humans, and to avoid the necessity of stressing and repeated manipulation for injection needed for chronic treatments. Ethical considerations are a growing part of animal experimentation and the present study permits to improve experimental practice. Using non-invasive administration is a real advantage to improve wellbeing, *via* a decrease in pain and stress for animals, and invasive manipulations. Drinking water is commonly used for administration of antibiotics (Marx et al., 2014), and needs to be extended to other treatments, particularly antipsychotics. Herein, our first PK results (in particular knowledge of relative bioavailability) will be useful to develop a drinking water protocol of chronic administration of lurasidone in C57BL/6 mice.

5. Conclusion

Lurasidone is a novel antipsychotic particularly interesting for the pharmacological validation of animal models of schizophrenia focusing on negative-like and cognitive-like symptoms. We demonstrated the solubility and the stability of the present formulation for at least 72 h at 4 °C. The C57BL/6 strain is widely used for the creation of transgenic mice, and therefore, is interesting for constructing multifactorial models (with genetic predisposition and environmental stress) of schizophrenia.

To summarise the results of behavioural assessment, we did not

observe, in our conditions, an impact of chronic lurasidone administration in C57BL/6 mice behaviour. This result enables the use of lurasidone to measure pharmacological validity in rodent models of schizophrenia. However, consideration must also be given to the cognitive impairments in this pathology.

Animal models of psychiatric diseases, such as psychosis, are mostly tested for predictive validity by administrations of antipsychotics, mostly performed *via* the intraperitoneal route, whereas this is not the case for human medication. We measured pharmacokinetic parameters of lurasidone by i.p. administration and the oral route to calculate the equivalent dose. We demonstrated that concentrations in plasma are not maintained for 24 h. Indeed, lurasidone has a short persistence in mice, which is not the case in humans. The present study allows the development of alternative methods of administration, the improvement of the well-being of both the mice and the experimenter, and the assessment of pharmacological validity of mice models.

Funding

Funding for this work was provided by the Normandy Region, COMUE, FRANCE.

Declaration of competing interest

None.

Acknowledgments

We are grateful to Nicole Turnbull who conducted behavioural tests, and with Johnny Vo, as native English-speakers, who accepted to proofread the present manuscript.

Experimental procedures were performed in accordance with French and European Economic Community guidelines for the care and use of laboratory animals (2010/63/UE, project no. 2016120817103795).

References

- Albaugh, V.L., Henry, C.R., Bello, N.T., Hajnal, A., Lynch, S.L., Halle, B., Lynch, C.J., 2006. Hormonal and Metabolic Effects of Olanzapine and Clozapine Related to Body Weight in Rodents. *Obesity (Silver Spring)* 14 (1), 36–51. <https://doi.org/10.1038/oby.2006.6>. PMID: 16493121.
- Bishara, D., Taylor, D., 2008. Upcoming Agents for the Treatment of Schizophrenia Mechanism of Action, Efficacy and Tolerability. vol. 68, no. 16. pp. 2269–2292.
- Bouet, V., Lecrux, B., Tran, G., Freret, T., 2011. Effect of pre- versus post-weaning environmental disturbances on social behaviour in mice. *Neurosci. Lett.* 488 (2), 221–224. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.11.033>.
- Brodtkin, E.S., Hagemann, A., Maureen, S., Silver, L.M., 2004. Social Approach – Avoidance Behavior of Inbred Mouse Strains Towards DBA/2 Mice. 1002. pp. 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.12.013>.
- Cates, L.N., Roberts, A.J., Huitron-Resendiz, S., Hedlund, P.B., 2013. Effects of lurasidone in behavioral models of depression. Role of the 5-HT7 receptor subtype. *Neuropharmacology* 70, 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.01.023>.
- Enomoto, T., Ishibashi, T., Tokuda, K., Ishiyama, T., Toma, S., Ito, A., 2008. Lurasidone reverses MK-801-induced impairment of learning and memory in the Morris water maze and radial-arm maze tests in rats. *Behav. Brain Res.* 186 (2), 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.08.012>.
- Feifel, D., Shilling, P.D., Macdonald, K., 2016. Review a review of oxytocin's effects on the positive, negative, and cognitive domains of schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 79 (3), 222–233. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.07.025>.
- Ferguson, J.N., Aldag, J.M., Insel, T.R., Young, L.J., 2001. Oxytocin in the Medial Amygdala is Essential for Social Recognition in the Mouse. 21, no. 20. pp. 8278–8285.
- Freret, T., Lelong-boulouard, V., Lecoufflet, P., Hamidouche, K., Dauphin, F., Boulouard, M., 2017. Co-modulation of an allosteric modulator of nicotinic receptor-cholinesterase inhibitor (galantamine) and a 5-HT4 receptor agonist (RS-67333): effect on scopolamine-induced memory deficit in the mouse. pp 2365–2374. <https://doi.org/10.1007/s00213-017-4664-z>.
- Hoff, J., 2000. Methods of blood collection in the mouse. *Lab Anim. (NY)* 29 (10), 47–53.
- Horiguchi, M., Huang, M., Meltzer, H.Y., 2011. Interaction of mGlu 2/3 agonism with clozapine and lurasidone to restore novel object recognition in subchronic phencyclidine-treated rats. pp 13–24. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2251-2>.
- Horiguchi, M., Miyauchi, M., Neugebauer, N.M., Oyamada, Y., Meltzer, H.Y., 2016.

3. Résultats

S. Perceley, et al

Pharmacology, Biochemistry and Behavior 194 (2020) 172933

- Prolonged reversal of the phencyclidine-induced impairment in novel object recognition by a serotonin (5-HT) 1A-dependent mechanism. *Behav. Brain Res.* 301, 132–141. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.08.040>.
- Horisawa, T., et al., 2011. The effects of selective antagonists of serotonin 5-HT 7 and 5-HT 1A receptors on MK-801-induced impairment of learning and memory in the passive avoidance and Morris water maze tests in rats: mechanistic implications for the beneficial effects of the no. *Behav. Brain Res.* 220 (1), 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.01.034>.
- Horisawa, T., et al., 2013. The role of 5-HT 7 receptor antagonism in the amelioration of MK-801-induced learning and memory deficits by the novel atypical antipsychotic drug lurasidone. *Behav. Brain Res.* 244, 66–69. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.01.026>.
- Huang, X., Yang, J., Yang, S., Cao, S., Qin, D., Zhou, Y., 2017. Role of Tansospirone, a 5-HT1A Receptor Partial Agonist, in the Treatment of Central Nervous System Disorders and the Underlying Mechanisms. 8, no. 60. pp. 102705–102720.
- ICH, 2005. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.
- Ishibashi, T., et al., 2010. Pharmacological profile of lurasidone, a novel antipsychotic receptor activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 334 (1), 171–181. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.167346.Schizophrenia>.
- Ishiyama, T., Tokuda, K., Ishibashi, T., Ito, A., Toma, S., Ohno, Y., 2007. Lurasidone (SM-13496), a novel atypical antipsychotic drug, reverses MK-801-induced impairment of learning and memory in the rat passive-avoidance test. *Eur. J. Pharmacol.* 572 (2–3), 160–170. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.06.058>.
- Jaki, T., Wolfsegger, M.J., 2018. Package 'PK'.
- Kapur, S., Vanderspek, S.C., Brownlee, B.A., Nobrega, J.N., 2006. Erratum: antipsychotic dosing in preclinical models is often unrepresentative of the clinical condition: a suggested solution based on in vivo occupancy (Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics (2003) 305 (625–631)). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317 (2), 919. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.046987.proaches>.
- Kattebina, Y.M., Pili, R.N., Mullangi, R., Seelam, R.R., Satla, S.R., 2016. LC-MS/MS assay for the determination of lurasidone and its active metabolite, ID-14283 in human plasma and its application to a clinical pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr.* (December 2015), 1065–1074. <https://doi.org/10.1002/bmc.3651>.
- Kolaczowski, M., Mierzejewski, P., Bienkowski, P., Wesolowska, A., Newman-Tancredi, A., 2014. Antipsychotic, antidepressant, and cognitive-impairment properties of antipsychotics: rat profile and implications for behavioral and psychological symptoms of dementia. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 387 (6), 545–557. <https://doi.org/10.1007/s00210-014-0966-4>.
- Kondej, M., Stepnicki, P., Kaczor, A.A., 2018. Multi-target approach for drug discovery against schizophrenia. *Int. J. Mol. Sci.* 19 (10). <https://doi.org/10.3390/ijms19103105>.
- Koo, T.S., Kim, S.J., Lee, J., Ha, D.J., Baek, M., Moon, H., 2011. Quantification of lurasidone, an atypical antipsychotic drug, in rat plasma with high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* 25 (12), 1389–1394. <https://doi.org/10.1002/bmc.1625>.
- Kraeuter, A.K., Archambault, N., van den Buuse, M., Sarnyai, Z., 2019. Ketogenic diet and olanzapine treatment alone and in combination reduce a pharmacologically-induced prepulse inhibition deficit in female mice. *Schizophr. Res.* 212, 221–224. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2019.08.002>.
- Lee, K.R., Chae, Y.J., Koo, T.S., 2011. Pharmacokinetics of lurasidone, a novel atypical anti-psychotic drug, in rats. *Xenobiotica* 41 (12), 1100–1107. <https://doi.org/10.3109/00498254.2011.603388>.
- Luoni, A., Ricchetti, J., Longo, L., Riva, M.A., 2017. Chronic lurasidone treatment normalizes GABAergic marker alterations in the dorsal hippocampus of mice exposed to prenatal immune activation. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 27 (2), 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2016.12.001>.
- Macbeth, A.H., Edds, J.S., 3rd, W.S.Y., 2011. Housing conditions and stimulus females: a robust social discrimination task for studying male rodent social recognition. *Nat. Protoc.* 4 (11), 1574–1581. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.141.Housing>.
- Marx, J.O., Vudathala, D., Murphy, L., Rankin, S., Hankenson, F.C., 2014. Antibiotic Administration in the Drinking Water of Mice. 53, no. 3. pp. 301–306.
- Maurice-Gélinas, C., Deslauriers, J., Monpays, C., Sarret, P., Grignon, S., 2018. The 5 α -reductase inhibitor finasteride increases suicide-related aggressive behaviors and blocks clozapine-induced beneficial effects in an animal model of schizophrenia. *Physiol. Behav.* 191 (November 2017), 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.03.036>.
- Millar, R., Andrieux, M.J., Bartzokis, A., Cadenhead, G., Dazzan, K., Fusar-Poli, P., ..., Kahn, P., 2016. Altering the course of schizophrenia: progress and perspectives. *Nat. Rev. Drug Discov.* 15 (7), 485.
- Miyachi, M., Neugebauer, N.M., Oyama, Y., Meltzer, H.Y., 2016. Nicotinic receptors and lurasidone-mediated reversal of phencyclidine-induced deficit in novel object recognition. *Behav. Brain Res.* 301, 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.10.044>.
- Moy, S.S., et al., 2008. Social Approach and Repetitive Behavior in Eleven Inbred Mouse Strains. 191. pp. 118–129. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.03.015>.
- Moy, S.S., et al., 2009. Social approach in genetically engineered mouse lines relevant to autism. *Genes Brain Behav.* 8 (2), 129–142. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2008.00452.x>.
- Nadler, J.J., Moy, S.S., Dold, G., 2004. Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice. pp 303–314. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2004.00071.x>.
- Pan, P., Jaeschke, R.R., Sowa-kuc, M., Datka, W., Misztak, P., Styczen, K., 2016. Pharmacological Reports Lurasidone: The 2016 Update on the Pharmacology, Efficacy and Safety Profile. 68. pp. 748–755. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.04.002>.
- 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 (1–3), 3–33. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01272-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X).
- R Core Team, 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria. .
- Rajagopal, L., Burgdorf, J.S., Moskal, J.R., Meltzer, H.Y., 2016a. GLYX-13 (Rapastinel) Ameliorates Subchronic Phencyclidine- and Ketamine-induced Declarative Memory Deficits in Mice. 299. pp. 105–110.
- Rajagopal, L., Massey, B.W., Michael, E., Meltzer, H.Y., 2016b. Serotonin (5-HT) 1A receptor agonism and 5-HT7 receptor antagonism ameliorate the subchronic phencyclidine-induced deficit in executive functioning in mice. *Psychopharmacology* 233 (4), 649–660. <https://doi.org/10.1007/s00213-015-4137-1>.
- Rajagopal, L., Soni, D., Meltzer, H.Y., 2018. Neurosteroid pregnenolone sulfate, alone, and as augmentation of lurasidone or tandospirone, rescues phencyclidine-induced deficits in cognitive function and social interaction. *Behav. Brain Res.* 350 (April), 31–43. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.05.005>.
- Stan, T.L., Cabral, V., Zhang, X., 2015. Lurasidone and fluoxetine reduce novelty-induced hypophagia and NMDA receptor subunit and PSD-95 expression in mouse brain. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 25 (10), 1714–1722. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.07.007>.
- Valsamis, B., Schmid, S., 2011. Habituation and prepulse inhibition of acoustic startle in rodents. *J. Vis. Exp.* (September), 2–11. <https://doi.org/10.3791/3446>.
- Waidyanatha, S., et al., 2019. Toxicokinetics and bioavailability of bisphenol AF following oral administration in rodents: a dose, species, and sex comparison. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 373 (May), 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.04.015>.
- Wieroińska, J.M., Anna, S., Magdalena, L., 2015. The antipsychotic-like effects in rodents of the positive allosteric modulator Lu AF21934 involve 5-HT 1A receptor signaling: mechanistic studies. *Psychopharmacology* 259–273. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3657-4>.
- Yuen, E.Y., Li, X., Wei, J., Horiguchi, M., Meltzer, H.Y., 2012. The Novel Antipsychotic Drug Lurasidone Enhances N-methyl-D-aspartate Receptor-mediated Synaptic Responses. 81, no. 2. pp. 113–119.

3.4.1.1 Résumé de l'article 6

Les objectifs de l'article 6 étaient d'une part de caractériser chez des souris C57BL/6 (animaux témoins) les effets comportementaux de l'administration de 1mg/kg de lurasidone par jour pendant 5 semaines. D'autre part, dans le but de mettre en place une administration de lurasidone par eau de boisson, nous avons mesuré certains paramètres pharmacocinétiques après administration aiguë de ce neuroleptique (i.p. et *per os*).

Nous avons montré que l'administration chronique de lurasidone à la dose sélectionnée ne modifiait pas le comportement de souris C57BL/6. Nous avons également montré que la rémanence de cette molécule dans le sang des souris après une administration unique est très courte. Il est donc nécessaire de prendre ce paramètre en compte pour la mise en place des protocoles d'administration chronique.

Une discussion autour des paramètres à utiliser pour évaluer la validité de prédiction des modèles animaux de schizophrénie est intégrée au chapitre « Discussion générale ».

4. Discussion générale

Les objectifs de cette thèse étaient principalement d'évaluer le nouveau modèle de schizophrénie 3-hit au regard des trois types de validité : la validité d'apparence, la validité de construction et la validité de prédiction.

La première partie de cette discussion porte sur chacune de ces trois validités. Tout d'abord, les différents paramètres mesurés pour évaluer la validité d'apparence des modèles animaux de schizophrénie vont être discutés. Ensuite, la validité de construction des modèles multifactoriels sera analysée avec l'apport de chaque facteur, considéré individuellement, ainsi que les interactions entre ces facteurs. Puis, les paramètres à prendre en compte pour évaluer la validité de prédiction des modèles de schizophrénie seront abordés.

Dans une seconde partie, la discussion portera sur une question plus générale : qu'est-ce qu'un bon modèle de schizophrénie ?

Pour apporter des éléments de réponse, nous allons aborder l'apport des constructions récentes de modèles animaux, de plus en plus complexes, dans un premier temps. Puis nous allons tenter d'entrevoir d'autres solutions pour améliorer les modèles. Pour enfin poser la question des espèces animales choisies pour modéliser une pathologie psychiatrique.

4.1 Validité d'apparence du modèle 3-hit

Bien que certains éléments n'aient pas été mesurés (ex : dosages de neurotransmetteurs) (voir Tableau 5).

), l'ensemble des études réalisées apporte une quantité importante d'informations sur le modèle 3-hit. Nous avons obtenu une vue assez large sur ce modèle avec des résultats comportementaux, morphologiques et fonctionnels. L'apparition d'un dysmorphisme sexuel, notamment dans l'étude en électrophysiologie, incite à réaliser toutes les analyses sur les deux sexes même si pour certains paramètres comportementaux nous n'avons pas décelé de différences entre les sexes (par exemple, le déficit comportemental au test du PPI apparait chez les mâles et les femelles).

Tableau 5 : Synthèse des principaux éléments associés au phénotype de schizophrénie (adapté de la Table 1 de Winship et al., 2019) et des résultats obtenus sur le modèle 3-hit. ? : non mesuré ; = : pas de modification par rapport aux témoins ; ↑ : augmentation par rapport aux témoins ; ↓ : diminution par rapport aux témoins ; # : modification par rapport aux témoins.

			3-hit		
			♂	♀	
		Mesure	Test / structure		
Comportement	Positif	Activité locomotrice	Open field	↓	?
			Actimétrie	=	?
		Stéréotypies		?	?
	Négatif	Anhédonie	Préférence au sucrose	=	?
		Sociabilité	Approche / évitement	↓	?
	Cognition	Reconnaissance sociale	Approche / évitement	?	?
		Inhibition latente	Conditionnement	?	?
		Mémoire de travail	Alternance spontanée	↓	?
		Mémoire de reconnaissance	Reconnaissance d'objet	?	?
		Mémoire de référence	Piscine de Morris	↓	?
		Flexibilité		?	?
		Apprentissage		↓	?
	Anxiété		Open field	↑	?
			Boite noire et blanche	↑	?
			Labyrinthe en croix surélevée	?	?
Sensori-moteur	Inhibition du réflexe de sursaut	PPI	↓	↓	
Latéralité	Olfaction		#	#	
Nidification			=	?	
Modifications morphologiques	IRMa	↑ volume	Ventricules latéraux	?	?
			Cortex	↓	?
		↓ volume	Striatum	?	?
			Thalamus	?	?
			Hippocampe	↓	?
	DTI	Altération de la myélinisation	Corps calleux	↓	?
	Dosages / immunohistochimie		Dopamine	Inte neurones parvalbumine	?
Glutamate			?		?
Sérotonine			?		?
GABA			=		?
Glycine			?		?
D-serine	?	?			
Modifications fonctionnelles	Electrophysiologie	LTP		↓	↓
		STP		↓	↓
		LTD		?	?
		Neurotransmission glutamatergique	Recepteurs AMPA	=	=
			Recepteurs NMDA	=	↑
Neurotransmission gabaergique	Recepteurs GABA	↓	↓		

La caractérisation comportementale du modèle 3-hit montre certains aspects du phénotype schizophrénique avec des symptômes de type négatif (déficit de sociabilité), des déficits cognitifs (déficits de mémoire de travail et mémoire de référence), une augmentation du comportement de type anxieux et un déficit d'inhibition du réflexe de sursaut. Le développement de modèle animaux de

schizophrénie pertinents a notamment comme objectif l'amélioration des traitements de cette pathologie. Les antipsychotiques actuels ne prennent pas en charge certains symptômes, en particulier les symptômes négatifs et les déficits cognitifs (Bost, 2016; Tandon, 2002). C'est donc particulièrement ces symptômes et déficits qui sont maintenant visés dans les modèles de schizophrénie, afin d'utiliser un support pertinent pour le développement de nouveaux antipsychotiques.

Le déficit d'inhibition du réflexe de sursaut observé chez les animaux 3-hit a également été observé dans d'autres modèles de schizophrénie à trois facteurs bien que l'impact de chaque facteur dans ce déficit, ou même d'éventuels effets de résilience, soient difficiles à interpréter (Chen et al., 2011; Sultana & Lee, 2020). Kekesi *et al.* ont mis en évidence un dimorphisme sexuel (que nous n'avons pas retrouvé dans notre modèle 3-hit), avec des déficits plus importants chez les mâles (Kekesi et al., 2015). Cette mesure d'inhibition du réflexe de sursaut est un élément clef de la caractérisation d'un modèle de schizophrénie (Khan & Powell, 2018).

Nous avons également observé des différences entre les groupes 3-hit et témoin dans les tests de l'*open field* et de la boîte noire et blanche mais pas dans le test d'actimétrie. Cela suggère que l'effet observé dans ces deux premiers tests relève davantage d'une augmentation de l'anxiété plutôt que d'une diminution de l'activité locomotrice. Les tests de l'*open field* et de la boîte noire et blanche sont réalisés dans des conditions de luminosité importante, il s'agit d'environnements assez grands et inconnus des souris, ils sont donc sources de stress pour ces rongeurs (Bourin, 2015; Lezak et al., 2017). Le test de l'actimétrie se déroule dans un dispositif petit et fermé qui se rapproche plus des conditions d'hébergement des animaux. Ce test est aussi réalisé sur un temps plus long (1h) que les tests de l'*open field* et de la boîte noire et blanche (respectivement 30min et 5min), ce qui réduit le stress dû à la nouveauté (Lister, 1990). L'apparition de différences entre les groupes 3-hit et témoin uniquement dans les environnements les plus anxiogènes indique que les souris 3-hit seraient plus sensibles au stress que les animaux témoins. Une augmentation de l'anxiété a également été montrée dans d'autres modèles de schizophrénie à trois facteurs (Chen et al., 2011; Sultana & Lee, 2020) mais pas tous (Kekesi et al., 2015).

Le modèle 3-hit présente des déficits de sociabilité ainsi qu'une altération des fibres du corps calleux. Une étude de Koshiyama *et al.* a permis de faire un lien entre ces deux paramètres, ces auteurs ayant montré une corrélation entre une altération des

fibres du corps calleux et des difficultés sociales chez des schizophrènes (Koshiyama et al., 2018). Parmi les trois autres modèles de schizophrénie à trois facteurs publiés dans la littérature, seulement celui réalisé chez la souris et qui combine une mutation DISC1, une séparation maternelle et une administration de kétamine, a été soumis à un test de sociabilité. Les animaux de ce modèle ont également des déficits de sociabilité, ainsi que des déficits de préférence pour la nouveauté sociale (Sultana & Lee, 2020). Il serait intéressant de réaliser des mesures d'imagerie de diffusion dans ce modèle pour observer d'éventuelles altérations du corps calleux. Les deux autres modèles à trois facteurs n'ont pas mesuré ce paramètre mais Kekesi *et al.* ont interprété une diminution de la dextérité motrice et de l'exploration comme des symptômes de type négatif (Kekesi et al., 2015).

Les déficits de mémoire sont largement recherchés dans les modèles actuels de schizophrénie (Winship et al., 2019). Les souris 3-hit présentaient dans nos expériences un déficit de mémoire de travail et de mémoire de référence. Les deux autres modèles à trois facteurs ayant mesuré la mémoire de travail montrent aussi un déficit chez les animaux soumis à trois facteurs (Kekesi et al., 2015; Sultana & Lee, 2020). Cependant, l'impact de chaque facteur est complexe à déterminer puisque les animaux soumis uniquement à la modification du gène DISC1 présentent ce déficit de mémoire de travail qui est partiellement compensé par l'ajout d'un autre facteur (séparation maternelle ou injections de kétamine) (Sultana & Lee, 2020). Un déficit de mémoire de référence a également été montré dans le modèle de Kekesi *et al.* (Kekesi et al., 2015).

Nous n'avons pas montré de symptôme de type positif chez les souris 3-hit qui aurait pu s'observer par une augmentation de la locomotion. Il aurait été intéressant d'observer d'éventuelles stéréotypies qui sont également un critère intéressant pour ce type de symptômes (Bubeníková-Valešová et al., 2008; De Oliveira et al., 2011). L'observation ininterrompue des animaux dans leur cage d'élevage en relevant d'éventuels comportements stéréotypés permettrait une évaluation des symptômes de type positif dans un environnement plus écologique, et donc moins stressant pour les animaux. Les rongeurs peuvent avoir un comportement de proie en présence d'humain, même si une manipulation quotidienne permet de limiter cet effet. Ce comportement de proie mène à une modification du comportement général des animaux, qui inhibe leur activité, les conduit à se cacher (Apfelbach et al., 2005), et

éventuellement à cesser d'exprimer des stéréotypies. Ainsi, pour avoir une évaluation plus exhaustive des symptômes de type positif exprimés par les animaux 3-hit, il serait intéressant de réaliser une observation *via* caméra vidéo du comportement des animaux en l'absence d'humains pendant *a minima* 24h. La ressource humaine nécessaire pour l'analyse de ce test rend difficile son application, bien que des technologies se développent pour accélérer et homogénéiser ces analyses comportementales individuelles.

D'autres éléments caractérisant les modèles de schizophrénie ont été observés dans le modèle 3-hit, sans que ceux-ci soient développés dans les autres études de modèles à trois facteurs. Parmi ceux-ci, l'altération de la latéralité olfactive reflète un dérèglement de l'asymétrie cérébrale. Les études cliniques montrent des altérations de la latéralité comportementale ainsi que de la latéralisation cérébrale chez les schizophrènes (Dragovic & Hammond, 2005; Okada et al., 2016; Satz & Green, 1999; Xie et al., 2018). C'est donc un élément innovant de caractérisation d'un modèle de schizophrénie qui mériterait d'être exploité dans d'autres modèles.

L'étude réalisée en électrophysiologie est également innovante pour ce type de modèle à trois facteurs. Cela nous a permis de montrer une altération de la neurotransmission GABAergique, des altérations fonctionnelles de l'hippocampe impliquant notamment la régulation par les autorécepteurs GABA_B, mais aussi un dimorphisme sexuel avec une augmentation de la transmission glutamatergique uniquement chez les femelles 3-hit. En association avec la diminution du volume de l'hippocampe des souris 3-hit observée en imagerie anatomique, l'altération hippocampique de la neurotransmission GABAergique peut être la base physiologique des déficits de mémoire de travail et de référence ainsi que les déficits d'inhibition du réflexe de sursaut observés chez ces animaux. En effet, ces trois types de déficits comportementaux ont été associés dans plusieurs études à des altérations morphologiques et fonctionnelles de l'hippocampe (Bures et al., 1997; Glover & Clinton, 2016; Hauser et al., 2005; Neves et al., 2008; Nguyen et al., 2014; Yonelinas, 2013; Zhang et al., 2002). Le lien entre altération de la neurotransmission GABAergique et déficit au test d'inhibition du sursaut a également été montré chez les souris MAP6 KO (Fradley et al., 2005). Afin de définir l'impact de la délétion partielle du gène MAP6 sur ce point, il serait nécessaire de réaliser une étude

électrophysiologique sur des animaux soumis uniquement à cette délétion partielle du gène MAP6.

Par ailleurs, certaines limitations concernant nos approches électrophysiologiques peuvent être avancées. Les enregistrements effectués dans l'article 2 sont restreints à la zone CA1 de l'hippocampe, ne permettant de caractériser que partiellement le « phénotype électrophysiologique hippocampique » des souris 3-hit. D'un autre côté, une autre limite est l'utilisation dans nos enregistrements de coupes de l'hippocampe ventral et dorsal, sans distinction. La localisation des zones que nous avons enregistrées pourrait donc être considérée comme trop large puisque des différences de fonctions entre l'hippocampe dorsal et ventral ont été montrées (Fanselow & Dong, 2010).

Puisque la neurotransmission GABAergique est altérée dans la schizophrénie (Gonzalez-Burgos et al., 2011; Nakazawa et al., 2012), la diminution du tonus de ce système de neurotransmission observée dans l'article 2 est un point important pour soutenir une bonne validité d'apparence du modèle 3-hit. La diminution de la densité de neurones à parvalbumine est un point clef du phénotype schizophrénique, qui est particulièrement intéressant pour la caractérisation des modèles animaux (Schmidt & Mirnics, 2015). Cependant, nous n'avons pas montré de diminution de la densité de ces interneurones dans l'hippocampe et le cortex préfrontal du modèle 3-hit. Cet élément n'a également pas été observé dans le modèle 3-M. Pourtant, des modèles animaux de schizophrénie à un ou deux facteurs similaires à ceux utilisés dans cette thèse (séparation maternelle, administration de THC, délétions génétiques autre que MAP6) montrent une altération de ces interneurones GABAergiques (Moran et al., 2016; Steullet et al., 2017). L'utilisation d'autres méthodes d'observation des interneurones à parvalbumine pourrait être une solution pour mieux caractériser le possible impact de notre conditionnement sur ces interneurones. En effet, une étude sur un modèle de schizophrénie à deux facteurs (délétion du gène COMT et administration chronique de THC à l'adolescence) n'a pas reporté de modification de la densité des interneurones à parvalbumine que ce soit dans l'hippocampe ou le cortex préfrontal, mais a démontré une diminution de la taille de ces neurones dans le cortex préfrontal des animaux (Behan et al., 2012).

4.2 Validité de construction

La schizophrénie étant une maladie multifactorielle impliquant des susceptibilités génétiques et des stress environnementaux précoces et tardifs, il est nécessaire d'utiliser ces connaissances étiologiques pour générer des modèles animaux avec une validité de construction pertinente.

Evaluer la validité de construction du modèle 3-hit permet de répondre à l'objectif de compréhension de l'implication de chaque facteur dans l'apparition de chaque type de déficits.

4.2.1 Facteur génétique

Le choix des mutations génétiques pour construire un modèle de schizophrénie est très large (Gainetdinov et al., 2001). Nous allons aborder les modifications génétiques utilisées dans les modèles murins de schizophrénie à trois facteurs. D'abord la délétion partielle du gène MAP6 utilisée dans les modèles 3-hit et 3-M, la modification génétique choisie par Sultana *et al.* : le gène DISC1 (Sultana & Lee, 2020). Ensuite nous allons aborder l'autre modification génétique utilisée dans cette thèse : la délétion du gène SR.

4.2.1.1 MAP6

La délétion partielle du gène MAP6 n'induit pas de phénotype schizophrénique et n'a pas d'impact sur le comportement des animaux (voir « *supplementary results 1* » de Bouet et al., 2020). Pourtant certaines études ont montré notamment un déficit de mémoire dans le test de reconnaissance d'objet des souris MAP6 hétérozygotes (Merenlender-Wagner et al., 2010, 2014). L'absence de la reproductibilité de ce résultat dans nos études (étude préliminaire et article 5) pourrait être en partie due à une sensibilité exacerbée de ces animaux aux conditions d'élevage. Ce point est étayé par nos difficultés à obtenir des animaux MAP6 KO. En effet, nous avons réalisé préalablement au protocole de reproduction décrit dans le matériel et méthode, un autre protocole de reproduction impliquant des croisements entre animaux hétérozygotes pour le gène MAP6. Nous avons observé une très forte mortalité des animaux MAP6 KO dans les portées générées par ce croisement, avec même aucun survivant pour ce génotype. De par la possibilité d'obtenir ce génotype dans d'autres

conditions de laboratoire (Andrieux et al., 2002), cette délétion génétique semble être particulièrement sensible aux modifications des conditions d'élevage.

Nos résultats ont permis de montrer l'intérêt de la délétion partielle du gène MAP6 dans un modèle multifactoriel de schizophrénie puisque l'apparition d'un effet de synergie est possible (les animaux MAP6^{+/-} étant par exemple plus sensibles aux traitements pharmacologiques dans le test du PPI). Cette augmentation de la sensibilité des animaux MAP6^{+/-} a également été associée à une séparation maternelle (Volle et al., 2013). De par l'absence globale d'effet propre de cette modification génétique et son effet sensibilisateur à d'autres facteurs, la délétion partielle du gène MAP6 apparaît être un bon candidat pour la construction de modèles animaux de schizophrénie, car il permet d'apporter une certaine vulnérabilité à des événements ultérieurs.

4.2.1.2 DISC1

L'autre modèle de schizophrénie à trois facteurs décrit chez la souris utilise une mutation du gène DISC1 (Sultana & Lee, 2020), un facteur génétique considéré comme suffisant pour induire un modèle de schizophrénie seul (Jones et al., 2011), (Jaaro-Peled, 2009) mais aussi en association avec un autre facteur (Cash-Padgett & Jaaro-Peled, 2013). La mutation génétique seule induit des déficits, qui sont parfois amplifiés ou contrebalancés par les autres facteurs (Sultana & Lee, 2020). L'approche diffère donc de la nôtre avec les modèles 3-hit et 3-M puisque notre hypothèse était de ne pas observer d'impact de la modification génétique seule mais uniquement un effet de synergie.

4.2.1.3 SR

La sérine racémase est une enzyme synthétisant la D-sérine, un co-agoniste du récepteur NMDA (Wolosker et al., 1999). Les schizophrènes présentent une diminution de la quantité de sérine racémase et de D-sérine (Bendikov et al., 2007; Hashimoto et al., 2005; Morita et al., 2007). De plus, une modification du *locus* du gène codant pour la sérine racémase a été identifié comme augmentant le risque de schizophrénie (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomic, 2014). La délétion du gène de la sérine racémase chez la souris entraîne un hypofonctionnement de la transmission glutamatergique, un phénotype comportemental de type schizophrénique

(avec une diminution de l'inhibition du réflexe de sursaut, et des performances diminuées aux tests de sociabilité et de mémoire), des altérations morphologiques (diminution de la taille de l'hippocampe) et physiologiques (diminution de la LTP hippocampique) (Balu et al., 2013; Basu et al., 2009; Labrie et al., 2009). Tout comme la modification du gène DISC1, cette délétion génétique montre donc des résultats prometteurs correspondant à un phénotype de type schizophrénique (Balu et al., 2013; Labrie et al., 2009). Nous avons donc utilisé cette modification génétique dans un modèle multifactoriel dans le but d'amplifier ces déficits avec un stress environnemental précoce induit par une séparation maternelle. Comme présenté sur le poster, certains déficits cognitifs ont bien été amplifiés par l'ajout de ce second facteur, avec par exemple l'apparition de déficits de reconnaissance de place chez les mâles. Ainsi, ce facteur génétique peut permettre de développer une sensibilité à des facteurs environnementaux comme la séparation maternelle. Son utilisation dans le cadre d'un modèle multifactoriel de schizophrénie est une piste prometteuse.

Dans le cadre de la recherche d'un effet de synergie entre les facteurs, il semble plus approprié d'utiliser des modifications génétiques n'ayant pas ou peu d'effet propre (comme la délétion partielle du gène MAP6), afin de faciliter l'identification des effets de synergie. Cependant, l'utilisation de facteurs induisant des phénotypes schizophréniques plus marqués (comme la modification des gènes DISC1 ou SR) est probablement plus appropriée dans le cadre d'une validation de prédiction ou du développement de nouvelles cibles pharmacologiques.

4.2.2 Facteur environnemental précoce : la séparation maternelle

La séparation maternelle est largement utilisée dans le cadre des modèles de schizophrénie et ceci, seule (Ellenbroek & Riva, 2003; Nishi et al., 2013) ou en association avec d'autres facteurs (Moran et al., 2016). Deux des trois autres modèles de schizophrénie à trois facteurs décrits dans la littérature utilisent un protocole de séparation maternelle chronique (Chen et al., 2011; Sultana & Lee, 2020). Ce protocole de séparation est largement utilisé dans la littérature et consiste en une séparation de quelques heures par jour, durant un nombre de jours variable entre le 1^{er} et le 21^{ème} jour post-natal (Nishi et al., 2013). Les études de Chen *et al.* et de

Sultana *et al.* utilisent respectivement une séparation quotidienne de 3h entre les 3^{ème} et 10^{ème} jours pour l'un, une séparation quotidienne de 4h entre les 3^{ème} et 12^{ème} jours pour l'autre (Chen *et al.*, 2011; Sultana & Lee, 2020). Le protocole de séparation maternelle utilisé durant cette thèse est aigu, avec une séparation maternelle de 24h au 9^{ème} jour de vie des animaux (Ellenbroek & Riva, 2003). Initialement développé chez le rat (Ellenbroek *et al.*, 1998; Husum *et al.*, 2002), ce protocole a été adapté à la souris au laboratoire (Bouet *et al.*, 2011). Cette séparation maternelle aiguë induit des déficits d'inhibition (du réflexe de sursaut, latente, P50) à l'âge adulte chez le rat (Ellenbroek & Riva, 2003) et de légers déficits de sociabilité à l'âge adulte chez la souris (Bouet *et al.*, 2011). Les modalités du protocole de séparation maternelle font varier les effets comportementaux et physiologiques (Nishi *et al.*, 2013). Par exemple une hyper-réactivité au stress a été montrée à l'âge adulte après un protocole de séparation maternelle aiguë mais pas chronique (Rosenfeld *et al.*, 1992).

Certains symptômes comme l'anxiété peuvent être liés à ce facteur. En effet, les troubles anxieux sont présent chez plus d'un tiers des schizophrènes (Braga *et al.*, 2013) et le lien entre les traumatismes durant l'enfance et les troubles anxieux est avéré (Heim & Nemeroff, 2001). Ainsi, la séparation maternelle pourrait être à l'origine de l'augmentation de l'anxiété dans les modèles multifactoriels de schizophrénie puisque seul le modèle n'utilisant pas ce facteur (Kekesi *et al.* utilisent un isolement social après le sevrage) ne présente pas d'augmentation de l'anxiété (Kekesi *et al.*, 2015). Les trois autres modèles à trois facteurs (dont notre modèle 3-hit) utilisant un protocole de séparation maternelle montrent une augmentation de l'anxiété par rapport aux témoins (Bouet *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2011; Sultana & Lee, 2020).

Le phénotype anxieux pourrait être lié aux modifications structurales et fonctionnelles induites par le stress subi durant la séparation maternelle, avec des modifications de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et des structures limbiques (Cirulli *et al.*, 2003). Cependant, la complexité des interactions entre facteurs empêche de définir si l'anxiété est due à un unique facteur (comme peuvent le suggérer les résultats de la publication de Sultana *et al.* avec une augmentation de l'anxiété chez les animaux ayant subi la mutation du gène DISC1 qui disparaît lorsque d'autres facteurs sont ajoutés à cette modification génétique (Sultana & Lee, 2020)), ou à un effet de synergie entre deux ou trois facteurs (comme suggéré par Chen *et al.* qui montrent une

augmentation de l'anxiété suite à l'administration de PCP, amplifiée par la séparation maternelle chronique (Chen et al., 2011)).

Pourtant, ce n'est pas le cas du modèle 3-M qui présente plutôt une diminution de l'anxiété malgré l'utilisation d'une séparation maternelle, qui plus est, associée à une administration de MK801 (qui devrait amplifier l'augmentation de l'anxiété comme démontré dans l'article de Chen et al., 2011). Une des limites de la comparaison entre ces différents modèles à trois facteurs est atteinte ici, avec l'utilisation d'espèces animales différentes (souris ou rat) et de potentiels dimorphismes sexuels qui n'ont pas encore pu être mis en évidence.

4.2.3 Facteur pharmacologique tardif

Les modèles 3-hit et 3-M ne diffèrent que par le facteur pharmacologique tardif qui cible le système endocannabinoïde dans le premier cas et le système glutamatergique dans le second. La principale différence identifiable entre les phénotypes de ces deux modèles est l'apparition de symptômes de type positif (augmentation de l'activité locomotrice) chez le modèle 3-M. Un hypofonctionnement des récepteurs NMDA *via* des administrations d'antagonistes de ces récepteurs est un modèle animal de schizophrénie largement utilisé et présentant notamment des symptômes de type positif (Lee & Zhou, 2019). A l'inverse, les agonistes des récepteurs cannabinoïdes de type 1 (CB1) comme le THC n'induisent pas de symptômes de type positif, même s'ils peuvent potentialiser ces symptômes induits par des agonistes dopaminergiques (Di Marzo, 2008; Fernandez-Espejo et al., 2009). La présence de récepteurs CB1, dont l'activation induit une hyperpolarisation des terminaisons présynaptiques des neurones glutamatergiques, pourrait permettre une inhibition de la neurotransmission glutamatergique lors du traitement chronique par le THC (Fernandez-Espejo et al., 2009). Malgré cette voie d'action, le modèle 3-hit ne semble pas présenter d'hypofonctionnement des récepteurs NMDA puisque, comme nous l'avons observé en électrophysiologie (article 2), l'activation de ces récepteurs est équivalente aux animaux témoins dans l'hippocampe, voire augmentée chez les femelles 3-hit.

Le facteur environnemental tardif utilisé dans le modèle 3-hit, l'administration de THC durant l'adolescence, a été choisi sur la base de certaines données épidémiologiques associant la consommation de cannabis à l'adolescence à la schizophrénie. En effet, la littérature suggère que cette consommation peut augmenter le risque de déclencher

une schizophrénie (Arseneault et al., 2002; Di Forti et al., 2019; Renard et al., 2014; Rubino & Parolaro, 2014). De plus, des études précliniques ont montré une altération des processus cognitifs et émotionnels à l'âge adulte après administration de THC à l'adolescence (Cha et al., 2006; Rubino et al., 2009). Cependant, il existe certaines différences entre le facteur de risque observé lié à la consommation de cannabis et l'administration de cannabinoïdes (THC ou autres agonistes CB1) dans les modèles animaux. En effet, le cannabis contient de nombreuses substances, dont le THC qui est l'une des molécules les plus psychoactives (Colizzi & Bhattacharyya, 2017). Les autres molécules présentes dans le cannabis, notamment le cannabidiol (CBD), semblent pouvoir moduler l'impact de la consommation de cette drogue sur l'augmentation du risque de schizophrénie (Colizzi et al., 2020). De plus, le cannabis est consommé avec du tabac, qui est une substance dont la consommation est largement plus élevée chez les schizophrènes que dans la population normale, sans que cela soit considéré comme un facteur de risque (Volkow, 2009). L'assimilation de la consommation de cannabis à un facteur de risque de schizophrénie peut également être remise en question par les témoignages de patients indiquant utiliser cette drogue comme automédication, pour atténuer certains de leur symptômes (Quigley & MacCabe, 2019; Van Dijk et al., 2012). Le CBD est effectivement étudié pour le traitement de nombreux troubles, notamment les psychoses (Deiana, 2013).

Ainsi, le lien entre consommation de cannabis et schizophrénie, bien qu'il soit attesté de nombreuses façons, ne permet pas d'établir de causalité entre la consommation de cette drogue et la pathologie.

4.2.4 Interactions entre facteurs

Un effet de synergie entre les différents facteurs a été montré dans les trois modèles de schizophrénie présentés dans cette thèse (le modèle 3-hit : articles 1, 2 et 4 ; le modèle 2-hit présenté dans le poster ; le modèle 3-M présenté dans l'article 5). En effet, les symptômes observés chez les animaux 2-hit et 3-M ne se limitent pas à l'addition des symptômes observés chez les animaux n'ayant subi qu'un seul facteur. L'utilisation de deux facteurs permet déjà d'observer un effet de synergie et l'induction de symptômes de type schizophrénique (voir poster), cependant l'intensité des symptômes observés chez des animaux ayant subi deux facteurs peut être encore amplifiée par l'ajout d'un troisième facteur (voir article 1). On peut donc suggérer qu'un

modèle à deux facteurs peut correspondre à une pathologie psychiatrique moins invalidante que la schizophrénie, ou une forme moins sévère de cette maladie, alors qu'un modèle à trois facteurs correspond à une forme plus sévère.

L'importance de l'interaction des trois facteurs dans le modèle 3-hit peut s'illustrer par la mesure du volume de l'hippocampe. En effet, la délétion partielle du gène MAP6 n'induit pas de réduction de ce volume (Powell et al., 2007), tout comme l'association d'une séparation maternelle et de l'administration chronique de THC (groupe 2-hit de l'article 1). Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que c'est bien l'association des trois facteurs qui induit une réduction du volume de l'hippocampe chez les souris 3-hit.

Les effets de résilience et de vulnérabilité semblent être régis par des mécanismes épigénétiques qui diffèrent en fonction des interactions que l'individu a eu avec son environnement. Ainsi, les traumatismes durant l'enfance chez les schizophrènes modulent les mécanismes épigénétiques et par ce biais instaurent une vulnérabilité aux autres facteurs de risque (Dudley et al., 2011; Tremolizzo et al., 2002). Ce même phénomène peut être également envisagé pour les protocoles de séparation maternelle dans les modèles animaux.

A l'inverse, une résilience peut apparaître et s'accroître avec l'augmentation du nombre de facteurs. L'utilisation de stratégies cognitives différentes peut masquer des symptômes, ce qui est cohérent avec l'observation de réseaux neuronaux d'activation différents de ceux des personnes saines chez des patients schizophrènes (Niznikiewicz et al., 2003). Des modifications d'activation des réseaux neuronaux ont été montrés chez les schizophrènes, et dans des modèles de schizophrénie chez le rongeur après administration d'antagonistes des récepteurs NMDA (voir pour revue Krajcovic et al., 2019).

Il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes de vulnérabilité et / ou de résilience mis en œuvre dans les interactions entre facteurs dans les modèles animaux de schizophrénie. Pour cela, une mesure de certains mécanismes épigénétiques (quantification par chromatographie liquide à haute performance de S-Adenosyl-Methionine et de S-Adenosyl-Homocysteine (Tremolizzo et al., 2005) ; quantification par immunohistochimie de l'acétyl-histone H3 (Demeter et al., 2016)) pourrait être réalisée sur chacun des huit groupes permettant de disséquer les effets de chacun des facteurs dans l'étude d'un modèle à trois facteurs.

4.3 Validité de prédiction

La validité de prédiction renvoie à la capacité des antipsychotiques à améliorer les symptômes observés dans les modèles animaux de schizophrénie. De nombreux antipsychotiques sont disponibles, cependant ils sont encore insatisfaisants et de nouvelles molécules doivent être développées. En effet, certains patients (environ 30%) présentent une résistance aux traitements (Lindenmayer, 2000; Sheitman & Lieberman, 1998). De plus, ces traitements ne prennent pas en charge certains symptômes (en particulier les symptômes négatifs et les déficits cognitifs) et ont même des effets délétères sur ces derniers (Bost, 2016; Tandon, 2002).

Chez la souris, pour administrer des antipsychotiques la voie intrapéritonéale est la plus utilisée car elle est simple et facile à réaliser ; des administrations orales, par voie intraveineuse, ou encore par voie intra-nasale sont également mises en œuvre. Ces différentes voies d'administrations sont caractérisées par des paramètres pharmacocinétiques différents concernant notamment le délai d'atteinte de la concentration plasmatique maximale, la durée de persistance du médicament dans l'organisme et la biodisponibilité (définie par la concentration atteignant la circulation générale et la vitesse avec laquelle elle l'atteint). Le choix des délais d'administration et des doses en fonction des voies utilisées est donc essentiel.

Les modèles animaux ayant pour but une transposition des résultats à des études cliniques, il faut tenir compte du mode d'administration utilisé chez l'humain. Les antipsychotiques, et en particulier la lurasidone, sont généralement administrés par voie orale sous forme de pilules. Il est donc nécessaire pour les modèles animaux de se rapprocher de cette voie d'administration. Une administration quotidienne *per os* est donc la solution qui se rapproche le plus de l'administration chez l'humain.

Cependant, un autre facteur doit également être pris en considération : la réduction systématique de tout acte invasif en expérimentation animale. L'administration *per os*, c'est à dire par gavage, est invasive et nécessite un expérimentateur compétent. Ce dernier point inclut le fait qu'une erreur de manipulation peut conduire à des lésions voire au décès de l'animal. Il serait donc plus adapté d'utiliser une voie d'administration orale mais qui ne nécessite pas de contrainte ni de contention, ce qui n'est pas le cas du gavage.

Différents protocoles utilisant la nourriture ou l'eau de boisson pour délivrer des agents pharmacologiques ont été décrits. L'utilisation de la nourriture comme support d'une molécule présente certains inconvénients. Par exemple, il est nécessaire de séparer les animaux au moment d'administrer la dose du médicament pour s'assurer que tous les individus aient accès à la nourriture. L'administration par l'eau de boisson présente de plus en plus d'adeptes de par ses avantages éthique (non invasif), et temporel (l'expérimentateur n'a pas à manipuler individuellement les animaux).

Vérifier la validité de prédiction des modèles animaux de schizophrénie consiste à administrer des antipsychotiques pour contrebalancer les déficits observés. L'étude des symptômes cognitifs dans un modèle de schizophrénie doit donc s'associer à l'utilisation d'un antipsychotique pouvant améliorer ces symptômes. L'antipsychotique lurasidone a été choisi pour évaluer la validité de prédiction du modèle 3-hit parce qu'il a démontré des propriétés procognitives mais aussi une efficacité pour contrer les symptômes négatifs, notamment dans les modèles de schizophrénie (Horiguchi et al., 2016; Ishiyama et al., 2007; Rajagopal, Burgdorf, et al., 2016). Pourtant, aucune amélioration de ce type n'est montrée en clinique en comparaison avec d'autres antipsychotiques (olanzapine, risperidone, clozapine, ...) (Citrome, 2012; Meltzer et al., 2011, 2020). L'étude de cet antipsychotique sur des souris témoins a montré une bonne tolérance comportementale des animaux et l'absence de modification de l'évolution temporelle de leur poids corporel.

Le mode d'administration choisi, la voie i.p., est largement utilisé dans la littérature mais ne correspond pas à l'utilisation par les patients d'un antipsychotique qui est le plus couramment administré chroniquement par voie orale. Afin de rapprocher les pratiques précliniques de la réalité clinique, nous avons mené une étude pharmacocinétique de la lurasidone suite à l'administration par ces deux voies. Notre étude indique notamment que le temps moyen de présence dans le plasma (MTT= « *Mean Transit Time* ») est inférieur à 2h (pour les 2 voies d'administration) et que la durée de séjour du principe actif dans le plasma n'excède pas 4h après administration aiguë. Comme indiqué plus haut, la connaissance de ces paramètres nous permettra d'adapter au mieux le protocole d'administration chronique lors d'études ultérieures chez la souris C57BL/6. Par ailleurs, utiliser la voie orale dans des modalités moins invasives et plus corrélées à la pharmacocinétique de la lurasidone permettra une avancée dans l'évaluation de la validité de prédiction des modèles animaux avec ces

nouveaux antipsychotiques de 3^{ème} génération, et un nouveau pas vers l'optimisation du bien-être animal. L'administration d'antipsychotiques par l'eau de boisson présente plusieurs avantages. Nos expériences ont montré qu'une administration chronique quotidienne (avec une seule administration par jour) ne permettait pas d'obtenir un plateau de la concentration plasmatique de lurasidone. L'administration par l'eau de boisson pourrait permettre une administration régulière au cours de la phase d'activité des animaux et l'obtention plus aisée à plus long terme (administration pour des durées supérieures à 3 semaines) d'un plateau d'équilibre des concentrations résiduelles. Cela se rapproche davantage de l'utilisation de ces molécules en clinique puisqu'on recherche un effet de plateau des concentrations plasmatiques. Grâce aux résultats de notre étude de pharmacocinétique qui permet de calculer la concentration nécessaire dans l'eau de boisson, un protocole d'administration par l'eau de boisson est envisageable, sachant par ailleurs qu'une souris C57BL/6 boit en moyenne 3,5ml par jour. Point important, nous avons également montré que la lurasidone est stable dans l'eau durant plusieurs jours. L'administration par l'eau de boisson a donc un avantage expérimental, mais également un avantage de limiter la demande en ressources humaines puisque sa stabilité dans l'eau ne demande qu'une manipulation tous les 3 ou 4 jours alors que les autres protocoles d'administration (i.p., *per os*) nécessitent une manipulation quotidienne et invasive de l'animal. Ce dernier point a son importance puisque la limite de douleur établie qui nécessite d'avoir une autorisation de projet pour exercer une expérience correspond à l'introduction d'une aiguille par un expérimentateur compétent. Les protocoles habituels atteignent donc déjà cette limite alors que l'administration par l'eau de boisson ne demande aucun acte invasif et donc pas nécessairement d'autorisation de projet si d'autres expérimentations ne sont pas réalisées sur ces mêmes animaux. Ce qui renvoie au dernier avantage de ce protocole, qui a donc des intérêts expérimentaux, de ressources humaines, et d'éthique en matière d'expérimentation animale.

Le choix de l'antipsychotique utilisé pour la validation de prédiction est complexe et restera imparfait du fait de l'absence de traitement efficace pour les symptômes négatifs et les déficits cognitifs de la schizophrénie. L'utilisation en association de plusieurs molécules, une par catégorie de symptôme, pourrait être intéressante. Cependant, en dehors des antipsychotiques, il n'existe pas non plus aujourd'hui de

molécules réellement efficaces pour traiter sélectivement les déficits sociaux ou cognitifs.

4.4 Qu'est-ce qu'un bon modèle de schizophrénie ?

4.4.1 Des constructions de plus en plus complexes pour des résultats de plus en plus prometteurs ?

L'un des principaux objectifs de la mise au point et de l'utilisation de modèles animaux de schizophrénie est le développement de nouveaux traitements plus efficaces. On peut donc se demander : Est-ce que construire des modèles animaux multifactoriels avec une validité de construction forte pourra permettre d'améliorer les traitements de la schizophrénie, en permettant notamment de soigner les symptômes négatifs et les troubles cognitifs ?

La large gamme de modèles animaux mono factoriels de schizophrénie développées depuis les années 1970 n'a pas eu d'impact fort sur le développement de nouveaux traitements de la schizophrénie bien qu'ils aient permis d'identifier les effets secondaires des antipsychotiques (Kilts, 2001). Les limites des possibilités de développement de cibles thérapeutiques semblent atteintes avec ces modèles mono factoriels. Le rythme de mise sur le marché de nouveaux antipsychotiques diminue (la lurasidone est approuvée par la FDA en 2014 (Jaeschke et al., 2016), la lumatépérone en 2020 (Greenwood et al., 2020)) alors que la seconde génération avait fait apparaître autour des années 1990 tout un groupe d'antipsychotiques (ex : rispéridone, quétiapine, olanzapine, ziprasidone). Ce qui était également le cas dans les années 1950 avec les antipsychotiques de première génération (chlorpromazine, fluphénazine, thioridazine) (Tandon, 2002). La troisième génération d'antipsychotique est d'ores et déjà née mais elle n'a pas atteint son pic d'expansion auquel on peut s'attendre en observant la cinétique d'apparition des antipsychotiques de première et de seconde génération.

Cette troisième génération a pour but d'améliorer les symptômes négatifs et les déficits cognitifs. Les quelques antipsychotiques de troisième génération existants montrent déjà certaines de ces capacités. La lurasidone permettrait de contrebalancer les déficits cognitifs (Jaeschke et al., 2016; Rajagopal, Massey, et al., 2016). Cependant,

bien que certaines études cliniques semblent également montrer un effet pro cognitif (Harvey et al., 2015), cette information est issue surtout des études précliniques. Dans le cas de la lumatépérone, l'intensité et la fréquence de ses effets indésirables sont réduits par rapport à celles des antipsychotiques de première et de seconde génération. Mais son efficacité sur les symptômes de type négatif n'a pas été montrée (Greenwood et al., 2020).

Les modèles animaux multifactoriels ne sont pas couramment utilisés pour le développement de cibles thérapeutiques. Les études sur ces modèles se centrent en effet plutôt sur la caractérisation du phénotype des modèles et la compréhension des mécanismes qui sous-tendent les déficits (Moran et al., 2016). Ces modèles multifactoriels modélisent les troubles mal ou non pris en charge par les antipsychotiques actuels. Ils seront donc potentiellement à l'origine d'une quatrième génération d'antipsychotiques qui pourra traiter les symptômes négatifs et les déficits cognitifs.

Afin de promouvoir une bonne validité de construction d'un modèle de schizophrénie, l'utilisation de plusieurs facteurs apparaît donc essentielle. Cependant, le cumul de facteurs a un effet d'augmentation de la variabilité interindividuelle mais également inter-cohorte, probablement par l'activation de mécanismes épigénétiques (Dudley et al., 2011; Tremolizzo et al., 2002). Cette variabilité pose problème pour l'interprétation des résultats et pour déterminer des éléments du phénotype du modèle. En effet, une variabilité inter-cohorte pose la question de la valeur des résultats obtenus avec chaque cohorte. Une variabilité interindividuelle réduit la puissance des résultats statistiques et empêche de voir apparaître des effets généraux. Les modèles de schizophrénie sont utiles pour tester de nouvelles stratégies thérapeutiques, mais une variabilité trop importante peut cacher d'éventuels effets bénéfiques, ou délétères, des traitements testés.

4.4.2 Et si on cultivait la variabilité ?

La modélisation d'une pathologie qui présente une si grande diversité de symptômes selon les patients, avec des intensités différentes telle que la schizophrénie, est complexe.

La construction et l'évaluation des différents types de validité d'un modèle multifactoriel de schizophrénie présente certaines difficultés qu'il est nécessaire de surmonter afin d'améliorer la recherche et la mise au point de nouveaux traitements. L'une de ces difficultés réside dans les variabilités interindividuelle et inter-cohorte comme nous avons pu l'observer dans nos modèles multifactoriels de schizophrénie. Variabilités qui rendent problématiques leurs utilisations pour tester de nouvelles stratégies thérapeutiques. Cependant, cette variabilité est cohérente avec la variabilité des symptômes observés chez les schizophrènes. Le débat sur l'utilisation du terme « schizophrénie » au singulier ou au pluriel est toujours d'actualité et est né en même temps que la caractérisation de cette maladie (Bleuler, 1911; Dollfus, 2019; Harding, 1988).

Un modèle animal doit tendre vers un isomorphisme avec la pathologie étudiée pour avoir une bonne validité d'apparence. Au regard de la variabilité interindividuelle des symptômes de la schizophrénie, les modèles animaux devraient donc refléter cette variabilité.

Cependant, à tous les stades d'utilisation des modèles animaux, de leur construction à leur évaluation, tout est fait pour réduire la variabilité interindividuelle et inter-cohorte. Les animaux utilisés dans ces modèles sont généralement des rongeurs, souvent uniquement des mâles pour supprimer une variabilité dû au dimorphisme sexuel (Moran et al., 2016). De plus, parmi les rongeurs utilisés, certaines souches sont consanguines afin de diminuer la variabilité génétique et donc comportementale (ex : souris C57BL/6). D'autre part, les conditions d'hébergement des animaux sont faiblement enrichies par crainte d'augmenter la variabilité interindividuelle par l'augmentation des possibilités d'interaction avec l'environnement et les autres congénères (Akhund-Zade et al., 2019), ce qui n'est pas forcément le cas (Bailoo et al., 2018). En plus de l'utilisation du minimum d'enrichissement pour l'hébergement des animaux, les animaleries sont également standardisées avec des cycles lumineux, une température et un taux d'humidité constants durant toute l'année. La manipulation des animaux par les expérimentateurs est également standardisée, tout comme les salles d'expérimentation. Les modèles animaux sont donc développés dans des conditions très standardisées.

Concernant les méthodes de caractérisation, notamment comportementale, du phénotype des modèles animaux, elles ne permettent pas systématiquement de

refléter toute la variabilité interindividuelle. Des analyses plus éthologiques du comportement (généralement réduit à des variables largement utilisés comme, par exemple, la distance parcourue et le temps passé dans le centre du dispositif de *l'open field* (Prut & Belzung, 2003; Sestakova et al., 2013; Sun et al., 2017; Woloszynowska-Fraser et al., 2017)) peuvent par exemple permettre de différencier les effets de molécules qui auraient induit un profil similaire sur les variables classiques (Choleris et al., 2001).

L'utilisation de tests prenant en compte un contexte plus éthologique peut permettre également d'observer des modifications plus fines des comportements sociaux (Peters et al., 2015). Cependant, ces tests nécessitent des observations sur le plus long terme et les études les mettant en œuvre sont donc très chronophages. Des dispositifs automatisés permettent des observations sur des plages temporelles plus importantes, en s'abstrayant de la variabilité inter expérimentateurs (Peleh et al., 2019). De tels dispositifs peuvent également permettre d'étudier les vocalisations des animaux (Caruso et al., 2020; Coffey et al., 2019), élément important de leur comportement social (Peters et al., 2015), qui peut également être une mesure d'anxiété (Harro, 2018).

La diversification des comportements mesurés peut donc permettre de faire apparaître des différences plus fines dans le comportement des animaux, ce qui peut être utile dans un modèle de schizophrénie, et plus particulièrement pour distinguer l'apport de chaque facteur dans un modèle multifactoriel.

Des batteries de tests comportementaux sont utilisées pour évaluer les modèles de schizophrénie à trois facteurs (Chen et al., 2011; Kekesi et al., 2015; Sultana & Lee, 2020). Chaque test est analysé statistiquement indépendamment des autres sans que ces résultats fassent l'objet d'une correction pour comparaisons multiples. Cela peut empêcher d'observer l'effet global d'un conditionnement, d'autant plus lorsque ce conditionnement est complexe comme pour les modèles de schizophrénie à trois facteurs. La transformation des données en scores z (en centrant-réduisant les données pour obtenir une moyenne de 0 et un écart type de 1) apporte une réponse en centralisant les résultats autour d'une unique variable plutôt qu'observer des résultats ponctuels, dans des gammes de valeurs très différentes, issus de plusieurs tests. Cependant, dans le cadre de modèles de schizophrénie, un seul score z n'est pas suffisant au regard des trois grandes catégories de symptômes ou déficits

recherchés. Il serait donc intéressant de réaliser 3 scores, pour les symptômes de type positif, négatif et pour les déficits cognitifs. L'utilisation de scores réduisant les données comportementales à un unique index a été réalisée par Kekesi *et al.* dans l'analyse d'un modèle de schizophrénie à trois facteurs. Les auteurs de ce travail ont distingué les symptômes de type positif, négatif et les autres symptômes, avant de les regrouper dans une variable globale intitulée « *schizophrenia score* ». La méthode utilisée diffère des scores z puisqu'il s'agit d'une transformation des variables continues en variables catégorielles (Kekesi *et al.*, 2015). Ces « scores de schizophrénie » sont essentiellement utilisés pour obtenir une représentation graphique claire, mais n'apportent pas de réelle information nouvelle et ne sont pas discutés dans cette étude. Une analyse en composantes principales (ACP) peut être réalisée sur des données normalisées mais non compilées. Ce type d'analyse permet de décrire et de visualiser un jeu de données complexe. Les informations sont « débruitées » pour faire apparaître les principaux axes qui décrivent le mieux la variabilité des données. Une autre méthode pour analyser des données issues d'une batterie de tests est aussi disponible : l'analyse de variances multivariée MANOVA. Cette méthode est un outil intéressant pour l'analyse de données issues de batteries de tests comportementaux évaluant des modèles animaux de pathologies neuropsychiatriques qui peut améliorer la validité, la prévisibilité, et la reproductibilité des résultats (Stukalin & Einat, 2019).

La prise en compte de la variabilité interindividuelle peut aussi se faire en conservant l'utilisation de tests statistiques classiques qui comparent des moyennes ou des médianes, mais en augmentant la taille des cohortes. En effet, l'hétérogénéité du nombre d'animaux par groupe a été une limite pour l'évaluation des modèles 3-hit et 3-M dans nos expériences, avec un nombre d'animaux restreint dans certains groupes (jusqu'à 6 animaux seulement pour le groupe 3-hit dont les résultats en électrophysiologie sont présentés dans l'article 2). Cependant, obtenir des effectifs constants d'environ 12 animaux par groupe n'est pas aisé avec un modèle à trois facteurs. Pour comprendre les mécanismes impliqués par chaque facteur, et leur potentiel de synergie les uns avec les autres, il est intéressant d'évaluer dans un même temps des animaux ayant subi uniquement un facteur, en addition d'animaux ayant subi toutes les combinaisons possibles de 2 facteurs, et ceux ayant subi les 3 facteurs. Cela revient à évaluer 8 groupes d'animaux. Des différences en fonction du sexe ont été révélées à plusieurs reprises dans les modèles animaux de schizophrénie, il est

donc nécessaire d'obtenir ces 8 groupes avec des animaux mâles et des animaux femelles ce qui amène à 16 groupes. De plus, une évaluation pharmacologique du modèle peut être faite pour évaluer sa validité de prédiction et ses capacités à servir à l'évaluation de nouveaux traitements. Il faudra donc utiliser un, potentiellement deux, traitements différents, par exemple un antipsychotique de dernière génération, en comparaison avec un antipsychotique de première génération, ce qui amène à 48 groupes (si l'on utilise qu'une seule dose). Afin de réaliser une étude construite de cette façon, en envisageant un effectif de 12 animaux par groupe, 576 animaux seraient donc nécessaires. Il faut ajouter à cela que nos expériences ont montré que, du fait du décalage temporel entre la connaissance du génotype des individus et le protocole de séparation maternelle, il est difficile de prévoir avec précision combien d'animaux seront obtenus par groupe. Une marge de manœuvre importante doit être mise en place. En effet, 90 femelles gestantes, même si elles permettent d'obtenir théoriquement 580 individus (avec une moyenne de 6,53 souriceaux par portée pour les C57BL/6j selon Janvier Labs) ne garantissent pas les 48 groupes d'animaux d'effectifs suffisants dans le contexte d'un modèle 3-hit. La méthode de reproduction des animaux dans le cadre de la construction des modèles 3-hit et 3-M (femelles C57BL/6 WT x mâles MAP6+/-) mène à 2 génotypes différents (WT et MAP6+/-) qui doivent être déterminés afin d'attribuer un groupe à chaque individu. Cependant, la détermination du génotype ne peut être réalisée qu'au moment du sevrage (21 jours), et donc après le protocole de séparation maternelle (réalisé au 9^{ème} jour). Ce décalage temporel entraîne une diminution des possibilités d'anticipation des effectifs constituant chaque groupe expérimental. L'utilisation de croisements engendrant un génotype unique est une solution qui a été envisagée, cependant cela nécessite l'utilisation de mâles MAP6 KO (l'utilisation de femelles WT étant nécessaire pour éliminer un biais de modification du comportement maternel induit par une délétion du gène MAP6 (Andrieux et al., 2002)). Ces animaux ne sont viables que dans des conditions d'hébergement spécifiques qui n'ont pas pu être reproduites au laboratoire, contraignant le protocole de reproduction des animaux.

Le nombre d'animaux par groupe ne peut donc être défini qu'après le génotypage des animaux, qui révèle souvent des déséquilibres en fonction des animaux qui ont subi la séparation maternelle ou non. De plus, une cohorte de cette ampleur, avec donc près de 600 animaux, ne permet pas d'envisager des administrations quotidiennes d'agents

pharmacologiques pour chaque individu, *a fortiori* si le biais expérimentateur veut être évité. Afin de réaliser des études de cette ampleur qui permettraient une grande avancée dans la compréhension des mécanismes de la pathologie, d'autres méthodes d'administration doivent être développées. En effet, la construction du modèle 3-M et *a fortiori* du modèle 3-hit est complexe et a mené à des effectifs faibles et variables dans les travaux présentés ici. Il est donc compliqué de réaliser une caractérisation complète des modèles 3-hit et 3-M de par les difficultés organisationnelles.

Le gène MAP6 présente de grands avantages dans la construction d'un modèle de schizophrénie et sa délétion partielle permet d'entraîner une susceptibilité aux facteurs environnementaux qui est cohérente avec les connaissances étiologiques de la schizophrénie (Choi et al., 2009; Deloulme et al., 2015; Marchisella et al., 2016; Schloss & Lau, 2012; Shimizu et al., 2006; Volle et al., 2013). Cependant, modéliser cette pathologie chez l'animal dans l'objectif de développer des traitements plus efficaces, nécessite un modèle reproductible et peu coûteux (en temps et en nombre d'animaux) permettant de « *screener* » et tester des molécules candidates. Ainsi, la délétion partielle du gène MAP6 mène à des contraintes pouvant altérer ou ralentir un processus d'évaluation de la validité de prédiction. Ce facteur génétique a donc de grands avantages dans l'étude de la compréhension des mécanismes qui sous-tendent la schizophrénie, mais son utilisation pour évaluer les capacités antipsychotiques de candidats médicaments ne semble pas pleinement appropriée.

Le modèle 2-hit (SR KO et séparation maternelle décrit dans le poster) permettra de simplifier cette étape puisque les animaux SR KO sont issus du croisement de deux génotypes identiques, il sera donc possible de réaliser de façon plus aisée une caractérisation complète du modèle.

Un manque de reproductibilité inter-cohortes a été observé dans certains tests. Par exemple, le déficit de mémoire de travail des animaux 3-hit décrit dans l'article 1 n'a pas été reproduit chez les animaux mâles dans une autre cohorte bien qu'il soit observé chez les femelles (données non publiées). L'absence de reproductibilité peut être le gage de qualité d'un modèle de schizophrénie au regard de la variabilité des phénotypes observés chez les patients, cependant ce n'est pas le gage d'une bonne commodité d'utilisation d'un modèle pouvant permettre de mesurer le potentiel de nouvelles molécules.

Ainsi, les variabilités observées dans les modèles multifactoriels de schizophrénie ont leur intérêt et peuvent être cultivées et prises en compte avec des analyses statistiques particulières. Les effectifs conditionnent cette variabilité et leur augmentation est importante dans ce type de modèle.

4.4.3 Est-ce que les symptômes psychiatriques peuvent être réellement modélisés chez le rongeur ?

4.4.3.1 Oui : avec certains dispositifs

Certains symptômes observés chez les schizophrènes sont particulièrement difficiles à modéliser chez l'animal. C'est le cas des hallucinations et pensées délirantes qui sont traduites chez l'animal en symptômes de type positif évalués par l'augmentation de l'activité locomotrice et les stéréotypies (Jones et al., 2011). D'autres symptômes caractéristiques de la schizophrénie ont un caractère plus translationnel comme le déficit d'inhibition du réflexe de sursaut qui peut être mesuré globalement de la même manière chez l'homme et dans les modèles animaux de schizophrénie. De plus, ce test présente un haut niveau d'automatisation ce qui limite fortement le biais inter expérimentateurs. Le test est réalisé dans des conditions d'isolement permettant de limiter l'impact des biais environnementaux sur les résultats. Cependant ce test reste stressant pour l'animal qui est soumis à un niveau sonore important (65dB de bruit de fond) durant une période relativement longue (environ de 20 à 40min) et dans un espace restreint (Valsamis & Schmid, 2011).

L'évaluation des déficits cognitifs peut également être considérée comme ayant une forte valeur translationnelle avec l'utilisation de dispositifs comprenant les écrans tactiles (« *touchscreen* ») utilisant des paradigmes relativement proches dans les modèles animaux et chez l'homme. De nombreuses fonctions cognitives peuvent être évaluées avec un unique appareil permettant des mesures fiables et reproductives de diverses capacités cognitives (apprentissage, mémoire, discrimination visuelle) (Horner et al., 2013). Le dispositif du « *touchscreen* » présente ces avantages, mais il ne permet pas de conserver un contexte écologique de test. En effet, même si une phase d'habituation est respectée, les animaux sont placés dans un environnement

stressant et les protocoles de tests nécessitent de soumettre les animaux à une restriction alimentaire (Horner et al., 2013).

4.4.3.2 Les limites du modèle souris

La souris C57BL/6 présente l'avantage de pouvoir réaliser des modifications génétiques et sa consanguinité est source de diminution de la variabilité interindividuelle. Pourtant, les capacités de ces souris à obtenir des performances « normales » lors de tests comportementaux largement utilisés dans la communauté n'a pu être reproduit à plusieurs reprises dans nos expériences. Cela a mené à un manque de reproductibilité pour certains tests et bien que les conditions environnementales soient très standardisées au laboratoire, nous ne savons pas quelle est l'origine de ces résultats non reproductibles. Dans mes expériences, les différentes manipulations subies par les animaux témoins pourraient avoir des effets et permettre de comprendre ces phénomènes. Concernant le facteur génétique, nous avons veillé à l'utilisation de mères C57BL/6 WT (et non de souris ayant une modification du gène d'intérêt puisque les animaux dont le gène MAP6 a été modifié présentent des altérations de leur comportement maternel (Andrieux et al., 2002)) n'induit pas de stress particulier par un comportement maternel altéré. Cependant, les portées étaient constituées dans nos expériences d'animaux WT et MAP6+/- et le fait de permettre à des animaux de génotypes différents de se côtoyer pourrait avoir un impact sur les animaux témoins des portées. Le protocole contrôle de séparation maternelle (de 20s seulement), bien que les souriceaux ne soient pas manipulés, pourrait tout de même avoir un impact sur les animaux qui sont dérangés à un stade très précoce de leur vie. La procédure contrôle de l'administration de THC est certainement la plus impactante, avec des administrations quotidiennes de sérum physiologique par voie intrapéritonéale. Il serait intéressant de connaître l'effet de chacune de ces procédures contrôle sur les animaux, ce qui pourrait éventuellement donner des indications sur les déficits inattendus des individus témoins que nous avons dans certains tests comportementaux.

Le choix de la souris peut également être discuté dans ce type de modèle qui nécessite l'étude de processus cognitifs complexes. En effet, les capacités des rats dans certains tests cognitifs (notamment ceux impliquant des repères spatiaux ou un environnement aquatique) sont supérieures à celles des souris, ce qui pourrait permettre de déceler

des altérations plus fines chez des rats (Cressant et al., 2007; Whishaw & Tomie, 1996) en mettant en œuvre des paradigmes comportementaux plus complexes que chez la souris.

4.4.3.3 Les limites des modèles rongeurs

Le fonctionnement du cerveau des rongeurs est très semblable à celui des humains, et cela vaut aussi pour les mécanismes sous-tendant la mémoire (Clark & Squirea, 2013). L'utilisation des rongeurs pour modéliser des pathologies humaines a donc un intérêt indiscutable. Cependant, les tests comportementaux permettant d'évaluer de nombreuses fonctions sont construits sur une base anthropomorphique. La vision est une modalité sensorielle très largement utilisée dans les tests comportementaux, pour évaluer par exemple, les fonctions cognitives (avec le test de reconnaissance d'objet, la piscine de Morris, ou le dispositif du « *touchscreen* »). Pour améliorer le caractère translationnel entre les mesures comportementales réalisées chez les rongeurs et celles réalisées chez les humains, il pourrait être intéressant d'utiliser les modalités sensorielles propres à chaque espèce. Le développement de tests pour les rongeurs utilisant la fonction olfactive est une étape vers une prise en compte plus importante de la valeur translationnelle des tests à mettre en œuvre.

Ainsi, malgré des interrogations sur l'interprétation des comportements exprimés dans certains tests, il n'en reste pas moins que de nombreuses fonctions impliquées dans les troubles psychiatriques peuvent être évaluées chez l'humain comme chez le rongeur (Homberg, 2013).

Une limitation incompressible des modèles animaux utilisant les rongeurs est leur condition d'élevage et de reproduction. En effet, le coût d'hébergement de nombreux rongeurs est important en comparaison à d'autres espèces comme le poisson. De plus, dans le cas de la schizophrénie de larges études sont nécessaires, que ce soit pour identifier les nombreux gènes impliqués dans l'apparition de certains symptômes, ou pour tester les nombreuses molécules potentiellement intéressantes dans l'amélioration des symptômes. Dans ces deux cas, bien que l'évaluation des aspects comportementaux deviennent plus rudimentaires, l'utilisation du *zebrafish* a un intérêt non négligeable (Campbell & Granato, 2020; Fontana et al., 2018).

4.5 Les 3R et le modèle 3-hit

Dans le cadre de cette thèse, des administrations intrapéritonéales étaient utilisées. Cependant ce type d'administration présente l'inconvénient d'être un acte invasif, tout comme les administrations orales par gavage. Les difficultés inhérentes au mode d'administration mènent à l'utilisation de nouvelles méthodes d'administration moins invasives qui pourraient apporter une réelle contribution à ce type d'études précliniques. En effet, une diminution des actes invasifs et des manipulations par un expérimentateur, ou plusieurs, permet une diminution de la douleur et du stress et consiste donc en un raffinement du procédé d'administration. Cela est d'autant plus vrai avec les administrations d'antipsychotiques dans le cadre de la validité de prédiction d'un modèle. Ces médicaments étant pris oralement de manière chronique et sur du long terme par les patients, les études précliniques doivent tendre vers un protocole similaire. L'administration chronique, par injection intrapéritonéale ou gavage est également une source de stress et de douleur chez l'animal. La recherche systématique chez l'animal de certains paramètres pharmacocinétiques (voir article 6) des antipsychotiques testés et leur prise en compte, préalablement à toute analyse comportementale, constitue une étape vers le raffinement des techniques d'administration de ces antipsychotiques. Dans le contexte des modèles de schizophrénie étudiés dans cette thèse, le nombre d'individus utilisés dans une cohorte expérimentale n'est pas réductible. Nos expérimentations ont montré qu'il était nécessaire d'augmenter le nombre d'animaux utilisés par cohorte. Paradoxalement, cela pourrait réduire à long terme le nombre d'animaux utilisés. En effet, utiliser des cohortes plus importantes permettrait une caractérisation plus complète et plus fiable du modèle. Ainsi, une seule cohorte serait nécessaire pour obtenir des résultats puissants et la répétition des mêmes expériences n'aurait plus de nécessité. A terme, cela conduirait à l'utilisation de moins de cohortes expérimentales. Concernant la possibilité d'un remplacement, ce n'est pas d'actualité que ce soit pour l'utilisation de modèles *in vitro* ou *in silico*. Des modèles informatiques pourraient avoir un grand intérêt dans la compréhension de la schizophrénie. Cependant ils nécessitent une importante base de données initiale que les modèles animaux *in vivo* ne sont pas encore à même de fournir.

4.6 Perspectives

Ce travail de thèse amène à un certain nombre de perspectives pour améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans la schizophrénie et ses traitements. Tout d'abord, il est évident que l'utilisation de modèles animaux multifactoriels est plus que nécessaire. Les études caractérisant ces modèles doivent être les plus complètes possibles en tenant compte des interactions entre les facteurs utilisés et d'éventuels dimorphismes sexuels. La caractérisation du phénotype de ces modèles doit également être la plus complète possible, en associant une caractérisation comportementale et l'observation de mécanismes aux niveaux systémique, cellulaire et moléculaire. L'observation des mécanismes épigénétiques peut également être un nouvel outil important dans l'évaluation de ces modèles.

La latéralité sensorielle et motrice est un reflet de la latéralisation des hémisphères cérébraux. Dans la schizophrénie, on observe des modifications de cette latéralisation cérébrale (avec des anomalies d'asymétrie observée normalement chez les individus sains, proportion plus importante d'individus gauchers que dans la population normale, *etc.*) (Sommer et al., 2001). L'étude de la latéralité olfactive des rongeurs n'est actuellement pas utilisée dans l'évaluation d'apparence des modèles animaux de schizophrénie. Ce paramètre pourrait représenter un nouveau marqueur du phénotype schizophrénique et potentiellement être un outil d'observation précoce des troubles des patients.

Dans le cadre de l'étude de la schizophrénie, l'intérêt d'étudier les vocalisations est conforté d'un point de vue translationnel par l'existence des troubles liés au langage présents dans cette pathologie (de Boer et al., 2020; DeLisi, 2001). Les rongeurs utilisent les vocalisations pour une communication intra espèce, elles reflètent donc leur sociabilité (Simola & Granon, 2019; Wöhr & Schwarting, 2013), tout comme les humains utilisent le langage pour ce même type de communication. La compréhension de ces vocalisations est encore parcellaire bien que des différences de fréquences d'émission des ultrasons sont observées en fonction du contexte aversif ou positif (Simola & Granon, 2019). L'utilisation de la mesure des vocalisations comme indice de sociabilité peut être un élément intéressant de la caractérisation des symptômes de type négatif dans un modèle de schizophrénie, si ces vocalisations sont mesurées dans un contexte permettant une communication interindividuelle. Deux des autres

études évaluant des modèles de schizophrénie à trois facteurs utilisent la mesure des vocalisations, mais dans des contextes ne permettant pas d'interaction sociale (durant la séparation maternelle (Chen et al., 2011) ou durant le test de suspension par la queue (Sultana & Lee, 2020)). Les variations de vocalisations sont interprétées différemment en fonction du contexte, une diminution des vocalisations durant le test de suspension par la queue est considéré comme un indice de dépression (Sultana & Lee, 2020), une augmentation des vocalisations des souriceaux durant la séparation maternelle est considéré comme un indice d'anxiété (Chen et al., 2011). Il serait intéressant d'adapter ces mesures des vocalisations dans des contextes sociaux, par exemple durant des tests de sociabilité.

Par ailleurs, une relation a été montrée entre déficits de langage et atteintes de la matière blanche, comprenant une altération des fibres du corps calleux chez les schizophrènes (de Boer et al., 2020; Tréhout et al., 2017). Une autre étude d'imagerie de diffusion a également associé une altération des fibres du corps calleux avec les difficultés sociales (Koshiyama et al., 2018). De plus, les troubles de langage semblent corrélés à la sévérité des symptômes négatifs chez les schizophrènes (de Boer et al., 2020).

De manière intéressante, des études précliniques ont montré une altération de la matière blanche chez des animaux présentant des déficits de vocalisation (Ellegood et al., 2013), notamment une altération du corps calleux, l'une des structures impactées dans la schizophrénie (Han et al., 2019). Ainsi, la mesure des vocalisations des rongeurs pourrait être un élément important du phénotype des modèles de schizophrénie (Kircher et al., 2019), particulièrement pour les symptômes de type négatif. Ce type de déficit pourrait être corrélé à des altérations de la matière blanche et notamment du corps calleux. Certaines études décrivant des modèles à trois facteurs utilisent des mesures de vocalisation, cependant le contexte choisi ne permet pas d'évaluer la sociabilité des animaux. Il serait donc intéressant de réaliser des mesures des vocalisations lors des tests sociaux, en association avec une étude en imagerie de diffusion pour détecter d'éventuelles altérations des fibres du corps calleux.

Enfin, concernant l'implication des systèmes de neurotransmission dans la pathophysiologie de la schizophrénie, plusieurs systèmes de neuromédiateurs sont actuellement étudiés et notamment les systèmes dopaminergique, glutamatergique, et

GABAergique. Concernant ce dernier, une diminution de l'expression des récepteurs GABA_B a été montrée dans plusieurs régions cérébrales dont l'hippocampe chez les schizophrènes (Ishikawa et al., 2005; Mizukami et al., 2000, 2002). Pour renforcer l'hypothèse d'une altération des récepteurs GABA_B portée par l'article 2, il serait intéressant de réaliser une analyse permettant de quantifier la densité de ce type de récepteur dans l'hippocampe des souris 3-hit.

5. Conclusion

Ce travail de thèse apporte une caractérisation large du phénotype d'un modèle innovant de schizophrénie (modèle 3-hit). L'étude de la schizophrénie *via* les modèles animaux est actuellement en train d'évoluer vers des modèles de plus en plus complexes. Bien que l'utilisation de trois facteurs soit encore très rare, certainement du fait non seulement de la lourdeur des expérimentations, mais surtout de la complexité de l'interprétation des résultats lorsque tous les facteurs sont pris en compte. Ces nouveaux modèles représentent un réel espoir pour les recherches autour de cette maladie et de ses traitements.

Le modèle 3-hit représente également une nouvelle base de recherche pour l'évaluation de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique. La complexité de son développement ne permet pas de l'utiliser pour le « *screening* » large de potentielles molécules intéressantes à un stade précoce, mais il pourrait être utile pour une étape finale de la caractérisation de leur efficacité.

Bibliographie

- Aas, M., Djurovic, S., Athanasiu, L., Steen, N. E., Agartz, I., Lorentzen, S., Sundet, K., Andreassen, O. A., & Melle, I. (2012). Serotonin transporter gene polymorphism, childhood trauma, and cognition in patients with psychotic disorders. *Schizophrenia Bulletin*, *38*(1), 15–22. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbr113>
- Abel, K. M., Drake, R., & Goldstein, J. M. (2010). Sex differences in schizophrenia. *International Review of Psychiatry*, *22*(5), 417–428. <https://doi.org/10.3109/09540261.2010.515205>
- Adhikari, B. M., Hong, L. E., Sampath, H., Chiappelli, J., Jahanshad, N., Thompson, P. M., Rowland, L. M., Calhoun, V. D., Du, X., Chen, S., & Kochunov, P. (2019). Functional network connectivity impairments and core cognitive deficits in schizophrenia. *Human Brain Mapping*, *40*(16), 4593–4605. <https://doi.org/10.1002/hbm.24723>
- Afe, T., Adegbohun, A. A., Ogunsemi, O., Osalusi, B., Adeyemo, S., Adetunmbi, O. C., Jejeloye, A., Enifeni, A., Babalola-Abiri, G., & Ogunlowo, O. (2019). Gender and Obstetric Factors in the Determination of the Age of Onset of Schizophrenia in a Nigerian Cohort. *Journal of Abnormal Psychology*, *128*(3), 256–262. <https://doi.org/10.1037/abn0000386>
- Akhund-Zade, J., Ho, S., O’Leary, C., & De Bivort, B. (2019). The effect of environmental enrichment on behavioral variability depends on genotype, behavior, and type of enrichment. *Journal of Experimental Biology*, *222*(19). <https://doi.org/10.1242/jeb.202234>
- Alameda, L., Ferrari, C., Baumann, P. S., Gholam-Rezaee, M., Do, K. Q., & Conus, P. (2015). Childhood sexual and physical abuse: Age at exposure modulates impact on functional outcome in early psychosis patients. *Psychological Medicine*, *45*(13), 2727–2736. <https://doi.org/10.1017/S0033291715000690>
- Aleman, A., Kahn, R. S., & Selten, J.-P. (2003). Sex differences in the Risk of Schizophrenia Evidence From Meta-analysis. *Arch Gen Psychiatry*, *60*(5), 565–571. <https://doi.org/10.1111/j.1464-0597.1985.tb01327.x>
- Alvarado-Alanis, P., León-Ortiz, P., Reyes-Madrigal, F., Favila, R., Rodríguez-Mayoral, O., Nicolini, H., Azcárraga, M., Graff-Guerrero, A., Rowland, L. M., & de la Fuente-Sandoval, C. (2015). Abnormal white matter integrity in antipsychotic-naïve first-episode psychosis patients assessed by a DTI principal component analysis. *Schizophrenia Research*, *162*(1–3), 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2015.01.019>
- Alves, P. N., Foulon, C., Karolis, V., Bzdok, D., Margulies, D. S., Volle, E., & Thiebaut de Schotten, M. (2019). An improved neuroanatomical model of the default-mode network reconciles previous neuroimaging and neuropathological findings. *Communications Biology*, *2*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0611-3>
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5)*. American Psychiatric Pub.
- Amitai, N., & Markou, A. (2010). Disruption of Performance in the 5-Choice Serial Reaction Time Task Induced by Administration of NMDA Receptor Antagonists: Relevance to Cognitive Dysfunction in Schizophrenia. *Biol Psychiatry*, *68*(1), 5–16. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.03.004>
- Anderson, W. W., & Collingridge, G. L. (2001). The LTP Program: A data acquisition program for on-line analysis of long-term potentiation and other synaptic events. *Journal of Neuroscience*

- Methods*, 108(1), 71–83. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(01\)00374-0](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(01)00374-0)
- Andreasen, N. C., & Flaum, M. (1991). Schizophrenia: The characteristic symptoms. *Schizophrenia Bulletin*, 17(1), 27–49. <https://doi.org/10.1093/schbul/17.1.27>
- Andréasson, S., Engström, A., Allebeck, P., & Rydberg, U. (1987). CANNABIS AND SCHIZOPHRENIA A Longitudinal Study of Swedish Conscripts. *The Lancet*, 330(8574), 1483–1486. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(87\)92620-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(87)92620-1)
- Andrieux, A., Salin, P. A., Vernet, M., Kujala, P., Baratier, J., Gory-Fauré, S., Bosc, C., Pointu, H., Proietto, D., Schweitzer, A., Denarier, E., Klumperman, J., & Job, D. (2002). The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. *Genes and Development*, 16(18), 2350–2364. <https://doi.org/10.1101/gad.223302>
- Antonova, E., Sharma, T., Morris, R., & Kumari, V. (2004). The relationship between brain structure and neurocognition in schizophrenia: A selective review. *Schizophrenia Research*, 70(2–3), 117–145. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2003.12.002>
- Apfelbach, R., Blanchard, C. D., Blanchard, R. J., Hayes, R. A., & McGregor, I. S. (2005). The effects of predator odors in mammalian prey species: A review of field and laboratory studies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(8), 1123–1144. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.05.005>
- Arakawa, H. (2018). Ethological approach to social isolation effects in behavioral studies of laboratory rodents. *Behavioural Brain Research*, 341, 98–108. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.12.022>
- Arnold, S. E. (1997). The medial temporal lobe in schizophrenia. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 9(3), 460–470. <https://doi.org/10.1176/jnp.9.3.460>
- Arseneault, L., Cannon, M., Poulton, R., Murray, R., Caspi, A., & Moffitt, T. E. (2002). Cannabis use in adolescence and risk for adult psychosis: Longitudinal prospective study. *British Medical Journal*, 325(7374), 1212–1213. <https://doi.org/10.1136/bmj.325.7374.1212>
- Ashburner, J., & Friston, K. (2003). Morphometry. *Human Brain Function: Second Edition*, 707–722. <https://doi.org/10.1016/B978-012264841-0/50038-X>
- Bailoo, J. D., Murphy, E., Boada-Saña, M., Varholick, J. A., Hintze, S., Baussière, C., Hahn, K. C., Göpfert, C., Palme, R., Voelkl, B., & Würbel, H. (2018). Effects of cage enrichment on behavior, welfare and outcome variability in female mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12, 1–20. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00232>
- Balu, D. T., Li, Y., Puhl, M. D., Benneyworth, M. A., Basu, A. C., Takagi, S., Bolshakov, V. Y., & Coyle, J. T. (2013). Multiple risk pathways for schizophrenia converge in serine racemase knockout mice, a mouse model of NMDA receptor hypofunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(26). <https://doi.org/10.1073/pnas.1304308110>
- Barsoum, N., Gough, A., Sturgess, J., & de la Iglesia, F. (1986). Parkinson-like syndrome in nonhuman primates receiving a tetrahydropyridine derivative. *Neurotoxicology*, 7(1), 119–126.
- Basińska, A. (1994). Sensory overload and schizophrenia: sensory gating as a measure of dysfunction of stimuli filtration. *Psychiatr Pol.*, 28(2), 171–182.
- Bassett, A. S., Lowther, C., Merico, D., Costain, G., Chow, E. W. C., Van Amelsvoort, T., McDonald-McGinn, D., Gur, R. E., Swillen, A., Van Den Bree, M., Murphy, K., Gothelf, D., Bearden, C. E., Eliez, S., Kates, W., Philip, N., Sashi, V., Campbell, L., Vorstman, J., ... Marshall, C. R. (2017). Rare genome-wide copy number variation and expression of schizophrenia in 22q11.2 deletion

- syndrome. *American Journal of Psychiatry*, 174(11), 1054–1063.
<https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2017.16121417>
- Basu, A. C., Tsai, G. E., Ma, C. L., Ehmsen, J. T., Mustafa, A. K., Han, L., Jiang, Z. I., Benneyworth, M. A., Froimowitz, M. P., Lange, N., Snyder, S. H., Bergeron, R., & Coyle, J. T. (2009). Targeted disruption of serine racemase affects glutamatergic neurotransmission and behavior. *Molecular Psychiatry*, 14(7), 719–727. <https://doi.org/10.1038/mp.2008.130>
- Baudin, G. (2018). *FACTEURS DE RISQUE ENVIRONNEMENTAUX DES TROUBLES PSYCHOTIQUES Focus sur les expériences infantiles traumatiques*. Tours.
- Beaudoin, M., Potvin, S., Giguère, C. E., Discepola, S. L., & Dumais, A. (2020). Persistent cannabis use as an independent risk factor for violent behaviors in patients with schizophrenia. *Npj Schizophrenia*, 6(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41537-020-0104-x>
- Becker, A., & Grecksch, G. (2004). Ketamine-induced changes in rat behaviour: a possible animal model of schizophrenia. Test of predictive validity. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 28(8), 1267–1277.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2004.06.019>
- Behan, Á. T., Hryniewiecka, M., O’Tuathaigh, C. M. P., Kinsella, A., Cannon, M., Karayiorgou, M., Gogos, J. A., Waddington, J. L., & Cotter, D. R. (2012). Chronic adolescent exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol in COMT mutant mice: Impact on indices of dopaminergic, endocannabinoid and GABAergic pathways. *Neuropsychopharmacology*, 37(7), 1773–1783.
<https://doi.org/10.1038/npp.2012.24>
- Bendikov, I., Nadri, C., Amar, S., Panizzutti, R., De Miranda, J., Wolosker, H., & Agam, G. (2007). A CSF and postmortem brain study of d-serine metabolic parameters in schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 90(1–3), 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2006.10.010>
- Benes, F. M. (2015). The GABA System in Schizophrenia: Cells, Molecules and Microcircuitry. *Schizophrenia Research*, 167(1–3), 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2015.07.017>
- Bernstein, D. P., Fink, L., Handelsman, L., Foote, J., Lovejoy, M., Wenzel, K., Sapareto, El., & Ruggiero, J. (1994). Initial Retrospective and Validity of a New Retrospective Measure of Child Abuse and Neglect. *Am J Psychiatry*, 151(8).
- Berrios, G. E. (1985). Positive and Negative Symptoms and Jackson. *Archives of General Psychiatry*, 42(1), 95. <https://doi.org/10.1097/00001504-199701000-00007>
- Bertolino, A. (1999). Dysregulation of dopamine and pathology of prefrontal neurons: Neuroimaging studies in schizophrenia and related animal models. *Epidemiologia e Psichiatria Sociale*, 8(4), 248–254. <https://doi.org/10.1017/S1121189X00008150>
- Billard, J. M., & Rouaud, E. (2007). Deficit of NMDA receptor activation in CA1 hippocampal area of aged rats is rescued by D-cycloserine. *European Journal of Neuroscience*, 25(8), 2260–2268.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05488.x>
- Billard, Jean Marie. (2010). Long-term depression in the hippocampal CA1 area of aged rats, revisited: Contribution of temporal constraints related to slice preparation. *PLoS ONE*, 5(3).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009843>
- Bleuler, E. (1911). *Dementia praecox ou Groupe des schizophrénies*.
- Bloemen, O. J. N., De Koning, M. B., Schmitz, N., Nieman, D. H., Becker, H. E., De Haan, L., Dingemans, P., Linszen, D. H., & Van Amelsvoort, T. A. M. J. (2010). White-matter markers for psychosis in a prospective ultra-high-risk cohort. *Psychological Medicine*, 40(8), 1297–1304.

<https://doi.org/10.1017/S0033291709991711>

- Bodnar, T. S., Rainecki, C., Wertelecki, W., Yevtushok, L., Plotka, L., Granovska, I., Zymak-Zakutnya, N., Pashtepa, A., Wells, A., Honerkamp-Smith, G., Coles, C. D., Kable, J. A., Chambers, C. D., & Weinberg, J. (2020). Immune network dysregulation associated with child neurodevelopmental delay: Modulatory role of prenatal alcohol exposure. *Journal of Neuroinflammation*, *17*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-1717-8>
- Bodnar, T. S., Rainecki, C., Wertelecki, W., Yevtushok, L., Plotka, L., Zymak-Zakutnya, N., Honerkamp-Smith, G., Wells, A., Rolland, M., Woodward, T. S., Coles, C. D., Kable, J. A., Chambers, C. D., & Weinberg, J. (2018). Altered maternal immune networks are associated with adverse child neurodevelopment: Impact of alcohol consumption during pregnancy. *Brain, Behavior, and Immunity*, *73*(February), 205–215. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.05.004>
- Boldrini, M., Fulmore, C. A., Tartt, A. N., Simeon, L. R., Pavlova, I., Poposka, V., Rosoklija, G. B., Stankov, A., Arango, V., Dwork, A. J., Hen, R., & Mann, J. J. (2018). Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell*, *22*(4), 589-599.e5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.03.015>
- Bolkan, S. S., Stujenske, J. M., Parnaudeau, S., Spellman, T. J., Rauffenbart, C., Abbas, A. I., Harris, A. Z., & Gordon, J. A. (2017). Thalamic projections sustain prefrontal activity during working memory maintenance. *Nature Neurosciences*, *20*(7), 987–996. <https://doi.org/10.1038/nn.4568>.Thalamic
- Borison, R., & Diamond, B. (1978). A new animal model for schizophrenia: interactions with adrenergic mechanisms. *Biol Psychiatry*, *13*(2), 217–225. <https://doi.org/208665>
- Borison, R. L., Havdala, H. S., & Diamond, B. I. (1977). Chronic phenylethylamine stereotypy in rats: A new animal model for schizophrenia? *Life Sciences*, *1*(1), 117–122. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0024-3205\(77\)90431-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0024-3205(77)90431-3)
- Bost, A. (2016). *Pharmacologie des antipsychotiques : vers une adaptation individuelle du traitement de la schizophrénie*. Toulouse III.
- Boucher, A. A., Arnold, J. C., Duffy, L., Schofield, P. R., Micheau, J., & Karl, T. (2007). Heterozygous neuregulin 1 mice are more sensitive to the behavioural effects of $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacology*, *192*(3), 325–336. <https://doi.org/10.1007/s00213-007-0721-3>
- Bouet, V., Boulouard, M., & Freret, T. (2016). Animal Models of Schizophrenia: An Update Advances in Schizophrenia Research. *Advances in Schizophrenia Research*, *10*. www.openaccessbooks.com
- Bouët, V., Freret, T., Toutain, J., Divoux, D., Boulouard, M., & Schumann-Bard, P. (2007). Sensorimotor and cognitive deficits after transient middle cerebral artery occlusion in the mouse. *Experimental Neurology*, *203*(2), 555–567. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.09.006>
- Bouet, V., Lecrux, B., Tran, G., & Freret, T. (2011). Effect of pre- versus post-weaning environmental disturbances on social behaviour in mice. *Neuroscience Letters*, *488*(2), 221–224. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.11.033>
- Bouet, V., Percelay, S., Leroux, E., Diarra, B., Léger, M., Delcroix, N., Andrieux, A., Dollfus, S., Freret, T., & Boulouard, M. (2020). A new 3-hit mouse model of schizophrenia built on genetic, early and late factors. *Schizophrenia Research*. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2020.11.043>
- Boullin, D. (1979). Biochemical methodology for studying affective disorders. *Encephale*, *5*(5), 521–531.

- Bourin, M. (2015). Animal models for screening anxiolytic-like drugs: A perspective. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 17(3), 295–303. <https://doi.org/10.31887/dcns.2015.17.3/mbourin>
- Bowers, M. B. J. (1974). Central dopamine turnover in schizophrenic syndromes. *Archives of General Psychiatry*, 31(1), 50–54. <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L5120925>
- Braff, D., & Geyer, M. (1980). Acute and chronic LSD effects on rat startle: data supporting an LSD--rat model of schizophrenia. *Biol Psychiatry.*, 15(6), 909–916.
- Braga, R. J., Reynolds, G. P., & Siris, S. G. (2013). Anxiety comorbidity in schizophrenia. *Psychiatry Research*, 210(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2013.07.030>
- Brandeis, R., Brandys, Y., & Yehuda, S. (1989). The Use of the Morris Water Maze in the Study of Memory and Learning. *International Journal of Neurosciences*, 48(1–2), 29–69.
- Broome, M. R., Woolley, J. B., Tabraham, P., Johns, L. C., Bramon, E., Murray, G. K., Pariante, C., McGuire, P. K., & Murray, R. M. (2005). What causes the onset of psychosis? *Schizophrenia Research*, 79(1), 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2005.02.007>
- Brown, A. S., & Derkits, E. J. (2010). Prenatal infection and schizophrenia: A review of epidemiologic and translational studies. *American Journal of Psychiatry*, 167(3), 261–280. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2009.09030361>
- Brown, J., Rueter, L., & Zhang, M. (2014). Predictive validity of a MK-801-induced cognitive impairment model in mice: implications on the potential limitations and challenges of modeling cognitive impairment associated with schizophrenia preclinically. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.*, 49, 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.11.008>
- Bruijnzeel, D., Yazdanpanah, M., Suryadevara, U., & Tandon, R. (2015). Lurasidone in the treatment of schizophrenia: A critical evaluation. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 16(10), 1559–1565. <https://doi.org/10.1517/14656566.2015.1058780>
- Bubeníková-Valešová, V., Horáček, J., Vrajová, M., & Höschl, C. (2008). Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 32(5), 1014–1023. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.03.012>
- Buck, J. M., O'Neill, H. C., & Stitzel, J. A. (2020). Developmental nicotine exposure engenders intergenerational downregulation and aberrant posttranslational modification of cardinal epigenetic factors in the frontal cortices, striata, and hippocampi of adolescent mice. *Epigenetics and Chromatin*, 13(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13072-020-00332-0>
- Bures, J., Fenton, A. A., Kaminsky, Y., & Zinyuk, L. (1997). Place cells and place navigation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(1), 343–350. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.1.343>
- Burgdorf, K. S., Trabjerg, B. B., Pedersen, M. G., Nissen, J., Banasik, K., Pedersen, O. B., Sørensen, E., Nielsen, K. R., Larsen, M. H., Erikstrup, C., Bruun-Rasmussen, P., Westergaard, D., Thørner, L. W., Hjalgrim, H., Paarup, H. M., Brunak, S., Pedersen, C. B., Torrey, E. F., Werge, T., ... Ullum, H. (2019). Large-scale study of Toxoplasma and Cytomegalovirus shows an association between infection and serious psychiatric disorders. *Brain, Behavior, and Immunity*, 79(October 2018), 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.01.026>
- Callahan, P. M., Terry, A. V., & Tehim, A. (2014). Effects of the nicotinic $\alpha 7$ receptor partial agonist GTS-21 on NMDA-glutamatergic receptor related deficits in sensorimotor gating and recognition memory in rats. *Psychopharmacology*, 231(18), 3695–3706. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3509-2>

- Campbell, P. D., & Granato, M. (2020). Zebrafish as a tool to study schizophrenia-associated copy number variants. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 13(4).
<https://doi.org/10.1242/dmm.043877>
- Cancel, A. (2018). *Les traumatismes infantiles dans la schizophrénie : apports de l'imagerie cérébrale*. Aix-Marseille.
- Cannon, C., Puri, V., Vivian, J., Egbertson, M., Eddins, D., & Uslaner, J. (2013). The nicotinic $\alpha 7$ receptor agonist GTS-21 improves cognitive performance in ketamine impaired rhesus monkeys. *Neuropharmacology*, 64, 191–196.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.05.003>
- Caponnetto, P., Polosa, R., Robson, D., & Bauld, L. (2020). Tobacco smoking, related harm and motivation to quit smoking in people with schizophrenia spectrum disorders. *Health Psychology Research*, 8(1). <https://doi.org/10.4081/hpr.2020.9042>
- Caruso, A., Ricceri, L., & Scattoni, M. L. (2020). Ultrasonic vocalizations as a fundamental tool for early and adult behavioral phenotyping of Autism Spectrum Disorder rodent models. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 116(May), 31–43.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.06.011>
- Cash-Padgett, T., & Jaaro-Peled, H. (2013). DISC1 mouse models as a tool to decipher gene-environment interactions in psychiatric disorders. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7(SEP), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00113>
- Castle, D., Baker, A. L., & Bonevski, B. (2019). Editorial: Smoking and schizophrenia. *Frontiers in Psychiatry*, 10(OCT), 1–2. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00738>
- Center for Behavioral Health Statistics and Quality. (2016). *IMPACT OF THE DSM-IV TO DSM-5 CHANGES ON THE NATIONAL SURVEY ON DRUG USE AND HEALTH*. Substance Abuse and Mental Health Services Administration.
- Cha, Y. M., White, A. M., Kuhn, C. M., Wilson, W. A., & Swartzwelder, H. S. (2006). Differential effects of delta9-THC on learning in adolescent and adult rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 83(3), 448–455. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.03.006>
- Chalfoun, C., Karelis, A. D., Stip, E., & Abdel-Baki, A. (2016). Running for your life: A review of physical activity and cardiovascular disease risk reduction in individuals with schizophrenia. *Journal of Sports Sciences*, 34(16), 1500–1515. <https://doi.org/10.1080/02640414.2015.1119875>
- Chen, C. K., Lin, S. K., Sham, P. C., Ball, D., Loh, E. W., Hsiao, C. C., Chiang, Y. L., Ree, S. C., Lee, C. H., & Murray, R. M. (2003). Pre-morbid characteristics and co-morbidity of methamphetamine users with and without psychosis. *Psychological Medicine*, 33(8), 1407–1414.
<https://doi.org/10.1017/S0033291703008353>
- Chen, J., Wang, Z., & Li, M. (2011). Multiple “hits” during postnatal and early adulthood periods disrupt the normal development of sensorimotor gating ability in rats. *Journal of Psychopharmacology*, 25(3), 379–392. <https://doi.org/10.1177/0269881109354929>
- Cheung, V., Cheung, C., McAlonan, G. M., Deng, Y., Wong, J. G., Yip, L., Tai, K. S., Khong, P. L., Sham, P., & Chua, S. E. (2008). A diffusion tensor imaging study of structural dysconnectivity in never-medicated, first-episode schizophrenia. *Psychological Medicine*, 38(6), 877–885.
<https://doi.org/10.1017/S0033291707001808>
- Chiappelli, J., Hong, L. E., Wijtenburg, S. A., Du, X., Gaston, F., Kochunov, P., & Rowland, L. M. (2015). Alterations in frontal white matter neurochemistry and microstructure in schizophrenia: Implications for neuroinflammation. *Translational Psychiatry*, 5(4).

<https://doi.org/10.1038/tp.2015.43>

- Chindo, B., Adzu, B., Yahaya, T., & Gamaniel, K. (2012). Ketamine-enhanced immobility in forced swim test: a possible animal model for the negative symptoms of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *38*(2), 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.04.018>
- Chiu, P., Rajakumar, G., Chiu, S., Johnson, R., & Mishra, R. (1985). Mesolimbic and striatal dopamine receptor supersensitivity: prophylactic and reversal effects of L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (PLG). *Peptides*, *6*(2), 179–183. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(85\)90036-1](https://doi.org/10.1016/0196-9781(85)90036-1)
- Choi, K. H., Zepp, M. E., Higgs, B. W., Weickert, C. S., & Webster, M. J. (2009). Expression profiles of schizophrenia susceptibility genes during human prefrontal cortical development. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, *34*(6), 450–458.
- Choleris, E., Thomas, A. W., Kavaliers, M., & Prato, F. S. (2001). A detailed ethological analysis of the mouse open field test: Effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *25*(3), 235–260. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(01\)00011-2](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(01)00011-2)
- Cirulli, F., Berry, A., & Alleva, E. (2003). Early disruption of the mother-infant relationship: Effects on brain plasticity and implications for psychopathology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *27*(1–2), 73–82. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(03\)00010-1](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(03)00010-1)
- Citrome, L. (2012). Lurasidone in schizophrenia: New information about dosage and place in therapy. *Advances in Therapy*, *29*(10), 815–825. <https://doi.org/10.1007/s12325-012-0052-6>
- Clark, R. E., & Squire, L. R. (2013). Similarity in form and function of the hippocampus in rodents, monkeys, and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(SUPPL2), 10365–10370. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301225110>
- Cleynen, I., Engchuan, W., Hestand, M. S., Heung, T., Holleman, A. M., Johnston, H. R., Monfeuga, T., McDonald-McGinn, D. M., Gur, R. E., Morrow, B. E., Swillen, A., Vorstman, J. A. S., Bearden, C. E., Chow, E. W. C., van den Bree, M., Emanuel, B. S., Vermeesch, J. R., Warren, S. T., Owen, M. J., ... Bassett, A. S. (2020). Genetic contributors to risk of schizophrenia in the presence of a 22q11.2 deletion. *Molecular Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0654-3>
- Coffey, K. R., Marx, R. G., & Neumaier, J. F. (2019). DeepSqueak: a deep learning-based system for detection and analysis of ultrasonic vocalizations. *Neuropsychopharmacology*, *44*(5), 859–868. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0303-6>
- Colizzi, M., & Bhattacharyya, S. (2017). Does Cannabis Composition Matter? Differential Effects of Delta-9-tetrahydrocannabinol and Cannabidiol on Human Cognition. *Current Addiction Reports*, *4*(2), 62–74. <https://doi.org/10.1007/s40429-017-0142-2>
- Colizzi, M., Ruggeri, M., & Bhattacharyya, S. (2020). Unraveling the Intoxicating and Therapeutic Effects of Cannabis Ingredients on Psychosis and Cognition. *Frontiers in Psychology*, *11*(May), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2020.00833>
- Correll, C. U., Detraux, J., De Lepeleire, J., & De Hert, M. (2015). Effects of antipsychotics, antidepressants and mood stabilizers on risk for physical diseases in people with schizophrenia, depression and bipolar disorder. *World Psychiatry*, *14*(2), 119–136. <https://doi.org/10.1002/wps.20204>
- Costall, B., Jones, B. J., Kelly, M. E., Naylor, R. J., & Tomkins, D. M. (1989). Exploration of mice in a black and white test box: Validation as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.*, *32*(3), 777–785. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(89\)90033-6](https://doi.org/10.1016/0091-3057(89)90033-6)

- Coyle, J. T. (1996). The glutamatergic dysfunction hypothesis for schizophrenia. *Harvard Review of Psychiatry*, 3(5), 241–253. <https://doi.org/10.3109/10673229609017192>
- Coyle, J. T., & Balu, D. T. (2018). The Role of Serine Racemase in the Pathophysiology of Brain Disorders. In *Advances in Pharmacology* (1st ed., Vol. 82). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.10.002>
- Crawley, J. N. (2007). Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. *Brain Pathology*, 17(4), 448–459. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00096.x>
- Crawley, J. N., Chen, T., Puri, A., Washburn, R., Sullivan, T. L., Hill, J. M., Young, N. B., Nadler, J. J., Moy, S. S., Young, L. J., Caldwell, H. K., & Young, W. S. (2007). Social approach behaviors in oxytocin knockout mice: Comparison of two independent lines tested in different laboratory environments. *Neuropeptides*, 41(3), 145–163. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2007.02.002>
- Cressant, A., Besson, M., Suarez, S., Cormier, A., & Granon, S. (2007). Spatial learning in Long-Evans Hooded rats and C57BL/6J mice: Different strategies for different performance. *Behavioural Brain Research*, 177(1), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.11.010>
- Dauwan, M., Begemann, M. J. H., Heringa, S. M., & Sommer, I. E. (2016). Exercise improves clinical symptoms, quality of life, global functioning, and depression in schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. *Schizophrenia Bulletin*, 42(3), 588–599. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbv164>
- Davies, C., Segre, G., Estradé, A., Radua, J., De Micheli, A., Provenzani, U., Oliver, D., Salazar de Pablo, G., Ramella-Cravaro, V., Besozzi, M., Dazzan, P., Miele, M., Caputo, G., Spallarossa, C., Crossland, G., Ilyas, A., Spada, G., Politi, P., Murray, R. M., ... Fusar-Poli, P. (2020). Prenatal and perinatal risk and protective factors for psychosis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Psychiatry*, 7(5), 399–410. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(20\)30057-2](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(20)30057-2)
- Davis, J., Eyre, H., Jacka, F. N., Dodd, S., Dean, O., McEwen, S., Debnath, M., McGrath, J., Maes, M., Amminger, P., McGorry, P. D., Pantelis, C., & Berk, M. (2016). A review of vulnerability and risks for schizophrenia: Beyond the two hit hypothesis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 65, 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.03.017>
- De Beaurepaire, R. (2014). La schizophrénie et les autres psychoses dans le DSM-5 Schizophrenia and other psychosis in the DSM-5. *La Lettre Du Psychiatre* •, X(2), 57–63. <https://www.edimark.fr/Front/frontpost/getfiles/21187.pdf>
- de Boer, J. N., van Hoogdalem, M., Mandl, R. C. W., Brummelman, J., Voppel, A. E., Begemann, M. J. H., van Dellen, E., Wijnen, F. N. K., & Sommer, I. E. C. (2020). Language in schizophrenia: relation with diagnosis, symptomatology and white matter tracts. *Npj Schizophrenia*, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41537-020-0099-3>
- De Clérambault, G. (1942). Oeuvre psychiatrique. Paris, Presses Universitaires de France.
- De Hert, M., Correll, C. U., Bobes, J., Cetkovich-Bakmas, M., Cohen, D. A. N., Asai, I., Detraux, J., Gautam, S., Möller, H. J., Ndeti, D. M., Newcomer, J. W., Uwakwe, R., & Leucht, S. (2011). Physical illness in patients with severe mental disorders. I. Prevalence, impact of medications and disparities in health care. *World Psychiatry*, 10(1), 52–77. <https://doi.org/10.1002/j.2051-5545.2011.tb00014.x>
- De Oliveira, L., Fraga, D. B., De Luca, R. D., Canever, L., Ghedim, F. V., Matos, M. P. P., Streck, E. L., Quevedo, J., & Zugno, A. I. (2011). Behavioral changes and mitochondrial dysfunction in a rat model of schizophrenia induced by ketamine. *Metabolic Brain Disease*, 26(1), 69–77. <https://doi.org/10.1007/s11011-011-9234-1>

- de Schotten, M. T. (2019). *Un nouveau modèle du réseau cérébral du « mode par défaut »*. INSB CNRS. <https://insb.cnrs.fr/fr/cnrsinfo/un-nouveau-modele-du-reseau-cerebral-du-mode-par-defaut>
- Debnath, M., Venkatasubramanian, G., & Berk, M. (2015). Fetal programming of schizophrenia: Select mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *49*, 90–104. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.12.003>
- Deiana, S. (2013). Medical use of cannabis. Cannabidiol: A new light for schizophrenia? *Drug Testing and Analysis*, *5*(1), 46–51. <https://doi.org/10.1002/dta.1425>
- del Re, E. C., Bouix, S., Fitzsimmons, J., Blokland, G. A. M., Mesholam-Gately, R., Wojcik, J., Kikinis, Z., Kubicki, M., Petryshen, T., Pasternak, O., Shenton, M. E., & Niznikiewicz, M. (2019). Diffusion abnormalities in the corpus callosum in first episode schizophrenia: Associated with enlarged lateral ventricles and symptomatology. *Psychiatry Research*, *277*, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2019.02.038>
- DeLisi, L. E. (1992). The significance of age of onset for schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, *18*(2), 209–215. <https://doi.org/10.1093/schbul/18.2.209>
- DeLisi, L. E. (2001). Speech disorder in schizophrenia: Review of the literature and exploration of its relation to the uniquely human capacity for language. *Schizophrenia Bulletin*, *27*(3), 481–496. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.schbul.a006889>
- Deloulme, J. C., Gory-Fauré, S., Mauconduit, F., Chauvet, S., Jonckheere, J., Boulan, B., Mire, E., Xue, J., Jany, M., Maucler, C., Deparis, A. A., Montigon, O., Daoust, A., Barbier, E. L., Bosc, C., Deglon, N., Brocard, J., Denarier, E., Le Brun, I., ... Andrieux, A. (2015). Microtubule-associated protein 6 mediates neuronal connectivity through Semaphorin 3E-dependent signalling for axonal growth. *Nature Communications*, *6*. <https://doi.org/10.1038/ncomms8246>
- Demeter, K., Török, B., Fodor, A., Varga, J., Ferenczi, S., Kovács, K. J., Eszik, I., Szegedi, V., & Zelena, D. (2016). Possible contribution of epigenetic changes in the development of schizophrenia-like behavior in vasopressin-deficient Brattleboro rats. *Behavioural Brain Research*, *300*, 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.12.007>
- DeRamus, T. P., Silva, R. F., Iraj, A., Damaraju, E., Belger, A., Ford, J. M., McEwen, S. C., Mathalon, D. H., Mueller, B. A., Pearlson, G. D., Potkin, S. G., Preda, A., Turner, J. A., Vaidya, J. G., van Erp, T. G. M., & Calhoun, V. D. (2020). Covarying structural alterations in laterality of the temporal lobe in schizophrenia: A case for source-based laterality. *NMR in Biomedicine*, *33*(6), 1–16. <https://doi.org/10.1002/nbm.4294>
- Dervaux, A., Laqueille, X., Bourdel, M., Leborgne, M., Olié, J., Lôo, H., & Krebs, M. (2003). Cannabis and schizophrenia: demographic and clinical correlates. *L'encephale*, *29*(1), 11–17.
- Di Forti, M., Quattrone, D., Freeman, T. P., Tripoli, G., Gayer-Anderson, C., Quigley, H., Rodriguez, V., Jongsma, H. E., Ferraro, L., La Cascia, C., La Barbera, D., Tarricone, I., Berardi, D., Szöke, A., Arango, C., Tortelli, A., Velthorst, E., Bernardo, M., Del-Ben, C. M., ... van der Ven, E. (2019). The contribution of cannabis use to variation in the incidence of psychotic disorder across Europe (EU-GEI): a multicentre case-control study. *The Lancet Psychiatry*, *6*(5), 427–436. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(19\)30048-3](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(19)30048-3)
- Di Marzo, V. (2008). Targeting the endocannabinoid system: To enhance or reduce? *Nature Reviews Drug Discovery*, *7*(5), 438–455. <https://doi.org/10.1038/nrd2553>
- Dickerson, F. B., & Lehman, A. F. (2006). Evidence-based psychotherapy for schizophrenia. *Journal of Nervous and Mental Disease*, *194*(1), 3–9.

<https://doi.org/10.1097/01.nmd.0000195316.86036.8a>

- Dollfus, S. (2019). *Les schizophrénies* (Médecine Sciences Publications (ed.)).
- Dollfus, S., Buijsrogge, J. A., Benali, K., Delamillieure, P., & Brazo, P. (2002). Sinistrality in subtypes of schizophrenia. *European Psychiatry, 17*(5), 272–277. [https://doi.org/10.1016/S0924-9338\(02\)00677-6](https://doi.org/10.1016/S0924-9338(02)00677-6)
- Dollfus, S., Lecardeur, L., Morello, R., & Etard, O. (2016). Placebo response in repetitive transcranial magnetic stimulation trials of treatment of auditory hallucinations in schizophrenia: A meta-Analysis. *Schizophrenia Bulletin, 42*(2), 301–308. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbv076>
- Dollfus, S., & Lyne, J. (2017). Negative symptoms: History of the concept and their position in diagnosis of schizophrenia. *Schizophrenia Research, 186*, 3–7. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2016.06.024>
- Dollfus, S., Razafimandimby, A., Delamillieure, P., Brazo, P., Joliot, M., Mazoyer, B., & Tzourio-Mazoyer, N. (2005). Atypical hemispheric specialization for language in right-handed schizophrenia patients. *Biological Psychiatry, 57*(9), 1020–1028. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.01.009>
- Domino, E. F. (1986). Opioid-hallucinogen interactions. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 24*(2), 401–405. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(86\)90370-9](https://doi.org/10.1016/0091-3057(86)90370-9)
- Donaldson, J., McGregor, D., & LaBella, F. (1982). Manganese neurotoxicity: a model for free radical mediated neurodegeneration? *Can J Physiol Pharmacol., 60*(11), 1398–1405. <https://doi.org/10.1139/y82-208>
- Dong, D., Wang, Y., Chang, X., Luo, C., & Yao, D. (2018). Dysfunction of Large-Scale Brain Networks in Schizophrenia: A Meta-analysis of Resting-State Functional Connectivity. *Schizophrenia Bulletin, 44*(1), 168–181. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbx034>
- Dragovic, M., & Hammond, G. (2005). Handedness in schizophrenia: A quantitative review of evidence. *Acta Psychiatrica Scandinavica, 111*(6), 410–419. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.2005.00519.x>
- DrugBank. (2020a). *Aripiprazole*. <https://go.drugbank.com/drugs/DB01238>
- DrugBank. (2020b). *Chlorpromazine*. <https://go.drugbank.com/drugs/DB00477>
- DrugBank. (2020c). *Clozapine*. <https://go.drugbank.com/drugs/DB00363>
- DrugBank. (2020d). *Fluphenazine*. <https://go.drugbank.com/drugs/DB00623>
- DrugBank. (2020e). *Haloperidol*. <https://go.drugbank.com/drugs/DB00502>
- DrugBank. (2020f). *Lurasidone*. <https://go.drugbank.com/drugs/DB08815>
- DrugBank. (2020g). *Olanzapine*. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00334>
- DrugBank. (2020h). *Quetiapine*. <https://go.drugbank.com/drugs/DB01224>
- DrugBank. (2020i). *Risperidone*. <https://go.drugbank.com/drugs/DB00734>
- DrugBank. (2020j). *Thioridazine*. <https://go.drugbank.com/drugs/DB00679>
- DrugBank. (2020k). *Ziprasidone*. <https://go.drugbank.com/drugs/DB00246>
- Du, Y., & Grace, A. A. (2016). Loss of parvalbumin in the hippocampus of MAM schizophrenia model rats is attenuated by peripubertal diazepam. *International Journal of*

Neuropsychopharmacology, 19(11), 1–5. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyw065>

- Duan, X., Chang, J. H., Ge, S., Faulkner, R. L., Kim, J. Y., Kitabatake, Y., Liu, X. bo, Yang, C. H., Jordan, J. D., Ma, D. K., Liu, C. Y., Ganesan, S., Cheng, H. J., Ming, G. li, Lu, B., & Song, H. (2007). Disrupted-In-Schizophrenia 1 Regulates Integration of Newly Generated Neurons in the Adult Brain. *Cell*, 130(6), 1146–1158. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.010>
- Dubach, M., & Bowden, D. (1983). Response to intracerebral dopamine injection as a model of schizophrenic symptomatology. *Prog Clin Biol Res.*, 131, 157–184.
- Dudley, K. J., Li, X., Kobor, M. S., Kippin, T. E., & Bredy, T. W. (2011). Epigenetic mechanisms mediating vulnerability and resilience to psychiatric disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35(7), 1544–1551. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.12.016>
- Duque, A., Coman, D., Carlyle, B. C., Bordner, K. A., George, E. D., Papademetris, X., Hyder, F., & Simen, A. A. (2012). Neuroanatomical changes in a mouse model of early life neglect. *Brain Structure and Function*, 217(2), 459–472. <https://doi.org/10.1007/s00429-011-0350-9>
- Eagle, A. L., Mazei-robison, M., & Robison, A. J. (2016). Sucrose Preference Test to Measure Stress-induced Anhedonia. *Bio-Protocol*, 6(11), 1–6.
- Ebdrup, B. H., Raghava, J. M., Nielsen, M., Rostrup, E., & Glenthøj, B. (2016). Frontal fasciculi and psychotic symptoms in antipsychotic-naïve patients with schizophrenia before and after 6 weeks of selective dopamine D2/3 receptor blockade. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 41(2), 133–141. <https://doi.org/10.1503/jpn.150030>
- Eells, J. B., Mislis, J. A., & Nikodem, V. M. (2006). Early postnatal isolation reduces dopamine levels, elevates dopamine turnover and specifically disrupts prepulse inhibition in Nurr1-null heterozygous mice. *Neuroscience*, 140(4), 1117–1126. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.12.065>
- Eggers, A. E. (2012). Extending David Horrobin’s membrane phospholipid theory of schizophrenia: Overactivity of cytosolic phospholipase A2 in the brain is caused by overdrive of coupled serotonergic 5HT2A/2C receptors in response to stress. *Medical Hypotheses*, 79(6), 740–743. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2012.08.016>
- Eggers, A. E. (2013). A serotonin hypothesis of schizophrenia. *Medical Hypotheses*, 80(6), 791–794. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2013.03.013>
- Ellegood, J., Babineau, B. A., Henkelman, R. M., Lerch, J. P., & Crawley, J. N. (2013). Neuroanatomical analysis of the BTBR mouse model of autism using magnetic resonance imaging and diffusion tensor imaging. *NeuroImage*, 70, 288–300. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.12.029>
- Ellenbroek, B., Willemsen, A., & Cools, A. (1989). Are antagonists of dopamine D1 receptors drugs that attenuate both positive and negative symptoms of schizophrenia? A pilot study in Java monkeys. *Neuropsychopharmacology.*, 2(3), 191–199. [https://doi.org/10.1016/0893-133x\(89\)90022-5](https://doi.org/10.1016/0893-133x(89)90022-5)
- Ellenbroek, B A, & Cools, A. R. (2000). Animal models for the negative symptoms of schizophrenia. *Behavioural Pharmacology*, 11(3–4), 223–233.
- Ellenbroek, Bart A. (2003). Animal models in the genomic era: Possibilities and limitations with special emphasis on schizophrenia. *Behavioural Pharmacology*, 14(5–6), 409–417. <https://doi.org/10.1097/01.fbp.0000087736.21047.3c>
- Ellenbroek, Bart A., Lubbers, L. J., & Cools, A. R. (1996). Activity of “Seroquel” (ICI 204,636) in animal models for atypical properties of antipsychotics: A comparison with clozapine.

- Neuropsychopharmacology*, 15(4), 406–416. [https://doi.org/10.1016/0893-133X\(96\)00001-2](https://doi.org/10.1016/0893-133X(96)00001-2)
- Ellenbroek, Bart A., & Riva, M. A. (2003). Early maternal deprivation as an animal model for schizophrenia. *Clinical Neuroscience Research*, 3(4–5), 297–302. [https://doi.org/10.1016/S1566-2772\(03\)00090-2](https://doi.org/10.1016/S1566-2772(03)00090-2)
- Ellenbroek, Bart A., van den Kroonenberg, P. T. J. M., & Cools, A. R. (1998). The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. *Schizophrenia Research*, 30(3), 251–260. [https://doi.org/10.1016/S0920-9964\(97\)00149-7](https://doi.org/10.1016/S0920-9964(97)00149-7)
- Ellenbroek, Bart A., van den Kroonenberg, P. T. J. M., & Cools, A. R. C. (2000). Lack of effect of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. *Schizophrenia Research*, 41(2), 365–371. [https://doi.org/10.1016/S0920-9964\(99\)00080-8](https://doi.org/10.1016/S0920-9964(99)00080-8)
- Ellman, L. M., Murphy, S. K., Maxwell, S. D., Calvo, E. M., Cooper, T., Schaefer, C. A., Bresnahan, M. A., Susser, E. S., & Brown, A. S. (2019). Maternal cortisol during pregnancy and offspring schizophrenia: Influence of fetal sex and timing of exposure. *Schizophrenia Research*, 213, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2019.07.002>
- Enomoto, T., Ishibashi, T., Tokuda, K., Ishiyama, T., Toma, S., & Ito, A. (2008). Lurasidone reverses MK-801-induced impairment of learning and memory in the Morris water maze and radial-arm maze tests in rats. *Behavioural Brain Research*, 186(2), 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.08.012>
- Epstein, K. A., Cullen, K., Mueller, B., Lee, S., & Kumra, S. (2014). White Matter Abnormalities and Cognitive Impairment in Early-Onset Schizophrenia-Spectrum Disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 53(3), 362–372. <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2013.12.007>
- Etain, B., Mathieu, F., Henry, C., Raust, A., Roy, I., Germain, A., Leboyer, M., & Bellivier, F. (2010). Preferential Association Between Childhood Emotional Abuse and Bipolar Disorder. *Journal of Traumatic Stress*, 23(3), 376–383. <https://doi.org/10.1002/jts.20532>
- Evangelou, E., Gao, H., Chu, C., Ntritsos, G., Blakely, P., Butts, A. R., Pazoki, R., Suzuki, H., Koskediris, F., Yiorkas, A. M., Karaman, I., Elliott, J., Luo, Q., Aeschbacher, S., Bartz, T. M., Baumeister, S. E., Braund, P. S., Brown, M. R., Brody, J. A., ... Elliot, P. (2019). Novel alcohol-related genes suggest shared genetic mechanisms with neuropsychiatric disorders. *Nature Human Behaviour*, 3(9), 950–961.
- Fanselow, M. S., & Dong, H. W. (2010). Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? *Neuron*, 65(1), 7–19. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.031>
- Feifel, D., Shilling, P. D., & Melendez, G. (2011). Further characterization of the predictive validity of the Brattleboro rat model for antipsychotic efficacy. *Journal of Psychopharmacology*, 25(6), 836–841. <https://doi.org/10.1177/0269881110388327>
- Feifel, David, Melendez, G., & Shilling, P. D. (2004). Reversal of sensorimotor gating deficits in brattleboro rats by acute administration of clozapine and a neurotensin agonist, but not haloperidol: A potential predictive model for novel antipsychotic effects. *Neuropsychopharmacology*, 29(4), 731–738. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300378>
- Feifel, David, Reza, T., & Robeck, S. (1999). Antipsychotic potential of CCK-based treatments: An assessment using the prepulse inhibition model of psychosis. *Neuropsychopharmacology*, 20(2), 141–149. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(98\)00041-4](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(98)00041-4)
- Feldon, J., & Weiner, I. (1992). From an animal model of an attentional deficit towards new insights into the pathophysiology of schizophrenia. *J Psychiatr Res*, 26(4), 345–366. [https://doi.org/10.1016/0022-3956\(92\)90040-u](https://doi.org/10.1016/0022-3956(92)90040-u) [Indexed for MEDLINE]

- Feng, Y., Wang, X. D., Guo, C. M., Yang, Y., Li, J. T., Su, Y. A., & Si, T. M. (2010). Expressions of neuregulin 1 β and ErbB4 in prefrontal cortex and hippocampus of a rat schizophrenia model induced by chronic MK-801 administration. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/859516>
- Ferguson, J. N., Aldag, J. M., Insel, T. R., & Young, L. J. (2001). *Oxytocin in the Medial Amygdala is Essential for Social Recognition in the Mouse*. 21(20), 8278–8285.
- Fernandez-Espejo, E., Viveros, M. P., Núñez, L., Ellenbroek, B. A., & Rodriguez De Fonseca, F. (2009). Role of cannabis and endocannabinoids in the genesis of schizophrenia. *Psychopharmacology*, 206(4), 531–549. <https://doi.org/10.1007/s00213-009-1612-6>
- Ferreira, F. R., De Paula, G. C., De Carvalho, R. J. V., Ribeiro-Barbosa, E. R., & Spini, V. B. M. G. (2020). Impact of Season of Birth on Psychiatric Disorder Susceptibility and Drug Abuse Incidence in a Population from the Köppen Tropical Savanna Region of Brazil. *Neuropsychobiology*, 79(2), 131–140. <https://doi.org/10.1159/000503069>
- Fink, M., & Sacklem, H. A. (1996). Convulsive Therapy in Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 22(1), 27–39. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)91577-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)91577-0)
- Firth, J., Cotter, J., Elliott, R., French, P., & Yung, A. R. (2015). A systematic review and meta-Analysis of exercise interventions in schizophrenia patients. *Psychological Medicine*, 45(7), 1343–1361. <https://doi.org/10.1017/S0033291714003110>
- Firth, Joseph, Stubbs, B., Rosenbaum, S., Vancampfort, D., Malchow, B., Schuch, F., Elliott, R., Nuechterlein, K. H., & Yung, A. R. (2017). Aerobic exercise improves cognitive functioning in people with schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. *Schizophrenia Bulletin*, 43(3), 546–556. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbw115>
- Flagstad, P., Glenthøj, B. Y., & Didriksen, M. (2005). Cognitive deficits caused by late gestational disruption of neurogenesis in rats: A preclinical model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 30(2), 250–260. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300625>
- Floresco, S. B., Geyer, M. A., Gold, L. H., & Grace, A. A. (2005). Developing predictive animal models and establishing a preclinical trials network for assessing treatment effects on cognition in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 31(4), 888–894. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbi041>
- Fontana, B. D., Mezzomo, N. J., Kalueff, A. V., & Rosemberg, D. B. (2018). The developing utility of zebrafish models of neurological and neuropsychiatric disorders: A critical review. *Experimental Neurology*, 299(May 2017), 157–171. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.10.004>
- Forlim, C. G., Klock, L., Bächle, J., Stoll, L., Giemsa, P., Fuchs, M., Schoofs, N., Montag, C., Gallinat, J., & Kühn, S. (2020). Reduced Resting-State Connectivity in the Precuneus is correlated with Apathy in Patients with Schizophrenia. *Scientific Reports*, 10(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59393-6>
- Fournet, V., De Lavilléon, G., Schweitzer, A., Giros, B., Andrieux, A., & Martres, M. P. (2012). Both chronic treatments by epothilone D and fluoxetine increase the short-term memory and differentially alter the mood status of STOP/MAP6 KO mice. *Journal of Neurochemistry*, 123(6), 982–996. <https://doi.org/10.1111/jnc.12027>
- Fradley, R. L., O'Meara, G. F., Newman, R. J., Andrieux, A., Job, D., & Reynolds, D. S. (2005). STOP knockout and NMDA NR1 hypomorphic mice exhibit deficits in sensorimotor gating. *Behavioural Brain Research*, 163(2), 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.05.012>
- Frantseva, M. V., Fitzgerald, P. B., Chen, R., Möller, B., Daigle, M., & Daskalakis, Z. J. (2008). Evidence for impaired long-term potentiation in schizophrenia and its relationship to motor skill learning.

Cerebral Cortex, 18(5), 990–996. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhm151>

- Freedman, R., Leonard, S., Gault, J. M., Hopkins, J., Cloninger, C. R., Kaufmann, C. A., Tsuang, M. T., Farone, S. V., Malaspina, D., Svrakie, D. M., Sanders, A., & Gejman, P. (2001). Linkage disequilibrium for schizophrenia at the chromosome 15q13-14 locus of the $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor subunit gene (CHRNA7). *American Journal of Medical Genetics - Neuropsychiatric Genetics*, 105(1), 20–22. [https://doi.org/10.1002/1096-8628\(20010108\)105:1<20::AID-AJMG1047>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1096-8628(20010108)105:1<20::AID-AJMG1047>3.0.CO;2-C)
- Freret, T., Lelong-Boulouard, V., Lecouflet, P., Hamidouche, K., Dauphin, F., & Boulouard, M. (2017). Co-modulation of an allosteric modulator of nicotinic receptor-cholinesterase inhibitor (galantamine) and a 5-HT₄ receptor agonist (RS-67333): effect on scopolamine-induced memory deficit in the mouse. *Psychopharmacology*, 234(15), 2365–2374. <https://doi.org/10.1007/s00213-017-4664-z>
- Friston, K. J. (1998). The disconnection hypothesis. *Schizophrenia Research*, 30(2), 115–125. [https://doi.org/10.1016/S0920-9964\(97\)00140-0](https://doi.org/10.1016/S0920-9964(97)00140-0)
- Fusar-Poli, P., Smieskova, R., Kempton, M. J., Ho, B. C., Andreasen, N. C., & Borgwardt, S. (2013). Progressive brain changes in schizophrenia related to antipsychotic treatment? A meta-analysis of longitudinal MRI studies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37(8), 1680–1691. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.06.001>
- Fusar-Poli, P., Tantardini, M., De Simone, S., Ramelle-Cravarò, V., Oliver, D., Kingdon, J., Kotlicka-Antczak, M., Valmaggia, L., Lee, J., Millan, M. J., Galderisi, S., Balottin, U., Ricca, V., & McGuire, P. (2017). Deconstructing vulnerability for psychosis: Meta-analysis of environmental risk factors for psychosis in subjects at ultra high-risk. *European Psychiatry*, 40, 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.eurpsy.2016.09.003>
- Fusar-Poli, Paolo, Deste, G., Smieskova, R., Barlati, S., Yung, A. R., Howes, O., Stieglitz, R.-D., Vita, A., McGuire, P., & Borgwardt, S. (2012). Cognitive Functioning in Prodromal Psychosis. *Arch Gen Psychiatry*, 69(6), 562–571.
- Gage, G. J., Kipke, D. R., & Shain, W. (2012). Whole animal perfusion fixation for rodents. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 65, 1–9. <https://doi.org/10.3791/3564>
- Gainetdinov, R. R., Mohn, A. R., & Caron, M. G. (2001). Genetic animal models: Focus on schizophrenia. *Trends in Neurosciences*, 24(9), 527–533. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01886-5](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01886-5)
- Gambill, J., & Kornetsky, C. (1976). Effects of chronic d-amphetamine on social behavior of the rat: implications for an animal model of paranoid schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*, 50(3), 215–223. <https://doi.org/10.1007/bf00426835>
- Gasse, C., Wimberley, T., Wang, Y., Mors, O., Børghlum, A., Als, T. D., Werge, T., Nordentoft, M., Hougaard, D. M., & Horsdal, H. T. (2019). Schizophrenia polygenic risk scores, urbanicity and treatment-resistant schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 212, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2019.08.008>
- Gastambide, F., Gilmour, G., Robbins, T., & Tricklebank, M. (2013). The mGlu₅ positive allosteric modulator LSN2463359 differentially modulates motor, instrumental and cognitive effects of NMDA receptor antagonists in the rat. *Neuropharmacology*, 64(240–247). <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.07.039>
- Gawel, K., Banono, N. S., Michalak, A., & Esguerra, C. V. (2019). A critical review of zebrafish schizophrenia models: Time for validation? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*,

107(January), 6–22. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.08.001>

- Gayer-Anderson, C., Jongsma, H. E., Di Forti, M., Quattrone, D., Velthorst, E., de Haan, L., Selten, J. P., Szöke, A., Llorca, P. M., Tortelli, A., Arango, C., Bobes, J., Bernardo, M., Sanjuán, J., Santos, J. L., Arrojo, M., Parellada, M., Tarricone, I., Berardi, D., ... Morgan, C. (2020). The European Network of National Schizophrenia Networks Studying Gene–Environment Interactions (EU-GEI): Incidence and First-Episode Case–Control Programme. *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology*, *55*(5), 645–657. <https://doi.org/10.1007/s00127-020-01831-x>
- Georges, P., & Franklin, K. B. J. (2008). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Elsevier Academic.
- Germain, N., Kymes, S., Löf, E., Jakubowska, A., François, C., & Weatherall, J. (2019). A systematic literature review identifying associations between outcomes and quality of life (QoL) or healthcare resource utilization (HCRU) in schizophrenia. *Journal of Medical Economics*, *22*(5), 403–413. <https://doi.org/10.1080/13696998.2019.1576694>
- Geyer, M. A., & Braff, D. L. (1987). Startle habituation and sensorimotor gating in schizophrenia and related animal models. *Schizophrenia Bulletin*, *13*(4), 643–668. <https://doi.org/10.1093/schbul/13.4.643>
- Giovanoli, S., Weber, L., & Meyer, U. (2014). Single and combined effects of prenatal immune activation and peripubertal stress on parvalbumin and reelin expression in the hippocampal formation. *Physiology and Behavior Laboratory*, *40*, 48–54.
- Glahn, D. C., Laird, A. R., Ellison-Wright, I., Thelen, S. M., Robinson, J. L., Lancaster, J. L., Bullmore, E., & Fox, P. T. (2008). Meta-Analysis of Gray Matter Anomalies in Schizophrenia: Application of Anatomic Likelihood Estimation and Network Analysis. *Biological Psychiatry*, *64*(9), 774–781. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.03.031>
- Glen, W. B., Horowitz, B., Carlson, G. C., Cannon, T. D., Talbot, K., Jentsch, J. D., & Lavin, A. (2014). Dysbindin-1 loss compromises NMDAR-dependent synaptic plasticity and contextual fear conditioning. *Hippocampus*, *24*(2), 204–213. <https://doi.org/10.1002/hipo.22215>
- Glover, M. E., & Clinton, S. M. (2016). Of rodents and humans: A comparative review of the neurobehavioral effects of early life SSRI exposure in preclinical and clinical research. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *51*, 50–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2016.04.008>
- Goeden, N., Velasquez, J., Arnold, K. A., Chan, Y., Lund, B. T., Anderson, G. M., & Bonnin, A. (2016). Maternal inflammation disrupts fetal neurodevelopment via increased placental output of serotonin to the fetal brain. *Journal of Neuroscience*, *36*(22), 6041–6049. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2534-15.2016>
- Gogos, A., Skokou, M., Ferentinou, E., & Gourzis, P. (2019). Nicotine consumption during the prodromal phase of schizophrenia – a review of the literature. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, *15*, 2943–2958. <https://doi.org/10.2147/NDT.S210199>
- Goldberg, T. E., Torrey, E. F., Berman, K. F., & Weinberger, D. R. (1994). Relations between neuropsychological performance and brain morphological and physiological measures in monozygotic twins discordant for schizophrenia. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, *55*(1), 51–61. [https://doi.org/10.1016/0925-4927\(94\)90011-6](https://doi.org/10.1016/0925-4927(94)90011-6)
- Gonzalez-Burgos, G., Fish, K. N., & Lewis, D. A. (2011). GABA neuron alterations, cortical circuit dysfunction and cognitive deficits in schizophrenia. In *Neural Plasticity* (Vol. 2011). <https://doi.org/10.1155/2011/723184>

- Gottesman, I. I. (1991). *Schizophrenia genesis: The origins of madness*. (W H Freeman/Times Books/ Henry Holt & Co. (ed.)).
- Gralnick, A. (1946). A THREE-YEAR SURVEY OF ELECTROSHOCK THERAPY Report on 276 cases; comparative value of insulin-coma therapy. *American Journal of Psychiatry*, *102*(5), 583–593.
- Green, M. J., Chia, T. Y., Cairns, M. J., Wu, J., Tooney, P. A., Scott, R. J., & Carr, V. J. (2014). Catechol-O-methyltransferase (COMT) genotype moderates the effects of childhood trauma on cognition and symptoms in schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*, *49*(1), 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2013.10.018>
- Green, M. J., Raudino, A., Cairns, M. J., Wu, J., Tooney, P. A., Scott, R. J., & Carr, V. J. (2015). Do common genotypes of FK506 binding protein 5 (FKBP5) moderate the effects of childhood maltreatment on cognition in schizophrenia and healthy controls? *Journal of Psychiatric Research*, *70*, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2015.07.019>
- Greenwood, J., Acharya, R. B., Marcellus, V., & Rey, J. A. (2020). Lumateperone: A Novel Antipsychotic for Schizophrenia. *Annals of Pharmacotherapy*. <https://doi.org/10.1177/1060028020936597>
- Guest, F. L., & Guest, P. C. (2018). Developmental Origins of Stress and Psychiatric Disorders. In P. C. Guest (Ed.), *Investigations of Early Nutrition Effects on Long-Term Health* (pp. 47–58). Editor.
- Gunawardana, L., Zammit, S., Lewis, G., Gunnell, D., Hollis, C., Wolke, D., & Harrison, G. (2011). Examining the association between maternal analgesic use during pregnancy and risk of psychotic symptoms during adolescence. *Schizophrenia Research*, *126*(1–3), 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2010.10.021>
- Gunne, L., Häggström, J., & Sjöquist, B. (1984). Association with persistent neuroleptic-induced dyskinesia of regional changes in brain GABA synthesis. *Nature*, *309*(5966), 347–349. <https://doi.org/10.1038/309347a0>
- Guo, J. Y., Ragland, J. D., & Carter, C. S. (2019). Memory and cognition in schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, *24*(5), 633–642. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0231-1>
- Gur, R. E., Petty, R. G., Turetsky, B. I., & Gur, R. C. (1996). Schizophrenia throughout life: Sex differences in severity and profile of symptoms. *Schizophrenia Research*, *21*(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/0920-9964\(96\)00023-0](https://doi.org/10.1016/0920-9964(96)00023-0)
- Gururajan, A., Taylor, D. A., & Malone, D. T. (2010). Current pharmacological models of social withdrawal in rats: relevance to schizophrenia. *Behavioural Pharmacology*, *21*(8), 690–709. <https://doi.org/doi:10.1097/FBP.0b013e32833fa7df>
- Gusev, F. E., Reshetov, D. A., Mitchell, A. C., Andreeva, T. V., Dincer, A., Grigorenko, A. P., Fedonin, G., Halene, T., Aliseychik, M., Filippova, E., Weng, Z., Akbarian, S., & Rogaev, E. I. (2019). Chromatin profiling of cortical neurons identifies individual epigenetic signatures in schizophrenia. *Translational Psychiatry*, *9*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0596-1>
- Hafner, H., Riecher-raössler, A., Der Heiden, W. A., Maurer, K., Fätkfnheuer, B., & Laöffler, W. (1993). Generating and testing a causal explanation of the gender difference in age at first onset of schizophrenia. *Psychological Medicine*, *23*(4), 925–940. <https://doi.org/10.1017/S0033291700026398>
- Haijma, S. V., Van Haren, N., Cahn, W., Koolschijn, P. C. M. P., Hulshoff Pol, H. E., & Kahn, R. S. (2013). Brain volumes in schizophrenia: A meta-analysis in over 18 000 subjects. *Schizophrenia Bulletin*, *39*(5), 1129–1138. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbs118>

- Halim, N., & Swerdlow, N. (2000). Distributed neurodegenerative changes 2-28 days after ventral hippocampal excitotoxic lesions in rats. *Brain Res.*, *873*(1), 60–74.
[https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)02497-5](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)02497-5)
- Han, T. U., Root, J., Reyes, L. D., Huchinson, E. B., Du Hoffmann, J., Lee, W. S., Barnes, T. D., & Drayna, D. (2019). Human GNPTAB stuttering mutations engineered into mice cause vocalization deficits and astrocyte pathology in the corpus callosum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(35), 17515–17524.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1901480116>
- Harding, C. M. (1988). Course types in schizophrenia: An analysis of European and American studies. *Schizophrenia Bulletin*, *14*(4), 633–643. <https://doi.org/10.1093/schbul/14.4.633>
- Harro, J. (2018). Animals, anxiety, and anxiety disorders: How to measure anxiety in rodents and why. *Behavioural Brain Research*, *352*(July 2017), 81–93.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.10.016>
- Harvey, P. D., Siu, C. O., Ogasa, M., & Loebel, A. (2015). Effect of lurasidone dose on cognition in patients with schizophrenia: Post-hoc analysis of a long-term, double-blind continuation study. *Schizophrenia Research*, *166*(1–3), 334–338. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2015.06.008>
- Hasan, A., Nitsche, M. A., Rein, B., Schneider-Axmann, T., Guse, B., Gruber, O., Falkai, P., & Wobrock, T. (2011). Dysfunctional long-term potentiation-like plasticity in schizophrenia revealed by transcranial direct current stimulation. *Behavioural Brain Research*, *224*(1), 15–22.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.05.017>
- Hashimoto, K., Engberg, G., Shimizu, E., Nordin, C., Lindström, L. H., & Iyo, M. (2005). Reduced D-serine to total serine ratio in the cerebrospinal fluid of drug naive schizophrenic patients. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *29*(5), 767–769.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2005.04.023>
- Hauser, J., Rudolph, U., Keist, R., Möhler, H., Feldon, J., & Yee, B. K. (2005). Hippocampal $\alpha 5$, subunit-containing GABAA receptors modulate the expression of prepulse inhibition. *Molecular Psychiatry*, *10*(2), 201–207. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001554>
- Heim, C., & Nemeroff, C. B. (2001). The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: Preclinical and clinical studies. *Biological Psychiatry*, *49*(12), 1023–1039.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(01\)01157-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(01)01157-X)
- Heiss, C. N., & Olofsson, L. E. (2019). The role of the gut microbiota in development, function and disorders of the central nervous system and the enteric nervous system. *Journal of Neuroendocrinology*, *31*(5), 1–11. <https://doi.org/10.1111/jne.12684>
- Hillemacher, T., Bachmann, O., Kahl, K. G., & Frieling, H. (2018). Alcohol, microbiome, and their effect on psychiatric disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *85*(November 2017), 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.04.015>
- Hoffman, D. C. (1992). Typical and atypical neuroleptics antagonize MK-801-induced locomotion and stereotypy in rats. *J Neural Transm Gen Sect*, *89*(1–2), 1–10.
<https://doi.org/10.1007/bf01245347>
- Hoffman, K. L., & Basurto, E. (2014). Clozapine and glycinamide prevent MK-801-induced deficits in the novel object recognition (NOR) test in the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Behavioural Brain Research*, *271*, 203–211.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.06.012>
- Hoffman, R. E., Boutros, N. N., Berman, R. M., Roessler, E., Belger, A., Krystal, J. H., & Charney, D. S.

- (1999). Transcranial magnetic stimulation of left temporoparietal cortex in three patients reporting hallucinated “voices.” *Biological Psychiatry*, 46(1), 130–132.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(98\)00358-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(98)00358-8)
- Hollingsworth, E., & Mueller, K. (1988). Patterns of locomotor and stereotypic behavior during continuous amphetamine administration in rats. *Pharmacol Biochem Behav.*, 30(2), 535–537.
[https://doi.org/10.1016/0091-3057\(88\)90493-5](https://doi.org/10.1016/0091-3057(88)90493-5)
- Holt, D. J., Weiss, A. P., Rauch, S. L., Wright, C. I., Zalesak, M., Goff, D. C., Ditman, T., Welsh, R. C., & Heckers, S. (2005). Sustained activation of the hippocampus in response to fearful faces in schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 57(9), 1011–1019.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.01.033>
- Homberg, J. R. (2013). Measuring behaviour in rodents: Towards translational neuropsychiatric research. *Behavioural Brain Research*, 236(1), 295–306.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.09.005>
- Hor, K., & Taylor, M. (2010). Suicide and schizophrenia: a systematic review of rates and risk factors. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*, 24(4 Suppl), 81–90.
<https://doi.org/10.1177/1359786810385490>
- Horiguchi, M., Miyauchi, M., Neugebauer, N. M., Oyamada, Y., & Meltzer, H. Y. (2016). Prolonged reversal of the phencyclidine-induced impairment in novel object recognition by a serotonin (5-HT) 1A- dependent mechanism. *Behavioural Brain Research*, 301, 132–141.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.08.040>
- Hornberger, L. K. (2006). Maternal diabetes and the fetal heart. *Heart*, 92(8), 1019–1021.
<https://doi.org/10.1136/hrt.2005.083840>
- Horner, A. E., Heath, C. J., Hvoslef-Eide, M., Kent, B. A., Kim, C. H., Nilsson, S. R. O., Alsio, J., Oomen, C. A., Holmes, A., Saksida, L. M., & Bussey, T. J. (2013). The touchscreen operant platform for testing learning and memory in rats and mice. *Nature Protocol*, 8(10), 1961–1984.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2013.122>
- Houy, E., & Thibaut, F. (2007). Onde P50 dans la schizophrénie. *EMC - Psychiatrie*, 4(3), 1–11.
[https://doi.org/10.1016/s0246-1072\(07\)48130-5](https://doi.org/10.1016/s0246-1072(07)48130-5)
- Hughes, J. R., Hatsukami, K., Mitchell, J. E., & Dahlgren, L. A. (1986). Prevalence of Smoking Among Psychiatric Disorders. *American Journal of Psychiatry*, 143:8(August), 993–997.
- Hunter, A., Murray, R., Asher, L., & Leonardi-Bee, J. (2020). The effects of tobacco smoking, and prenatal tobacco smoke exposure, on risk of schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. *Nicotine and Tobacco Research*, 22(1), 3–10.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Husum, H., Termeer, E., Mathé, A. A., Bolwig, T. G., & Ellenbroek, B. A. (2002). Early maternal deprivation alters hippocampal levels of neuropeptide Y and calcitonin-gene related peptide in adult rats. *Neuropharmacology*, 42(6), 798–806. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(02\)00038-2](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(02)00038-2)
- Inserm. (2020). *AVC : Récupérer par la pensée*. <https://www.inserm.fr/actualites-et-evenements/actualites/avc-recuperer-par-pensee>
- International Schizophrenia Consortium. (2009). Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia that overlaps with bipolar disorder International. *Nature*, 460(7256), 748–752.
<https://doi.org/10.3406/linly.1992.11011>

- Ishikawa, M., Mizukami, K., Iwakiri, M., & Asada, T. (2005). Immunohistochemical and immunoblot analysis of γ -aminobutyric acid B receptor in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia and bipolar disorder. *Neuroscience Letters*, *383*(3), 272–277. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.04.025>
- Ishiyama, T., Tokuda, K., Ishibashi, T., Ito, A., Toma, S., & Ohno, Y. (2007). Lurasidone (SM-13496), a novel atypical antipsychotic drug, reverses MK-801-induced impairment of learning and memory in the rat passive-avoidance test. *European Journal of Pharmacology*, *572*(2–3), 160–170. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.06.058>
- Jaaro-Peled, H. (2009). Gene models of schizophrenia: DISC1 mouse models. In *Progress in Brain Research* (Vol. 179, Issue C). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(09\)17909-8](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(09)17909-8)
- Jackson, J. (1875). On temporary mental disorders after epileptic paroxysms. *West Riding Lunatic Asylum Med Rep*, *5*, 105–129.
- Jaeschke, R. R., Sowa-kucma, M., Panczyszyn-Trzewik, P., Misztak, P., Styczen, K., & Datka, W. (2016). Lurasidone : The 2016 update on the pharmacology , efficacy and safety profile. *Pharmacological Reports*, *68*, 748–755. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.04.002>
- Jimenez, A. M., Riedel, P., Lee, J., Reavis, E. A., & Green, M. F. (2019). Linking resting-state networks and social cognition in schizophrenia and bipolar disorder. *Human Brain Mapping*, *40*(16), 4703–4715. <https://doi.org/10.1002/hbm.24731>
- Johansson, C., Jackson, D., Zhang, J., & Svensson, L. (1995). Prepulse inhibition of acoustic startle, a measure of sensorimotor gating: effects of antipsychotics and other agents in rats. *Pharmacol Biochem Behav.*, *52*(4), 649–654. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)00160-x](https://doi.org/10.1016/0091-3057(95)00160-x)
- Johnston, M. V., & Coyle, J. T. (1979). Histological and neurochemical effects of fetal treatment with methylazoxymethanol on rat neocortex in adulthood. *Brain Research*, *170*(1), 135–155. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90946-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90946-6)
- Jones, C., Watson, D., & Fone, K. (2011). Animal models of schizophrenia. *British Journal of Pharmacology*, *164*(4), 1162–1194. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01386.x>
- Jones, H. J., Hammerton, G., McCloud, T., Hines, L. A., Wright, C., Gage, S. H., Holmans, P., Jones, P. B., Davey Smith, G., Linden, D. E. J., O'Donovan, M. C., Owen, M. J., Walters, J. T., Munafò, M. R., Heron, J., & Zammit, S. (2020). Examining pathways between genetic liability for schizophrenia and patterns of tobacco and cannabis use in adolescence. *Psychological Medicine*. <https://doi.org/10.1017/S0033291720001798>
- Jones, M. T., Strassnig, M. T., & Harvey, P. D. (2020). Emerging 5-HT receptor antagonists for the treatment of Schizophrenia. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, *25*(2), 189–200. <https://doi.org/10.1080/14728214.2020.1773792>
- Jozet-alves, C., Percelay, S., Bouet, V., Jozet-alves, C., Percelay, S., Bouet, V., Laterality, O., Jozet-alves, C., & Percelay, S. (2019). *Olfactory Laterality Is Valence-Dependent in Mice To cite this version : HAL Id : hal-02279643 SS symmetry Olfactory Laterality Is Valence-Dependent in Mice*. *11*(9).
- Kamnasaran, D., Muir, W. J., Ferguson-Smith, M. A., & Cox, D. W. (2003). Disruption of the neuronal PAS3 gene in a family affected with schizophrenia. *Journal of Medical Genetics*, *40*(5), 325–332. <https://doi.org/10.1136/jmg.40.5.325>
- Kamyshanskaia, N., Gorkin, V., & Voitenko, N. (1990). Multiple forms of monoaminoxidase in the rat brain during experimental catatonia. *Vopr Med Khim.*, *36*(5), 32–34.

- Karbasforoushan, H., & Woodward, N. D. (2012). Resting-State Networks in Schizophrenia. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 12(21), 2404–2414. <https://doi.org/10.2174/1568026611212210011>
- Karlsson, H., Dal, H., Gardner, R. M., Torrey, E. F., & Dalman, C. (2019). Birth month and later diagnosis of schizophrenia. A population-based cohort study in Sweden. *Journal of Psychiatric Research*, 116(May), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2019.05.025>
- Karlsson, H., & Dalman, C. (2019). Epidemiological Studies of Prenatal and Childhood Infection and Schizophrenia. In G. M. Khandaker, U. Meyer, & P. B. Jones Editors (Eds.), *Neuroinflammation and Schizophrenia* (pp. 35–48). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/7854_2018_87
- Katagiri, N., Pantelis, C., Nemoto, T., Zalesky, A., Hori, M., Shimoji, K., Saito, J., Ito, S., Dwyer, D. B., Fukunaga, I., Morita, K., Tsujino, N., Yamaguchi, T., Shiraga, N., Aoki, S., & Mizuno, M. (2015). A longitudinal study investigating sub-threshold symptoms and white matter changes in individuals with an “at risk mental state” (ARMS). *Schizophrenia Research*, 162(1–3), 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2015.01.002>
- Kay, S. R., Fiszbein, A., & Opler, L. A. (1987). The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 13(2), 261–276. <https://doi.org/10.1093/schbul/13.2.261>
- Keeley, R. J., Trow, J., Bye, C., & McDonald, R. J. (2015). Part II: Strain- and sex-specific effects of adolescent exposure to THC on adult brain and behaviour: Variants of learning, anxiety and volumetric estimates. *Behavioural Brain Research*, 288, 132–152. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.01.001>
- Kekesi, G., Petrovzski, Z., Benedek, G., & Horvath, G. (2015). Sex-specific alterations in behavioral and cognitive functions in a “three hit” animal model of schizophrenia. *Behavioural Brain Research*, 284, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.02.015>
- Kelly, S., Jahanshad, N., Zalesky, A., Kochunov, P., Agartz, I., Alloza, C., Andreassen, O. A., Arango, C., Banaj, N., Bouix, S., Bousman, C. A., Brouwer, R. M., Bruggemann, J., Bustillo, J., Cahn, W., Calhoun, V., Cannon, D., Carr, V., Catts, S., ... Donohoe, G. (2018). Widespread white matter microstructural differences in schizophrenia across 4322 individuals: Results from the ENIGMA Schizophrenia DTI Working Group. *Molecular Psychiatry*, 23(5), 1261–1269. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.170>
- Kępińska, A. P., Iyegbe, C. O., Vernon, A. C., Yolken, R., Murray, R. M., & Pollak, T. A. (2020). Schizophrenia and Influenza at the Centenary of the 1918-1919 Spanish Influenza Pandemic: Mechanisms of Psychosis Risk. *Frontiers in Psychiatry*, 11(February), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00072>
- Khan, A., & Powell, S. B. (2018). Sensorimotor Gating Deficits in “Two-Hit” Models of Schizophrenia Risk Factors. *Schizophr Res.*, 198, 68–83. <https://doi.org/doi:10.1016/j.schres.2017.10.009>
- Kilts, C. D. (2001). The changing roles and targets for animal models of schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 50(11), 845–855. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(01\)01286-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(01)01286-0)
- Kim, G. W., Kim, Y. H., & Jeong, G. W. (2017). Whole brain volume changes and its correlation with clinical symptom severity in patients with schizophrenia: A DARTEL-based VBM study. *PLoS ONE*, 12(5), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177251>
- Kinkead, B., Dobner, P. R., Egnatashvili, V., Murray, T., Deitemeyer, N., & Nemeroff, C. B. (2005). Neurotensin-deficient mice have deficits in prepulse inhibition: Restoration by clozapine but not haloperidol, olanzapine, or quetiapine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 315(1), 256–264. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.087437>

- Kircher, T., Wöhr, M., Nenadic, I., Schwarting, R., Schratt, G., Alferink, J., Culmsee, C., Garn, H., Hahn, T., Müller-Myhsok, B., Dempfle, A., Hahmann, M., Jansen, A., Pfefferle, P., Renz, H., Rietschel, M., Witt, S. H., Nöthen, M., Krug, A., & Dannlowski, U. (2019). Neurobiology of the major psychoses: a translational perspective on brain structure and function—the FOR2107 consortium. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, *269*(8), 949–962. <https://doi.org/10.1007/s00406-018-0943-x>
- Kirkpatrick, B., & Buchanan, R. (1990). The neural basis of the deficit syndrome of schizophrenia. *J Nerv Ment Dis.*, *178*(9), 545–555. <https://doi.org/10.1097/00005053-199009000-00001>
- Kline, J. J., & Reid, K. (1985). The acute periventricular injury syndrome: a possible animal model for psychotic disease. *Psychopharmacology (Berl.)*, *87*(3), 292–297. <https://doi.org/10.1007/bf00432710> [Indexed for MEDLINE]
- Kochunov, P., Chiappelli, J., Wright, S. N., Rowland, L. M., Patel, B., Wijtenburg, S. A., Nugent, K., McMahon, R. P., Carpenter, W. T., Muellerklein, F., Sampath, H., & Elliot Hong, L. (2014). Multimodal white matter imaging to investigate reduced fractional anisotropy and its age-related decline in schizophrenia. *Psychiatry Research - Neuroimaging*, *223*(2), 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.pscychresns.2014.05.004>
- Kochunov, P., Coyle, T. R., Rowland, L. M., Jahanshad, N., Thompson, P. M., Kelly, S., Du, X., Sampath, H., Bruce, H., Chiappelli, J., Ryan, M., Fisseha, F., Savransky, A., Adhikari, B., Chen, S., Paciga, S. A., Whelan, C. D., Xie, Z., Hyde, C. L., ... Hong, L. E. (2017). Association of white matter with core cognitive deficits in patients with schizophrenia. *JAMA Psychiatry*, *74*(9), 958–966. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2017.2228>
- Koenig, J. I., Kirkpatrick, B., & Lee, P. (2002). Glucocorticoid hormones and early brain development in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, *27*(2), 309–318. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00396-7](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00396-7)
- Kokkinidis, L., & Anisman, H. (1981). Amphetamine psychosis and schizophrenia: a dual model. *Neurosci Biobehav Rev.*, *5*(4), 449–461. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(81\)90015-4](https://doi.org/10.1016/0149-7634(81)90015-4)
- Kong, A., Frigge, M. L., Masson, G., Besenbacher, S., Sulem, P., Magnusson, G., Gudjonsson, S. A., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., Jonasdottir, A., Wong, W. S. W., Sigurdsson, G., Walters, G. B., Steinberg, S., Helgason, H., Thorleifsson, G., Gudbjartsson, D. F., Helgason, A., Magnusson, O. T., ... Stefansson, K. (2012). Rate of de novo mutations and the importance of father-s age to disease risk. *Nature*, *488*(7412), 471–475. <https://doi.org/10.1038/nature11396>
- Korovaitseva, G. I., Gabaeva, M. V., Yunilainen, O. A., & Golimbet, V. E. (2019). Effect of VNTR Polymorphism of the AS3MT Gene and Obstetrical Complications on the Severity of Schizophrenia. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, *168*(1), 84–86. <https://doi.org/10.1007/s10517-019-04653-3>
- Koshiyama, D., Fukunaga, M., Okada, N., Morita, K., Nemoto, K., Yamashita, F., Yamamori, H., Yasuda, Y., Fujimoto, M., Kelly, S., Jahanshad, N., Kudo, N., Azechi, H., Watanabe, Y., Donohoe, G., Thompson, P. M., Kasai, K., & Hashimoto, R. (2018). Role of frontal white matter and corpus callosum on social function in schizophrenia. *Schizophrenia Research*, *202*, 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2018.07.009>
- Kostrzewa, R. M., Nowak, P., Brus, R., & Brown, R. W. (2016). Perinatal treatments with the dopamine D2-receptor agonist quinpirole produces permanent D2-receptor supersensitization: A model of schizophrenia. *Neurochemical Research*, *41*(1–2), 183–192. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1757-0>
- Kponee-Shovein, K. Z., Weisskopf, M. G., Grashow, R., Rotem, R. S., Coull, B. A., Schnaas, L.,

- Hernández-Chávez, M. del C., Sanchez, B., Peterson, K., Hu, H., & Téllez-Rojo, M. M. (2020). Estimating the causal effect of prenatal lead exposure on prepulse inhibition deficits in children and adolescents. *NeuroToxicology*, *78*(August 2019), 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2020.02.013>
- Kraan, T., Velthorst, E., Smit, F., de Haan, L., & van der Gaag, M. (2015). Trauma and recent life events in individuals at ultra high risk for psychosis: Review and meta-analysis. *Schizophrenia Research*, *161*(2–3), 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2014.11.026>
- Krajcovic, B., Fajnerova, I., Horacek, J., Kelemen, E., Kubik, S., Svoboda, J., & Stuchlik, A. (2019). Neural and neuronal discoordination in schizophrenia: From ensembles through networks to symptoms. *Acta Physiologica*, *226*(4), 1–29. <https://doi.org/10.1111/apha.13282>
- Krepela, J., Hosak, L., Pachlova, B., & Hrdlicka, M. (2019). Maintenance electroconvulsive therapy in schizophrenia. *Psychiatria Danubina*, *31*(1), 62–68. <https://doi.org/10.24869/psyd.2019.62>
- Krogmann, A., Peters, L., von Hardenberg, L., Bödeker, K., Nöhles, V. B., & Correll, C. U. (2020). Keeping up with the therapeutic advances in schizophrenia: a review of novel and emerging pharmacological entities. *Cambridge University Press*, *24*, 41–68. <https://doi.org/10.1017/S109285291900124X>
- Krystal, J. H., D'Souza, D. C., Karper, L. P., Bennett, A., Abi-Dargham, A., Abi-Saab, D., Cassello, K., Bowers, M. B., Vegso, S., Heninger, G. R., & Charney, D. S. (1999). Interactive effects of subanesthetic ketamine and haloperidol in healthy humans. *Psychopharmacology*, *145*(2), 193–204. <https://doi.org/10.1007/s002130051049>
- Kubicki, M., Park, H., Westin, C. F., Nestor, P. G., Mulkern, R. V., Maier, S. E., Niznikiewicz, M., Connor, E. E., Levitt, J. J., Frumin, M., Kikinis, R., Jolesz, F. A., McCarley, R. W., & Shenton, M. E. (2005). DTI and MTR abnormalities in schizophrenia: Analysis of white matter integrity. *NeuroImage*, *26*(4), 1109–1118. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2005.03.026>
- Labhardt, F. (1954). Technic, side effects and complications of largactil therapy. *Schweiz Arch. Neurol. Psychiatry*, *73*(1–2), 338–345.
- Labrie, V., Fukumura, R., Rastogi, A., Fick, L. J., Wang, W., Boutros, P. C., Kennedy, J. L., Smeralul, M. O., Lee, F. H., Baker, G. B., Belsham, D. D., Barger, S. W., Gondo, Y., Wong, A. H. C., & Roder, J. C. (2009). Serine racemase is associated with schizophrenia susceptibility in humans and in a mouse model. *Human Molecular Genetics*, *18*(17), 3227–3243. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp261>
- Larsson, S., Andreassen, O. A., Aas, M., Røssberg, J. I., Mork, E., Steen, N. E., Barrett, E. A., Lagerberg, T. V., Peleikis, D., Agartz, I., Melle, I., & Lorentzen, S. (2013). High prevalence of childhood trauma in patients with schizophrenia spectrum and affective disorder. *Comprehensive Psychiatry*, *54*(2), 123–127. <https://doi.org/10.1016/j.comppsy.2012.06.009>
- Latusz, J., & Maćkowiak, M. (2020). Early-life blockade of NMDA receptors induces epigenetic abnormalities in the adult medial prefrontal cortex: possible involvement in memory impairment in trace fear conditioning. *Psychopharmacology*, *237*(1), 231–248. <https://doi.org/10.1007/s00213-019-05362-5>
- Lee, C.-T., Yueh Hsiao, C., Fu Lee, J., Chen, Y. C., Ndi Nfor, O., Huang, J. Y., Wang, L., Chang Ho, C., & Po Liaw, Y. (2018). Relationship between Schizophrenia and Low-Income Based on Age and Sex: Results from a Nation-wide Population-Based Longitudinal Study. *Neuropsychiatry*, *08*(03), 1000–1006. <https://doi.org/10.4172/neuropsychiatry.1000426>
- Lee, G., & Zhou, Y. (2019). NMDAR Hypofunction Animal Models of Schizophrenia. *Frontiers in*

- Leger, M, & Neill, J. C. (2016). A systematic review comparing sex differences in cognitive function in schizophrenia and in rodent models for schizophrenia, implications for improved therapeutic strategies. *Neurosci Biobehav Rev.*, 68, 979–1000.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.06.029>
- Leger, Marianne, Quiedeville, A., Bouet, V., Haelewyn, B., Boulouard, M., Schumann-Bard, P., & Freret, T. (2013). Object recognition test in mice. *Nature Protocols*, 8(12), 2531–2537.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2013.155>
- Lein, E. S., Hawrylycz, M. J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., Boe, A. F., Boguski, M. S., Brockway, K. S., Byrnes, E. J., Chen, L., Chen, L., Chen, T. M., Chin, M. C., Chong, J., Crook, B. E., Czaplinska, A., Dang, C. N., Datta, S., ... Jones, A. R. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*, 445(7124), 168–176.
<https://doi.org/10.1038/nature05453>
- Lelong-Boulouard, V., Quentin, T., Moreaux, F., Debruyne, D., Boulouard, M., & Coquerel, A. (2006). Interactions of buprenorphine and dipotassium clorazepate on anxiety and memory functions in the mouse. *Drug and Alcohol Dependence*, 85(2), 103–113.
<https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2006.03.017>
- Leroux, E., Vandeveldel, A., Tréhout, M., & Dollfus, S. (2018). Abnormalities of fronto-subcortical pathways in schizophrenia and the differential impacts of antipsychotic treatment: a DTI-based tractography study. *Psychiatry Research - Neuroimaging*, 280(August), 22–29.
<https://doi.org/10.1016/j.pscychresns.2018.08.008>
- Leucht, S., Cipriani, A., Spineli, L., Mavridis, D., Örey, D., Richter, F., Samara, M., Barbui, C., Engel, R. R., Geddes, J. R., Kissling, W., Stapf, M. P., Lässig, B., Salanti, G., & Davis, J. M. (2013). Comparative efficacy and tolerability of 15 antipsychotic drugs in schizophrenia: A multiple-treatments meta-analysis. *The Lancet*, 382(9896), 951–962. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60733-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60733-3)
- Lewis, C. M., Levinson, D. F., Wise, L. H., DeLisi, L. E., Straub, R. E., Hovatta, I., Williams, N. M., Schwab, S. G., Pulver, A. E., Faraone, S. V., Brzustowicz, L. M., Kaufmann, C. A., Garver, D. L., Gurling, H. M. D., Lindholm, E., Coon, H., Moises, H. W., Byerley, W., Shaw, S. H., ... Helgason, T. (2003). Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia. *American Journal of Human Genetics*, 73(1), 34–48.
<https://doi.org/10.1086/376549>
- Lezak, K. R., Missig, G., & Carlezon, W. A. (2017). Behavioral methods to study anxiety in rodents. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 19(2), 181–191.
<https://doi.org/10.31887/DCNS.2015.17.3/mbourin>
- Li, S., Hu, N., Zhang, W., Tao, B., Dai, J., Gong, Y., Tan, Y., Cai, D., & Lui, S. (2019). Dysconnectivity of multiple brain networks in schizophrenia: A meta-analysis of resting-state functional connectivity. *Frontiers in Psychiatry*, 10(JULY), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00482>
- Li, Y., Sun, L., Yang, T., Jiao, W., Tang, J., Huang, X., Huang, Z., Meng, Y., Luo, L., Wang, X., Bian, X., Zhang, F., Wang, K., & Sun, Q. (2019). Design and Synthesis of Novel Positive Allosteric Modulators of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors with the Ability to Rescue Auditory Gating Deficit in Mice. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(1), 159–173.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01492>
- Lieberman, J. A., Davis, R. E., Correll, C. U., Goff, D. C., Kane, J. M., Tamminga, C. A., Mates, S., & Vanover, K. E. (2016). ITI-007 for the Treatment of Schizophrenia: A 4-Week Randomized,

- Double-Blind, Controlled Trial. *Biological Psychiatry*, 79(12), 952–961.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.08.026>
- Lindenmayer, J. P. (2000). Treatment refractory schizophrenia. *Psychiatric Quarterly*, 71(4), 373–384.
<https://doi.org/10.1023/A:1004640408501>
- Lipner, E., Murphy, S. K., & Ellman, L. M. (2020). Prenatal maternal stress and the cascade of risk to schizophrenia spectrum disorders in offspring. *Current Psychiatry Reports*, 21(10), 99.
<https://doi.org/10.1007/s11920-019-1085-1>
- Lipska, B. K., & Weinberger, D. R. (2000). To model a psychiatric disorder in animals: Schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology*, 23(3), 223–239. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00137-8](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00137-8)
- Lipska, B., Swerdlow, N., Geyer, M., Jaskiw, G., Braff, D., & Weinberger, D. (1995). Neonatal excitotoxic hippocampal damage in rats causes post-pubertal changes in prepulse inhibition of startle and its disruption by apomorphine. *Psychopharmacology (Berl)*, 122(1), 35–43.
<https://doi.org/10.1007/bf02246439>
- Lisi, G., Ribolsi, M., Siracusano, A., & Niolu, C. (2020). Maternal Vitamin D and its Role in Determining Fetal Origins of Mental Health. *Current Pharmaceutical Design*, 26(21), 2497–2509.
<https://doi.org/10.2174/1381612826666200506093858>
- Lister, R. G. (1990). Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology and Therapeutics*, 46(3), 321–340. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(90\)90021-S](https://doi.org/10.1016/0163-7258(90)90021-S)
- Long, L. E., Chesworth, R., Huang, X. F., McGregor, I. S., Arnold, J. C., & Karl, T. (2010). A behavioural comparison of acute and chronic 9- tetrahydrocannabinol and cannabidiol in C57BL/6JArc mice. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 13(7), 861–876.
<https://doi.org/10.1017/S1461145709990605>
- Lu, L., Dong, M., Zhang, L., Zhu, X. M., Ungvari, G. S., Ng, C. H., Wang, G., & Xiang, Y. T. (2019). Prevalence of suicide attempts in individuals with schizophrenia: A meta-analysis of observational studies. *Epidemiology and Psychiatric Sciences*.
<https://doi.org/10.1017/S2045796019000313>
- Lucchese, G., Flöel, A., & Stahl, B. (2020). A Peptide Link Between Human Cytomegalovirus Infection, Neuronal Migration, and Psychosis. *Frontiers in Psychiatry*, 11(May), 1–8.
<https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00349>
- Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R., & Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6), 434–445.
<https://doi.org/10.1038/nrn2639>
- Macbeth, A. H., Edds, J. S., & Young, W. S. (2011). Housing conditions and stimulus females: a robust social discrimination task for studying male rodent social recognition. *Nature Protocol*, 4(11), 1574–1581. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.141>
- Madigand, J., Tréhout, M., Delcroix, N., Dollfus, S., & Leroux, E. (2019). Corpus callosum microstructural and macrostructural abnormalities in schizophrenia according to the stage of disease. *Psychiatry Research - Neuroimaging*, 291(August), 63–70.
<https://doi.org/10.1016/j.pscychresns.2019.08.002>
- Majer, M., Nater, U. M., Lin, J. M. S., Capuron, L., & Reeves, W. C. (2010). Association of childhood trauma with cognitive function in healthy adults: A pilot study. *BMC Neurology*, 10.
<https://doi.org/10.1186/1471-2377-10-61>

- Mäki, P., Veijola, J., Jones, P. B., Murray, G. K., Koponen, H., Tienari, P., Miettunen, J., Tanskanen, P., Wahlberg, K. E., Koskinen, J., Lauronen, E., & Isohanni, M. (2005). Predictors of schizophrenia - A review. *British Medical Bulletin*, 73–74, 1–15. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldh046>
- Malaspina, D., Harkavy-Friedman, J., Corcoran, C., Mujica-Parodi, L., Printz, D., Gorman, J. M., & Van Heertum, R. (2004). Resting neural activity distinguishes subgroups of schizophrenia patients. *Biological Psychiatry*, 56(12), 931–937. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.09.013>
- Maletic, V., Eramo, A., Gwin, K., Offord, S. J., & Duffy, R. A. (2017). The role of norepinephrine and its α -adrenergic receptors in the pathophysiology and treatment of major depressive disorder and schizophrenia: A systematic Review. *Frontiers in Psychiatry*, 8(MAR). <https://doi.org/10.3389/fpsy.2017.00042>
- Mamelak, M., Chiu, S., & Mishra, R. (1985). Brain adenylate cyclase activity in the amphetamine sensitized rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 9(5–6), 721–724. [https://doi.org/10.1016/0278-5846\(85\)90048-x](https://doi.org/10.1016/0278-5846(85)90048-x)
- Manahan-Vaughan, D., Haebler, D. von, Winter, C., Juckel, G., & Heinemann, U. (2008). A Single Application of MK801 Causes Symptoms of Acute Psychosis, Deficits in Spatial Memory, and Impairment of Synaptic Plasticity in Rats. *Hippocampus*, 18, 125–134. <https://doi.org/10.1002/hipo>
- Manoach, D. S., Gollub, R. L., Benson, E. S., Searl, M. M., Goff, D. C., Halpern, E., Saper, C. B., & Rauch, S. L. (2000). Schizophrenia subjects show fMRI activation of dorsolateral prefrontal cortex and basal ganglia during a working memory task. *Biological Psychiatry*, 48(2), 99–109.
- Manson, C. (2005). *Usage de cannabis et schizophrénie*. Caen.
- Marchisella, F., Coffey, E. T., & Hollos, P. (2016). Microtubule and microtubule associated protein anomalies in psychiatric disease. *Cytoskeleton*, 73(10), 596–611. <https://doi.org/10.1002/cm.21300>
- Marie-Odile Krebs. (2020). *Schizophrénie*. Inserm. <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/schizophrénie>
- Martin, P., Waters, N. R., Waters, S. E., Carlsson, A., & Carlsson, M. L. (1997). MK-801-induced hyperlocomotion: Differential effects of M100907, SDZ PSD 958 and raclopride. *European Journal of Pharmacology*, 335(2–3), 107–116. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(97\)01188-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0014-2999(97)01188-6)
- McDonald-McGinn, D., Sullivan, K. E., Marino, B., Philip, N., Swillen, A., Vorstman, J. A. S., Zackai, E. H., Emanuel, B. S., Vermeesch, J. R., Morrow, B. E., Scambler, P. J., & Basset, A. S. (2017). 22Q11.2 Deletion Syndrome. *Obstetric Imaging: Fetal Diagnosis and Care, 2nd Edition*, 1, 1–19. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44548-1.00154-6>
- McEwen, B. S., De Kloet, E. R., & Rostene, W. (1986). Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiological Reviews*, 66(4), 1121–1188. <https://doi.org/10.1152/physrev.1986.66.4.1121>
- McInnes, L., & Freimer, N. (1995). Mapping genes for psychiatric disorders and behavioral traits. *Curr Opin Genet Dev*, 5(3), 376–381. [https://doi.org/10.1016/0959-437x\(95\)80054-9](https://doi.org/10.1016/0959-437x(95)80054-9)
- McLaughlin, K. A., Colich, N. L., Rodman, A. M., & Weissman, D. G. (2020). Mechanisms linking childhood trauma exposure and psychopathology: A transdiagnostic model of risk and resilience. *BMC Medicine*, 18(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12916-020-01561-6>
- Meltzer, H. Y., Cucchiaro, J., Silva, R., Ogasa, M., Phillips, D., Xu, J., Kalali, A. H., Schweizer, E., Pikalov,

- A., & Loebel, A. (2011). Lurasidone in the treatment of schizophrenia: A randomized, double-blind, placebo- and olanzapine-controlled study. *American Journal of Psychiatry*, *168*(9), 957–967. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2011.10060907>
- Meltzer, H. Y., Share, D. B., Jayathilake, K., Salomon, R. M., & Lee, M. A. (2020). Lurasidone Improves Psychopathology and Cognition in Treatment-Resistant Schizophrenia. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, *40*(3), 240–249. <https://doi.org/10.1097/JCP.0000000000001205>
- Mendizabal, I., Berto, S., Usui, N., Toriumi, K., Chatterjee, P., Douglas, C., Huh, I., Jeong, H., Layman, T., Tamminga, C. A., Preuss, T. M., Konopka, G., & Yi, S. V. (2019). Cell type-specific epigenetic links to schizophrenia risk in the brain. *Genome Biology*, *20*(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1747-7>
- Merenlender-Wagner, A., Pikman, R., Giladi, E., Andrieux, A., & Gozes, I. (2010). NAP (davunetide) enhances cognitive behavior in the STOP heterozygous mouse-A microtubule-deficient model of schizophrenia. *Peptides*, *31*(7), 1368–1373. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.04.011>
- Merenlender-Wagner, A., Shemer, Z., Touloumi, O., Lagoudaki, R., Giladi, E., Andrieux, A., Grigoriadis, N. C., & Gozes, I. (2014). New horizons in schizophrenia treatment: Autophagy protection is coupled with behavioral improvements in a mouse model of schizophrenia. *Autophagy*, *10*(12), 2324–2332. <https://doi.org/10.4161/15548627.2014.984274>
- Meyer-Lindenberg, A. S., Olsen, R. K., Kohn, P. D., Brown, T., Egan, M. F., Weinberger, D. R., & Berman, K. F. (2005). Regionally specific disturbance of dorsolateral prefrontal-hippocampal functional connectivity in schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, *62*(4), 379–386. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.62.4.379>
- Meyer, J. M., Loebel, A. D., & Schweizer, E. (2009). Lurasidone: A new drug in development for schizophrenia. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, *18*(11), 1715–1726. <https://doi.org/10.1517/13543780903286388>
- Millan, M. J., Andrieux, A., Bartzokis, G., Cadenhead, K., Dazzan, P., Fusar-Poli, P., & Kahn, R. (2016). Altering the course of schizophrenia: progress and perspectives. *Nature Reviews Drug Discovery*, *15*(7), 485.
- Millan, Mark J., Andrieux, A., Bartzokis, G., Cadenhead, K., Dazzan, P., Fusar-Poli, P., Gallinat, J., Giedd, J., Grayson, D. R., Heinrichs, M., Kahn, R., Krebs, M. O., Leboyer, M., Lewis, D., Marin, O., Marin, P., Meyer-Lindenberg, A., McGorry, P., McGuire, P., ... Weinberger, D. (2016). Altering the course of schizophrenia: Progress and perspectives. *Nature Reviews Drug Discovery*, *15*(7), 485–515. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.28>
- Miller, B. J., & Goldsmith, D. R. (2019). Inflammatory biomarkers in schizophrenia: Implications for heterogeneity and neurobiology. *Biomarkers in Neuropsychiatry*, *1*(September), 100006. <https://doi.org/10.1016/j.bionps.2019.100006>
- Misiak, B., Stramecki, F., Gawęda, Ł., Prochwicz, K., Sąsiadek, M. M., Moustafa, A. A., & Frydecka, D. (2018). Interactions Between Variation in Candidate Genes and Environmental Factors in the Etiology of Schizophrenia and Bipolar Disorder: a Systematic Review. *Molecular Neurobiology*, *55*(6), 5075–5100. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0708-y>
- Miyamoto, S., Miyake, N., Jarskog, L. F., Fleischhacker, W. W., & Lieberman, J. A. (2012). Pharmacological treatment of schizophrenia: A critical review of the pharmacology and clinical effects of current and future therapeutic agents. *Molecular Psychiatry*, *17*(12), 1206–1227. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.47>
- Mizukami, K., Ishikawa, M., Hidaka, S., Iwakiri, M., Sasaki, M., & Iritani, S. (2002).

- Immunohistochemical localization of GABAB receptor in the entorhinal cortex and inferior temporal cortex of schizophrenic brain. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 26(2), 393–396. [https://doi.org/10.1016/S0278-5846\(01\)00247-0](https://doi.org/10.1016/S0278-5846(01)00247-0)
- Mizukami, K., Sasaki, M., Ishikawa, M., Iwakiri, M., Hidaka, S., Shiraishi, H., & Iritani, S. (2000). Immunohistochemical localization of γ -aminobutyric acid(B) receptor in the hippocampus of subjects with schizophrenia. *Neuroscience Letters*, 283(2), 101–104. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)00939-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(00)00939-3)
- Moran, P., Stokes, J., Marr, J., Bock, G., Desbonnet, L., Waddington, J., & O'Tuathaigh, C. (2016). Gene \times Environment Interactions in Schizophrenia: Evidence from Genetic Mouse Models. *Neural Plasticity*. <https://doi.org/10.1155/2016/2173748>
- Moran, S. P., Maksymetz, J., & Conn, P. J. (2019). Targeting Muscarinic Acetylcholine Receptors for the Treatment of Psychiatric and Neurological Disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, 40(12), 1006–1020. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.10.007>
- Moreno-Jiménez, E. P., Flor-García, M., Terreros-Roncal, J., Rábano, A., Cafini, F., Pallas-Bazarrá, N., Ávila, J., & Llorens-Martín, M. (2019). Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 25(4), 554–560. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0375-9>
- Morgan, C., & Fisher, H. (2007). Environment and schizophrenia: Environmental factors in schizophrenia: Childhood trauma - A critical review. *Schizophrenia Bulletin*, 33(1), 3–10. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbl053>
- Morita, Y., Ujike, H., Tanaka, Y., Otani, K., Kishimoto, M., Morio, A., Kotaka, T., Okahisa, Y., Matsushita, M., Morikawa, A., Hamase, K., Zaito, K., & Kuroda, S. (2007). A Genetic Variant of the Serine Racemase Gene Is Associated with Schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 61(10), 1200–1203. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.07.025>
- Mørkved, N., Johnsen, E., Kroken, R. A., Gjestad, R., Winje, D., Thimm, J., Fathian, F., Rettenbacher, M., Anda, L. G., & Løberg, E. M. (2020). Does childhood trauma influence cognitive functioning in schizophrenia? The association of childhood trauma and cognition in schizophrenia spectrum disorders. *Schizophrenia Research: Cognition*, 21(May), 100179. <https://doi.org/10.1016/j.scog.2020.100179>
- Morris, R. G. M. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation*, 12(2), 239–260. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0023-9690\(81\)90020-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0023-9690(81)90020-5)
- Mortimer, A. M. (1997). Cognitive Function in Schizophrenia— Do Neuroleptics Make a Difference? *Pharmacol Biochem Behav.*, 56(4), 789–795. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(96\)00425-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0091-3057(96)00425-X)
- Moser, P. C., Hitchcock, J. M., Lister, S., & Moran, P. M. (2000). The pharmacology of latent inhibition as an animal model of schizophrenia. *Brain Research Reviews*, 33(2–3), 275–307. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(00\)00026-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0165-0173(00)00026-6)
- Moy, S. S., Nadler, J. J., Young, N. B., Nonneman, R. J., Grossman, A. W., Murphy, D. L., D'Ercole, A. J., Crawley, J. N., Magnuson, T. R., & Lauder, J. M. (2009). Social approach in genetically engineered mouse lines relevant to autism. *Genes, Brain and Behavior*, 8(2), 129–142. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2008.00452.x>
- Murphy, B. P., Chung, Y. C., Park, T. W., & McGorry, P. D. (2006). Pharmacological treatment of primary negative symptoms in schizophrenia: A systematic review. *Schizophrenia Research*, 88, 5–25. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2006.07.002>

- Murrie, B., Lappin, J., Large, M., & Sara, G. (2020). Transition of Substance-Induced, Brief, and Atypical Psychoses to Schizophrenia: A Systematic Review and Meta-analysis. *Schizophrenia Bulletin*, *46*(3), 505–516. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbz102>
- Naatanen, R. (1992). *Attention and brain function* (Hillsdale (ed.)). Erlbaum.
- Nadler, J. J., Moy, S. S., & Dold, G. (2004). Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice. 303–314. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2004.00071.x>
- Nakako, T., Murai, T., Ikejiri, M., Ishiyama, T., Taiji, M., & Ikeda, K. (2013). Effects of a dopamine D1 agonist on ketamine-induced spatial working memory dysfunction in common marmosets. *Behavioural Brain Research*, *249*(109–115). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.04.012>
- Nakazawa, K., Zsiros, V., Jiang, Z., Nakao, K., Kolata, S., Zhang, S., & Belforte, J. E. (2012). GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology. *Neuropharmacology*, *62*(3), 1574–1583. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.022>
- Nelson, M. D., Saykin, A. J., Flashman, L. A., & Riordan, H. J. (1998). Hippocampal volume reduction in schizophrenia as assessed by magnetic resonance imaging: A meta-analytic study. *Archives of General Psychiatry*, *55*(5), 433–440. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.55.5.433>
- Neves, G., Cooke, S. F., & Bliss, T. V. P. (2008). Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: A neural network approach to causality. *Nature Reviews Neuroscience*, *9*(1), 65–75. <https://doi.org/10.1038/nrn2303>
- Nguyen, R., Morrissey, M. D., Mahadevan, V., Cajanding, J. D., Woodin, M. A., Yeomans, J. S., Takehara-Nishiuchi, K., & Kim, J. C. (2014). Parvalbumin and GAD65 interneuron inhibition in the ventral hippocampus induces distinct behavioral deficits relevant to schizophrenia. In *Journal of Neuroscience* (Vol. 34, Issue 45, pp. 14948–14960). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2204-14.2014>
- Ni, P., Tian, Y., Gu, X., Yang, L., Wei, J., Wang, Y., Zhao, L., Zhang, Y., Zhang, C., Li, L., Tang, X., Ma, X., Hu, X., & Li, T. (2019). Plasma neuropeptides as circulating biomarkers of multifactorial schizophrenia. *Comprehensive Psychiatry*, *94*, 152114. <https://doi.org/10.1016/j.comppsy.2019.152114>
- Niculescu, A. B., Segal, D. S., Kuczenski, R., Barrett, T., Hauger, R. L., & Kelsoe, J. R. (2001). Identifying a series of candidate genes for mania and psychosis: A convergent functional genomics approach. *Physiological Genomics*, *2001*(4), 83–91. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.2000.4.1.83>
- Nielsen, S. M., Toftdahl, N. G., Nordentoft, M., & Hjorthoj, C. (2017). Association between alcohol, cannabis, and other illicit substance abuse and risk of developing schizophrenia: A nationwide population based register study. *Psychological Medicine*, *47*(9), 1668–1677. <https://doi.org/10.1017/S0033291717000162>
- Nishi, M., Horii-Hayashi, N., Sasagawa, T., & Matsunaga, W. (2013). Effects of early life stress on brain activity: Implications from maternal separation model in rodents. *General and Comparative Endocrinology*, *181*(1), 306–309. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.09.024>
- Nitta, M., Kishimoto, T., Müller, N., Weiser, M., Davidson, M., Kane, J. M., & Correll, C. U. (2013). Adjunctive use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs for schizophrenia: A meta-analytic investigation of randomized controlled trials. *Schizophrenia Bulletin*, *39*(6), 1230–1241. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbt070>
- Niznikiewicz, M. A., Kubicki, M., & Shenton, M. E. (2003). Recent structural and functional imaging

- findings in schizophrenia. *Current Opinion in Psychiatry*, 16(2), 123–147.
<https://doi.org/10.1097/00001504-200303000-00002>
- Noda, Y., Yamada, K., Furukawa, H., & Nabeshima, T. (1995). Enhancement of immobility in a forced swimming test by subacute or repeated treatment with phencyclidine: a new model of schizophrenia. *British Journal of Pharmacology*, 116(5), 2531–2537.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1995.tb15106.x>
- Oades, R. (1982). Search strategies on a hole-board are impaired in rats with ventral tegmental damage: animal model for tests of thought disorder. *Biol Psychiatry*, 17(2), 243–258.
- Okada, N., Fukunaga, M., Yamashita, F., Koshiyama, D., Yamamori, H., Ohi, K., Yasuda, Y., Fujimoto, M., Watanabe, Y., Yahata, N., Nemoto, K., Hibar, D. P., Van Erp, T. G. M., Fujino, H., Isobe, M., Isomura, S., Natsubori, T., Narita, H., Hashimoto, N., ... Hashimoto, R. (2016). Abnormal asymmetries in subcortical brain volume in schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 21(10), 1460–1466. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.209>
- Olayinka, O., Ojimba, C., Alemu, B., Olaolu, O., Edomias, D., Popoola, O., Kallikkadan, J., Tumenta, T., Gayam, V., Valbrun, L., Olupona, T., & Hershberger, J. (2020). Cannabis Use in Inpatients With Schizophrenia Spectrum Disorders at a Community Hospital. *Journal of Clinical Medicine Research*, 12(4), 243–250. <https://doi.org/10.14740/jocmr4110>
- Oliver, P. L., & Davies, K. E. (2009). Interaction between environmental and genetic factors modulates schizophrenic endophenotypes in the Snap-25 mouse mutant blind-drunk. *Human Molecular Genetics*, 18(23), 4576–4589. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp425>
- OMS. (2014). *Prévention du suicide : l'état d'urgence mondiale*.
<https://doi.org/10.4414/saez.2018.06453>
- Orzi, F., Dow-Edwards, D., Jehle, J., Kennedy, C., & Sokoloff, L. (1983). Comparative effects of acute and chronic administration of caffeine on local cerebral glucose utilization in the conscious rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 3, 154–160.
- Owens, E. M., Bachman, P., Glahn, D. C., & Bearden, C. E. (2016). Electrophysiological Endophenotypes for Schizophrenia. *Harvard Review of Psychiatry*, 24(2), 129–147.
<https://doi.org/10.1097/HRP.0000000000000110>
- Palmer, B. A., Pankratz, V. S., & Bostwick, J. M. (2005). The lifetime risk of suicide in schizophrenia: A reexamination. *Archives of General Psychiatry*, 62(3), 247–253.
<https://doi.org/10.1001/archpsyc.62.3.247>
- Palmer, D. M., Sprang, H. E., & Hans, C. L. (1951). Electroshock therapy in schizophrenia. A statistical survey of 455 cases. *Journal of Nervous and Mental Disease*.
- Pantham, P., Aye, I. L. M. H., & Powell, T. L. (2015). Inflammation in maternal obesity and gestational diabetes mellitus. *Placenta*, 36(7), 709–715. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.04.006>
- Pearce, B., Valadi, N., Po, C., & Miller, A. (2000). Viral infection of developing GABAergic neurons in a model of hippocampal disinhibition. *Neuroreport*, 11(11), 2433–2438.
<https://doi.org/10.1097/00001756-200008030-00019>
- Pedersen, C. S., Sørensen, B. D., Parachikova, A. I., & Plath, N. (2014). PCP-induced deficits in murine nest building activity: Employment of an ethological rodent behavior to mimic negative-like symptoms of schizophrenia. *Behavioural Brain Research*, 273, 63–72.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.023>
- Peleh, T., Bai, X., Kas, M. J. H., & Hengerer, B. (2019). RFID-supported video tracking for automated

- analysis of social behaviour in groups of mice. *Journal of Neuroscience Methods*, 325(April), 108323. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2019.108323>
- Perceley, S., Since, M., Lagadu, S., Freret, T., Bouet, V., & Boulouard, M. (2020). Antipsychotic lurasidone: Behavioural and pharmacokinetic data in C57BL/6 mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 194(April), 172933. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2020.172933>
- Pérez-Iglesias, R., Tordesillas-Gutiérrez, D., Barker, G. J., McGuire, P. K., Roiz-Santiañez, R., Mata, I., de Lucas, E. M., Quintana, F., Vazquez-Barquero, J. L., & Crespo-Facorro, B. (2010). White matter defects in first episode psychosis patients: A voxelwise analysis of diffusion tensor imaging. *NeuroImage*, 49(1), 199–204. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.07.016>
- Peters, B. D., De Haan, L., Dekker, N., Blaas, J., Becker, H. E., Dingemans, P. M., Akkerman, E. M., Majoie, C. B., Van Amelsvoort, T., Den Heeten, G. J., & Linszen, D. H. (2008). White matter fibertracking in first-episode schizophrenia, schizoaffective patients and subjects at ultra-high risk of psychosis. *Neuropsychobiology*, 58(1), 19–28. <https://doi.org/10.1159/000154476>
- Peters, S. M., Pothuizen, H. H. J., & Spruijt, B. M. (2015). Ethological concepts enhance the translational value of animal models. *European Journal of Pharmacology*, 759, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.043>
- Pieper, A. A., Wu, X., Han, T. W., Estill, S. J., Dang, Q., Wu, L. C., Reece-Fincanon, S., Dudley, C. A., Richardson, J. A., Brat, D. J., & McKnight, S. L. (2005). The neuronal PAS domain protein 3 transcription factor controls FGF-mediated adult hippocampal neurogenesis in mice. *PNAS*, 102(39), 14052–14057. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506713102>
- Piontkewitz, Y., Arad, M., & Weiner, I. (2012). Tracing the development of psychosis and its prevention: What can be learned from animal models. In *Neuropharmacology* (Vol. 62, Issue 3, pp. 1273–1289). <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.04.019>
- Poirier-Littré, M. F. (1992). Use of pharmacological data in the choice of antipsychotic drugs. *Encephale.*, 3, 459–466.
- Popovic, D., Schmitt, A., Kaurani, L., Senner, F., Papiol, S., Malchow, B., Fischer, A., Schulze, T. G., Koutsouleris, N., & Falkai, P. (2019). Childhood Trauma in Schizophrenia: Current Findings and Research Perspectives. *Frontiers in Neuroscience*, 13(March), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00274>
- Potasiewicz, A., Nikiforuk, A., Hołuj, M., & Popik, P. (2017). Stimulation of nicotinic acetylcholine alpha7 receptors rescue schizophrenia-like cognitive impairments in rats. *Journal of Psychopharmacology*, 31(2), 260–271. <https://doi.org/10.1177/0269881116675509>
- Poulet, E., Haesebaert, F., Saoud, M., Suaud-Chagny, M. F., & Brunelin, J. (2010). Treatment of schizophrenic patients and rTMS. *Psychiatria Danubina*, 22(SUPPL. 1), 143–146.
- Powell, K., Hori, S., Leslie, R., Andrieux, A., Schellinck, H., Thorne, M., & Robertson, G. (2007). Cognitive impairments in the STOP null mouse model of schizophrenia. *Behavioral Neuroscience*, 121(5), 826–835. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.121.5.826>
- Powell, S. B., Zhou, X., & Geyer, M. A. (2009). Prepulse inhibition and genetic mouse models of schizophrenia. *Behavioural Brain Research*, 204(2), 282–294. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.04.021>
- Pozzi, L., Dorocic, I. P., Wang, X., Carlén, M., & Meletis, K. (2014). Mice lacking NMDA receptors in parvalbumin neurons display normal depression-related behavior and response to antidepressant action of NMDAR antagonists. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083879>

- Pradhan, S. N. (1984). Phencyclidine (PCP): Some human studies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 8(4), 493–501. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(84\)90006-X](https://doi.org/10.1016/0149-7634(84)90006-X)
- Pratt, J. A., Winchester, C., Egerton, A., Cochran, S. M., & Morris, B. J. (2008). Modelling prefrontal cortex deficits in schizophrenia: Implications for treatment. *British Journal of Pharmacology*, 153(SUPPL. 1), 465–470. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.24>
- Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. *European Journal of Pharmacology*, 463(1–3), 3–33. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01272-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X)
- Pugliese, V., Bruni, A., Carbone, E. A., Calabrò, G., Cerminara, G., Sampogna, G., Luciano, M., Steardo, L., Fiorillo, A., Garcia, C. S., & De Fazio, P. (2019). Maternal stress, prenatal medical illnesses and obstetric complications: Risk factors for schizophrenia spectrum disorder, bipolar disorder and major depressive disorder. *Psychiatry Research*, 271(November 2018), 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2018.11.023>
- Quattrone, D., Ferraro, L., Tripoli, G., La Cascia, C., Quigley, H., Quattrone, A., Jongsma, H. E., Del Peschio, S., Gatto, G., Gayer-Anderson, C., Jones, P. B., Kirkbride, J. B., La Barbera, D., Tarricone, I., Berardi, D., Tosato, S., Lasalvia, A., Szöke, A., Arango, C., ... Di Forti, M. (2020). Daily use of high-potency cannabis is associated with more positive symptoms in first-episode psychosis patients: The EU-GEI case-control study. *Psychological Medicine*. <https://doi.org/10.1017/S0033291720000082>
- Quigley, H., & MacCabe, J. H. (2019). The relationship between nicotine and psychosis. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, 9, 204512531985996. <https://doi.org/10.1177/2045125319859969>
- Raedler, T. J., Bymaster, F. P., Tandon, R., Copolov, D., & Dean, B. (2007). Towards a muscarinic hypothesis of schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 12(3), 232–246. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001924>
- Raevskii, K., Aleksandrovskii, I., Poiurovskii, M., Kharlamov, A., & Neznamov, G. (1985). Anxiolytic action of sodium valproate (possible role of gamma-aminobutyric acid in affective disorders). *Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova*, 85(4), 574–579.
- Rajagopal, L., Burgdorf, J. S., Moskal, J. R., & Meltzer, H. Y. (2016). GLYX-13 (rapastinel) ameliorates subchronic phencyclidine- and ketamine-induced declarative memory deficits in mice. 299, 105–110.
- Rajagopal, L., Massey, B. W., Michael, E., & Meltzer, H. Y. (2016). Serotonin (5-HT)_{1A} receptor agonism and 5-HT₇ receptor antagonism ameliorate the subchronic phencyclidine-induced deficit in executive functioning in mice. *Psychopharmacology*, 233(4), 649–660. <https://doi.org/10.1007/s00213-015-4137-1>
- Rajakumar, G., Naas, F., Johnson, R., Chiu, S., Yu, K., & Mishra, R. (1987). Down-regulation of haloperidol-induced striatal dopamine receptor supersensitivity by active analogues of L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (PLG). *Peptides*, 8(5), 855–861. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(87\)90072-6](https://doi.org/10.1016/0196-9781(87)90072-6)
- Read, J., Van Os, J., Morrison, A. P., & Ross, C. A. (2005). Childhood trauma, psychosis and schizophrenia: A literature review with theoretical and clinical implications. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 112(5), 330–350. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.2005.00634.x>
- Reichenberg, A., Gross, R., Weiser, M., Bresnahan, M., Silverman, J., Harlap, S., Rabinowitz, J., Shulman, C., Malaspina, D., Lubin, G., Knobler, H. Y., Davidson, M., & Susser, E. (2012).

- Advancing Paternal Age and Autism. *Arch Gen Psychiatry*, 63, 1026–1032.
- Renard, J., Krebs, M. O., Le Pen, G., & Jay, T. M. (2014). Long-term consequences of adolescent cannabinoid exposure in adult psychopathology. *Frontiers in Neuroscience*, 8(OCT), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00361>
- Ridley, R., Baker, H., & Scraggs, P. (1979). The time course of the behavioral effects of amphetamine and their reversal by haloperidol in a primate species. *Biol Psychiatry*, 14(5), 753–765.
- Robert, A., & King, M. (1988). Neurodevelopmental model of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, 45(11), 1051–1054.
- Roberts, L., & Greene, J. R. T. (2003). Post-weaning social isolation of rats leads to a diminution of LTP in the CA1 to subiculum pathway. *Brain Research*, 991(1–2), 271–273. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.08.022>
- Robinson, T. E., & Becker, J. B. (1986). Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: A review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Research Reviews*, 11(2), 157–198. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(86\)90002-0](https://doi.org/10.1016/0165-0173(86)90002-0)
- Rodríguez, B., Nani, J. V., Almeida, P. G. C., Brietzke, E., Lee, R. S., & Hayashi, M. A. F. (2020). Neuropeptides and oligopeptidases in schizophrenia. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 108(November 2019), 679–693. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.11.024>
- Rosenfeld, P., Wetmore, J. B., & Levine, S. (1992). Effects of repeated maternal separations on the adrenocortical response to stress of preweaning rats. *Physiology and Behavior*, 52(4), 787–791. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(92\)90415-X](https://doi.org/10.1016/0031-9384(92)90415-X)
- Rosenman, S., & Rodgers, B. (2004). Childhood adversity in an Australian population. *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology*, 39(9), 695–702. <https://doi.org/10.1007/s00127-004-0802-0>
- Rots, N. Y., De Jong, J., Workel, J. O., Levine, S., Cools, A. R., & De Kloet, E. R. (1996). Neonatal maternally deprived rats have as adults elevated basal pituitary-adrenal activity and enhanced susceptibility to apomorphine. *Journal of Neuroendocrinology*, 8(7), 501–506. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.1996.04843.x>
- Royer, C., Delcroix, N., Leroux, E., Alary, M., Razafimandimby, A., Brazo, P., Delamillieure, P., & Dollfus, S. (2015). Functional and structural brain asymmetries in patients with schizophrenia and bipolar disorders. *Schizophrenia Research*, 161(2–3), 210–214. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2014.11.014>
- Rubino, T., & Parolaro, D. (2014). Cannabis abuse in adolescence and the risk of psychosis: A brief review of the preclinical evidence. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 52, 41–44. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.07.020>
- Rubino, Tiziana, & Parolaro, D. (2016). The impact of exposure to cannabinoids in adolescence: Insights from animal models. *Biological Psychiatry*, 79(7), 578–585. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.07.024>
- Rubino, Tiziana, Realini, N., Braida, D., Guidi, S., Capurro, V., Viganò, D., Guidali, C., Pinter, M., Sala, M., Bartesaghi, R., & Parolaro, D. (2009). Changes in hippocampal morphology and neuroplasticity induced by adolescent THC treatment are associated with cognitive impairment in adulthood. *Hippocampus*, 19(8), 763–772. <https://doi.org/10.1002/hipo.20554>
- Rueter, L. E., Ballard, M. E., Gallagher, K. B., Basso, A. M., Curzon, P., & Kohlhaas, K. L. (2004). Chronic

- low dose risperidone and clozapine alleviate positive but not negative symptoms in the rat neonatal ventral hippocampal lesion model of schizophrenia. *Psychopharmacology*, 176(3–4), 312–319. <https://doi.org/10.1007/s00213-004-1897-4>
- Saito, J., Hori, M., Nemoto, T., Katagiri, N., Shimoji, K., Ito, S., Tsujino, N., Yamaguchi, T., Shiraga, N., Aoki, S., & Mizuno, M. (2017). Longitudinal study examining abnormal white matter integrity using a tract-specific analysis in individuals with a high risk for psychosis. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 71(8), 530–541. <https://doi.org/10.1111/pcn.12515>
- Sams-Dodd, F. (1998). Effects of diazepam, citalopram, methadone and naloxone on PCP-induced stereotyped behaviour and social isolation in the rat social interaction test. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 23(2), 287–293. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(98\)00030-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0149-7634(98)00030-X)
- Satz, P., & Green, M. F. (1999). Atypical handedness in schizophrenia: Some methodological and theoretical issues. *Schizophrenia Bulletin*, 25(1), 63–78. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.schbul.a033367>
- Scheibel, A. B., & Conrad, A. S. (1993). Hippocampal dysgenesis in mutant mouse and schizophrenic man: Is there a relationship? *Schizophrenia Bulletin*, 19(1), 21–33. <https://doi.org/10.1093/schbul/19.1.21>
- Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomic. (2014). Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*, 511(7510), 421–427. <https://doi.org/10.1038/nature13595>
- Schloss, P., & Lau, T. (2012). STOP-in the name of mood: Microtubule-associated proteins in mood and cognition. *Journal of Neurochemistry*, 121(1), 1–3. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07614.x>
- Schmajuk, N., Christiansen, B., & Cox, L. (2000). Haloperidol reinstates latent inhibition impaired by hippocampal lesions: data and theory. *Behav Neurosci.*, 114(4), 659–670. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.114.4.659>
- Schmidt, A., Lenz, C., Smieskova, R., Harrisberger, F., Walter, A., Riecher-Rössler, A., Simon, A., Lang, U. E., McGuire, P., Fusar-Poli, P., & Borgwardt, S. J. (2015). Brain Diffusion Changes in Emerging Psychosis and the Impact of State-Dependent Psychopathology. *NeuroSignals*, 23(1), 71–83. <https://doi.org/10.1159/000442605>
- Schmidt, C. J., Somalia, P. K., Hanson, G. R., Peat, M. A., & Gibb, J. W. (1985). Methamphetamine-Induced Depression of Monoamine Synthesis in the Rat: Development of Tolerance. *J Neurochem.*, 44(3), 852–855. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1985.tb12893.x>
- Schmidt, M. J., & Mirnics, K. (2015). Neurodevelopment, GABA System Dysfunction, and Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology R*, 40, 190–206. <https://doi.org/doi:10.1038/npp.2014.95>
- Schobel, S. A., Chaudhury, N. H., Khan, U. A., Paniagua, B., Styner, M. A., Asllani, I., Inbar, B. P., Corcoran, C. M., Lieberman, J. A., Moore, H., & Small, S. A. (2013). Imaging Patients with Psychosis and a Mouse Model Establishes a Spreading Pattern of Hippocampal Dysfunction and Implicates Glutamate as a Driver. *Neuron*, 78(1), 81–93. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.02.011>
- Schoenfeld, T. J., & Cameron, H. A. (2015). Adult neurogenesis and mental illness. *Neuropsychopharmacology*, 40(1), 113–128. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.230>
- Schultz, S. H., North, S. W., & Shields, C. G. (2007). Schizophrenia: A review. *American Family*

Physician, 75(12), 1821–1829.

- Schwartz, T. L., Sachdeva, S., & Stahl, S. M. (2012). Glutamate neurocircuitry: Theoretical underpinnings in: Schizophrenia. *Frontiers in Pharmacology*, 3 NOV(November), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00195>
- Sciortino, D., Pigoni, A., Delvecchio, G., Maggioni, E., Schiena, G., & Brambilla, P. (2021). Role of rTMS in the treatment of cognitive impairments in Bipolar Disorder and Schizophrenia: a review of Randomized Controlled Trials. *Journal of Affective Disorders*, 280(PA), 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2020.11.001>
- Seeman, M. V. (2019). Does Gender Influence Outcome in Schizophrenia? *Psychiatric Quarterly*, 90(1), 173–184. <https://doi.org/10.1007/s11126-018-9619-y>
- Selten, J. P., Van Der Ven, E., & Termorshuizen, F. (2019). Migration and psychosis: A meta-analysis of incidence studies. *Psychological Medicine*, 50(2), 303–313. <https://doi.org/10.1017/S0033291719000035>
- Serpa, M. H., Doshi, J., Erus, G., Chaim-Avancini, T. M., Cavallet, M., Van De Bilt, M. T., Sallet, P. C., Gattaz, W. F., Davatzikos, C., Busatto, G. F., & Zanetti, M. V. (2017). State-dependent microstructural white matter changes in drug-naïve patients with first-episode psychosis. *Psychological Medicine*, 47(15), 2613–2627. <https://doi.org/10.1017/S0033291717001015>
- Sestakova, N., Puzserova, A., Kluknavsky, M., & Bernatova, I. (2013). Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: Methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdisciplinary Toxicology*, 6(3), 126–135. <https://doi.org/10.2478/intox-2013-0020>
- Sheitman, B. B., & Lieberman, J. A. (1998). The natural history and pathophysiology of treatment resistant schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*, 32(3–4), 143–150. [https://doi.org/10.1016/S0022-3956\(97\)00052-6](https://doi.org/10.1016/S0022-3956(97)00052-6)
- Shi, L., Fatemi, S. H., Sidwell, R. W., & Patterson, P. H. (2003). Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring. *Journal of Neuroscience*, 23(1), 297–302. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-01-00297.2003>
- Shimizu, H., Iwayama, Y., Yamada, K., Toyota, T., Minabe, Y., Nakamura, K., Nakajima, M., Hattori, E., Mori, N., Osumi, N., & Yoshikawa, T. (2006). Genetic and expression analyses of the STOP (MAP6) gene in schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 84(2–3), 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2006.03.017>
- Simola, N., & Granon, S. (2019). Ultrasonic vocalizations as a tool in studying emotional states in rodent models of social behavior and brain disease. *Neuropharmacology*, 159(November 2018), 107420. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.11.008>
- Since, M., Freret, T., Nee, G., Terme, T., Vanelle, P., & Boulouard, M. (2013). New orally effective 3-(2-nitro)phenylpropanamide analgesic derivatives: Synthesis and antinociceptive evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 69, 728–734. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.08.041>
- Skåtun, K. C., Kaufmann, T., Brandt, C. L., Doan, N. T., Alnæs, D., Tønnesen, S., Biele, G., Vaskinn, A., Melle, I., Agartz, I., Andreassen, O. A., & Westlye, L. T. (2018). Thalamo-cortical functional connectivity in schizophrenia and bipolar disorder. *Brain Imaging and Behavior*, 12(3), 640–652. <https://doi.org/10.1007/s11682-017-9714-y>
- Skudlarski, P., Jagannathan, K., Anderson, K., Stevens, M. C., Calhoun, V. D., Skudlarska, B. A., & Pearlson, G. (2010). Brain Connectivity Is Not Only Lower but Different in Schizophrenia: A Combined Anatomical and Functional Approach. *Biological Psychiatry*, 68(1), 61–69.

<https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2010.03.035>

- Smeland, O. B., Frei, O., Dale, A. M., & Andreassen, O. A. (2020). The polygenic architecture of schizophrenia — rethinking pathogenesis and nosology. *Nature Reviews Neurology*, *16*(7), 366–379. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-0364-0>
- Smith, A., Kaufman, F., Sandy, M. S., & Cardenas, A. (2020). Cannabis Exposure During Critical Windows of Development: Epigenetic and Molecular Pathways Implicated in Neuropsychiatric Disease. *Current Environmental Health Reports*. <https://doi.org/10.1007/s40572-020-00275-4>
- Sokoloff, L., Reivich, M., Kennedy, C., Rosiers, M. H. D., Patlak, C. S., Pettigrew, K. D., Sakurada, O., & Shinohara, M. (1977). The [14C]Deoxyglucose Method for the Measurement of Local Cerebral Glucose Utilization: Theory, Procedure, and Normal Values in the Conscious and Anesthetized Albino Rat. *Journal of Neurochemistry*, *28*(5), 897–916. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1977.tb10649.x>
- Solbrig, M. V., Koob, G. F., Parsons, L. H., Kadota, T., Horscroft, N., Briese, T., & Lipkin, W. I. (2000). Neurotrophic factor expression after CNS viral injury produces enhanced sensitivity to psychostimulants: potential mechanism for addiction vulnerability. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *20*(21), 1–6. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-21-j0002.2000>
- Solmi, F., Lewis, G., Zammit, S., & Kirkbride, J. B. (2020). Neighborhood Characteristics at Birth and Positive and Negative Psychotic Symptoms in Adolescence: Findings from the ALSPAC Birth Cohort. *Schizophrenia Bulletin*, *46*(3), 581–591. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbz049>
- Sørensen, H. J., Mortensen, E. L., Reinisch, J. M., & Mednick, S. A. (2004). Association between prenatal exposure to analgesics and risk of schizophrenia. *British Journal of Psychiatry*, *185*(NOV.), 366–371. <https://doi.org/10.1192/bjp.185.5.366>
- Sorrells, S. F., Paredes, M. F., Cebrian-silla, A., Qi, D., Kelley, K. W., James, D., Mayer, S., Chang, J., Auguste, K. I., Chang, E., Martin, A. J. G., Kriegstein, A. R., Mathern, G. W., Oldham, M. C., Huang, E. J., Garcia-verdugo, J. M., Yang, Z., & Alvarez-buylla, A. (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply. *Nature*, *555*(7696), 377–381. <https://doi.org/10.1038/nature25975.Human>
- Stephan-Otto, C., Lombardini, F., Núñez, C., Senior, C., Ochoa, S., Usall, J., & Brébion, G. (2020). Fluctuating asymmetry in patients with schizophrenia is related to hallucinations and thought disorganisation. *Psychiatry Research*, *285*(January), 112816. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2020.112816>
- Steullet, P., Cabungcal, J. H., Coyle, J., Didriksen, M., Gill, K., Grace, A. A., Hensch, T. K., Lamantia, A. S., Lindemann, L., Maynard, T. M., Meyer, U., Morishita, H., O'Donnell, P., Puhl, M., Cuenod, M., & Do, K. Q. (2017). Oxidative stress-driven parvalbumin interneuron impairment as a common mechanism in models of schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, *22*(7), 936–943. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.47>
- Stevens, J. R. (2002). Schizophrenia: Reproductive hormones and the brain. *American Journal of Psychiatry*, *159*(5), 713–719. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.159.5.713>
- Stille, G., & Sayers, A. (1975). The problem of animal models for psychiatric conditions, as illustrated by the immobilization reaction (catalepsy) in the rat (author's transl). *Pharmakopsychiatr Neuropsychopharmakol*, *8*(3), 105–114. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1094448>
- Stilo, S. A., & Murray, R. M. (2019). Non-Genetic Factors in Schizophrenia. *Current Psychiatry Reports*, *21*(10), 100.

- Strupp, H. (1978). Psychotherapy research and practice: An overview. In N. Y. J. W. & Sons (Ed.), *Handbook of psychotherapy and behavior change* (In SL Garf, pp. 3–22).
- Stukalin, Y., & Einat, H. (2019). Analyzing test batteries in animal models of psychopathology with multivariate analysis of variance (MANOVA): One possible approach to increase external validity. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *178*(October 2017), 51–55. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2017.11.003>
- Sudilovsky, A. (1975). Effects of disulfiram on the amphetamine-induced behavioral syndrome in the cat as a model of psychosis. *Natl Inst Drug Abuse Res Monogr Ser.*, *3*, 109–135. <https://doi.org/DOI: 10.1037/e467662004-001>
- Suemaru, K., Kohnomi, S., Umeda, K., & Araki, H. (2008). Evaluation of antipsychotic and relative drugs using disruption of prepulse inhibition as an animal model for schizophrenia. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*, *28*(3), 121–126.
- Sultana, R., & Lee, C. C. (2020). Expression of Behavioral Phenotypes in Genetic and Environmental Mouse Models of Schizophrenia. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *14*(February), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.00029>
- Sun, L., Min, L., Zhou, H., Li, M., Shao, F., & Wang, W. (2017). Adolescent social isolation affects schizophrenia-like behavior and astrocyte biomarkers in the PFC of adult rats. *Behavioural Brain Research*, *333*(16), 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.07.011>
- Susser, E., Clair, D. S., & He, L. (2008). Latent effects of prenatal malnutrition on adult health: The example of schizophrenia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1136*, 185–192. <https://doi.org/10.1196/annals.1425.024>
- Swerdlow, N., Braff, D., Taaid, N., & Geyer, M. (1994). Assessing the validity of an animal model of deficient sensorimotor gating in schizophrenic patients. *Arch Gen Psychiatry.*, *51*(2), 139–154. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1994.03950020063007>
- Swerdlow, N., Lipska, B., Weinberger, D., Braff, D., Jaskiw, G., & Geyer, M. (1995). Increased sensitivity to the sensorimotor gating-disruptive effects of apomorphine after lesions of medial prefrontal cortex or ventral hippocampus in adult rats. *Psychopharmacology (Berl.)*, *122*(1), 27–34. <https://doi.org/10.1007/bf02246438>
- Swerdlow, N., Taaid, N., Oostwegel, J., Randolph, E., & Geyer, M. (1998). Towards a cross-species pharmacology of sensorimotor gating: effects of amantadine, bromocriptine, pergolide and ropinirole on prepulse inhibition of acoustic startle in rats. *Behav Pharmacol.*, *5*(5–6), 389–396. <https://doi.org/10.1097/00008877-199809000-00002>
- Szeszko, P. R., Robinson, D. G., Ikuta, T., Peters, B. D., Gallego, J. A., Kane, J., & Malhotra, A. K. (2014). White matter changes associated with antipsychotic treatment in first-episode psychosis. *Neuropsychopharmacology*, *39*(6), 1324–1331. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.288>
- Szöke, A., Pignon, B., & Schürhoff, F. (2019). Schizophrenia risk factors in exceptional achievers: a re-analysis of a 60-year-old database. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37484-9>
- Takeuchi, T., Okumura, Y., & Ichikura, K. (2020). Alcohol Consumption or Excessive Use of Psychotropic Medication Prior to Suicidal Self-injury in Patients with Adjustment Disorder, Depression, and Schizophrenia: A Cross-sectional Study. *Acta Medica Okayama*, *74*(1), 49–52. <https://doi.org/10.18926/AMO/57952>
- Talati, P., Rane, S., Kose, S., Blackford, J. U., Gore, J., Donahue, M. J., & Heckers, S. (2014). Increased hippocampal CA1 cerebral blood volume in schizophrenia. *NeuroImage: Clinical*, *5*, 359–364.

<https://doi.org/10.1016/j.nicl.2014.07.004>

- Tamminga, C. A., Stan, A. D., & Wagner, A. D. (2010). The Hippocampal Formation in Schizophrenia. *Am J Psychiatry*, *10*(167), 1178–1193. <https://doi.org/10.1109/EPEC.2015.7379984>
- Tandon, R. (2002). Safety and tolerability: How do newer generation “atypical” antipsychotics compare? *Psychiatric Quarterly*, *73*(4), 297–311. <https://doi.org/10.1023/A:1020464017021>
- Tao, R., Li, C., Jaffe, A. E., Shin, J. H., Deep-Soboslay, A., Yamin, R., Weinberger, D. R., Hyde, T. M., & Kleinman, J. E. (2020). Cannabinoid receptor CNR1 expression and DNA methylation in human prefrontal cortex, hippocampus and caudate in brain development and schizophrenia. *Translational Psychiatry*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41398-020-0832-8>
- Tian, Y., Yang, J., Lei, Y., Zhang, Z., Dai, Z., Chen, X., Lui, F., Zhang, J., & Ling, S. (2016). Neonatal ventral hippocampus lesion changes nuclear restricted protein/brain (NRP/B) expression in hippocampus, cortex and striatum in developmental periods of rats. *Neuroscience*, *319*, 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.01.037>
- Tiedtke, P., Bischoff, C., & Schmidt, W. (1990). MK-801-induced stereotypy and its antagonism by neuroleptic drugs. *J Neural Transm Gen Sect*, *81*(3), 173–182. <https://doi.org/10.1007/bf01245040>
- Tizabi, Y. (2007). Nicotine and nicotinic system in hypoglutamatergic models of schizophrenia. *Neurotoxicity Research*, *12*, 233–246. <https://doi.org/10.1007/bf03033907>
- Toro, C. T., & Deakin, J. F. W. (2007). Adult neurogenesis and schizophrenia: A window on abnormal early brain development? *Schizophrenia Research*, *90*(1–3), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2006.09.030>
- Torrey, E. F., & Yolken, R. H. (2017). Schizophrenia and Infections: The Eyes Have It. *Schizophrenia Bulletin*, *43*(2), 247–252. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbw113>
- Tregellas, J. R., Ellis, J., Shatti, S., Du, Y. P., & Rojas, D. C. (2009). Increased Hippocampal, Thalamic, and prefrontal hemodynamic response to an urban noise Stimulus in Schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*, *166*(3), 354–360. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2008.08030411>
- Tréhou, M., Leroux, E., Delcroix, N., & Dollfus, S. (2017). Relationships between corpus callosum and language lateralization in patients with schizophrenia and bipolar disorders. *Bipolar Disorders*, *19*(6), 496–504. <https://doi.org/10.1111/bdi.12526>
- Tremolizzo, L., Carboni, G., Ruzicka, W. B., Mitchell, C. P., Sugaya, I., Tueting, P., Sharma, R., Grayson, D. R., Costa, E., & Guidotti, A. (2002). An epigenetic mouse model for molecular and behavioral neuropathologies related to schizophrenia vulnerability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(26), 17095–17100. <https://doi.org/10.1073/pnas.262658999>
- Tremolizzo, Lucio, Doueiri, M. S., Dong, E., Grayson, D. R., Davis, J., Pinna, G., Tueting, P., Rodriguez-Menendez, V., Costa, E., & Guidotti, A. (2005). Valproate corrects the schizophrenia-like epigenetic behavioral modifications induced by methionine in mice. *Biological Psychiatry*, *57*(5), 500–509. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.11.046>
- Trépanier, M. O., Hopperton, K. E., Mizrahi, R., Mechawar, N., & Bazinet, R. P. (2016). Postmortem evidence of cerebral inflammation in schizophrenia: A systematic review. *Molecular Psychiatry*, *21*(8), 1009–1026. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.90>
- Tsuang, M. T., Stone, W. S., & Faraone, S. V. (1999). Schizophrenia: A review of genetic studies. *Harvard Review of Psychiatry*, *7*(4), 185–207. <https://doi.org/10.1093/hrp/7.4.185>

- Tsukada, T., Shimada, H., Sakata-Haga, H., Iizuka, H., & Hatta, T. (2019). Molecular mechanisms underlying the models of neurodevelopmental disorders in maternal immune activation relevant to the placenta. *Congenital Anomalies*, *59*(3), 81–87. <https://doi.org/10.1111/cga.12323>
- Valsamis, B., & Schmid, S. (2011). Habituation and Prepulse Inhibition of Acoustic Startle in Rodents. *Journal of Visualized Experiments*, September, 2–11. <https://doi.org/10.3791/3446>
- Van Dijk, D., Koeter, M. W. J., Hijman, R., Kahn, R. S., & Van den Brink, W. (2012). Effect of cannabis use on the course of schizophrenia in male patients: A prospective cohort study. *Schizophrenia Research*, *137*(1–3), 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2012.01.016>
- Van Etten, E., & Mathieu, C. (2005). Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: Basic concepts. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *97*(1–2), 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2005.06.002>
- Vancampfort, D., Rosenbaum, S., Ward, P. B., & Stubbs, B. (2015). Exercise improves cardiorespiratory fitness in people with schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. *Schizophrenia Research*, *169*(1–3), 453–457. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2015.09.029>
- Verdoux, H. (2004). Perinatal risk factors for schizophrenia: How specific are they? *Current Psychiatry Reports*, *6*(3), 162–167. <https://doi.org/10.1007/s11920-004-0060-6>
- Vilkov, G., Minoranskaia, A., & Kolmakova, T. (1983). Changes in catecholamine metabolism in the brains of rabbits after treatment with anti-brain antibodies and lithium ions. *Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova*, *83*(9), 1395–1398.
- Vita, A., De Peri, L., Deste, G., & Sacchetti, E. (2012). Progressive loss of cortical gray matter in schizophrenia: A meta-analysis and meta-regression of longitudinal MRI studies. *Translational Psychiatry*, *2*(October), 1–13. <https://doi.org/10.1038/tp.2012.116>
- Vitolo, E., Tatu, M. K., Pignolo, C., Cauda, F., Costa, T., Ando, A., & Zennaro, A. (2017). White matter and schizophrenia: A meta-analysis of voxel-based morphometry and diffusion tensor imaging studies. *Psychiatry Research - Neuroimaging*, *270*(February), 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2017.09.014>
- Vogel-Ciernia, A., & Wood, M. A. (2014). Examining object location and object recognition memory in mice. *Current Protocols in Neuroscience*, *2014*(October), 8.31.1-8.31.17. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0831s69>
- Volkow, N. D. (2009). Substance use disorders in Schizophrenia - Clinical implications of comorbidity. *Schizophrenia Bulletin*, *35*(3), 469–472. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbp016>
- Volle, J., Brocard, J., Saoud, M., Gory-Faure, S., Brunelin, J., Andrieux, A., & Suaud-Chagny, M. F. (2013). Reduced expression of STOP/MAP6 in mice leads to cognitive deficits. *Schizophrenia Bulletin*, *39*(5), 969–978. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbs113>
- Von Hausswolff-Juhlin, Y., Bjartveit, M., Lindström, E., & Jones, P. (2009). Schizophrenia and physical health problems. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, *119*(SUPPL. 438), 15–21. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.2008.01309.x>
- Vorstman, J. A. S., Olde Loohuis, L. M., Kahn, R. S., & Ophoff, R. A. (2018). Double hits in schizophrenia. *Human Molecular Genetics*, *27*(15), 2755–2761. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy175>
- Wan, F., Geyer, M., & Swerdlow, N. (1995). Presynaptic dopamine-glutamate interactions in the nucleus accumbens regulate sensorimotor gating. *Psychopharmacology (Berl)*1995, *120*(4),

433–441. <https://doi.org/10.1007/bf02245815>

- Weinberger, D. (1987). Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, *44*(7), 660–669. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1987.01800190080012>
- Weiner, I, Lubow, R., & Feldon, J. (1984). Abolition of the expression but not the acquisition of latent inhibition by chronic amphetamine in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *83*(2), 194–199. <https://doi.org/10.1007/bf00429734>
- Weiner, Ina. (2003). The “two-headed” latent inhibition model of schizophrenia: Modeling positive and negative symptoms and their treatment. *Psychopharmacology*, *169*(3–4), 257–297. <https://doi.org/10.1007/s00213-002-1313-x>
- Weiner, Ina, Shadach, E., Tarrasch, R., Kidron, R., & Feldon, J. (1996). The latent inhibition model of schizophrenia: Further validation using the atypical neuroleptic, clozapine. *Biological Psychiatry*, *40*(9), 834–843. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-3223\(95\)00573-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-3223(95)00573-0)
- Weiser, M., Fenchel, D., Frenkel, O., Fruchter, E., Burshtein, S., Yehuda, A. Ben, Yoffe, R., Bergman-Levi, T., Reichenberg, A., Davidson, M., & Sandin, S. (2020). Understanding the association between advanced paternal age and schizophrenia and bipolar disorder. *Psychological Medicine*, *50*(3), 431–437. <https://doi.org/10.1017/S0033291719000242>
- Whishaw, I., & Tomie, J. (1996). Of Mice and Mazes: Similarities Between Mice and Rats on Dry Land But Not Water Mazes. *Physiology & Behavior*, *60*(5), 1191–1197. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(96\)00176-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(96)00176-X)
- Wilson, C., & Terry, A. V. (2010). Neurodevelopmental animal models of schizophrenia: Role in novel drug discovery and development. *Clinical Schizophrenia and Related Psychoses*, *4*(2), 124–137. <https://doi.org/10.3371/CSRP.4.2.4>
- Winship, I. R., Dursun, S. M., Baker, G. B., Balista, P. A., Kandratavicius, L., Maia-de-Oliveira, J. P., Hallak, J., & Howland, J. G. (2019). An Overview of Animal Models Related to Schizophrenia. *Canadian Journal of Psychiatry*, *64*(1), 5–17. <https://doi.org/10.1177/0706743718773728>
- Winter, C., Reutiman, T., Folsom, T., Sohr, R., Wolf, R., Juckel, G., & Fatemi, S. (2008). Dopamine and serotonin levels following prenatal viral infection in mouse--implications for psychiatric disorders such as schizophrenia and autism. *Eur Neuropsychopharmacol.*, *18*(10), 712–716. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2008.06.001>
- Wöhr, M., & Schwarting, R. K. W. (2013). Affective communication in rodents: Ultrasonic vocalizations as a tool for research on emotion and motivation. *Cell and Tissue Research*, *354*(1), 81–97. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1607-9>
- Wolosker, H., Blackshaw, S., & Snyder, S. H. (1999). Serine racemase: A glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate neurotransmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(23), 13409–13414. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.23.13409>
- Woloszynowska-Fraser, M. U., Wulff, P., & Riedel, G. (2017). Parvalbumin-containing GABA cells and schizophrenia: Experimental model based on targeted gene delivery through adeno-associated viruses. *Behavioural Pharmacology*, *28*(8), 630–641. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000360>
- Wortinger, L. A., Engen, K., Barth, C., Lonning, V., Jørgensen, K. N., Andreassen, O. A., Haukvik, U. K., Vaskinn, A., Ueland, T., & Agartz, I. (2019). Obstetric complications and intelligence in patients on the schizophrenia-bipolar spectrum and healthy participants. *Psychological Medicine*.

<https://doi.org/10.1017/S0033291719002046>

- Xie, H., Yepuri, N., Meng, Q., Dhawan, R., Leech, C. A., Chepurny, O. G., Holz, G. G., & Cooney, R. N. (2020). Therapeutic potential of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonists to combat obesity, diabetes, and inflammation. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, *21*(4), 431–447. <https://doi.org/10.1007/s11154-020-09584-3>
- Xie, W., Peng, C. K., Huang, C. C., Lin, C. P., Tsai, S. J., & Yang, A. C. (2018). Functional brain lateralization in schizophrenia based on the variability of resting-state fMRI signal. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *86*(May), 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.05.020>
- Xu, B., Roos, J. L., Levy, S., van Rensburg, E. J., Gogos, J. A., & Karayiorgou, M. (2008). Strong association of de novo copy number mutations with sporadic schizophrenia. *Nature Genetics*, *40*(7), 880–885. <https://doi.org/10.1038/ng.162>
- Yang, A. C., & Tsai, S. J. (2017). New targets for schizophrenia treatment beyond the dopamine hypothesis. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(8). <https://doi.org/10.3390/ijms18081689>
- Yonelinas, A. P. (2013). The Hippocampus Supports High-Resolution Binding in the Service of Perception, Working Memory and Long-Term Memory. *Behavioural Brain Research*, *1*(254), 34–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.05.030>
- Yu, H., Yan, H., Li, J., Li, Z., Zhang, X., Ma, Y., Mei, L., Liu, C., Cai, L., Wang, Q., Zhang, F., Iwata, N., Ikeda, M., Wang, L., Lu, T., Li, M., Xu, H., Wu, X., Liu, B., ... Yue, W. (2017). Common variants on 2p16.1, 6p22.1 and 10q24.32 are associated with schizophrenia in Han Chinese population. *Molecular Psychiatry*, *22*(7), 954–960. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.212>
- Zhang, L., Schallert, T., Zhang, Z. G., Jiang, Q., Arniego, P., Li, Q., Lu, M., & Chopp, M. (2002). A test for detecting long-term sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia. *Journal of Neuroscience Methods*, *117*, 207–214. www.elsevier.com/locate/jneumeth
- Zimmerberg, B., & Shartrand, A. M. (1992). Temperature-dependent effects of maternal separation on growth, activity, and amphetamine sensitivity in the rat. *Developmental Psychobiology*, *25*(3), 213–226. <https://doi.org/10.1002/dev.420250306>

Validation d'un modèle murin de schizophrénie pour améliorer la recherche de nouveaux traitements.
Approche psychopharmacologique, en imagerie et en électrophysiologie.

Résumé :

La schizophrénie est une maladie psychiatrique très invalidante qui concerne près de 1% de la population. Bien que son étiologie soit toujours inconnue, elle est certainement multifactorielle et comprend une interaction entre prédisposition génétique et facteurs environnementaux. Il existe des traitements médicamenteux mais ils ne sont pas totalement efficaces, particulièrement pour la prise en charge des symptômes négatifs et des déficits cognitifs. Le développement de nouveaux traitements plus efficaces passe par l'amélioration des modèles animaux prenant en compte le caractère multifactoriel de l'étiologie de cette pathologie.

Nous avons développé un modèle murin multifactoriel de schizophrénie innovant (modèle 3-hit) présentant une forte validité de construction. Pour cela, nous avons combiné une modification génétique (1er hit : délétion partielle du gène MAP6) avec un stress environnemental précoce (2nd hit : séparation maternelle de 24h au 9ème jour de vie) et une exposition tardive au THC durant l'adolescence (3ème hit : administration quotidienne de tétrahydrocannabinol à 8mg/kg du 32ème au 52ème jour).

Dans un premier temps, nous avons montré une bonne validité d'apparence de ce modèle à travers des études comportementale, en imagerie et en électrophysiologie. En effet, au niveau comportemental les souris 3-hit présentent des symptômes de type négatif, des déficits cognitifs et une altération de la latéralité olfactive. Nous avons aussi montré un déficit d'inhibition du réflexe de sursaut, qui est un élément comportemental clef dans les modèles animaux de schizophrénie, car il est également utilisé en recherche clinique. Nous avons également observé certaines altérations morphologiques et fonctionnelles cérébrales caractéristiques de la schizophrénie comme une réduction du volume de l'hippocampe, une altération des fibres du corps calleux et un dysfonctionnement des systèmes de neurotransmission glutamatergique et GABAergique. Certains dimorphismes sexuels ont été également montrés dans nos études.

Dans un deuxième temps, nous avons comparé les déficits des animaux 3-hit avec ceux d'autres modèles de schizophrénie développés au laboratoire. La caractérisation des effets de chaque facteur, indépendamment et en association, nous a permis de mettre en évidence un phénomène de synergie entre les facteurs et non une simple addition des déficits induits par chacun d'entre eux.

Le modèle de schizophrénie 3-hit présente de bonnes validités de construction et d'apparence, il est maintenant nécessaire afin de parfaire sa caractérisation de tester sa validité pharmacologique.

Mots clef : schizophrénie ; modèles animaux multifactoriels ; comportement ; symptômes (triade) ; psychopharmacologie ; électrophysiologie ; immunohistochimie ; imagerie

Abstract:

Affecting 1% of worldwide population, schizophrenia is a debilitating pathology. Whether the aetiology of schizophrenia remains unknown, its multifactorial aspect is conversely now well admitted, and certainly gathers genetic vulnerability and environmental factors. Actual treatments are still unmet, particularly for negative and cognitive symptoms. For a better translation from treatments design of schizophrenia to clinical efficiency, there is a crucial need to refine preclinical animal models that considers the multifactorial aspects of this disease.

We developed a new murine multifactorial model of schizophrenia (3-hit), that possesses a strong construct validity. To this, we combined a genetic predisposition (1st hit: partial deletion of MAP-6) with an early postnatal stress (2nd hit: 24 h maternal separation at postnatal day 9), and a late cannabinoid exposure during adolescence (3rd hit: tetrahydrocannabinol THC from post-natal day 32 to 52; 8 mg/kg/day).

First, we characterised a promising face validity through behavioural, imaging and electrophysiological studies. At behavioural level, we demonstrated that 3-hit mice displayed negative-like symptoms, cognitive deficits and altered olfactory laterality. Moreover, we showed a sensory motor gating deficit, that is a major translational clue for animal models of schizophrenia. Additionally, 3-hit mice displayed some characteristic morphological and functional impairments of the disease: reduced hippocampal volume, altered callosal fibres, glutamatergic and GABAergic neurotransmission dysfunctions. We moreover highlighted some sexual dimorphisms.

Second, we compared deficits of 3-hit mice to those of others models of schizophrenia developed in our laboratory. Deficits induced by one factor, or combination of several factors, evidenced a synergistic effect, and not a simple addition between each of them.

The 3-hit model therefore presents strong construct validity and promising face validity, encouraging to assess the pharmacological validity.

Key words: schizophrenia; multifactorial animal models; behaviour; triad of symptoms; psychopharmacology; electrophysiology; immunohistochemistry; imaging