



**HAL**  
open science

# Rôle du gène codant pour le précurseur du peptide $\beta$ -amyloïde dans des conditions physiologiques et dans la Trisomie 21 chez le rat

Marion Pellen

## ► To cite this version:

Marion Pellen. Rôle du gène codant pour le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde dans des conditions physiologiques et dans la Trisomie 21 chez le rat. Médecine humaine et pathologie. Université de Strasbourg, 2021. Français. NNT : 2021STRAJ047 . tel-04127623

**HAL Id: tel-04127623**

**<https://theses.hal.science/tel-04127623>**

Submitted on 14 Jun 2023

**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.



**UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**



**ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

**UMR 7104 I.G.B.M.C - UMR 7364 L.N.C.A**

**THÈSE** présentée par :

**Marion PELLEN**

soutenue le : **19 octobre 2021**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Neurosciences**

**Rôle du gène codant pour le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde dans des conditions physiologiques et dans la Trisomie 21 chez le Rat**

**THÈSE dirigée par :**

**Yann HERAULT**

**Jean-Christophe CASSEL**

Directeur de Recherche, CNRS, Université de Strasbourg  
Professeur, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Jean-Maurice DELABAR**

**Claire RAMPON**

Directeur de Recherche, CNRS, Paris  
Directrice de Recherche, CNRS, Toulouse

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Caroline ROUAUX**

**Barbara BARDONI**

Chargée de Recherche, INSERM, Strasbourg  
Directrice de Recherche, INSERM, Valbonne



A mes parents



## REMERCIEMENTS

Je tiens à tout d'abord à remercier les membres de mon jury, les docteurs Jean-Maurice Delabar, Claire Rampon, Caroline Rouaux et Barbara Bardoni d'avoir acceptés et pris le temps d'évaluer mon travail de thèse.

Merci à mes directeurs de thèse Yann Hérault et Jean-Christophe Cassel de m'avoir donné l'opportunité d'intégrer leurs équipes et de m'avoir fait confiance pendant ces 4 années. Merci de m'avoir donné la chance de travailler sur ces projets passionnants, de m'avoir transmis vos connaissances et votre rigueur scientifique. Cette aventure a commencé pour moi lors de mon master, et n'a été depuis qu'une succession d'expériences très enrichissantes aussi bien d'un point de vue scientifique, que personnelle.

Je souhaite également remercier Anne Pereira De Vasconcelos, mon mentor. Merci pour votre disponibilité, votre bonne humeur et votre optimisme à tout épreuve. Merci d'avoir été présente, et d'avoir toujours pris le temps de me conseiller et de me rassurer.

Je voudrais remercier particulièrement Damien Maréchal à qui je dois beaucoup. Merci d'avoir été un super encadrant pendant mon master et aussi au début de ma thèse. Je suis extrêmement reconnaissante pour toute l'aide que tu as et que tu continues à m'apporter. Merci d'avoir toujours été présent même en étant de l'autre côté de l'océan. Parce que ton soutien est très important pour moi, et bien plus qu'un encadrant, tu es devenu un ami qui compte énormément.

Merci à mes deux équipes d'avoir permis que cette thèse se déroule dans les meilleures conditions possibles. Même sans avoir passé beaucoup de temps au LNCA, j'y ai rencontré de très belles personnes qui m'ont beaucoup apporté. Merci en particulier à Brigitte Cosquer et Karine Herbeaux pour leur bonne humeur et pour avoir toujours trouvé des petites réponses à mes petites questions. Merci Brigitte pour ton aide avec le projet APP-KO, pour toutes les coupes que tu as réalisées, t'as rapidité ne sera jamais égalée. Merci également à Monique Majchrzak pour son aide précieuse avec mes vieux rats et tous leurs petits problèmes de santé. Merci à Daniel Egesi pour avoir préparé les cages et les biberons de mes rats. Merci à Pascal Romieu de m'avoir toujours bien fait rire. En grand merci à Caroline, Laura D, Laura T, Gaëlle, Romain et Christopher. Merci d'avoir été à mes côtés, pour vos conseils et pour votre écoute. Surtout merci pour les moments qu'on a partagés ensemble en dehors du labo, notamment au Milano, qui nous aurons permis d'échapper au quotidien de la thèse qui n'est pas toujours facile. Merci d'être toujours là, même si je n'ai pas toujours été très disponible. Tout simplement, merci à tout le LNCA pour votre accueil chaleureux et votre bienveillance.

Merci à Claire Chevalier, mon rayon de soleil, toujours à essayer de trouver un moyen de me faire rire, en toutes circonstances. Merci de rendre mes journées plus belles. Merci également à Arnaud Duchon pour sa gentillesse et sa bienveillance, toujours disponible quand on a besoin d'un conseil et tout simplement parce que tu me fais beaucoup rire. Merci à Michel Roux pour ta patience avec mes rats qui ne sont pas toujours coopératifs et qui tournent souvent de l'œil. La pièce d'OCT attends toujours que l'on mette en œuvre nos talents cachés de décorateurs. Au passage, encore désolée pour le congélateur, il faut croire que je ne contrôle pas toujours très bien ma force.... Merci à toute l'équipe pour votre aide au quotidien.

Un grand merci à Géraldine Prevost, même si un simple merci ne me semble pas suffisant pour tout ce que tu fais au quotidien. Finalement sans toi une grande partie de cette thèse n'existerait pas. Merci de faire ton travail avec autant de passion et ta gestion hors pair de nos lignées. Je ne sais tout simplement pas comment j'aurais fait si tu n'avais pas été là.

Merci à Isabelle Goncalves d'être la super vétérinaire que tu es. Ton aide et ton soutien mon été très précieux face à toutes les difficultés qu'on aura pu rencontrer. Merci d'avoir toujours essayé de trouver des solutions, de n'avoir jamais abandonné bien que ça en est très souvent désespérant. Nos petites boules de poils sont toujours pleines de surprises, et ce n'est pas fini.... Au moins avec eux on ne s'ennuie jamais.

Merci à Loïc Lindner et Pauline Cayrou pour toutes les ddPCR que vous avez faites, pour avoir résolu tous les problèmes de génotypage qu'on aura pu rencontrer, et ce toujours avec le sourire. Merci à la plateforme GenomEast pour le séquençage de mes précieux échantillons.

Merci à Hamid Ennah, Mourad Richert et Chaouki Bam'Hamed pour leur aide avec mes rats, qui m'a été très précieuse, en particulier au cours de l'écriture de ce manuscrit. Merci pour votre gentillesse et votre bienveillance.

Je ne pourrai pas tous vous remercier un par un, sinon cette section remerciements deviendrait plus longue que ma thèse. Désolée pour toutes les personnes que je n'ai pas citées, mais qui ont contribué à faire de ce projet ce qu'il ait.

Merci à ceux qui ont été là au tout début tel que Guillaume, Thu Lan, Mélanie, est qui m'ont guidé dans mes premiers pas de doctorante. Merci pour vos conseils, votre aide et surtout votre humour qui ont embelli mes journées.

Un merci tout particulier à Mar et Helin pour avoir toujours été là. Merci pour votre aide au quotidien, pour vos conseils, et pour toutes les discussions que l'on a eu et qui m'auront permis d'avancer. Vous avez été là jusqu'au bout, jusqu'à l'impression de ce manuscrit qui n'aurait fort probablement pas pu voir le jour dans les temps sans votre aide. Merci d'avoir supporté mon stress et ma mauvaise humeur de ces derniers mois, sans jamais vous plaindre. Tout simplement parce que je ne sais pas ce que j'aurais fait sans vous !

Un grand merci à mes amies de longue date, Anne et Delphine. Merci d'avoir été compréhensive et d'être toujours là, malgré le fait que j'ai été très absente au cours de ces 4 dernières années. Promis, je vais essayer de me rattraper. J'ai vraiment beaucoup de chance de vous avoir dans ma vie.

Les derniers remerciements vont aux personnes les plus importantes de ma vie, ma famille. Merci d'avoir toujours cru en moi, d'avoir fait de moi la personne que je suis aujourd'hui. Merci pour votre soutien qui m'est très précieux et d'être aussi compréhensif.



# SOMMAIRE

<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>1</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>7</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>14</b>
CHAPITRE I : L'APP : STRUCTURE, MÉTABOLISME ET FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES .....	16
I- Structure de la protéine APP .....	16
II- Synthèse de l'APP .....	19
III- Expression.....	20
IV- Voies protéolytiques .....	21
1- Les voies canoniques.....	21
1.1- La voie amyloïdogénique .....	21
1.2- La voie non-amyloïdogénique.....	23
1.3- Les enzymes $\alpha$ , $\beta$ et $\gamma$ -sécrétases .....	23
2- Les nouvelles voies de clivages .....	25
V- Les fonctions physiologiques de l'APP.....	29
1- Prolifération cellulaire.....	30
2- Différenciation cellulaire.....	30
3- Migration cellulaire .....	31
4- Croissance neuritique et guidage axonale .....	32
5- Fonction synaptique.....	34
VI- Caractérisation phénotypique des modèles de souris APP-KO .....	36
1- Les modèles.....	36
2- Caractérisation comportementale .....	37
3- Caractérisation cellulaire et moléculaire cérébrale .....	40
CHAPITRE II : L'APP DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER ASSOCIÉE AU SYNDROME DE DOWN .....	44
I- La maladie d'Alzheimer .....	44
1- Les différentes formes de la maladie d'Alzheimer .....	44
2- Les signes cliniques .....	45
3- Les caractéristiques neuropathologiques .....	47
3.1- Les plaques amyloïdes .....	47
3.2- Les dégénérescences neurofibrillaires.....	48
3.3- Neuro-inflammation .....	50
3.4 Pertes synaptiques et neuronales.....	51
II- Le Syndrome de Down.....	52
1- Les différentes formes de SD .....	52
2- Les signes cliniques .....	53
2.1- Les dysmorphies .....	54
2.2- La déficience intellectuelle .....	55
2.3- L'hypotonie musculaire.....	56
2.4- Les comorbidités.....	56
3- Les anomalies cérébrales .....	58
4- Les corrélations génotypes-phénotypes dans le Syndrome de Down.....	59
5- L'apport des modèles rongeurs du Syndrome de Down .....	60
III- La maladie d'Alzheimer dans le syndrome de down .....	61
1- Prévalence.....	61
2- Rôle majeur de l'APP.....	62
3- Symptômes cliniques .....	63
4- Neuropathologie de la MA dans un contexte de SD .....	64

5- Comment étudier la MA dans un contexte de SD chez les rongeurs ?.....	66
<b>OBJECTIFS .....</b>	<b>68</b>
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>72</b>
PROJET I : CARACTÉRISATION D'UN NOUVEAU MODÈLE DE RAT APP–KO .....	74
I- Les animaux .....	74
1- Le modèle.....	74
2- Les effectifs .....	75
3- Conditions d'hébergement .....	75
4- Autorisation de projet.....	76
II- Génotypage .....	76
1- Digestion tissulaire pour extraction d'ADN .....	76
2- Amplification de l'ADN par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) .....	76
3- Migration par électrophorèse sur gel d'agarose.....	77
III- Tests de comportement .....	78
1- Labyrinthe en croix surélevé .....	78
1.1- Dispositif .....	78
1.2- Protocole .....	79
2- Test de l'activité circadienne.....	79
3- Test du champ ouvert .....	80
4- Test de la barre .....	81
5- Piscine de Morris.....	82
5.1- Principe .....	82
5.2- Dispositif .....	83
5.3- Protocole .....	84
6- Double H .....	85
6.1- Dispositif .....	85
6.2- Protocole .....	86
7- Mise à mort des animaux.....	87
IV- Analyses de biologie moléculaire .....	88
1- Extraction protéique .....	88
2- Dosage des protéines.....	89
3- Western blot .....	89
V- Analyses histologiques.....	91
1- Principe de la Stéréologie.....	91
2- Coupes de cerveau .....	92
3- Coloration au violet de crésyl.....	93
4- Mesures de volumes et de surfaces.....	94
4.1- Dispositif .....	94
4.2- Mesure de volumes .....	94
4.2.1 Principe .....	94
4.2.2- Protocole sous Mercator.....	95
4.3- Mesures de surface.....	95
5- Analyses statistiques .....	97
PROJET II : CARACTÉRISATION DE MODÈLES DE RATS DU SYNDROME DE DOWN AVEC OU SANS L'APP HUMANISÉE.....	98
I- Les animaux .....	98
1- Les modèles.....	98
1.1- Les modèles de rat du Syndrome de Down .....	98
1.1.1- Validation des modèles Dup(Rno11) et Dup(Rno20) par ddPCR.....	99
1.1.1.1- Extraction de l'ADN .....	99
1.1.1.2- Protocole de la ddPCR.....	99
1.1.2- Validation des modèles Dup(Rno11) et Dup(Rno20) par CGH arrays .....	102
1.2- Les modèles de rats du Syndrome de Down avec l'APP humanisée.....	105

1.2.1-	Modèle de rat APP humanisée.....	105
1.2.2-	Modèles de rat du Syndrome de Down avec l'APP humanisée.....	106
2-	Conditions d'hébergement .....	107
3-	Autorisation de projet.....	108
II-	Génotypage .....	109
1-	Génotypage de la duplication du Rno11 .....	109
2-	Génotypage de la duplication du Rno20 .....	110
2.1-	Méthode de génotypage par PCR classique.....	110
2.1.1-	Digestion tissulaire pour extraction d'ADN.....	110
2.1.2-	PCR et Migration .....	110
2.2-	Méthode de génotypage par ddPCR.....	111
3-	Génotypage de l'APP humanisée .....	111
4-	Génotypage des modèles de rats SD avec l'APP <sup>H</sup> .....	112
III-	Tests de comportement .....	112
1-	Effectifs .....	112
2-	Test de l'activité circadienne.....	114
3-	Labyrinthe en Y .....	115
4-	Champ ouvert .....	117
5-	Interaction sociale.....	118
6-	Test de reconnaissance du nouvel emplacement d'un objet.....	118
7-	Test de reconnaissance du nouvel objet.....	120
8-	Piscine de Morris.....	121
8.1-	Dispositif .....	121
8.2-	Protocole .....	122
9-	Mises à mort des animaux .....	124
10-	Analyses statistiques .....	125
IV-	Transcriptomique .....	125

## **RESULTATS..... 128**

PROJET I : CARACTÉRISATION D'UN NOUVEAU MODÈLE DE RAT APP-KO .....	130
I- Validation du modèle .....	130
II- Tests comportementaux.....	131
1- Masse corporelle.....	132
2- Labyrinthe en croix surélevé .....	133
3- Test de l'activité circadienne.....	136
3.1- Phase d'habituation .....	136
3.2- Activité Diurne versus Nocturne .....	137
3.3- Effet du vieillissement.....	140
4- Champ ouvert .....	141
4.1- Evaluation de la distance parcourue.....	141
4.2- Temps passé à la périphérie versus le centre .....	143
4.3- Effet du vieillissement.....	143
5- Test de la barre .....	145
6- Piscine de Morris.....	146
6.1- Phase d'acquisition .....	146
6.1.1- Analyse des résultats pour chaque âge.....	147
6.1.2- Effet du vieillissement.....	151
6.2- Test de rappel .....	153
6.2.1- Analyse des résultats pour chaque âge.....	153
6.2.2- Effet du vieillissement.....	155
6.3- Phase d'extinction.....	155
6.3.1- Analyse des résultats pour chaque âge.....	155
6.3.2- Effet du vieillissement.....	158
7- Double H .....	158

7.1- Phase d'acquisition .....	159
7.2- Tests de rappel.....	161
7.2.1- Analyse des résultats à l'âge de 2 mois.....	162
7.2.2- Analyse des résultats à l'âge de 12 mois.....	163
7.2.3- Analyse des résultats à l'âge de 18 mois.....	165
7.2.4- Conclusion.....	166
8- Masse cérébrale .....	167
9- Conclusion.....	168
III- Analyses histologiques.....	170
1- Mesures de volumes de différentes régions cérébrales .....	170
2- Mesures de surfaces de régions cérébrales .....	172
IV- Analyses moléculaires .....	174
1- Etude de l'expression des protéines de la famille de l'APP.....	175
2- Etude de l'expression de marqueurs synaptiques .....	177
3- Etude de l'expression de marqueurs astrocytaires .....	179
4- Tableau de synthèse .....	182
PROJET II : CARACTÉRISATION DE MODÈLES DE RATS DU SYNDROME DE DOWN AVEC OU SANS L'APP HUMANISÉE.....	183
OBJECTIF 1 : CARACTÉRISATION DES MODÈLES DE RATS DU SYNDROME DE DOWN .....	183
I- Validation des modèles .....	183
1- Validation par ddPCR .....	183
2- Validation par CGH array.....	184
II- Tests de comportement .....	185
1- Masse corporelle.....	186
2- Test de l'activité circadienne.....	187
3- Labyrinthe en Y .....	188
4- Champ ouvert .....	190
5- Interaction sociale.....	193
6- Test de reconnaissance de la localisation de l'objet (OLM) .....	193
7- Test de reconnaissance du nouvel objet (NOR) .....	195
8- Piscine de Morris.....	197
8.1- Phase d'acquisition .....	197
8.2- Test de rappel n°1.....	200
8.3- Phase de reversal.....	202
8.4- Test de rappel n°2.....	205
9- Conclusion générale .....	207
OBJECTIF 2 : CARACTÉRISATION DES MODÈLES DE RATS DU SYNDROME DE DOWN AVEC L'APP HUMANISÉE .....	209
I- Masse corporelle .....	210
II- Test de l'activité circadienne .....	211
III- Labyrinthe en Y.....	213
IV- Test du champ ouvert .....	215
V- Interaction sociale .....	217
VI- Test de reconnaissance de la localisation de l'objet (OLM) .....	217
VII- Test de reconnaissance du nouvel objet.....	219
VIII- Piscine de Morris.....	221
1- Phase d'acquisition .....	221
2- Test de rappel n°1 .....	224
3- Phase de reversal .....	226
4- Test de rappel n°2 .....	228
IX- Conclusion générale .....	230
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>234</b>
PROJET I : CARACTÉRISATION D'UN MODÈLE RAT APP-KO .....	237

PROJET II : CARACTÉRISATION DE MODÈLES DE RATS DU SYNDROME DE DOWN AVEC OU SANS L'APP HUMANISÉE.....	245
1- Etude des modèles de rat du SD sans l'APP <sup>H</sup> .....	245
2- Etude des modèles de rat du SD avec l'APP <sup>H</sup> .....	250
<b>REFERENCES.....</b>	<b>252</b>



## LISTE DES ABREVIATIONS

I <sup>aire</sup>	Primaire
II <sup>aire</sup>	Secondaire
AAC	Angiopathie Amyloïde Cérébrale
A $\beta$	Peptide $\beta$ -Amyloïde
Abcg1	ATP Binding Cassette Subfamily G Member 1
AcD	Domaine Acide
ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease
AEP	Asparagine Endopeptidase
AICD	APP Intracellular Domain
ALID	APP-Like Protein Intracellular Domain
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate
ANOVA	Analyse de variance
APH-1	Anterior Pharynx-Defective 1
Apl-1	Amyloid- $\beta$ -like protein
APLP1/2	APP-like protein 1/2
APOE $\epsilon$ 4	Allèle 4 de l'Apolipoprotéine E
APP	$\beta$ -Amyloid Precurseur Protein
APP <sup>H</sup>	APP Humanisée
APPL	APP-Like
APP <sup>WT</sup>	APP wild-type
ARNg	ARN guide
ARN-Seq	ARN Séquencé
Asp	Asparagine
BACE1/2	$\beta$ -site APP-Cleaving Enzyme1/2
BD	Bas-Droit
BET	Bromure d'éthidium
BG	Bas-Gauche
BIN1	Bridging Integrator 1

BSA	Bovine Serum Albumin
Btg3	BTG Anti-Proliferation Factor 3
C-ter	Extrémité C-terminale
CA1/2/3	Corne d'Ammon 1/2/3
Cbs	Cystathionine Beta-Synthase
CE	Coefficient d'erreur
Cg	Cortex cingulaire
CGH arrays	Hybridation génomique comparative sur des puces à ADN
Cldn8	Claudin 8
CLU	Clusterine
CPFm	Cortex préfrontal médian
CREMEAS	Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg
CTF	C-Terminal Fragment
CuBD	Domaine de liaison au cuivre
Cx	Cortex
Cx Ent	Cortex entorhinal
Cy3/5	Cyanine 3/5
DAB-1	Disabled-1
DCC	Deleted in Colorectal Cancer
DCR	Down Syndrome Chromosome Region
ddPCR	PCR digitale en gouttelettes
DEGs	Differential Expressed Genes
DG	Gyrus Denté
DH	Double H
dHipp	Hippocampe dorsal
DISC1	Disrupted-in-schizophrenia 1
DSCAM	DS Cell Adhesion Molecule
E	Est
EOAD	Early-Onset Alzheimer Disease



Ex16/17	Exon 16/17
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GFLD	Growth Factor-Like Domain
Glo1	Glyoxalase I
GO	Genes Ontology
GWAS	Genome-Wide Association Studies
HBD	Domaine de liaison à l'héparine
HD	Haut-Droit
HG	Haut-Gauche
Hipp	Hippocampe
HRP	Peroxydase de raifort
Hsa21	Chromosome 21 Humain ( <i>Homo sapiens</i> )
ICS	Institut Clinique de la Souris
IGBMC	Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire
Igsf5	Immunoglobulin Superfamily Member 5
IL	Cortex Infralimbique
IPP	Interaction protéine-protéine
Itgb2	Integrin Subunit Beta 2
ITSN1	Intersectin 1
JNM	Jonction Neuromusculaire
Kcnj15	Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 15
KD	Knock-Down
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KO	Knock-Out
KPI	Domaine inhibiteur de protéases de type Kunitz
Lipi	Lipase I
LNCA	Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives
LOAD	Late-Onset Alzheimer Disease

Lss	Lanosterol Synthase
LTP	Potentialisation à long terme
MA	Maladie d'Alzheimer
Mac-1	Macrophage Integrin-1
MAP	Microtubule-Associated Proteins
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
Mb	Méga bases
MCI	Mild Cognitive Impairment
MDC9	Metalloprotease/Disintegrin/Cysteine-rich Protein 9
MDT	Mémoire de travail
mEPPs	Miniature End-Plate Potentials
Mmu 10/16/17	Chromosome souris ( <i>Mus musculus</i> ) 10/16/17
Mrap	Melanocortin 2 Receptor Accessory Protein
MT5-MMP	Membrane Type-5 Matrix Metalloproteinase
N	Nord
N-ter	Extrémité N-terminale
Ncam2	Neural Cell Adhesion Molecule 2
NCT	Nicastrine
ne	Non évalué
NE	Nord-Est
NGF	Nerve Growth Factor
NMDA	Acide N-méthyl-D-aspartique
NO	Nord-Ouest
NOR	Novel Object Recognition
NSPC	Neural Stem/Progenitor Cell
O	Ouest
OLM	Object Location Memory
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAM	Protospacer Adjacent Motif

pb	Paire de base
PBS	Tampon Phosphate Salin
Pcp4	Purkinje Cell Protein 4
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
Pde9a	Phosphodiesterase 9A
PEN-2	Presenilin enhancer 2
PF	Plateforme
PFA	Paraformaldéhyde
PiB	Pittsburgh compound-B
PICALM	Phosphatidylinositol Binding Clathrin Assembly Protein
PMSF	Fluorure de Phénylméthylsulfonyle
PrL	Cortex Prélimbique
Prmt2	Protein Arginine Methyltransferase 2
PS1/2	Préséniline 1/2
PSD-95	Postsynaptic density protein 95
QC	Quadrant-cible
QI	Quotient Intellectuel
Rno11/20	Chromosome rat ( <i>Rattus norvegicus</i> ) 11/20
RRP	Readily Releasable Pool
Rwdd2b	RWD Domain Containing 2B
S	Sud
S100B	S100 Calcium Binding Protein B
sAPP	APP soluble
SD	Syndrome de Down
SE	Sud-Est
sem	Semaine
Sik1	Salt Inducible Kinase 1
Slc19a1	Solute Carrier Family 19 Member 1
SNAP-25	Synaptosomal-Associated Protein of 25kDa

SO	Sud-Ouest
SOD1	Superoxide Dismutase 1
SORL1	Sortilin-Related Receptor-1
SP	Peptide signal
Stade E	Stade Embryonnaire
Syn	Synaptophysine
SYNJ1	Synaptojanin 1
TAAM	Transg�n�se et Archivage d'Animaux Modèles
TACE	Tumor Necrosis Factor-Alpha Converting Enzyme
TAU	Tubuline Associated Unit
TDM	Domaine Transmembranaire
TEP	Tomographie par �mission de Positrons
TREM2	Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2
Trpm2	Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 2
Umodl1	Uromodulin-Like 1 Precursor
vHipp	Hippocampe ventral
WT	Wild-type
YOAD	Young-Onset Alzheimer Disease
Zbtb21	Zinc Finger And BTB Domain Containing 21

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : STRUCTURE DE LA PROTÉINE APP .....	18
FIGURE 2 : VOIE DE SYNTHÈSE DE L'APP .....	20
FIGURE 3 : VOIES DE CLIVAGES AMYLOÏDOGÉNIQUE ET NON-AMYLOÏDOGÉNIQUE DE L'APP .....	22
FIGURE 4 : SITES DE CLIVAGES DE L'ENZYME $\Gamma$ -SÉCRÉTASE DANS LE DOMAINE TRANSMEMBRANAIRE DE L'APP..	23
FIGURE 5 : CLIVAGE DE L'APP PAR L'ENZYME H-SÉCRÉTASE .....	26
FIGURE 6 : CLIVAGE DE L'APP PAR L'ENZYME $\Delta$ -SÉCRÉTASE .....	27
FIGURE 7 : CLIVAGE DE L'APP PAR L'ENZYME MÉPRINE-B .....	28
FIGURE 8 : CLIVAGE DE L'APP PAR LA VOIE DES CASPASES.....	29
FIGURE 9 : DÉCOURS TEMPOREL DU DÉVELOPPEMENT DE LA MALADIE D'ALZHEIMER .....	46
FIGURE 10 : PROGRESSION DE LA PATHOLOGIE AMYLOÏDE DANS LE CERVEAU DE PERSONNES ATTEINTES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER .....	48
FIGURE 11 : PROGRESSION DES DÉGÉNÉRESCENCES NEUROFIBRILLAIRES DANS LE CERVEAU DES PERSONNES ATTEINTES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER.....	50
FIGURE 12 : CARYOTYPE D'UNE FEMME PORTEUSE D'UNE TRISOMIE COMPLÈTE.....	53
FIGURE 13 : DYSMORPHIES PHYSIQUES ASSOCIÉES AU SYNDROME DE DOWN .....	54
FIGURE 14 : REPRÉSENTATION DES RÉGIONS CHROMOSOMIQUES, DE LA SOURIS ET DU RAT, SYNTÉNIQUES AU CHROMOSOME 21 HUMAIN .....	60
FIGURE 15 : COMPARAISON DE LA SÉQUENCE DE L'AB ENTRE L'HOMME ET LE RAT .....	67
FIGURE 16 : SCHÉMA DE CONSTRUCTION DU MODÈLE DE RAT APP-KO .....	74
FIGURE 17: DÉCOURS TEMPOREL DES TESTS COMPORTEMENTAUX RÉALISÉS CHEZ LE MODÈLE APP-KO .....	78
FIGURE 18 : DISPOSITIF DU LABYRINTHE EN CROIX SURÉLEVÉ .....	79
FIGURE 19 : DISPOSITIF DU TEST DE L'ACTIVITÉ CIRCADIENNE .....	80
FIGURE 20 : DISPOSITIF DU TEST DU CHAMP OUVERT .....	81
FIGURE 21 : DISPOSITIF DU TEST DE LA BARRE .....	82
FIGURE 22 : DISPOSITIF DE LA PISCINE DE MORRIS .....	83
FIGURE 23 : TEST DU DOUBLE H .....	87
FIGURE 24: PROTOCOLE DE RÉALISATION DES COUPES DE CERVEAU POUR LES MESURES DE VOLUMES ET SURFACES PAR LA TECHNIQUE DE STÉRÉOLOGIE .....	93
FIGURE 25: EXEMPLE D'UNE GRILLE DE POINTS .....	94
FIGURE 26: PLANCHE NEUROANATOMIQUE INDIQUANT LES DÉLIMITATIONS DES DIFFÉRENTES SOUS-RÉGIONS DU PLAN DE L'HIPPOCAMPE DORSAL.....	96
FIGURE 27: PLANCHE NEUROANATOMIQUE INDIQUANT LES DÉLIMITATIONS DES DIFFÉRENTES SOUS-RÉGIONS DU PLAN DU STRIATUM.....	96
FIGURE 28: PROTOCOLE DE PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS POUR LA RÉALISATION DU CGH ARRAYS.....	104

FIGURE 29: SCHÉMA DE CONSTRUCTION DU MODÈLE DE RAT APP HUMANISÉE .....	105
FIGURE 30 : GÉNÉRATION DES MODÈLES DE RATS DE LA MALADIE D'ALZHEIMER DANS UN CONTEXTE DU SYNDROME DE DOWN.....	107
FIGURE 31: HÉBERGEMENT DES RATS SUR PORTOIRS VENTILÉS.....	108
FIGURE 32 : CARACTÉRISATION COMPORTEMENTALE DES MODÈLES DE RATS SD SANS L'APP <sup>H</sup> À L'ÂGE DE 6-7 SEMAINES .....	113
FIGURE 33: CARACTÉRISATION COMPORTEMENTALE DES MODÈLES DE RATS SD AVEC L'APP <sup>H</sup> À L'ÂGE DE 6-7 SEMAINES .....	114
FIGURE 34: DISPOSITIF DU TEST DE L'ACTIVITÉ CIRCADIENNE .....	115
FIGURE 35: DISPOSITIF DU LABYRINTHE EN Y .....	116
FIGURE 36: DISPOSITIF DU CHAMP OUVERT .....	117
FIGURE 37: PROTOCOLE DU TEST DE L'OLM .....	119
FIGURE 38: TEST DE RECONNAISSANCE DU NOUVEL OBJET .....	121
FIGURE 39 : DISPOSITIF DE LA PISCINE DE MORRIS .....	122
FIGURE 40: PROTOCOLE DE PISCINE DE MORRIS RÉALISÉ CHEZ LES MODÈLES DE RAT SD AVEC OU SANS L'APP <sup>H</sup> .....	122
FIGURE 41: VALIDATION DU MODÈLE DE RAT APP-KO AU NIVEAU PROTÉIQUE PAR WESTERN BLOT.....	131
FIGURE 42: EVOLUTION DE LA MASSE CORPORELLE CHEZ LES RATS APP <sup>+/-</sup> ET APP <sup>-/-</sup> .....	132
FIGURE 43: ACTIVITÉ LOCOMOTRICE ET ANXIÉTÉ CHEZ LES RATS APP <sup>+/-</sup> ET APP <sup>-/-</sup> DANS LE LABYRINTHE EN CROIX SURÉLEVÉ.....	134
FIGURE 44: EFFET DU VIEILLISSEMENT CHEZ LES RATS APP <sup>+/-</sup> ET APP <sup>-/-</sup> DANS LE LABYRINTHE EN CROIX SURÉLEVÉ .....	135
FIGURE 45: ACTIVITÉ LOCOMOTRICE DES RATS LORS DE LA PHASE D'HABITUATION AU TEST DE L'ACTIVITÉ CIRCADIENNE .....	136
FIGURE 46: ACTIVITÉ LOCOMOTRICE DANS LE TEST DE L'ACTIVITÉ CIRCADIENNE SUR UNE PÉRIODE DE 45H SUIVANT LA PHASE D'HABITUATION.....	138
FIGURE 47: EFFET DU VIEILLISSEMENT SUR L'ACTIVITÉ LOCOMOTRICE DES RATS APP <sup>+/-</sup> ET APP <sup>-/-</sup> LORS DES PHASES DIURNE ET NOCTURNE DU TEST DE L'ACTIVITÉ CIRCADIENNE.....	141
FIGURE 48: ACTIVITÉ LOCOMOTRICE CHEZ LES RATS APP <sup>+/-</sup> ET APP <sup>-/-</sup> DANS LE TEST DU CHAMP OUVERT .....	142
FIGURE 49: EFFET DU VIEILLISSEMENT SUR L'ACTIVITÉ LOCOMOTRICE DES RATS APP <sup>+/-</sup> ET APP <sup>-/-</sup> DANS LE TEST DU CHAMP OUVERT .....	144
FIGURE 50: COORDINATION SENSORIMOTRICE DES RATS APP <sup>+/-</sup> ET APP <sup>-/-</sup> DANS LE TEST DE LA BARRE .....	145
FIGURE 51: EFFET DU VIEILLISSEMENT SUR LA COORDINATION SENSORIMOTRICE DES RATS APP <sup>+/-</sup> ET APP <sup>-/-</sup> AU TEST DE LA BARRE .....	146
FIGURE 52: DISTANCE PARCOURUE ET LATENCE POUR ATTEINDRE LA PLATEFORME POUR LES RATS APP <sup>+/-</sup> ET APP <sup>-/-</sup> LORS DE LA PHASE D'ACQUISITION DANS LA PISCINE DE MORRIS .....	148
FIGURE 53: THIGMOTAXIE ET VITESSE DE NAGE POUR LES RATS APP <sup>+/-</sup> ET APP <sup>-/-</sup> LORS DE LA PHASE D'ACQUISITION DANS LA PISCINE DE MORRIS.....	150

FIGURE 54: MÉMOIRE SPATIALE CHEZ LES RATS <i>APP<sup>+/-</sup></i> ET <i>APP<sup>-/-</sup></i> LORS DU TEST DE RAPPEL EN PISCINE DE MORRIS .....	154
FIGURE 55: FLEXIBILITÉ COMPORTEMENTALE DES RATS <i>APP<sup>+/-</sup></i> ET <i>APP<sup>-/-</sup></i> LORS DE LA PHASE D'EXTINCTION EN PISCINE DE MORRIS.....	156
FIGURE 56: APPRENTISSAGE SPATIAL CHEZ LES RATS <i>APP<sup>+/-</sup></i> ET <i>APP<sup>-/-</sup></i> LORS DU TEST DU DOUBLE H.....	159
FIGURE 57: STRATÉGIES POUVANT ÊTRE UTILISÉES LORS DES TESTS DE RAPPEL DANS LE TEST DU DOUBLE H ...	161
FIGURE 58: CAPACITÉS DE RAPPEL DE L'EMPLACEMENT DE LA PLATEFORME CHEZ LES RATS <i>APP<sup>+/-</sup></i> ET <i>APP<sup>-/-</sup></i> À L'ÂGE DE 2 MOIS LORS DU TEST DU DOUBLE H.....	162
FIGURE 59: CAPACITÉS DE RAPPEL DE L'EMPLACEMENT DE LA PLATEFORME CHEZ LES RATS <i>APP<sup>+/-</sup></i> ET <i>APP<sup>-/-</sup></i> À L'ÂGE DE 12 MOIS LORS DU TEST DU DOUBLE H.....	164
FIGURE 60: CAPACITÉS DE RAPPEL DE L'EMPLACEMENT DE LA PLATEFORME CHEZ LES RATS <i>APP<sup>+/-</sup></i> ET <i>APP<sup>-/-</sup></i> À L'ÂGE DE 18 MOIS LORS DU TEST DU DOUBLE H.....	166
FIGURE 61: EVOLUTION DE LA MASSE CÉRÉBRALE CHEZ LES RATS <i>APP<sup>+/-</sup></i> ET <i>APP<sup>-/-</sup></i> .....	168
FIGURE 62: VOLUME DES SOUS-RÉGIONS DU CORTEX PRÉFRONTAL MÉDIAN ET DE L'HIPPOCAMPE DORSAL CHEZ LA COHORTE DE 12 MOIS.....	171
FIGURE 63: SURFACE DE DIFFÉRENTES STRUCTURES CÉRÉBRALES AU NIVEAU DU STRIATUM CHEZ LA COHORTE DE 12 MOIS .....	173
FIGURE 64: SURFACE DE DIFFÉRENTES STRUCTURES CÉRÉBRALES AU NIVEAU DE L'HIPPOCAMPE DORSAL CHEZ LA COHORTE DE 12 MOIS .....	174
FIGURE 65: EXPRESSION DE LA PROTÉINE APLP1 DANS L'HIPPOCAMPE ET LE CORTEX PRÉFRONTAL MÉDIAN DES RATS <i>APP<sup>+/-</sup></i> ET <i>APP<sup>-/-</sup></i> PAR WESTERN BLOT .....	175
FIGURE 66: EXPRESSION DE LA PROTÉINE APLP2 DANS L'HIPPOCAMPE ET LE CORTEX PRÉFRONTAL MÉDIAN DES RATS <i>APP<sup>+/-</sup></i> ET <i>APP<sup>-/-</sup></i> PAR WESTERN BLOT .....	176
FIGURE 67: EXPRESSION DE LA PROTÉINE SNAP-25 DANS L'HIPPOCAMPE ET LE CORTEX PRÉFRONTAL MÉDIAN DES RATS <i>APP<sup>+/-</sup></i> ET <i>APP<sup>-/-</sup></i> PAR WESTERN BLOT.....	178
FIGURE 68: EXPRESSION DE LA PROTÉINE SYNAPTOPHYSINE DANS L'HIPPOCAMPE ET LE CORTEX PRÉFRONTAL MÉDIAN DES RATS <i>APP<sup>+/-</sup></i> ET <i>APP<sup>-/-</sup></i> PAR WESTERN BLOT.....	179
FIGURE 69: EXPRESSION DE LA PROTÉINE GFAP DANS L'HIPPOCAMPE ET LE CORTEX PRÉFRONTAL MÉDIAN DES RATS <i>APP<sup>+/-</sup></i> ET <i>APP<sup>-/-</sup></i> PAR WESTERN BLOT.....	180
FIGURE 70: EXPRESSION DE LA PROTÉINE S100B DANS L'HIPPOCAMPE ET LE CORTEX PRÉFRONTAL MÉDIAN DES RATS <i>APP<sup>+/-</sup></i> ET <i>APP<sup>-/-</sup></i> PAR WESTERN BLOT .....	181
FIGURE 71: VALIDATION DE LA CONSTRUCTION DES MODÈLES DUP(RNO11) ET DUP(RNO20) PAR DDPCR.....	184
FIGURE 72: VALIDATION DE LA CONSTRUCTION DES MODÈLES DUP(RNO11) ET DUP(RNO20) PAR CGH ARRAY. 185	185
FIGURE 73 : MASSE CORPORELLE DES RATS DUP(RNO20), DUP(RNO11) ET DUP(RNO11-20) À L'ÂGE DE 9 SEMAINES .....	186
FIGURE 74: ACTIVITÉ LOCOMOTRICE DES RATS DUP(RNO20), DUP(RNO11) ET DUP(RNO11-20) LORS DU TEST DE L'ACTIVITÉ CIRCADIANNE .....	188
FIGURE 75: ANXIÉTÉ ET MÉMOIRE DE TRAVAIL DANS LE LABYRINTHE EN Y CHEZ LES RATS DUP(RNO20), DUP(RNO11) ET DUP(RNO11-20) .....	190

FIGURE 76: DISTANCE PARCOURUE DANS LE TEST DU CHAMP OUVERT CHEZ LES RATS DUP(RNO20), DUP(RNO11) ET DUP(RNO11-20) .....	192
FIGURE 77: TEMPS PASSÉ À LA PÉRIPHÉRIE ET AU CENTRE DU CHAMP OUVERT CHEZ LES RATS DUP(RNO20), DUP(RNO11) ET DUP(RNO11-20) .....	193
FIGURE 78: MÉMOIRE SPATIALE À COURT TERME CHEZ LES RATS DUP(RNO20), DUP(RNO11) ET DUP(RNO11-20) LORS DU TEST DE L'OLM .....	195
FIGURE 79: MÉMOIRE DE RECONNAISSANCE CHEZ LES RATS DUP(RNO20), DUP(RNO11) ET DUP(RNO11-20) LORS DU TEST DU NOR.....	197
FIGURE 80: APPRENTISSAGE SPATIAL CHEZ LES RATS DUP(RNO20), DUP(RNO11) ET DUP(RNO11-20) LORS DE LA PHASE D'ACQUISITION EN PISCINE DE MORRIS .....	199
FIGURE 81: MÉMOIRE SPATIALE CHEZ LES RATS DUP(RNO20), DUP(RNO11) ET DUP(RNO11-20) LORS DU PREMIER TEST DE RAPPEL EN PISCINE DE MORRIS .....	202
FIGURE 82: FLEXIBILITÉ COMPORTEMENTALE CHEZ LES RATS DUP(RNO20), DUP(RNO11) ET DUP(RNO11-20) LORS DE LA PHASE DE REVERSAL EN PISCINE DE MORRIS.....	204
FIGURE 83: MÉMOIRE SPATIALE CHEZ LES RATS DUP(RNO20), DUP(RNO11) ET DUP(RNO11-20) LORS DU SECOND TEST DE RAPPEL EN PISCINE DE MORRIS .....	206
FIGURE 84: MASSE CORPORELLE DES RATS DUP(RNO20)-APP <sup>H2</sup> , DUP(RNO11)-APP <sup>H3</sup> ET DUP(RNO11-20)-APP <sup>H3</sup> À L'ÂGE DE 9 SEMAINES.....	210
FIGURE 85: ACTIVITÉ LOCOMOTRICE DES MODÈLES RATS DUP(RNO20)-APP <sup>H2</sup> , DUP(RNO11)-APP <sup>H3</sup> ET DUP(RNO11-20)-APP <sup>H3</sup> LORS DU TEST DE L'ACTIVITÉ CIRCADIENNE .....	212
FIGURE 86: ANXIÉTÉ ET MÉMOIRE DE TRAVAIL DANS LE LABYRINTHE EN Y CHEZ LES RATS DUP(RNO20)-APP <sup>H2</sup> , DUP(RNO11)-APP <sup>H3</sup> ET DUP(RNO11-20)-APP <sup>H3</sup> .....	214
FIGURE 87: DISTANCE PARCOURUE CHEZ LES RATS DUP(RNO20)-APP <sup>H2</sup> , DUP(RNO11)-APP <sup>H3</sup> ET DUP(RNO11-20)-APP <sup>H3</sup> DANS LE TEST DU CHAMP OUVERT.....	216
FIGURE 88: TEMPS PASSÉ À LA PÉRIPHÉRIE ET AU CENTRE DU CHAMP OUVERT CHEZ LES RATS DUP(RNO20)-APP <sup>H2</sup> , DUP(RNO11)-APP <sup>H3</sup> ET DUP(RNO11-20)-APP <sup>H3</sup> .....	217
FIGURE 89: MÉMOIRE SPATIALE À COURT TERME CHEZ LES RATS DUP(RNO20)-APP <sup>H2</sup> , DUP(RNO11)-APP <sup>H3</sup> ET DUP(RNO11-20)-APP <sup>H3</sup> LORS DU TEST DE L'OLM .....	218
FIGURE 90: MÉMOIRE DE RECONNAISSANCE CHEZ LES RATS DUP(RNO20)-APP <sup>H2</sup> , DUP(RNO11)-APP <sup>H3</sup> ET DUP(RNO11-20)-APP <sup>H3</sup> LORS DU TEST DU NOR.....	220
FIGURE 91 : APPRENTISSAGE SPATIAL CHEZ LES RATS DUP(RNO20)-APP <sup>H2</sup> , DUP(RNO11)-APP <sup>H3</sup> ET DUP(RNO11-20)-APP <sup>H3</sup> LORS DE LA PHASE D'ACQUISITION EN PISCINE DE MORRIS.....	223
FIGURE 92: MÉMOIRE SPATIALE CHEZ LES RATS DUP(RNO20)-APP <sup>H2</sup> , DUP(RNO11)-APP <sup>H3</sup> ET DUP(RNO11-20)-APP <sup>H3</sup> LORS DU PREMIER TEST DE RAPPEL EN PISCINE DE MORRIS .....	225
FIGURE 93: FLEXIBILITÉ COMPORTEMENTALE CHEZ LES RATS DUP(RNO20)-APP <sup>H2</sup> , DUP(RNO11)-APP <sup>H3</sup> ET DUP(RNO11-20)-APP <sup>H3</sup> LORS DE LA PHASE DE REVERSAL EN PISCINE DE MORRIS.....	227
FIGURE 94: MÉMOIRE SPATIALE CHEZ LES RATS DUP(RNO20)-APP <sup>H2</sup> , DUP(RNO11)-APP <sup>H3</sup> ET DUP(RNO11-20)-APP <sup>H3</sup> LORS DU SECOND TEST DE RAPPEL EN PISCINE DE MORRIS.....	230



## LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : SYNTHÈSE DES RÉSULTATS DES ÉTUDES COMPORTEMENTALES RÉALISÉES CHEZ LES MODÈLES DE SOURIS APP-KO .....	40
TABLEAU 2 : SYNTHÈSE DES RÉSULTATS DES ANALYSES CELLULAIRES ET MOLÉCULAIRES RÉALISÉES CHEZ LES MODÈLES DE SOURIS APP-KO .....	43
TABLEAU 3 : EFFECTIFS D'ANIMAUX PAR GÉNOTYPES POUR CHAQUE COHORTE.....	75
TABLEAU 4 : COMPOSITION DU MIX POUR L'AMPLIFICATION DE L'ADN LORS DE LA PCR .....	77
TABLEAU 5 : CONDITIONS DE RÉALISATION DE LA PCR DES RATS APP-KO .....	77
TABLEAU 6: CONDITIONS UTILISÉES POUR CHACUNE DES PROTÉINES CIBLÉES POUR LA RÉALISATION DES WESTERN BLOTS.....	91
TABLEAU 7: SÉQUENCES DES AMORCES ET DES SONDAS DES GÈNES CIBLÉS POUR LA VALIDATION DU MODÈLE DUP(RNO11) PAR DDPCR.....	100
TABLEAU 8: SÉQUENCES DES AMORCES ET DES SONDAS DES GÈNES CIBLÉS POUR LA VALIDATION DU MODÈLE DUP(RNO20) PAR DDPCR.....	101
TABLEAU 9: SÉQUENCES DES AMORCES ET DES SONDAS POUR LE GÉNOTYPAGE PAR DDPCR DE LA DUPLICATION DE LA RÉGION RNO11 .....	109
TABLEAU 10: SÉQUENCES DES AMORCES UTILISÉES POUR LES PCR-WT ET DUP DU MODÈLE DUP(RNO20) .....	110
TABLEAU 11: SÉQUENCES DES AMORCES ET DES SONDAS POUR LE GÉNOTYPAGE PAR DDPCR DE LA DUPLICATION DE LA RÉGION RNO20.....	111
TABLEAU 12: SYNTHÈSE DES RÉSULTATS DE L'ÉTUDE COMPORTEMENTALE RÉALISÉE CHEZ LES RATS <i>APP<sup>+/-</sup></i> ET <i>APP<sup>-/-</sup></i> .....	170
TABLEAU 13: SYNTHÈSE DES RÉSULTATS DE L'ANALYSE MOLÉCULAIRE RÉALISÉE PAR WESTERN BLOT CHEZ LES RATS <i>APP<sup>+/-</sup></i> ET <i>APP<sup>-/-</sup></i> .....	182
TABLEAU 14 : SYNTHÈSE DES RÉSULTATS DE L'ÉTUDE COMPORTEMENTALE RÉALISÉE CHEZ LES RATS DUP(RNO20), DUP(RNO11) ET DUP(RNO11-20) .....	208
TABLEAU 15 : SYNTHÈSE DES RÉSULTATS DE L'ÉTUDE COMPORTEMENTALE RÉALISÉE CHEZ LES RATS DUP(RNO20)-APP <sup>H2</sup> , DUP(RNO11)-APP <sup>H3</sup> ET DUP(RNO11-20)-APP <sup>H3</sup> .....	232





---

# **INTRODUCTION**

---



## CHAPITRE I : L'APP : structure, métabolisme et fonctions physiologiques

Le gène codant pour le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde, ou «  *$\beta$ -amyloid precursor protein* » (noté *APP*), a été identifié pour la première fois en 1987 (Goldgaber et al. 1987; Kang et al. 1987; Tanzi et al. 1987). Il est localisé sur le chromosome 21 humain (Hsa21) en 21q21.3 et s'étend sur environ 290 kilobases (kb) (données tirées d'Ensembl, version du génome GRCh38.p13). Il code pour une protéine homonyme, *APP*, et se compose de 18 exons qui peuvent faire l'objet d'un épissage alternatif. Ainsi, 17 transcrits ont été décrits à ce jour (données tirées d'Ensembl), dont les 3 principaux sont l'APP770, l'APP751 et l'APP695. Ces isoformes se distinguent par la longueur de leur séquence en acides aminés qui est indiquée par un nombre dans leur appellation. Ainsi, l'APP770 est la forme la plus longue.

Le gène *APP* est hautement conservé entre les espèces ; il en existe à ce jour 279 orthologues (données tirées d'Ensembl). On le retrouve ainsi sur le chromosome 16 chez la souris et sur le chromosome 11 chez le rat, avec, respectivement, 88% et 89% d'homologie au niveau du gène (alignement des séquences nucléotidiques réalisé sur blast.ncbi.nlm.nih.gov). Il est également présent chez la Drosophile *Drosophila melanogaster*, où le gène est appelé *App1* pour *APP-like* (Rosen et al. 1989), ou encore chez le vers *Caenorhabditis elegans*, sous l'appellation *Apl-1* pour *Amyloid- $\beta$ -like protein* (Daigle et Li 1993) (homologie faible au niveau du gène). Par ailleurs, chez les mammifères, le gène *APP* fait partie d'une famille de gènes incluant deux autres membres appelés *APLP1* et *APLP2*, pour *APP-like protein 1/2* (Wasco et al. 1992; 1993). Ces gènes présentent une homologie de 73% et 71% avec le gène *APP* (alignement des séquences nucléotidiques des gènes humains réalisé sur blast.ncbi.nlm.nih.gov).

### I- Structure de la protéine APP

L'APP est une glycoprotéine transmembranaire de type I, c'est-à-dire que sa région N-terminale (N-ter) se situe du côté extracellulaire et sa région C-terminale (C-ter) du côté cytoplasmique. Elle se compose d'un large domaine extracellulaire, d'un unique domaine transmembranaire et d'un court domaine intracellulaire (U. C. Müller, Deller, et Korte 2017) (**Figure 1-A**).

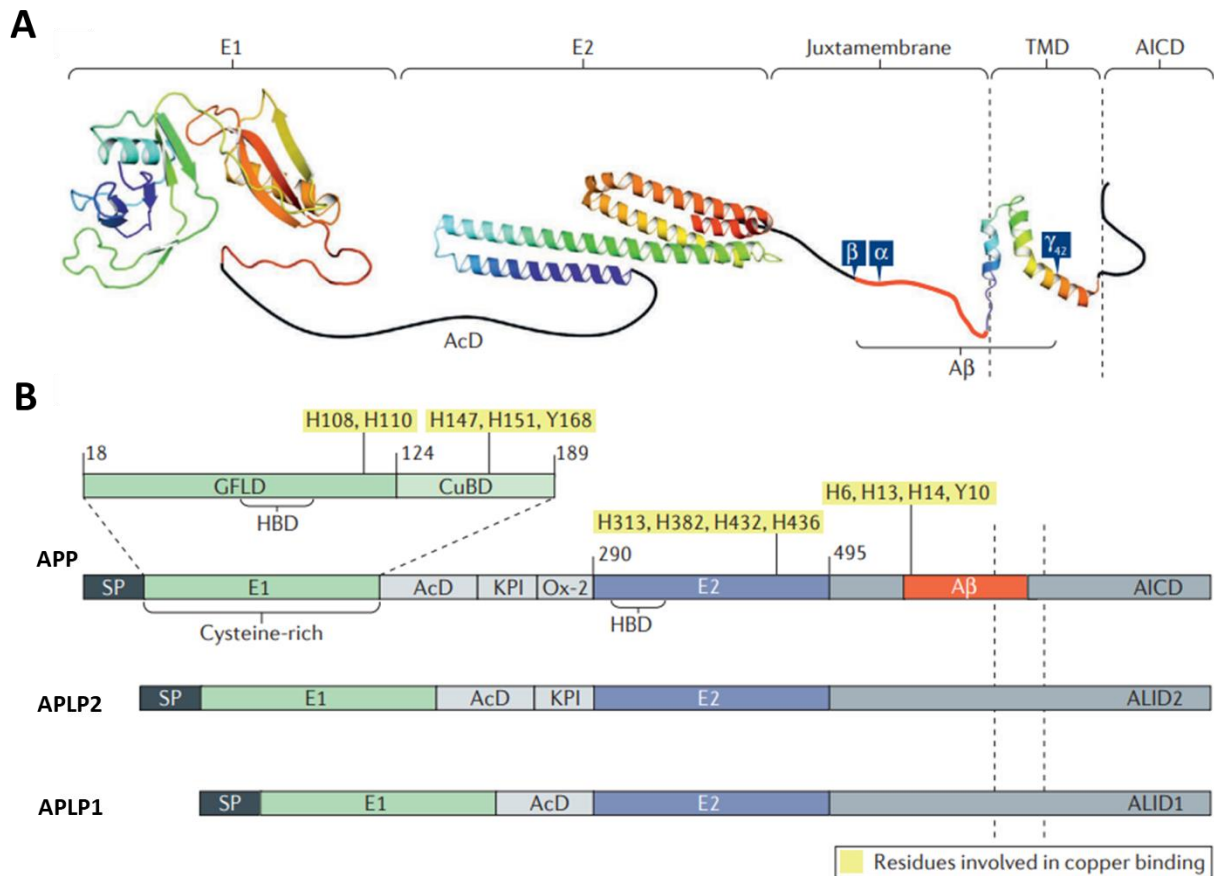
Le domaine extracellulaire, ou ectodomaine, de l'APP débute par un peptide-signal qui va permettre son adressage, en début de synthèse, dans le réticulum endoplasmique (**Figure 1-B**). Par la suite, on distingue

6 sous-domaines. Tout d'abord, le domaine E1 est un domaine riche en cystéine qui présente des similarités avec certains facteurs de croissance (Rossjohn et al. 1999). Il peut être subdivisé en 2 domaines : un domaine ressemblant aux facteurs de croissance riche en cystéine, contenant un site de liaison à l'héparine, et un domaine de liaison au cuivre. Le domaine E1 est suivi d'une région riche en acide glutamique et acide aspartique, appelée domaine acide dont la fonction est inconnue. S'en suit un domaine inhibiteur de protéases de type Kunitz (KPI) et le domaine Ox-2. Ces derniers, correspondant aux exons 7 et 8 du gène *App*, sont absents de l'isoforme APP695 pour laquelle ces exons ont été épissés. Concernant l'isoforme APP751, elle est issue de l'épissage de l'exon 8, elle est donc dépourvue du domaine Ox-2. Ainsi, seule l'isoforme APP770 possède ces deux domaines. Enfin, on trouve le domaine E2 qui est riche en hélices  $\alpha$ . Il contient le second site de liaison à l'héparine ainsi que plusieurs sites de liaisons aux métaux, comme le cuivre ou le fer.

Vient ensuite la région juxta-membranaire qui permet de faire le lien entre le domaine E2 et le domaine transmembranaire. Cette région contient notamment les sites de clivages des enzymes  $\alpha$ - et  $\beta$ -sécrétases dont les voies protéolytiques seront décrites par la suite (Partie IV). C'est également dans cette région que débute la séquence du peptide  $\beta$ -amyloïde ( $A\beta$ ) qui se poursuit ensuite dans le domaine transmembranaire. Ce dernier comporte le site de clivage d'une troisième enzyme appelée  $\gamma$ -sécrétase.

Enfin, le domaine intracellulaire possède plusieurs sites de phosphorylation (van der Kant et Goldstein 2015). Il présente également un motif YENPTY qui est un motif d'internalisation impliqué dans l'endocytose de l'APP. Ce domaine intracellulaire est, par ailleurs, hautement conservé avec les autres membres de la famille APP (APLP1 et APLP2).

La majorité des domaines présents dans la structure de l'APP est retrouvée dans les protéines APLP1 et APLP2. En effet, les domaines E1, E2 et la région acide sont également présents chez ces dernières, la protéine APLP2 possède en plus le domaine KPI (U. C. Müller, Deller, et Korte 2017). Cependant, la séquence de l' $A\beta$  est spécifique de l'APP et n'est pas retrouvée chez les autres membres.



**Figure 1 : Structure de la protéine APP**

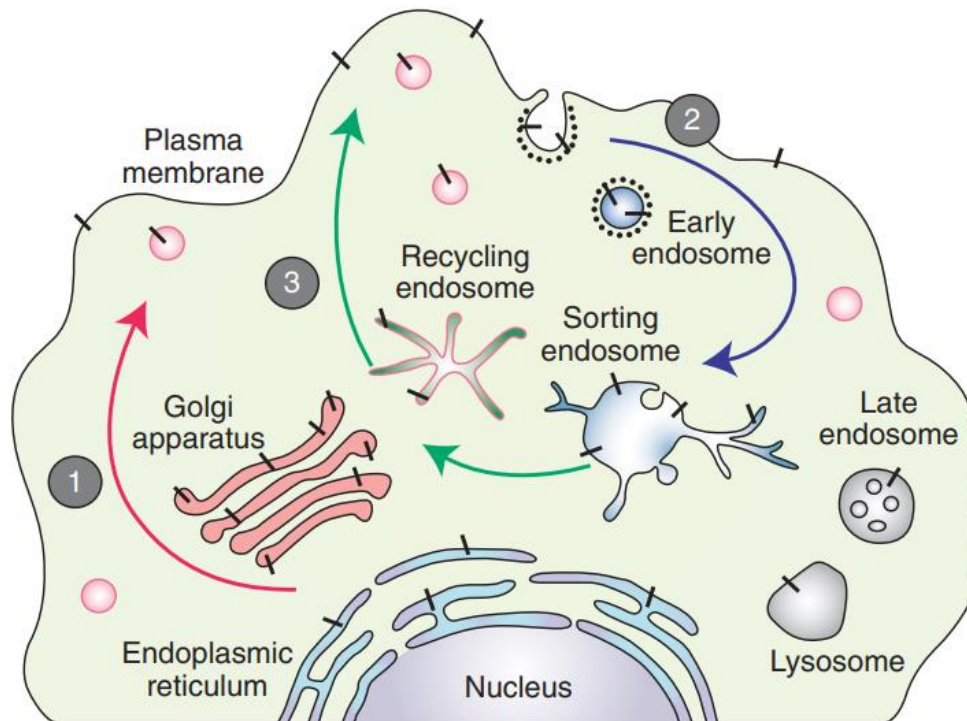
(A) Représentation de la structure tridimensionnelle de la protéine APP basée sur l'isoforme APP695. L'APP est constituée d'un large domaine extracellulaire divisé en 4 sous-domaines dans le cas de l'APP695 : le domaine E1 qui est riche en cystéines, le domaine acide (AcD), le domaine E2 qui est riche en hélices  $\alpha$  et le domaine juxta-membranaire. Ce dernier contient le site de clivage des enzymes  $\alpha$ - et  $\beta$ -sécrétases, indiquées par les lettres  $\alpha$  et  $\beta$ , respectivement. La séquence du peptide A $\beta$ , indiquée en rouge, est à cheval entre le domaine juxta-membranaire et le domaine transmembranaire de l'APP (TMD) qui contient le site de clivage de la  $\gamma$ -sécrétase ( $\gamma$ ). Enfin, l'APP comporte un court domaine intracellulaire (AICD). (B) Représentation des différents domaines de la protéine APP et des protéines APLP1 et APLP2. Certains des domaines présents dans la structure de l'APP sont retrouvés dans les protéines APLP1 et APLP2. La séquence de l'A $\beta$  est, quant à elle, spécifique à l'APP. La numérotation des acides aminés se réfère à l'isoforme APP695. SP : Peptide Signal ; GFLD : domaine ressemblant aux facteurs de croissance riche en cystéines (Growth Factor-Like Domain) ; HBD : domaine de liaison à l'héparine ; CuBD : domaine de liaison au cuivre ; KPI : domaine inhibiteur de protéases de type Kunitz ; Ox-2 : domaine Ox-2 ; ALID : domaine intracellulaire des protéines APLP (APP-Like Protein Intracellular Domain) ; H : résidu histidine ; Y : résidu tyrosine. (Figure de Müller et al. 2017).



## II- Synthèse de l'APP

La synthèse de la protéine APP se fait via la voie sécrétoire (**Figure 2**). En effet, la présence d'un peptide-signal au début de sa séquence permet son adressage au réticulum endoplasmique dans lequel l'APP sera synthétisée. Elle est ensuite transférée dans l'appareil de Golgi avant son transport à la membrane plasmique. Entre sa synthèse et son arrivée à la membrane, l'APP subit un processus de maturation via des modifications post-traductionnelles. Ces dernières incluent une N- et O-glycosylation, des phosphorylations, de la palmitoylation, ou encore des sulfatations de la tyrosine (Weidemann et al. 1989; Oltersdorf et al. 1990; Walter et al. 1997; Bhattacharyya, Barren, et Kovacs 2013). Des altérations dans ces processus de maturation peuvent influencer la voie protéolytique par laquelle l'APP sera clivée. Ainsi, une fois l'APP arrivée à la membrane, elle peut être clivée selon les voies protéolytiques décrites dans la partie IV. Si elle n'est pas clivée, elle est internalisée rapidement du fait de la présence du motif YENPTY dans son domaine intracellulaire. L'endocytose de l'APP se fait par un mécanisme dépendant de la clathrine. Elle est ainsi transportée jusqu'aux endosomes précoces qui sont des vésicules présentes dans le cytoplasme, ils constituent la première étape de la voie endolysosomale. Deux devenir sont alors possibles. Une fraction de l'APP est recyclée et renvoyée à la membrane, alors que l'autre fraction est dégradée par transfert dans les lysosomes. A noter que seulement 10% de l'APP synthétisée sont présents à la membrane lorsque la cellule est à l'état de repos. La majorité de l'APP reste ainsi dans l'appareil de Golgi (Haass et al. 2012) .

Dans le cas des neurones, une fois l'APP sortie de l'appareil de Golgi, elle est transportée jusqu'aux axones via un transport axonal rapide (Koo et al. 1990). Par ailleurs, elle est également présente dans les dendrites. Il a ainsi été proposé qu'une fraction de l'APP dans les axones est transportée dans les dendrites par un mécanisme de transcytose (Simons et al. 1995). Cela correspond au transport de molécules d'une surface de la cellule à une autre via des vésicules. Cependant, le mécanisme par lequel l'APP est adressée aux axones ou aux dendrites est mal compris.



**Figure 2 : Voie de synthèse de l'APP**

(1) L'APP est synthétisée via la voie sécrétoire. Elle est donc adressée au réticulum endoplasmique, avant d'être transférée dans l'appareil de Golgi, puis transportée à la membrane plasmique. (2) Une fois à la membrane, l'APP est clivée ou rapidement internalisée, elle est alors transportée jusqu'aux endosomes précoces. (3) Une fraction de l'APP internalisée est alors recyclée à la membrane, le reste est dégradé dans les lysosomes. (Figure de Haass et al. 2012)

### III- Expression

L'APP est exprimée de façon ubiquitaire. Ainsi, chez l'Homme, son ARNm est détecté aussi bien dans le cerveau que dans les tissus périphériques tels que le cœur, les reins, les muscles, les poumons, le pancréas, ou encore le foie (Kang et Müller-Hill 1990; Tanaka et al. 1989). Le plus haut niveau d'expression de l'APP est détecté dans le cerveau. Dans ce dernier, c'est l'isoforme APP675 qui est majoritairement exprimée, alors que l'ARNm des isoformes APP770 et APP751 est principalement détecté dans les tissus périphériques. Un profil d'expression similaire est retrouvé chez le rat dont la protéine APP présente 97% d'homologie avec l'APP humaine. Ainsi, son ARNm est retrouvé dans les mêmes tissus que cités précédemment avec une répartition similaire des différentes isoformes (Kang et Müller-Hill 1990).

Par ailleurs, des études ont été réalisées afin de déterminer le type cellulaire dans lequel est exprimée l'APP dans le cerveau. Bien que plusieurs études réalisées *in vitro* sur des cultures d'astrocytes montrent une expression de l'APP (LeBlanc et al. 1991; Rohan de Silva et al. 1997), celle-ci n'a pas été démontrée *in*

*vivo*. En effet, la réalisation d'immunomarquage sur des coupes de cerveaux montre une expression de l'APP dans les neurones de l'hippocampe, mais pas dans les cellules gliales (astrocytes, microglies, oligodendrocytes) (Guo et al. 2012; Del Turco et al. 2016). Ces différences de résultats pourraient être en partie liées à la spécificité des anticorps. L'étude de Guo et al. (2012) montre que certains anticorps manquent de spécificité dans le cadre d'approches immunohistochimiques.

Par ailleurs, le profil d'expression des autres membres de la famille de l'APP a également été étudié. Ainsi, l'expression d'APLP1 est restreinte au système nerveux (Lorent et al. 1995). À l'inverse, APLP2 présente une expression ubiquitaire avec un pattern d'expression semblable à celui de l'APP.

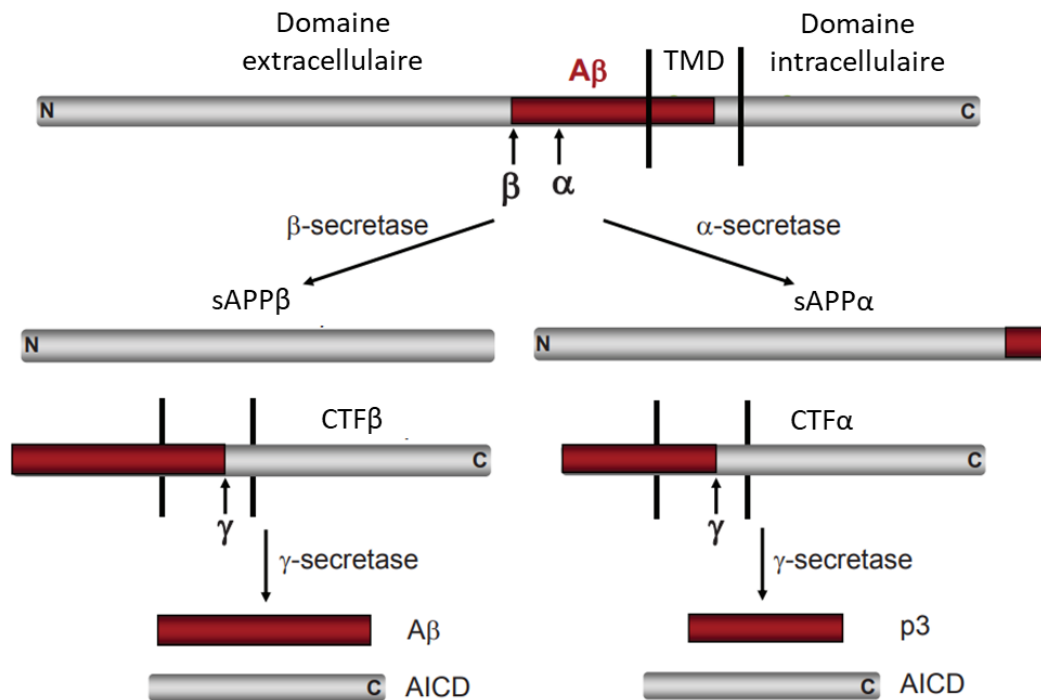
## **IV- Voies protéolytiques**

Au cours de sa vie, la protéine APP peut être clivée par différentes enzymes. Les deux voies protéolytiques principales connues sont les voies amyloïdogénique et non-amyloïdogénique (Haass et al. 2012). Cependant, au cours des dernières années, plusieurs nouvelles voies protéolytiques ont été identifiées (Andrew et al. 2016; Norstrom 2017).

### **1- Les voies canoniques**

#### **1.1- La voie amyloïdogénique**

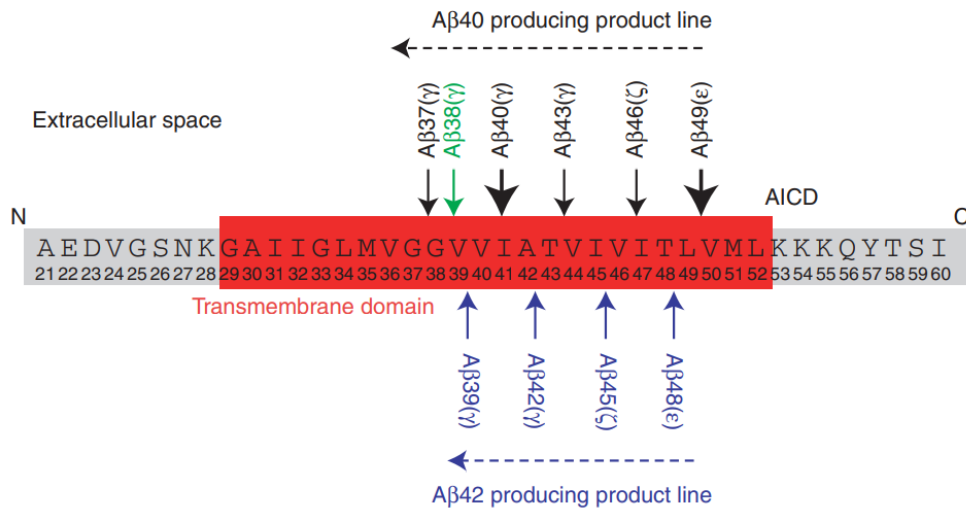
Le clivage de l'APP par la voie amyloïdogénique fait intervenir une enzyme appelée  $\beta$ -sécrétase (**Figure 3**). Cette enzyme clive l'APP dans son ectodomaine, ce qui conduit à la production d'un fragment extracellulaire soluble, appelé sAPP $\beta$ , qui est libéré dans le milieu extracellulaire. Cela donne également lieu à un fragment qui reste lié à la membrane, appelé CTF $\beta$  pour *C-Terminal Fragment- $\beta$*  ou C99. Le CTF $\beta$  est à son tour clivé par une autre enzyme appelée  $\gamma$ -sécrétase. Cela donne naissance au peptide A $\beta$ , qui constitue les plaques amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer, et au fragment AICD (*APP Intracellular Domain*).



**Figure 3 : Voies de clivages amyloïdogénique et non-amyloïdogénique de l'APP**

Dans la voie amyloïdogénique, l'APP est clivée par l'enzyme β-sécrétase donnant naissance aux fragments sAPPβ et CTFβ. Ce dernier est à son tour clivé par la γ-sécrétase pour produire le peptide Aβ et le fragment AICD. Dans la voie non-amyloïdoénique, l'APP est clivée par l'enzyme α-sécrétase. Cela conduit à la production des fragment sAPPα et CTFα. La γ-sécrétase va ensuite cliver le fragment CTFα ce qui génère les fragments p3 et AICD. Les lettres β, α et γ indiquent le site de clivage des enzymes β-sécrétase, α-sécrétase et γ-sécrétase, respectivement. TDM : domaine transmembranaire. (Figure adaptée de Zheng et Koo 2011)

Le clivage par la γ-sécrétase se fait dans le domaine transmembranaire. Cette enzyme possède 3 sites de clivages possibles situés dans la région C-ter de l'Aβ (**Figure 4**). En effet, cette dernière clive de façon successive l'APP donnant naissance à des peptides Aβ de longueur variable. Ainsi, le premier clivage de la γ-sécrétase se fait au site ε qui se situe après l'acide aminé 48 ou 49. Ensuite, l'APP est clivée au site ζ, soit après l'acide aminé 45 ou 46. Enfin, le dernier clivage au site γ n'est pas aussi précis que les 2 précédents. En effet, il peut avoir lieu après les acides aminés 37, 38, 39, 40, 42 ou 43, mais il se fait principalement après les acides aminés 40 ou 42. Ainsi, la succession de ces 3 clivages peut donner naissance à des peptides Aβ dont la longueur varie entre 37 et 43 acides aminés. Dans des conditions physiologiques, 90% de l'Aβ produit l'est sous la forme de 40 acides aminés (Aβ40), l'Aβ42 représentant seulement 10% de la production (Thinakaran et Koo 2008). Ce dernier est considéré comme plus neurotoxique et plus enclin à l'agrégation.



**Figure 4 : Sites de clivages de l'enzyme γ-sécrétase dans le domaine transmembranaire de l'APP**

La γ-sécrétase possède 3 sites de clivages dans le domaine transmembranaire de l'APP : le site ε après l'acide aminé 48 ou 49, le site ζ après l'acide aminé 45 ou 46, le site γ après les acides aminés 37, 38, 39, 40, 42 et 43. Cette succession de clivages permet de générer des peptides Aβ dont la taille varie entre 37 et 43 acides aminés. (Figure de Haass et al. 2012)

### 1.2- La voie non-amyloïdogénique

Le clivage de l'APP par la voie non-amyloïdogénique empêche la production du peptide Aβ. En effet, dans un premier temps, l'APP est clivée par l'enzyme α-sécrétase dans la séquence de l'Aβ, au niveau de l'ectodomaine (**Figure 3**). Comme lors du clivage par la β-sécrétase, cela conduit à la production d'un fragment extracellulaire soluble et d'un fragment lié à la membrane, appelés respectivement sAPPα et CTFα (*C-Terminal Fragment α*) ou C83. Ce dernier est également clivé par la γ-sécrétase donnant naissance à un petit peptide de 3kDa, appelé p3, qui est libéré au niveau extracellulaire. Cela conduit également à la production d'un fragment AICD, libéré dans le cytoplasme.

### 1.3- Les enzymes α, β et γ-sécrétases

#### La β-sécrétase

La BACE-1 (*β-site APP-Cleaving Enzyme 1*) est l'enzyme qui a été identifiée comme possédant les propriétés pour cliver l'APP au niveau du site de la β-sécrétase (Sinha et al. 1999; Vassar et al. 1999; Lin et al. 2000). Il s'agit d'une aspartyl-protéase transmembranaire qui est présente dans l'appareil de Golgi, au niveau de la membrane plasmique ou encore dans les endosomes précoces. Ces derniers constituent le site majeur de clivage de l'APP par la β-sécrétase. Par ailleurs, l'APP et BACE-1 interagissent au niveau de la membrane

plasmique, constituant ainsi un site potentiel de clivage (Kinoshita et al. 2003). Bien que la BACE-1 soit exprimée de façon ubiquitaire, son plus haut niveau d'expression se trouve dans le cerveau. C'est également dans ce dernier qu'elle est la plus active (Sinha et al. 1999). Ainsi, dans le cerveau, la voie amyloïdogénique constitue la voie principale de clivage de l'APP. A l'inverse, c'est la voie non amyloïdogénique qui est majoritaire dans les autres organes.

Par ailleurs, il a été proposé que la cathepsine B puisse cliver l'APP au site de la  $\beta$ -sécrétase. Son rôle reste cependant controversé, des résultats contradictoires étant observés quant à son effet sur la production d'A $\beta$  (Andrew et al. 2016).

### L' $\alpha$ -sécrétase

L'enzyme  $\alpha$ -sécrétase a été identifiée comme membre de la famille des Métalloprotéases et Désintégrines ADAM (*A Disintegrin And Metalloprotease*). Plusieurs enzymes de cette famille ont ainsi été identifiées comme possédant une activité  $\alpha$ -sécrétase. Ces enzymes sont ADAM9 (ou MDC9, *Metalloprotease/Disintegrin/Cysteine-rich Protein 9*) (Koike et al. 1999), ADAM10 (Lammich et al. 1999), ADAM17 (ou TACE, *Tumor Necrosis Factor-Alpha Converting Enzyme*) (Buxbaum et al. 1998) et ADAM19 (Asai et al. 2003; Tanabe et al. 2007). Par ailleurs, dans les neurones, ADAM10 serait la principale  $\alpha$ -sécrétase (Kuhn et al. 2010). Le clivage de l'APP par l' $\alpha$ -sécrétase est localisé à la membrane plasmique où l'enzyme est exprimée.

### La $\gamma$ -sécrétase

L'enzyme  $\gamma$ -sécrétase est un complexe qui se compose de 4 sous-unités : la préséniline 1 ou 2 (PS1 ou PS2), la nicastrine (NCT), l'*Anterior pharynx-defective 1* (APH-1) et la *Presenilin enhancer 2* (PEN-2) (Edbauer et al. 2003). Ainsi, il a été proposé que, dans un premier temps, APH-1 et NCT forment un complexe intermédiaire qui recrute ensuite la PS puis la PEN-2 (LaVoie et al. 2003). APH-1 aurait un rôle dans l'assemblage du complexe et permettrait de stabiliser la PS. Cette dernière subit alors une endoprotéolyse impliquant PEN-2 (Luo et al. 2003). Ce clivage donne naissance à 2 fragments, un fragment N-ter de 27-28kDa et un fragment C-ter de 16-17kDa. Ces fragments restent associés, ce qui forme un hétérodimère. C'est sous cette forme que la PS est active, conférant ainsi l'activité enzymatique au complexe de la  $\gamma$ -sécrétase (Thinakaran et al. 1996; Wolfe et al. 1999). Le rôle joué par la NCT est un peu moins clair : elle jouerait un rôle dans la sélection des substrats. En effet, elle serait capable d'exclure les substrats en fonction de la taille de leur ectodomaine, évitant ainsi le clivage de protéines qui ne sont pas des substrats de la  $\gamma$ -sécrétase (Bolduc et al. 2016).

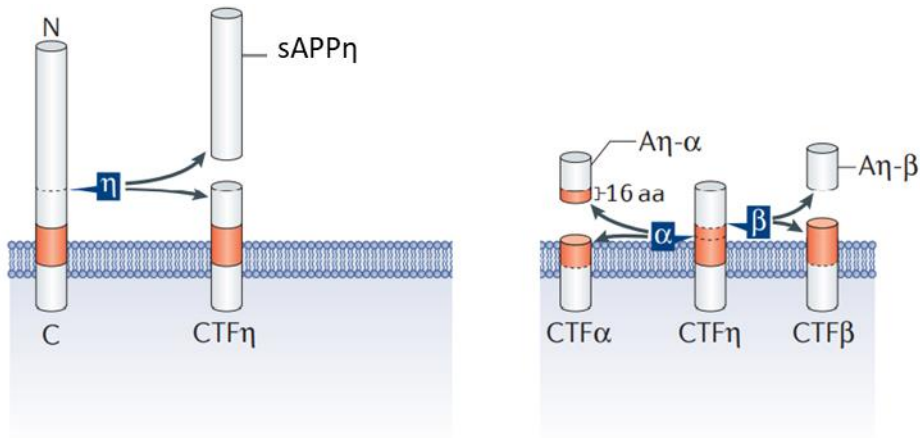
Le complexe de la  $\gamma$ -sécrétase sous sa forme mature est principalement exprimé au niveau de la membrane plasmique et dans le système endolysosomal. Ainsi, la  $\gamma$ -sécrétase est capable de cliver l'APP à la membrane plasmique (Chyung, Raper, et Selkoe 2005), une activité  $\gamma$ -sécrétase peut également être détectée dans les lysosomes (Pasternak et al. 2003).

## 2- Les nouvelles voies de clivages

En plus des voies de clivages amyloïdogéniques et non-amyloïdogéniques décrites ci-dessus, cinq nouvelles voies protéolytiques pour l'APP ont été décrites à ce jour (Andrew et al. 2016; U. C. Müller, Deller, et Korte 2017; Norstrom 2017).

### Voie de la $\eta$ -sécrétase

Comme pour les voies amyloïdogénique et non-amyloïdogénique, le clivage de l'APP par l'enzyme  $\eta$ -sécrétase conduit à la production d'un fragment extracellulaire soluble et d'un fragment lié à la membrane, appelés sAPP $\eta$  et CTF $\eta$ , respectivement. Ce dernier peut être à son tour clivé par l' $\alpha$ - ou la  $\beta$ -sécrétase, ou dégradé dans les lysosomes. Dans le cas d'un clivage par l' $\alpha$ -sécrétase, cela donne naissance aux fragments A $\eta$ - $\alpha$  et CTF $\alpha$ . Si le clivage se fait via la  $\beta$ -sécrétase, les fragments obtenus sont appelés A $\eta$ - $\beta$  et CTF $\beta$ . L'enzyme identifiée comme ayant une activité  $\eta$ -sécrétase est une protéase appelée MT5-MMP (*Membrane Type-5 Matrix Metalloproteinase*) (**Figure 5**).



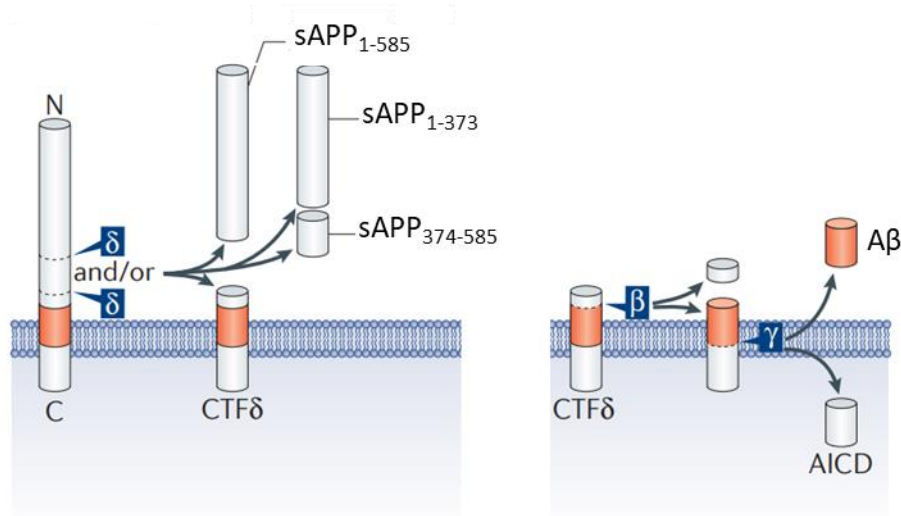
### Figure 5 : Clivage de l'APP par l'enzyme η-sécrétase

Le site de clivage de l'enzyme η-sécrétase se situe dans le domaine extracellulaire de l'APP. Ce clivage permet de générer les fragments sAPPη et CTFη. Ce dernier est ensuite clivé par l'enzyme α- ou β-sécrétase ce qui donne naissance aux fragments Aη-α et CTFα, ou Aη-β et CTFβ, respectivement. Le fragment rouge correspond à la séquence de l'Aβ. (Figure adaptée de Müller et al. 2017)

### Voie de la δ-sécrétase

Dans cette voie protéolytique, le clivage de l'APP peut se produire en 2 sites différents dans son ectodomaine via l'enzyme AEP (*Asparagine endopeptidase*). Comme son nom l'indique, cette enzyme clive après les résidus asparagine (Asp). Ainsi, le premier site de clivage situé après l'Asp373 conduit à la production des fragments sAPP<sub>1-373</sub> et CTFδ<sub>374</sub>. Ce dernier peut être clivé au second site de clivage de la δ-sécrétase, soit après l'Asp585, donnant lieu à un fragment soluble appelé sAPP<sub>374-585</sub>. Par ailleurs, la δ-sécrétase peut cliver directement l'APP après l'Asp585, sans clivage préalable après l'Asp373. Cela conduit à la production de sAPP<sub>1-585</sub> et CTFδ<sub>586</sub>. Le fragment CTFδ<sub>586</sub> peut être à son tour clivé par l'enzyme β-sécrétase, puis par la γ-sécrétase. Cela conduit notamment à la production d'Aβ et d'AICD (**Figure 6**).





### Figure 6 : Clivage de l'APP par l'enzyme δ-sécrétase

La δ-sécrétase possède deux sites de clivages dans le domaine extracellulaire de l'APP, ce qui donne naissance aux fragments sAPP<sub>1-585</sub>, sAPP<sub>1-373</sub>, sAPP<sub>374-585</sub> et CTFδ<sub>586</sub>. Le fragment CTFδ<sub>586</sub> peut ensuite être clivé de façon successive par les enzymes β- et γ-sécrétase ce qui permet de générer les fragments Aβ (en rouge) et AICD. (Figure adaptée de Müller et al. 2017)

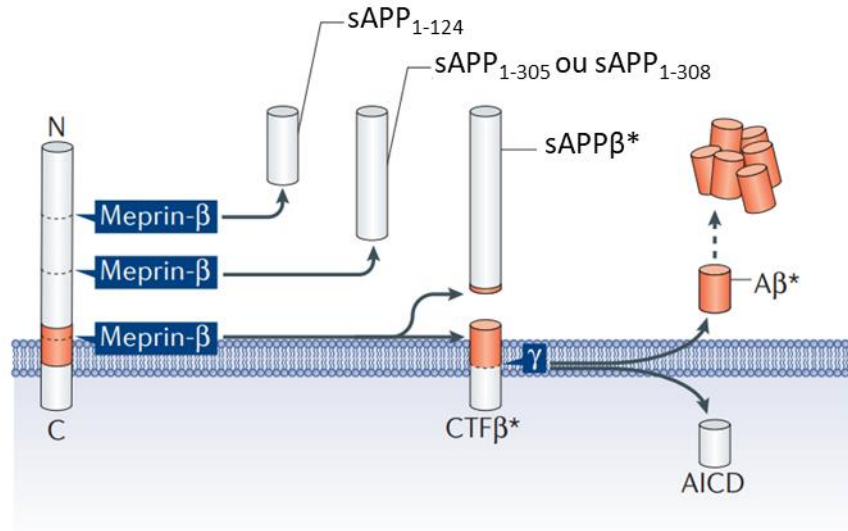
### Voie de la θ-sécrétase

L'activité θ-sécrétase a été attribuée à l'enzyme BACE-2 qui partage 75% d'homologie avec la BACE1. Cette enzyme est capable de cliver l'APP au niveau du site de la β-sécrétase avec cependant une affinité bien moins importante que la BACE-1. Par ailleurs, elle est également capable de cliver l'APP au site θ qui se situe juste en-dessous du site de l'α-sécrétase. Cela empêche donc la production d'Aβ puisque le site θ est localisé dans la séquence de l'Aβ. Ce clivage va ainsi donner naissance au sAPPθ et au CTFθ. Ce dernier est clivé par la γ-sécrétase donnant un peptide p3-like et l'AICD.

### Voie de la Méprine-β

La Méprine-β est une métalloprotéase à zinc capable de cliver l'APP au site de la β-sécrétase ou à proximité de ce dernier. Ce clivage produit ainsi des fragments qui ressemblent au sAPPβ (sAPPβ\*) et au CTFβ (CTFβ\*). Ces derniers ont, respectivement, 2 acides aminés en plus ou en moins comparés aux fragments générés dans la voie amyloïdogénique. Le CTFβ\* est ensuite clivé par la γ-sécrétase permettant de générer un peptide Aβ tronqué, noté Aβ\* ou Aβ<sub>2-x</sub>, et l'AICD. Ainsi, ce peptide Aβ\* débute au deuxième acide aminé de la séquence de l'Aβ.

Par ailleurs, la Méprine- $\beta$  possède 3 autres sites de clivage dans l'ectodomaine de l'APP. Ces derniers sont situés après les acides aminés 124, 305 et 308, et conduisent à la production de fragments solubles appelés sAPP<sub>124</sub>, sAPP<sub>305</sub> et sAPP<sub>308</sub> (**Figure 7**).

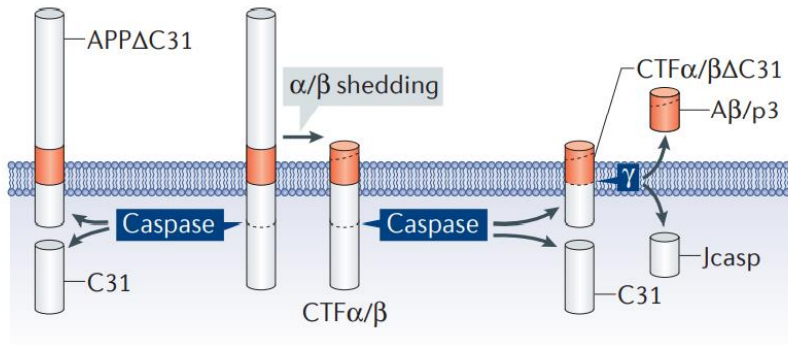


### Figure 7 : Clivage de l'APP par l'enzyme Méprine- $\beta$

La Méprine- $\beta$  possède trois sites de clivages dans le domaine extracellulaire de l'APP permettant de générer les fragments sAPP<sub>1-124</sub>, sAPP<sub>1-305</sub> ou sAPP<sub>1-308</sub>, sAPP $\beta^*$  et CTF $\beta^*$ . Ainsi, le fragment sAPP $\beta^*$  possède deux acides aminés supplémentaires comparé au sAPP $\beta$  issu du clivage par la voie amyloïdogénique. A l'inverse, le CTF $\beta^*$  possède deux acides aminés en moins par rapport au CTF $\beta$ . Ce dernier est à son tour clivé par la  $\gamma$ -sécrétase ce qui conduit à la production d'A $\beta^*$  (fragment rouge), qui possède 2 acides aminés en moins dans sa région N-ter par rapport à l'A $\beta$ , et d'AICD. (Figure adaptée de Müller et al. 2017)

### Voie des caspases

L'APP peut également être clivée dans son domaine intracellulaire par des caspases. En effet, elle possède dans ce domaine une séquence consensus qui peut être reconnue par le groupe III des caspases (Weidemann et al. 1999). Ce dernier inclut les caspases 6, 8 et 9. Ce clivage donne lieu au fragment C31. Par ailleurs, les fragments CTF $\alpha/\beta$ , issus du clivage de l'APP par les enzymes  $\alpha$ - et  $\beta$ -sécrétase, peuvent également être clivés par les caspases. Ainsi, la succession des clivages des caspases et la  $\gamma$ -sécrétase donne naissance aux fragments CTF $\alpha/\beta$  auquel il manque les 31 derniers acides aminés de la région C-ter (CTF $\alpha/\beta\Delta$ C31), A $\beta$  ou p3, et à un petit peptide appelé Jcasp (**Figure 8**).



### **Figure 8 : Clivage de l'APP par la voie des caspases**

L'APP peut être clivée par des caspases dans son domaine intracellulaire donnant naissance à un fragment appelé C31. Par ailleurs, si ce clivage est précédé d'un clivage de l'APP par l'enzyme  $\alpha$ - ou  $\beta$ -sécrétase, cela conduit à la production des fragments C31, CTF $\alpha$ / $\beta$  $\Delta$ C31 qui correspond au CTF $\alpha$ / $\beta$  sans les 31 derniers acides aminés de la région C-ter, A $\beta$  ou p3, et Jcasp. (Figure de Müller et al. 2017)

Il existe donc à ce jour 7 voies protéolytiques identifiées pour la protéine APP qui peuvent donner naissance à un total de 27 fragments. Autant de fragments qui peuvent avoir des fonctions physiologiques variées et qui font de l'APP une protéine particulièrement complexe à étudier.

## **V- Les fonctions physiologiques de l'APP**

Bien que l'APP soit principalement connue et étudiée pour son implication dans la maladie d'Alzheimer (MA), elle possède également de nombreuses fonctions physiologiques. L'évolution de l'expression de l'APP au cours du développement, le décryptage de sa structure nous donnent les premiers éléments quant à ses possibles fonctions. En effet, l'APP est détectée dès le stade embryonnaire E7,25 chez la souris (E7,25) ce qui laisse penser qu'elle jouerait un rôle important dans le développement (Ott et Bullock 2001). Elle est ainsi détectée dans l'épiblaste et le pli neural qui donne ensuite la partie antérieure du tube neural. De plus, l'APP est détectée dans le tube neural au stade E9,5 (Salbaum et Ruddle 1994). Par ailleurs, du fait de sa structure, il a été proposé que l'APP joue un rôle de récepteur de surface cellulaire (Kang et al. 1987) ou qu'elle pourrait également agir comme un facteur de croissance (Rossjohn et al. 1999).

En complément de ces premiers éléments, l'utilisation de différentes techniques telles que les cultures cellulaires, la réalisation de Knock-Down (KD) par ARN interférence, ou encore la création de modèles Knock-Out (KO) totaux ou conditionnels pour l'APP ont permis d'en apprendre davantage sur les implications physiologiques de cette protéine.

L'APP est exprimée de façon ubiquitaire, elle reste cependant majoritairement étudiée pour ses fonctions dans le système nerveux central, du fait de son rôle dans la MA. Ainsi, les paragraphes suivants se focaliseront sur ses fonctions principalement au niveau du système nerveux central. En effet, très peu de choses sont connues quant à ces fonctions dans le système nerveux périphérique ou dans d'autres organes que le cerveau (Puig et Combs 2013). Il s'agit ici d'une description non-exhaustive des fonctions dans lesquelles l'APP est impliquée, cette protéine intervenant dans de très nombreuses fonctions.

### **1- Prolifération cellulaire**

Le premier rôle de l'APP que l'on peut citer est dans la prolifération cellulaire, qui constitue la première étape importante du développement. Ainsi, en culture, la surexpression de l'APP entraîne une augmentation de la prolifération des cellules souches/progénitrices neurales (NSPC, pour *Neural Stem/Progenitor Cell*) (Hu et al. 2013). A l'inverse, dans les NSPC issues de souris APP-KO, une réduction de la prolifération est observée. L'APP pourrait assurer ce rôle via le fragment sAPP $\alpha$  issu de son clivage par l' $\alpha$ -sécrétase. En effet, ce dernier présente dans sa région N-ter un domaine riche en cystéine qu'on peut retrouver chez certains facteurs de croissance (Rossjohn et al. 1999). Cela laisse penser que le sAPP $\alpha$  pourrait avoir une fonction neurotrophique. De plus, *in vitro*, ce fragment stimule la prolifération des cellules souches neurales (Ohsawa et al. 1999). Plus précisément, c'est une région proche de l'extrémité N-ter du sAPP $\alpha$  qui est responsable de cet effet, région contenant un domaine riche en cystéine.

Par ailleurs, ce rôle dans la prolifération cellulaire est retrouvé chez les souris adultes, ce qui laisse supposer une implication également dans la neurogénèse adulte. En effet, le fragment sAPP $\alpha$  est également capable de stimuler la prolifération des progéniteurs neuronaux dans la zone sous-ventriculaire (Caillé et al. 2004). Cette dernière constitue l'un des foyers neurogéniques toujours présents à l'âge adulte.

### **2- Différenciation cellulaire**

L'APP joue également un rôle dans la différenciation cellulaire. En effet, dans le cerveau du rat, au cours du développement embryonnaire, l'APP est détectée dans les structures en différenciation (Kirazov et al. 2001). Ainsi au stade E14, l'APP est détectée dans la moelle épinière, le bulbe rachidien, les ganglions de la base et l'hypothalamus, stade auquel ces structures contiennent des neurones en cours de différenciation. Par la suite, l'APP est détectée dans les structures ventrales, le cortex, les bulbes olfactifs ou encore dans le système auditif lorsque ces structures rentrent dans un processus de différenciation.

L'APP est ainsi exprimée dans les neurones qui ont commencé à se différencier (Salbaum et Ruddle 1994) et son expression augmente lorsqu'on induit la différenciation de neurones hippocampiques en culture (Hung et al. 1992). Par ailleurs, la surexpression de l'APP dans des cellules souches embryonnaires humaines induit rapidement et spontanément leur différenciation en progéniteurs neuronaux/neurones (Freude et al. 2011). De la même façon, une étude réalisée à partir de NSPC de souris montre que lorsque ces dernières surexpriment l'APP, un nombre plus important de neurones est obtenu (Hu et al. 2013). A l'inverse, des NSPC KO pour l'APP donnent naissance à moins de neurones comparées à des cellules « wild-type » (WT).

De plus, alors que l'étude de Freude et al. 2011 montre que les fragments sAPP $\alpha$  et sAPP $\beta$  sont capables d'induire une différenciation des cellules souches embryonnaires humaines, l'étude de Hung et al. 1992 suggère plutôt une implication de l'APP sous sa forme transmembranaire. En effet, dans cette étude, l'augmentation de l'expression de l'APP dans les neurones en différenciation n'est pas accompagnée par une augmentation de l'expression des fragments issus de son clivage. Ces différences pourraient s'expliquer par le fait que les conditions d'études ne sont pas similaires, différenciation cellulaire induite ou spontanée, de même le type cellulaire et l'espèce étudiés diffèrent : neurones hippocampiques de rats vs. cellules souches embryonnaires humaines.

### **3- Migration cellulaire**

L'APP est aussi exprimée dans les cellules de la glie radiaire (Trapp et Hauer 1994), laissant supposer une implication dans la migration cellulaire. En effet, la réduction de l'expression de l'APP, par la réalisation d'un KD, dans les précurseurs neuronaux présents dans la zone ventriculaire altère la migration de ces derniers dans la plaque corticale (T. L. Young-Pearse et al. 2007). Bien que ces précurseurs neuronaux soient en mesure de sortir de la zone ventriculaire et de migrer au travers de la zone intermédiaire, les précurseurs restent bloqués sous la plaque corticale. A l'inverse, la surexpression d'APP dans les précurseurs neuronaux entraîne une accélération de leur migration. Par ailleurs, les auteurs de cette étude ont montré que les domaines extracellulaire et intracellulaire de l'APP étaient tous les deux requis pour la migration des précurseurs neuronaux dans la plaque corticale.

Plusieurs protéines interagissant avec l'APP ont été identifiées comme pouvant contribuer à sa fonction dans la migration neuronale. La première qui a été mise en évidence est la protéine *Disabled-1* (DAB-1) (T. L. Young-Pearse et al. 2007). Cette protéine joue un rôle essentiel dans la migration (Howell et al. 1997; Tissir et Goffinet 2003). Par ailleurs, son KD dans les précurseurs neuronaux entraîne un phénotype

semblable à celui observé avec le KD de l'APP. A l'inverse, sa surexpression permet de restaurer partiellement la migration altérée par le KD de l'APP. Cette protéine pourrait ainsi agir en aval de l'APP.

Une autre protéine interagissant avec l'APP pourrait être impliquée, il s'agit de la protéine *Disrupted-in-schizophrenia 1* (DISC1) (T. L. Young-Pearse et al. 2010). Cette dernière est notamment exprimée au niveau du centrosome des précurseurs neuronaux où elle joue un rôle-clé dans la migration neuronale (Kamiya et al. 2005). Les auteurs ont ainsi montré que l'interaction APP-DISC1 permettrait de réguler la localisation subcellulaire de cette dernière et que DISC1 agirait en aval d'APP et de DAB-1. En effet, la surexpression de DISC1 permet de restaurer le déficit de migration observé dans les modèles de KD d'APP et DAB-1. Cependant, les mécanismes par lesquels ces différentes interactions régulent la migration cellulaire ne sont pas connus.

L'interaction de l'APP avec la Pancortine pourrait également réguler la migration des précurseurs neuronaux dans la plaque corticale (Rice et al. 2012). Cette protéine, exprimée dans le cortex cérébral en développement et mature, possède 4 isoformes capables d'interagir avec l'APP. Plus particulièrement, l'interaction de l'APP avec deux d'entre elles permet de réguler la migration des précurseurs neuronaux soit en inhibant, soit en favorisant leur entrée dans la plaque corticale.

Enfin, un autre mécanisme possible serait via l'interaction de l'APP avec la protéine  $Go\alpha$ . En effet, il a été mis en évidence, dans le système nerveux entérique du papillon *Manduca sexta*, que l'homologue de l'APP, appelé APPL (APP-Like), colocalise avec la protéine  $Go\alpha$  dans une population de neurones en migration (Ramaker, Swanson, et Copenhaver 2013). Ainsi, le KD d'APPL, de même que l'inhibition de la protéine  $Go\alpha$ , entraînent une migration excessive de ces neurones. Les auteurs proposent que l'interaction de l'APP avec des facteurs extracellulaires induirait l'activation de cette protéine G qui provoquerait une entrée d'ions calcium ( $Ca^{2+}$ ) dans la cellule, inhibant le processus de migration. Une étude précédente a mis en évidence ce processus d'inhibition de la migration dépendant du  $Ca^{2+}$  (Horgan et Copenhaver 1998). Par ailleurs, cette interaction APP- $Go\alpha$  est également présente chez le rat, la souris et l'humain (Ramaker, Swanson, et Copenhaver 2013).

#### **4- Croissance neuritique et guidage axonale**

La détection de l'APP dans le cône de croissance laisse supposer un rôle de cette protéine dans la croissance neuritique (Ferreira, Caceres, et Kosik 1993; Kirazov et al. 2001). L'inhibition de la synthèse d'APP dans des cultures de neurones corticaux entraîne une diminution de la longueur des neurites

(Allinquant et al. 1995). De la même façon, l'application d'APP sous sa forme membranaire ou sous sa forme soluble, entraîne une augmentation de la longueur des neurites et de la complexité de leur arborisation dans des cultures de phéochromocytomes (Milward et al. 1992). Ces études montrent donc que l'APP favoriserait la croissance neuritique et sont en accord avec les observations faites dans le modèle de souris APP-KO de Zheng et al. (1995) (description détaillée dans la Partie VI). En effet, les souris APP-KO âgées de 12-13 mois présentent une réduction de la longueur des dendrites apicales au niveau des neurones de la région CA1 de l'hippocampe ainsi qu'une réduction de la complexité de l'arborisation dendritique (Seabrook et al. 1999; Tyan et al. 2012). Ces réductions ne sont pas observées chez des souris plus jeunes, âgés de 2-4 mois. Une réduction de la complexité de l'arborisation dendritique est également observée pour les neurones corticaux (Dawson et al. 1999), cette réduction étant visible dès l'âge de 3-4 semaines (Hoe et al. 2009).

Des mécanismes ont également été proposés pour ce rôle de l'APP dans la croissance neuritique. Cet effet pourrait impliquer le facteur de croissance NGF (*Nerve Growth Factor*). En effet, alors que le NGF favorise la croissance neuritique, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre l'APP empêche son effet (Milward et al. 1992). Un autre mécanisme possible impliquerait une interaction avec la Reeline et l'Intégrine  $\alpha3\beta1$ . Ces dernières sont impliquées dans la croissance neuritique (Niu et al. 2004; DeFreitas et al. 1995). Par ailleurs, il a été montré que l'APP et la Reeline interagissent avec l'intégrine  $\alpha3\beta1$  (Hoe et al. 2009; Dulabon et al. 2000). Ainsi, *in vitro*, la présence de Reeline dans le milieu de culture ou la surexpression de l'APP dans les neurones hippocampiques entraîne une augmentation de la complexité et de la longueur des dendrites (Hoe et al. 2009) ; cet effet est potentialisé avec la combinaison de ces 2 facteurs. A l'inverse, le KD de l'APP entraîne une diminution de la longueur des dendrites et prévient les effets de la Reeline sur la croissance dendritique (Hoe et al. 2009). De plus, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre l'intégrine  $\alpha3\beta1$  réduit la croissance dendritique et bloque les effets de l'APP et de la Reeline sur la croissance. Hoe et al. (2009) proposent ainsi que la Reelin serait un lien extracellulaire entre l'APP et l'intégrine  $\alpha3\beta1$ , qui elles, sont présentes à la membrane, permettant ainsi de stabiliser leur interaction qui favoriserait la croissance neuritique.

Il a également été montré que la perte de l'APP peut conduire à une augmentation de la croissance neuritique, mais cette fois-ci au niveau de l'axone (Tracy L. Young-Pearse et al. 2008). Ainsi, les neurones issus de souris APP-KO présentent un axone plus long comparé aux neurones issus de souris WT. Ce résultat est obtenu à la fois pour les neurones hippocampiques et les neurones corticaux. Par ailleurs, cette augmentation est également confirmée *in vivo*, puisque le KD de l'APP dans les précurseurs neuronaux,

chez le rat, entraîne une augmentation de la longueur de l'axone. Les auteurs proposent ainsi que l'APP inhiberait l'effet de l'Intégrine  $\beta 1$  sur la croissance de l'axone. En effet, alors que l'application d'un anticorps anti-Intégrine  $\beta 1$  n'a pas d'effet sur la croissance axonale de neurones WT, elle empêche l'augmentation de la croissance axonale observée dans les neurones APP-KO. Par ailleurs, le sAPP $\alpha$  est capable de stimuler la croissance de l'axone et d'interagir avec l'Intégrine  $\beta 1$ . Il a ainsi été proposé que le sAPP $\alpha$ , en se fixant sur l'Intégrine  $\beta 1$ , empêche l'APP d'interagir avec cette dernière et donc d'inhiber la croissance axonale. De la même façon, le fragment sAPP $\beta$  est capable d'augmenter la croissance de l'axone (Chasseigneaux et al. 2011). Cependant, dans cette étude l'application de sAPP $\alpha$  ou de sAPP $\beta$ , sur des cultures de neurones corticaux, induit une diminution de la longueur et du nombre de dendrites, ces résultats étant en contradiction avec les études citées précédemment. L'application de sAPP $\alpha$  ou de sAPP $\beta$  cause ainsi une diminution de l'adhésion cellulaire, favorisant la croissance axonale et conduisant à la rétractation de certaines dendrites.

L'APP joue donc un rôle dans la croissance neuritique avec des effets différents selon qu'il s'agisse des dendrites ou de l'axone. Ainsi, elle favoriserait la croissance des dendrites alors qu'elle aurait un effet inhibiteur sur celle de l'axone.

En complément de son implication dans la croissance neuritique, l'APP aurait également un rôle dans le guidage axonal. En effet, l'APP pourrait contribuer au guidage des axones commissuraux assuré par la Nétrine-1 (Rama et al. 2012). Cette dernière est la première molécule identifiée ayant un rôle dans le guidage des axones commissuraux (Kennedy, Brown, et Rossor 1994) via l'activation de son récepteur DCC (*Deleted in Colorectal Cancer*), ce qui conduit à l'activation de voies de signalisation intracellulaires telle que la voie MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) (Forcet et al. 2002). Ainsi, l'APP est capable d'interagir avec le récepteur DCC en présence de la Nétrine-1 induisant une activation plus importante de la voie de signalisation MAPK.

## **5- Fonction synaptique**

La protéine APP jouerait également un rôle au niveau synaptique. En effet, une augmentation de son expression est constatée au cours des 2 premières semaines postnatales, correspondant à la période de synaptogénèse chez le rat (Löffler et Huber 1992; Kirazov et al. 2001). Elle atteint ainsi son maximum d'expression 15-16 jours après la naissance. Par ailleurs, l'APP a été détectée dans une préparation de synaptosomes (Kirazov et al. 2001) et une colocalisation avec la synaptophysine a été mise en évidence chez le rat au niveau du cervelet, des bulbes olfactifs, du cortex pariétal, ou encore de la jonction



neuromusculaire (Schubert et al. 1991; Ohta et al. 1993). Cette colocalisation est également observée au niveau du cortex temporal et de la jonction neuromusculaire chez l'humain (Schubert et al. 1991). Toutes ces observations suggèrent donc un rôle de l'APP dans la synaptogénèse.

Ainsi, l'APP est nécessaire au bon développement de la jonction neuromusculaire (JNM). En effet, bien que les souris APP-KO ne présentent pas d'anomalie de la morphologie de la JNM, l'expression de l'APP au niveau pré- et post-synaptique est nécessaire pour son développement et son fonctionnement (Z. Wang et al. 2009). En effet, le KO de l'APP dans les neurones moteurs ou dans le muscle chez des souris APLP2-KO induit une réduction de l'apposition de la synaptophysine (marqueur pré-synaptique) et des récepteurs de l'acétylcholine (marqueur post-synaptique) normalement observée chez des individus WT, un bourgeonnement excessif des terminaisons nerveuses et une réduction de la fréquence des mEPPs (*miniature end-plate potentials*), ce qui traduit un déficit pré-synaptique. Par ailleurs, ces altérations sont également visibles chez les souris double KO pour l'APP et APLP2 (P. Wang et al. 2005). Ces résultats traduisent donc l'importance de la présence de l'APP au niveau pré- et post-synaptique pour le développement des synapses neuromusculaires. Par ailleurs, la réalisation de co-cultures de neurones avec des cellules HEK293 exprimant l'APP induit la synaptogénèse dans les axones en contact avec ces dernières (Z. Wang et al. 2009).

Par ailleurs, l'APP joue également un rôle important au niveau des épines dendritiques. En culture, alors que la surexpression de l'APP induit une augmentation de la densité d'épines dendritiques des neurones hippocampiques, son KD, tout comme son KO, induit une réduction d'environ 30-35% (Lee et al. 2010; Tyan et al. 2012). Ce résultat est également retrouvé *in vivo*, puisqu'une diminution de la densité d'épines est observée au niveau des neurones pyramidaux de l'hippocampe et du cortex chez les souris APP-KO de 12-15 mois. Cette diminution n'est pas présente chez des animaux jeunes âgés de 2-4 mois. L'APP a donc un rôle de maintien des épines dendritiques au cours du vieillissement. Les épines dendritiques sont le site de formation des synapses excitatrices, leur réduction chez les souris APP-KO pourrait conduire à une altération de la fonction synaptique chez ces animaux.

En parallèle des études portant sur la morphologie des neurones, l'implication de l'APP dans la plasticité synaptique a été étudiée. Ainsi, les souris APP-KO de 12-15 mois présentent un déficit de potentialisation à long terme (LTP) dans la région CA1 de l'hippocampe (Ring et al. 2007; Tyan et al. 2012). Ce déficit n'est pas présent chez les souris jeunes de 2-4 mois. En revanche, aucun déficit de LTP n'a été mis en évidence au niveau du gyrus denté chez des souris APP-KO de 9-11 mois (Jedlicka et al. 2012). Ces différences pourraient s'expliquer par différents niveaux d'expression de l'APP entre les sous-régions de l'hippocampe

(Del Turco et al. 2016). Ainsi, l'APP est plus fortement exprimée dans la région CA1 que dans le Gyrus Denté, avec une expression 1,7 fois plus importante que ce soit au niveau de l'ARNm ou protéique. Cela pourrait donc expliquer pourquoi l'absence d'APP a un impact plus marqué dans la région CA1.

A l'inverse, d'autres études montrent que l'absence d'APP favorise la fonction synaptique. En effet, en culture, l'absence d'APP entraîne une augmentation de l'amplitude des courants AMPA ( *$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate*) et NMDA (*acide N-méthyl-D-aspartique*), du nombre de vésicules du pool de vésicules compétentes prêtes à être libérées (RRP, *Readily Releasable Pool*) et du nombre de synapses (Priller et al. 2006). Par ailleurs, chez les souris APP-KO, une augmentation du marquage de la synaptophysine est constatée dans l'hippocampe à 3 semaines, traduisant une augmentation du nombre de synapses. Une augmentation de la densité d'épines dendritiques a également été mise en évidence dans le cortex somatosensoriel de souris APP-KO âgées de 4-6 mois (Bittner et al. 2009) alors qu'aucune différence n'avait été constatée dans l'hippocampe de souris de 2-4 mois (Tyan et al. 2012).

Les différences observées entre ces études peuvent être liées à différents facteurs. Par exemple, concernant les résultats contradictoires obtenus pour la densité d'épines dendritiques (Bittner et al. 2009; Lee et al. 2010; Tyan et al. 2012), les structures étudiées ne sont pas les mêmes, hippocampe dans un cas, cortex somatosensoriel dans l'autre. Ce qui laisse supposer que l'implication de l'APP n'est pas la même dans ces 2 structures. Cette différence pourrait également être liée au modèle APP-KO utilisé, qui n'est pas le même entre les 2 études. Ces modèles de souris APP-KO sont décrits dans la partie VI de ce chapitre.

Enfin, l'APP joue également un rôle important au niveau cognitif, ce qui pourrait être mis en lien avec les altérations synaptiques développées précédemment. Cette implication au niveau cognitif a pu être mise en évidence grâce à la caractérisation phénotypique des modèles de souris APP-KO ; elle sera développée dans le paragraphe suivant.

## **VI- Caractérisation phénotypique des modèles de souris APP-KO**

### **1- Les modèles**

Il existe à ce jour 4 modèles de souris KO pour l'APP. Chacun de ces modèles cible différentes régions du gène, mais leur construction se base sur la même technique, celle de la recombinaison homologe dans des cellules souches embryonnaires.

Le premier modèle a été publié en 1994 par Müller et al. et a été créé par introduction, dans l'exon 2 du gène, d'une cassette de résistance à la néomycine et d'une séquence de terminaison de la transcription.

La cassette de résistance à la néomycine permet ainsi de sélectionner les cellules qui ont intégré la nouvelle construction. Cependant, cette construction n'a pas conduit à l'obtention d'un KO complet. En effet, l'expression d'une plus petite protéine, ne comportant pas l'exon 2, est observée à 5% du niveau des animaux WT.

Par la suite, un autre modèle a été créé par délétion de la séquence codant pour le promoteur et le 1<sup>er</sup> exon du gène *App* (Zheng et al. 1995). Cette délétion a conduit à un KO complet, en effet, ni l'ARNm, ni la protéine ne sont détectés dans le cerveau ou dans les reins des souris.

L'année suivante, un troisième modèle a été créé. Il se base sur l'utilisation de la technique Cre-LoxP (Z. W. Li et al. 1996). Ainsi, l'insertion d'une séquence LoxP dans l'exon 2 et d'une seconde séquence dans l'exon 17 a permis d'éliminer une séquence de 200 kb après expression de la Cre-Recombinase. Le gène de l'APP a une taille d'environ 290 kb (Données tirées d'Ensembl, version du génome GRCh38.p13). Cette délétion représente donc la quasi-totalité du gène. L'absence d'APP dans ce modèle a été confirmée par western blot dans le cerveau (Ring et al. 2007).

Enfin, le dernier modèle créé cible l'exon 1 du gène dans lequel un codon stop a été introduit (Sturchler-Pierrat et Sommer, non publié). De la même façon que le précédent modèle, l'absence d'APP a été confirmée au niveau protéique par western blot sur des extraits d'hippocampe (Senechal, Kelly, et Dev 2008). La caractérisation de ces modèles de souris APP-KO a permis de mettre en évidence plusieurs phénotypes liés à l'absence d'APP, que ce soit au niveau comportemental ou au niveau moléculaire.

## 2- Caractérisation comportementale

Afin de faciliter la compréhension, le paragraphe suivant décrit de manière globale les différents phénotypes observés chez les souris APP-KO, sans distinction entre les modèles. Le **Tableau 1** synthétise les phénotypes observés pour chaque modèle séparément.

De manière générale, une réduction de la masse corporelle (7-20%) et de la force musculaire (15-27%) sont observées dans tous les modèles de souris APP-KO (Zheng et al. 1995; Dawson et al. 1999; Phinney et al. 1999; Ring et al. 2007; U. Müller et al. 1994; Tremml et Lipp 1998; Senechal, Kelly, et Dev 2008). Une réduction de la masse cérébrale (10-11%) a également été mise en évidence dans les modèles de Müller et al. 1994 et de Li et al. 1996 (Magara et al. 1999; Ring et al. 2007). Par ailleurs, l'activité locomotrice et exploratoire ou encore l'activité au cours du nyctémère ont été évaluées. Les souris APP-KO âgées de 2-4 mois présentent une réduction de leur activité locomotrice et exploratoire (Zheng et al. 1995; U. Müller

et al. 1994; Tremml et Lipp 1998; Dawson et al. 1999; Ring et al. 2007; Senechal, Kelly, et Dev 2008), alors qu'aucune différence n'est constatée aux âges de 8 et 10 mois (Senechal, Kelly, et Dev 2008). Des différences dans l'activité locomotrice sont également retrouvées au plan du rythme circadien, les souris APP-KO étant plus actives en début de phase nocturne alors qu'elles présentent une hypoactivité à la fin de cette phase (Ring et al. 2007).

Différents tests ont aussi été réalisés afin d'évaluer la mémoire des souris APP-KO. Ainsi, dans le test du labyrinthe en Y, un test qui permet d'évaluer la mémoire de travail, aucune différence quant au pourcentage d'alternances spontanées n'est observée, que ce soit à 3 ou à 8 mois (Senechal, Kelly, et Dev 2008). La mémoire de travail ne semble donc pas impactée par l'absence d'APP. En revanche, pour la mémoire à long terme de type associative, évaluée par un test d'évitement passif ou actif, un déficit est mis en évidence à l'âge de 8-10 mois (Dawson et al. 1999; Senechal, Kelly, et Dev 2008). Aucune différence n'est observée à un âge plus précoce (3-4 mois).

Enfin, la mémoire spatiale à long terme a également été étudiée chez les souris APP-KO, en particulier grâce au test de la piscine de Morris. De manière générale pour tous les modèles, à l'âge de 2-4 mois, les souris APP-KO présentent de moins bonnes performances comparées aux animaux WT, ce qui traduit un déficit d'apprentissage (U. Müller et al. 1994; Tremml et Lipp 1998; Dawson et al. 1999; Ring et al. 2007). Lors de la phase de rappel, aucun déficit n'est constaté à cet âge. A l'âge de 10 mois, un déficit d'apprentissage est retrouvé, il semble cependant plus marqué qu'à l'âge de 4 mois (Dawson et al. 1999). De plus, bien qu'aucune différence ne soit observée entre les WT et les souris APP-KO lors de la phase de rappel à 10 mois, l'analyse de la figure indique que les WT passent plus de 25% de leur temps dans le quadrant cible, ce qui n'est apparemment pas le cas des souris APP-KO. Il semble donc qu'à 10 mois, les souris APP-KO présentent un déficit de mémoire spatiale. Ce test a également été réalisé à un stade bien plus avancé, à savoir à l'âge de 18-28 mois (Phinney et al. 1999), âge pour lequel un déficit d'apprentissage et de mémoire spatiale est retrouvé. Par ailleurs, certaines études ont réalisé, dans la piscine de Morris, un test de « *reversal* » en changeant la localisation de la plateforme, test mesurant notamment la flexibilité comportementale. Ainsi, certaines études montrent que les souris APP-KO ne sont pas capables d'apprendre la nouvelle localisation de la plateforme (U. Müller et al. 1994; Phinney et al. 1999), ce qui traduit un déficit de flexibilité. En revanche, dans d'autres études, les souris APP-KO présentent plus de difficultés à apprendre la nouvelle localisation, cependant, elles restent capables d'apprendre, visible par la diminution de la latence, ou de la distance pour atteindre la plateforme (Tremml et Lipp 1998; Ring et al. 2007). Pour ces deux dernières études, le déficit observé serait à mettre en lien plutôt avec un déficit

d'apprentissage, comme observé lors de la phase d'acquisition, qu'avec un déficit de flexibilité comportementale. Les différences entre ces études peuvent être liées au modèle APP-KO utilisé, les études de Müller et al. (1994), Phinney et al. (1999) et Ring et al. (2007) utilisant chacune un modèle différent (Tableau 1). En revanche, les études de Müller et al. (1994) et Tremml et al. (1998) s'appuient sur le même modèle, celui de Müller et al. (1994), l'origine des différences entre ces études n'est pas connue. En effet, elles ont été réalisées au même âge, avec des protocoles identiques.

Ainsi, alors que certains déficits cognitifs apparaissent avec l'âge, d'autres sont présents chez l'adulte jeune et s'accroissent avec l'âge. L'APP jouerait donc un rôle important dans le maintien des fonctions cognitives au cours du vieillissement.

	<b>Interruption de l'exon 2 (Müller et al. 1994)</b>	<b>Délétion du promoteur et de l'exon 1 (Zheng et al. 1995)</b>	<b>Délétion de 200kb (Li et al. 1996)</b>	<b>Introduction d'un codon stop dans l'exon 1 (Sturchler-Pierrat et al. Non publié)</b>
	Expression d'une petite protéine	KO complet	KO complet	KO complet
<b>Etudes</b>	Müller et al. (1994) Tremml et al. (1998) Magara et al. (1999)	Zheng et al. (1995) Dawson et al. (1999) Phinney et al. (1999) Seabrook et al. (1999) Tyan et al. (2012)	Magara et al. (1999) Ring et al. (2007) Jedlick et al. (2012)	Senechal et al. (2008)
<b>Masse corporelle</b>	↘ (8-10%)	↘ (15-20%)	↘ (15-20%)	↘ (7-12%)
<b>Masse cérébrale</b>	↘ (10%)	ne	↘ (10-11%)	ne
<b>Force musculaire</b>	↘ (15-27%)	↘ (20%)	↘ (23%)	↘ (22-23%)
<b>Activité locomotrice</b>	↘ (2-3 mois)	↘ (2-4 mois)	↗ en début et ↘ en fin de phase nocturne (8 mois)	↘ (3 mois) ou ∅ (8 et 10 mois)
<b>Activité exploratoire</b>	ne	ne	↘ (3 mois)	ne
<b>Mémoire de travail (Labyrinthe en Y)</b>	ne	ne	ne	∅ (8 et 10 mois)
<b>Mémoire associative (Evitement actif/passif)</b>	ne	∅ (4 mois) ou ↘ (10 mois)	ne	∅ (3 mois) ou ↘ (8-10 mois)
<b>Mémoire spatiale (Piscine de Morris)</b>	↘ apprentissage ∅ pour le rappel (2-3 mois)	↘ apprentissage (4, 10 et 18-28 mois) ∅ (4-10 mois) ou ↘ (18-28 mois) pour le rappel	↘ apprentissage ∅ pour le rappel (2-3 mois)	ne
	Déficit de reversal (2-3 mois)	Déficit de reversal (18-28 mois)	Déficit de reversal (2 mois)	ne
<b>Potentialisation à long terme</b>		↘ de LTP dans CA1 (12-15 mois) ∅ de LTP dans le gyrus denté (9-11 mois)	↘ de LTP dans CA1 (9-12 mois)	

**Tableau 1 : Synthèse des résultats des études comportementales réalisées chez les modèles de souris APP-KO**

En plus des observations faites chez ces modèles APP-KO au niveau comportemental, ce tableau récapitule les résultats obtenus pour les études de potentialisation à long-terme qui ont été décrits dans Partie V, Point 5. ↘ et ↗, indique respectivement une diminution et une augmentation par rapport aux WT ; ∅, indique une absence de différence entre les souris APP-KO et les WT ; ne : non évalué.

### 3- Caractérisation cellulaire et moléculaire cérébrale

Des analyses au niveau cellulaire et moléculaire ont également été réalisées chez les différents modèles APP-KO (**Tableau 2**). Ainsi, aucune perte neuronale n'a été mise en évidence chez ces souris à l'âge de 18-28 mois, que ce soit dans le cortex ou dans l'hippocampe (Phinney et al. 1999). Par ailleurs, Zheng et al.

(1999) n'ont pas mis en évidence d'anomalie de la forme des neurones - gonflement ou atrophie - dans le cortex, l'hippocampe et le cervelet. Cependant, il a été constaté dans les modèles de Müller et al. (1994) et de Li et al. (1996) chez les souris APP-KO une augmentation de la fréquence de l'agénésie du corps calleux, qui peut être observée avec un fond génétique 129Sv (U. Müller et al. 1994; Magara et al. 1999). L'expression de ce phénotype est par ailleurs influencée par le fond génétique utilisé.

Les autres types cellulaires du cerveau ont également été étudiés. Ainsi, pour étudier les astrocytes, le marqueur de la GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) a été utilisé. Une augmentation de son expression a été observée dans l'hippocampe et le cortex des souris APP-KO à 3 et 8-12 mois, ce qui traduit une réaction inflammatoire de type astroglieuse (Zheng et al. 1995; Seabrook et al. 1999; Dawson et al. 1999). En revanche, aucune différence d'expression de la GFAP n'a été mise en évidence à l'âge de 18-28 mois (Phinney et al. 1999). Cette différence de résultat est probablement liée à l'âge des animaux, car ces 4 études utilisent le modèle de Zheng et al. (1995). De façon similaire, dans l'étude de Ring et al. (2007), aucune différence d'expression de la GFAP n'est observée à l'âge de 11 mois. On peut cependant noter que le modèle étudié n'est pas le même que dans les études précédentes, cette étude utilise le modèle de Li et al. (1996). De plus, les cellules microgliales ne semblent pas impactées par l'absence d'APP, si on considère le marqueur de la microglie, Mac-1 (Phinney et al. 1999). Certaines études ont également mis en évidence des différences dans l'expression du marqueur dendritique MAP-2 (*Microtubule Associated Protein 2*), avec des résultats qui varient d'une étude à l'autre. Ainsi, une diminution de son expression est observée dans une sous-population de souris APP-KO, dans l'hippocampe comme dans le cortex (Dawson et al. 1999). Dans l'étude de Seabrook et al. (1999), l'expression de MAP-2 ne diminue pas. En revanche, MAP-2 s'accumule dans le corps cellulaire des neurones du fait de la perte des dendrites apicales. Finalement, l'étude de Phinney et al. (1999), ne montre aucune différence dans l'expression de ce marqueur dans le cortex et l'hippocampe aux âges de 18-28 mois.

De plus, certaines études chez les souris APP-KO ont mis en évidence une altération de l'expression de marqueurs synaptiques. Ainsi, une diminution de l'expression de la synaptophysine et de la synapsine, deux marqueurs pré-synaptiques, est observée dans le cortex et l'hippocampe de souris APP-KO de 8-10 mois (Dawson et al. 1999). Une autre étude montre un marquage plus diffus de la synaptophysine bien que son expression ne soit pas diminuée (Seabrook et al. 1999). Ces résultats laissent donc supposer une potentielle altération de la fonction synaptique chez ces animaux, ce qui est en accord avec un rôle de l'APP au niveau de la synapse. Cependant, les études de Phinney et al. (1999) et de Tyan et al. (2012) ne mettent pas en évidence de différence d'expression de la synaptophysine, bien que ces 4 études utilisent

le même modèle, celui de Zheng et al. (1995). Ces différences de résultats pourraient être liées à l'âge des animaux qui varie d'une étude à l'autre (4, 8-12 et 18-28 mois), de même que la technique utilisée (immunomarquage, western blot). Par ailleurs, l'étude de Ring et al. (2007), qui utilise le modèle de Li et al. (1996), ne montre pas non plus de différence d'expression de la synaptophysine. Enfin, l'expression du marqueur post-synaptique PSD-95 (*Postsynaptic Density Protein 95*) a également été étudiée, aucune différence n'a été mise en évidence (Tyan et al. 2012).

Par ailleurs, la possibilité d'une compensation par les autres membres de la famille de l'APP (APLP1 et APLP2) a également été étudiée pour le modèle de Zheng et al. (1995). Ainsi, aucune différence d'expression d'APLP1 et APLP2 n'est visible, ce qui laisse supposer que ces 2 protéines ne compensent pas pour la perte de l'APP.



	Interruption de l'exon 2 (Müller et al. 1994)	Délétion du promoteur et de l'exon 1 (Zheng et al. 1995)	Délétion de 200kb (Li et al. 1996)	Introduction d'un codon stop dans l'exon 1 (Sturchler-Pierrat et al. Non publié)
	Expression d'une petite protéine	KO complet	KO complet	KO complet
<b>Etudes</b>	Müller et al. (1994) Magara et al. (1999)	Zheng et al. (1995) Dawson et al. (1999) Phinney et al. (1999) Seabrook et al. (1999) Hoe et al. (2009) Tyan et al. (2012)	Magara et al. (1999) Priller et al. (2006) Ring et al. (2007) Bittner et al. (2009)	/
<b>Neuroanatomie</b>	↗ agénésie du corps calleux	Pas de perte neuronale (18-28 mois) Pas de gonflement/ atrophie des neurones (2-3 mois)	↗ agénésie du corps calleux	ne
<b>Structure neuronale</b>	ne	↘ des épines dendritiques, Hipp (12-15 mois)	↗ épines dendritiques, Cx somatosensoriel (4-6 mois)	ne
	ne	↘ longueur des dendrites, Hipp (12-13 mois) ↘ complexité arborisation dendritique, Cx et Hipp (3-4 sem, 8-13 mois)	ne	ne
<b>Marqueurs cellulaires</b>	ne	↗ (3, 8-12 mois) ou ∅ GFAP (18-28 mois) ↘ (8-10 mois) ou ∅ (8-12 et 18-28 mois) MAP-2 ∅ Mac-1 (18-28 mois) Pour Hipp et Cortex	∅ GFAP (11 mois)	ne
<b>Marqueurs synaptiques</b>	ne	↘ synapsine (8-10 mois) ↘ (8-10 mois) ou ∅ (18-28 mois) synaptophysine ∅ PSD-95 (4 et 12 mois) Pour Hipp et Cortex	↗ (3 sem) ou ∅ (11 mois) synaptophysine dans Hipp	ne
<b>APLP1 - APLP2</b>	ne	∅ au niveau de l'ARNm	ne	ne

**Tableau 2 : Synthèse des résultats des analyses cellulaires et moléculaires réalisées chez les modèles de souris APP-KO**

Ce tableau récapitule, en plus des éléments décrits dans ce point 3, les atteintes de la structure neuronale décrites dans la Partie V, Points 4 et 5. ↘ et ↗, indique respectivement une diminution et une augmentation par rapport aux WT ; ∅, indique une absence de différence entre les souris APP-KO et les WT ; ne : non évalué ; Hipp : Hippocampe ; Cx : Cortex ; sem : semaines.

## CHAPITRE II : L'APP dans la Maladie d'Alzheimer associée au Syndrome de Down

### I- La maladie d'Alzheimer

La démence est, selon la définition donnée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), « un syndrome dans lequel on observe une dégradation de la mémoire, du raisonnement, du comportement et de l'aptitude à réaliser les activités quotidiennes ». Ainsi, en 2020, les démences concernaient 50 millions de personnes dans le monde (Données tirées du site de l'OMS datant du 21 septembre 2020). D'après les projections, ce chiffre va continuer d'augmenter dans les années à venir et devrait atteindre environ 82 millions de personnes en 2030 et 152 millions en 2050. Cette augmentation est liée à l'allongement de l'espérance de vie, au vieillissement de la population, et également à l'augmentation du nombre de cas dans les pays à faibles revenus. La maladie d'Alzheimer est la principale cause de démence au monde, elle représente ainsi 60 à 70% des cas. Il s'agit d'une maladie neurodégénérative liée à l'âge qui se caractérise entre autres par un déclin progressif de la mémoire.

La MA a été décrite pour la première fois le 4 novembre 1906 par le Dr. Aloïs Alzheimer lors de la 37<sup>ème</sup> Conférence des psychiatres allemands à Tübingen en Allemagne. Cela a ensuite fait l'objet d'une publication en 1907 dans laquelle il décrit une « maladie particulière du cortex cérébral ». Cette publication, rédigée en allemand, a par la suite été traduite en anglais (Stelzmann, Norman Schnitzlein, et Reed Murtagh 1995). Aloïs Alzheimer y décrit ainsi le cas d'une patiente âgée de 51 ans, Auguste Deter, qui présente un déclin de la mémoire, une désorientation et des hallucinations. L'autopsie du cerveau montre une atrophie et une neurodégénérescence. Par ailleurs, le Dr. Alzheimer met en évidence la présence de fibrilles dans les neurones et de faisceaux épais à la surface des cellules. Cela correspond à ce qu'on connaît aujourd'hui comme étant les dégénérescences neurofibrillaires et les plaques amyloïdes, respectivement, qui sont les caractéristiques histopathologiques de la MA. Ces dernières seront définies par la suite.

#### 1- Les différentes formes de la maladie d'Alzheimer

On distingue 3 formes de MA en fonction de leurs origines et de l'âge auquel elles se déclarent (Chen et Mobley 2019). Les **formes familiales**, aussi appelées « *Early-Onset Alzheimer Disease* » (EOAD), se déclarent avant l'âge de 65 ans. Dans certains cas, elles peuvent même apparaître dès l'âge de 30 ans. Elles ne représentent que 1% des cas de MA (« 2020 Alzheimer's Disease Facts and Figures » 2020) et

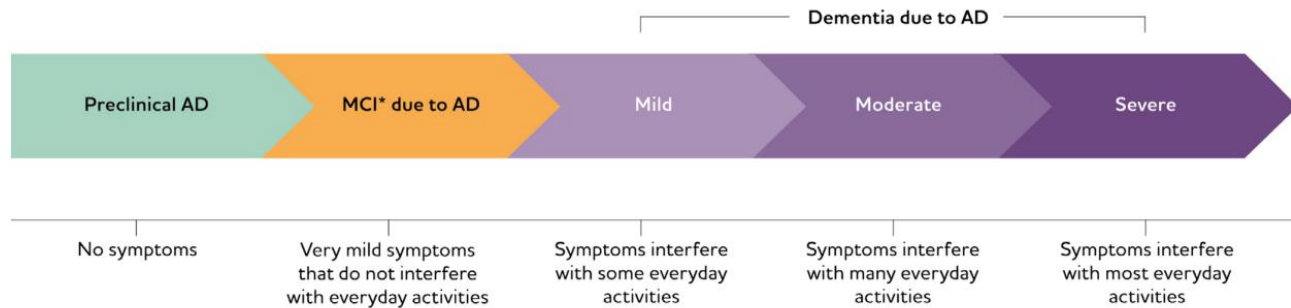
possèdent une origine génétique. Ces formes familiales sont liées à la présence d'une mutation autosomale dominante dans l'un des 3 gènes suivants : *APP*, *PS1* et *PS2*. Elles incluent également les cas de duplication du gène *APP*.

Les formes les plus fréquentes sont les **formes sporadiques** ou « **Late-Onset Alzheimer-Disease** » (LOAD) pour lesquelles aucune mutation dans un gène n'a été identifiée. Elles sont causées par une interaction entre des facteurs génétiques et environnementaux et se déclarent après l'âge de 65 ans. Plusieurs facteurs de risques ont ainsi été identifiés pour ces formes sporadiques. Tout d'abord, au niveau génétique, le facteur de risque le plus connu est l'allèle 4 de l'Apolipoprotéine E (*APOE ε4*). Ainsi, le risque de développer une MA est 3 fois plus important pour les personnes porteuses d'une copie de l'*APOE ε4* et de 8 à 12 fois plus important pour celles qui en ont 2 copies (Corder et al. 1993; Farrer 1997; « 2020 Alzheimer's Disease Facts and Figures » 2020). Par ailleurs, les études d'association pangénomique (« *Genome-Wide Association Studies* » ou GWAS), ou encore le séquençage complet du génome ou de l'exome, ont permis d'identifier de nouveaux facteurs de risques génétiques. Ces différents gènes sont impliqués dans le métabolisme du cholestérol, la réponse immunitaire ou encore l'endocytose (Giri, Zhang, et Lü 2016). Parmi ces gènes sont présents, entre autres, la clusterine (*CLU*), le « *Sortilin-Related Receptor-1* » (*SORL1*), la « *Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2* » (*TREM2*), la « *Bridging Integrator 1* » (*BIN1*), ou encore la « *Phosphatidylinositol Binding Clathrin Assembly Protein* » (*PICALM*). Par ailleurs, il existe des facteurs de risques non-génétiques. Ainsi, le facteur de risque majeur pour le développement de la MA est l'âge. Cependant, d'autres éléments augmentent également le risque de développer une MA comme le diabète, le tabagisme, un niveau d'éducation faible, l'inactivité, qu'elle soit physique ou mentale, ou encore un faible niveau de stimulations sociales (Hersi et al. 2017).

Enfin, dans certains des cas de formes sporadiques, la MA se déclare avant l'âge de 65 ans, sans pour autant qu'elle ne puisse être liée à une mutation génétique « familiale ». On parle alors de « **Young-Onset Alzheimer Disease** » (YOAD).

## 2- Les signes cliniques

La MA est une pathologie évolutive qui se traduit, entre autres, par un déclin progressif des facultés cognitives, dont plusieurs formes de mémoires (par ex., de travail, épisodique, sémantique). Son développement peut ainsi être découpé en 3 phases (« 2020 Alzheimer's Disease Facts and Figures » 2020) (**Figure 9**).



**Figure 9 : Décours temporel du développement de la maladie d'Alzheimer**

La MA est évolutive, son développement peut ainsi se découper en 3 phases. Tout d'abord, la phase préclinique, pour laquelle aucun symptôme n'est visible. A mesure que les altérations cérébrales s'accroissent, les premiers symptômes vont apparaître, aussi appelé « Mild Cognitive Impairment » (MCI). Il s'agit alors de la phase prodromique. Les atteintes de la mémoire et de la réflexion vont s'accroître progressivement jusqu'à atteindre la phase de démence. Cette dernière est également évolutive, et peut-être divisée en 3 phases en fonction de la sévérité des atteintes. (Figure de 2020 Alzheimer's disease facts and figures)

Tout d'abord, la **phase préclinique** pendant laquelle les caractéristiques neuropathologiques de la maladie commencent à se développer. A ce stade, aucun symptôme n'est observé que ce soit au niveau cognitif ou au niveau du comportement. Le cerveau reste capable de compenser les altérations fonctionnelles liées au développement de la pathologie.

Ensuite, vient la **phase prodromique** pour laquelle des altérations subtiles de mémoire et de la réflexion apparaissent. Cependant, cela n'interfère pas avec la réalisation des activités de la vie quotidienne. On parle alors de déficience cognitive légère (MCI, pour *Mild Cognitive Impairment*). La mémoire épisodique commence déjà à être impactée lors de cette phase prodromique. Il s'agit de la mémoire des événements personnellement vécus, elle inclut ainsi trois composantes qui permettent de répondre aux questions « où », « quand » et « quoi » (Tulving 1972).

Finalement, lorsque les dommages au niveau du cerveau deviennent trop importants pour que ce dernier puisse compenser les déficits, c'est l'entrée dans la **phase de démence**. La mémoire et la réflexion sont altérées, des changements du comportement sont également observés. Ces altérations sont sévères au point d'interférer avec la réalisation des tâches de la vie quotidienne et avec la vie en société. Ainsi, un déclin des fonctions exécutives, une altération de la communication, une désorientation et de la confusion sont observés. Par ailleurs, des symptômes non-cognitifs peuvent également être observés comme l'apathie, la dépression ou encore de l'agressivité. A noter que la phase de démence est également évolutive puisqu'elle progresse d'un stade léger à un stade sévère. Ainsi, lors de la phase de démence légère, les personnes atteintes de la MA gardent un certain niveau d'indépendance mais ont besoin d'aide

pour réaliser certaines activités. Lorsque la démence atteint le stade sévère, les personnes atteintes de la MA deviennent totalement dépendantes. Elles sont alors alitées et ont besoin de soins de façon continue. Elles deviennent vulnérables aux infections, comme les pneumonies qui sont la cause principale de décès chez les personnes avec la MA (Dubois et al. 2010; « 2020 Alzheimer's Disease Facts and Figures » 2020).

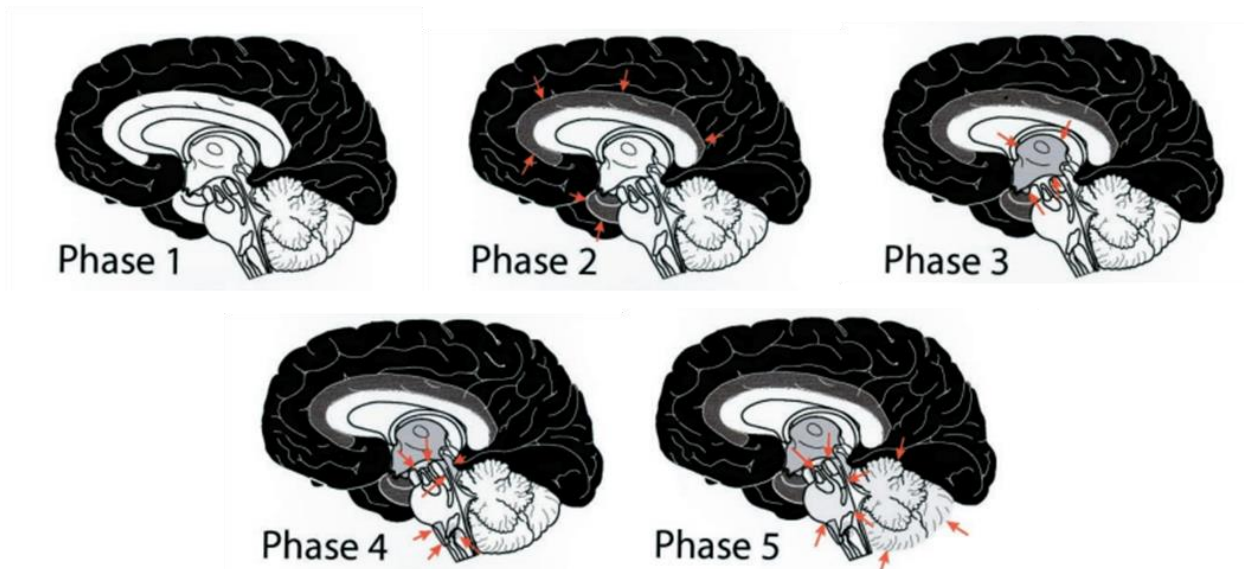
### **3- Les caractéristiques neuropathologiques**

Le développement de la MA au niveau cérébral se traduit par l'apparition de plaques amyloïdes et de dégénérescences neurofibrillaires, les 2 caractéristiques histopathologiques de la maladie, mais également par une neurodégénérescence et une neuro-inflammation.

#### **3.1- Les plaques amyloïdes**

Les plaques amyloïdes sont des dépôts extracellulaires du peptide A $\beta$  issu du clivage de la protéine APP. On en distingue 2 types, les plaques diffuses et les plaques neuritiques ou séniles (Serrano-Pozo et al. 2011). Les premières sont composées d'A $\beta$  non-fibrillaire. Elles ne contiennent pas de neurites dystrophiques et ne sont généralement pas associées à des cellules gliales réactives qui constituent la réaction neuro-inflammatoire (Itagaki et al. 1989). Les plaques diffuses ne sont pas caractéristiques de la MA puisqu'elles peuvent également être observées dans le cerveau de personnes âgées ne présentant pas d'atteinte cognitive. Les plaques neuritiques sont quant à elles composées d'A $\beta$  sous forme fibrillaire. Elles possèdent un cœur dense et compact et sont entourées de neurites dystrophiques. Elles sont également associées à des astrocytes et des cellules microgliales réactifs.

Le développement de la pathologie amyloïde est progressif et peut être divisé en 5 phases (Thal et al. 2002) (**Figure 10**). Les premières plaques A $\beta$  sont détectées dans les cortex frontal, pariétal, temporal et occipital (Phase 1). Par la suite, en Phase 2, la pathologie amyloïde affecte le cortex entorhinal, l'hippocampe et le cortex insulaire. Elle continue ensuite de se propager et affecte alors les régions sous-corticales (Phase 3) comme le striatum, les noyaux du cerveau antérieur basal, le thalamus ou encore l'hypothalamus. A ce stade, des plaques amyloïdes sont également présentes dans la substance blanche. Lors de la Phase 4, c'est au tour des noyaux du tronc cérébral d'être affectés, avec le noyau olivaire inférieur, la formation réticulaire et la substance noire. Enfin, des plaques sont détectées dans le cervelet et la pathologie continue de progresser dans les noyaux du tronc cérébral affectant notamment les noyaux du raphé, le locus coeruleus et le noyau parabrachial (Phase 5).



**Figure 10 : Progression de la pathologie amyloïde dans le cerveau de personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer**

Le développement des plaques amyloïdes dans le cerveau se découpe en 5 phases, avec dans un premier temps une atteinte corticale (Phase 1). La pathologie se propage ensuite à l'hippocampe et aux cortex entorhinal et insulaire (Phase 2) avant d'atteindre les régions sous-corticales (Phase 3). Sa progression se poursuit, affectant les noyaux du tronc cérébral (Phase 4), puis le cervelet (Phase 5). (Figure adaptée de Thal et al. 2002)

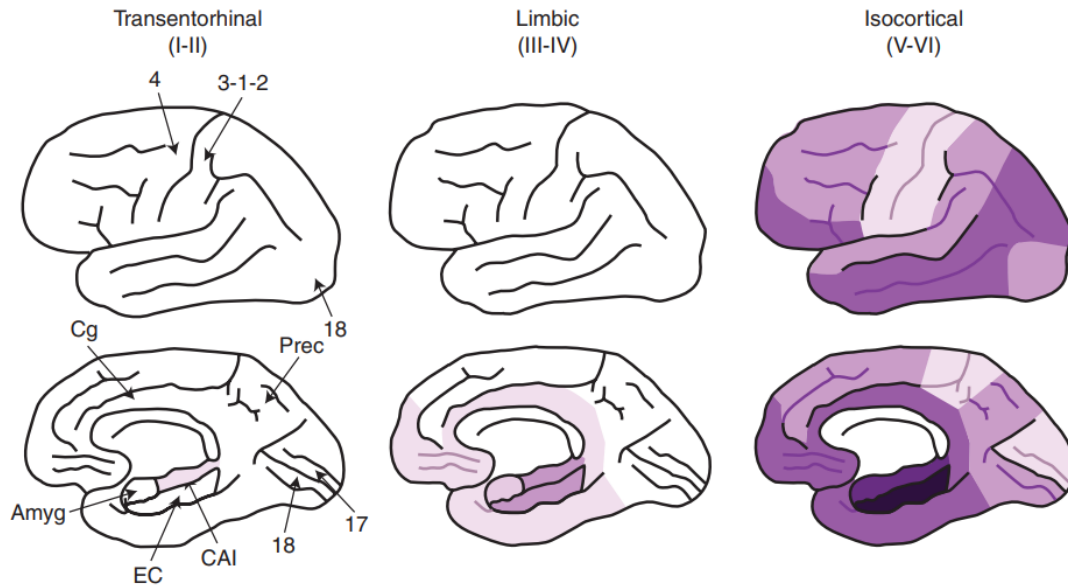
Cependant, le peptide A $\beta$  ne s'accumule pas uniquement sous forme de plaques. Il peut être également détecté dans la paroi de vaisseaux sanguins (Serrano-Pozo et al. 2011). On parle d'angiopathie amyloïde cérébrale (AAC) qui touche principalement les capillaires corticaux, les petites artérioles, les artères de taille moyenne ou encore les artères leptoméningées. Ces AAC affectent principalement les lobes occipitaux et pariétaux postérieurs. Leur gravité peut varier et peut être scorée selon une échelle allant de 0 à 4, le score de 4 étant le plus sévère. Ainsi, environ 80% des personnes atteintes de la MA présentent une AAC.

### 3.2- Les dégénérescences neurofibrillaires

Les dégénérescences neurofibrillaires sont des dépôts intracellulaires de la protéine TAU (*Tubuline Associated Unit*) sous sa forme hyperphosphorylée. Cette protéine fait partie de la famille des protéines associées aux microtubules MAP (*Microtubule-Associated Proteins*). Ainsi, en temps normal, TAU est associée aux microtubules, mais son hyperphosphorylation va entraîner son détachement de ces derniers et son accumulation dans le cytoplasme des neurones. Tout comme pour les plaques amyloïdes, on distingue différents types de dégénérescences neurofibrillaires (Serrano-Pozo et al. 2011). Tout d'abord, les pré-dégénérescences, ou dégénérescences neurofibrillaires diffuses, correspondent à des dépôts diffus

de TAU dans le cytoplasme des neurones. Ces derniers présentent une morphologie normale. Ensuite, les dégénérescences neurofibrillaires matures sont des dépôts filamenteux de TAU. Ils sont présents dans le cytoplasme des neurones, mais peuvent aussi être détectés dans les dendrites et dans le segment proximal des axones. Ces dépôts entraînent le déplacement du noyau des neurones vers la périphérie du corps cellulaire. Enfin, les dégénérescences neurofibrillaires extraneuronales, ou « fantômes », sont présentes au niveau extracellulaire du fait de la mort des neurones qui les contenaient.

Le développement de la pathologie Tau est également progressif, il peut être divisé en 6 stades numérotés de I à VI, aussi appelés stades de Braak (Braak et al. 2006). Par ailleurs, ces stades peuvent être regroupés en 3 stades principaux appelés : transentorhinal (Stades I et II), limbique (Stades III et IV) et isocortical (Stades V et VI) (**Figure 11**). Les premiers sites d'apparition des dégénérescences neurofibrillaires sont les régions transentorhinale et entorhinale, avec une atteinte progressive de l'hippocampe (Stades I et II). Elles vont ensuite progressivement se propager aux autres structures du cerveau affectant notamment le subiculum, l'amygdale ou encore le thalamus (Stades III et IV) jusqu'à atteindre les aires associatives du cortex (Stades V et VI). Récemment, des dégénérescences neurofibrillaires ont été détectées dans des noyaux sous-corticaux en l'absence d'atteinte de régions corticales (Braak et al. 2011). Il s'agit d'un stade de pré-dégénérescences qui est détecté dans le locus coeruleus, les noyaux du raphé et le noyau magnocellulaire. A noter que le développement des dégénérescences neurofibrillaires est corrélé aux déficits cognitifs, ce qui n'est pas le cas des plaques amyloïdes.



**Figure 11 : Progression des dégénérescences neurofibrillaires dans le cerveau des personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer**

Le développement des dégénérescences neurofibrillaires peut-être divisé en 3 stades principaux. Le stade transentorhinal qui se caractérise par une atteinte des régions transentorhinales et entorhinales. La pathologie se propage aux structures comme l'amygdale, le thalamus et le subiculum ce qui correspond au stade limbique. Les dégénérescences neurofibrillaires finissent par affecter l'ensemble du cortex, le stade isocortical est alors atteint. Plus la couleur est foncée, plus la densité de dégénérescences neurofibrillaires est importante. Amyg : Amygdale ; EC : Cortex entorhinal ; CA1 : Corne d'Ammon 1 ; Cg : Cortex cingulaire ; Prec : Precuneus ; 4 : Cortex moteur primaire ; 3-1-2 : Cortex sensoriel primaire ; 17 : Cortex visuel primaire ; 18 : Cortex visuel associatif. (Figure de Serrano-Pozo et al. 2011)

### 3.3- Neuro-inflammation

La MA est aussi caractérisée par la présence de microglies et d'astrocytes réactifs qui constituent la réaction neuro-inflammatoire. Ces derniers sont associés aux plaques amyloïdes compactes (Itagaki et al. 1989). Ainsi, les microglies réactives sont présentes au centre des plaques A $\beta$  alors que les astrocytes réactifs sont en périphérie. Par ailleurs, des microglies et des astrocytes réactifs peuvent également être détectés à proximité des dégénérescences neurofibrillaires (Serrano-Pozo et al. 2011).

Bien que dans un premier temps cette réaction pourrait avoir un rôle bénéfique en réduisant le niveau d'A $\beta$  dans le cerveau par phagocytose, son activation prolongée pourrait contribuer au développement de la pathologie (Chen et Mobley 2019; Kinney et al. 2018). En effet, les microglies et astrocytes activés de façon prolongée libèrent des cytokines pro-inflammatoires ou encore des espèces réactives de l'oxygène, de l'oxyde nitrique, l'interleukine 1- $\beta$ . Cela accentue la neuro-inflammation et contribue à la neurodégénérescence. Par ailleurs, l'activation prolongée des microglies entraîne une altération de leur



capacité à phagocyter l'A $\beta$ , ce qui contribue à exacerber la pathologie amyloïde. Cette neuro-inflammation accentue également la pathologie Tau.

### **3.4 Pertes synaptiques et neuronales**

Le cerveau des personnes atteintes de la MA présente une atrophie, en particulier au niveau du lobe temporal postérieur (Serrano-Pozo et al. 2011). Cette atrophie est liée aux importantes pertes synaptiques et neuronales qui peuvent être observées dans le cadre de la MA.

Ainsi, des pertes synaptiques ont été observées dans différentes régions du cerveau. Par exemple, une réduction progressive du nombre de synapses est constatée dans le gyrus denté de l'hippocampe à mesure que la démence évolue (Masliah et al. 1994). Alors que la perte synaptique est estimée à 20% chez des personnes avec une MA à un stade précoce, elle est de 50-65% chez les personnes avec une MA aux stades léger et avancé. De la même façon, une perte synaptique est observée dans la région CA1 de l'hippocampe ou encore dans le cortex frontal (Stephen W. Scheff, DeKosky, et Price 1990; S. W. Scheff et al. 2007). Dans ce dernier, la perte synaptique s'accroît également avec l'évolution de la démence (DeKosky et Scheff 1990). Par ailleurs, un élargissement de la taille des synapses restantes a été mis en évidence (DeKosky et Scheff 1990; Stephen W. Scheff, DeKosky, et Price 1990). Cela pourrait traduire un mécanisme de compensation mis en place afin d'essayer de palier la perte synaptique tant que celle-ci n'est pas trop importante. À noter que la réduction du nombre de synapses n'est pas uniquement liée à la neurodégénérescence. Elle peut se produire de façon indépendante. De plus, une corrélation est observée entre le déclin cognitif et la perte de synapses (DeKosky et Scheff 1990; S. W. Scheff et al. 2007).

Une neurodégénérescence est également observée dans plusieurs structures cérébrales comme au niveau de la formation hippocampique, incluant l'amygdale, le cortex frontal ou encore le cortex entorhinal (Andrade-Moraes et al. 2013 ; Gomez-Isla et al. 1996). Ainsi, dans le cortex entorhinal, une neurodégénérescence est visible dès un stade précoce de la maladie (Gomez-Isla et al. 1996). Cette dernière affecte dans un premier temps les couches II et IV, puis s'étend aux autres couches lorsque la pathologie progresse. Ainsi, à un stade de démence légère, une réduction de 60 et 40% du nombre de neurones est observée dans les couches II et IV du cortex entorhinal, respectivement. Cette réduction s'accroît à un stade de démence sévère, atteignant alors une réduction de 90% dans la couche II et 70% dans la couche IV. Par ailleurs, le cortex entorhinal n'est pas la seule structure à être affectée de façon précoce. Une neurodégénérescence est également observée de façon précoce dans des régions sous-corticales comme le noyau basal de Meynert ou encore le locus coeruleus (Arendt et al. 2015). À l'inverse,

d'autres structures sont affectées à un stade plus tardif du développement de la pathologie, c'est notamment le cas pour le sulcus temporal supérieur (Gomez-Isla et al. 1996). Le cervelet quant à lui semble préservé de cette neurodégénérescence puisqu'aucune perte neuronale n'y est visible (Andrade-Moraes et al. 2013). Par ailleurs, tout comme pour la perte synaptique, la neurodégénérescence est corrélée au déclin cognitif.

## II- Le Syndrome de Down

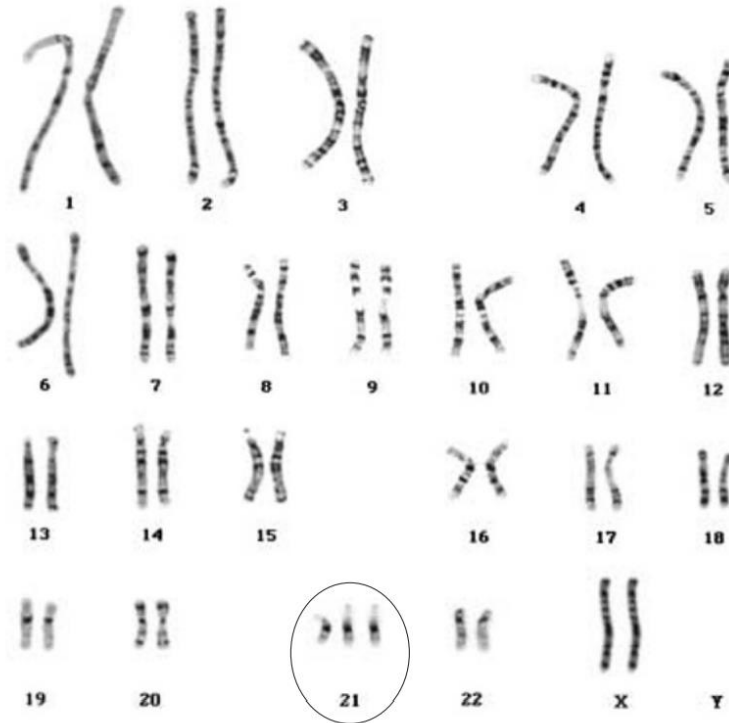
Le Syndrome de Down (SD), ou Trisomie 21, est la première cause de déficience intellectuelle d'origine génétique. Il a été décrit pour la première fois par John Langdon Down en 1862, et le lien entre le SD et la présence du chromosome 21 surnuméraire a été établie en 1959 par Marthe Gautier, puis repris par Jérôme Lejeune et Raymond Turpin (Lejeune, Turpin, et Gautier 1959). Le séquençage quasi complet du chromosome 21 (Hsa21) a été réalisé en 2000 (Hattori et al. 2000). Ce dernier, acrocentrique, comporte un bras court de 0,3 Mégabases (Mb) et un bras long de 33,65 Mb. Aujourd'hui, 236 gènes codant pour des protéines ont été identifiés ainsi que 424 gènes non-codant et 188 pseudo-gènes (données tirées d'Ensembl, version du génome GRCh38.p13).

La fréquence du SD est estimée à environ 1 naissance sur 800 (De Graaf, Van Hove, et Haveman 2014). Cependant, le risque d'avoir un enfant atteint du SD augmente avec l'âge de la mère (Mai et al. 2013). Ainsi, il est de 1/1500 à 20 ans, 1/1000 à 30 ans et passe à 1/100 à l'âge de 40 ans.

### 1- Les différentes formes de SD

Le SD est la conséquence d'une non-disjonction des chromosomes ou chromatides lors de la phase de méiose ou mitose. Cela conduit à la présence de 47 chromosomes dans les cellules au lieu de 46. On en distingue ainsi 4 formes (Bull 2020; <https://www.jeromefdn.org/>). Tout d'abord, la **trisomie complète** représente la majorité des cas de SD, soit 95% (**Figure 12**). Elle se traduit par la présence de 3 copies complètes du chromosomes 21 qui sont présentes dans toutes les cellules de l'organisme. On dit de cette trisomie qu'elle est libre, complète et homogène. Ensuite, la **translocation Robertsonienne** concerne 2 à 4% des cas. Dans cette forme, le bras long du chromosome 21 supplémentaire se retrouve attaché à un autre chromosome, généralement le chromosome 14, mais il peut aussi se retrouver associé aux chromosomes 21 ou 22. Dans certains cas, les personnes atteintes du SD vont posséder 3 copies du chromosome 21 seulement dans une sous-population de leurs cellules, le reste de leurs cellules possédant

un nombre normal de chromosomes. Le nombre de cellules affectées varie d'une personne à l'autre. On parle ainsi de **trisomie mosaïque**, elle concerne 1 à 2% des cas. Enfin, dans de très rares cas (< 1%), la trisomie peut être **partielle**. Elle se traduit alors par la duplication d'un fragment du chromosome 21 et non du chromosome entier.



**Figure 12 : Caryotype d'une femme porteuse d'une trisomie complète**

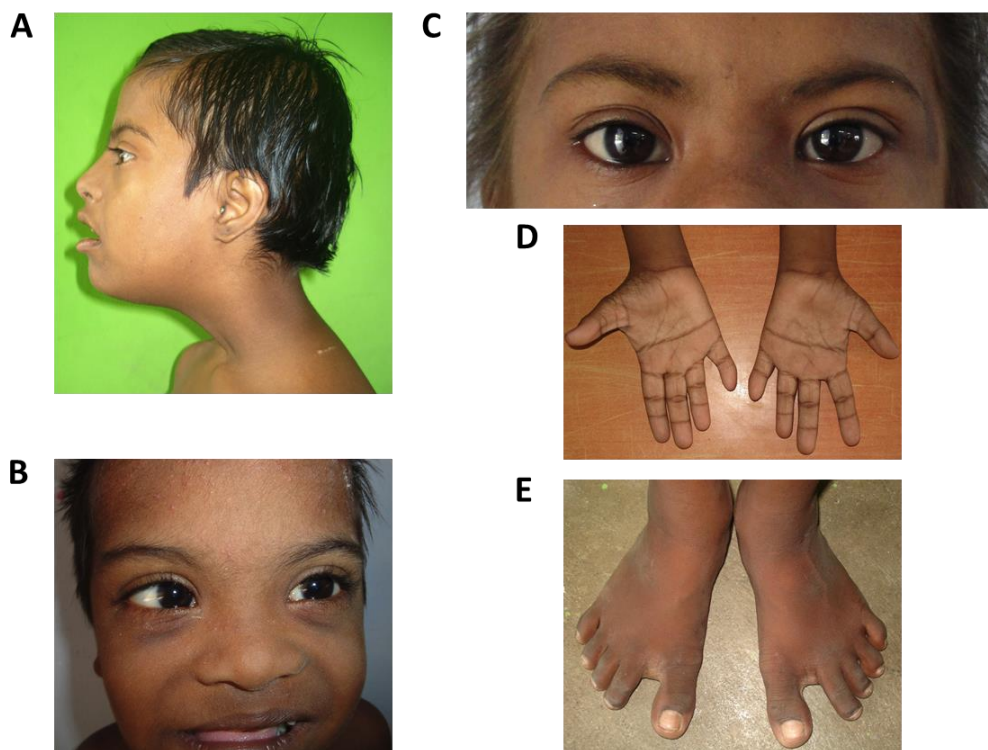
Figure de Antonarakis et al. 2004

## 2- Les signes cliniques

Les personnes atteintes du SD présentent des phénotypes très variables. Cependant, certains phénotypes sont caractéristiques et sont retrouvés chez toutes les personnes atteintes du SD. Elles présentent ainsi des dysmorphies physiques, une déficience intellectuelle et une hypotonie musculaire. Par ailleurs, elles sont plus à risques de développer d'autres problèmes de santé parmi lesquels on peut citer les anomalies cardiaques, des problèmes auditifs, visuels, hématologiques ou encore la maladie d'Alzheimer (Antonarakis et al. 2020; Bull 2020). D'un point de vue clinique, aucune différence n'est observée entre une trisomie complète et une trisomie par translocation. En revanche, pour les trisomies mosaïque et partielle, la déficience intellectuelle est souvent moins sévère et les personnes atteintes développent moins de complications médicales.

## 2.1- Les dysmorphies

Les personnes atteintes du SD possèdent des traits physiques caractéristiques (Sureshabu et al. 2011). Ainsi, elles présentent une brachycéphalie, c'est-à-dire un aplatissement de l'arrière de la tête (**Figure 13-A**). Leur visage rond se caractérise par des petites oreilles dont la position est plus basse, un petit nez avec une arête aplatie et un pli épicanthique (**Figure 13-B et C**). Ce dernier correspond à un repli cutané sur la paupière supérieure au niveau du coin interne de l'œil. Leur bouche est également petite et entrouverte, une protrusion de la langue pouvant être observée. Cette dernière présente un aspect fissuré ainsi qu'une augmentation de son volume, on parle de macroglossie. Des anomalies dentaires sont aussi présentes avec un possible retard de la dentition. Outre des anomalies au niveau de la face, les personnes atteintes du SD possèdent un cou court et large avec un excès de peau au niveau de la nuque. Au niveau des mains, un seul pli palmaire est observé celui-ci s'étendant d'un côté à l'autre de la paume de la main. L'auriculaire présente une courbure vers les autres doigts de la main, on parle de clinodactylie, ainsi qu'une hypoplasie de la seconde phalange (**Figure 13-D**). Enfin, au niveau des pieds, l'espace entre le premier et le second orteil est élargi (**Figure 13-E**).



**Figure 13 : Dysmorphies physiques associées au Syndrome de Down**

Les personnes atteintes du SD présentent une brachycéphalie (**A**), un nez avec une arête aplatie et une bouche entrouverte (**B**). Au niveau des yeux, un pli épicanthique est observé (**C**). Des anomalies de la morphologie des mains (**D**) et des pieds (**E**) sont également mises en évidence. Les mains possèdent un unique pli palmaire, ainsi qu'une clinodactylie et une hypoplasie de la seconde phalange de l'auriculaire. (Figure de Sureshabu et al. 2011)

## 2.2- La déficience intellectuelle

La déficience intellectuelle est la caractéristique majeure du SD. Cependant, le degré de déficience est variable d'un individu à l'autre avec un quotient intellectuel (QI) de 50 en moyenne. Ce dernier pouvant varier entre 30 et 70 (Grieco et al. 2015). Ainsi, la majorité des personnes atteintes du SD présentent une déficience intellectuelle modérée à sévère. En effet, dans l'étude réalisée par Määttä et al. (2006), 19% des personnes atteintes du SD présentaient une déficience légère avec un QI entre 50 et 69, une déficience modérée dans 30% des cas (QI entre 35 et 49), sévère dans 33% (QI entre 20 et 34) et profonde dans 18% des cas (QI<20) (Määttä et al. 2006).

Les personnes atteintes du SD présentent des déficits dans diverses fonctions cognitives. Tout d'abord au niveau du langage, pour lequel un retard d'acquisition est constaté chez les enfants atteints du SD. Ce retard apparaît dès l'acquisition des premiers mots et se maintient alors que le vocabulaire s'enrichit (Buckley et Oliver 1994). Ainsi, les enfants atteints du SD mettent 12 mois de plus à atteindre un stade de 10 mots de vocabulaire. Ils mettent également plus de temps pour commencer à construire des phrases à plusieurs mots. Les enfants avec un développement normal atteignent le stade de phrases composées de 2 mots à l'âge d'environ 19 mois, alors que les enfants avec le SD l'atteignent en moyenne à 37 mois, soit 18 mois plus tard.

Des altérations sont également observées au niveau des fonctions exécutives ou encore de la mémoire. Parmi les fonctions exécutives, des déficits sont constatés dans la planification, l'inhibition ou encore la flexibilité cognitive chez les adolescents atteints du SD (S. Lanfranchi et al. 2010; Borella, Carretti, et Lanfranchi 2013). Par ailleurs, un déficit de flexibilité cognitive est retrouvé chez l'adulte (Rowe, Lavender, et Turk 2006). Cette étude met également en évidence un déficit d'attention, alors que les capacités d'inhibition ne semblent pas altérées chez les adultes atteints du SD. Concernant la mémoire, la mémoire de travail (MDT) est impactée. Cette dernière permet le maintien d'information sur du court terme et implique une manipulation mentale de l'information. Ainsi, un déficit de MDT reposant sur une composante verbale est observé chez les adolescents tout comme chez les adultes atteints du SD (Rowe, Lavender, et Turk 2006; S. Lanfranchi et al. 2010; Borella, Carretti, et Lanfranchi 2013). Par ailleurs, ce déficit semble indépendant de l'altération des capacités verbales observée chez les personnes atteintes du SD (Silvia Lanfranchi, Jerman, et Vianello 2009). A l'inverse, la MDT reposant sur une composante visuo-spatiale semble relativement préservée. En effet, l'étude de Lanfranchi et al. 2009 montre qu'en fonction du degré de complexité de la tâche de MDT visuo-spatiale, une altération de cette dernière peut être visible ou non. Ainsi, pour une tâche de complexité faible, aucun déficit n'est observé (Rowe, Lavender, et

Turk 2006; Silvia Lanfranchi, Jerman, et Vianello 2009). A l'inverse, lorsque la tâche présente une complexité élevée et donc un exercice mental plus important, une altération de la MDT visuo-spatiale est mise en évidence (Silvia Lanfranchi, Jerman, et Vianello 2009; S. Lanfranchi et al. 2010).

Enfin, la mémoire à long terme a également été évaluée chez les personnes atteintes du SD. Cette dernière peut être subdivisée en 2 types de mémoire. Tout d'abord, la mémoire explicite qui implique un rappel conscient des informations et qui peut être exprimée par le langage. Cette dernière peut également être subdivisée et comporte notamment la mémoire épisodique. Ainsi, un déficit de mémoire épisodique est observé chez les personnes atteintes du SD (Carlesimo, Marotta, et Vicari 1997; Vicari, Bellucci, et Carlesimo 2000). Il serait en partie lié à un déficit de récupération des informations qui ont été précédemment stockées. La mémoire implicite, par opposition à la mémoire explicite, ne nécessite pas de rappel conscient de l'information. Elle comprend les apprentissages procéduraux et non-associatifs, les habitudes et les conditionnements. Ainsi, la mémoire implicite est préservée chez les personnes atteintes du SD.

### **2.3- L'hypotonie musculaire**

L'hypotonie musculaire est présente chez tous les individus atteints du SD. Elle traduit une réduction du tonus et de la force musculaire (A. F. Morris, Vaughan, et Vaccaro 1982). Par ailleurs, une réduction du réflexe rotulien est également constatée. Cette hypotonie a différentes conséquences avec, notamment, un retard dans l'acquisition de la motricité. Elle contribue également à l'apparition de désordres musculo-squelettiques (Foley et Killeen 2019) ou encore aux dysfonctionnements oro-faciaux (Faulks et al. 2008). Une hypotonie est ainsi observée au niveau de la langue et des lèvres. Cela impacte l'alimentation comme, par exemple, à la naissance où la faible musculature de la mâchoire affecte l'allaitement.

### **2.4- Les comorbidités**

Aux 3 traits caractéristiques du SD viennent s'ajouter de nombreuses comorbidités (Antonarakis et al. 2020; Bull 2020). En effet, les personnes atteintes du SD présentent une susceptibilité plus importante au développement de nombreuses complications de santé. Ces dernières varient d'un individu à l'autre. Certaines de ces comorbidités sont décrites dans ce paragraphe ; il s'agit ici d'une liste non-exhaustive.

Des **anomalies cardiaques congénitales** sont ainsi couramment observées. Elles concernent 54% des enfants atteints du SD (Bergstrom et al. 2016). Chez ces derniers, 3 formes d'anomalies cardiaques

congénitales sont diagnostiquées : la communication auriculo-ventriculaire qui représente la majorité des cas (42%), la communication interventriculaire et la communication interauriculaire, dans 22 et 16% des cas, respectivement. Par ailleurs, des anomalies cardiaques peuvent être détectées chez des adolescents et adultes atteints du SD qui ne présentaient pas d'antécédents d'anomalies cardiaques congénitales (Geggel, O'Brien, et Feingold 1993).

Des **troubles du sommeil** sont également constatés chez les personnes atteintes du SD. Une étude réalisée sur des enfants âgés entre 7 et 17 ans montre que 65% d'entre eux présentent des troubles du sommeil (Hoffmire et al. 2014). Des apnées du sommeil sont le plus fréquemment observées. Elles peuvent être en partie liées aux dysmorphies faciales présentes chez les personnes atteintes du SD. Par ailleurs, une autre altération du sommeil a été mise en évidence dans cette étude, le syndrome des jambes sans repos. Ce dernier correspond à des mouvements involontaires des jambes pendant le sommeil.

A cela se rajoutent des **problèmes auditifs et visuels**. L'étude réalisée par Roizen et al. (2014) chez 440 enfants atteints du SD a mis en évidence que 39% d'entre eux présentent des problèmes auditifs et 57% des problèmes visuels (Roizen et al. 2014). Des pertes d'audition sont fréquemment observées ; elles concernent 34 à 78% des enfants (Nightingale et al. 2017; Chen et al. 2021). Elles peuvent être liées à une altération de la transmission du son, on parle alors de surdité de transmission, ou à des altérations de la structure sensorielle et nerveuse de la cochlée, on parle alors de surdité neurosensorielle. Les enfants atteints du SD présentent également un risque plus élevé de développer des otites (Austeng et al. 2013). Concernant la vision, des troubles de la réfraction sont principalement observés (Fong et al. 2013). Cela inclut la myopie et l'astigmatisme. Cette étude montre également un nombre important de cataractes, concernent 72,2% des yeux, ainsi que du strabisme (40% des yeux).

Les personnes atteintes du SD présentent également un risque élevé de développer une **leucémie**. En effet, les leucémies représentent 95% des cancers chez les enfants atteints du SD âgés de moins de 4 ans alors qu'elles ne représentent que 34% des cancers chez les enfants de la population générale (H. Hasle 2001; Henrik Hasle et al. 2016). Par ailleurs, le risque de développer une leucémie reste élevé jusqu'à l'âge de 30 ans. Ainsi, à l'âge adulte les leucémies représentent 18% des cancers chez les individus avec le SD contre seulement 2,4% dans la population générale. A l'inverse, les personnes atteintes du SD ont un risque plus faible de développer des tumeurs solides.

Enfin, les personnes atteintes du SD présentent un risque accru de développer une démence précoce de type Alzheimer. Cet aspect sera développé plus en détails dans la Partie III de ce chapitre.

### 3- Les anomalies cérébrales

Les déficits cognitifs décrit précédemment sont le résultat de nombreuses anomalies au niveau de la structure du cerveau. Une réduction du volume cérébral est observée chez les personnes atteintes du SD ; on parle de microcéphalie (Jernigan et al. 1993; Pinter et al. 2001). Cependant, cette réduction n'affecte pas toutes les structures cérébrales de la même façon. En effet, alors que certaines structures apparaissent plus petites, d'autres ne sont pas affectées. Ainsi, une réduction du volume du cervelet, aussi appelée hypoplasie cérébelleuse, est observée (Wisniewski 1990; Jernigan et al. 1993; Pinter et al. 2001). De la même façon, le cortex frontal ou encore l'hippocampe sont de taille réduite (Wisniewski 1990; Jernigan et al. 1993; Aylward et al. 1999). A l'inverse, les structures corticales postérieures, le thalamus, l'hypothalamus ou encore l'amygdale sont préservés (Jernigan et al. 1993; Aylward et al. 1999). Les ganglions de la base ont également été étudiés, notamment le volume du noyau caudé, du putamen et du globus pallidus. Alors que Jernigan et al. (1993) ne mettent pas en évidence d'atteinte des ganglions de la base, Aylward et al. (1997) confirment que le noyau caudé et le globus pallidus ne sont pas affectés par cette réduction de volume cérébral, alors qu'en revanche ils relèvent une augmentation du volume du putamen. Cette différence entre les 2 études pourrait s'expliquer par le fait que Jernigan et al. (1993) ont mesuré le volume du noyau lenticulaire, comprenant le putamen et le globus pallidus, alors que dans l'étude de Aylward et al. (1997) le volume de chaque structure a été mesuré séparément.

Par ailleurs, des anomalies au niveau cellulaire sont également observées. Ainsi, une réduction du nombre de neurones a été mise en évidence dans le cortex, en particulier dans les couches II et IV (Wisniewski 1990). De la même façon, la région hippocampique possède moins de neurones dès le stade fœtal (Guidi et al. 2008). Cela concerne notamment l'hippocampe, le présubiculum ou encore le cortex entorhinal. Cette réduction neuronale pourrait être en partie liée à une altération de la neurogénèse. En effet, Guidi et al. (2008) ont montré une réduction du nombre de cellules en prolifération dans la zone ventriculaire de l'hippocampe au stade fœtal. Un mécanisme d'apoptose plus important pourrait également contribuer à cette réduction. En effet, une augmentation du nombre de cellules apoptotiques est mise en évidence dans le gyrus denté et la zone ventriculaire (Guidi et al. 2008). Par ailleurs, la morphologie neuronale est également affectée. Ainsi, la complexité de l'arborisation neuronale et la longueur des dendrites sont diminuées dans les cortex visuel et temporal chez l'adulte (Takashima et Iida 1994). Une réduction du nombre d'épines dendritiques et de la densité synaptique est également observée dans le cortex visuel (Wisniewski 1990; Takashima et Iida 1994). Enfin, un retard de la myélinisation est constaté chez 22,5% des enfants atteints du SD. Ces anomalies de la structure des neurones peuvent contribuer à altérer la fonction synaptique, et donc la plasticité synaptique qui joue un rôle clé dans les fonctions cognitives.



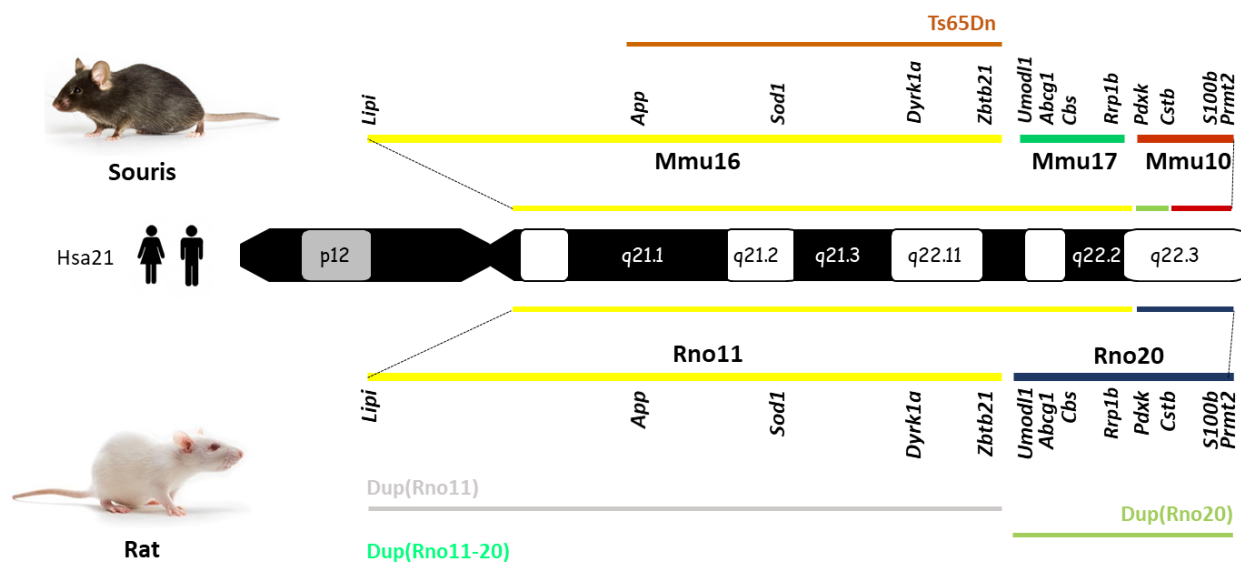
#### 4- Les corrélations génotypes-phénotypes dans le Syndrome de Down

Afin d'identifier les gènes responsables des phénotypes observés dans le SD, des études de corrélations génotypes-phénotypes ont été réalisées. Ces dernières s'appuient sur la comparaison de cas de trisomies partielles et ont pour but de mieux comprendre la physiopathologie du SD. Ainsi, les premières études réalisées ont mis en évidence une petite région, située en 21q22, comme étant responsable de la majorité des traits phénotypiques associés au SD (Delabar et al. 1993). Cette région est appelée DCR, pour « *Down Syndrome Chromosome Region* ». Les phénotypes observés dans le SD reposeraient alors sur des gènes contenus dans une région unique sur le chromosome 21. Par la suite, Korenberg et al. (1994) ont comparé les phénotypes de 16 individus porteurs d'une trisomie partielle. Cela a ainsi permis d'associer certains phénotypes à des régions spécifiques du Hsa21, créant ainsi une carte phénotypique (Korenberg et al. 1994). Par ailleurs, cette étude a mis en évidence l'implication de gènes situés en dehors de la DCR. En effet, les régions identifiées n'incluent pas toujours, ou ne sont pas limitées, à la DCR. Ces observations viennent donc contredire l'idée d'une région unique, avec l'existence de plusieurs régions critiques associées à des phénotypes particuliers. D'autres études ont, par la suite, cartographié de façon plus précise les régions impliquées (Lyle et al. 2009; Korbel et al. 2009). Ainsi, plusieurs régions seraient impliquées dans le développement des déficiences intellectuelles, deux régions ayant été identifiées. Des observations similaires ont été faites pour l'hypotonie musculaire. De plus, pour certains phénotypes, des gènes candidats ont été identifiés, c'est notamment le cas pour les anomalies cardiaques congénitales pour lesquelles le gène *DSCAM* (« *DS Cell Adhesion Molecule* ») a été mis en évidence. De la même façon, pour la MA dans ce contexte de SD, une région critique de 1,95 Mb qui inclut le gène *APP* a été définie. L'importance de ce gène dans le développement de la MA dans le SD est décrite plus en détails dans la Partie III, Point 2. Par ailleurs, des cas de trisomies partielles, qui n'incluent pas la DCR, ont été identifiés (Korenberg et al. 1994; Weisfeld-Adams et al. 2016). Cela renforce donc l'idée que des gènes, situés en dehors de cette région, sont également impliqués dans le développement du SD. L'étude de Weisfeld-Adams et al. (2016) a ainsi mis en évidence l'implication des gènes *SOD1* (« *Superoxide Dismutase 1* »), *SYNJ1* (« *Synaptojanin 1* ») et *ITSN1* (« *Intersectin 1* ») dans le développement des caractéristiques physiques associées au SD ainsi que des déficiences intellectuelles.

Les études réalisées chez les personnes porteuses de trisomie partielle ont permis d'accroître nos connaissances sur la physiopathologie du SD. Cependant, cette approche est limitée par le fait que les cas de trisomies partielles sont très rares, ils représentaient environ 60 cas dans le monde en 2010. Il est donc nécessaire d'avoir recours à des modèles animaux afin de caractériser de façon plus précise, le gène ou les régions impliquées dans le développement de phénotypes particuliers.

## 5- L'apport des modèles rongeurs du Syndrome de Down

Dans le but de comprendre la physiopathologie du SD, et de mieux comprendre les corrélations génotypes-phénotypes, de nombreux modèles de souris SD ont été créés (Herault et al. 2017). Ainsi, chez la souris, les régions synténiques au Hsa21 sont réparties sur 3 chromosomes différents : les chromosomes 10 (Mmu10, Mmu pour *Mus musculus*), 16 (Mmu16) et 17 (Mmu17) (**Figure 14**). Le premier modèle qui a été créé est le modèle Ts65Dn (Davisson, Schmidt, et Akeson 1990). Ce dernier est le plus couramment utilisé. Il comporte un mini-chromosome supplémentaire qui inclut la région de synténie du Mmu16 entre les gènes *App* et *Zbtb21* (« Zinc Finger And BTB Domain Containing 21 ») ainsi que la région centromérique du Mmu17. Cependant, cette dernière n'est pas homologue au Hsa21. Elle comporte ainsi des gènes pouvant avoir une influence sur les phénotypes observés sans qu'il n'y ait de lien avec le SD. Depuis, de nombreux modèles ont été développés. Ces derniers présentent soit des duplications totales ou partielles de ces différentes régions de synténie, soit des duplications de gènes spécifiques semblant jouer un rôle-clé dans le développement du SD. Le but de ces modèles est de nous permettre de mieux comprendre le rôle joué par ces différentes régions/gènes dans le développement des différents phénotypes associés SD.



**Figure 14** : Représentation des régions chromosomiques, de la souris et du rat, synténiques au chromosome 21 humain

Le chromosome 21 humain (Hsa 21) est représenté au centre de la figure. Dans la partie supérieure, sont indiquées, pour la souris, les régions chromosomiques Mmu16, Mmu17 et Mmu10 synténiques au Hsa21. Pour le rat, les régions de synténie, présentes sur les chromosomes Rno11 et Rno20, sont représentées dans la partie inférieure de la figure. En-dessous de chaque région, quelques gènes homologues au Hsa21 sont listés. Les intervalles dupliqués chez les modèles Ts65Dn, Dup(Rno11), Dup(Rno20) et Dup(Rno11-20) sont également représentés.

Par ailleurs, la récente révolution de l'ingénierie génétique permet, depuis quelques années, de créer des modèles de rats du SD. En effet, la mise au point de la technique CRISPR/Cas9 permet de modifier facilement et rapidement le génome du rat, ce qui était jusque-là difficile (Birling et al. 2017). Chez ce dernier, les régions synténiques au Hsa21 sont présentes sur 2 chromosomes différents : les chromosomes 11 (Rno11, Rno = *Rattus norvegicus*) et 20 (Rno20) (**Figure 14**). Ainsi, parmi les modèles qui ont été créés à l'Institut Clinique de la Souris, deux modèles sont étudiés dans le cadre de cette thèse, les rats Dup(Rno11) et Dup(Rno20). Le premier comporte une duplication de la région du Rno11 synténique au Hsa21. Cette région de 24,4 Mb se situe entre les gènes *Lipi* (« *Lipase I* ») et *Zbtb21* et comporte 140 gènes codant pour des protéines. Le modèle Dup(Rno20), quant à lui, présente une duplication de la région Rno20 synténique au Hsa21. Cette dernière, d'une taille de 3,6 Mb, se situe entre les gènes *Umodl1* (« *Uromodulin-like 1 precursor* ») et *Prmt2* (« *Protein Arginine Methyltransferase 2* »). Cette région est donc bien plus petite que la région du Rno11 et comporte uniquement 73 gènes codant pour des protéines. Ces modèles permettent d'étudier le rôle de chacune de ses régions dans la physiopathologie du SD. Par ailleurs, ils permettent d'obtenir facilement un modèle de trisomie complète. En effet, le croisement des modèles Dup(Rno11) et Dup(Rno20) permet d'obtenir un modèle de rat incluant une duplication des 2 régions de synténies. Ce modèle est appelé Dup(Rno11-20).

### III- La maladie d'Alzheimer dans le syndrome de down

#### 1- Prévalence

En 1929, l'espérance de vie des personnes atteintes du SD n'était que de 9 ans (Bittles et Glasson 2007). Avec l'amélioration des soins qui leur sont apportés, leur espérance de vie a progressivement augmenté au cours de ces dernières années. Cela est principalement lié à une meilleure prise en charge des comorbidités associées au SD. Ainsi, une amélioration des procédures chirurgicales pour les malformations cardiaques ou encore la mise en place des antibiotiques pour traiter les infections ont contribué à cette augmentation de leur espérance de vie. De nos jours, les personnes atteintes du SD vivent en moyenne jusqu'à 60 ans voire au-delà.

Par ailleurs, cette augmentation de l'espérance de vie a mis en évidence que les personnes atteintes du SD présentent un risque élevé de développer, de façon précoce, une démence de type Alzheimer. Ainsi, une étude de suivi réalisée sur 20 ans estime que le risque de développer une MA dans un contexte de SD est de 23% à l'âge de 50 ans (McCarron et al. 2017). Ce risque augmente avec l'âge et passe à 45% à l'âge de 55 ans, et à 88% pour les personnes SD âgées de 65 ans et plus. Cependant, la prévalence de la MA

dans un contexte de SD varie d'une étude à l'autre, avec des prévalences qui peuvent être plus faibles (Coppus, Evenhuis, et van Duijin 2006; Bayen et al. 2018). Ainsi, l'étude de Coppus et al. (2006) met en évidence une prévalence de 32,1% pour la tranche d'âge de 55-59 ans, cette dernière diminuant chez les personnes SD de plus de 65 ans, atteignant 25,6% du fait d'un taux de mortalité plus élevé. L'étude de Bayen et al. (2018) propose pour sa part une prévalence de 49% chez les plus de 65 ans. Les différences entre ces études peuvent être en partie liées à la difficulté de diagnostic de la démence chez les personnes atteintes du SD du fait de leur déficience intellectuelle plus ou moins sévère. Par ailleurs, les études de McCarron et al. (2017) et Coppus et al. (2006) se basent sur un suivi des patients sur plusieurs années, alors que l'étude de Bayen et al. (2018) repose sur une analyse d'un recueil de données sur 1 an. Enfin, l'étude de McCarron et al. (2017) n'inclut que des femmes, alors que les 2 autres études considèrent les 2 sexes. Voici autant d'éléments qui peuvent induire des variations dans les pourcentages trouvés. Cependant, toutes ces études mettent en évidence que les personnes atteintes du SD ne vont pas systématiquement développer une MA.

Par ailleurs, l'âge moyen de diagnostic de la MA chez les personnes atteintes du SD est d'environ 55 ans (McCarron et al. 2017; Sinai et al. 2018) avec une espérance de vie de 3 à 6 ans après le diagnostic.

## **2- Rôle majeur de l'APP**

Dans le contexte du SD, le gène de l'APP joue un rôle-clé dans le développement de la MA. En effet, il est présent sur le chromosome 21 et existe donc en 3 copies chez les personnes atteintes du SD. Par ailleurs, sa duplication est suffisante pour induire le développement de la MA. Il existe ainsi des cas de microduplications de régions du chromosome 21, incluant l'APP, qui induisent une MA chez des personnes qui n'ont pas le SD (Anne Rovelet-Lecrux et al. 2006; A. Rovelet-Lecrux et al. 2007; Hooli et al. 2012). A l'inverse, les personnes atteintes du SD qui présentent une trisomie partielle n'incluant pas le gène *APP*, qui est donc en 2 copies, ne développent pas de MA. Ainsi, dans la littérature, le cas d'un homme de 65 ans et celui d'une femme de 78 ans avec trisomie partielle n'incluant pas l'APP ont été décrits (Prasher et al. 1998; Doran et al. 2017). Ils ne montraient aucun signe de démence et ne présentaient pas les caractéristiques neuropathologiques associées à la MA. Par ailleurs, en accord avec les pourcentages de prévalence décrits précédemment, toutes les personnes atteintes du SD avec une trisomie complète ne développent pas une MA. En effet, le cas d'un homme de 70 ans avec une trisomie complète sans MA a été décrit (Krinsky-McHale et al. 2008). Ce dernier, suivi pendant 16 ans, ne présentait pas de déclin de ses capacités cognitives, dont la mémoire épisodique qui est impactée dans la MA. Ainsi, bien que l'APP joue

un rôle clé dans le développement de la MA dans ce contexte de SD, la pénétrance incomplète du phénotype laisse supposer l'implication d'autres gènes. Il pourrait s'agir de gènes également présents sur le chromosome 21, et qui sont donc surexprimés, ou d'autres gènes présents dans le reste du génome.

### **3- Symptômes cliniques**

Des changements dans le comportement et la personnalité des personnes atteintes du SD ont été suggérés comme étant les premiers signes du développement d'une démence de type Alzheimer (Holland et al. 2001; Ball et al. 2006). Ainsi, les principaux changements observés sont l'apathie, une perte de motivation, une réduction de l'empathie, de l'obstination, ou encore une labilité émotionnelle. Ces changements de comportement/personnalité sont plus typiques d'une démence de type frontal. Cela laisse donc penser qu'une atteinte frontale serait le premier signe de développement de la MA chez les personnes atteintes du SD. Par ailleurs, l'étude de Ball et al. (2006) montre qu'un déclin des fonctions exécutives est associé à ces changements. Ces dernières impliquent le cortex frontal ce qui renforce l'idée d'une atteinte frontale précoce. Cependant, une autre étude indique qu'une altération de la mémoire serait le premier signe du développement de la MA (Blok, Scheirs, et Thijm 2017). En effet, cette étude met en évidence une altération de la mémoire immédiate. Bien que des changements dans le comportement et la personnalité soient également observés, ils ne semblent pas précéder le déficit de mémoire. Des observations similaires ont été faites dans d'autres études qui montrent un déficit dans le rappel d'informations chez des personnes SD à un stade précoce de la MA (Krinsky-McHale et al. 2008; Devenny et al. 2002). Un déficit dans le stockage de nouvelles informations est également constaté. Par ailleurs, ces déficits de mémoire peuvent être observés chez certaines personnes atteintes du SD avant même que le diagnostic de MA soit établi. Les différences entre ces études, sur le premier signe associé au développement de la MA, pourraient s'expliquer par la difficulté de diagnostic de la démence. En effet, la présence d'un déficit intellectuel plus ou moins sévère « en toile de fond » rend le diagnostic plus complexe. Ainsi, la démence est souvent mise en évidence une fois qu'elle a atteint un stade déjà avancé.

Certaines études s'intéressent également à la chronologie des déficits cognitifs au cours de la progression de la MA chez les personnes atteintes du SD (Firth et al. 2019; Startin et al. 2019). Ainsi, au cours de la phase prodromique de la maladie, soit avant que la démence ne soit diagnostiquée, les fonctions qui semblent être les premières touchées sont la mémoire visuo-spatiale, l'attention, la coordination motrice, les fonctions exécutives, ou encore la fluidité verbale. Par la suite, les capacités de planification,

d'apprentissage et de flexibilité sont altérées, et ce n'est que plus tard que des changements au niveau du comportement peuvent être observés.

Par ailleurs, en plus des déficits cognitifs, une comorbidité est observée avec l'épilepsie (Altuna, Giménez, et Fortea 2021). En effet, un nombre plus important de personnes atteintes du SD avec une MA présentent une épilepsie, soit 41,1% contre 21,7% chez les personnes SD sans la MA (Bayen et al. 2018). De la même façon, un risque plus élevé d'épilepsie est constaté chez les personnes de la population générale qui ont une MA (Giorgi et al. 2020). Un délai d'environ 2-3 ans est observé entre le diagnostic de la démence et la première crise épileptique (Lott et al. 2012; Gholipour et al. 2017). Cependant, chez certaines personnes, la démence et l'épilepsie peuvent se déclencher en même temps. Ainsi, un déclin cognitif plus important est constaté chez les personnes SD qui présentent de l'épilepsie. Il s'agit principalement de crises myocloniques et tonico-cloniques généralisées qui peuvent coexister. Par ailleurs, cette épilepsie évolue au cours du temps (d'Orsi, Specchio, et Apulian Study Group on Senile Myoclonic Epilepsy 2014). Ainsi, les crises myocloniques précèdent les crises tonico-cloniques généralisées et affectent principalement la partie haute du corps. Ces crises myocloniques et tonico-cloniques se produisent au réveil et vont, au cours du temps, laisser place à des myoclonies non-épileptiques.

#### **4- Neuropathologie de la MA dans un contexte de SD**

Tout comme les personnes atteintes de la MA, les personnes atteintes du SD développent les plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires caractéristiques de la MA. Cependant, les premiers changements liés à la MA débutent des années avant que les premières plaques où premiers signes cliniques ne soient observés. Ainsi, dans le cadre du SD, des changements peuvent être observés dès le stade fœtal avec la détection d'A $\beta$  soluble dans le cerveau de fœtus dès la 21<sup>ème</sup> semaine de gestation (Teller et al. 1996). Par ailleurs, avant l'apparition de dépôts extracellulaires d'A $\beta$ , des dépôts intracellulaires sont détectés chez les personnes atteintes du SD (Gyure et al. 2001). Ces dépôts intracellulaires sont notamment détectés dans le cortex cérébral et l'hippocampe, et peuvent être observés dès l'âge de 1 an.

La présence de plaques amyloïdes extracellulaires n'est que très rarement observée avant l'âge de 20 ans (D. M. A. Mann 1988). Dans un premier temps, des plaques diffuses apparaissent. Elles commencent à se développer chez les personnes atteintes du SD entre la fin de l'adolescence et la vingtaine (D. M. Mann et Esiri 1988; Iwatsubo et al. 1995; Davidson et al. 2018). Par la suite, des plaques amyloïdes matures, présentant un cœur dense, vont se développer. A mesure que les plaques se développent, le nombre de

dépôts intracellulaire d'A $\beta$  diminue (Cataldo et al. 2004). L'étude de Davidson et al. (2018) met en évidence que le premier site d'apparition des plaques serait le cortex temporal. Cependant, l'utilisation de la technique de tomographie par émission de positrons (TEP) *in vivo* indique que le striatum serait le premier site de formation des plaques amyloïdes (Handen et al. 2012; Annus et al. 2016). Ceci est similaire à ce qui peut être observé dans les formes familiales de la MA liée à une mutation dans le gène de la PS1 ou de l'APP, et pour lesquelles le premier site de dépôt est également le striatum (Villemagne et al. 2009). Ces différences de résultats pourraient être liées aux techniques utilisées, immunomarquage vs. TEP. Cette dernière utilise le composé PiB (*Pittsburgh compound-B*) capable de se lier à l'A $\beta$  et qui présente une plus forte affinité pour la forme fibrillaire. Ainsi, on pourrait supposer que ces différences soient liées à une différence de sensibilité des techniques. Alors qu'avec l'immunomarquage, tous les types de plaques seront détectées, dont les plaques diffuses, l'utilisation du PiB va permettre de détecter majoritairement les formes matures. Par la suite, comme pour la MA dans la population générale, les plaques amyloïdes vont s'étendre au reste du cerveau (Annus et al. 2016).

En plus des plaques amyloïdes, les personnes atteintes du SD vont également développer une angiopathie amyloïde cérébrale. Cette dernière ne semble pas apparaître avant l'âge de 40 ans (Davidson et al. 2018). Cependant, elle est plus fréquente que dans les formes sporadiques de la MA. Ainsi, dans l'étude de Davidson et al. (2018), 87% des personnes avec le SD présentaient une AAC contre 72% des personnes présentant une forme sporadique de la MA. De plus, ces AAC peuvent devenir plus sévères avec l'âge.

Concernant les dégénérescences neurofibrillaires, elles ne sont pas détectées dans le cerveau des personnes atteintes du SD en l'absence de plaques amyloïdes (D. M. Mann et Esiri 1988; Rafii et al. 2017; Davidson et al. 2018). Ainsi, elles ne sont pas visibles avant l'âge de 35 ans. Le développement de ces dégénérescences neurofibrillaires suit un profil semblable à celui observé dans la MA dans la population générale (Braak et al. 2006; 2011). Ces dernières apparaissent en premier lieu au niveau du cortex entorhinal, de l'hippocampe, du locus coeruleus et du noyau du raphé dorsal (D. M. Mann et Esiri 1988; Hof 1995; Davidson et al. 2018). Elles vont ensuite s'étendre et atteindre les régions corticales, cependant pas avant l'âge de 45-50 ans. Par ailleurs, comme dans la MA dans la population générale, il y a une meilleure corrélation entre la démence et la densité de dégénérescences neurofibrillaires qu'avec la densité de plaques amyloïdes (Margallo-Lana et al. 2007). A l'âge de 40-50 ans, quasiment toutes les personnes atteintes du SD ont développé les plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires caractéristiques de la MA (D. M. A. Mann 1988).

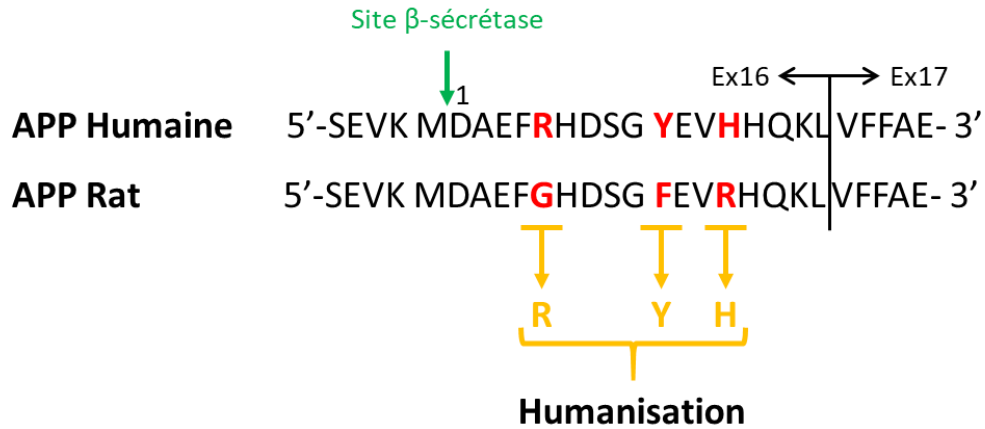
Une neurodégénérescence est également mise en évidence dans le cerveau des personnes atteintes du SD présentant de nombreuses plaques amyloïdes et dégénérescences neurofibrillaires (D. M. A. Mann et al. 1987). Ainsi, chez ces dernières, une réduction du nombre de neurones est constatée dans le cortex temporal, l'hippocampe, le locus coeruleus ou encore dans le noyau du raphé dorsal. Ces réductions sont également observées chez les personnes de la population générale atteinte de la MA. Cependant, le pourcentage de pertes neuronales dans le locus coeruleus et le cortex temporal est moins important dans le cadre du SD que chez les personnes atteintes de la MA sans le SD.

### 5- Comment étudier la MA dans un contexte de SD chez les rongeurs ?

Le gène *App* se situe chez le rat sur le Rno11 et chez la souris sur le Mmu16. Ainsi, le modèle de rat Dup(Rno11) présente 3 copies du gène *App*, c'est également le cas du modèle de souris Ts65Dn. Chez ce dernier, il a notamment été montré que l'APP est impliquée dans la neurodégénérescence des neurones cholinergiques des noyaux de la base du cerveau antérieur, une dégénérescence également observée dans la MA et le SD (Salehi et al. 2006). Cette neurodégénérescence est liée à une altération du transport du facteur de croissance NGF (*Nerve Growth Factor*) causée par la surexpression de l'APP. D'autres phénotypes associés à la MA ont été observés chez ce modèle, dont une hyperphosphorylation de TAU, une neurodégénérescence des neurones du locus coeruleus, ou encore une astroglie et une microglie (Choong et al. 2015). Cependant, chez ce modèle, il n'y a pas d'augmentation de l'expression des isoformes A $\beta$ 40/42 dans le cerveau, ni de développement de plaques A $\beta$  ou encore de dégénérescences neurofibrillaires. En effet, les rongeurs ne développent pas naturellement les plaques amyloïdes caractéristiques de la MA. Ainsi, certains des modèles utilisés pour étudier la MA reposent sur la surexpression du gène *APP* humain comportant une mutation. Cela permet d'induire le développement de dépôts d'A $\beta$ . Cependant, ces modèles s'éloignent de la pathologie humaine, puisque, dans la population générale, la MA n'est pas liée à la surexpression d'une forme mutée de l'APP. L'absence de développement de plaques A $\beta$  chez les rongeurs pourrait s'expliquer par une différence de 3 acides aminés dans la séquence de l'A $\beta$  comparé à la séquence humaine (De Strooper et al. 1995) (**Figure 15**). De ce fait, l'APP est moins clivé par l'enzyme  $\beta$ -sécrétase conduisant à une production moins importante d'A $\beta$ . Afin d'induire le développement de plaques amyloïdes dans nos modèles de rat du SD, l'idée a été de modifier la séquence de l'A $\beta$  du rat afin de la rendre identique à la séquence humaine. Le but était ainsi d'obtenir des modèles de rat de la MA dans un contexte de SD qui se veulent physiologiquement plus proches des conditions observées dans la pathologie humaine. Un modèle de rat dit « APP humanisée » (noté APP<sup>H</sup>) a



donc été créé à l'Institut Clinique de la Souris. L'étape suivante a été d'introduire cette version humanisée dans nos modèles de rat du SD. La génération de ces modèles est expliquée plus en détails dans la partie Matériels et Méthodes.



**Figure 15 : Comparaison de la séquence de l'A $\beta$  entre l'Homme et le Rat**

Un fragment de la séquence protéique de l'APP est représenté. Il s'étend des acides aminés 667 à 695, ce qui correspond à la fin de l'exon 16 (Ex16) et au début de l'exon 17 (Ex17). Ce fragment contient la séquence du peptide A $\beta$ , dont le premier acide aminé est indiqué par le chiffre 1. Les différences entre la séquence Humaine et celle du Rat sont indiquées par les lettres rouge. Ces acides aminés ont été modifiés dans la séquence du rat afin de les rendre identiques à ceux de la séquence humaine, on parle alors d'humanisation de l'APP.

---

# **OBJECTIFS**

---



Au cours de ma thèse, j'ai travaillé sur deux projets principaux. Ces projets ont pour point central le gène APP qui a été étudié sous ces aspects à la fois physiologique et pathologique. Ainsi, le **premier projet** avait pour but d'étudier les fonctions physiologiques de l'APP au cours du vieillissement. Pour ce faire, un tout nouveau modèle a été étudié, il s'agit d'un modèle de rat APP-KO. Ce dernier a été caractérisé au niveau comportemental avec l'évaluation de fonctions non-mnésiques et mnésiques, mais également au niveau neuroanatomique et moléculaire. Le but était donc d'étudier les effets de l'absence d'APP au cours du vieillissement chez les rats. De plus, nous voulions comparer les résultats obtenus chez notre modèle rat avec les modèles souris afin de voir si des résultats similaires étaient obtenus.

Le **second projet** s'intéresse aux mécanismes de la Maladie d'Alzheimer (MA) dans le contexte du Syndrome de Down (SD) et comporte deux objectifs. Le premier objectif était de caractériser de nouveaux modèles de rat du SD : les modèles Dup(Rno20), Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20) afin de mieux comprendre l'implication des différentes régions dupliquées dans le développement du SD. Ces modèles ont donc été caractérisés, dans un premier temps, au niveau comportemental, puis une analyse transcriptomique a été réalisée. Le second objectif, quant à lui, visait à étudier l'effet de l'humanisation de l'APP chez ces modèles. Le but étant d'essayer de modéliser la MA dans ces modèles du SD. Ainsi, la même étude comportementale que celle réalisée chez les modèles non humanisés a été reproduite chez les modèles avec l'APP<sup>H</sup>. Par ailleurs, une étude de vieillissement a été réalisée chez ces derniers, et elle est toujours en cours. La MA est une pathologie liée à l'âge, il était donc important d'étudier cet aspect de vieillissement.



---

# **MATERIELS ET METHODES**

---

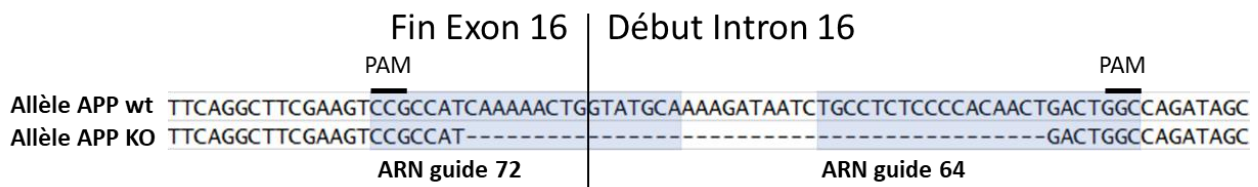


# Projet I : Caractérisation d'un nouveau modèle de rat APP-KO

## I- Les animaux

### 1- Le modèle

Les animaux utilisés dans cette étude sont des rats mâles OFA pour lesquels une inactivation du gène *App* a été réalisée. Ce modèle a été créé à l'Institut Clinique de la Souris (ICS, Illkirch, France) par l'équipe du Dr. Yann Héroult. La construction de ce modèle se base sur une mutagenèse ciblée par utilisation du système CRISPR/Cas9 (Birling et al. 2017). Ce modèle est issu de la première stratégie mise en œuvre pour créer le modèle de rat APP<sup>H</sup>. Cette stratégie cible l'exon 16 du gène de l'APP, ce dernier comporte le début de la séquence du peptide A $\beta$  où se trouvent les différences entre l'Homme et le Rat. Pour ce faire, des embryons au stade une cellule ont été injectés avec un cocktail comprenant l'endonuclease Cas9 (100ng/ $\mu$ L), deux ARN guides (ARNg, 50ng/ $\mu$ L), le premier ciblant la fin de l'exon 16, le second ciblant une séquence au début de l'intron 16 (Figure 16). Ce cocktail comprenait également un ADN double brins (5ng/ $\mu$ L) qui correspond à l'ADN donneur comportant les mutations ponctuelles. Ainsi, la combinaison Cas9-ARNg devait favoriser la recombinaison homologe en réalisant une coupure double brin de l'ADN. Cependant, cette approche n'a pas permis d'obtenir le modèle APP<sup>H</sup>, l'approche qui a ensuite été mise en œuvre pour l'obtenir est décrite dans le Projet II, Partie I, Point 1.2.1. En revanche, cela a induit une délétion de 43 pb, qui est suffisante pour induire un KO total de la protéine APP. Le modèle a été validé au niveau protéique par réalisation de western blots pour l'APP dont la technique est décrite dans la Partie IV.



**Figure 16 : Schéma de construction du modèle de rat APP-KO**

Représentation de la séquence nucléotidique de l'APP correspondant à la fin de l'exon 16 et au début de l'exon 17. Les séquences reconnues par les ARN-guides sont indiquées par les rectangles bleu clair. Leur utilisation a permis une délétion de 43 pb (allèle APP-KO). Les paires de base délétées sont indiquées par des tirets sur la séquence de l'allèle KO. Les PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) sont les séquences nucléotidiques reconnues par la Cas9 pour lui permettre de se fixer à l'ADN et de réaliser une coupure double brin.



## 2- Les effectifs

Cette étude a été réalisée sur 3 cohortes différentes âgées de 2, 12 et 18 mois. Ces cohortes sont composées d'animaux de 3 génotypes différents : sauvages ( $App^{+/+}$ ), hétérozygotes ( $App^{+/-}$ ) et homozygotes ( $App^{-/-}$ ), le symbole « - » indiquant une délétion d'un allèle de l'APP. Les effectifs d'animaux utilisés dans chacune des cohortes sont indiqués dans le **Tableau 3**. A noter que pour la cohorte de 18 mois, un plus grand nombre d'animaux a été produit afin de prévenir les pertes liées au vieillissement, qui étaient attendues.

	$App^{+/+}$	$App^{+/-}$	$App^{-/-}$
2 mois	11	11	12
12 mois	13	13	12
18 mois	23	24	27

**Tableau 3 : Effectifs d'animaux par génotypes pour chaque cohorte**

## 3- Conditions d'hébergement

Tous les animaux utilisés dans ce projet ont été produits et hébergés au TAAM (Transgénése et Archivage d'Animaux Modèles, Orléans, France) jusqu'à leur arrivée au laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives (LNCA), environ deux semaines avant le début des tests comportementaux pour les cohortes de 2 et 12 mois. Pour la cohorte de 18 mois, les animaux sont arrivés environ 3 mois avant le début des tests, soit à l'âge de 15 mois. Le but était de pouvoir suivre les animaux vers la fin de la période de vieillissement pendant laquelle des pertes liées à des problèmes de santé étaient attendues.

A leur arrivée au laboratoire, les rats sont placés dans des cages transparentes en Makloron, soit seuls pour les cohortes de 2 et 12 mois (dimensions de la cage : 42 x 26 x 15 cm), soit par groupe de 2 pour la cohorte de 18 mois (dimensions de la cage : 60 x 38 x 19,5 cm). Les rats ont un accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture et disposent d'un bâton à ronger en bois en guise d'enrichissement. La température ( $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) et l'hygrométrie ( $50\pm 10\%$ ) de la pièce de stabulation et des pièces de comportement sont contrôlées. Ces pièces sont soumises à un cycle lumière/obscurité de 12h (période éclairée 7h-19h à l'heure d'hiver et 8h-20h à l'heure d'été). Par ailleurs, un fond sonore constant est maintenu par le biais d'une radio pendant la phase diurne. A noter que la pièce de stabulation est différente des pièces de tests, à l'exception du test du Double H pour lequel les animaux sont hébergés dans la pièce d'expérimentation.

La première semaine après leur arrivée, les rats ne sont pas manipulés afin de leur laisser le temps de s'acclimater à leur nouvel environnement. La semaine suivante, ou la semaine précédant le début des tests comportementaux, les animaux sont manipulés à raison de 1-2min/jour pendant 5 jours afin de les habituer à l'expérimentateur et à la manipulation. Les tests comportementaux sont réalisés pendant la phase diurne. Un suivi du poids des animaux est réalisé tout au long de la période de test à raison d'une pesée par semaine.

#### **4- Autorisation de projet**

Toutes les procédures mises en œuvre dans cette étude l'ont été en accord avec les directives nationales (décret n°2013-118 du 1<sup>er</sup> Février 2013, Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale) et européennes (directives 2010/63/UE) relatives à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Par ailleurs, ce projet a été validé par le comité d'éthique local CREMEAS le 7 avril 2016 (Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg – n° APAFIS : #3433).

## **II- Génotypage**

### **1- Digestion tissulaire pour extraction d'ADN**

L'extraction d'ADN est réalisée à partir d'une biopsie du pavillon de l'oreille. Cette dernière est prélevée une dizaine de jours après la naissance lors de l'identification de l'animal par la mise en place d'une boucle d'oreille à numéro unique. Les biopsies sont digérées dans 100µL de tampon de lyse (DirectPCR Lysis Reagent, Viagen #102-T) auquel on rajoute 10µL de Protéinase K 10mg/mL (#P6556-1G, Sigma-Aldrich). Elles sont ensuite placées dans un bain-marie à 56°C sur la nuit. Le lendemain, les échantillons sont agités, puis incubés à 95°C pendant 30 min afin d'inactiver la Protéinase K. Ils sont ensuite centrifugés pendant 5 min à 13 000 rpm (rotations par minutes).

### **2- Amplification de l'ADN par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)**

Afin de réaliser la PCR, le surnageant obtenu lors de l'extraction d'ADN (1,5µL) est mis en présence d'un mix (14µL) permettant l'amplification de l'ADN. La composition de ce mix est décrite dans le **Tableau 4**. Il comporte les amorces suivantes : 8590-forward (5'- TCT GGG TTG ACA AAC ATC AAG ACA G -3') et 8591-reverse (5'- CTC AGT TTT GGC CCA GGA CGA GTC A -3'). Ces amorces permettent de différencier l'allèle

WT (*Wild-Type*), de l'allèle KO. La réaction de PCR est alors réalisée dans un thermocycleur selon les conditions de dénaturation, hybridation et élongation indiquées dans le **Tableau 5**.

	Concentration finale	Volume final
Tampon de réaction + MgCl <sub>2</sub>	1x	1,5µL
dNTP	10µM	0,3µL
Amorces	10µM	0,5µL
Taq polymérase (Roche)	5U/µL	0,2µL
ADN		1,5µL
H <sub>2</sub> O		10,5 µL

**Tableau 4 : Composition du mix pour l'amplification de l'ADN lors de la PCR**  
Les volumes indiqués correspondent à la préparation du mix pour un seul échantillon

Etape	Température	Temps	Nombre de cycles
<b>Dénaturation initiale</b>	<b>95°C</b>	<b>4 min</b>	<b>1</b>
<b>Dénaturation</b>	<b>94°C</b>	<b>30 s</b>	<b>34</b>
<b>Hybridation</b>	<b>62°C</b>	<b>30 s</b>	
<b>Elongation</b>	<b>72°C</b>	<b>1 min</b>	
<b>Elongation finale</b>	<b>72°C</b>	<b>7 min</b>	<b>1</b>
	<b>20°C</b>	<b>5 min</b>	<b>1</b>

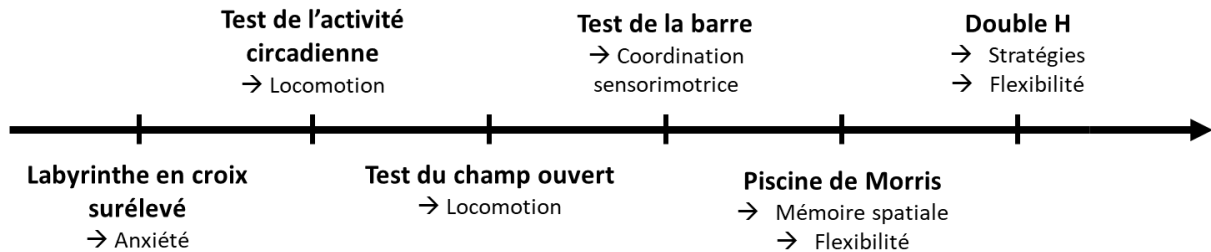
**Tableau 5 : Conditions de réalisation de la PCR des rats APP-KO**

### 3- Migration par électrophorèse sur gel d'agarose

Les produits de PCR ainsi obtenus sont séparés par électrophorèse suivant leur taille sur un gel d'agarose 2% contenant du bromure d'éthidium (BET, 1µL pour 80mL d'agarose, Euromedex #EU0070). Les échantillons sont déposés sur le gel après ajout de 4µL de tampon de charge et migrent pendant 30 min à 130 V. Le gel est ensuite révélé sous ultra-violets. Ainsi, une bande de 188 pb est obtenue pour les animaux *App*<sup>+/+</sup>, alors qu'une bande de 145 pb est obtenue pour les animaux *App*<sup>-/-</sup>. Pour les animaux hétérozygotes, *App*<sup>+/-</sup>, ces 2 bandes sont visibles.

### III- Tests de comportement

Une batterie de tests comportementaux a été réalisée sur les 3 cohortes. Ces tests, réalisés au LNCA, sont décrits dans ce paragraphe dans l'ordre dans lequel ils ont été réalisés (**Figure 17**).



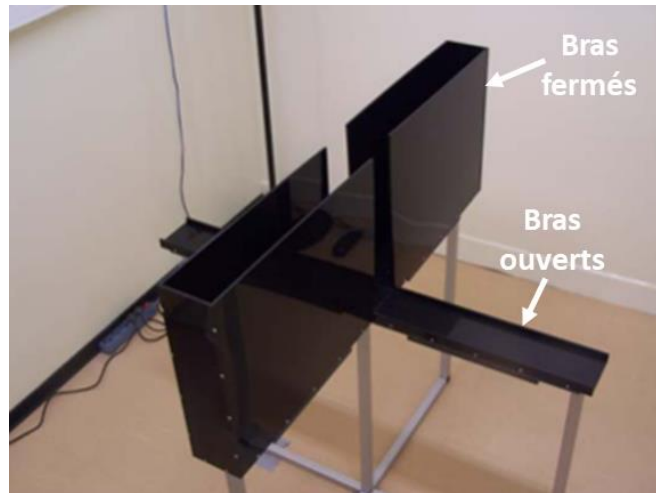
**Figure 17:** Déroulement temporel des tests comportementaux réalisés chez le modèle APP-KO

#### 1- Labyrinthe en croix surélevé

Le test du labyrinthe en croix surélevé est un test de référence utilisé pour évaluer l'anxiété (Walf et Frye 2007). Il se base sur l'effet anxiogène que représente les espaces ouverts et éclairés pour les rats. En effet, ces derniers préfèrent les lieux clos et peu éclairés, qui sont considérés comme plus sécurisants.

##### 1.1- Dispositif

Ce labyrinthe en plexiglas noir est constitué de 4 bras, 2 bras ouverts et 2 bras fermés (**Figure 18**). Ces derniers, d'une longueur de 50 cm et d'une largeur de 10 cm, se rejoignent au niveau d'une plateforme centrale (10 x 10 cm). Alors que les bras fermés sont bordés d'une paroi opaque (40 cm de hauteur), les bras ouverts ne sont entourés que d'un petit rebord (1,5 cm de hauteur). Le dispositif est situé à une hauteur de 73 cm au-dessus du sol. L'éclairage de la pièce est apporté par 4 lampes halogènes disposées autour du labyrinthe. Ce dernier est réglé à l'aide d'un luxmètre de sorte à obtenir une intensité lumineuse de 10 lux à l'extrémité des bras ouverts, 2 lux à l'extrémité des bras fermés, et 7 lux au centre du dispositif. L'intensité lumineuse est contrôlée régulièrement tout au long de la phase de test. Une caméra placée au-dessus du dispositif et reliée à un ordinateur permet de suivre le comportement du rat. L'acquisition des données est réalisée à l'aide du logiciel Chronos<sup>®</sup>.



**Figure 18** : Dispositif du labyrinthe en croix surélevé

### 1.2- Protocole

Le rat est amené dans la pièce de test à l'aide d'une cage de transport ne contenant pas de litière. Il est alors laissé dans la pièce pendant 5 min afin de s'habituer à ce nouvel environnement. Le rat est ensuite déposé au centre du labyrinthe, la tête dirigée vers un bras fermé. Il est alors libre d'explorer le dispositif pendant 5 min. Entre chaque rat, le labyrinthe est nettoyé à l'alcool 70% afin de réduire les odeurs.

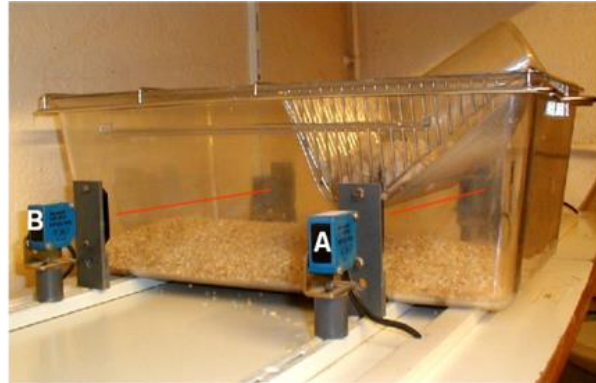
Les paramètres mesurés sont le temps passé dans les bras ouverts et fermés, qui est un indicateur du niveau d'anxiété des animaux. En effet, les animaux anxieux ont tendance à passer plus de temps dans les bras fermés. Un indice d'anxiété peut également être calculé. Il correspond au rapport entre le temps passé dans les bras ouverts sur le temps total passé dans les bras, ouverts et fermés, le tout multiplié par 100. Le nombre de défécations dans la cage de transport et le labyrinthe est également compté. Enfin, le nombre total d'entrées dans les bras est mesuré, car il traduit l'activité relative des animaux.

### 2- Test de l'activité circadienne

Le test de l'activité circadienne permet d'évaluer l'activité locomotrice horizontale des animaux au cours de deux nycthémères successifs, soit dans notre cas sur une période de 48h. L'intérêt de ce test est qu'il permet d'évaluer l'activité spontanée des animaux dans leur cage d'élevage.

Les rats sont placés dans des cages transparentes en Makloron (dimensions : 42 x 26 x 15 cm) ne comportant qu'une fine couche de litière (**Figure 19**). Chaque cage est équipée de 2 cellules photoélectriques séparées de 28 cm, émettant un faisceau infra-rouge à 4,5 cm au-dessus du fond de la

cage. Ces cellules sont reliées à un ordinateur qui compte le nombre d'interruptions successives des deux faisceaux, une interruption successive correspondant à un déplacement horizontal d'un bout à l'autre de la cage.



**Figure 19 : Dispositif du test de l'activité circadienne**

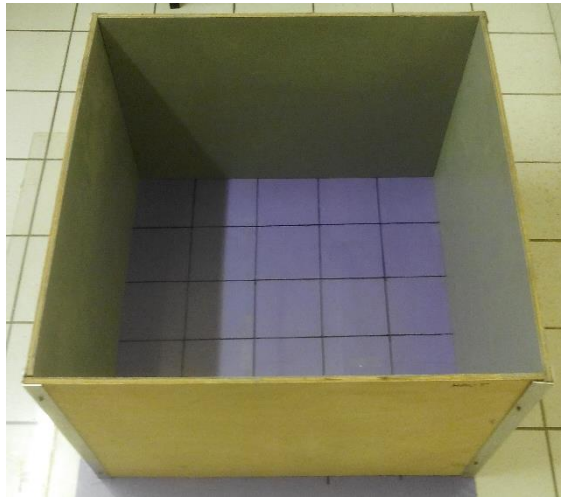
La cage d'hébergement est positionnée dans un emplacement comportant deux cellules photoélectriques émettant un faisceau infra-rouge. Les cellules sont indiquées par les lettres A et B.

Le jour du test les animaux sont placés dans les cages de façon à ce que le test débute à 11h. Il se poursuit alors sur 2 jours, les animaux sont donc sortis du test le jour 3 à 11h. L'activité locomotrice est enregistrée d'abord pendant une phase d'habituation aux conditions expérimentales. Elle correspond au 3 premières heures du test, l'activité est alors évaluée par intervalles de 30 min. La phase d'acquisition correspond au 45h restantes et comprend donc 3 périodes diurnes et 2 périodes nocturnes. Lors de cette phase, l'activité est évaluée par intervalles d'une heure.

### **3- Test du champ ouvert**

Le champ ouvert ou *Open-field* est un test permettant d'évaluer l'activité locomotrice et exploratoire, ainsi que l'anxiété dans un nouvel environnement (Walsh et Cummins 1976). Le dispositif est un espace carré ouvert de 64 x 64 x 45 cm, dont le fond est divisé en 25 carreaux de taille égale (**Figure 20**). Le test étant réalisé dans la pièce de la piscine de Morris, un rideau est placé autour du dispositif. Le but est d'empêcher les rats de percevoir les indices spatiaux présents sur les murs. L'éclairage de la pièce est apporté par 2 lampes halogènes placées à l'opposé l'une de l'autre. L'intensité lumineuse est réglée à l'aide d'un luxmètre et est d'environ 40-50 lux dans les coins et de 60-70 lux au centre. Une caméra reliée à un ordinateur est placée au-dessus du dispositif. Elle permet l'enregistrement de différents paramètres à

l'aide du logiciel Smart® (SD Instruments, San Diego, Etats-Unis). En complément, une webcam est placée au-dessus du dispositif afin de filmer les animaux pour pouvoir compter le nombre de redressements et de toilettages.



**Figure 20 : Dispositif du test du champ ouvert**

L'animal est placé dans le dispositif au niveau de l'un des coins, la tête dirigée vers la paroi. Le point de départ est le même pour tous les rats. Un unique essai de 10 min est réalisé. A la fin de l'essai, le dispositif est nettoyé à l'alcool 70% pour réduire et uniformiser les informations olfactives.

Les paramètres mesurés sont la distance parcourue, qui est un indicateur de l'activité locomotrice. Le temps passé à la périphérie versus celui passé au centre du dispositif donne une indication du niveau d'anxiété des animaux. Des animaux anxieux auront ainsi tendance à passer plus de temps à la périphérie du dispositif. En effet, cette dernière est moins éclairée et la présence des parois est sécurisante.

#### **4- Test de la barre**

Le test de la barre a pour but d'évaluer la coordination sensori-motrice des animaux. Le dispositif est composé d'une barre en bois d'une longueur de 2 m (divisé en 4 segments de 0,5 m) positionnée à 80 cm du sol (**Figure 21**). Le rat doit apprendre à se déplacer sur la barre afin de rejoindre sa cage située à l'une des extrémités. Un filet est placé sous la barre afin de récupérer l'animal en cas de chute. La largeur de la barre utilisée varie en fonction du gabarit des rats. Ainsi, pour la cohorte de 2 mois, une barre d'une largeur de 2,5 cm a été utilisée. Cette dernière a également été utilisée au début de la mise en œuvre du test pour

la cohorte de 12 mois. Cependant, au vu des difficultés rencontrées par les animaux sauvages (*App<sup>+/+</sup>*), du fait de leur poids, la barre a été remplacée par une barre plus large (4,2 cm). Cette dernière a également été utilisée pour la cohorte de 18 mois.



**Figure 21 : Dispositif du test de la barre**

La cage d'hébergement du rat est placée à l'une des extrémités d'une barre en bois d'une longueur de 2m, divisée en 4 segments de 0,5 m. L'animal doit alors apprendre à se déplacer sur la barre afin de rejoindre sa cage.

Le test consiste en une phase d'entraînement de 4 jours (3-6 essais/jours). Les rats sont placés à proximité de leur cage, puis à 50 cm de l'extrémité au jour 1, puis, à compter du deuxième jour, à des distances allant crescendo (1m ; 1,5m ; puis 2m). Au cinquième jour, la coordination sensori-motrice est évaluée pendant 3 essais successifs. Le rat est placé à la distance de 2 m et le placement des pattes de l'animal sur la barre est noté. Un score de 1 point est attribué pour chaque segment de 0,5 m traversé avec les pattes placées sur le dessus de la barre. Lorsque les pattes glissent sur les côtés, le score est de 0 pour le segment concerné. Les scores de chaque essai sont additionnés, le score maximal étant de 12.

## **5- Piscine de Morris**

### **5.1- Principe**

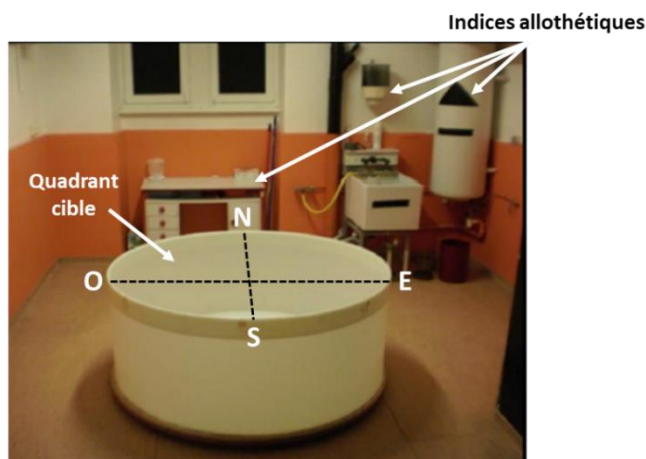
Le test de la Piscine de Morris (R. Morris 1984) est un test de mémoire spatiale qui permet d'évaluer la capacité des rats à se construire une représentation mentale de l'environnement (i.e. carte cognitive : (Tolman 1948; O'Keefe et Nadel 1979) ). Il se base sur le comportement naturel des rats à fuir l'eau fraîche ( $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), dont la température constitue une situation aversive. Ce test permet d'évaluer la capacité des



animaux à utiliser des indices spatiaux, aussi appelés indices allothétiques, présents dans l'environnement, cela dans le but de retrouver l'emplacement d'une plateforme. Cette dernière possède une position fixe et est immergée sous l'eau, la rendant invisible pour l'animal. Le point de départ est différent d'un essai à l'autre, l'animal doit donc mettre en place une stratégie dite allocentrique afin de retrouver la plateforme. Cette stratégie se base sur les informations présentes dans l'environnement, soit les objets présents dans la pièce. Elle s'oppose à la stratégie égocentrique qui, elle, se base sur l'apprentissage de la séquence des mouvements du corps. Ce test permet d'évaluer l'apprentissage, le rappel et l'extinction d'un souvenir spatial.

## 5.2- Dispositif

La piscine de Morris est un dispositif circulaire en PVC blanc de 160 cm de diamètre et de 60 cm de hauteur (**Figure 22**). Elle est divisée en quatre quadrants virtuels de taille égale : Nord-Est (NE), Nord-Ouest (NO), Sud-Est (SE), Sud-Ouest (SO). L'un de ces quadrants accueille une plateforme cylindrique en plastique transparent de 11 cm de diamètre. Selon la phase du test, cette plateforme peut être visible ou immergée à 2 cm sous la surface de l'eau. La piscine est remplie jusqu'à mi-hauteur d'une eau opacifiée par ajout de lait en poudre. L'immersion de la plateforme et l'opacification de l'eau permettent de rendre la plateforme invisible aux yeux de l'animal. Par ailleurs, de nombreux indices allothétiques sont présents dans la pièce (formes géométriques aux murs, bureau, évier...) afin de permettre à l'animal de se construire une carte cognitive qui lui permettra de localiser la plateforme à l'aide d'une stratégie allocentrique. Une caméra, placée au-dessus du dispositif et reliée à un ordinateur, permet de suivre le comportement de l'animal en temps réel et de générer une série de variables objectivant les paramètres de navigation du rat à l'aide du logiciel Smart<sup>®</sup> (SD Instruments, San Diego, Etats-Unis).



**Figure 22 : Dispositif de la piscine de Morris**

La piscine est divisée en 4 quadrants virtuels, parmi lesquels le quadrant Nord-Ouest qui accueille la plateforme lors de la phase d'acquisition (quadrant cible). Les points Nord (N), Est (E), Sud (S) et Ouest (O) correspondent aux points de lâcher lors de la phase d'acquisition.

### 5.3- Protocole

Le protocole utilisé dans le cadre de cette étude se divise en 4 phases. Tout d'abord, la **phase d'habituation** qui correspond au premier jour du test. Elle vise à familiariser les animaux avec le dispositif et l'eau fraîche au cours d'une session de 4 essais consécutifs. Chaque essai est d'une durée maximale de 1 min avec un point de lâcher différent pour chaque essai (NO, SO, NE et Sud (S)). Les rats sont lâchés dans la piscine la tête dirigée vers la paroi, cela est valable quel que soit la phase du test. La plateforme, placée au centre du quadrant SE, est alors visible et dépasse le niveau de l'eau d'1 cm. Un rideau entoure la piscine pour prévenir l'utilisation d'indices allothétiques. La **phase d'acquisition** se déroule sur les 6 jours suivants. Le rideau est alors retiré pour permettre l'accès aux indices allothétiques. La plateforme, localisée au centre du quadrant NO, est immergée 2 cm sous le niveau de l'eau. Comme pour l'habituation, 4 essais consécutifs d'une durée maximale de 1 min chacun sont réalisés. Les rats sont alors lâchés selon une séquence aléatoire aux points Nord (N), Sud (S), Est (E) et Ouest (O). Cette séquence est différente d'un jour à l'autre. Au bout de 1 min, si la plateforme n'a pas été trouvée, l'animal est guidé jusqu'à cette dernière par l'expérimentateur. Une fois sur la plateforme, il y est laissé pendant 10s, puis récupéré pour réaliser l'essai suivant. Pour chaque essai, la distance et la latence pour atteindre la plateforme, ainsi que la vitesse et le temps passé à proximité des parois (thigmotaxie) sont mesurés.

Un **test de rappel** est réalisé 24h après le dernier jour d'acquisition. Il permet d'évaluer la mémoire spatiale à long-terme des animaux. La plateforme est retirée et les rats sont lâchés dans le quadrant NE pour un unique essai d'une durée de 1 min. Les 2 jours suivants permettent d'évaluer le comportement d'**extinction** (Lopez, Vasconcelos, et Cassel 2008). Les rats doivent apprendre que la plateforme n'est plus présente dans le quadrant NO et suspendre leur recherche dans ce quadrant. Cette dernière phase se déroule dans les mêmes conditions que le test de rappel, c'est-à-dire en l'absence de plateforme et avec un unique essai de 1 min. Les rats sont également lâchés au point NE. Pour le test de rappel, comme pour l'extinction, le temps passé dans le quadrant cible (QC), à savoir celui dans lequel se trouvait la plateforme auparavant, est mesuré. Si ce temps est significativement supérieur à 25% de la durée totale de l'essai, cela traduit, lors du test, un souvenir de l'emplacement de la plateforme. En principe, ce temps doit diminuer lors de la phase d'extinction qui consiste à apprendre que la consigne valable jusque-là ne l'est plus.

## 6- Double H

Le Double H (DH) est un labyrinthe aquatique en forme de deux "H" contigus. Le but pour l'animal est, comme dans la piscine de Morris, de s'échapper de l'eau fraîche en retrouvant une plateforme immergée à l'extrémité de l'un des bras. L'intérêt de ce test est qu'il permet de déterminer la stratégie mise en place par l'animal pour retrouver la plateforme : soit il utilise une **stratégie égocentrique** basée sur la reproduction d'une séquence de mouvements, soit il utilise une **stratégie allocentrique** basée sur les indices allothétiques de la pièce. Ce test permet aussi d'étudier la flexibilité comportementale en évaluant la capacité des animaux à passer d'une stratégie égocentrique à une stratégie allocentrique, ou d'engager directement cette dernière lors d'un essai "trompeur". Une fois que l'animal a pris l'habitude d'aborder la tâche à l'aide d'une stratégie égocentrique, il est déposé à l'extrémité d'un bras duquel il n'a pas l'habitude de partir. S'il répète la stratégie égocentrique, il rejoindra un bras qui n'est pas celui dans lequel se trouvait la plateforme au cours des essais précédents. Le principe de la tâche est alors de lui permettre de corriger sa stratégie en basculant, s'il le peut, sur l'engagement d'une stratégie allocentrique. Cela se traduira par un temps plus important passé à explorer le bras dans lequel se trouvait la plateforme au cours des essais précédents.

### 6.1- Dispositif

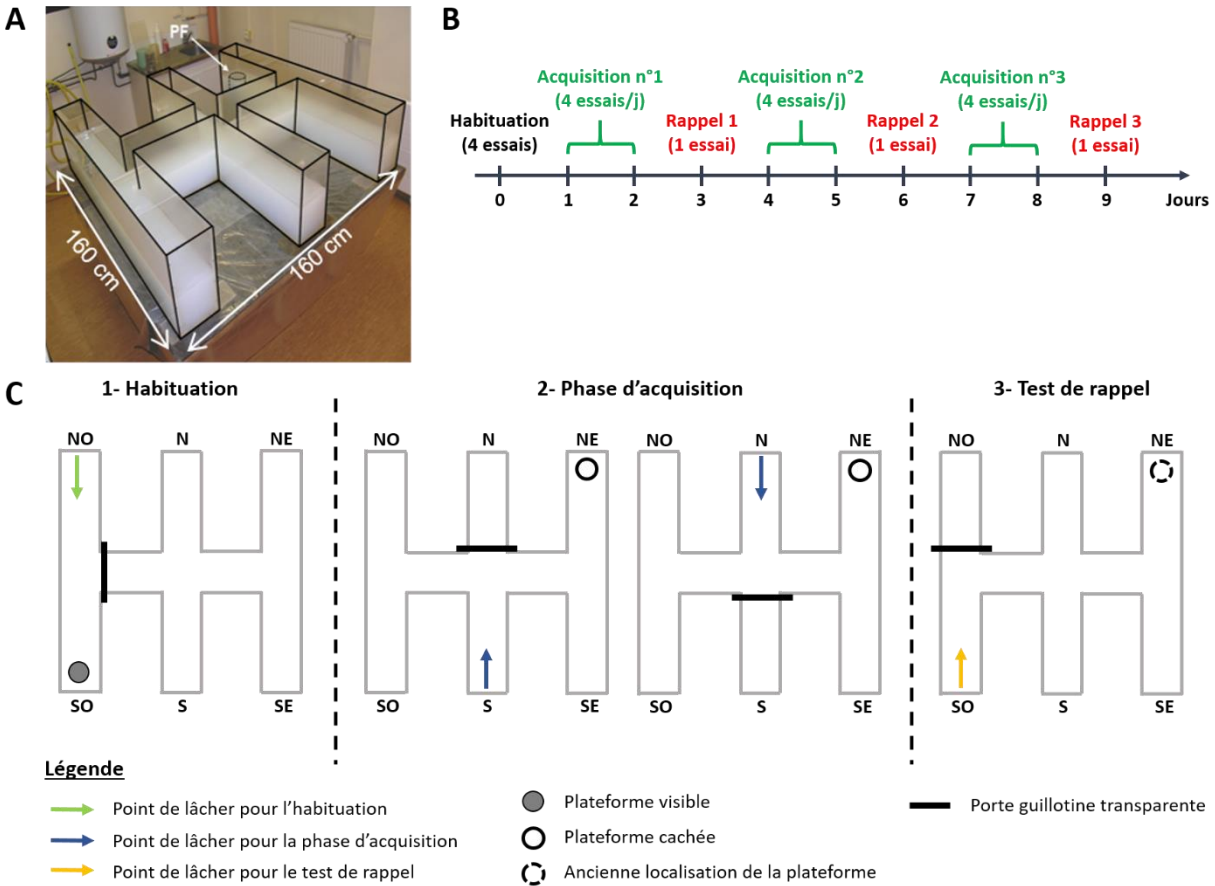
Le DH est un dispositif de plexiglas transparent comportant 3 bras parallèles de 160 cm de long reliés les uns aux autres par un couloir central d'une longueur de 160 cm (**Figure 23-A**). Chacun des bras présente une paroi d'une hauteur de 35 cm, les 2 bras centraux étant nommés bras Nord (N) et Sud (S) par convention. Les quatre branches latérales sont désignées par rapport aux 2 bras centraux : NO, NE, SE et SO (Pol-Bodetto et al. 2011). Une plateforme de 11 cm de diamètre et d'une hauteur de 15 cm est placée à l'extrémité de l'un des bras. Suivant la phase du test, cette plateforme est visible (habituation) ou immergée à 2 cm sous la surface de l'eau (acquisition). Le dispositif est rempli d'eau ( $21\pm 1^\circ\text{C}$ ) jusqu'à mi-hauteur. Cette eau est opacifiée par ajout de lait en poudre. Le DH est positionné sur une table dans la pièce d'hébergement à une hauteur de 80 cm. Nombre d'indices allothétiques sont présents dans la pièce (formes géométriques sur les murs, évier, racks...). Dans le cadre des cohortes de 2 et 12 mois, le passage de chaque rat a été filmé à l'aide d'une webcam reliée à un ordinateur. Différentes variables ont été extraites *a posteriori* à partir de ces films. Pour la cohorte 18 mois, le logiciel ANY-Maze a été utilisé afin de suivre les déplacements des rats et d'extraire les variables d'intérêts directement.

## 6.2- Protocole

Comme pour la piscine de Morris, le protocole du DH se découpe en plusieurs étapes (**Figure 23-B**). Le premier jour du test vise à **habituer** les animaux au dispositif. Chaque rat réalise 4 essais consécutifs d'une durée maximale de 1 min. La plateforme visible dépasse de 1 cm la surface de l'eau qui n'est pas opacifiée par du lait. Les rats sont lâchés à l'extrémité du bras NO, la tête dirigée vers la paroi, et doivent rejoindre la plateforme située dans le bras SO (**Figure 23-C**). L'accès au reste du labyrinthe est bloqué par une porte guillotine transparente.

**L'acquisition** est divisée en 3 phases de 2 jours (1 session/jour, 4 essais/session, 1 min/essai), chaque phase étant séparée par un test de rappel. Les rats sont lâchés selon une séquence aléatoire à l'extrémité des bras N et S, séquence modifiée chaque jour. L'accès au bras situé en face du point de lâché est bloqué. La plateforme est cachée dans le bras NE, environ 2 cm sous la surface de l'eau. Ce protocole vise à favoriser la mise en place d'une stratégie allocentrique tout en restant relativement répétitif pour permettre également la mise en place d'une stratégie égocentrique. Ainsi, l'animal peut apprendre les séquences de mouvements à réaliser pour retrouver la plateforme en fonction du point de lâcher, soit Droite-Gauche si lâché dans le bras S, soit Gauche-Gauche si lâché dans le bras N. Si les rats ne trouvent pas la plateforme à l'issue de la minute, ils y sont guidés par l'expérimentateur. Une fois sur la plateforme, les rats y sont laissés pendant 10s avant d'être récupérés pour effectuer l'essai suivant. La latence pour atteindre la plateforme et le nombre d'erreurs (entrée dans un bras autre que celui où se trouve la plateforme) sont mesurés.

Les **tests de rappel** consistent en un unique essai d'une durée de 1 min en l'absence de plateforme. Les rats sont lâchés à l'extrémité du bras SO, l'accès au bras NO étant bloqué par une porte guillotine. Trois tests de rappel sont réalisés, chacun 24h après le dernier essai de l'une des 3 phases d'acquisition, soit au 3<sup>ème</sup>, 6<sup>ème</sup> et 9<sup>ème</sup> jour de l'entraînement (**Figure 23-B**). Les variables mesurées sont le 1<sup>er</sup> bras visité, indicateur de la stratégie utilisée par l'animal. L'entrée dans le bras N traduit l'utilisation d'une stratégie égocentrique, l'animal reproduisant l'un des trajets appris lors de l'acquisition (droite puis gauche). L'entrée directement dans le bras NE, qui contenait la plateforme pendant l'acquisition, traduit l'utilisation d'une stratégie allocentrique. Le temps passé dans les bras N et NE est également mesuré, et lorsque ce dernier est significativement supérieur au hasard (8,2s), il confirme la mise en œuvre d'une carte cognitive.



**Figure 23 : Test du Double H**

(A) Photographie du dispositif (PF : plateforme). (B) Déroulement temporel du protocole expérimental. (C) Configurations du dispositif selon la phase du protocole. Pour la **phase d'habituation** (1), la plateforme visible est localisée dans le bras SO et les rats sont lâchés dans le bras NO (4 essais). Ensuite, lors de la **phase d'acquisition** (2), les rats sont lâchés dans les bras S et N selon une séquence aléatoire (4 essais/jour). La plateforme cachée est localisée dans le bras NE. Ce protocole vise à favoriser la mise en place d'une stratégie allocentrique. Enfin, pour les 3 **tests de rappel** à 24h (3), la plateforme est retirée. Les rats effectuent un unique essai avec pour point de départ de bras SO (essai « trompeur »).

## 7- Mise à mort des animaux

Pour chacune des cohortes, les animaux sont séparés en deux sous-groupes, l'un pour réaliser des analyses de biologie moléculaire, le second pour de l'histologie.

Pour les animaux destinés aux **analyses de biologie moléculaire**, le protocole de mise à mort est le suivant. Les animaux reçoivent une injection intrapéritonéale d'une solution de Kétamine (82,5mg/kg, Imalgène® 1000, Centravet, France) - Xylazine (11mg/kg, Rompun® 2%, Centravet, France) à raison de 2,1mL/kg. Ils sont alors rapidement guillotins, environ 2 min après l'injection. Le cerveau est prélevé et la masse de ce dernier est déterminée. Une dissection sur glace est ensuite réalisée afin de prélever l'hippocampe et le

cortex préfrontal médian (CPFm). Après prélèvements, ces structures sont rapidement congelées dans l'azote liquide et sont ensuite conservées au congélateur à -80°C jusqu'à réalisation des analyses.

Pour les animaux destinés aux **analyses histologiques**, des perfusions intracardiaques de paraformaldéhyde (PFA) ont été réalisées. Les animaux sont anesthésiés à un niveau chirurgical par une injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (200mg/kg, Doléthal®, Ceva Santé animale, Libourne, France). Une fois le seuil d'anesthésie chirurgical atteint, confirmé par l'absence de réflexe de retrait de la patte et des réflexes palpébraux, la procédure de perfusion peut débuter. Une incision est réalisée au niveau de la pointe du sternum, la paroi thoracique est alors ouverte et le cœur dégagé. Une pince hémostatique est placée au niveau de l'aorte thoracique afin de bloquer la circulation sanguine et ainsi, perfuser uniquement la partie supérieure du corps du rat, l'organe d'intérêt étant le cerveau. Une aiguille reliée à une canule est alors insérée dans le ventricule gauche du cœur. L'oreillette cardiaque droite est incisée pour permettre l'écoulement du perfusé. Une solution de rinçage, composée de NaCl 0,9%, est d'abord perfusée pendant 5 min à raison de 10mL/min afin d'évacuer le sang. Elle est ensuite remplacée par du PFA 4% dilué dans du tampon phosphate (0,2M) afin de fixer les tissus. Ce dernier est perfusé pendant 15 min à raison de 10mL/min. Les solutions perfusées sont maintenues sur glace tout au long de la procédure. Une fois la perfusion terminée, le cerveau est prélevé et placé à 4°C dans du PFA 4% pour une phase de post-fixation de 4h. Il est ensuite cryoprotégé par transfert dans du saccharose 30% pour 48h. Enfin, le cerveau est congelé en le plongeant dans de l'isopentane à une température de -40°C pendant 1 min. Les cerveaux ainsi prélevés sont ensuite conservés au congélateur -80°C jusqu'à la réalisation des coupes au cryostat pour les analyses histologiques.

## **IV- Analyses de biologie moléculaire**

### **1- Extraction protéique**

Les extractions protéiques ont été réalisées à partir de l'hippocampe et du CPFm, 2 structures cérébrales jouant un rôle-clé dans la mémoire. Elles sont placées dans des tubes contenant des billes de céramiques (Precellys® CK14 KT03961-1-003.2) en présence d'une solution de lyse (500µL pour l'hippocampe ; 300µL pour le CPFm). Cette solution se compose de RIPA 1X (NaCl 0,5M ; EDTA 0,5M ; Tris 1M pH=8 ; Nonidet P40 ; SDS 5%) auquel vient s'ajouter un cocktail d'inhibiteurs de protéases, du sodium orthovanadate et du fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) (Santa Cruz, sc-24948A), avec pour chaque, une dilution finale de 1/100. Les échantillons sont broyés à l'aide du broyeur Precellys 24 (Cat. No. EQ03119.200.RD000.0) à 5000 rpm pendant 2x20s. Ils sont ensuite centrifugés pendant 30min à 14000

rpm à 4°C. Le surnageant est récupéré, une partie est utilisée pour le dosage protéique (5µL), l'autre partie est placée au congélateur à -80°C jusqu'à réalisation des westerns blot.

## 2- Dosage des protéines

Afin de doser les protéines des échantillons, deux dilutions sont préparées à partir des 5µL d'extrait protéique, dilutions à 1/50 et à 1/100. Une gamme étalon est réalisée à partir d'albumine de sérum bovin (BSA, pour *Bovine Serum Albumin*) en suivant le protocole indiqué dans le kit Pierce™ BCA Protein (Thermo Scientific - #23225). Les concentrations utilisées pour cette gamme s'étendent de 0 à 1500 µg/mL de BSA. Chaque dilution d'échantillon, ainsi que la gamme étalon, sont déposées en duplica (5µL) sur une plaque 96 puits auxquels sont ajoutés 200µL de réactif de dosage. La densité optique, qui est proportionnelle à la concentration en protéines, est alors mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 570nm. La concentration de chaque échantillon est déterminée à l'aide de la gamme étalon. Les échantillons sont ensuite préparés par ajout de tampon de charge 5X (Pierce™ Lane Marker Reducing Sample Buffer- #39000) et d'eau milliQ.

## 3- Western blot

Les Western blots sont réalisés à partir de gels de polyacrylamide SDS-Page. Ils se composent d'un gel de séparation (Acrylamide 40% ; Tris 1,5M pH=8,8 ; SDS 10% ; APS 10% ; TEMED ; eau milliQ), dont le pourcentage en acrylamide varie selon la protéine ciblée, et d'un gel de concentration (Acrylamide 40% ; Tris 0,5M pH=6,8 ; SDS 10% ; APS 10% ; TEMED) avec un pourcentage en acrylamide fixe, soit 6%. Les gels sont placés dans des cuves d'électrophorèse en présence de tampon de migration 1X (10X : 30,3g Tris Base ; 144g glycine ; 10g SDS ; qsp eau milliQ). Les échantillons sont déposés dans les puits après dénaturation à 95°C pendant 5 min. La quantité de protéines déposée est de 10µg, à l'exception de l'étude de l'expression de la protéine APLP2 pour laquelle 40µg sont déposées. La **migration** est effectuée à 60V jusqu'à sortie du front de migration.

Les protéines sont ensuite transférées sur des membranes. Deux systèmes de transfert différents ont été utilisés. Le premier consiste à préparer les cassettes de transfert de la façon suivante : un filtre en mousse, 2 papiers Whatman (Whatman® Chromatography Paper Cat. No. 3030700), une membrane de nitrocellulose (Amersham™ Protran™ 0,45µm NC Cat. No. 10600033), le gel, 2 papiers Whatman et un filtre. Les cassettes sont alors placées dans le système d'électrophorèse en présence de tampon de transfert (eau milliQ ; Buffer 1X (3,03g Tris Base ; 14,4g glycine ; eau qsp 1L) ; éthanol pur 10%). La cuve est placée dans la glace. Le **transfert** est effectué à 110V pendant 1h.

Le second système de transfert utilise le Trans-Blot® Turbo™ Blotting System (Bio-Rad, Cat. No. 170-4155). Le transfert est alors réalisé en suivant le protocole du fournisseur. Le transfert est effectué à 25V et 1,3A pendant 10 min. Les protéines sont également transférées sur une membrane de nitrocellulose.

Les membranes sont ensuite saturées dans du lait (5%) dilué dans du tampon de rinçage TBS-T 1X (10X TBS Buffer : 80g NaCl ; 200mL 1M Tris-HCl pH=7,6 ; eau qsp 1L) sous agitation. Trois rinçages de 10 min sont alors réalisés. Les membranes sont ensuite incubées avec **l'anticorps primaire (Tableau 6)** sous agitation, soit 1h à température ambiante, soit sur la nuit à 4°C. Trois rinçages de 10 min dans du TBS-T 1X sont réalisés, puis les membranes sont incubées avec **l'anticorps secondaire (Tableau 6)** couplé à la peroxydase de raifort (HRP pour *Horseradish Peroxidase*) pendant 1h à température ambiante sous agitation. Trois rinçages (5 min dans du TBS-T 1X) sont réalisés avant révélation du marquage par utilisation du kit SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific - #34080) ou du kit Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad, #170-5061). La luminescence est alors détectée à l'aide d'une caméra (Amersham™ imager LAS600).

Pour quantifier l'expression de la protéine d'intérêt, le signal détecté pour cette dernière est rapporté au signal d'une protéine de référence, la GAPDH ou la  $\beta$ -actine. Avant de la révéler, une étape de détachement des anticorps appelée "*stripping*" est réalisée. Pour cela, la solution Restore™ Plus Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific - #46430) est utilisée. La révélation de la GAPDH est réalisée en suivant le protocole décrit dans ce paragraphe à partir de l'étape de saturation. L'anticorps de la  $\beta$ -actine est directement couplé à l'HRP, il n'y a donc pas d'étape d'incubation avec un anticorps secondaire.

La **quantification** est réalisée par utilisation du logiciel Image J®. Il permet de mesurer la densité en niveau de gris du signal pour chaque échantillon. Pour cela, un rectangle est tracé autour de la bande correspondant à la protéine cible et ce pour chacun des puits. Pour chaque rectangle tracé, une courbe reflétant l'intensité du signal est obtenue. On extrait alors l'aire sous la courbe à partir de laquelle un pourcentage de niveau de gris est calculé pour chaque échantillon. La densité relative de chaque échantillon est ensuite calculée en utilisant le pourcentage de gris du premier puit comme standard. Les valeurs sont normalisées en rapportant, pour chaque puits, la densité relative de la protéine d'intérêt à la valeur correspondant à la protéine de référence.



Protéines	Anticorps I <sup>aire</sup>			Anticorps II <sup>aire</sup>	
	Dilution	Espèce	Référence	Dilution	Référence
APP	1/2500	Souris	Millipore MAB348	1/5000	DAKO P0447
APLP1	1/500	Lapin	Abcam ab192481	1/5000	Invitrogen A16096
APLP2	1/10000		Abcam ab140624	1/2000	
GFAP	1/2500		DAKO Z0334	1/5000	
S100B	1/500		Sigma HPA015768	1/5000	
SNAP-25	1/1000	Chèvre	Santa Cruz SC- 7538	1/5000	Millipore AP106P
Synaptophysine	1/10000	Souris	Abcam ab8049	1/10000	DAKO P0447
GAPDH	1/5000		Thermo Scientific MA5-15738	1/5000	
B-actine	1/150000	/	Sigma A38-54	/	/

**Tableau 6: Conditions utilisées pour chacune des protéines ciblées pour la réalisation des Western Blots**

I<sup>aire</sup> : primaire ; II<sup>aire</sup> : secondaire

## V- Analyses histologiques

Des mesures de volumes et de surfaces de différentes régions cérébrales ont été réalisées sur les cerveaux perfusés de la cohorte de 12 mois. Pour cela, la technique de stéréologie a été utilisée. Ces analyses ont été réalisées pour 6 individus pour chaque condition génétique.

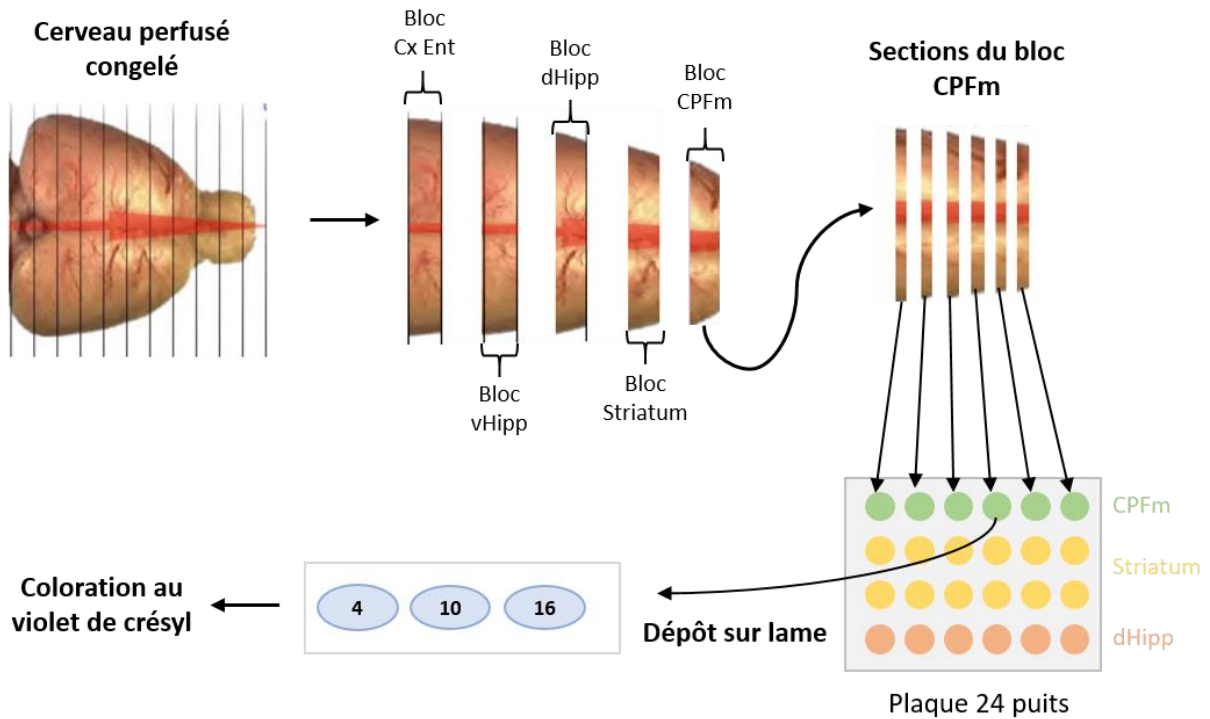
### 1- Principe de la Stéréologie

La stéréologie est un outil de quantification basé sur un ensemble de méthodes mathématiques et statistiques (West 2012; 2013; Howard et Reed 2010). Elle permet d'estimer des volumes, des surfaces, des longueurs ou des nombres pour des éléments contenus dans un volume délimité, par exemple, le nombre de neurones contenu dans l'hippocampe. Cette méthode permet ainsi d'obtenir des informations sur une structure en 3 dimensions à partir de coupes en 2 dimensions. La stéréologie est une méthode dite non-biaisée. Elle permet de réduire les biais systématiques, liés à la conception des protocoles, et les biais d'échantillonnages qui sont rencontrés avec les techniques classiques de microscopie. La préparation

des protocoles bien en amont des expériences permet ainsi de réduire les biais systématiques. Par ailleurs, la sélection des échantillons étudiés se fait de façon randomisée, le matériel d'intérêt n'est donc pas choisi. Cela est valable à chaque étape d'échantillonnage, soit de l'animal étudié jusqu'aux coupes de cerveaux analysées. Ainsi, chaque échantillon a la même probabilité d'être étudié. On parle d'échantillonnage uniforme, aléatoire et systématique.

## 2- Coupes de cerveau

Des coupes, d'une épaisseur de 40 $\mu$ m, sont réalisées au cryostat (Microm HM560, Thermo Scientific et Leica CM3050S) à partir des cerveaux perfusés (Partie III, Point 7). Elles sont déposées dans une boîte 24 puits contenant un cryopréservateur qui permet de les conserver sans dommage au congélateur -20°C jusqu'à leur utilisation. Pour permettre l'échantillonnage des coupes, des blocs de cerveau sont définis pour chaque structure d'intérêt grâce à l'atlas de Paxinos et Watson (2007). Dans le cadre de notre étude, cinq blocs ont été définis selon les coordonnées stéréotaxiques suivantes : le CPFm s'étendant de +4,2 à +2,52 mm par rapport au bregma ; le striatum entre +2,28 et -1,92 mm ; l'hippocampe dorsal entre -2,16 et -4,20 mm ; l'hippocampe ventral entre -4,44 et -6,84 mm et enfin un bloc correspondant au cortex entorhinal entre -6,96 et -8,76 mm (**Figure 24**). Les plaques 24 puits sont composées de rangées de 6 puits et les coupes obtenues pour un bloc sont réparties sur 1 rangée de puits, à l'exception du striatum pour lequel les coupes sont réparties sur 2 rangées (12 puits) du fait de la taille importante de cette structure. Pour un bloc, la première coupe est déposée dans le premier puits et ainsi de suite jusqu'au puits n°6. Une fois la rangée complétée, les coupes sont à nouveau déposées à partir du puits n°1, dans lequel se trouve donc la 1<sup>ère</sup> et la 7<sup>ème</sup> coupe. La même procédure est répétée jusqu'à la fin du bloc et ce pour chaque structure d'intérêt. Chaque puits contient donc plusieurs coupes pour une structure donnée. Les coupes qui seront utilisées pour les analyses sont ensuite sélectionnées au hasard en lançant un dé. Si le dé indique 4, alors toutes les coupes du puit n°4 sont déposées sur lames, puis colorées par la technique du violet de crésyl, dont le protocole est décrit ci-après. Cela permet d'échantillonner les coupes sélectionnées pour les mesures de façon non biaisée. En effet, chaque coupe a la même probabilité d'être sélectionnée. Cette technique permet ainsi de prendre en considération la totalité de la structure sans pour autant réaliser les mesures sur toutes les coupes d'un bloc donné.



**Figure 24: Protocole de réalisation des coupes de cerveau pour les mesures de volumes et surfaces par la technique de stéréologie**

Le cerveau est coupé selon des blocs définis grâce à l’atlas de Paxinos et Watson (2007). Dans notre cas, cinq blocs ont été définis : le cortex préfrontal médian (CPfM), le striatum, l’hippocampe dorsal (dHipp), l’hippocampe ventral (vHipp) et le cortex entorhinal (Cx Ent). Des coupes d’une épaisseur de 40µm sont ainsi réalisées au cryostat. Elles sont alors déposées sur une plaque 24 puits (1 ou 2 rangées de puits par structures). Par exemple, pour le bloc du CPfM, les coupes sont déposées sur une rangée de puits en démarrant par le premier puits. Une fois la rangée complétée, les coupes sont à nouveau déposées à partir du puit n°1. Celles utilisées pour les mesures de volumes et surfaces sont sélectionnées par lancer de dés. Si ce dernier affiche 4, alors toutes les coupes du puits n°4 sont déposées sur une lame, soit les coupes n°4, 10, 16, etc. Elles sont ensuite colorées par la technique du violet de crésyl.

### 3- Coloration au violet de crésyl

La technique de coloration au violet de crésyl permet, notamment, de visualiser l’organisation des tissus. Elle permet de colorer le noyau et le cytoplasme des cellules en bleu-violet. Dans un premier temps, les lames sont plongées dans de l’eau pendant 2 min afin de les réhydrater. Elles sont alors transférées dans une solution de violet de crésyl (5g violet de crésyl acétate, Sigma, #C1791 ; 60mL acétate de sodium 1M ; 340mL acide acétique 1M) préalablement chauffée à 55°C, pendant 9 min. Les lames sont ensuite rincées dans 3 bains d’eau distillée de 3 min. Elles sont ensuite plongées successivement dans 2 bains d’éthanol à 70 et 95%, respectivement (2 min chaque), avant d’être brièvement (20s) transférées dans un mélange acide/alcool décolorant (10mL acide acétique concentré dans 200mL d’éthanol 95%). Des bains d’éthanol sont à nouveau réalisés, chacun d’une durée de 4 min ; 1 bain d’éthanol 95% suivi de 2 bains d’éthanol

100%. Enfin, les lames sont plongées dans une solution de xylène pendant 5 min. Une fois ces étapes terminées, le montage des lames peut être réalisé en utilisant le milieu de montage EUKITT®.

#### 4- Mesures de volumes et de surfaces

##### 4.1- Dispositif

Les mesures de volumes et de surfaces ont été réalisées par utilisation d'un microscope optique (Leica DM5500B) comportant une platine motorisée qui permet de se déplacer dans toutes les dimensions de la coupe (axes x, y et z). Le microscope est couplé à une caméra numérique (Optronics Microfire) reliée à un ordinateur à partir duquel les mesures sont réalisées à l'aide du logiciel de stéréologie Mercator (Explora Nova, La Rochelle, France).

##### 4.2- Mesure de volumes

###### 4.2.1 Principe

La mesure des volumes se base sur la méthode stéréologique de Cavalieri (Cavalieri 1635; Schmitz et Hof 2005). Cette dernière utilise des mesures de surface, quand cela est possible, en se basant sur la formule mathématique suivante :

$$V = T \times \sum_{i=1}^m A_i$$

Ainsi, le volume (V) est égal à la somme des surfaces de chaque coupe (A<sub>i</sub>, avec i = 1 à m, soit les coupes 1 à m) multiplié par la distance entre les coupes qui inclut l'épaisseur de chaque coupe (T). Cette mesure implique la réalisation de sections de l'objet d'intérêt, l'épaisseur de ces dernières étant connue. Si la mesure de surface n'est pas possible, cette méthode utilise alors une grille de points. Cette grille est déposée par le logiciel sur la structure d'intérêt et le nombre de point présent dans la structure sont comptés. Le volume est alors déterminé grâce à la formule mathématique suivante :

Volume associé à  
chaque point

$$V = T \times \frac{a}{p} \times \sum_{i=1}^m P_i$$

Surface de la section

**Figure 25: Exemple d'une grille de points**

La distance entre chaque point est connue, ainsi que la surface associée à chaque point (a/p).

Le volume est alors égal à la somme du nombre de points présents dans la structure d'intérêt pour chaque coupe ( $P_i$ , avec  $i = 1$  à  $m$ ), multiplié par la surface associée à chaque point ( $a/p$ ) (**Figure 25**) et par la distance entre les coupes incluant l'épaisseur de chaque coupe ( $T$ ). Dans notre cas, nous avons utilisé la 1<sup>ère</sup> formule basée sur des mesures de surface.

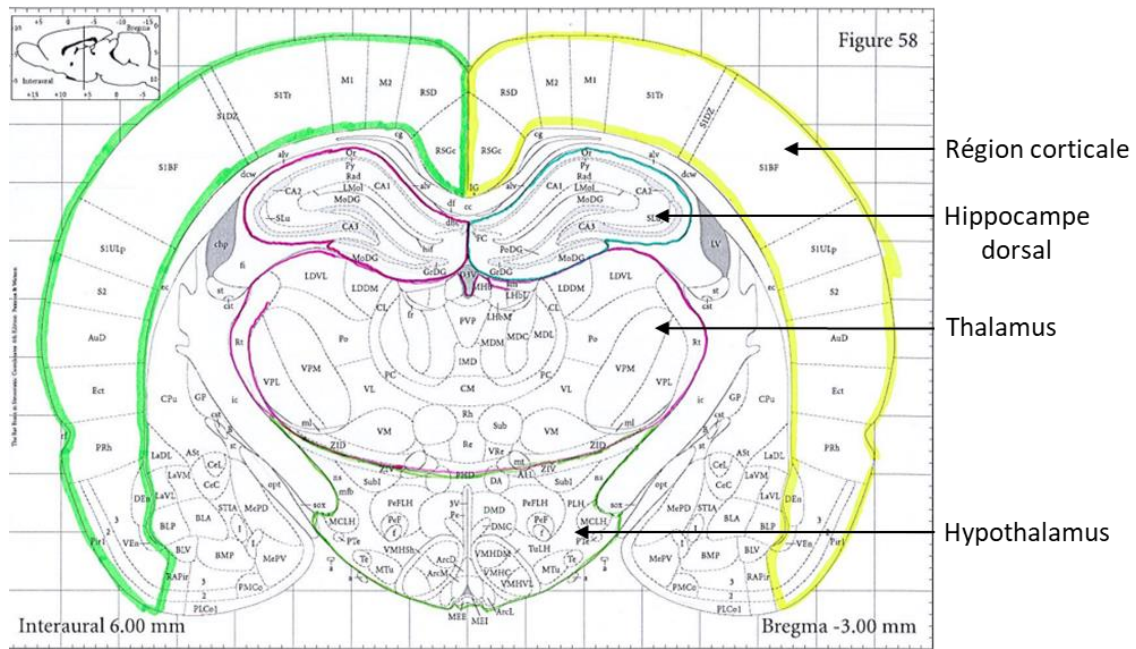
La fiabilité des mesures est définie par le coefficient d'erreur (CE) qui représente la variabilité des mesures réalisées entre les coupes d'un même animal. Le CE est déterminé par le logiciel. Les résultats sont considérés comme fiable lorsque le CE est inférieur à 0,15.

#### 4.2.2- Protocole sous Mercator

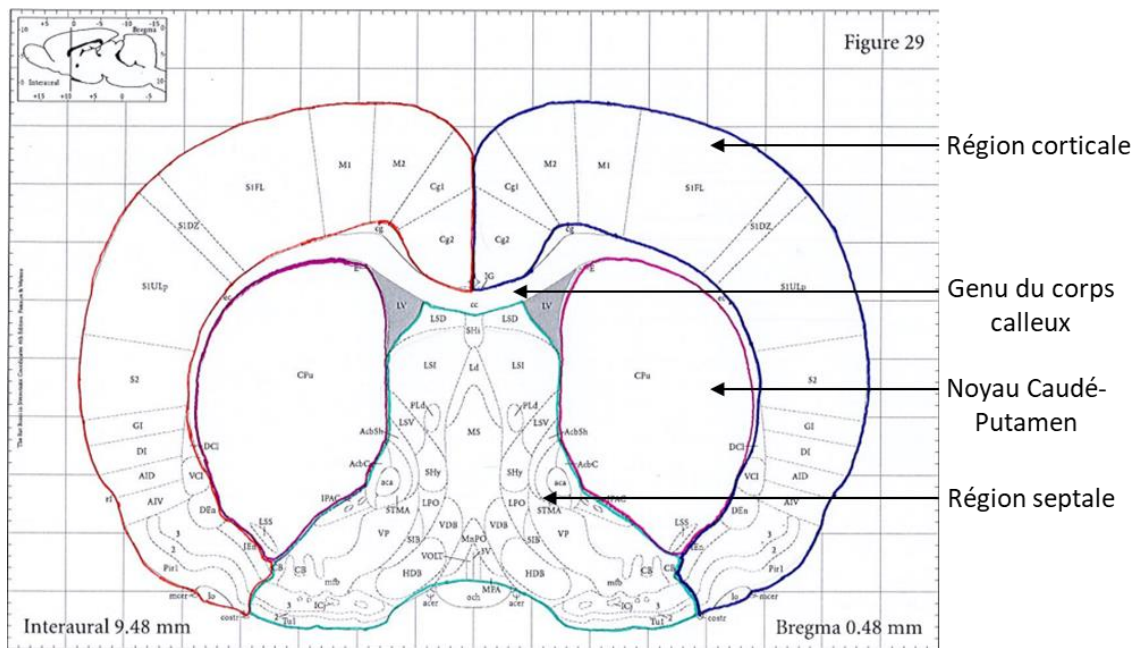
Les mesures de volume ont été réalisées pour les différentes sous-régions de l'hippocampe dorsal (Cornes d'Ammon : CA1, CA2 et CA3 ; Gyrus denté) et du CPFm (cortex infralimbique, prélimbique et cingulaire). Pour chaque coupe, sélectionnées selon le protocole décrit au Point 2, les limites des différentes sous-régions sont dessinées par l'expérimentateur en s'appuyant sur l'atlas de Paxinos et Watson (2007). Ainsi, pour chaque coupe de tissu cérébral, la surface de chaque sous-région d'intérêt est mesurée. Elle est ensuite multipliée par l'épaisseur totale de la région, soit  $240\mu\text{m}$  ( $40\mu\text{m} \times 6$ ) considérant notre échantillonnage d'une coupe sur 6, et l'épaisseur de  $40\mu\text{m}$  pour chaque coupe. Le volume total de la sous-région d'intérêt est ainsi obtenu.

#### 4.3- Mesures de surface

Les mesures de surfaces ont été réalisées par une analyse morphologique simple en délimitant le contour de chaque sous-région d'intérêt d'une coupe coronale au niveau de l'hippocampe dorsal (**Figure 26**) et une coupe coronale au niveau du striatum pour chaque rat (**Figure 27**). Ainsi, les structures étudiées au niveau de l'hippocampe dorsal sont : l'hippocampe, le thalamus, l'hypothalamus ainsi que l'ensemble de la région corticale. Au niveau du striatum, les structures qui ont été étudiées sont : le genu du corps calleux, la région septale, le noyau caudé-putamen, et l'ensemble de la région corticale.



**Figure 26:** Planche neuroanatomique indiquant les délimitations des différentes sous-régions du plan de l'hippocampe dorsal



**Figure 27:** Planche neuroanatomique indiquant les délimitations des différentes sous-régions du plan du striatum

## 5- Analyses statistiques

Pour l'ensemble des tests comportementaux et l'évolution de la masse corporelle, des analyses de variance (ANOVA) à 1 facteur (Génotype) ou 2 facteurs (Génotype x Jour, Période, Heure, Zone ou Bras) avec mesures répétées sont réalisées. Quand cela est justifié (effet significatif d'un facteur ou d'une interaction de facteurs), un test « post-hoc » de Newman-Keuls est réalisé. Pour les tests de rappel dans la piscine de Morris et le DH, le test *t* de Student permet de comparer le temps passé dans le quadrant-cible ou les bras N et NE au hasard (25% du temps pour la piscine de Morris ; 8,2s pour le DH). Enfin, un test du Chi<sup>2</sup> est réalisé pour comparer les rats utilisant une stratégie allocentrique *versus* égocentrique dans le DH. Par ailleurs, afin d'étudier l'effet du vieillissement, des ANOVA factorielles (Génotypes x Age) ou à mesures répétées (Génotype x Age x Jour, Période ou Zone) sont réalisées afin de comparer les différents âges étudiés.

Pour les Western Blots et les mesures de volumes et surfaces, des ANOVA à 1 facteur (Génotype) sont réalisées. L'ensemble des analyses statistiques est réalisé à l'aide des logiciels Statistica® et GraphPad Prism ; le seuil de significativité est  $p < 0,05$ .

## **Projet II : Caractérisation de modèles de rats du Syndrome de Down avec ou sans l'APP humanisée**

### **I- Les animaux**

#### **1- Les modèles**

Les animaux utilisés dans ce projet sont des rats mâles et femelles de fond génétique Sprague-Dawley. L'ensemble des modèles décrits ici a été créé à l'Institut Clinique de la souris (Illkirch, France) par l'équipe du Dr. Yann Hérault.

#### **1.1- Les modèles de rat du Syndrome de Down**

Les modèles de rats du SD utilisés dans le cadre de ce projet ont été générés par utilisation de la technologie CRISMERE (Birling et al. 2017). Leur construction est décrite dans la publication Birling et al. (2017). Il s'agit des modèles Dup(Rno11), Dup(Rno20) et Dup(Rno11-20). Les rats Dup(Rno11) présentent ainsi une duplication de la région du Rno11 synténique au Hsa21. Cette région, située entre les gènes *Lipi* et *Zbtb21*, fait une taille de 24,4 Mb et comporte 140 gènes codant pour des protéines. Les rats Dup(Rno20) présentent une duplication de la région du Rno20 synténique au Hsa21. Cette région, bien plus petite que la région du Rno11, fait une taille de 3,6 Mb. Elle se situe entre les gènes *Umodl1* et *Prmt2* et contient uniquement 73 gènes. Les rats Dup(Rno11-20) sont ainsi issus du croisement des 2 modèles précédents. Ces animaux possèdent à la fois la duplication de la région Rno11 et de la région Rno20, ce qui correspond à une trisomie complète.

La construction des modèles Dup(Rno11) et Dup(Rno20) a été validée de deux façons. Tout d'abord, en étudiant le nombre de copies de différents gènes présents dans la région dupliquée par la technique de PCR digitale en gouttelettes, ou *digital droplet PCR* (ddPCR). Par la suite, la technique d'hybridation génomique comparative sur des puces à ADN (CGH arrays) a été utilisée afin de vérifier que le gain de matériel génétique, chez les modèles Dup(Rno11) et Dup(Rno20), englobe la totalité de la région dupliquée initialement définie. Nous voulions également vérifier la présence d'éventuelles altérations aux extrémités des régions dupliquées, ou d'autres anomalies chromosomiques dans les chromosomes modifiés, soit le Rno11 pour le modèle Dup(Rno11) et le Rno20 pour le modèle Dup(Rno20).



### 1.1.1- Validation des modèles Dup(Rno11) et Dup(Rno20) par ddPCR

Les ddPCR ont été réalisées en collaboration avec le Service de Validation des modèles de l'ICS.

#### 1.1.1.1- Extraction de l'ADN

L'ADN est extrait à l'aide du kit DNA Extract All Reagents (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific). Les échantillons sont digérés par ajout de 50µL du tampon de lyse. Ils sont alors incubés à 95°C pendant 10 min. Une fois les biopsies digérées, 50µL de solution neutralisante est ajoutée. Les échantillons sont alors dilués 20 fois pour la réalisation de la ddPCR (Lindner, Cayrou, Jacquot, et al. 2021; Lindner, Cayrou, Rosahl, et al. 2021).

#### 1.1.1.2- Protocole de la ddPCR

La réaction de PCR est réalisée à partir de 2µL des échantillons dilués au vingtième, auxquels sont ajoutés 10µL du Supermix ddPCR 2x (sans dUTP, #1863024, Bio-Rad), 250nM de chaque sonde couplée à un fluorophore (FAM ou HEX), l'une dirigée contre le gène d'intérêt, l'autre contre le gène de références, ainsi que 750nM de chaque amorce (2 amorces par gènes étudiés) pour un volume final de 20µL pour chaque échantillon (Lindner, Cayrou, Jacquot, et al. 2021). Les échantillons ainsi préparés sont ensuite fractionnés sous forme de gouttelettes par utilisation du générateur de gouttelettes QX200 (Bio-Rad). La réaction de PCR est alors réalisée en déposant 40µL des échantillons sur une plaque 96 puits. L'ADN contenu dans les gouttelettes est alors amplifié selon les conditions suivantes : 95°C pendant 10 min, suivi de 40 cycles de 20s à 95°C, suivi d'un gradient d'hybridation entre 53 et 63°C pendant 1 min, puis 10 min à 98°C pour une étape de désactivation. Les produits de PCR sont alors analysés grâce au lecteur QX200 (Bio-Rad) permettant de mesurer l'intensité de fluorescence de chaque gouttelette. Les données sont ensuite analysées avec le logiciel Qantasoft™ Analysis Pro (Version 1.0.596).

Dans le cadre de la validation du **modèle Dup(Rno11)**, le nombre de copies de huit gènes, présents dans la région Rno11 dupliqué, a été étudié. Il s'agit des gènes *Btg3* (*BTG Anti-Prolifération Factor 3*), *Cldn8* (*Claudin 8*), *Kcnj15* (*Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 15*), *Igsf5* (*Immunoglobulin Superfamily Member 5*), *Mrap* (*Melanocortin 2 Receptor Accessory Protein*), *Ncam2* (*Neural Cell Adhesion Molecule 2*), *Pcp4* (*Purkinje Cell Protein 4*) et *Rwdd2b* (*RWD Domain Containing 2B*). Les amorces et les sondes utilisées pour ces gènes sont indiquées dans le **Tableau 7**.

			Séquence
Gène <i>Btg3</i>	Amorces	Forward	5'- TGC ATT CGT GTC AAT AAG TTT CAG -3'
		Reverse	5'- CCC AGA GTG TAA GCT CCT TTG -3'
	Sonde	/56-FAM/TC CTG AAA G/Zen/C CTG TGA GAA CAG CT/3IABkFQ/	
Gène <i>Cldn8</i>	Amorces	Forward	5'- ATG GTT CAC GCG GTT CTT -3'
		Reverse	5'- TAA CTG CCA CTC GCA TTA CTT -3'
	Sonde	/56-FAM/AC GAC CCA T/Zen/C GAA AGA CTG TTG GT/3IABkFQ/	
Gène <i>Kcnj15</i>	Amorces	Forward	5'- GGT GGC TAA CAT GAG GAA GAG -3'
		Reverse	5'- GTA GCC TGG TTG AGG AGA ATG -3'
	Sonde	/56-FAM/TT GAT TCA G/Zen/T GCC AGC TTT CCG GA/3IABkFQ/	
Gène <i>Igsf5</i>	Amorces	Forward	5'- CCC TGT AAC GTG ACT TGC TAT -3'
		Reverse	5'- CGG CTC CAG AAA GGA ATA GTA G -3'
	Sonde	/56-FAM/TT TCC TGG G/Zen/A GCT TGA GGT TCC TG/3IABkFQ/	
Gène <i>Mrap</i>	Amorces	Forward	5'- GTT ACA GCA GCA GAG TCC TTC -3'
		Reverse	5'- TCT CCA GGT TCA CCA CTA CA -3'
	Sonde	/56-FAM/AC CAG GTT C/Zen/A GGA TGG GTG TCC TA/3IABkFQ/	
Gène <i>Ncam2</i>	Amorces	Forward	5'- CAG AGA TGT GAA GTT GTC AGA TT -3'
		Reverse	5'- GAT GCA TGC TTC TCT GGT G -3'
	Sonde	/56-FAM/AC TGT GAG G/Zen/C CGC GAG TAG AAT TG/3IABkFQ/	
Gène <i>Pcp4</i>	Amorces	Forward	5'- CAC CCG AAG ACA CCA AGT T -3'
		Reverse	5'- TGG GTT TCT GTT CAT GCA TTT C -3'
	Sonde	/56-FAM/AG AGC AAA G/Zen/T CAT CCA CAC CCA GT/3IABkFQ/	
Gène <i>Rwdd2b</i>	Amorces	Forward	5'- AAC ACA GAT CTG ACA GCA TAC C -3'
		Reverse	5'- GCA TGC TCT TTA ACC CAC TCT -3'
	Sonde	/56-FAM/AG CAC TGT C/Zen/T GGG AGA GGT CTG TA/3IABkFQ/	

**Tableau 7: Séquences des amorces et des sondes des gènes ciblés pour la validation du modèle Dup(Rno11) par ddPCR**

Concernant la validation du **modèle Dup(Rno20)**, le nombre de copies de neuf gènes présents dans la région Rno20 dupliquée a été étudié. Il s'agit des gènes *Abcg1* (*ATP-binding cassette sub-family G member 1*), *Pde9a* (*Phosphodiesterase 9A*), *Cbs* (*Cystathionine Beta-Synthase*), *Sik1* (*Salt Inducible Kinase 1*), *Trpm2* (*Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 2*), *Itgb2* (*Integrin Subunit Beta 2*), *Slc19a1* (*Solute Carrier Family 19 Member 1*), *Lss* (*Lanosterol Synthase*) et *S100b* (*S100 Calcium Binding Protein B*) (Birling et al. 2017). Les amorces et les sondes utilisées pour ces gènes sont indiquées dans le

**Tableau 8.**

			Séquence
Gène <i>Abcg1</i>	Amorces	Forward	5'- GGC ATG TGT GAC TCT GAC TAT AA -3'
		Reverse	5'- GGC CTC TCC AAA CCT TCT TTA -3'
	Sonde	5'- AGA CGT GAA CCC GTT CCT CTG G -3' Fluorophore FAM	
Gène <i>Pde9a</i>	Amorces	Forward	5'- CAA GGC CAT CTA CCT AGA CAT C -3'
		Reverse	5'- GGA CAC CTG CGC CTA TTA -3'
	Sonde	56-FAM/AT GGA CGC A/Zen/T CCA GAA GGT ACC C/3IABkFQ/	
Gène <i>Cbs</i>	Amorces	Forward	5'- TAG ACT CAG ACG CGG GAA A -3'
		Reverse	5'- CAA TCA CCT GAG CCT GTT GT -3'
	Sonde	56-FAM/TCGGACAGGA/ZEN/TCACAGCTCAGATAGG/3IABkFQ/	
Gène <i>Sik1</i>	Amorces	Forward	5'- AGG TCC TCA GCA TGT CTT TG -3'
		Reverse	5'- GCC CGT TGG AAG TCA GAT AA -3'
	Sonde	/56-FAM/AA GTC ACA C/Zen/C AGA AGA CGC TGA GC/3IABkFQ/	
Gène <i>Trpm2</i>	Amorces	Forward	5'- AGT CAA TAG GTG CGT GCT AAG -3'
		Reverse	5'- TTC TTC TCC AGC TTG TTC TCT G -3'
	Sonde	/56-FAM/CC TGG GTG A/Zen/G TTA ACC CTT TCC GG/3IABkFQ/	
Gène <i>Itgb2</i>	Amorces	Forward	5'- CCA GAT CAT GAG GTC ACA TAC C -3'
		Reverse	5'- GCT GCT GGA TAA CCT ACA CTT -3'
	Sonde	/56-FAM/TG TAA GCG T/Zen/T TCC GTC CTT CTG CT/3IABkFQ/	
Gène <i>Slc19a1</i>	Amorces	Forward	5'- TCA CCT ACT ATG TCC ATG TCC T -3'
		Reverse	5'- CTC CAG TGC ATA CTC AGA AGT G -3'
	Sonde	/56-FAM/AG CAG ACT C/Zen/A ACT ACA ACG GTG CC/3IABkFQ/	
Gène <i>Lss</i>	Amorces	Forward	5'- GTC GGC AGA GAT GGA CTT ATT -3'
		Reverse	5'-GCT TCC AGA CTT GGG ATG AA -3'
	Sonde	/56-FAM/CC CAC TCT T/Zen/T GGG ACT GGA CAC AG/3IABkFQ/	
Gène <i>S100b</i>	Amorces	Forward	5'- CAT CAA CAA CGA GCT CTC TCA -3'
		Reverse	5'- CAG AGG CAG AAA CGG AAG TTA -3'
	Sonde	5'- CTG AGC TGC TCC AGA AAT GGT CCT -3' Fluorophore FAM	

**Tableau 8: Séquences des amorces et des sondes des gènes ciblés pour la validation du modèle Dup(Rno20) par ddPCR**

### 1.1.2- Validation des modèles Dup(Rno11) et Dup(Rno20) par CGH arrays

Le CGH arrays a été réalisé par l'entreprise Helixio (Saint-Beauzire, France). Nous avons utilisé un CGH arrays à deux couleurs (AMADID 027064, Agilent Technologies) afin de marquer les échantillons d'un animal WT et d'un animal mutant. Le protocole réalisé comporte plusieurs étapes comme décrit dans la **Figure 28**.

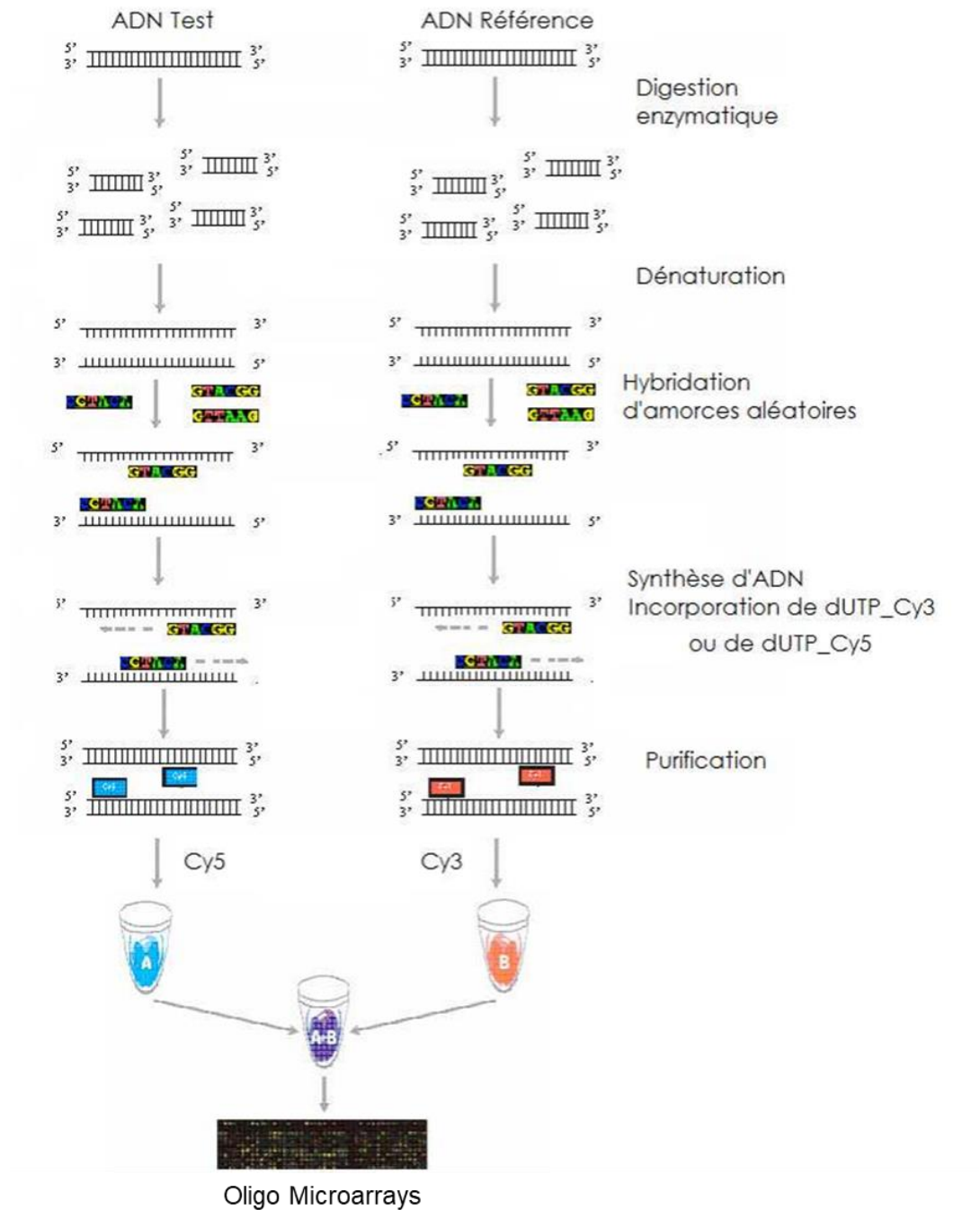
Tout d'abord, les échantillons d'ADN sont dosés à l'aide du fluorimètre Qubit (Qubit® 2.0, Thermo Fisher Scientific) en utilisant le kit Qubit® DNA BR Assay. Afin d'évaluer la pureté de l'ADN, la concentration des échantillons est mesurée aux absorbances 230, 260 et 280 nm au NanoDrop ND-1000 (Thermo Fischer Scientific), puis les ratios 260/230 et 260/280 sont calculés à partir des valeurs obtenues. Ainsi, la pureté et la concentration des échantillons étaient de bonne qualité. Les mesures effectuées avec le NanoDrop et le Qubit étaient proches. Le marquage des échantillons est réalisé à partir de 1µg d'ADN (mesurée par le Qubit) par utilisation du kit SureTag DNA Labeling (Agilent Technologies). Les échantillons d'ADN WT et mutant (aussi noté ADN test) sont digérés pendant 2h à 37°C avec les enzymes de restrictions Alu I et Rsa I. Après inactivation des enzymes, l'ADN est dénaturé 3 min à 98°C. L'utilisation d'amorces aléatoires et d'un fragment exo-klenow, correspondant à un fragment de l'ADN polymérase I, permet ensuite de marquer les échantillons par utilisation de dUTP couplés à un fluorochrome. La cyanine 5 (Cy5) est ainsi utilisée pour les échantillons mutants ou la cyanine 3 (Cy3) pour les échantillons WT. Une colonne est alors utilisée afin de purifier les segments avec un poids de 30kDa (Agilent Technologies).

Avant l'étape d'hybridation, l'absorbance de l'ADN marqué est mesurée à 260nm (ADN), 550nm (Cy3) et 650nm (Cy5) à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 pour évaluer le rendement et l'activité spécifique d'incorporation de la Cy (pmol Cy/µg ADN). L'activité spécifique était entre 20 et 60 pmol Cy/µg et le rendement était homogène et dans la gamme de valeurs.

L'hybridation est ensuite réalisée par utilisation de la technique de double-couleur. Cette méthode permet de mesurer directement le ratio entre les signaux de fluorescence émis (Cy5/Cy3 ou « mutant/WT ») au niveau de chaque oligonucléotide sur la puce. L'hybridation est réalisée à 67°C pendant 24h. La puce est ensuite lue par le scanner G2505C (Agilent Technologies). Ce dernier permet la lecture simultanée des fluorophore Cy3 et Cy5, avec une intensité de lumière du laser constante. Le scanner est équipé de logiciel d'acquisition d'images Feature Extraction 11.5.1.1 (Agilent Technologies) et suit un protocole spécifique pour l'analyse de la puce. Les étapes principales de cette analyse sont les suivantes : i) identifier les points sur la puce avec des identificateurs de séquences spécifiques, ii) marquer les « *outliers* », iii) calculer le bruit de fond, les biais et erreurs liés à la fluorescence, iv) corriger les biais liés à la fluorescence, v) calculer

plusieurs paramètres et statistiques lié au signal, vi) réaliser une analyse de contrôle qualité pour évaluer la qualité de l'hybridation.

Un fichier excel est obtenu dans lequel est indiqué, en lignes, la position hybridée identifiée par un nom de sonde et, en colonnes, les différents paramètres comme la localisation chromosomique de l'hybridation, le LogRatio (base 10) et le niveau de confiance du LogRatio (noté comme PvalueLogRatio). Le LogRatio représente ainsi le logarithme du signal Cy5 traité sur le signal Cy3 traité. En utilisant les positions chromosomiques, nous avons construit un fichier.BED qui contient les positions des différentes hybridations sur chaque chromosome. De plus, nous avons extrait la table refFlat du navigateur génomique UCSC en format.BED. Cette table contient les positions chromosomiques annotées pour tous les exons/gènes du génome téléchargés à partir de la version Rn4 du génome, HGSC Version 3.4 Novembre 2004. Par utilisation de Bedtools en langage Bash, nous avons annoté le fichier CGH arrays avec le nom du gène et de l'exon où l'hybridation a eu lieu. Enfin, à l'aide du programme de statistiques R, nous avons importé les annotations des gènes et exons des hybridations du CGH arrays. L'intervalle chromosomique dupliqué pour chaque modèle et les hybridations limitrophes correspondant à un gène ont alors été représentés.



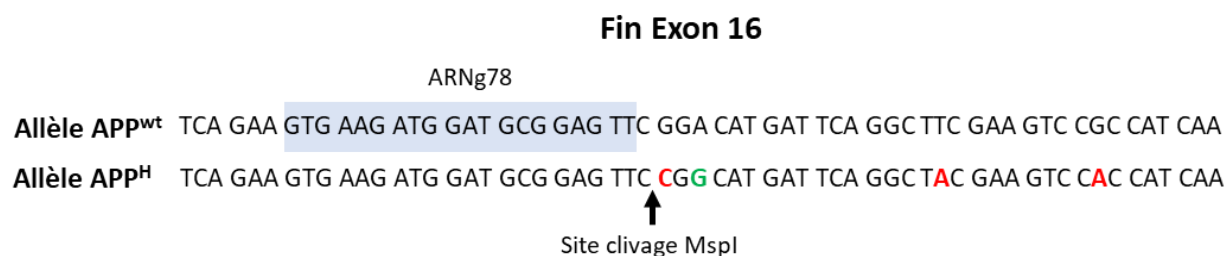
**Figure 28: Protocole de préparation des échantillons pour la réalisation du CGH arrays**

L'ADN Test correspond à l'ADN de l'animal mutant, Dup(Rno11) ou Dup(Rno20), et l'ADN Référence correspond à l'ADN d'un animal WT. La figure est tirée du protocole fourni par l'entreprise Helixio.

## 1.2- Les modèles de rats du Syndrome de Down avec l'APP humanisée

### 1.2.1- Modèle de rat APP humanisée

La création du modèle de rat APP<sup>H</sup> repose sur une mutagenèse ciblée réalisée par utilisation de la technologie CRISPR/Cas9. Comme mentionné précédemment, le début de la séquence de l'Aβ est localisé vers la fin de l'exon 16 où sont présentes les différences entre la séquence humaine et celle du rat. Afin de rendre la séquence protéique de l'Aβ du rat identique à celle de l'Homme, trois mutations ponctuelles ont été introduite dans la séquence nucléotidique du gène *App* par recombinaison homologue. Contrairement à la première approche mise en œuvre, le cocktail injecté dans les embryons comprenait cette fois-ci l'ARNm de la Cas9 (10ng/μL), un seul ARNg (10ng/μL), situé en amont des sites de mutations ponctuelles (**Figure 29**), ainsi que des oligodésoxynucléotides simple brin (10ng/μl). Avec cette stratégie une seule coupure double brin de l'ADN est réalisée contre deux avec la première approche. Les oligodésoxynucléotides correspondent à l'ADN donneur. Il s'agit ici d'une séquence nucléotidique d'une taille de 150 nucléotides comportant les 3 mutations ponctuelles. Par ailleurs, une 4<sup>ème</sup> mutation a été introduite en plus des trois premières afin de créer un site de restriction pour l'enzyme MspI. Ce site de restriction est nécessaire afin de pouvoir différencier l'APP du rat (APP<sup>wt</sup>) de l'APP<sup>H</sup> lors du génotypage. En effet, les séquences nucléotidiques de ces 2 formes ont exactement la même taille, il n'est donc pas possible de les différencier.



**Figure 29: Schéma de construction du modèle de rat APP humanisée**

Représentation de la séquence nucléotidique de l'APP correspondant à la fin de l'exon 16. La séquence reconnue par l'ARNg est indiquée par le rectangle bleu clair. L'approche mise en œuvre a permis d'introduire 3 mutations ponctuelles dans la séquence nucléotidiques afin de rendre la séquence peptidique de l'Aβ du rat identique à celle de l'Homme. Ces 3 mutations sont indiquées par les lettres en rouge. Par ailleurs, une quatrième mutation, indiquée par la lettre en vert, a été introduite afin de créer un site de restriction pour l'enzyme MspI. Ce site est nécessaire afin de pouvoir génotyper les animaux.

### 1.2.2- Modèles de rat du Syndrome de Down avec l'APP humanisée

L'idée a été d'introduire la version humanisée du gène de l'APP dans nos modèles de rat du SD. Le but était d'obtenir des modèles de rat pour la MA dans un contexte de SD qui se veulent plus proches des conditions observées dans la pathologie humaine. Le gène *App* est localisé chez le rat sur le Rno11. Les rats Dup(Rno11) en possèdent donc 3 copies alors que les rats Dup(Rno20) n'en possèdent que 2. Nous voulions ainsi remplacer l'APP du rat, APP<sup>wt</sup>, par l'APP<sup>H</sup>. Pour cela, des rats Dup(Rno11) d'une part, et des rats Dup(Rno20) d'autre part, ont été croisés avec des rats homozygotes pour l'APP<sup>H</sup> (APP<sup>H2</sup>). Plusieurs étapes de croisement ont ensuite été nécessaires afin d'obtenir des rats Dup(Rno11) avec 3 copies d'APP<sup>H</sup> et Dup(Rno20) avec 2 copies d'APP<sup>H</sup>, appelés, respectivement, Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>. Pour la création des rats Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup>, 3 étapes de croisements ont été nécessaires et sont détaillées ci-dessous :

- **Etape 1** : Croisement de rats Dup(Rno11) sans APP<sup>H</sup> avec des rats APP<sup>H2</sup> afin d'obtenir des rats Dup(Rno11) avec 1 copie d'APP<sup>H</sup>, notés Dup(Rno11)-APP<sup>H1</sup>.
- **Etape 2** : Croisement des rats Dup(Rno11)-APP<sup>H1</sup> avec des rats APP<sup>H2</sup> afin d'obtenir des rats Dup(Rno11) avec 2 copies d'APP<sup>H</sup>, notés Dup(Rno11)-APP<sup>H2</sup>.
- **Etape 3** : Croisement des rats Dup(Rno11)-APP<sup>H2</sup> avec des rats APP<sup>H2</sup> afin d'obtenir les rats Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup>.

Pour génotyper les animaux issus de ces croisements, la technique de ddPCR a été utilisée. Le protocole, mis au point par le Service de Validation des modèles de l'ICS, permet ainsi de compter le nombre de copies d'APP<sup>wt</sup> et d'APP<sup>H</sup>. Cela permet donc de déterminer à la fois si l'animal est porteur de la duplication de la région Rno11 et le nombre de copies APP<sup>H</sup> intégrées dans son génome. Cette technique permet ainsi de sélectionner les animaux avec le bon génotype pour l'étape suivante de croisement. Le protocole de ddPCR est décrit dans la Partie II au point 4.

Concernant la création du modèle Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>, seules 2 étapes ont été nécessaires :

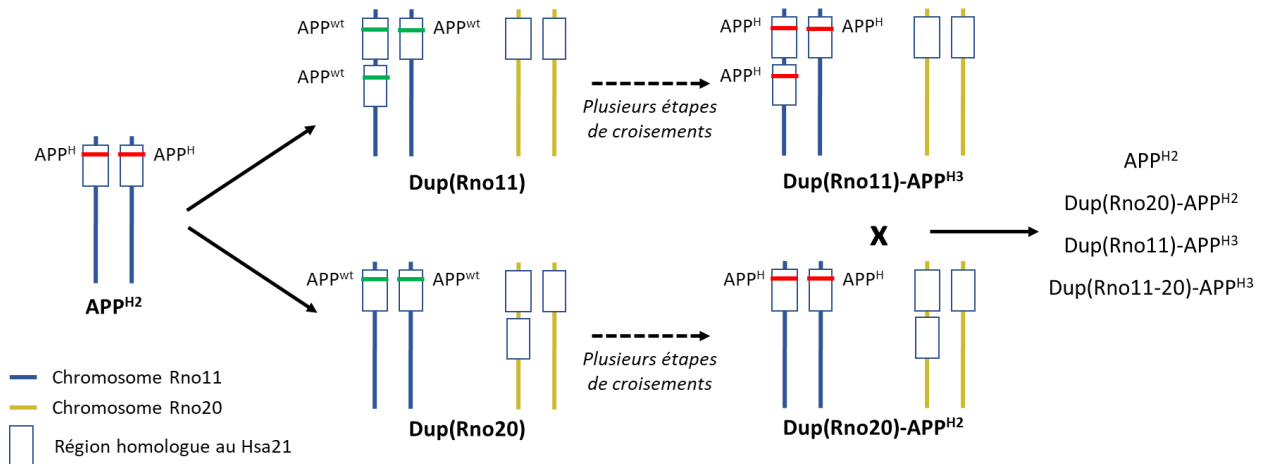
- **Etape 1** : Croisement des rats Dup(Rno20) sans APP<sup>H</sup> avec des rats APP<sup>H2</sup> afin d'obtenir des rats Dup(Rno20) avec 1 copie d'APP<sup>H</sup>, notés Dup(Rno20)-APP<sup>H1</sup>.
- **Etape 2** : Croisement des rats Dup(Rno20)-APP<sup>H1</sup> avec des rats APP<sup>H2</sup> afin d'obtenir les rats Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>.

Pour ces croisements, la réalisation de PCR classiques, permettant de mettre en évidence la duplication du Rno20 et de déterminer si le rat possède 1 (hétérozygote) ou 2 copies (homozygote) d'APP<sup>H</sup>, a permis



de sélectionner les animaux avec le bon génotype. Les protocoles pour ces PCR sont décrits dans la Partie II aux points 2.1 et 3, respectivement.

Ces modèles sont maintenant établis et sont maintenus en les croisant avec des rats APP<sup>H2</sup>. Par ailleurs, le croisement des modèles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> entre eux permet d'obtenir des rats avec une trisomie complète, modèle appelé Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>. Ce dernier croisement est ainsi utilisé pour produire les cohortes d'animaux de ce projet. Il permet de produire, en plus des rats Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>, des rats APP<sup>H2</sup>, Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> et Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup>. Le schéma de la **Figure 30** récapitule de façon simplifiée les croisements réalisés. Les animaux issus de ce dernier croisement sont génotypés par des ddPCR permettant de déterminer la présence de la duplication de la région Rno11 et/ou de la région Rno20, et le nombre de copies d'APP<sup>H</sup>. Le protocole pour le génotypage de ces animaux est décrit dans la Partie II au point 4.



**Figure 30 : Génération des modèles de rats de la maladie d'Alzheimer dans un contexte du syndrome de Down**

Les rats Dup(Rno11) et Dup(Rno20) ont été croisés avec des rats homozygotes pour l'APP<sup>H</sup> (APP<sup>H2</sup>) afin d'obtenir, après plusieurs étapes de croisements, des rats Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>, respectivement. Le croisement de ces 2 modèles permet alors de générer des rats APP<sup>H2</sup>, Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>, Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>. Ces derniers présentent une trisomie complète avec une duplication des 2 régions ainsi que 3 copies d'APP<sup>H</sup>.

## 2- Conditions d'hébergement

Tous les animaux utilisés dans ce projet ont été produits au sein de notre établissement utilisateur, l'ICS. Ils sont transférés dans la zone de phénotypage au minimum 2 semaines avant le début des tests comportementaux. Ils sont alors placés dans des cages jetables en plastique (Innocage® #R-BTM-H, Innovive, Paris, France) de dimensions 43,2 x 34 x 19,8 cm. Ces cages sont fermées et placées sur des

portoirs ventilés (**Figure 31**). Les rats sont hébergés par groupe de 2 et ont un accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture. Ils disposent d'un bâton à ronger en bois en guise d'enrichissement. La pièce de stabulation, différente des pièces de tests, est soumise à un cycle lumière/obscurité de 12h (lumière de 7h à 19h) et sa température est contrôlée ( $23\pm 1^\circ\text{C}$ ).



**Figure 31:** Hébergement des rats sur portoirs ventilés

Comme décrit dans le Projet I, la semaine suivant leur arrivée dans la zone de phénotypage, les animaux ne sont pas manipulés afin de les laisser s'acclimater à leur nouvel environnement. La semaine précédent le début des tests comportementaux, ils sont manipulés 1-2 min/jour pendant 5 jours afin de les habituer à l'expérimentateur et à la manipulation. Les tests comportementaux sont réalisés pendant la phase diurne. Le poids des animaux est suivi tout au long de la période de comportement à raison d'une pesée par semaine.

### **3- Autorisation de projet**

Les procédures mise en œuvre dans cette étude respectent les directives nationales (décret n°2013-118 du 1<sup>er</sup> Février 2013, Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale) et européennes (directives 2010/63/UE) relatives à la protection des animaux utilisés

à des fins scientifiques. Par ailleurs, ces projets ont été validés par le comité d'éthique interne, le Com'Eth (IGBMC-ICS). Deux demandes de projets ont ainsi été déposées, l'une concernant les modèles de rats SD sans l'APP<sup>H</sup> (n°APAFIS : #21265), l'autre concernant les modèles SD humanisés (n° APAFIS : #22785).

Par ailleurs, les modèles qui comportent une duplication de la région Rno11 sont à phénotypes dommageables. Les premières études réalisées chez ces animaux ont mis en évidence une sensibilité aux staphylocoques dorés pouvant entraîner le développement de lésions cutanées. Par ailleurs, la réalisation d'études de vieillissement a montré chez ces animaux le développement d'autres phénotypes qui sont classiquement observés chez les vieux rats. Cela inclut des insuffisances rénales, des tumeurs mammaires, des détresses respiratoire et cardiaque, ou encore du diabète. Ces modèles font donc l'objet d'une demande d'autorisation pour leur maintien qui a été validé par le Com'Eth (n°APAFIS : #31362).

## II- Génotypage

Le génotypage des modèles utilisés dans ce projet peut être réalisé en PCR classique et/ou en ddPCR. Ces dernières sont réalisées en collaboration avec le Service de Validation des Modèles et le Service de Génotypage de l'ICS.

### 1- Génotypage de la duplication de la région Rno11

Le génotypage de la duplication de la région Rno11 est réalisé par ddPCR à partir d'une biopsie d'oreille. Le protocole décrit dans ce paragraphe concerne les modèles sans l'APP<sup>H</sup>. L'extraction d'ADN et la réalisation de la ddPCR suivent le même protocole que celui décrit dans la Partie I, Point 1.1.1. Pour mettre en évidence la duplication, l'*App* est utilisé comme gène cible et le gène de référence est localisé en q21 (Tableau 9).

		Nom	Séquence
Gène cible <i>App</i>	Amorces	Rr5480_rApp Forward	5'- GTG AAG ATG GAT GCG GAG TT -3'
		Rr5480_rApp Reverse	5'- CTA TCT GGC CAG TCA GTT GTG -3'
	Sonde	Rr5480_rApp_WT	5'- ATT CAG GCT TCG AAG TCC GCC ATC -3' Fluorophore HEX
Gène de Référence q21	Amorces	Rn_Chro11q21 Forward	5'- CCC TAG ACA CCA GAA GAA TAG TG -3'
		Rn_Chro11q21 Reverse	5'- CGT CTG GTA GTA CTT GTC GTA AG -3'
	Sonde	Rn_Chro11q21	5'- TGT TTG CAG AAT GGC GTC TTC ACC -3' Fluorophore HEX

**Tableau 9: Séquences des amorces et des sondes pour le génotypage par ddPCR de la duplication de la région Rno11**

Le gène *App* est utilisé comme gène cible, il est inclus dans la région dupliquée et est donc présent en trois copies. Le gène de référence est localisé en q21.

## 2- Génotypage de la duplication du Rno20

Le génotypage de la duplication de la région Rno20 peut se faire selon 2 méthodes, soit par la technique de PCR classique, soit par ddPCR. Ces 2 méthodes sont décrites ci-dessous.

### 2.1- Méthode de génotypage par PCR classique

#### 2.1.1- Digestion tissulaire pour extraction d'ADN

Comme décrit dans le Projet I, l'extraction d'ADN est réalisée à partir d'une biopsie d'oreille prélevée une dizaine de jours après la naissance de l'animal. Les biopsies sont digérées dans 700µL de tampon d'extraction (50mM Tris-HCl pH=8, 100mM EDTA pH=8, 100mM NaCl, 1% SDS, eau qsp 1L) auquel est ajouté 40µL de Protéinase K 10mg/mL. Elles sont alors incubées sur la nuit dans un bain-marie à 56°C. Une fois les échantillons digérés, ils sont agités brièvement avant ajout de 250µL de NaCl 6M. Ils sont alors agités pendant 5 min, puis centrifugés pendant 10 min à 13 000 rpm. Le surnageant (750µL) est ensuite transféré dans un nouveau tube Eppendorf auquel vient s'ajouter 500µL d'isopropanol. Les tubes sont agités par retournement jusqu'à apparition d'un filament d'ADN, puis centrifugés à 13 000 rpm pendant 5 min. Le surnageant est éliminé, en prenant soin de ne pas perdre le culot d'ADN présent au fond du tube, et est remplacé par de l'éthanol 70% (1mL). Les échantillons sont à nouveau centrifugés 5 min à 13 000 rpm, puis placés dans une étuve à 37°C après élimination du surnageant. Une fois l'éthanol complètement évaporé, l'ADN est re-suspendu dans 20µL de TE (10mM Tris pH=8, 1mM EDTA pH=8, eau qsp 1mL). Les échantillons sont alors incubés 1h dans un bain-marie à 65°C. Enfin, l'ADN contenu dans chaque échantillon est dosé au Nanodrop (Thermo Scientific) et des dilutions à une concentration de 50ng d'ADN/µL sont préparées.

#### 2.1.2- PCR et Migration

Le protocole pour la réalisation de la PCR est similaire à celui décrit dans le Projet I, Partie II, Point 2. Cependant, seul 1µL de la dilution à 50ng/µl est utilisé, le volume d'eau ajouté dans la préparation du mix est alors de 11µL. Afin de pouvoir différencier l'allèle WT, de l'allèle DUP, deux PCR sont réalisées, notées, respectivement, PCR-WT et PCR-DUP. Les couples d'amorces utilisés pour chacune des PCR sont indiqués dans le **Tableau 10**.

PCR	Nom de l'amorce	Séquence
WT	9368-forward	5'- GGC GAG CCT ACA TGG TTG G -3'
	9369-reverse	5'- GCA GAC ACC AGC ACC CAT C -3'
DUP	9371-forward	5'- GGT CTC ATC GTG GCC CAT ACT C -3'
	9366-reverse	5'- CTT GTA GGC TGT GGG CTG AAT G -3'

**Tableau 10: Séquences des amorces utilisées pour les PCR-WT et DUP du modèle Dup(Rno20)**

Les conditions utilisées pour la réaction de PCR (**Tableau 5**) et la migration des produits de PCR sont identiques à celles décrites dans la Partie II du Projet I. Lors de la révélation du gel sous ultra-violets, une bande de 311 pb est obtenue avec la PCR-WT pour tous les animaux. A l'inverse, avec la PCR-DUP, une bande de 351 pb est obtenue uniquement pour les animaux porteurs de la duplication de la région Rno20.

## 2.2- Méthode de génotypage par ddPCR

Le protocole suivi est identique à celui décrit précédemment (Partie I, Point 1.1.1). Pour identifier la duplication de la région Rno20, le gène ciblé est *Abcg1* présent sur le Rno20, le gène *Glo1* (*Glyoxalase I*) est, quant à lui, utilisé comme référence (**Tableau 11**).

		Nom	Séquence
Gène cible <i>Abcg1</i>	Amorces	Rr5758_5'_rAbcg1 Forward	5'- GGC ATG TGT GAC TCT GAC TAT AA -3'
		Rr5758_5'_rAbcg1 Reverse	5'- GGC CTC TCC AAA CCT TCT TTA -3'
	Sonde	Rr5758_5'_rAbcg1	5'- AGA CGT GAA CCC GTT CCT CTG G -3' Fluorophore FAM
Gène de référence <i>Glo1</i>	Amorces	Rn_Chro20_rGlo1 Forward	5'- AAG GAC AAG ACG GAG AGG A -3'
		Rn_Chro20_rGlo1 Reverse	5'- GGA CTG GTG AGC AGA GAA TAA A -3'
	Sonde	Rn_Chro20_rGlo1	5'- TGT TTC CAT CTC TTT CCG CAG CCT -3' Fluorophore HEX

**Tableau 11: Séquences des amorces et des sondes pour le génotypage par ddPCR de la duplication de la région Rno20**

Le gène *Abcg1* est utilisé comme gène cible, il est inclus dans la région dupliquée et est donc présent en trois copies. Le gène *Glo1* est utilisé comme gène de référence.

## 3- Génotypage de l'APP humanisée

Le génotypage de l'APP<sup>H</sup> peut être réalisé par PCR classique. Cela est valable pour les animaux issus des croisements permettant de produire des rats APP<sup>H</sup>, soit non porteurs d'une duplication, ainsi que pour les animaux issus des différentes étapes de production du modèle Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>.

Pour cette PCR, l'extraction d'ADN peut se faire soit en utilisant la technique décrite dans le Projet I, Partie II, point 1, soit en utilisant la technique décrite dans le Projet II, Partie II, point 2.1.1. Concernant la PCR en elle-même, les conditions sont identiques à celles décrites dans le Projet I, Partie II, point 2. Les séquences des amorces utilisées sont les suivantes : 9384-forward 5'- CAG TCT GTT TGC TTG CGA GGT AG -3' et 9385-reverse 5'- CAG GAC GAG TCA AGA GGT ACC ATA C -3'.

Une fois les produits de PCR obtenus, une digestion enzymatique est réalisée afin de pouvoir différencier l'APP<sup>wt</sup> de l'APP<sup>H</sup>, dont la taille des séquences est identique. Pour chaque échantillon, 10µL de produit de PCR sont prélevés, auxquels sont ajoutés : 0,25µL de l'enzyme MspI ; 2,5µL du tampon (CutSmart, #B7204S, BioLabs, New England) et 12,25µL d'eau. Les échantillons sont alors incubés dans une étuve à 37°C sur la nuit. Ils sont ensuite migrés sur un gel d'agarose 2%. Lors de la révélation du gel sous ultraviolets, une bande de 361 pb est obtenue pour l'allèle APP<sup>wt</sup> et 2 bandes, d'une taille de 246 et 115 pb, sont obtenues pour l'allèle APP<sup>H</sup>. Pour les rats hétérozygotes, ces 3 bandes sont visibles.

#### 4- Génotypage des modèles de rats SD avec l'APP<sup>H</sup>

Les modèles de rats SD avec l'APP<sup>H</sup> sont génotypés par ddPCR. Tout d'abord, concernant le génotypage des animaux aux différentes étapes de croisements pour la production des rats Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup>, on utilise le même protocole que pour le modèle Dup(Rno11) sans l'APP<sup>H</sup> (décrit au point 1). Ainsi, les gènes-cibles et de référence sont les mêmes. Cependant, une seconde sonde est utilisée en plus de la sonde Rr5480\_rAPP\_WT dirigée contre l'APP<sup>wt</sup>. La 2<sup>ème</sup> sonde, appelée Rr5480\_rApp\_PM, est dirigée contre l'APP<sup>H</sup> et est couplé à un fluorophore FAM (5- TCA GGC TAC GAA GTC CAC CAT CAA -3'). Ainsi, la combinaison de ces 2 sondes permet de déterminer le nombre de copies d'APP<sup>wt</sup> *versus* APP<sup>H</sup> et donc, par conséquent, la présence ou l'absence de la duplication du Rno11. Cette ddPCR est également utilisée pour le génotypage des animaux issus des croisements Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> par Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>. Pour ces croisements, il est également nécessaire de réaliser la ddPCR pour la duplication de la région Rno20 décrite au point 2.2. La combinaison de ces 2 ddPCR permet de déterminer la présence de la duplication de la région Rno11 et/ou de la région Rno20, ainsi que le nombre de copies d'APP<sup>H</sup>.

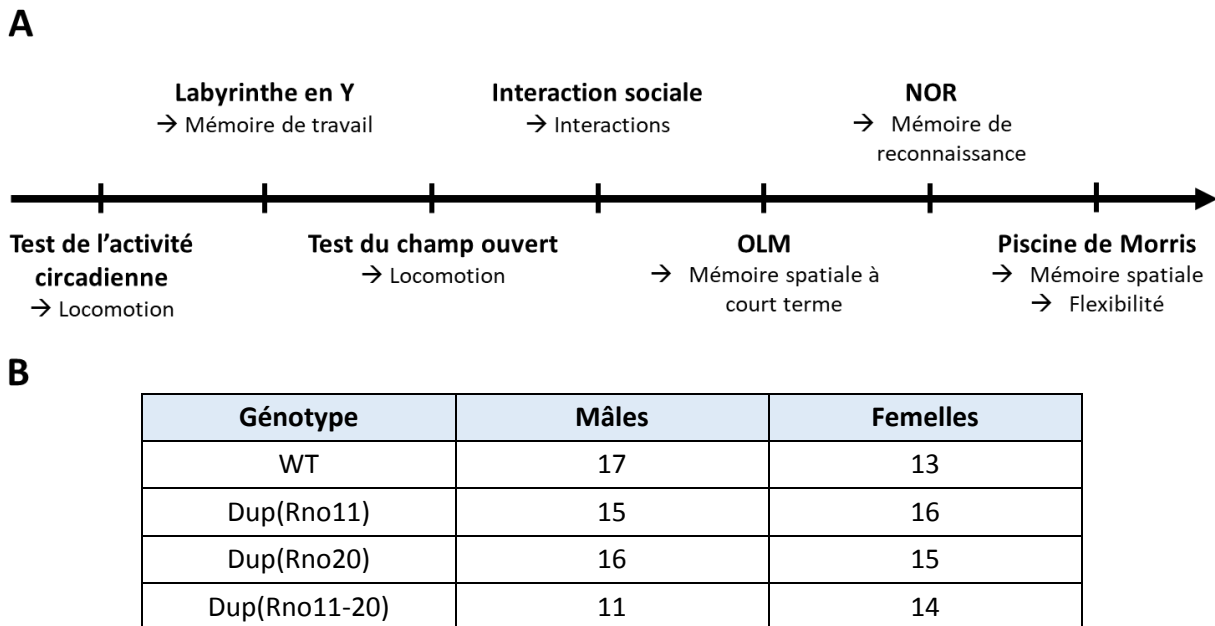
### III- Tests de comportement

#### 1- Effectifs

Dans le cadre de ce projet, les tests comportementaux ont été réalisés à l'Institut Clinique de la Souris. La caractérisation des modèles de rats SD, avec et sans l'APP<sup>H</sup>, a été réalisée séparément.

Dans un premier temps, une batterie de tests comportementaux a été réalisée chez les modèles rats non humanisés (**Figure 32-A**). L'étude a été réalisée chez des mâles et des femelles, les animaux étant répartis sur 4 cohortes. Chaque cohorte comporte des animaux de 4 génotypes différents : rats contrôles (WT), Dup(Rno11), Dup(Rno20) et Dup(Rno11-20). Les effectifs finaux pour chaque génotype sont indiqués dans

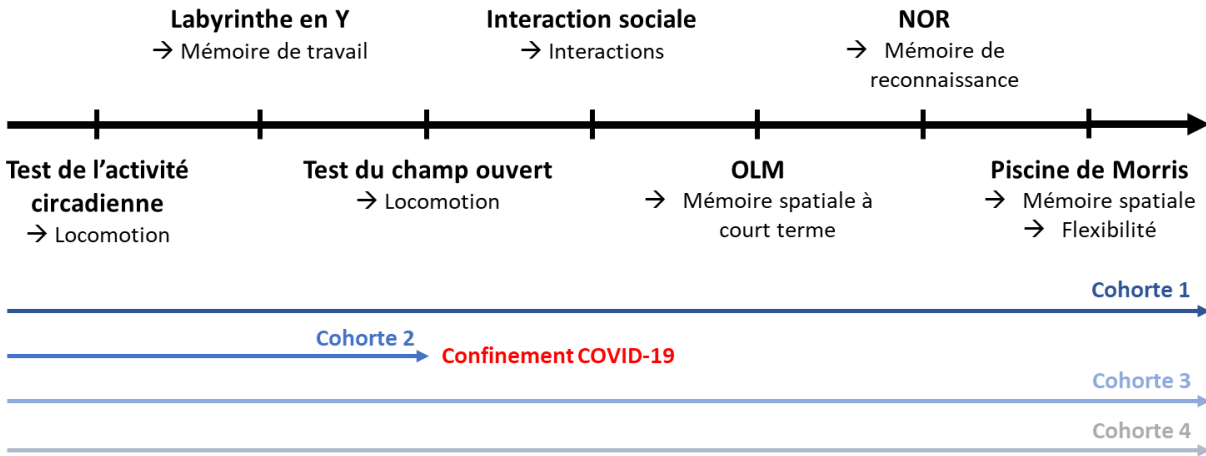
la **Figure 32-B**. Les animaux sont passés dans les tests à partir de l'âge de 6-7 semaines. La caractérisation de ces cohortes a été réalisée avec l'aide du Dr. Damien Maréchal (Cohorte 1) et de Guillaume Pani (Cohorte 2).



**Figure 32 : Caractérisation comportementale des modèles de rats SD sans l'APP<sup>H</sup> à l'âge de 6-7 semaines**

(A) Décours temporel des tests comportementaux réalisés. (B) Effectifs finaux par sexe et par génotype.

Cette même batterie de tests a ensuite été reproduite chez les modèles de rats humanisés. Comme précédemment, l'étude a été réalisée chez des mâles et des femelles, avec des animaux de 4 génotypes différents : des rats homozygotes pour l'APP<sup>H</sup> (APP<sup>H2</sup>), des Dup(Rno11) avec 3 copies d'APP<sup>H</sup> (Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup>), des Dup(Rno20) avec 2 copies d'APP<sup>H</sup> (Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>) et des Dup(Rno11-20) avec 3 copies d'APP<sup>H</sup> (Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>). Ces animaux sont répartis sur 4 cohortes. Ils ont ainsi été passés une première fois dans les tests à partir de l'âge de 6-7 semaines, puis repassés dans ces mêmes tests à l'âge de 12 mois environ. Du fait du premier confinement lié à la situation COVID-19, la cohorte 2 n'a pas pu être passée dans l'ensemble des tests comportementaux à l'âge de 6-7 semaines (**Figure 33-A**). Les effectifs d'animaux lors du premier passage en test (6-7 semaines) est indiqué dans la **Figure 33-B**. Par ailleurs, l'étude à l'âge de 12 mois est toujours en cours, les cohortes 3 et 4 sont actuellement en vieillissement. Au cours de la période de vieillissement, des animaux ont dû être mis à mort pour des raisons de santé, ainsi les effectifs au stade de 12 mois diffèrent de ceux de l'étude à 6-7 semaines. L'étude de vieillissement étant en cours, elle ne sera pas présentée dans ce manuscrit.

**A****B**

Génotype	Mâles	Femelles
APP <sup>H2</sup>	19	20
Dup(Rno20)-APP <sup>H2</sup>	14	12
Dup(Rno11)-APP <sup>H3</sup>	23	14
Dup(Rno11-20)-APP <sup>H3</sup>	12	18

**Figure 33: Caractérisation comportementale des modèles de rats SD avec l'APP<sup>H</sup> à l'âge de 6-7 semaines**

**(A)** Déroulement temporel des tests comportementaux réalisés. Pour chaque cohorte, la flèche indique les tests comportementaux dans lesquels les animaux ont été testés. Du fait de la situation COVID-19, la cohorte 2 n'a pas pu être passée dans l'ensemble des tests comportementaux. **(B)** Effectifs finaux par sexe et par génotype.

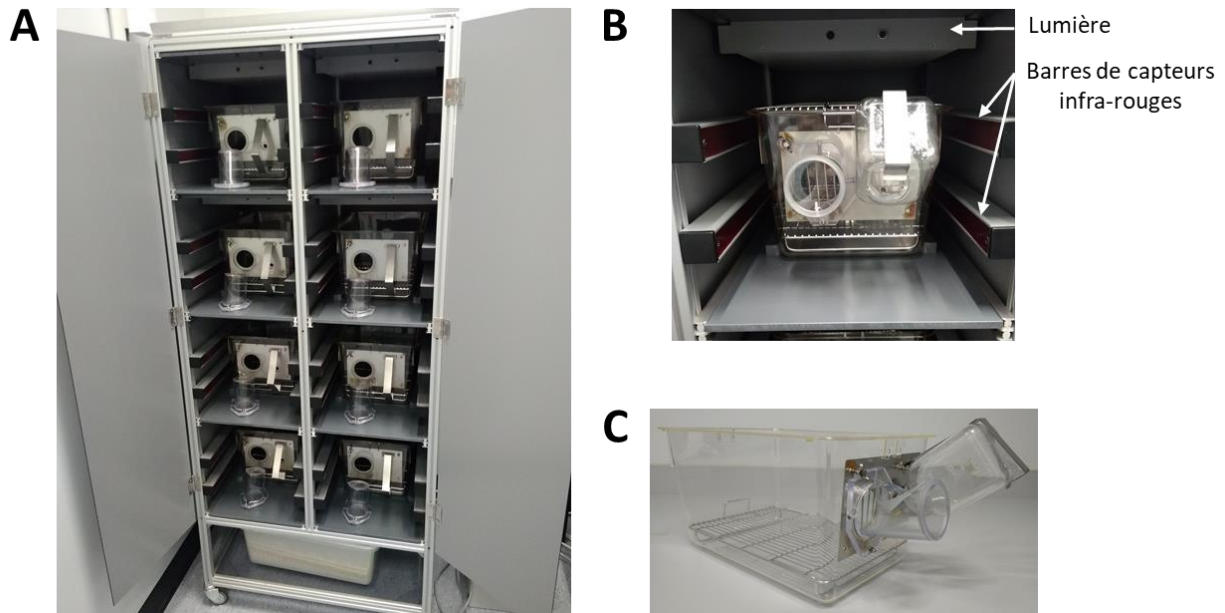
Certains des tests réalisés dans ce projet sont les mêmes que ceux utilisés dans le Projet I, seuls le protocole et le dispositif changent. Ainsi, pour ces derniers, le principe du test ne sera pas rappelé.

## 2- Test de l'activité circadienne

Le dispositif est constitué d'une armoire comportant 8 emplacements pouvant chacun accueillir une cage Tecniplast<sup>TM</sup> transparente (dimensions : 33 x 20 x 19 cm) (**Figure 34-A**). Ces dernières sont différentes des cages d'hébergement et se composent d'un sol en grille (**Figure 34-B**). Chaque emplacement possède 4 barres de capteurs infra-rouges. Les deux premières, situées à une hauteur de 6 cm, permettent d'évaluer l'activité locomotrice horizontale des rats. Les deux autres permettent de compter les redressements, elles se situent ainsi à une hauteur de 15 cm. Le dispositif est relié à un ordinateur qui permet d'extraire



différentes variables à l'aide du logiciel POLY\_PLUS (Imetronic®). Le test se déroule sur une période de 46h. Il débute ainsi à 11h le jour 1 et se termine à 9h le jour 3. L'activité est alors évaluée par intervalles de 1h, les 3 premières heures du test correspondant à la phase dite d'habituation.



**Figure 34:** Dispositif du test de l'activité circadienne

**(A)** Armoire d'activité circadienne comportant 8 emplacements. **(B)** Vue rapproché de l'emplacement d'une cage. Il comporte 4 barres de capteurs infra-rouges. Les deux premières situées vers le bas de la cage permettent d'évaluer l'activité horizontale des animaux. Les deux autres sont situées au niveau du plafond de la cage et permettent de compter les redressements. L'éclairage est assuré par une lumière présente au plafond. **(C)** Cage utilisée pour l'activité circadienne. Chaque cage comporte un sol grillagé, ainsi qu'une mangeoire et un biberon amovibles.

### 3- Labyrinthe en Y

Le test du labyrinthe en Y permet d'évaluer la mémoire de travail en étudiant l'alternance spontanée (Kraeuter et Guest 2019). Il se base ainsi sur le comportement naturel du rat à aller explorer un bras non visité au préalable. La capacité des rats à alterner les bras visités est évaluée.

Le dispositif, situé à une hauteur de 90 cm au-dessus du sol, se compose de 3 bras de taille identique (90 x 26 x 41,5 cm) qui se rejoignent au niveau d'une plateforme centrale (**Figure 35**). La paroi des bras est recouverte d'un papier blanc opaque présentant des motifs différents pour chacun d'entre eux (nuages, triangles, rayures en diagonal). L'éclairage de la pièce est réglé de telle sorte à avoir une intensité lumineuse de 15 lux au centre du dispositif. Une caméra placée au-dessus du dispositif et reliée à un ordinateur permet de suivre le comportement du rat en temps réel grâce au logiciel Pylon Viewer.



**Figure 35:** Dispositif du labyrinthe en Y

Chaque rat réalise un unique essai d'une durée de 8 min. Il est déposé à l'extrémité d'un bras, la tête dirigée vers la paroi. Le point de départ est le même pour tous les animaux. Le dispositif est nettoyé à l'éthanol 50% entre chaque rat afin de réduire au maximum les informations olfactives. La séquence des bras visités est relevée afin de déterminer le pourcentage d'alternance spontanée. Ce dernier permet d'évaluer la mémoire de travail des animaux. Il est calculé selon la formule suivante :

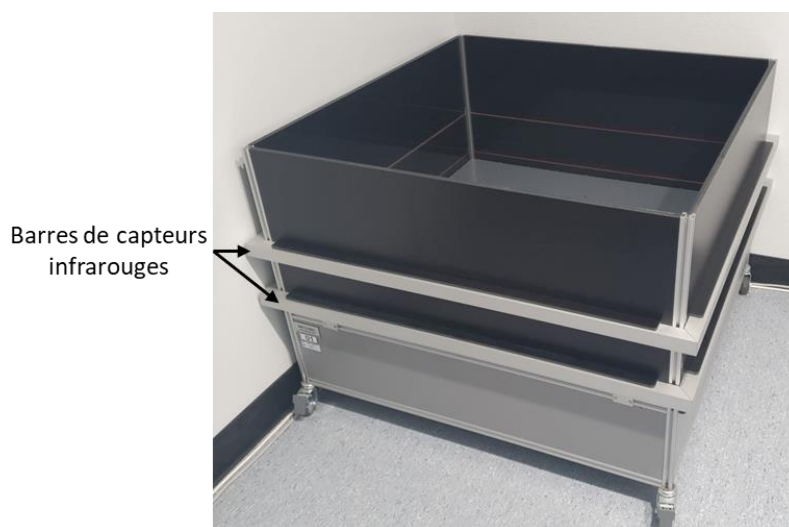
$$\% \text{ alternances} = \frac{n}{N-2} \times 100$$

Ou **n** correspond au nombre total d'alternances, soit les visites successives de 3 bras différents, et **N** représente le nombre total de bras visités.

La latence de sortie du 1<sup>er</sup> bras, qui est un indicateur d'anxiété, est également mesurée.

#### 4- Champ ouvert

Le dispositif est un carré ouvert avec des parois noires opaques de dimensions 90 x 90 x 40 cm (**Figure 36**). Il est entouré de capteurs infra-rouges sur 2 niveaux. Ceux présents à une hauteur de 2 cm du fond de l'arène permettent d'évaluer l'activité locomotrice horizontale des animaux. Les capteurs situés à une hauteur de 15 cm permettent, quant à eux, de comptabiliser les redressements. L'éclairage de la pièce est réglé à l'aide d'un luxmètre de telle façon à avoir une intensité lumineuse d'environ 15 lux au centre du champ ouvert. Deux arènes sont présentes dans la pièce, elles permettent ainsi de faire passer 2 rats en simultanée. Ces arènes sont branchées en série et reliée à un ordinateur. Le logiciel POLY\_OPENFIELD permet de suivre les déplacements et les redressements de l'animal en temps réel et d'extraire différentes variables.



**Figure 36: Dispositif du champ ouvert**

L'arène est entourée de capteurs infra-rouges sur deux niveaux. Les capteurs présents dans la partie base de l'arène permettent d'évaluer l'activité horizontale des animaux. Les capteurs situés à une hauteur de 15 cm permettent de compter les redressements.

Les rats réalisent un unique essai d'une durée de 30 min. Ils sont déposés dans l'arène au centre de l'une des parois, la tête dirigée vers cette dernière. Le point de lâcher est identique pour tous les rats. L'arène est nettoyée à l'éthanol 50% entre chaque rat afin de réduire les odeurs.

Les paramètres mesurés sont les mêmes que ceux étudiés dans la Projet I, soit la distance parcourue, le temps passé à la périphérie *versus* le centre du dispositif et le nombre de redressements.

## 5- Interaction sociale

Ce test se base sur le fait que les rongeurs sont des animaux sociaux habitués à vivre en groupe. Le test d'interaction sociale permet de mettre en évidence de potentielles altérations de la sociabilité dans nos modèles de rats SD.

Ce test utilise le même dispositif que pour le champ ouvert. Il est réalisé 24h après le test du champ ouvert qui est donc considéré comme une phase d'habituation à l'arène. Les capteurs infrarouges ne sont pas utilisés. Une caméra, placée au-dessus du champ ouvert et reliée à un ordinateur, permet de suivre en temps réel le comportement des animaux. Le logiciel EthoVision XT (Version 11.5, Noldus) permet à l'expérimentateur de quantifier le nombre de fois où une interaction se produit ainsi que la durée de chacune d'elle. Les différentes interactions étudiées sont : les suivis, les reniflements tête/tête et tête/postérieur, les contacts, les approches, les bagarres, les comportements de répulsion et de fuite ainsi que les isolements.

Ainsi, deux rats sont placés dans l'arène. Ils sont de même génotype mais ne se connaissent pas. L'essai est d'une durée de 10 min, chaque rat n'étant utilisé qu'une seule fois. Entre chaque session, l'arène est nettoyée à l'éthanol 50%.

## 6- Test de reconnaissance du nouvel emplacement d'un objet

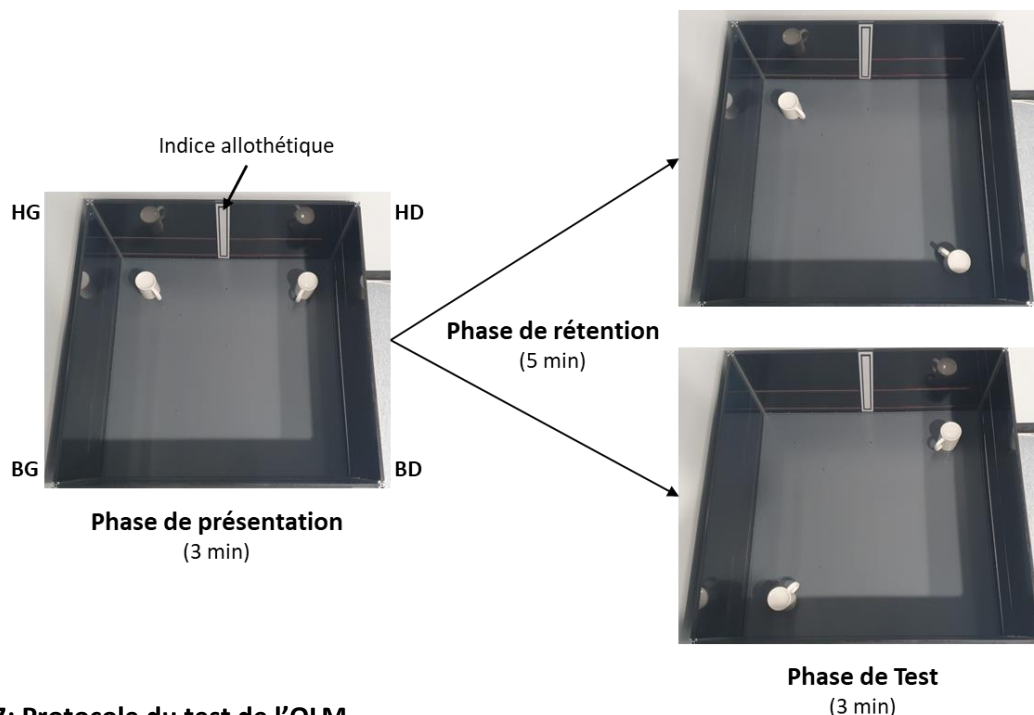
Le test de reconnaissance du nouvel emplacement d'un objet ou *Object Location Memory* (OLM) permet d'étudier la mémoire spatiale à court terme. Il se base sur la tendance naturelle des animaux à explorer plus longtemps un objet déplacé qu'un objet non déplacé, sachant que les deux leur sont familiers (Abdelkader Ennaceur et Meliani 1992; A. Ennaceur, Neave, et Aggleton 1997).

Ce test est également réalisé dans le champ ouvert dans lequel un indice allothétique a été placé au niveau d'une paroi (forme géométrique de couleur blanche). Le comportement des rats est alors suivi grâce à la caméra positionnée au-dessus de l'arène.

Ce test se déroule sur 2 jours, avec une **phase d'habituation** le premier jour. Le but est d'habituer les animaux à l'arène en présence de l'indice allothétique. Chaque rat effectue donc un unique essai d'une durée de 15 min. L'animal est déposé dans l'arène au centre de l'une des parois, la tête dirigée vers cette dernière. Le point de lâcher est le même pour tous les animaux.

Le deuxième jour se divise en plusieurs phases (**Figure 37**). Tout d'abord, la **phase de présentation** pour laquelle 2 objets identiques sont placés dans l'arène (Tasses blanche). Les objets utilisés sont les mêmes pour tous les rats et sont positionnés dans les angles haut-gauche et haut-droit de l'arène. L'animal est alors libre d'explorer pendant 3 min. Il est ensuite replacé dans sa cage d'hébergement pour une **phase de rétention** de 5 min. L'un des objets est alors déplacé. L'objet déplacé est randomisé entre les animaux de telle sorte que ce ne soit pas toujours le même objet qui soit déplacé. Pendant cette phase de rétention, ni l'arène, ni les objets ne sont nettoyés à l'éthanol 50%. Le rat est alors replacé dans l'arène pour la **phase de test** d'une durée de 3 min. Pour les phases de présentation et de test, l'animal est déposé dans l'arène dans l'angle opposé au côté où l'objet sera déplacé. Ainsi, si l'objet en Haut à Gauche est l'objet qui sera déplacé, alors l'animal est déposé dans l'angle en Bas à Droite. A l'inverse, si c'est l'objet en Haut à Droite qui est déplacé, l'animal est déposé dans l'angle en Bas à Gauche. Une fois la phase de test terminée, l'arène et les objets sont nettoyés à l'éthanol 50% avant de faire passer le rat suivant.

Pendant les phases de présentation et de test, le temps passé à explorer les objets est mesuré à l'aide du logiciel EthoVision XT (Version 11.5, Noldus). L'animal est considéré comme en train d'explorer l'objet lorsqu'il a le museau dirigé vers l'objet à une distance inférieure ou égale à 2 cm.



**Figure 37: Protocole du test de l'OLM**

Pour le test de l'OLM, un indice allothétique est placé au niveau de l'une des parois du champ ouvert. Lors de la phase de présentation, le rat est mis en présence de 2 tasses identiques placées dans les coins Haut-Gauche (HG) et Haut-Droit (HD). Après une phase de rétention de 5 min, la phase de test est réalisée. L'un des objets est alors déplacé, soit l'objet droit, soit l'objet gauche de façon aléatoire. BG : Bas-Gauche, BD : Bas-Droite.

## 7- Test de reconnaissance du nouvel objet

Le test de reconnaissance du nouvel objet ou *Novel Object Recognition* (NOR) permet d'évaluer la mémoire de reconnaissance. Il se base sur le comportement naturel des rongeurs à passer plus de temps à explorer un objet qui est nouveau comparativement à un objet familier (A. Ennaceur et Delacour 1988).

Ce test est réalisé dans le champ ouvert et se déroule sur 3 jours. Le premier jour correspond à la **phase d'habituation** à l'arène. L'indice allothétique utilisé pour le test de l'OLM est alors retiré. Chaque rat effectue un unique essai d'une durée de 15 min pendant lequel il est libre d'explorer l'arène. Le point de lâcher correspond au centre de l'une des parois, l'animal est déposé la tête dirigée vers cette dernière. La présence de 2 arènes permet de faire passer 2 rats simultanément. L'activité horizontale et verticale de l'animal sont alors mesurées à l'aide des capteurs infrarouges. Le dispositif est relié à un ordinateur qui permet d'extraire la distance parcourue par l'animal à l'aide du logiciel POLY\_OPENFIELD.

Le jour suivant correspond à la **phase de présentation**. Trois objets sont alors placés dans l'arène, ils sont choisis parmi les objets suivant : une flasque de culture cellulaire de 75 mL opacifiée par de la peinture noire, un bidon bleu, un biberon transparent et une seringue de 50 mL (**Figure 38-A**). Ils sont placés dans les angles haut-gauche, haut-droit et bas-gauche de l'arène (**Figure 38-B**). La combinaison d'objets présentée, ainsi que l'ordre dans lequel ils sont placés dans l'arène, varient d'un animal à l'autre. Le rat est alors déposé dans l'arène au niveau de l'angle ne contenant pas d'objet (Bas-droit), la tête dirigée vers la paroi. Il est alors libre d'explorer les objets pendant une période de 3 min.

La **phase de test** est réalisée 24h après la présentation (Jour 3). L'un des 3 objets est alors remplacé par un objet qui n'a jamais été rencontré par l'animal. La combinaison d'objets utilisée lors de la phase de présentation variant d'un animal à l'autre, par conséquent, le nouvel objet n'est pas toujours le même. Par ailleurs, la position de ce dernier change également d'un animal à l'autre. Comme précédemment, le rat est déposé dans l'angle bas-droit de l'arène, la tête dirigée vers la paroi. Il est alors libre d'explorer les objets pendant 3 mins.

Pour les phases de présentation et de test, les rats sont passés un par un et leur comportement est suivi en temps réel grâce à la caméra positionnée au-dessus de l'arène. Le logiciel EthoVision XT (Version 11.5, Noldus) permet à l'expérimentateur de mesurer le temps passé à explorer chacun des objets. L'animal est considéré comme étant en train d'explorer un objet lorsque son museau est dirigé vers ce dernier et à une distance inférieure ou égale à 2 cm. Le temps passé à explorer le nouvel objet et les objets familier sont alors comparés. Pour chaque phase, l'arène et les objets sont nettoyés à l'éthanol 50% entre le passage de chaque rat.

**A****B**

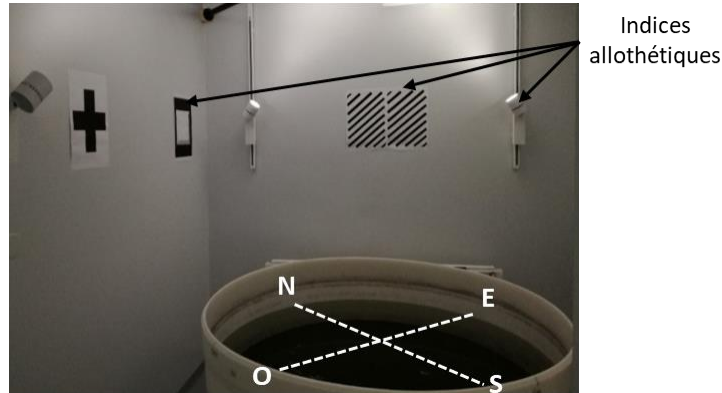
**Figure 38: Test de reconnaissance du nouvel objet**

(A) Objets utilisés pour réaliser le test du NOR. Dans l'ordre de la photographie : la flasque de culture cellulaire opacifiée par de la peinture noire, un bidon bleu, un biberon transparent et une seringue de 50 mL. (B) Exemple d'une combinaison de 3 objets. Ces derniers sont placés dans le champ ouvert dans les coins HG, HD et BG. Le coin BD est utilisé comme point de lâcher des rats. Lors de la phase de test, l'un des 3 objets est remplacé par l'objet qui n'a jamais été rencontré par l'animal.

## 8- Piscine de Morris

### 8.1- Dispositif

La piscine de Morris est un dispositif circulaire en PVC blanc de 160 cm de diamètre et d'une hauteur de 80 cm (**Figure 39**). Comme décrit précédemment, elle est divisée en 4 quadrants virtuels de taille égale. La plateforme, positionnée dans l'un de ses quadrants, est constituée d'une tige métallique à l'extrémité de laquelle est fixé un disque en plastique dur de couleur noir et de 10 cm de diamètre. La piscine est remplie d'une eau opacifiée à l'aide de peinture à l'eau de couleur noire (Gouache Redimix Noire #188039, Le Franc Bourgeois). La température de l'eau est maintenue à  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ . L'éclairage de la pièce est réglé de sorte à obtenir une intensité lumineuse de 70 lux au niveau de l'emplacement de la plateforme. Différents indices allothétiques sont également présents dans la pièce : des formes géométriques collées au mur, les appliques lumineuses au mur, un rideau... Une caméra, placée au-dessus du dispositif et reliée à un ordinateur, permet de suivre le comportement de l'animal en temps réel et de générer une série de variable à l'aide du logiciel EthoVision XT (Version 11.5, Noldus).

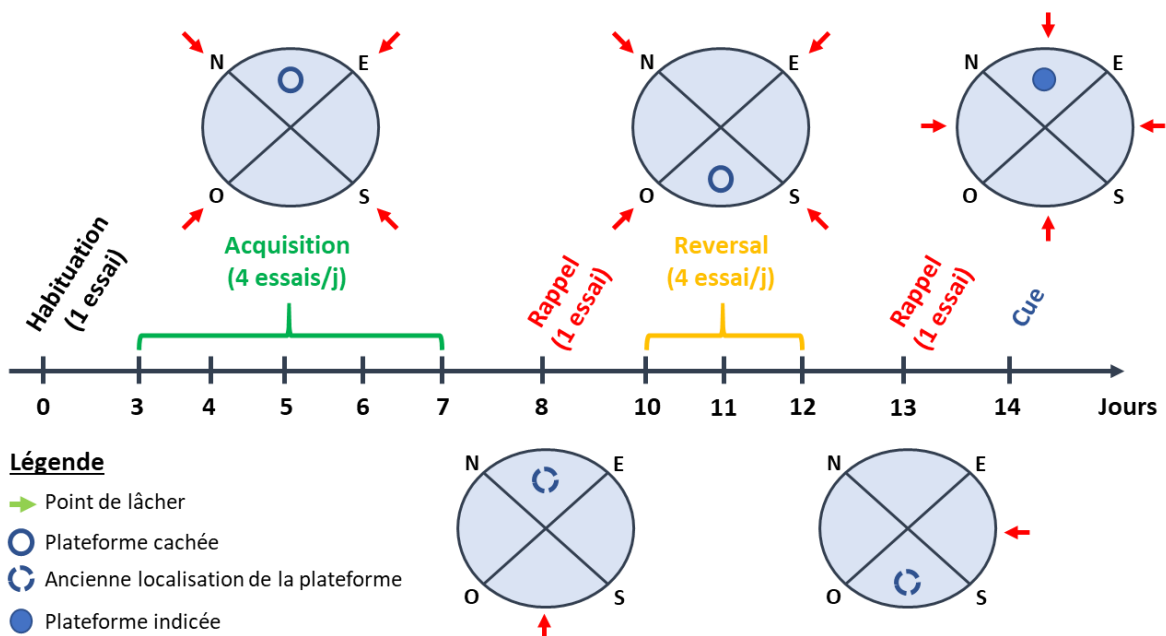


**Figure 39 : Dispositif de la piscine de Morris**

La piscine est divisée en 4 quadrants virtuels, dont l'un d'entre eux accueille une plateforme. Les points Nord (N), Est (E), Sud (S) et Ouest (O) correspondent aux points de lâcher lors de la phase d'acquisition.

### 8.2- Protocole

Le protocole utilisé dans le cadre de cette étude se divise en 6 phases (**Figure 40**). Pour chacune d'elle, les rats sont répartis en groupe de maximum 6 et minimum 4 animaux. La composition de ces groupes reste la même jusqu'à la fin du test. Les rats sont amenés dans l'antichambre de la pièce de test et placés dans des cages jetables individuelles en plastique (Innovive) comportant un morceau d'essuie-tout.



**Figure 40: Protocole de piscine de Morris réalisé chez les modèles de rat SD avec ou sans l'APP<sup>H</sup>**

Pour chaque phase, un schéma modélisant la piscine indique la position de la plateforme et les points de lâcher utilisés. L'habituation est, quant à elle, réalisée en l'absence de plateforme.



Le premier jour constitue la **phase d'habituat**ion des animaux au dispositif et à l'eau fraîche. Un rideau est placé autour de la piscine afin d'empêcher l'accès aux indices allothétiques présents dans la pièce. Chaque rat effectue un unique essai d'une durée de 1 min, en l'absence de plateforme. Ils sont lâchés au point S, la tête dirigée vers la paroi.

Au troisième jour après l'habituat

ion, une **phase d'acquisition** est réalisée, d'une durée de 5 jours. Le rideau est retiré afin de permettre l'accès aux indices allothétiques. La plateforme, placée au centre du quadrant NE, est immergée 3 cm sous la surface de l'eau. L'immersion de la plateforme combinée à l'opacification de l'eau par de la peinture noire permet de la rendre invisible pour les animaux. Chaque jour, 4 essais sont réalisés d'une durée maximale de 1 min. Les animaux étant répartis par groupe, tous les animaux du groupe réalisent le premier essai avant d'effectuer le second et ainsi de suite. Les rats sont lâchés selon une séquence aléatoire aux points N, S, E et O. Cette séquence est différente d'un jour à l'autre, et également entre les rats pour un jour donné. L'essai se termine lorsque le rat est parvenu sur la plateforme. Si au bout de 1 min, la plateforme n'a pas été trouvée, l'animal est guidé jusqu'à cette dernière par l'expérimentateur. Une fois sur la plateforme, il y est laissé pendant 10s avant d'être replacé dans sa cage individuelle. Le rat suivant effectue alors son essai.

Un **premier test de rappel** est réalisé 24h après le dernier jour d'acquisition. La plateforme est alors retirée et les rats effectuent un unique essai d'une durée de 1 min. Ils sont lâchés dans le quadrant SO, la tête toujours dirigée vers la paroi. Le temps passé dans le quadrant-cible (celui où se trouvait la plateforme pendant l'acquisition, QC) est alors évalué.

Par la suite, une **phase d'inversion de consigne (le reversal)** est réalisée 48h après le test de rappel. Le principe est le même que pour la phase d'acquisition, cependant la localisation de la plateforme est modifiée. Cela permet d'évaluer la capacité des rats à apprendre une nouvelle position de la plateforme et ainsi évaluer leur degré de flexibilité comportementale. La plateforme, immergée 3 cm sous la surface de l'eau, est désormais localisée au centre du quadrant SO. Cette phase de reversal est cependant plus courte, se déroulant sur 3 jours uniquement. Les rats effectuent 4 essais d'une durée maximale de 1 min. Les points de lâcher sont les mêmes que pour la phase d'acquisition (N, S, E et O).

Un **second test de rappel** est réalisé 24h après le dernier jour de reversal, selon les mêmes modalités que celles décrites pour le premier test de rappel. Seul le point de lâcher diffère (quadrant SE).

Enfin, le dernier jour, soit 24h après le dernier test de rappel, un **test de plateforme indicée (cue)** est réalisé. Il permet de mettre en évidence de potentiels problèmes visuels ou motivationnels. Bien que la

plateforme reste immergée sous la surface de l'eau, elle est indiquée en y fixant une tige métallique comportant à son extrémité une boule en polystyrène noir et blanc. Un rideau est placé autour de la piscine afin de neutraliser les indices allothétiques. Chaque rat effectue 4 essais, d'une durée maximale de 1 min. La séquence des points de lâcher, identique pour tous les rats, est la suivante : NE – SO – NO – SE. Comme pour les phases d'acquisition et de reversal, l'essai se termine lorsque l'animal monte sur la plateforme. Si la plateforme n'est pas trouvée au bout de 1 min, l'animal y est guidé par l'expérimentateur.

Pour les phases d'acquisition, de reversal et de plateforme indiquée, la distance et la latence pour atteindre la plateforme, ainsi que la vitesse de nage sont mesurées pour chaque essai.

### **9- Mises à mort des animaux**

Concernant les cohortes de rats SD non humanisés (WT, Dup(Rno11), Dup(Rno20) et Dup(Rno11-20)), les animaux ont été mis à mort par utilisation d'un gradient progressif de CO<sub>2</sub>. Deux démarches sont alors possibles : soit la tête de l'animal est prélevée pour des analyses crânio-faciales, soit le cerveau est prélevé et disséqué. Dans le premier cas, les têtes sont placées dans de l'éthanol 70% afin de les conserver jusqu'à ce qu'elles soient scannées afin de permettre une reconstruction en 3 dimensions du crâne. Pour ce qui est des dissections, les structures prélevées sont l'hippocampe et le cortex préfrontal.

Pour les cohortes de rats SD avec l'APP<sup>H</sup> (APP<sup>H2</sup>, Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>, Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup>, Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>), seules les 2 premières cohortes ont complété les tests comportementaux aux 2 âges. Ces animaux ont été prélevés pour des analyses histologiques, des perfusions intracardiaques de PFA 4% ont donc été réalisées. Les rats sont anesthésiés par injection intrapéritonéale d'une solution de Xylazine (23 mg/kg, Rompun® à 20mg/mL, Bayer) – Kétamine (184 mg/kg, Kétamine 1000 à 100mg/mL, Virbac) – Buprénorphine (0,1 mg/kg, Vetergésic® à 0,3mg/mL, Ceva) à raison de 332 µL/100g. Après perte complète des réflexes de retrait de la patte et du réflexe palpébral, la procédure de perfusion peut débuter. Cette dernière est similaire à celle décrite dans la Projet I, Partie II, Point 7. Ainsi, seules les étapes modifiées seront décrites ici. La solution de rinçage utilisée est du tampon phosphate salin 1X (PBS 1X) auquel est ajouté de l'héparine (10mg pour 100 mL de PBS) afin d'éviter la coagulation. Cette solution est perfusée pendant 5 min à raison de 10mL/min. Les solutions perfusées sont maintenues à température ambiante pendant toute la procédure. Une fois la perfusion terminée, le cerveau est prélevé et placé dans un tube Falcon contenant du PFA 4% pour une phase de post-fixation sur la nuit, à température ambiante. Le cerveau est ensuite rincé avec du PBS 1x (2 x 5 min) et placé dans de l'éthanol 70% pour conservation jusqu'à inclusion en paraffine.

## 10- Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Dans un premier temps, la normalité des données est vérifiée par les tests d'Agostino - Pearson et de Shapiro - Wilk. Si les données suivent une loi normale, des ANOVA à 1 (Génotype) ou 2 facteurs (Génotype x Jour, Période, Zone) sont réalisées. Dans le cas contraire, un test non-paramétrique est réalisé (Tests de Mann-Whitney et de Kruskal-Wallis). Lorsqu'un effet significatif d'un facteur ou d'une interaction de facteurs est mis en évidence, un test « post-hoc » est réalisé (Tests de Tukey ou de Sidak). Pour plusieurs tests comportementaux, le one-sample Student *t*-Test a été utilisé afin de comparer une moyenne à une valeur standard correspondant au hasard (labyrinthe en Y, OLM, NOR et piscine de Morris). Le seuil de significativité est  $p < 0,05$ .

## IV- Transcriptomique

Les analyses transcriptomiques ont été réalisées pour les modèles de rats SD avec et sans l'APP<sup>H</sup> en collaboration avec les Dr. Damien Maréchal, Arnaud Duchon et Maria del Mar Muniz Moreno et la plateforme GenomEast de l'IGBMC.

L'hippocampe gauche de rats âgés de 13-16 semaines, pour les modèles sans l'APP<sup>H</sup>, et de 57-65 semaines, pour les modèles avec l'APP<sup>H</sup>, est disséqué et congelé dans l'azote liquide. Les effectifs pour chaque génotype sont les suivants, pour les modèles sans l'APP<sup>H</sup>,  $n=10$  pour les WT,  $n=5$  pour les Dup(Rno20),  $n=10$  pour les Dup(Rno11) et  $n=5$  pour les Dup(Rno11-20) ; pour les modèles avec l'APP<sup>H</sup>,  $n=6$  pour les APP<sup>H2</sup>,  $n=6$  pour les Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>,  $n=5$  pour les Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et  $n=7$  pour les Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>. Ces hippocampes sont ensuite conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'extraction d'ARN. Cette dernière est réalisée à l'aide du kit RNeasy® Plus Mini (Qiagen, Venlo, Netherlands) selon les instructions du fournisseur. La qualité des échantillons est ensuite vérifiée avec un Bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, Californie, Etats-Unis).

La préparation des librairies a été réalisée par la plateforme GenomEast, membre du consortium « France Génomique » (ANR-10-INBS-0009) en utilisant le guide de préparation des échantillons TruSeq Stranded Total RNA – PN 15031048. Les librairies d'ARN-Seq (ARN séquencé) total sont générées à partir d'un minimum de 150-300ng de l'ARN total par utilisation du kit de préparation des échantillons TruSeq Stranded Total RNA LT avec Ribo-Zero Gold (Illumina, San Diego, CA), en suivant les instructions du fabricant. La molécule extraite à partir du matériel biologique est de l'ARN polyA. Le séquençage de

l'expression du génome entier est alors réalisé par la plateforme GenomEast grâce à l'Illumina Hiseq 4000 permettant la lecture d'ARN-Seq à une seule extrémité d'une longueur de 50 pb. Les lectures brutes des séquences sont alignées par Hisat2 sur la version du génome du rat Rnor6.v104. 32623 gènes identifiés à partir d'ENSEMBL ont été quantifiés en s'alignant au Rnor6.v104. Le système HTSeq-count est ensuite utilisé pour générer des comptages bruts. Les analyses sous-jacentes ont été effectuées à l'aide de scripts utilisant le langage bash créés par le Dr. Maria del Mar Muniz Moreno et de scripts R version 4.0.4 utilisant les paquets FCROS (Dembélé et Kastner 2014) et DESeq2 (Love, Huber, et Anders 2014) pour identifier les gènes à expression différentielle (DEGs, pour *Differential Expressed Genes*).

L'analyse fonctionnelle différentielle a été effectuée en suivant la méthode GAGE (Luo et al. 2009) et en regroupant les voies de signalisation en 25 catégories fonctionnelles, on parle alors de meta-pathways. Afin, d'évaluer la connectivité des gènes, nous avons construit un réseau minimum d'interactions protéine-protéine (IPP) entièrement connecté (noté MinIPPNet). Ce réseau est basé sur des gènes connus pour être impliqués dans les voies synaptiques du fait de leurs associations à ces dernières via les bases de données GO (*Gene Ontology*, Ashburner et al. 2000) et KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, (Kanehisa et Goto 2000)). De plus, des informations de régulation ont été ajoutées afin de construire le RegPPINet final (Duchon et al. 2021). Par ailleurs, nous avons utilisé l'analyse de la centralité d'interdépendance pour identifier les « hubs » qui sont clés pour maintenir le flux de communication du réseau.



---

# RESULTATS

---



## Projet I : Caractérisation d'un nouveau modèle de rat APP-KO

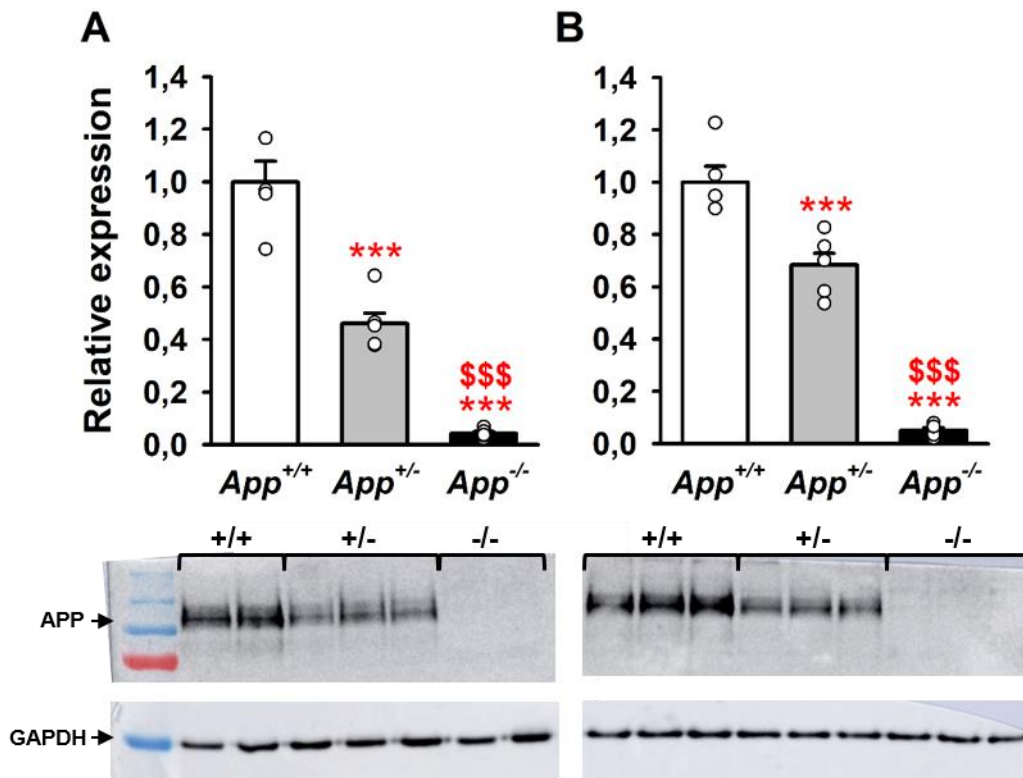
L'objectif de ce premier projet était de caractériser un tout nouveau modèle de rat APP-KO. Cette caractérisation a été réalisée à différentes échelles. Tout d'abord, au niveau comportemental par la réalisation de différents tests permettant d'évaluer l'anxiété, la locomotion ou encore l'apprentissage et la mémoire spatiale. Ensuite, une étude morphométrique a été réalisée au niveau du cerveau afin d'étudier les changements que pourrait induire l'absence d'APP sur sa structure. Enfin, des analyses moléculaires ont été réalisées afin d'étudier l'expression de différentes protéines (protéines de la famille de l'APP, marqueurs cellulaires et synaptiques). L'idée était d'essayer de faire des liens entre les observations faites à l'échelle de l'individus et les potentielles altérations structurales et moléculaires.

### **I- Validation du modèle**

Le modèle APP-KO a été validé au niveau protéique par western blot. Pour cela, un anticorps dirigé contre la partie N-terminale de l'APP, correspondant au début de la protéine (acides aminés 66-81), a été utilisé. L'expression de l'APP a ainsi été étudiée dans l'hippocampe et le cortex préfrontal médian.

Dans l'**hippocampe (Figure 41-A)**, l'ANOVA à un facteur met en évidence un effet significatif du Génotype ( $F_{2,13}=87,51$  ;  $p<0,001$ ). Ainsi, l'expression de l'APP est réduite de moitié chez les rats  $App^{+/-}$  (-53,9% ;  $p<0,001$  vs.  $App^{+/+}$ ), alors qu'elle a quasiment disparu chez les  $App^{-/-}$  (-95,8% ;  $p<0,001$  vs.  $App^{+/+}$ ). De la même façon, dans le **cortex préfrontal médian (Figure 41-B)**, l'ANOVA à un facteur montre un effet significatif du Génotype ( $F_{2,13}=112,5$  ;  $p<0,001$ ). Une réduction de 31,6% de l'expression de l'APP est ainsi observée chez les rats  $App^{+/-}$  comparés aux  $App^{+/+}$  ( $p<0,001$ ). L'APP est quasiment absente chez les  $App^{-/-}$  avec une réduction de 94,9% du niveau d'expression par rapport aux  $App^{+/+}$  ( $p<0,001$ ).





**Figure 41: Validation du modèle de rat APP-KO au niveau protéique par western blot**

**(A)** Expression de la protéine APP dans l'hippocampe des rats. Le niveau d'expression de l'APP est réduit de 53,9% chez les rats *App*<sup>+/-</sup> et de 95,8% chez les *App*<sup>-/-</sup> par rapport aux rats *App*<sup>+/+</sup> (n=5 pour les *App*<sup>+/+</sup> et *App*<sup>-/-</sup>, n=6 pour les *App*<sup>+/-</sup>). **(B)** Expression de la protéine APP dans le cortex préfrontal médian des rats. Le niveau d'expression de l'APP est réduit de 31,6% chez les rats *App*<sup>+/-</sup> et de 94,9% chez les *App*<sup>-/-</sup> par rapport aux rats *App*<sup>+/+</sup> (n=5 pour les *App*<sup>+/+</sup> et *App*<sup>-/-</sup>, n=6 pour les *App*<sup>+/-</sup>). Pour les deux structures, l'expression de l'APP est normalisée par l'expression de la protéine de référence, la GAPDH. Les valeurs représentent des moyennes ± erreur type. Statistiques : \*\*\* *p*<0,001 vs. *App*<sup>+/+</sup> ; §§§ *p*<0,001 vs. *App*<sup>+/-</sup>.

## II- Tests comportementaux

Une batterie de tests comportementaux a été réalisée à 3 âges : 2 mois, 12 mois et 18 mois. Il s'agissait de 3 cohortes séparées constituées chacune de 3 génotypes : *App*<sup>+/+</sup>, *App*<sup>+/-</sup> et *App*<sup>-/-</sup>. Les effectifs pour chacune des cohortes sont les suivants :

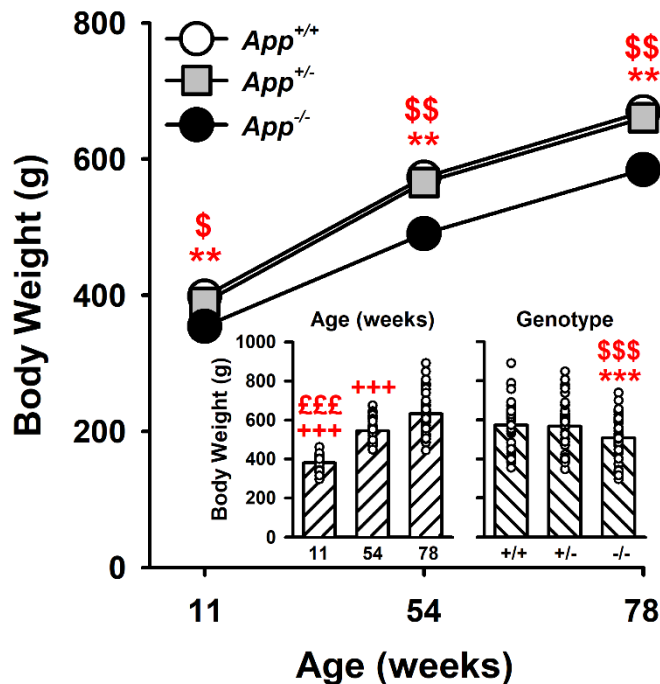
- Cohorte 2 mois : n=11 pour les *App*<sup>+/+</sup> ; n=11 pour les *App*<sup>+/-</sup> et n=12 pour les *App*<sup>-/-</sup>
- Cohorte 12 mois : n=13 pour les *App*<sup>+/+</sup> ; n=13 pour les *App*<sup>+/-</sup> et n=12 pour les *App*<sup>-/-</sup>
- Cohorte 18 mois : n=22 pour les *App*<sup>+/+</sup> ; n=23 pour les *App*<sup>+/-</sup> et n=27 pour les *App*<sup>-/-</sup>. A noter que ces animaux ont été répartis sur deux groupes.

Les mêmes tests comportementaux ont été réalisés pour chaque cohorte. Les résultats sont présentés dans l'ordre dans lesquels ces tests ont été réalisés.

Les résultats de l'étude comportementale, ainsi que toutes les analyses statistiques qui s'y rattachent sont présentés, dans les pages qui suivent, avec un très grand nombre de détails. Il est possible de se reporter directement à un tableau de synthèse (**Tableau 12**) qui se trouve en page 170.

### 1- Masse corporelle

Pour chaque cohorte, la masse corporelle a été suivie pendant toute la période de comportement à raison d'une pesée par semaine. Afin de simplifier la représentation des résultats, seuls les résultats de la première pesée des animaux sont présentés. Cette dernière a été réalisée à l'âge de 11 semaines pour la cohorte de 2 mois, 54 semaines pour la cohorte de 12 mois et à 78 semaines pour la cohorte de 18 mois (**Figure 42**).



**Figure 42:** Evolution de la masse corporelle chez les rats *App*<sup>+/-</sup> et *App*<sup>-/-</sup>

Une augmentation de la masse corporelle est observée au cours du vieillissement des animaux. De manière globale, les rats de 11 semaines ont une masse corporelle inférieure à ceux de 54 et 78 semaines, c'est également le cas des rats de 54 semaines comparés à ceux de 78 semaines. Par ailleurs, les rats *App*<sup>-/-</sup> présentent une masse corporelle significativement plus faible comparativement aux rats *App*<sup>+/+</sup> et *App*<sup>+/-</sup>. Cette réduction est observée aux 3 âges étudiés. Les valeurs représentent des moyennes ± erreur-type. *Statistiques* : \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$  vs. *App*<sup>+/+</sup> ; \$  $p < 0,05$ , \$\$  $p < 0,01$  et \$\$\$  $p < 0,001$  vs. *App*<sup>+/+</sup> ; +  $p < 0,05$  vs. 78 semaines ; ++  $p < 0,01$  vs. 78 semaines ; +++  $p < 0,001$  vs. 78 semaines ; £  $p < 0,05$  vs. 54 semaines ; £££  $p < 0,001$  vs. 54 semaines.

L'analyse des données par une ANOVA à un facteur montre un effet significatif du Génotype pour ces 3 âges (à 11 semaines  $F_{2,31}=6,51$  -  $p<0,01$  ; à 54 semaines  $F_{2,35}=8,86$  -  $p<0,001$  ; à 78 semaines  $F_{2,65}=8,36$  -  $p<0,001$ ). Ainsi, les rats *App<sup>-/-</sup>* présentent une réduction de leur masse corporelle comparés aux rats *App<sup>+/+</sup>* ( $p<0,01$  aux 3 âges) et *App<sup>+/-</sup>* ( $p<0,05$  à 11 semaines et  $p<0,01$  à 54 et 78 semaines). Cette réduction est de l'ordre de 11 à 14% comparée aux *App<sup>+/+</sup>* (11% à 11 semaines ; 14,4% à 54 semaines et 12,7% à 78 semaines).

Par ailleurs, certains rats de la cohorte 2 ont également été pesés aux âges de 9 et 10 semaines. Ainsi, alors qu'aucune différence significative n'est visible à l'âge de 9 semaines (ANOVA à un facteur, effet du Génotype,  $F_{2,26}=2,04$ ), une différence significative apparaît à l'âge de 10 semaines. L'ANOVA à un facteur met ainsi en évidence un effet du Génotype ( $F_{2,26}=6,11$  ;  $p<0,01$ ), les rats *App<sup>-/-</sup>* présentant une masse corporelle plus faible que les rats *App<sup>+/+</sup>* et *App<sup>+/-</sup>* ( $p<0,01$ ). Cette réduction est de 11,3% comparée aux *App<sup>+/+</sup>*.

Les rats *App<sup>-/-</sup>* présentent donc une réduction de leur masse corporelle qui apparaît entre l'âge de 9 et 10 semaines.

Une analyse de l'effet du vieillissement a été réalisée pour la masse corporelle. L'ANOVA à 2 facteurs (Age x Génotype) met ainsi en évidence un effet de l'Age ( $F_{2,131}=180,20$  ;  $p<0,001$ ) et du Génotype ( $F_{2,131}=15,49$  ;  $p<0,001$ ). Ce dernier correspond à la réduction de la masse corporelle observée chez les rats *App<sup>-/-</sup>* comparés aux rats *App<sup>+/+</sup>* et *App<sup>+/-</sup>* ( $p<0,001$ ). L'effet de l'Age, quant à lui, traduit la prise de poids continue des rats tout au long de leur vie. Ainsi, de manière globale, les rats présentent une masse corporelle plus importante à l'âge de 54 semaines comparé à l'âge de 11 semaines ( $p<0,001$ ). Cette dernière étant encore plus importante à l'âge de 78 semaines ( $p<0,001$  vs. 11 et 54 semaines). L'interaction Age x Génotype n'est pas significative ( $F_{4,131}=0,58$ ).

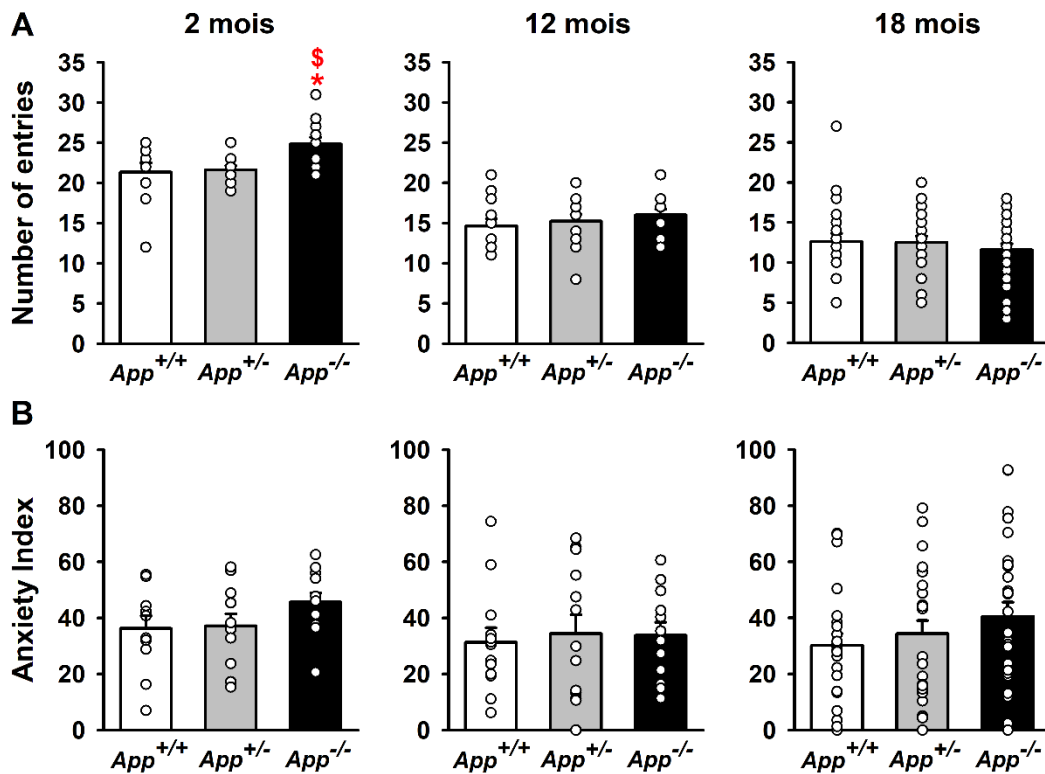
## 2- Labyrinthe en croix surélevé

Le test du labyrinthe en croix surélevé a permis d'évaluer l'effet du KO de l'APP sur le niveau d'anxiété des animaux. Par ailleurs, la mesure du nombre total d'entrées dans les bras donne une indication de l'activité générale des animaux.

L'ANOVA à un facteur réalisée pour le **nombre total d'entrée dans les bras ouverts et fermés (Figure 43-A)** montre, à 2 mois, un effet significatif du Génotype ( $F_{2,31}=4,89$  ;  $p<0,05$ ). Ainsi, les rats *App<sup>-/-</sup>* présentent un nombre d'entrées significativement plus important comparés aux *App<sup>+/+</sup>* et aux *App<sup>+/-</sup>* ( $p<0,05$ ). Les rats

*App*<sup>-/-</sup> sont donc plus actifs. Cette différence n'est pas retrouvée aux âges de 12 ( $F_{2,35}=0,641$ ) et 18 mois ( $F_{2,71}=0,408$ ), pour lesquels aucune différence significative entre les génotypes n'est observée.

Par ailleurs, le **temps passé dans les bras ouverts vs. les bras fermés** a été mesuré. Cela permet de calculer un indice d'anxiété qui correspond au temps passé dans les bras ouverts rapporté au temps total passé dans les bras (fermés et ouverts), le tout multiplié par 100 (**Figure 43-B**). L'ANOVA ne montre pas de différence entre les génotypes pour les 3 âges étudiés (2 mois :  $F_{2,31}=1,680$  ; 12 mois :  $F_{2,35}=0,085$  ; 18 mois :  $F_{2,71}=1,214$ ). Les rats *App*<sup>+/-</sup> et *App*<sup>-/-</sup> ne présentent donc pas de modification de leur niveau d'anxiété.

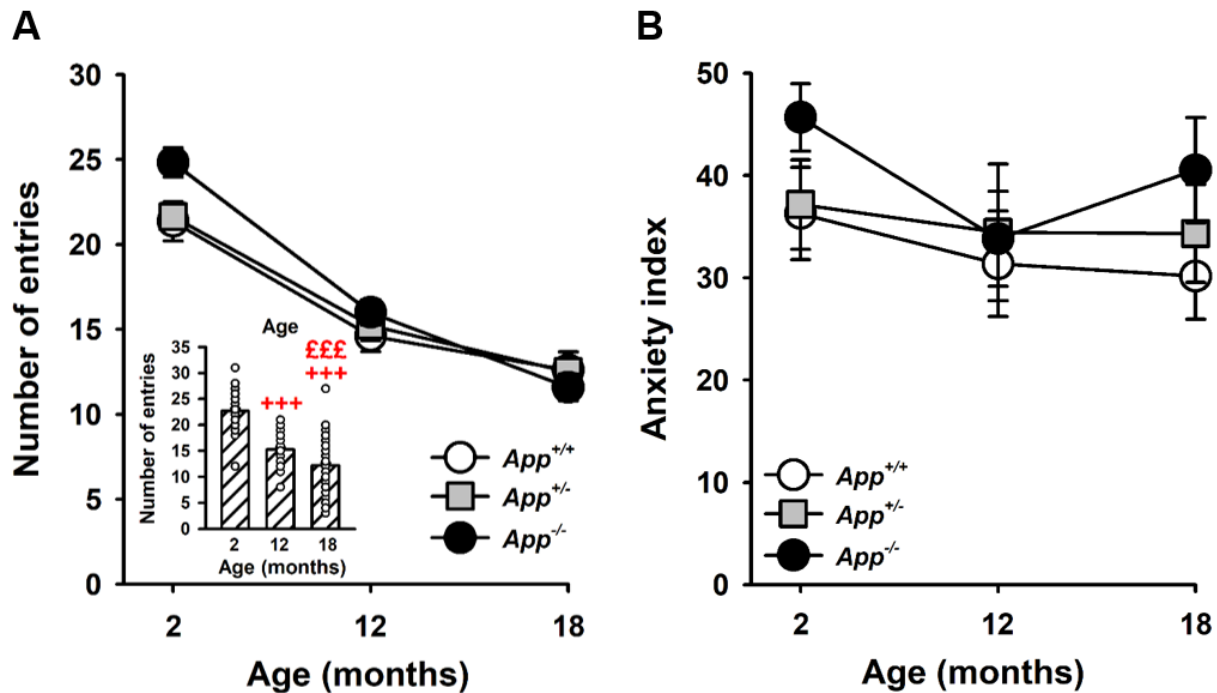


**Figure 43:** Activité locomotrice et anxiété chez les rats *App*<sup>+/-</sup> et *App*<sup>-/-</sup> dans le labyrinthe en croix surélevé

(A) Nombre total d'entrées dans les bras ouverts et fermés. Seuls les rats *App*<sup>-/-</sup> de la cohorte de 2 mois présentent une augmentation du nombre d'entrées dans les bras. Ils sont donc plus actifs. (B) Indice d'anxiété. Aucune différence du niveau d'anxiété n'est observée entre les génotypes, quel que soit l'âge étudié. Les valeurs représentent des moyennes ± erreur-type. Statistiques : \*  $p < 0,05$  vs. *App*<sup>+/+</sup> ; \$  $p < 0,05$  vs. *App*<sup>+/-</sup>.

L'effet du vieillissement a également été étudié pour ces paramètres. Pour le **nombre total d'entrées dans les bras** (**Figure 44-A**), l'ANOVA à 2 facteurs (Age x Génotype) ne montre pas d'effet significatif du Génotype ( $F_{2,137}=1,372$ ), ni d'interaction Age x Génotype ( $F_{4,137}=1,783$ ), seul un effet significatif de l'âge est observé ( $F_{2,137}=86,089$  ;  $p < 0,001$ ). Ainsi, la diminution du nombre d'entrées dans les bras observée avec

l'âge, pour les 3 génotypes, atteste de la réduction de l'activité au cours du vieillissement. L'ANOVA à 2 facteurs réalisée pour l'indice d'anxiété (Figure 44-B) ne montre aucun effet significatif de l'Age ( $F_{2,137}=0,935$ ), du Génotype ( $F_{2,137}=1,4$ ), ni d'interaction Age x Génotype ( $F_{4,137}=0,228$ ). Le niveau d'anxiété des animaux reste donc stable au cours du vieillissement et n'est pas influencé par l'absence d'APP.



**Figure 44: Effet du vieillissement chez les rats *App*<sup>+/-</sup> et *App*<sup>-/-</sup> dans le labyrinthe en croix surélevé**

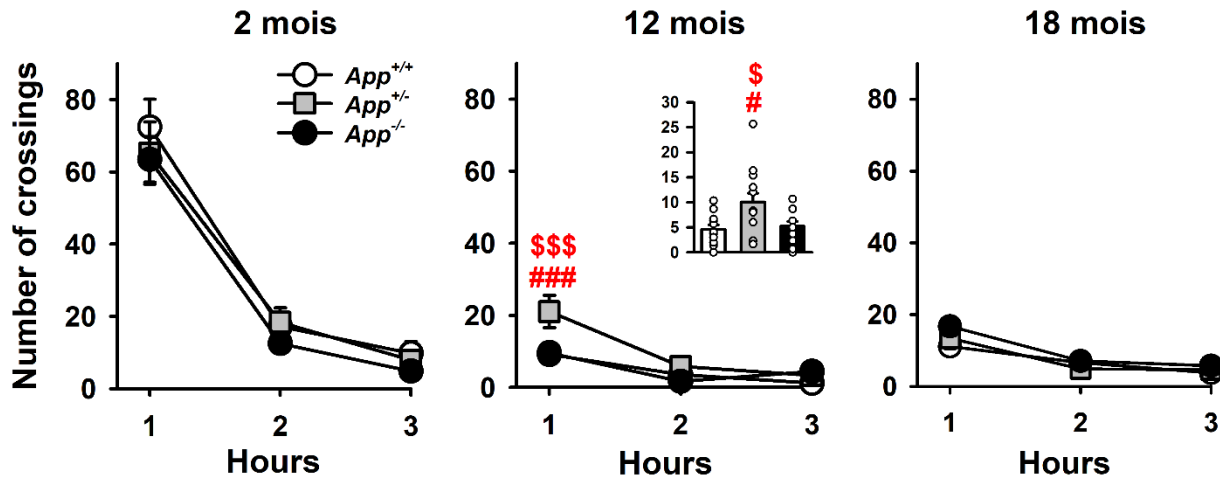
(A) Nombre total d'entrées dans les bras ouverts et fermés. Une diminution du nombre total d'entrées est observée de façon similaire chez tous les animaux avec l'âge. (B) Indice d'anxiété. Aucune différence du niveau d'anxiété n'est observée entre les génotypes, ni au cours du vieillissement. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type. Statistiques : +++  $p < 0,001$  vs. 2 mois ; £££  $p < 0,001$  vs. 12 mois.

En conclusion, l'absence d'APP n'a pas d'incidence sur le niveau d'anxiété des animaux, et ce quel que soit l'âge étudié. Seul un effet est observé pour l'activité locomotrice à l'âge de 2 mois, les *App*<sup>-/-</sup> apparaissant alors plus actifs. Par ailleurs, l'absence d'APP n'influence pas l'évolution de ces paramètres au cours du vieillissement des animaux. En effet, pour les 3 génotypes une diminution de l'activité locomotrice est mise en évidence avec l'âge alors que le niveau d'anxiété reste stable.

### 3- Test de l'activité circadienne

#### 3.1- Phase d'habituat

Le test de l'activité circadienne a permis d'évaluer l'activité des rats dans leur cage d'élevage sur une période de 48h. Les 3 premières heures du test correspondent à la phase d'habituat (Figure 45).



**Figure 45: Activité locomotrice des rats lors de la phase d'habituat au test de l'activité circadienne**

Une diminution de l'activité au cours du temps est observée pour l'ensemble des animaux aux 3 âges étudiés. Cela traduit une habituat des animaux aux conditions expérimentales. Cependant, à l'âge de 12 mois, les rats *App*<sup>+/-</sup> sont plus actifs comparés aux autres génotypes, en particulier lors de la 1<sup>ère</sup> heure. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type. *Statistiques* : #  $p < 0,05$  et ###  $p < 0,001$  vs. *App*<sup>+/+</sup> ; \$  $p < 0,05$  et \$\$\$  $p < 0,001$  vs. *App*<sup>-/-</sup>.

A l'âge de 2 mois, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Heure) met en évidence un effet significatif de l'Heure ( $F_{2,62}=137,1$  ;  $p < 0,001$ ). Cela traduit une diminution de l'activité globale des animaux au cours du temps et donc une habituat aux conditions expérimentales. Le test « post-hoc » de Newman-Keuls montre une différence significative entre la 1<sup>ère</sup> heure de test et les deux heures suivantes ( $p < 0,001$ ) ainsi qu'entre la deuxième et la troisième heure de test ( $p < 0,05$ ). En revanche, aucun effet du Génotype ( $F_{2,31}=0,908$ ), ni de l'interaction Génotype x Heure ( $F_{4,62}=0,202$ ) ne sont observés. L'activité locomotrice au cours de cette phase d'habituat est donc similaire entre les génotypes.

De la même façon, à l'âge de 12 mois, un effet significatif de l'Heure est observé ( $F_{2,68}=20,587$  ;  $p < 0,001$ ). Les rats sont ainsi plus actifs lors de la 1<sup>ère</sup> heure comparée aux deux heures suivantes ( $p < 0,001$ ). Par ailleurs, un effet significatif du Génotype ( $F_{2,34}=5,218$  ;  $p < 0,05$ ) et une interaction Génotype x Heure ( $F_{4,68}=2,711$  ;  $p < 0,05$ ) sont mis en évidence. Ainsi, de manière globale les rats *App*<sup>+/-</sup> sont plus actifs que les rats *App*<sup>+/+</sup> et *App*<sup>-/-</sup> ( $p < 0,05$ ) lors de cette phase d'habituat. Plus particulièrement, le test « post-hoc » réalisé pour l'interaction Génotype x Heure montre que les rats *App*<sup>+/-</sup> présentent une activité plus

importante que les *App*<sup>+/+</sup> et *App*<sup>-/-</sup> lors de la 1<sup>ère</sup> heure du test ( $p < 0,001$ ). Cette augmentation d'activité pourrait être liée à un stress ou une exploration exacerbée en réponse au nouvel environnement.

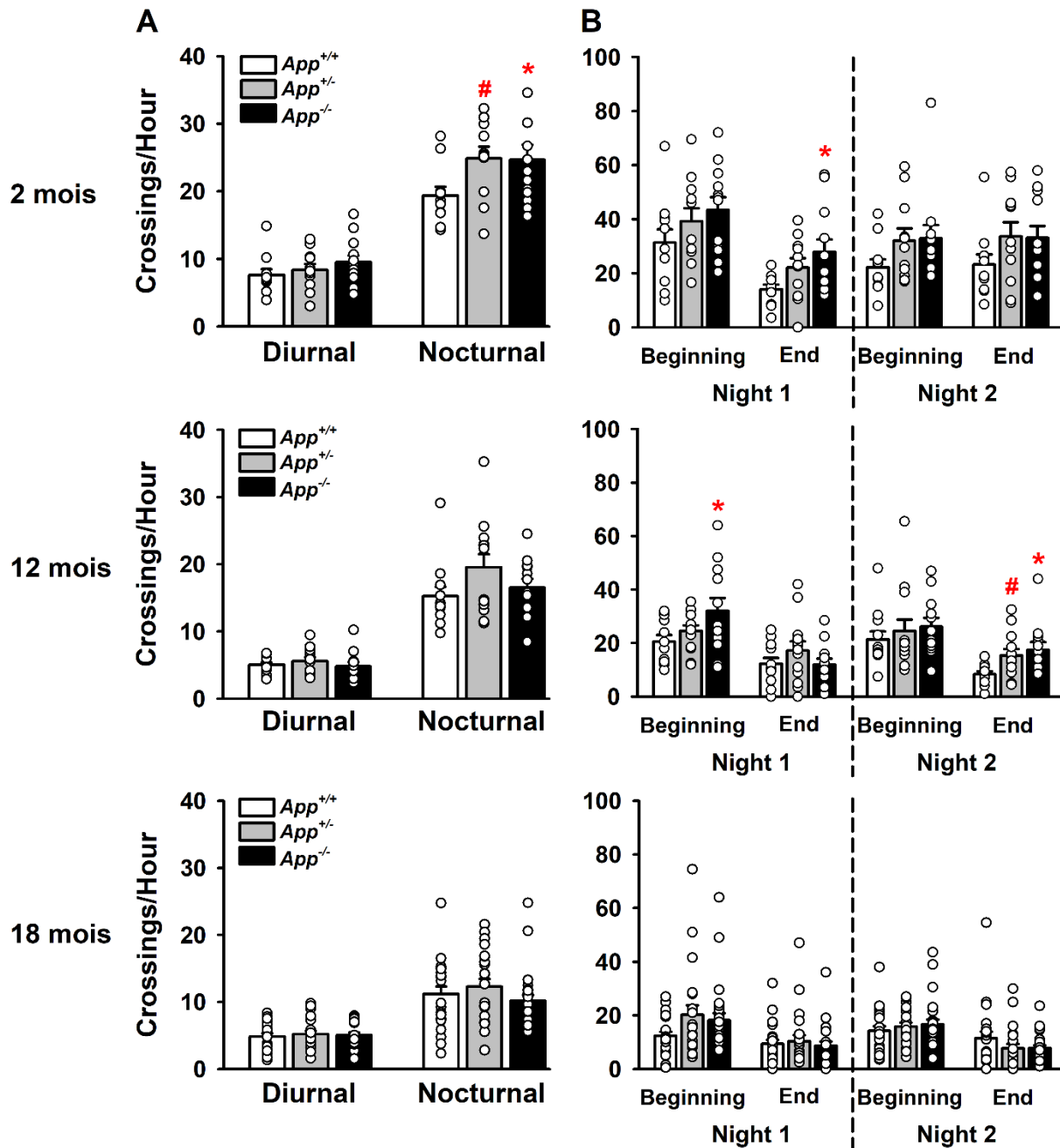
Enfin, à l'âge de **18 mois**, l'ANOVA à 2 facteurs indique comme pour les groupes d'âges précédents un effet de l'Heure ( $F_{2,132}=24,518$  ;  $p < 0,001$ ). Une diminution de l'activité locomotrice horizontale est ainsi retrouvée entre la 1<sup>ère</sup> heure de test et les deux heures suivantes ( $p < 0,001$ ). Aucun effet significatif n'est mis en évidence pour le Génotype ( $F_{2,66}=1,812$ ) et pour l'interaction Génotype x Heure ( $F_{4,132}=0,728$ ). Il n'y a donc pas de différence d'activité locomotrice entre les génotypes lors de l'habituation.

En résumé, lors de la phase d'habituation, une diminution de l'activité locomotrice au cours du temps est observée chez l'ensemble des animaux et aux 3 âges étudiés. Cette diminution, attendue, traduit une habituation des animaux aux conditions expérimentales.

### 3.2- Activité Diurne versus Nocturne

Suite à cette phase d'habituation, l'activité horizontale des rats est suivie pendant 45h, elle peut alors être divisée en **activité diurne vs. nocturne (Figure 46-A)**. L'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Période) pour la cohorte de **2 mois** met en évidence un effet significatif de la Période ( $F_{1,31}=285,49$  ;  $p < 0,001$ ) et une tendance à la significativité pour l'interaction Génotype x Période ( $F_{2,31}=2,67$  ;  $p = 0,085$ ). Aucun effet significatif du Génotype n'est observé ( $F_{2,31}=2,393$ ). L'effet de la Période s'explique par une activité locomotrice significativement plus importante lors de la phase nocturne comparée à la phase diurne. Ce résultat est attendu, les rats étant des animaux nocturnes. Par ailleurs, les rats *App*<sup>+/+</sup> et *App*<sup>-/-</sup> sont plus actifs lors de la phase nocturne comparés aux *App*<sup>+/+</sup> ( $p < 0,05$ ). De la même façon, pour les cohortes de **12 mois** et **18 mois**, l'ensemble des animaux est plus actif lors de la phase nocturne comparée à la phase diurne ( $p < 0,001$  ; ANOVA à 2 facteurs, effet de la Période, à 12 mois  $F_{1,34}=160,89$  ; à 18 mois  $F_{1,66}=150,80$ ). Par ailleurs, pour ces 2 âges, aucune différence n'est observée entre les génotypes (à 12 mois,  $F_{2,34}=2,2$  ; à 18 mois,  $F_{2,66}=0,746$ ) ou pour l'interaction Génotype x Période (à 12 mois,  $F_{2,34}=1,385$  ; à 18 mois  $F_{2,66}=1,358$ ).

En conclusion, l'absence d'APP impacte l'activité locomotrice uniquement à l'âge de 2 mois. Cette dernière est ainsi augmentée lors de la phase nocturne chez les rats *App*<sup>+/+</sup> et *App*<sup>-/-</sup>. Cela est en accord avec les observations faites dans le labyrinthe en croix surélevé où les rats *App*<sup>-/-</sup> apparaissent plus actifs uniquement à l'âge de 2 mois.



**Figure 46: Activité locomotrice dans le test de l'activité circadienne sur une période de 45h suivant la phase d'habituation**

**(A)** Activité Diurne vs. Nocturne. A l'âge de 2 mois, les rats *App*<sup>+/-</sup> et *App*<sup>-/-</sup> présentent une augmentation de leur activité lors de la phase nocturne. Aucune différence n'est observée pour les cohortes de 12 et 18 mois. **(B)** Activité au début et à la fin de la phase nocturne. L'activité des animaux a été évaluée au cours des 2 premières et 2 dernières heures de la phase nocturne. Seules quelques variations de l'activité locomotrices sont observées aux âges de 2 et 12 mois chez les rats *App*<sup>+/-</sup> et *App*<sup>-/-</sup>. Aucun effet majeur de l'absence de l'APP n'est mis en évidence. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type. *Statistiques* : \* et #  $p < 0,05$  vs. *App*<sup>+/+</sup>.



Nous nous sommes également intéressés à **l'activité en début et fin de phase nocturne (Figure 46-B)**. En effet, l'étude de Ring et al. (2007) a mis en évidence chez les souris APP-KO une augmentation de leur activité locomotrice en début de phase nocturne alors que celle-ci est diminuée à la fin de la phase nocturne. Nous voulions donc savoir si ce résultat était retrouvé dans notre modèle de rat. Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'activité des animaux au cours des 2 premières et des 2 dernières heures de chacune des phases nocturnes.

A **l'âge de 2 mois**, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Période) montre un effet significatif du Génotype et de la Période ( $F_{2,31}=4,105$  ;  $p<0,05$  et  $F_{3,93}=11,189$  ;  $p<0,001$ , respectivement). L'effet du Génotype traduit de manière globale une activité locomotrice plus importante des rats *App<sup>+/-</sup>* et *App<sup>-/-</sup>* comparés aux *App<sup>+/+</sup>* ( $p<0,05$ ). Ce résultat est en accord avec l'augmentation de l'activité nocturne décrite précédemment à l'âge de 2 mois chez ces animaux. L'effet de la Période montre que, lors de la Nuit 1, l'ensemble des rats est significativement plus actif en début qu'en fin de nuit. A l'inverse, aucune différence n'est observée entre le début et la fin de la Nuit 2. Des analyses ANOVA à un facteur ont également été réalisées pour comparer les génotypes lors de ces différentes périodes de la phase nocturne. Un effet du Génotype est observé uniquement à la fin de la Nuit 1 ( $F_{2,31}=4,007$  ;  $p<0,05$ ). Ainsi, les rats *App<sup>-/-</sup>* sont plus actifs que les *App<sup>+/+</sup>* lors des deux dernières heures de la Nuit 1. Cette différence n'est pas retrouvée lors de la Nuit 2 ( $F_{2,31}=1,679$ ).

Pour la cohorte de **12 mois**, un effet de la Période est retrouvé (ANOVA à 2 facteurs,  $F_{3,102}=18,545$  ;  $p<0,001$ ). De manière globale, les rats sont plus actifs en début qu'en fin de nuit ( $p<0,001$ ). Cette observation est valable pour les 2 phases nocturnes. Par ailleurs, l'effet du Génotype tend à être significatif ( $F_{2,34}=2,256$  ;  $p=0,085$ ). Cependant, le test « post-hoc » de Newman-Keuls ne met pas en évidence de différence significative. Aucune interaction Génotype x Période n'est observée ( $F_{6,102}=1,428$ ). Les analyses ANOVA à un facteur réalisées pour chaque période indiquent une tendance pour l'effet du Génotype en début de Nuit 1 ( $F_{2,34}=3,122$  ;  $p=0,057$ ). Les rats *App<sup>-/-</sup>* sont ainsi plus actifs comparés aux *App<sup>+/+</sup>* ( $p<0,05$ ). Un effet significatif du Génotype est également mis en évidence en fin de Nuit 2 ( $F_{2,34}=4,457$  ;  $p<0,05$ ). Il traduit une activité locomotrice plus importante chez les *App<sup>+/-</sup>* et les *App<sup>-/-</sup>* par rapport aux *App<sup>+/+</sup>* ( $p<0,05$ ). Les ANOVA à un facteur pour la fin de la Nuit 1 et le début de la Nuit 2 ne mettent pas en évidence d'effet du Génotype ( $F_{2,34}=1,231$  et  $F_{2,34}=0,463$ , respectivement).

Enfin, pour la cohorte de **18 mois**, un effet significatif de la Période est mis en évidence ( $F_{3,198}=17,937$  ;  $p<0,001$ ). Cela traduit une activité plus importante des animaux en début de nuit et ce pour les deux phases nocturnes ( $p<0,001$ ). Alors qu'aucune différence n'est observée entre les génotypes ( $F_{2,66}=0,327$ ),

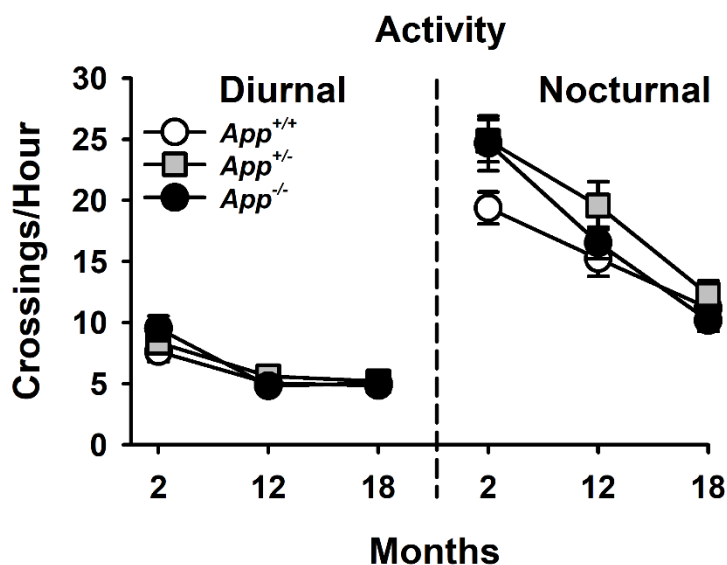
une interaction significative Génotype x Période est constatée ( $F_{6,198}=2,419$  ;  $p<0,05$ ). Cependant, le test « post-hoc » n'indique pas de différence significative entre les génotypes pour une période donnée. Les analyses ANOVA à un facteur réalisées pour chaque période ne montre pas d'effet significatif du Génotype.

En résumé, l'analyse de l'activité en début et fin de phase nocturne montre seulement des variations ponctuelles de l'activité des rats *App<sup>-/-</sup>* aux âges de 2 et 12 mois. En d'autres termes, l'absence d'APP n'a pas d'effet majeur sur l'activité des animaux que ce soit en début ou en fin de nuit et ce quel que soit l'âge étudié.

### 3.3- Effet du vieillissement

L'effet du vieillissement a été étudié pour l'activité diurne vs. nocturne (Figure 47). L'ANOVA à 3 facteurs (Génotype x Age x Période) montre ainsi un effet significatif de l'Age ( $F_{2,131}=55,657$  ;  $p<0,001$ ). Cela traduit, de façon globale, une diminution de l'activité locomotrice des animaux avec l'âge (2 mois vs. 12 mois vs. 18 mois,  $p<0,001$ ). Un effet du Génotype est également mis en évidence ( $F_{2,131}=3,873$  ;  $p<0,05$ ). Les rats *App<sup>+/-</sup>* sont globalement plus actifs que les *App<sup>+/+</sup>* ( $p<0,05$ ). Par ailleurs, l'ANOVA met également en évidence un effet significatif de la Période ( $F_{1,131}=644,80$  ;  $p<0,001$ ) et des interactions Période x Age ( $F_{2,131}=38,907$  ;  $p<0,001$ ) et Période x Génotype ( $F_{2,131}=4,388$  ;  $p<0,05$ ). L'effet de la Période s'explique par une activité plus importante de l'ensemble des animaux lors de la phase nocturne comparée à la phase diurne ( $p<0,001$ ). L'interaction Période x Age montre une diminution de l'activité locomotrice avec l'âge pour la phase diurne et la phase nocturne, cependant cette diminution est plus importante pour cette dernière. Enfin, l'interaction Génotype x Période indique que les rats *App<sup>+/-</sup>* sont plus actifs lors de la phase nocturne comparés aux *App<sup>+/+</sup>* ( $p<0,01$ ) et aux *App<sup>-/-</sup>* ( $p<0,05$ ). Aucun effet significatif n'est observé pour les interactions Age x Génotype ( $F_{4,131}=1,488$ ) et Période x Age x Génotype ( $F_{4,131}=1,163$ ).

En résumé, cette analyse montre une diminution de l'activité locomotrice des animaux avec l'âge, aussi bien pour la phase diurne que pour la phase nocturne. Cette diminution n'est pas impactée par l'absence d'APP. Par ailleurs, les rats *App<sup>+/-</sup>* sont plus actifs en particulier lors de la phase nocturne.



**Figure 47:** Effet du vieillissement sur l'activité locomotrice des rats *App*<sup>+/-</sup> et *App*<sup>-/-</sup> lors des phases diurne et nocturne du test de l'activité circadienne

Une diminution de l'activité locomotrice est observée chez l'ensemble des animaux avec le vieillissement que ce soit pendant la phase diurne, ou la phase nocturne. Cependant, cette diminution est plus importante lors de la phase nocturne. L'absence d'APP n'affecte pas l'évolution de l'activité locomotrice lors des phases diurne et nocturne au cours du vieillissement. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type.

#### 4- Champ ouvert

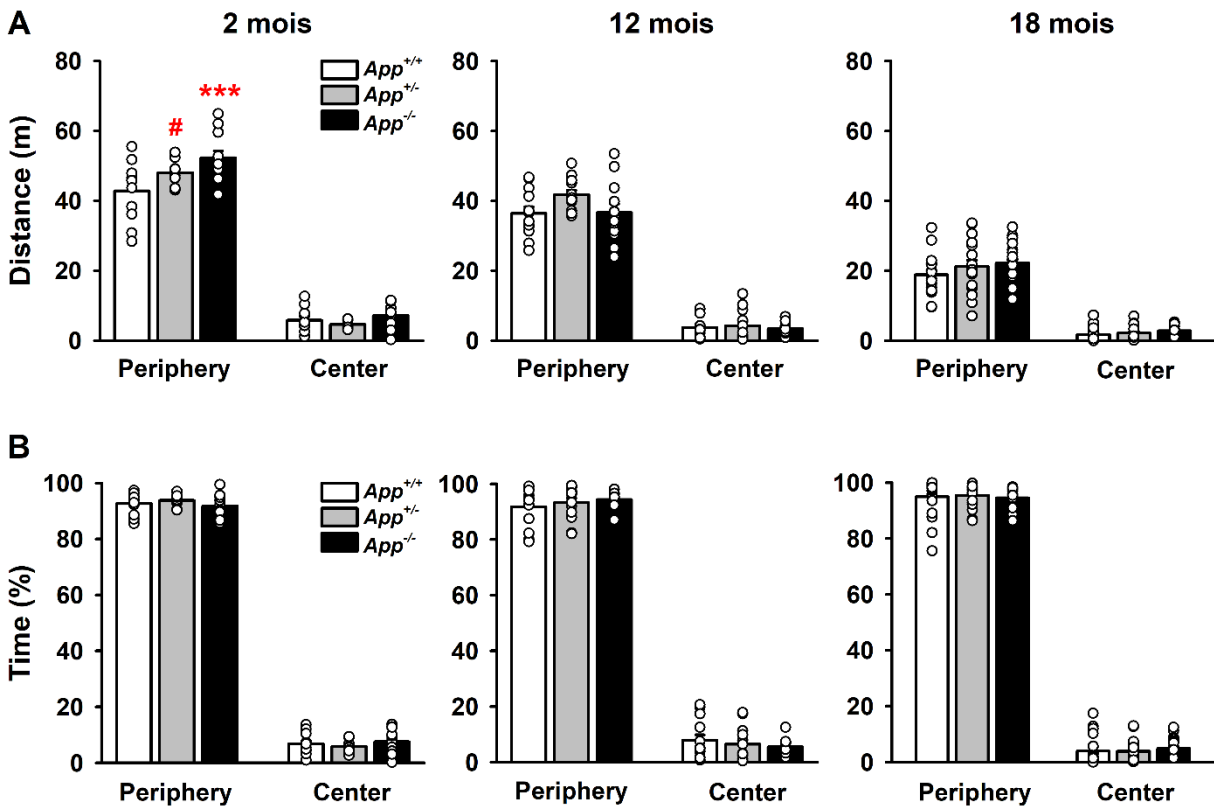
Le test du champ ouvert permet également d'évaluer l'activité locomotrice des animaux, mais cette fois-ci dans un nouvel environnement. Les rats réalisent alors un unique essai de 10 min pendant lequel la distance parcourue ainsi que le temps passé à la périphérie *versus* le centre du dispositif sont mesurés.

##### 4.1- Evaluation de la distance parcourue

Comme attendu, la distance parcourue à la périphérie du dispositif est plus importante que celle parcourue au centre, et ce quel que soit l'âge étudié (**Figure 48-A**) (effet de la Zone  $p < 0,001$  ; ANOVA à 2 facteurs, à 2 mois  $F_{1,30}=1320,23$  ; à 12 mois  $F_{1,35}=752,38$  ; à 18 mois  $F_{1,54}=536,09$ ). Par ailleurs, à l'âge de **2 mois**, un effet significatif du Génotype est mis en évidence ( $F_{2,30}=5,52$  ;  $p < 0,01$ ). Les rats *App*<sup>-/-</sup> sont ainsi globalement plus actifs que les *App*<sup>+/+</sup> ( $p < 0,01$ ). Cela est en accord avec les résultats du labyrinthe en croix surélevé et le test du circadien qui montrent une augmentation de l'activité de ces animaux à 2 mois. L'ANOVA à 2 facteurs indique également une interaction significative Génotype x Zone à l'âge de 2 mois ( $F_{2,30}=4,82$  ;  $p < 0,05$ ). Ainsi, les rats *App*<sup>+/-</sup> et *App*<sup>-/-</sup> parcourent une distance plus importante que les *App*<sup>+/+</sup> à la périphérie du dispositif ( $p < 0,05$  et  $p < 0,001$ , respectivement). A l'âge de **12 mois**, l'effet du Génotype

tend à être significatif ( $F_{2,35}=2,86$  ;  $p=0,071$ ). Le test « post-hoc » révèle alors que les rats  $App^{+/-}$  sont plus actifs que les  $App^{+/+}$  ( $p<0,05$ ). Aucune interaction Génotype x Zone n'est mise en évidence ( $F_{2,35}=1,52$ ). Enfin, à l'âge de **18 mois**, aucun effet du Génotype ( $F_{2,54}=2,123$ ), ni d'interaction Génotype x Zone ( $F_{2,54}=0,783$ ) ne sont observés.

En résumé, les rats  $App^{+/-}$  et  $App^{-/-}$  apparaissent plus actifs à la périphérie du dispositif à l'âge de 2 mois. Cette différence d'activité n'est pas retrouvée aux âges de 12 et 18 mois. Cependant, les rats  $App^{+/-}$  sont globalement plus actifs à 12 mois.



**Figure 48: Activité locomotrice chez les rats  $App^{+/-}$  et  $App^{-/-}$  dans le test du champ ouvert**

**(A)** Distance parcourue à la périphérie vs. le centre du champ ouvert. A l'âge de 2 mois, les rats  $App^{+/-}$  et  $App^{-/-}$  parcourent une distance plus importante à la périphérie du champ ouvert. Cette augmentation n'est pas retrouvée aux âges de 12 et 18 mois, bien que les rats  $App^{+/-}$  apparaissent globalement plus actifs à l'âge de 12 mois. **(B)** Pourcentage de temps passé à la périphérie vs. le centre du champ ouvert. Aucune différence n'est observée entre les génotypes. L'ensemble des animaux passe significativement plus de temps à la périphérie du dispositif comparé au centre. Il n'y a donc pas de différence de niveau d'anxiété chez les rats  $App^{+/-}$  et  $App^{-/-}$ . Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type. Statistiques : #  $p<0,05$  et \*\*\*  $p<0,001$  vs.  $App^{+/+}$ .

#### 4.2- Temps passé à la périphérie versus le centre

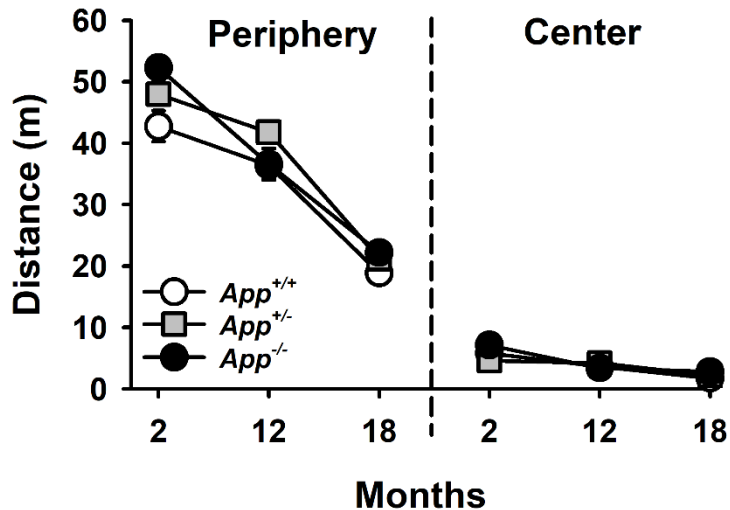
Le **pourcentage de temps passé à la périphérie vs. le centre (Figure 48-B)** est un indicateur du niveau d'anxiété des animaux. Ainsi, aux 3 âges étudiés, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Zone) met en évidence un effet de la Zone ( $p < 0,001$  ; à 2 mois  $F_{1,30}=4672$  ; à 12 mois  $F_{1,35}=2188$  ; à 18 mois  $F_{1,54}=5575,4$ ). L'ensemble des animaux passent ainsi plus de temps à la périphérie comparé au centre de l'arène comme attendu ( $p < 0,001$ ). Par ailleurs, pour les 3 âges, aucun effet significatif du Génotype (à 2 mois  $F_{2,30}=1$  ; à 12 mois  $F_{2,35}=2$  ; à 18 mois  $F_{2,54}=0,4$ ) ou de l'interaction Génotype x Zone (à 2 mois  $F_{2,30}=1$  ; à 12 mois  $F_{2,35}=1$  ; à 18 mois  $F_{2,54}=0,2$ ) n'est observé.

Ainsi, aucune différence entre les génotypes n'est observée pour le temps passé à la périphérie vs. le centre de l'arène, et ce pour les 3 âges étudiés. Le niveau d'anxiété des animaux n'est donc pas affecté par l'absence d'APP. Ce résultat est en accord avec les observations faites lors du test du labyrinthe en croix surélevé.

#### 4.3- Effet du vieillissement

L'effet du vieillissement a également été étudié. Tout d'abord, pour la **distance parcourue dans les différentes zones** de l'arène (Figure 49). Un effet significatif de l'Age ( $F_{2,119}=202,54$  ;  $p < 0,001$ ), du Génotype ( $F_{2,119}=5,78$  ;  $p < 0,01$ ) et de la Zone ( $F_{1,119}=2680,45$  ;  $p < 0,001$ ) sont mis en évidence par l'ANOVA à 3 facteurs (Génotype x Age x Zone). L'effet de l'Age traduit ainsi une diminution globale de l'activité locomotrice avec l'âge (2 mois vs. 12 mois vs. 18 mois,  $p < 0,001$ ). Par ailleurs, les rats  $App^{+/-}$  et  $App^{-/-}$  sont plus actifs que les  $App^{+/+}$  ( $p < 0,05$ ). La distance parcourue à la périphérie étant toujours plus importante que celle parcourue au centre de l'arène ( $p < 0,001$ ). L'ANOVA montre également des interactions significatives Age x Génotype ( $F_{4,119}=2,86$ ), Zone x Age ( $F_{2,119}=141,79$ ) et Zone x Génotype ( $F_{2,119}=4,88$ ). L'interaction Age x Génotype indique que la diminution de la distance parcourue observée chez tous les génotypes est plus importante chez les rats  $App^{-/-}$ . Par ailleurs, bien que cette diminution affecte aussi bien la distance parcourue à la périphérie que celle parcourue au centre, la distance parcourue à la périphérie diminue de façon plus importante avec l'âge. Enfin, l'interaction Génotype x Zone montre que de manière globale, les rats  $App^{+/-}$  et  $App^{-/-}$  parcourent une distance plus importante en périphérie comparés aux  $App^{+/+}$  ( $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ , respectivement). L'interaction Zone x Age x Génotype n'est pas significative ( $F_{4,119}=1,50$ ).

En conclusions, cette analyse montre que les rats *App<sup>+/-</sup>* et *App<sup>-/-</sup>* sont plus actifs, en particulier à la périphérie du dispositif. Par ailleurs, l'activité locomotrice diminue avec l'âge des animaux. Cette diminution est plus importante chez les rats *App<sup>-/-</sup>* du fait d'une hyperactivité à l'âge de 2 mois.



**Figure 49: Effet du vieillissement sur l'activité locomotrice des rats *App<sup>+/-</sup>* et *App<sup>-/-</sup>* dans le test du champ ouvert**

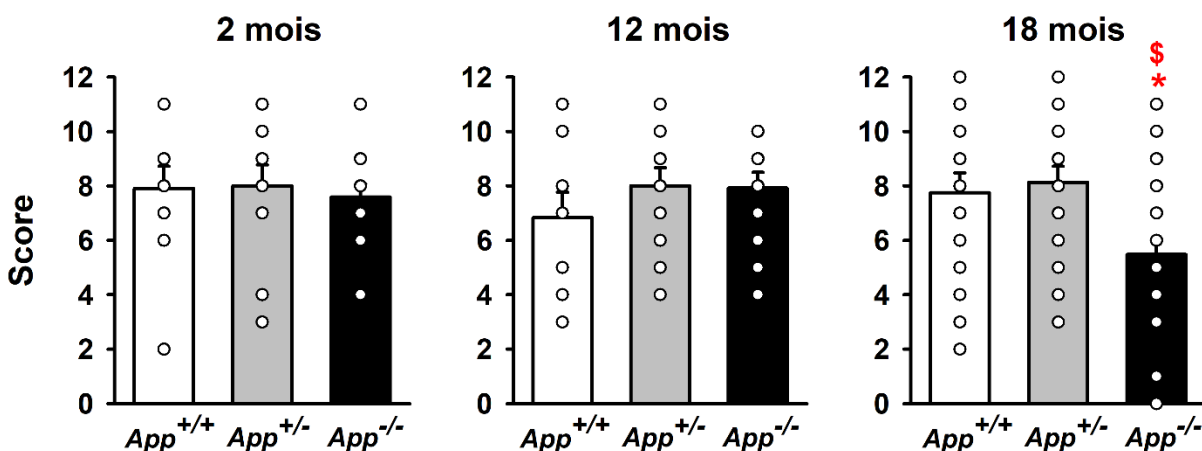
Représentation de la distance parcourue à la périphérie vs. le centre du champ ouvert au cours du vieillissement. Une diminution de la distance parcourue est observée avec le vieillissement des animaux que ce soit à la périphérie ou au centre du dispositif. Cependant, cette diminution est plus importante pour la distance parcourue à la périphérie et pour les rats *App<sup>-/-</sup>*. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type.

Concernant le **pourcentage de temps passé à la périphérie versus le centre** de l'arène, comme attendu, l'ANOVA à 3 facteurs (Génotype x Age x Zone) indique un effet significatif de la Zone ( $F_{1,119}=10426,6$  ;  $p<0,001$ ). L'ensemble des animaux passe plus de temps à la périphérie du champ ouvert. Une interaction Zone x Age est également mise en évidence ( $F_{2,119}=3,5$  ;  $p<0,05$ ). Ainsi, à l'âge de 18 mois, les rats passent significativement moins de temps dans la partie centrale comparativement à l'âge de 12 mois ( $p<0,05$ ). Aucun effet significatif n'est observé pour l'Age ( $F_{2,119}=2,4$ ), le Génotype ( $F_{2,119}=0,4$ ), ni pour les interactions Age x Génotype ( $F_{4,119}=0,3$ ), Zone x Génotype ( $F_{2,119}=0,4$ ) ou encore Zone x Age x Génotype ( $F_{4,119}=0,6$ ).

En résumé, l'absence d'APP n'influence pas le pourcentage de temps passé à la périphérie versus le centre du dispositif au cours du vieillissement.

## 5- Test de la barre

La coordination sensorimotrice des animaux a été évaluée grâce au test de la barre. Les animaux doivent apprendre à se déplacer sur une barre en bois de 2m afin de rejoindre leur cage placée à une extrémité. Un score de 1 est lors attribué pour chaque segment de 0,5m traversé sans glissement des pattes. Le score maximal d'un essai est donc de 4. Chaque rat effectue 3 essais dont les scores sont ensuite additionnés, le score final maximal est alors de 12 (Figure 50).



**Figure 50: Coordination sensorimotrice des rats *App*<sup>+/+</sup> et *App*<sup>-/-</sup> dans le test de la barre**

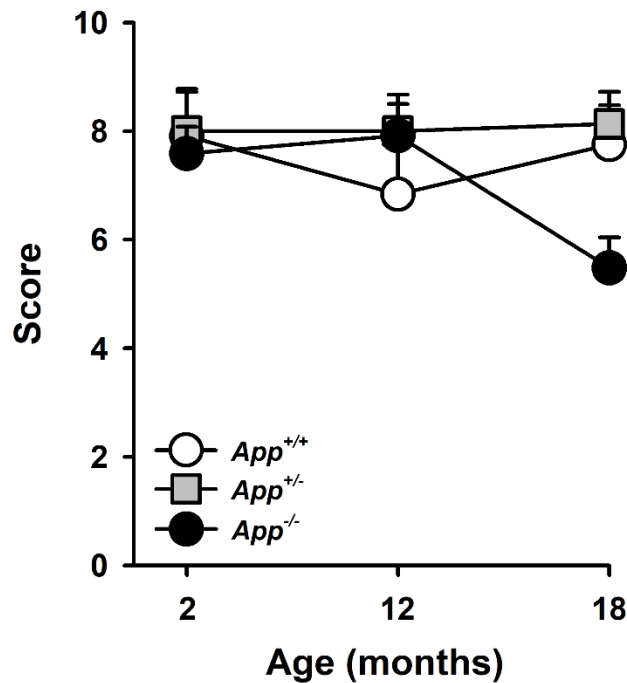
Représentation du score obtenu par les animaux lors de la phase de test. Aucune différence n'est observée entre les géotypes aux âges de 2 et 12 mois. Cependant, à l'âge de 18 mois, les rats *App*<sup>-/-</sup> présentent de moins bonnes performances, témoignant d'une altération de leur coordination sensorimotrice. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type. Statistiques : \*  $p < 0,05$  vs. *App*<sup>+/+</sup> et \$  $p < 0,05$  vs. *App*<sup>+/-</sup>.

Ainsi, pour les cohortes de **2 et 12 mois**, aucune différence n'est observée entre les géotypes (ANOVA à un facteur, à 2 mois  $F_{2,31}=0,10$  ; à 12 mois  $F_{2,34}=0,76$ ). Aucune altération de la coordination sensorimotrice n'est donc observée à ces 2 âges. En revanche, à l'âge de **18 mois**, l'ANOVA à un facteur met en évidence un effet significatif du Génotype ( $F_{2,67}=5,75$  ;  $p < 0,01$ ). Les rats *App*<sup>-/-</sup> présentent de moins bonnes performances comparées aux *App*<sup>+/+</sup> ( $p < 0,05$ ) et *App*<sup>+/-</sup> ( $p < 0,05$ ). Les *App*<sup>-/-</sup> semblent donc présenter un déficit de coordination sensorimotrice. Cependant, si on s'intéresse à la distribution des données individuelles, une importante variabilité interindividuelle est constatée.

Par ailleurs, l'**analyse du vieillissement** (Figure 51) ne montre pas d'effet de l'Age ( $F_{2,13}=0,85$ ), du Génotype ( $F_{2,132}=1,58$ ), ni d'interaction Age x Génotype ( $F_{4,132}=1,921$ ).

Nous pouvons donc conclure que les rats *App*<sup>+/+</sup> et *App*<sup>-/-</sup> ne présentent pas de déficit de coordination sensorimotrice aux âges de 2 et 12 mois. En revanche, un déficit est observé chez les rats *App*<sup>-/-</sup> à l'âge de

18 mois. Par ailleurs, les performances de l'ensemble des animaux restent stables au cours du vieillissement.



**Figure 51:** Effet du vieillissement sur la coordination sensorimotrice des rats *App*<sup>+/-</sup> et *App*<sup>-/-</sup> au test de la barre

Représentation de l'évolution du score en fonction de l'âge des animaux. Aucune différence significative n'est observée entre les génotypes ainsi qu'au cours du vieillissement. L'absence d'APP n'influence donc pas de manière significative l'évolution des performances de coordination sensorimotrice. Les valeurs représentent des moyennes ± erreur-type.

## 6- Piscine de Morris

Le test de la Piscine de Morris a ensuite été réalisé afin d'évaluer l'apprentissage et la mémoire spatial, ainsi que la flexibilité comportementale. Pour cela, le protocole que nous avons utilisé comporte 3 phases principales : la phase d'acquisition, le test de rappel et la phase d'extinction. Pour chacune d'entre elles, différents paramètres sont évalués, les résultats obtenus sont décrits ci-dessous.

### 6.1- Phase d'acquisition

La phase d'acquisition se déroule sur 6 jours avec 4 essais/jour. Les capacités d'apprentissage spatial sont évaluées par la mesure de différents paramètres que sont la distance parcourue et la latence pour atteindre la plateforme, le temps passé à proximité des parois, ou thigmotaxie, ainsi que la vitesse de nage.



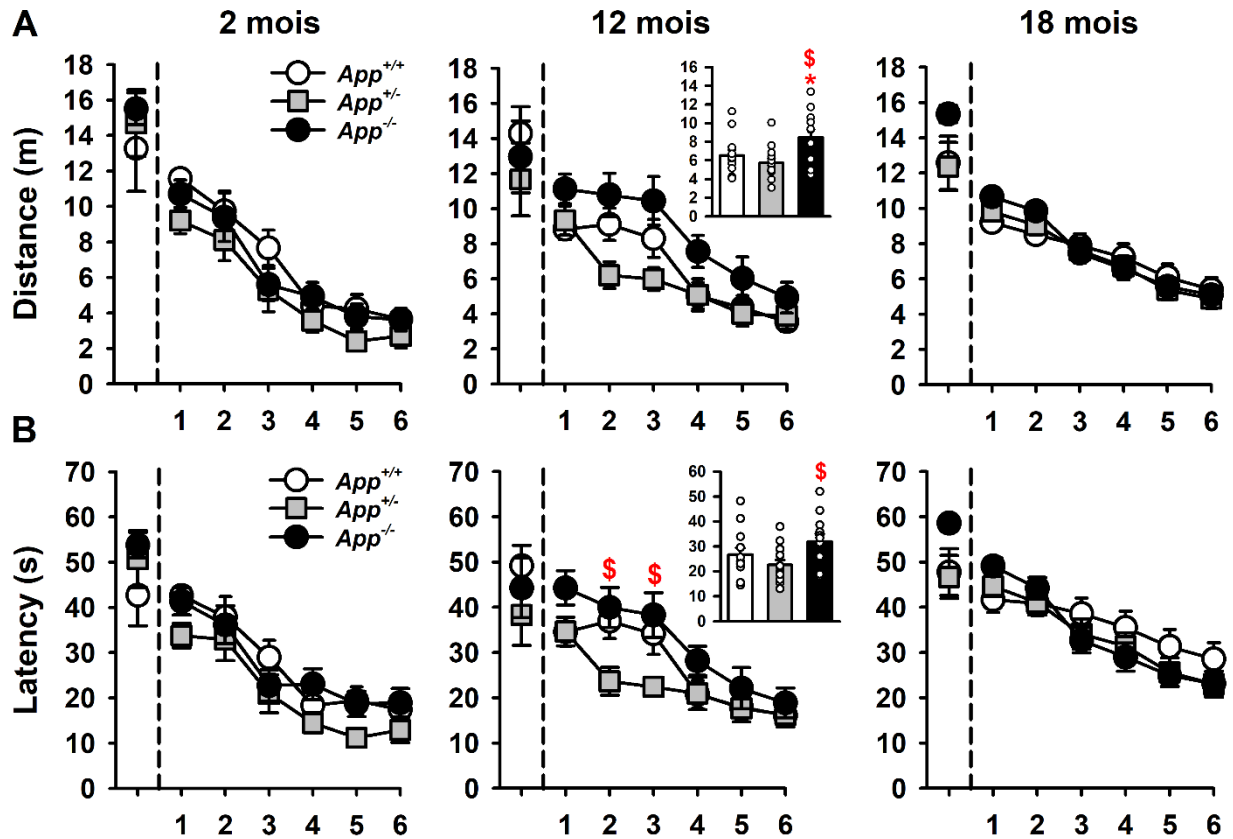
### 6.1.1- Analyse des résultats pour chaque âge

Concernant la **distance parcourue pour atteindre la plateforme (Figure 52-A)**, aucune différence n'est observée lors du premier essai du premier jour et ce pour les 3 âges étudiés (ANOVA à un facteur, effet du Génotype, à 2 mois  $F_{2,31}=0,40$  ; à 12 mois  $F_{2,35}=0,48$  ; à 18 mois  $F_{2,69}=2,29$ ). Par ailleurs, quel que soit l'âge étudié, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Jour) met en évidence un effet du Jour (à 2 mois,  $F_{5,155}=54,22$  ; à 12 mois  $F_{5,175}=33,92$  ; à 18 mois  $F_{5,345}=58,76$  ;  $p<0,001$ ). Cela s'explique par une diminution de la distance parcourue pour atteindre la plateforme au cours des jours d'apprentissage. Ainsi, aux 3 âges, l'ensemble des rats est capable d'apprendre la localisation de la plateforme. Par ailleurs, pour la cohorte de 12 mois, un effet significatif du Génotype est également observé (ANOVA à 2 facteurs,  $F_{2,35}=4,77$  ;  $p<0,05$ ). Les rats *App<sup>-/-</sup>* parcourent ainsi une distance plus importante pour atteindre la plateforme comparativement aux *App<sup>+/+</sup>* et *App<sup>+/-</sup>* ( $p<0,05$ ). Ils présentent ainsi un retard d'apprentissage. Cet effet du Génotype n'est pas présent aux âges de 2 et 18 mois (ANOVA à 2 facteurs, à 2 mois  $F_{2,31}=2,18$  ; à 18 mois  $F_{2,69}=0,12$ ). Par ailleurs, aux 3 âges étudiés, l'ANOVA à 2 facteurs ne montre pas d'interaction significative Génotype x Jour (à 2 mois  $F_{10,155}=0,47$  ; à 12 mois  $F_{10,175}=1,61$  ; à 18 mois  $F_{10,345}=1,38$ ).

Des résultats similaires sont obtenus avec l'étude de la **latence pour atteindre la plateforme (Figure 52-B)**. Ainsi, aucune différence n'est observée lors du premier essai du premier jour d'acquisition pour les 3 âges étudiés (ANOVA à un facteur, effet du Génotype, à 2 mois  $F_{2,31}=1,11$  ; à 12 mois  $F_{2,35}=0,84$  ; à 18 mois  $F_{2,69}=3,01$ ). L'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Jour) montre également un effet significatif du Jour aux 3 âges ( $p<0,001$  ; à 2 mois  $F_{5,155}=42,85$  ; à 12 mois  $F_{5,175}=31,85$  ; à 18 mois  $F_{5,345}=45,15$ ). Par ailleurs, à l'âge de **2 mois**, l'ANOVA à 2 facteurs ne met pas en évidence d'effet du Génotype ( $F_{2,31}=2,64$ ), ni d'interaction Jour x Génotype ( $F_{10,155}=0,60$ ). A l'inverse, à l'âge de **12 mois**, un effet significatif du Génotype ( $F_{2,35}=3,27$  ;  $p<0,05$ ) et une interaction Génotype x Jour ( $F_{10,175}=2,13$  ;  $p<0,05$ ) sont observés. Ainsi, les rats *App<sup>-/-</sup>* mettent plus de temps à atteindre la plateforme comparativement aux *App<sup>+/-</sup>*. Plus précisément, ils mettent plus de temps à atteindre la plateforme au cours des jours 2 et 3 ( $p<0,05$ ). Ces résultats confirment donc le retard d'apprentissage mis en évidence avec l'analyse de la distance parcourue. Enfin, à l'âge de **18 mois**, une interaction Génotype x Jour est également observée ( $F_{10,345}=2,24$  ;  $p<0,05$ ). Cependant, le test « post-hoc » de Newman-Keuls ne montre pas de différence significative. Par ailleurs, aucun effet du Génotype n'est mis en évidence ( $F_{2,69}=0,41$ ).

En résumé, l'analyse de la distance parcourue et de la latence pour atteindre la plateforme a permis de mettre en évidence un retard d'apprentissage chez les rats *App<sup>-/-</sup>* de 12 mois. Ce dernier apparaît avec

l'âge puisqu'il n'est pas visible à l'âge de 2 mois. Par ailleurs, il n'est pas retrouvé à l'âge de 18 mois. Nous savons que les performances des animaux WT se dégradent avec le vieillissement.



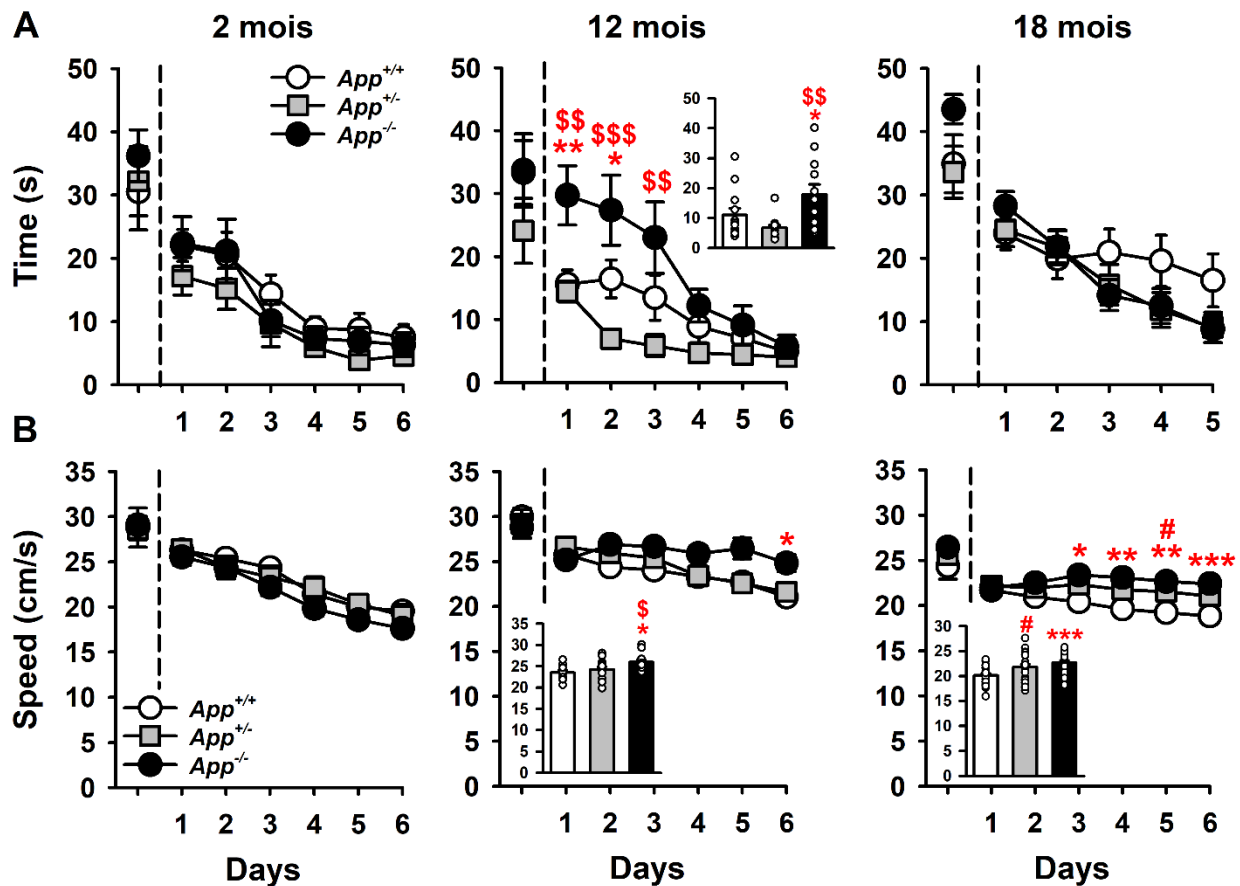
**Figure 52:** Distance parcourue et latence pour atteindre la plateforme pour les rats *App*<sup>+/+</sup> et *App*<sup>-/-</sup> lors de la phase d'acquisition dans la piscine de Morris

(A) Distance parcourue pour atteindre la plateforme lors de la phase d'acquisition. Aucune différence n'est observée entre les génotypes aux âges de 2 et 18 mois. En revanche, à l'âge de 12 mois, les rats *App*<sup>-/-</sup> parcourent une distance plus importante. (B) Latence pour atteindre la plateforme lors de la phase d'acquisition. Pour les cohortes de 2 et 18 mois, aucune différence n'est observée entre les génotypes. A l'âge de 12 mois, les rats *App*<sup>-/-</sup> mettent plus de temps à atteindre la plateforme comparativement aux *App*<sup>+/+</sup>. Les valeurs représentent des moyennes ± erreur-type. Statistiques : \*  $p < 0,05$  vs. *App*<sup>+/+</sup> ; §  $p < 0,05$  *App*<sup>-/-</sup> vs. *App*<sup>+/+</sup>.

Le temps passé à nager à proximité des parois, appelé thigmotaxie, a également été mesuré (Figure 53-A). L'ANOVA à un facteur, réalisée pour le premier essai du premier jour d'acquisition, ne montre pas de différence entre les génotypes et ce à tous les âges (à 2 mois  $F_{2,31}=0,32$  ; à 12 mois  $F_{2,35}=1,05$  ; à 18 mois  $F_{2,69}=2,77$ ). Par ailleurs, un effet significatif du Jour est mis en évidence par l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Jour) pour les 3 âges étudiés ( $p < 0,001$  ; à 2 mois  $F_{5,155}=29,57$  ; à 12 mois  $F_{5,175}=30,29$  ; à 18 mois

$F_{5,345}=39,86$ ). Cela traduit une diminution de la thigmotaxie au cours des jours d'apprentissage. Ce résultat est attendu puisqu'au cours des jours les animaux apprennent le principe de la tâche et donc la localisation de la plateforme. Par conséquent, les rats passent moins de temps en thigmotaxie à essayer de trouver une échappatoire au niveau de la paroi. Cela reflète également une baisse de l'anxiété du fait d'une familiarisation avec la tâche. De plus, à **2 mois**, l'ANOVA à 2 facteurs ne montrent pas d'effet significatif du Génotype ( $F_{2,31}=1,01$ ), ni d'interaction Jour x Génotype ( $F_{10,155}=0,37$ ). En revanche, pour la cohorte de **12 mois**, un effet significatif du Génotype ( $F_{2,35}=5,79$  ;  $p<0,01$ ) ainsi qu'une interaction Génotype x Jour ( $F_{10,175}=4,54$  ;  $p<0,001$ ) sont mis en évidence. Le premier traduit une thigmotaxie plus importante chez les rats  $App^{-/-}$  comparés aux  $App^{+/+}$  ( $p<0,05$ ) et  $App^{+/-}$  ( $p<0,01$ ). Plus particulièrement, les rats  $App^{-/-}$  présentent une thigmotaxie plus importante aux jours 1 ( $p<0,01$  vs.  $App^{+/+}$  et  $App^{+/-}$ ), 2 ( $p<0,05$  vs.  $App^{+/+}$  et  $p<0,001$  vs.  $App^{+/-}$ ) et 3 d'acquisition ( $p<0,01$  vs.  $App^{+/-}$ ). Enfin à l'âge de **18 mois**, seule une interaction Génotype x Jour est mise en évidence ( $F_{10,345}=3,53$  ;  $p<0,001$ ), l'effet du Génotype n'est pas significatif ( $F_{2,69}=0,88$ ). Cependant, le test « post-hoc » de Newman-Keuls ne montre pas de différence significative.

En conclusion, une différence dans le temps passé à proximité des parois est observée uniquement chez les  $App^{-/-}$  à l'âge de 12 mois. Cela laisse supposer que ces animaux pourraient être plus stressés, anxieux. Cependant, cela n'est pas en accord avec les observations faites dans les tests du labyrinthe en croix surélevé et du champ ouvert. En effet, dans ces tests, aucune différence n'a été observée pour le niveau d'anxiété. Nous pouvons donc supposer que les rats  $App^{-/-}$  à 12 mois présentent plus de difficultés à comprendre le principe de la tâche ou à mettre en place une stratégie adaptée. Ainsi, ils persisteraient plus longtemps à essayer de trouver une échappatoire au niveau de la paroi.



**Figure 53: Thigmotaxie et vitesse de nage pour les rats  $App^{+/-}$  et  $App^{-/-}$  lors de la phase d'acquisition dans la piscine de Morris**

(A) Temps passé en thigmotaxie lors de la phase d'acquisition. Une différence est observée uniquement à l'âge de 12 mois, les rats  $App^{-/-}$  font ainsi significativement plus de thigmotaxie. (B) Vitesse de nage lors de la phase d'acquisition. Une augmentation de la vitesse de nage est mise en évidence chez les rats  $App^{-/-}$  aux âges de 12 et 18 mois. Par ailleurs, pour la cohorte de 18 mois, les rats  $App^{+/-}$  présentent également une augmentation de leur vitesse de nage. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type. Statistiques : \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$   $App^{-/-}$  vs.  $App^{+/+}$ ; \$  $p < 0,05$ , \$\$  $p < 0,01$ , \$\$\$  $p < 0,001$   $App^{-/-}$  vs.  $App^{+/-}$ ; #  $p < 0,05$   $App^{+/-}$  vs.  $App^{+/+}$ .

Enfin, la **vitesse de nage** au cours des jours d'apprentissage a été mesurée (Figure 53-B). Comme pour les paramètres précédents, aucune différence n'est observée entre les génotypes au cours du premier essai du premier jour d'acquisition (ANOVA à un facteur, effet du Génotype, à 2 mois  $F_{2,31}=0,024$  ; à 12 mois  $F_{2,35}=0,20$  ; à 18 mois  $F_{2,69}=1,06$ ). L'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Jour) met en évidence un effet significatif du Jour aux 3 âges étudiés ( $p < 0,001$  ; à 2 mois  $F_{5,155}=50,56$  ; à 12 mois  $F_{5,175}=12,78$  ; à 18 mois  $F_{5,345}=6,49$ ). Cela traduit, aux âges de **2 et 12 mois**, une diminution de la vitesse de nage au cours des jours d'apprentissage. A l'âge de **18 mois**, seule une diminution significative est observée au dernier jour d'apprentissage. Par ailleurs, à l'âge de **2 mois**, aucun effet du Génotype ( $F_{2,31}=1,21$ ) ou d'interaction

Génotype x Jour ( $F_{10,155}=0,46$ ) ne sont observés. Pour la cohorte de **12 mois**, en revanche, les rats *App*<sup>-/-</sup> nagent significativement plus vite que les *App*<sup>+/+</sup> et *App*<sup>+/-</sup> ( $p<0,05$ , ANOVA à 2 facteurs, effet du Génotype  $F_{2,35}=4,46$ ). De plus, une interaction Génotype x Jour est également mise en évidence ( $F_{10,175}=2,72$ ;  $p<0,01$ ). Ainsi, au dernier jour d'acquisition, les rats *App*<sup>-/-</sup> nagent significativement plus vite que les *App*<sup>+/+</sup> ( $p<0,05$ ). Enfin, pour la cohorte de **18 mois**, l'ANOVA à 2 facteurs met également en évidence un effet du Génotype ( $F_{2,69}=7,75$ ;  $p<0,001$ ) et une interaction Jour x Génotype ( $F_{10,345}=4,0$ ;  $p<0,001$ ). Ainsi, les rats *App*<sup>+/-</sup> et *App*<sup>-/-</sup> nagent significativement plus vite que les rats *App*<sup>+/+</sup> ( $p<0,05$  et  $p<0,001$ , respectivement). Plus précisément, les rats *App*<sup>-/-</sup> nagent significativement plus vite que les rats *App*<sup>+/+</sup> aux jours 3 ( $p<0,05$ ), 4 ( $p<0,01$ ), 5 ( $p<0,01$ ) et 6 ( $p<0,001$ ) d'apprentissage et que les rats *App*<sup>+/-</sup> au jour 5 ( $p<0,05$ ).

En résumé, aucune différence de la vitesse de nage n'est observée à l'âge de 2 mois. En revanche, à partir de l'âge de 12 mois, les rats *App*<sup>-/-</sup> nagent significativement plus vite que les rats *App*<sup>+/+</sup>. Ainsi, le retard d'apprentissage observé chez les rats *App*<sup>-/-</sup> ne serait pas lié à un problème moteur.

### 6.1.2- Effet du vieillissement

Une analyse de l'effet du vieillissement a été réalisée uniquement pour la distance parcourue et la latence d'atteinte de la plateforme, ainsi que pour la thigmotaxie qui sont les 3 paramètres-clés pour évaluer l'apprentissage spatial des animaux.

L'ANOVA à 3 facteurs (Age x Génotype x Jour) réalisée sur la **distance parcourue pour atteindre la plateforme** lors de l'acquisition montre un effet significatif de l'Age ( $F_{2,135}=4,02$ ;  $p<0,05$ ), du Génotype ( $F_{2,135}=4,78$ ;  $p<0,01$ ) et du Jour ( $F_{5,675}=144,18$ ;  $p<0,001$ ). Ainsi, une augmentation globale de la distance parcourue pour atteindre la plateforme est observée à l'âge de 18 mois par rapport à l'âge de 2 mois ( $p<0,05$ ). Par ailleurs, les rats *App*<sup>-/-</sup> parcourent une distance plus importante comparés aux *App*<sup>+/+</sup> ( $p<0,05$ ). L'effet du Jour indique, quant à lui, une diminution globale de la distance parcourue au cours des jours d'apprentissage. Une interaction Jour x Age est également mise en évidence ( $F_{10,675}=4,41$ ;  $p<0,001$ ). Cela s'explique par une diminution de la distance parcourue au cours des jours pour les 3 âges étudiés, qui est cependant moins importante à l'âge de 18 mois. Une tendance à la significativité est observée pour l'interaction Age x Génotype ( $F_{4,135}=2,02$ ;  $p=0,095$ ). Le test « post-hoc » indique que, uniquement à l'âge de 12 mois, les rats *App*<sup>-/-</sup> parcourent une distance plus importante que les rats *App*<sup>+/+</sup> ( $p<0,05$ ). Aucune des interactions Jour x Génotype ( $F_{10,675}=1,03$ ) ou Jour x Age x Génotype ( $F_{20,675}=1,25$ ) n'est significative.

L'analyse réalisée pour la **latence pour atteindre la plateforme** montre également un effet de l'Age ( $F_{2,135}=13,15$  ;  $p<0,001$ ), du Génotype ( $F_{2,135}=3,57$  ;  $p<0,05$ ) et du Jour ( $F_{5,675}=106,0$  ;  $p<0,001$ ). Ainsi, l'effet de l'Age montre qu'à 18 mois l'ensemble des animaux met plus de temps à atteindre la plateforme comparé à 2 et 12 mois ( $p<0,001$ ). L'analyse « post-hoc » réalisée pour l'effet du Génotype ne met pas en évidence de différence significative. L'effet du Jour traduit, comme observée pour la distance, une diminution de la latence pour atteindre la plateforme au cours des jours d'apprentissage. Par ailleurs, les interactions Jour x Age ( $F_{10,675}=1,81$  ;  $p=0,056$ ) et Jour x Age x Génotype ( $F_{20,675}=1,54$  ;  $p=0,061$ ) tendent à être significatives. La première indique une diminution de la latence pour atteindre la plateforme aux 3 âges étudiés, diminution qui tend cependant à être moins importante à l'âge de 18 mois. Plus précisément, aucune diminution significative de la latence n'est observée chez les rats *App<sup>+/-</sup>* de 18 mois avant le 6<sup>ème</sup> jour d'apprentissage ( $p<0,05$  Jour 1 vs. Jour 6).

Concernant la **thigmotaxie**, l'ANOVA à 3 facteurs (Age x Génotype x Jour) montre un effet significatif de l'Age ( $F_{2,135}=3,89$  ;  $p<0,05$ ) et du Jour ( $F_{5,675}=87,31$  ;  $p<0,001$ ). L'effet de l'Age indique ainsi une augmentation de la thigmotaxie chez les rats âgés de 18 mois par rapport à l'âge de 2 mois ( $p<0,05$ ). L'effet du Jour traduit, comme pour les paramètres précédents, une diminution de la thigmotaxie au cours des jours d'apprentissage. Les interactions Jour x Génotype ( $F_{10,675}=3,43$  ;  $p<0,001$ ) et Jour x Age x Génotype ( $F_{20,675}=2,05$  ;  $p<0,01$ ) sont également significatives. Ainsi, de manière globale, les rats *App<sup>-/-</sup>* font plus de thigmotaxie au 1<sup>er</sup> jour d'apprentissage comparés aux autres génotypes ( $p<0,05$ ). La diminution de la thigmotaxie au cours des jours d'apprentissage est plus importante chez ces animaux. De façon plus précise, une diminution plus importante de la thigmotaxie au cours des jours est observée chez les rats *App<sup>-/-</sup>* à l'âge de 12 mois. Ce résultat est retrouvé à l'âge de 18 mois chez les *App<sup>-/-</sup>* et également chez les rats *App<sup>+/-</sup>*.

En résumé, les analyses de l'effet du vieillissement réalisées pour ces différents paramètres montrent de moins bonnes performances à l'âge de 18 mois comparés aux âges plus précoces. En effet, les animaux de 18 mois parcourent une distance plus importante et mettent plus de temps à atteindre la plateforme. De plus, la diminution de ces 2 paramètres au cours des jours, traduisant un apprentissage, est moins importante comparée aux âges de 2 et 12 mois. Les rats âgés de 18 mois font également plus de thigmotaxie. Cela pourrait traduire plus de difficultés à comprendre le principe de la tâche ou à mettre en place une stratégie efficace pour retrouver la plateforme. Ces observations sont en accord avec la dégradation connue des performances des animaux avec l'âge (Harati et al. 2011; 2013). Par ailleurs, l'absence d'APP impacte les performances des rats *App<sup>-/-</sup>* uniquement à l'âge de 12 mois. A cet âge, une

augmentation de la distance parcourue est ainsi observée chez ces animaux comparés aux rats *App<sup>+/-</sup>*. Cependant, l'évolution des performances des animaux au cours du vieillissement sont similaires entre les génotypes.

## 6.2- Test de rappel

Afin d'évaluer la mémoire spatiale, un test de rappel est réalisé 24h après le dernier jour d'acquisition, en l'absence de plateforme. Le pourcentage de temps passé dans les différents quadrants et en particulier dans le quadrant cible, c'est-à-dire là où se trouvait la plateforme pendant l'acquisition, est mesuré. Le nombre de croisements de l'annulus, zone virtuelle de 30cm de diamètre centrée sur la plateforme, est également compté. Ce dernier est un indicateur de la précision du souvenir.

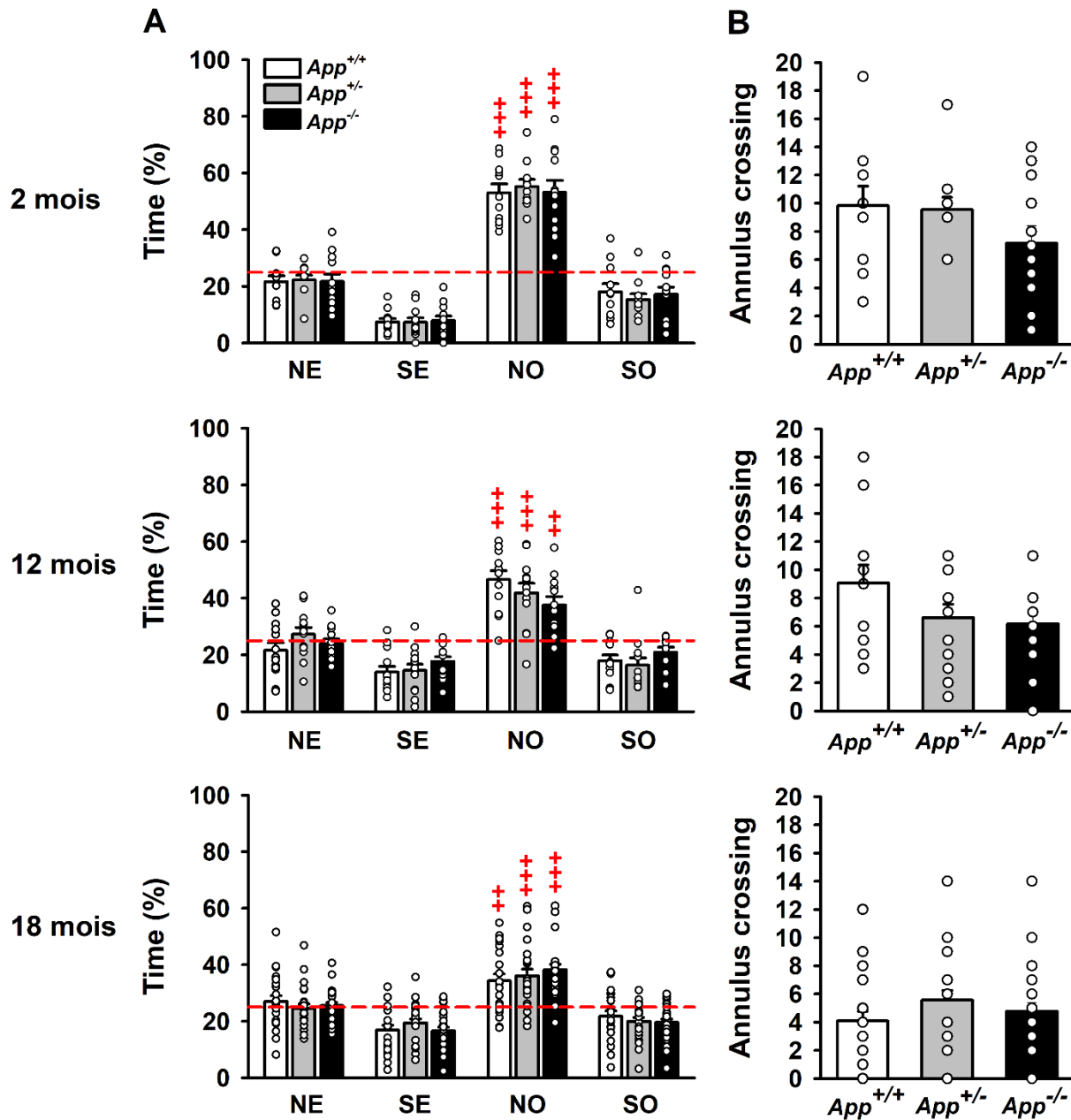
### 6.2.1- Analyse des résultats pour chaque âge

Tout d'abord, concernant le **pourcentage de temps passé dans les quadrants (Figure 54-A)**, les ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Quadrant) montrent un effet significatif du Quadrant pour tous les âges ( $p < 0,001$ , à 2 mois  $F_{3,93}=143,2$  ; à 12 mois  $F_{3,105}=52,21$  ; à 18 mois  $F_{3,207}=50,62$ ). Ainsi, l'ensemble des rats passent significativement plus de temps dans le quadrant cible (QC), quadrant NO, comparé aux autres quadrants, et ce pour les 3 âges étudiés ( $p < 0,001$ ). Aucun effet du Génotype (à 2 mois  $F_{2,31}=0,0006$  ; à 12 mois  $F_{2,35}=0,29$  ; à 18 mois  $F_{2,69}=0,47$ ) ou de l'interaction Génotype x Quadrant (à 2 mois  $F_{6,93}=0,14$  ; à 12 mois  $F_{6,105}=1,54$  ; à 18 mois  $F_{6,207}=0,77$ ) ne sont observés. Par ailleurs, une comparaison à 25%, correspondant au hasard, a été réalisée pour le QC. L'analyse du test *t* de Student montre que tous les rats passent significativement plus de 25% de leur temps dans le QC. Ce résultat est observé pour tous les âges étudiés (à 2 mois :  $p < 0,001$  pour *App<sup>+/+</sup>*, *App<sup>+/-</sup>* et *App<sup>-/-</sup>* ; à 12 mois :  $p < 0,001$  pour *App<sup>+/+</sup>* et *App<sup>+/-</sup>* ;  $p < 0,01$  pour *App<sup>-/-</sup>* ; à 18 mois :  $p < 0,01$  pour *App<sup>+/+</sup>* et  $p < 0,001$  pour *App<sup>+/-</sup>* et *App<sup>-/-</sup>*).

Concernant les **croisements de l'annulus (Figure 54-B)**, les ANOVA à un facteur réalisées aux 3 âges ne montrent pas d'effet significatif du Génotype (à 2 mois  $F_{2,31}=1,53$  ; à 12 mois  $F_{2,35}=2,04$  ; à 18 mois  $F_{2,69}=0,18$ ). Le nombre de croisements de l'annulus est donc comparable entre les génotypes, quel que soit l'âge étudié.

Nous pouvons donc conclure que l'ensemble des rats est capable de rappeler la localisation de la plateforme aux 3 âges. Cela est visible par le fait qu'ils passent plus de 25% de leur temps dans le QC. Par

ailleurs, l'absence d'APP n'impacte pas la précision du souvenir. Ainsi, les rats  $App^{+/-}$  et  $App^{-/-}$  ne présentent pas de déficit de mémoire spatiale.



**Figure 54: Mémoire spatiale chez les rats  $App^{+/-}$  et  $App^{-/-}$  lors du test de rappel en piscine de Morris**

(A) Pourcentage de temps passé dans les 4 quadrants lors du test de rappel. L'ensemble des rats passe significativement plus de 25% de leur temps dans le quadrant NO, où se trouvait la plateforme, aux 3 âges étudiés. Aucun déficit de mémoire spatiale n'est donc observé chez les rats  $App^{+/-}$  et  $App^{-/-}$ . (B) Nombre de croisements de l'annulus lors du test de rappel. Aucune différence n'est observée entre les génotypes. Les rats  $App^{+/-}$  et  $App^{-/-}$  ne présentent pas de différence dans la précision du souvenir. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type. Statistiques : ++  $p < 0,01$  et +++  $p < 0,001$  vs. hasard (25%).



## 6.2.2- Effet du vieillissement

L'étude de l'effet du vieillissement réalisée pour le **pourcentage de temps passé dans le QC** montre un effet de l'Age (ANOVA à 2 facteurs (Age x Génotype),  $F_{2,135}=28,60$  ;  $p<0,001$ ). Cet effet s'explique par une diminution du pourcentage de temps passé dans le QC avec l'âge. Ainsi, de façon globale, les rats passent plus de temps dans le QC à l'âge de 2 mois comparé aux âges de 12 et 18 mois ( $p<0,001$ ). C'est également le cas à l'âge de 12 mois, où ils y passent plus de temps par rapport à l'âge de 18 mois ( $p<0,05$ ). L'effet du Génotype ( $F_{2,135}=0,27$ ) et l'interaction Age x Génotype ( $F_{4,135}=1,48$ ) ne sont pas significatifs.

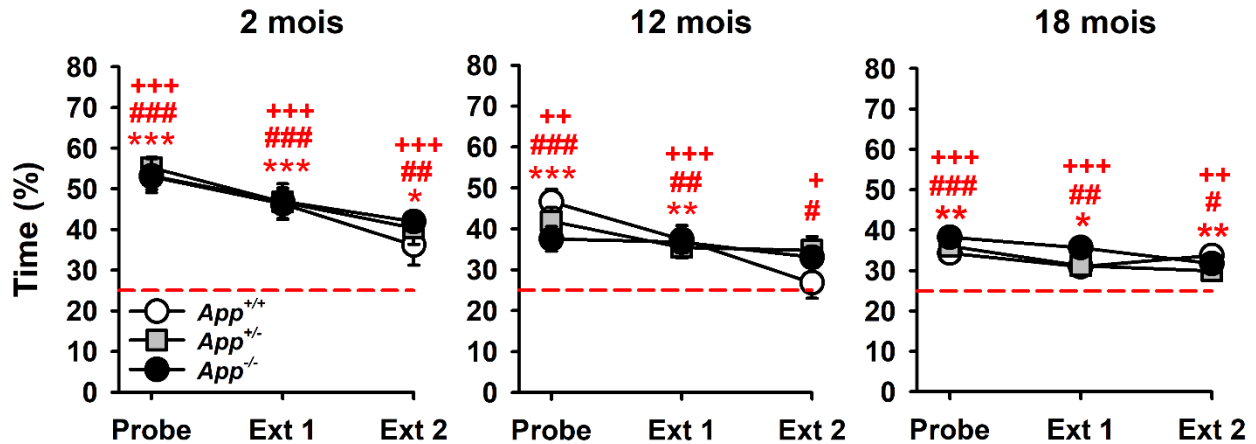
De la même façon pour le **nombre de croisements de l'annulus**, l'ANOVA à 2 facteurs (Age x Génotype) met en évidence un effet de l'Age ( $F_{2,135}=16,01$  ;  $p<0,001$ ). Ainsi, à 18 mois, les rats croisent significativement moins l'emplacement de la plateforme comparés aux âges de 2 mois ( $p<0,001$ ) et 12 mois ( $p<0,01$ ). Aucune différence n'est observée pour l'effet du Génotype ( $F_{2,135}=2,40$ ) et pour l'interaction Age x Génotype ( $F_{4,135}=1,95$ ).

En résumé, les résultats mettent en évidence une dégradation des performances avec l'âge. En effet, à l'âge de 18 mois, les animaux présentent des performances qui sont globalement moins bonnes comparées aux précédents âges de l'étude. Par ailleurs, cette dégradation des performances n'est pas influencée par l'absence d'APP.

## 6.3- Phase d'extinction

### 6.3.1- Analyse des résultats pour chaque âge

Les capacités d'extinction des rats ont été évaluées sur les 2 jours suivants le test de rappel. Les rats effectuent alors un unique essai de 1 min, dans les mêmes conditions que le test de rappel, donc en l'absence de plateforme. Le temps passé dans le QC est alors évalué (**Figure 55**).



**Figure 55: Flexibilité comportementale des rats  $App^{+/-}$  et  $App^{-/-}$  lors de la phase d'extinction en piscine de Morris**

Représentation du pourcentage de temps passé dans le QC, où se trouvait la plateforme auparavant (quadrant NO), pour le test de rappel (Probe), le premier (Ext 1) et deuxième (Ext 2) jour d'extinction. A l'âge de 2 mois, une diminution du temps passé dans le QC est observée au cours des jours pour l'ensemble des animaux, ce qui traduit une extinction du souvenir spatial. Cette diminution n'est pas retrouvée chez les  $App^{+/-}$  et  $App^{-/-}$  à l'âge de 12 mois. Ils présentent donc un déficit d'extinction. A l'âge de 18 mois, aucun processus d'extinction n'est observé chez les 3 génotypes. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type. *Statistiques* : comparaison au hasard (25%) : \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$  pour les  $App^{+/+}$ ; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  et ###  $p < 0,001$  pour les  $App^{+/-}$ ; +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$  et +++  $p < 0,001$  vs.  $App^{-/-}$ .

Pour la cohorte de **2 mois**, la comparaison du temps passé dans le QC à 25% montre que tous les rats y passent significativement plus de 25% de leur temps que ce soit au jour 1 d'extinction (test  $t$  de Student,  $p < 0,001$  pour  $App^{+/+}$ ,  $App^{+/-}$  et  $App^{-/-}$ ) ou au jour 2 ( $p < 0,05$  pour  $App^{+/+}$ ;  $p < 0,01$  pour  $App^{+/-}$ ;  $p < 0,001$  pour  $App^{-/-}$ ). De plus, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Jour) met en évidence un effet significatif du Jour ( $F_{2,62}=15,17$ ;  $p < 0,001$ ) alors qu'aucun effet n'est observé pour le Génotype ( $F_{2,31}=0,27$ ), pas plus que pour l'interaction Génotype x Jour ( $F_{4,62}=0,27$ ). L'effet du jour s'explique par une diminution du temps passé dans le QC au cours des jours d'extinction. Cette diminution est attendue puisqu'elle est le témoin d'une extinction du souvenir spatial. En effet, les rats apprennent que la plateforme n'est plus présente dans le QC et vont la chercher dans les autres quadrants. Ainsi, bien que le temps passé dans le QC reste significativement supérieur à 25%, le fait qu'il diminue au cours des jours indique la mise en place d'un processus d'extinction. L'ensemble des rats est donc capable de mettre en place un nouvel apprentissage, ils ne présentent pas de déficit d'extinction.

A l'âge de **12 mois**, le test  $t$  de Student montre que l'ensemble des rats passent significativement plus de 25% de leur temps dans le QC lors du jour 1 d'extinction ( $p < 0,01$  pour  $App^{+/+}$  et  $App^{+/-}$ ;  $p < 0,001$  pour  $App^{-/-}$ ).

⁻). En revanche, lors du 2<sup>ème</sup> jour d'extinction, les rats *App<sup>+/+</sup>* ne passent pas significativement plus de 25% de leur temps dans le QC ( $p=0,64$ ). Cela n'est pas observé pour les rats *App<sup>+/-</sup>* et *App<sup>-/-</sup>* qui continuent à passer plus de 25% de leur temps dans le QC au 2<sup>ème</sup> jour d'extinction ( $p<0,05$ ). Par ailleurs, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Jour) montre un effet significatif du Jour ( $F_{2,70}=18,11$  ;  $p<0,001$ ). De manière globale, une diminution du temps passé dans le QC est observée au cours des jours d'extinction. Une interaction significative Génotype x Jour est également observée ( $F_{4,70}=4,12$ ,  $p<0,01$ ). Le test « post-hoc » révèle ainsi une diminution du temps passé dans le QC au cours des jours chez les *App<sup>+/+</sup>*, diminution qui n'est pas retrouvée chez les rats *App<sup>+/-</sup>* et *App<sup>-/-</sup>*. Aucun effet du Génotype n'est mis en évidence ( $F_{2,35}=0,096$ ). Ces résultats montrent donc une extinction chez les rats *App<sup>+/+</sup>*. En effet, chez ces derniers une diminution du temps passé dans la QC est observée. Cela signifie donc qu'ils ont appris que la plateforme n'était plus dans ce quadrant et qu'ils vont la chercher ailleurs. De plus, au jour 2 d'extinction, les *App<sup>+/+</sup>* ne passent pas significativement plus de 25% de leur temps dans le QC ce qui confirme la présence d'un mécanisme d'extinction chez ces animaux. En revanche, cette diminution n'est pas retrouvée chez les rats *App<sup>+/-</sup>* et *App<sup>-/-</sup>* qui persistent à chercher la plateforme dans le QC. Ces animaux présentent donc un déficit d'extinction, qui pourrait correspondre à de la persévérance.

Pour la cohorte de **18 mois**, le test t de Student indique que tous les rats passent significativement plus de 25% de leur temps dans le QC que ce soit au jour 1 d'extinction ( $p<0,05$  pour *App<sup>+/+</sup>* ;  $p<0,01$  pour *App<sup>+/-</sup>* et  $p<0,001$  pour *App<sup>-/-</sup>*), ou au jour 2 ( $p<0,01$  pour *App<sup>+/+</sup>* et *App<sup>-/-</sup>* ;  $p<0,05$  pour *App<sup>+/-</sup>*). De plus, un effet du Jour est mis en évidence pour l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Jour, effet du Jour  $F_{2,138}=7,32$  ;  $p<0,001$ ). Cet effet traduit une réduction du temps passé dans le QC entre le test de rappel et les 2 jours d'extinction ( $p<0,01$  vs. Jour 1 d'extinction ;  $p<0,001$  vs. Jour 2 d'extinction). En revanche, aucune différence n'est observée entre les 2 jours d'extinction. Au vu de ces résultats, nous pouvons conclure que l'ensemble des animaux présente un déficit d'extinction à l'âge de 18 mois. En effet, il n'y a pas de réelle diminution du temps passé dans le QC au cours de la phase d'extinction. Par ailleurs, l'ensemble des animaux persistent à chercher la plateforme dans le QC en y passant plus de 25% de leur temps aux 2 jours d'extinction.

En conclusion, nous observons, chez les rats *App<sup>+/-</sup>* et *App<sup>-/-</sup>*, l'apparition d'un déficit d'extinction avec l'âge, qui apparaît à l'âge de 12 mois. Par ailleurs, au stade plus avancé de 18 mois, la dégradation des performances des rats *App<sup>+/+</sup>*, du fait du vieillissement, induit chez ces derniers un déficit d'extinction. Les performances des 3 groupes génétiques sont alors similaires.

### 6.3.2- Effet du vieillissement

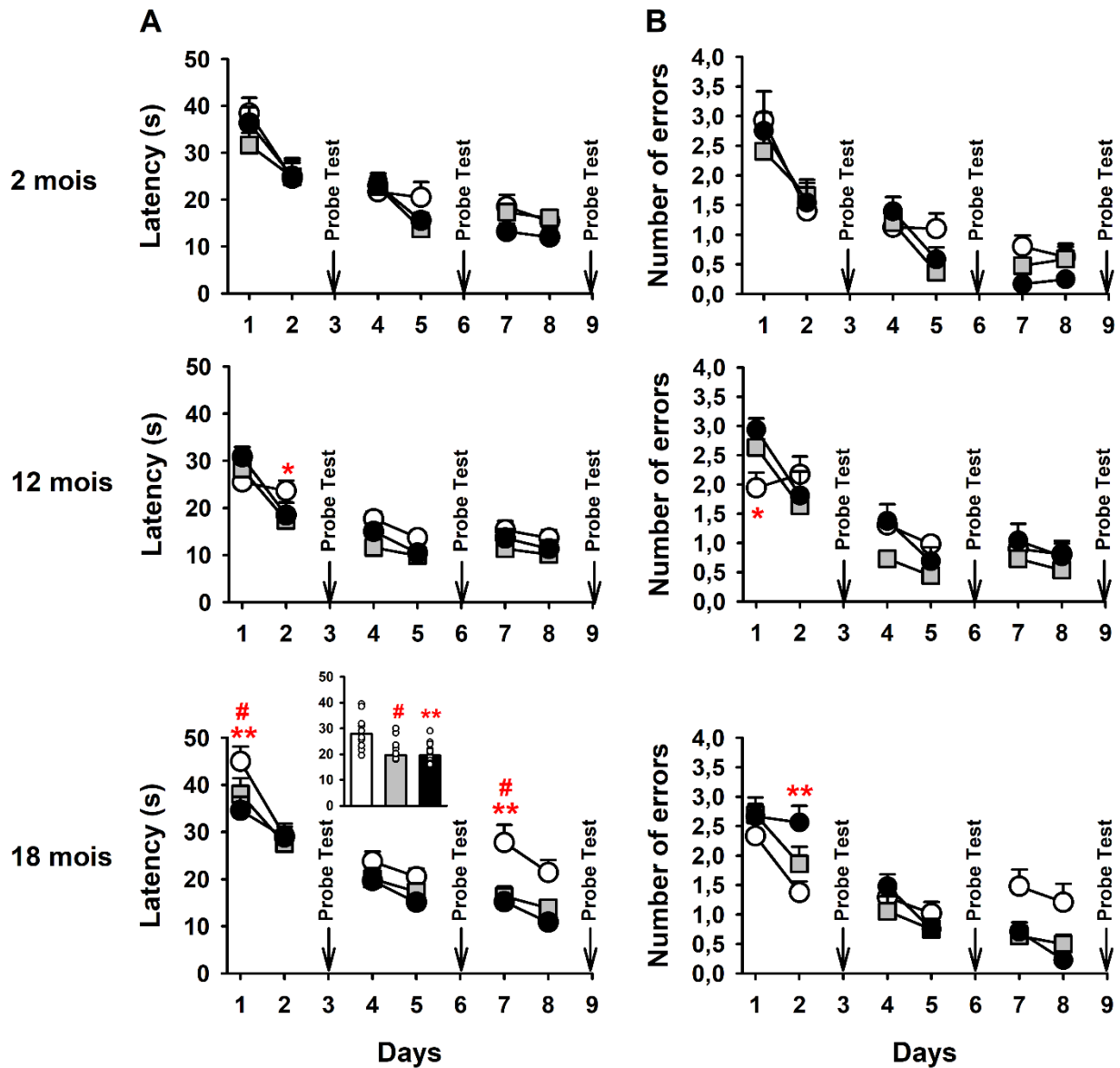
L'ANOVA à 3 facteurs (Age x Génotype x Jour) réalisée pour le pourcentage de temps passé dans le QC au cours de l'extinction montre un effet significatif de l'Age ( $F_{2,135}=25,94$  ;  $p<0,001$ ) et du Jour ( $F_{2,270}=44,58$  ;  $p<0,001$ ). L'effet de l'Age indique que les rats âgés de 2 mois passent significativement plus de temps dans le QC comparés aux âges de 12 et 18 mois ( $p<0,001$ ). Globalement, une diminution du temps passé dans ce quadrant est observée au cours des jours d'extinction. Par ailleurs, l'analyse met également en évidence des interactions significatives Jour x Age ( $F_{4,270}=4,64$  ;  $p<0,01$ ) et Jour x Age x Génotype ( $F_{8,270}=2,32$  ;  $p<0,05$ ). La première interaction montre une diminution du pourcentage de temps passé dans le QC au cours des jours à l'âge de 2 et 12 mois. Cette diminution est visible entre le test de rappel et les 2 jours d'extinction, mais également entre le 1<sup>er</sup> et 2<sup>ème</sup> jour d'extinction. En revanche, pour les animaux âgés de 18 mois, une diminution significative est observée uniquement entre le test de rappel et les 2 jours d'extinction, il n'y a pas de différence entre le 1<sup>er</sup> et le 2<sup>ème</sup> jour d'extinction. De façon plus précise, l'interaction Jour x Age x Génotype indique que dès l'âge de 12 mois, aucune diminution du temps passé dans le QC n'est observée chez les rats *App<sup>+/-</sup>* et *App<sup>-/-</sup>*. Cette absence de diminution du temps passé dans le QC n'apparaît qu'à l'âge de 18 mois chez les rats *App<sup>+/+</sup>*.

En conclusion, ces résultats viennent confirmer les observations faites pour chaque âge séparément. Ainsi, le déficit d'extinction apparaît de façon plus précoce chez les rats *App<sup>+/-</sup>* et *App<sup>-/-</sup>*, visible dès 12 mois, comparés aux rats *App<sup>+/+</sup>*, chez lesquels le déficit n'est visible qu'à l'âge de 18 mois.

## 7- Double H

Comme pour la piscine de Morris, le test du DH est un test aquatique permettant d'évaluer l'apprentissage spatial et la mémoire spatiale, ainsi que la flexibilité comportementale. L'avantage de ce test est qu'il permet d'étudier la stratégie mise en place par les animaux pour retrouver la plateforme. A noter que pour des raisons techniques, les résultats du DH pour la cohorte de 18 mois ont été analysés uniquement pour le second groupe.

## 7.1- Phase d'acquisition



**Figure 56: Apprentissage spatial chez les rats  $App^{+/-}$  et  $App^{-/-}$  lors du test du Double H**

(A) Latence pour atteindre la plateforme lors de la phase d'acquisition. Une diminution de la latence au cours des jours est observée chez l'ensemble des animaux aux 3 âges étudiés. A l'âge de 18 mois, les rats  $App^{+/-}$  présentent de moins bonnes performances, ils mettent ainsi plus de temps à atteindre la plateforme comparés aux  $App^{+/-}$  et  $App^{-/-}$ . (B) Nombre total d'erreurs. Aucune différence significative n'est observée entre les génotypes quel que soit l'âge étudié. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type. Statistiques : \*  $p < 0,05$  et \*\*  $p < 0,01$   $App^{-/-}$  vs.  $App^{+/-}$  ; #  $p < 0,05$   $App^{+/-}$  vs.  $App^{-/-}$ .

La phase d'acquisition se découpe en 3 phases de 2 jours comportant chacun 4 essais. Entre chacune de ces phases, un test de rappel est réalisé. Afin d'évaluer l'apprentissage, la latence pour atteindre la

plateforme ainsi que le nombre d'erreurs sont évalués. Une erreur est comptée à chaque fois qu'un rat rentre dans un bras autre que ceux permettant d'accéder directement à la plateforme.

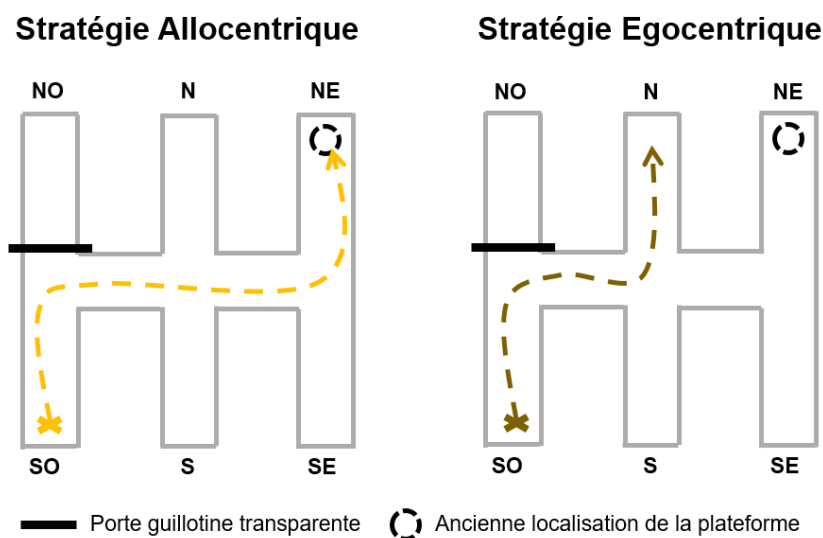
L'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Jour) réalisée pour la **latence d'atteinte de la plateforme (Figure 56-A)** indique un effet significatif du Jour, quel que soit l'âge étudié ( $p < 0,001$  ; à 2 mois  $F_{5,150}=1,67$  ; à 12 mois  $F_{5,175}=55,23$  ; à 18 mois  $F_{5,150}=56,75$ ). Cela s'explique par une diminution de la latence pour atteindre la plateforme au cours des jours, ce qui traduit un apprentissage. Par ailleurs, à l'âge de **2 mois** aucun effet du Génotype ( $F_{2,30}=0,40$ ), ni d'interaction Génotype x Jour ( $F_{10,150}=1,67$ ) ne sont mis en évidence. L'ensemble des rats apprennent donc de façon similaire. A l'âge de **12 mois**, aucun effet significatif du Génotype n'est observé ( $F_{2,35}=2,71$ ). En revanche l'interaction Génotype x Jour tend à être significative ( $F_{10,175}=1,86$  ;  $p=0,055$ ). L'analyse « post-hoc » indique ainsi que, lors du second jour d'acquisition, les rats *App<sup>+/+</sup>* mettent significativement plus de temps à atteindre la plateforme comparativement aux *App<sup>-/-</sup>* ( $p < 0,05$ ). Enfin à l'âge de **18 mois**, l'ANOVA à 2 facteurs indique un effet significatif du Génotype ( $F_{2,30}=6,79$  ;  $p < 0,01$ ) et une tendance à la significativité pour l'interaction Génotype x Jour ( $F_{10,150}=1,69$  ;  $p=0,088$ ). Les rats *App<sup>+/+</sup>* mettent globalement plus de temps à atteindre la plateforme comparativement aux *App<sup>+/-</sup>* ( $p < 0,05$ ) et *App<sup>-/-</sup>* ( $p < 0,01$ ). Ils présentent donc de moins bonnes performances. Plus particulièrement, cette augmentation de la latence chez les rats *App<sup>+/+</sup>* est observée aux 1<sup>er</sup> ( $p < 0,05$  vs. *App<sup>+/-</sup>* et  $p < 0,01$  vs. *App<sup>-/-</sup>*) et 5<sup>ème</sup> jours d'acquisition ( $p < 0,05$  vs. *App<sup>+/-</sup>* et  $p < 0,01$  vs. *App<sup>-/-</sup>*).

Concernant le **nombre d'erreurs (Figure 56-B)**, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Jour) met également en évidence un effet significatif du Jour, quel que soit l'âge des animaux ( $p < 0,001$  ; à 2 mois  $F_{5,150}=39,25$  ; à 12 mois  $F_{5,175}=33,74$  ; à 18 mois  $F_{5,150}=31,88$ ). Le nombre d'erreurs commises par les rats diminue au cours des jours d'apprentissage. Par ailleurs, pour les 3 groupes d'âge, aucun effet du Génotype n'est observé (à 2 mois  $F_{2,30}=0,71$  ; à 12 mois  $F_{2,35}=1,81$  ; à 18 mois  $F_{2,30}=0,60$ ). Pour ce qui est de l'interaction Génotype x Jour, elle n'est pas significative à l'âge de 2 mois ( $F_{10,150}=1,067$ ) et tend à l'être pour la cohorte de 12 mois ( $F_{10,175}=1,76$  ;  $p=0,071$ ). Pour cette dernière, le test « post-hoc » montre que les rats *App<sup>+/+</sup>* font significativement moins d'erreurs que les *App<sup>-/-</sup>* lors du 1<sup>er</sup> jour d'acquisition ( $p < 0,05$ ). A l'âge de 18 mois, l'ANOVA à 2 facteurs indique une interaction Génotype x Jour ( $F_{10,150}=3,70$  ;  $p < 0,001$ ). Ainsi, les rats *App<sup>-/-</sup>* commettent significativement plus d'erreurs que les rats *App<sup>+/+</sup>* lors du 2<sup>ème</sup> jour d'apprentissage ( $p < 0,01$ ).

En conclusion, une diminution de la latence et du nombre d'erreurs est observée au cours des jours d'apprentissage pour l'ensemble des animaux. Ainsi, tous les rats sont capables d'apprendre la localisation de la plateforme. Par ailleurs, l'absence d'APP n'impacte pas les performances des animaux. En effet, seules des variations ponctuelles du nombre d'erreurs sont observées chez les rats *App<sup>-/-</sup>*.

## 7.2- Tests de rappel

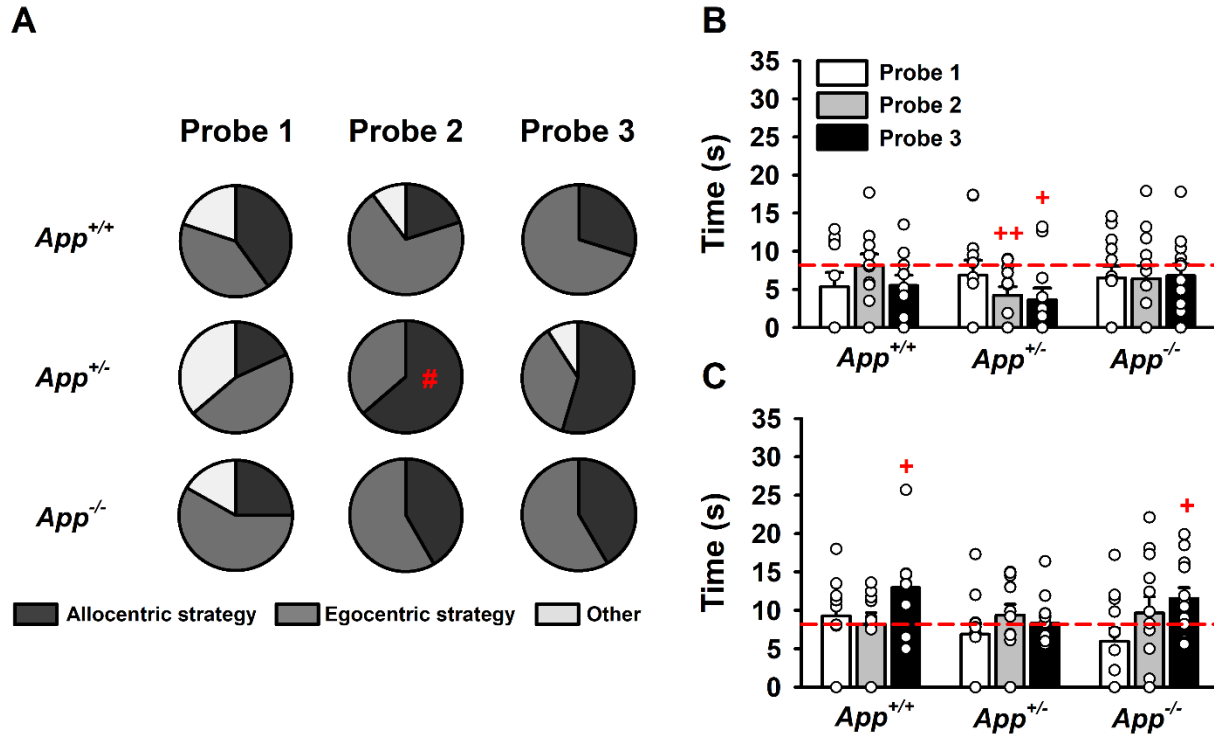
Lors des tests de rappel, les rats effectuent un unique essai d'une durée maximale de 1 min en l'absence de plateforme. Le 1<sup>er</sup> bras visité est alors relevé. Il permet de déterminer la première stratégie mise en place par les rats pour retrouver la plateforme. Trois groupes sont définis en fonction du bras visité (**Figure 57**) : un groupe « Stratégie allocentrique » lorsque les rats vont directement dans le bras où se trouvait la plateforme au cours de l'acquisition, soit dans le bras NE. Ces rats se sont donc basés sur les indices allothétiques présents dans la pièce pour retrouver la plateforme. Ensuite, le groupe « Stratégie égocentrique » lorsque les rats sont rentrés dans le bras N. Ils ont alors reproduit l'une des séquences de mouvements apprises lors de la phase d'acquisition, soit Droite-Gauche. Enfin, un groupe « Autres » lorsque les rats entrent en 1<sup>er</sup> dans un bras autre que les bras NE et N. Par ailleurs, le temps passé dans les bras N et NE est également évalué.



**Figure 57:** Stratégies pouvant être utilisées lors des tests de rappel dans le test du Double H

Lors des tests de rappel, les rats sont lâchés à l'extrémité du bras SO. L'accès au bras NO est bloqué par une porte guillotine transparente. Le premier bras visité par l'animal permet de déterminer la stratégie mise en place pour retrouver la localisation de la plateforme. La stratégie allocentrique est basée sur l'utilisation des indices allothétiques présents dans la pièce. Les rats qui utilisent cette stratégie vont directement dans le bras NE où se trouvait la plateforme. En revanche, les rats qui utilisent une stratégie égocentrique se basent sur une séquence de mouvements qu'ils ont apprise pendant l'entraînement. Les 2 séquences apprises au cours de l'acquisition sont : tourner à droite, puis à gauche lorsque le point de lâcher est le bras S, ou tourner deux fois à gauche lorsque le point de lâcher est le bras N. Les rats étant lâchés dans le bras SO lors des tests de rappel, la seule séquence qu'ils peuvent reproduire est donc tourner à droite puis à gauche. Ainsi, les rats qui utilisent une stratégie égocentrique en première approche vont rentrer dans le bras N.

### 7.2.1- Analyse des résultats à l'âge de 2 mois



**Figure 58:** Capacités de rappel de l'emplacement de la plateforme chez les rats *App*<sup>+/-</sup> et *App*<sup>-/-</sup> à l'âge de 2 mois lors du test du Double H

(A) Analyse du premier bras visité par les animaux lors du test de rappel. Le premier bras visité nous permet de déterminer la première stratégie mise en place par les rats pour retrouver la plateforme. Les rats *App*<sup>+/+</sup> et *App*<sup>-/-</sup> utilisent principalement une stratégie égocentrique alors que les rats *App*<sup>+/-</sup> utilisent davantage une stratégie allocentrique. (B) Temps passé dans le bras N lors du test de rappel. Pour tous les tests de rappel, l'ensemble des rats ne passent pas significativement plus de 8,2s (hasard) dans le bras N. (C) Temps passé dans le bras NE lors du test de rappel. Les rats *App*<sup>+/+</sup> et *App*<sup>+/-</sup> passent plus de 8,2s dans le bras NE lors du rappel 3, ils sont donc capables de rappeler la localisation de la plateforme aussi d'un point de vue allocentrique. Cela signifie donc que les rats *App*<sup>+/+</sup> et *App*<sup>-/-</sup> sont capables de passer d'une stratégie égocentrique à une stratégie allocentrique. Les rats *App*<sup>+/-</sup> ne sont pas capables de rappeler la localisation de la plateforme. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type. Statistiques : #  $p < 0,05$  vs. *App*<sup>+/+</sup>, +  $p < 0,05$  et ++  $p < 0,01$  vs. hasard (8,2s).

L'analyse de la **première stratégie** (Figure 58-A) mise en place par les rats montre que les rats *App*<sup>+/+</sup> et *App*<sup>-/-</sup> utilisent principalement une stratégie égocentrique. Cela est vrai dès le premier test de rappel pour les rats *App*<sup>-/-</sup>, alors que les rats *App*<sup>+/+</sup> utilisent principalement cette stratégie à partir du 2<sup>ème</sup> test de rappel. A l'inverse, à partir du second test de rappel, les rats *App*<sup>+/-</sup> utilisent principalement une stratégie allocentrique. Ces rats vont donc directement dans le bras NE où se trouvait la plateforme auparavant.

Concernant le **temps passé dans le bras N** (Figure 58-B), l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Rappel) ne met pas en évidence d'effet du Génotype ( $F_{2,30}=0,64$ ), du Rappel ( $F_{2,60}=0,44$ ) ou d'interaction Génotype x Rappel



( $F_{4,60}=1,13$ ). De plus, le test  $t$  de Student utilisé pour comparer le temps moyen passé dans les bras au hasard (8,2s), montre que, pour tous les tests de rappel, aucun des groupes ne passe significativement plus de 25% du temps dans le bras N. Pour le **temps passé dans le bras NE (Figure 58-C)**, soit dans le bras cible, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Rappel) indique un effet du Rappel ( $F_{2,60}=3,47$  ;  $p<0,05$ ). De manière générale, les rats passent significativement plus de temps dans le bras NE lors du 3<sup>ème</sup> test de rappel comparé au 1<sup>er</sup> ( $p<0,05$ ). Aucun effet du Génotype ( $F_{2,30}=1,08$ ) ou de l'interaction Génotype x Rappel ( $F_{4,60}=1,12$ ) n'est observé. De plus, le test  $t$  de Student montre que les rats  $App^{+/+}$  et  $App^{-/-}$  passent significativement plus de 8,2s dans le bras NE lors du 3<sup>ème</sup> test de rappel ( $p<0,05$ ). Ces rats sont donc capables de rappeler la localisation de la plateforme lors du 3<sup>ème</sup> test de rappel.

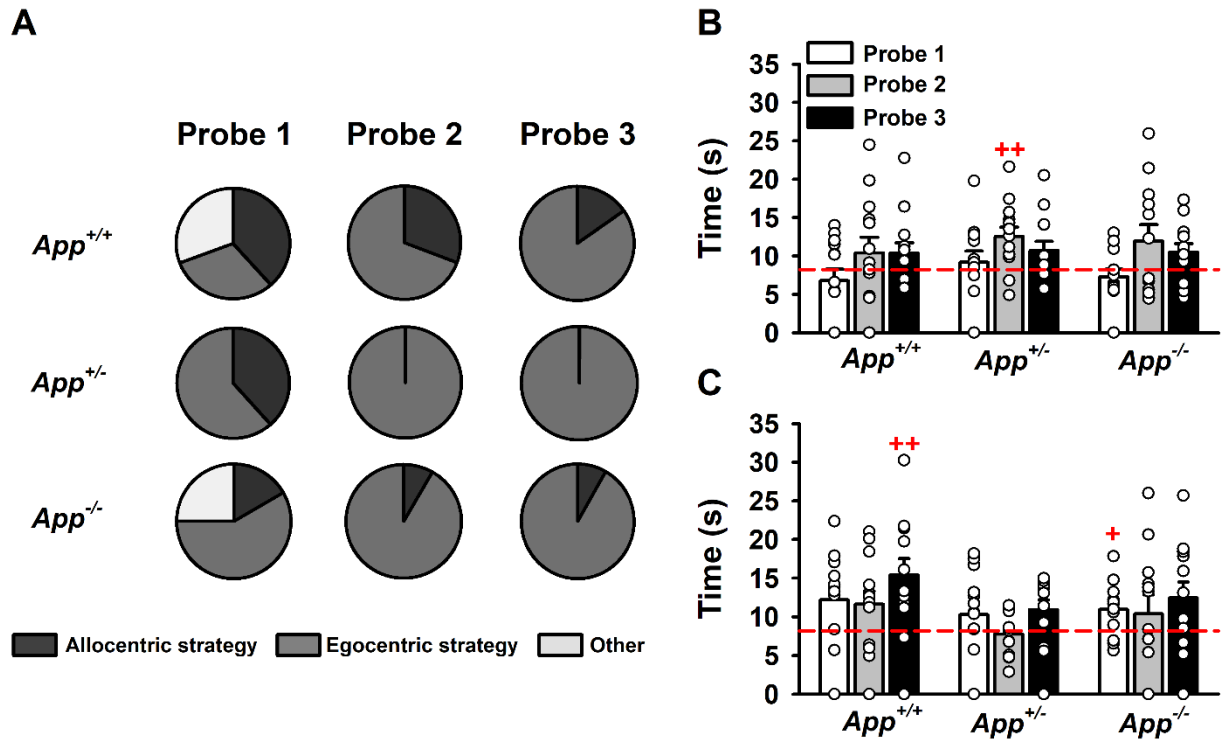
En résumé, bien que les rats  $App^{+/+}$  et  $App^{-/-}$  utilisent en première approche une stratégie égocentrique, au bout du 3<sup>ème</sup> test de rappel, ils sont capables de rappeler la localisation de la plateforme. En effet, ces rats passent significativement plus de temps que le hasard dans le bras NE, ce qui n'est pas le cas dans le bras N. Cela signifie donc qu'ils sont capables de passer d'une stratégie égocentrique à une stratégie allocentrique leur permettant de retrouver la localisation de la plateforme, ce qui est traduit dans leur insistance à visiter davantage ce bras. En revanche, pour les rats  $App^{+/-}$ , bien qu'ils utilisent principalement une stratégie allocentrique en première approche, ils ne passent pas significativement plus de 8,2s dans le bras NE. Ils ne semblent donc pas capables de rappeler la localisation de la plateforme.

### 7.2.2- Analyse des résultats à l'âge de 12 mois

Tout d'abord, concernant la **première stratégie (Figure 59-A)** mise en place par les rats, on constate que, pour les 3 groupes génétiques, la stratégie principalement utilisée est la stratégie égocentrique. Cela est valable pour tous les tests de rappel, à l'exception du premier test de rappel pour les  $App^{+/+}$  qui utilisent dans les mêmes proportions les 3 stratégies.

Concernant le **temps passé dans le bras N (Figure 59-B)**, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Rappel) montre un effet significatif du Rappel ( $F_{2,70}=6,57$  ;  $p<0,01$ ). Les rats passent ainsi significativement plus de temps dans le bras N aux 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> tests de rappel comparés au premier ( $p<0,01$  et  $p<0,05$ , respectivement). Aucun effet du Génotype ( $F_{2,35}=0,66$ ) ou de l'interaction Génotype x Rappel ( $F_{4,70}=0,24$ ) n'est observé. Par ailleurs, les rats  $App^{+/-}$  passent significativement plus de 8,2s dans le bras N lors du 2<sup>ème</sup> test de rappel ( $p<0,01$ ). Ensuite, pour le **temps passé dans le bras NE (Figure 59-C)**, l'ANOVA à 2 facteurs montre une tendance à la significativité pour l'effet du Rappel ( $F_{2,70}=3,03$  ;  $p=0,055$ ). Le test « post-hoc » indique que les rats passent significativement plus de temps dans le bras NE lors du 3<sup>ème</sup> test de rappel comparé au

2<sup>ème</sup> ( $p < 0,05$ ). Comme précédemment, l'effet du Génotype ( $F_{2,35}=2,03$ ) et l'interaction Génotype x Rappel ( $F_{4,70}=0,28$ ) ne sont pas significatifs. De plus, les rats  $App^{+/+}$  passent significativement plus de 8,2s dans ce bras lors du 3<sup>ème</sup> test de rappel (test  $t$  de Student,  $p < 0,001$ ). Une différence significative par rapport à 8,2s est également observée pour les rats  $App^{-/-}$  lors du 1<sup>er</sup> test de rappel ( $p < 0,05$ ). En d'autres termes, les rats  $App^{+/+}$  sont capables de rappeler la localisation de la plateforme lors du 3<sup>ème</sup> test de rappel, alors que les rats  $App^{-/-}$  la rappellent lors du 1<sup>er</sup> test de rappel mais plus par la suite.



**Figure 59:** Capacités de rappel de l'emplacement de la plateforme chez les rats  $App^{+/+}$  et  $App^{-/-}$  à l'âge de 12 mois lors du test du Double H

(A) Analyse du premier bras visité par les animaux lors du test de rappel. Le premier bras visité nous permet de déterminer la première stratégie mise en place par les rats pour retrouver la plateforme. L'ensemble des rats utilisent principalement une stratégie égocentrique. (B) Temps passé dans le bras N lors du second test de rappel. Seuls les rats  $App^{+/+}$  passent plus de 8,2s dans le bras N lors du second test de rappel. (C) Temps passé dans le bras NE lors du test de rappel. Les rats  $App^{+/+}$  sont capables de rappeler la localisation de la plateforme lors du 3<sup>ème</sup> test de rappel, alors que les rats  $App^{-/-}$  n'en sont capables que lors du 1<sup>er</sup> test de rappel. En effet, lors de ces tests de rappel, ils passent plus de 8,2 s dans le bras NE où se trouvait la plateforme auparavant. Ce n'est pas le cas des rats  $App^{+/-}$  qui ne sont pas capables de rappeler la localisation de la plateforme. Ainsi, les rats  $App^{+/+}$  et  $App^{-/-}$  ne passent pas d'une stratégie égocentrique à une stratégie allocentrique, seule stratégie leur permettant de rappeler la localisation de la plateforme. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type. Statistiques : +  $p < 0,05$  et ++  $p < 0,01$  vs. hasard (8,2s).

En conclusion, bien que les rats  $App^{+/+}$  utilisent en première approche principalement une stratégie égocentrique, ils sont ensuite capables d'utiliser une stratégie allocentrique. En effet, cela est visible lors

du 3<sup>ème</sup> test de rappel pour lequel les rats *App<sup>+/+</sup>* insistent dans le bras NE où se trouvait la plateforme auparavant. Contrairement à ces derniers, les rats *App<sup>+/-</sup>* et *App<sup>-/-</sup>* ne sont pas capables de rappeler la localisation de la plateforme au 3<sup>ème</sup> rappel. En effet, ils n'insistent pas dans le bras NE, ils ne sont donc pas capables de passer d'une stratégie égocentrique à une stratégie allocentrique.

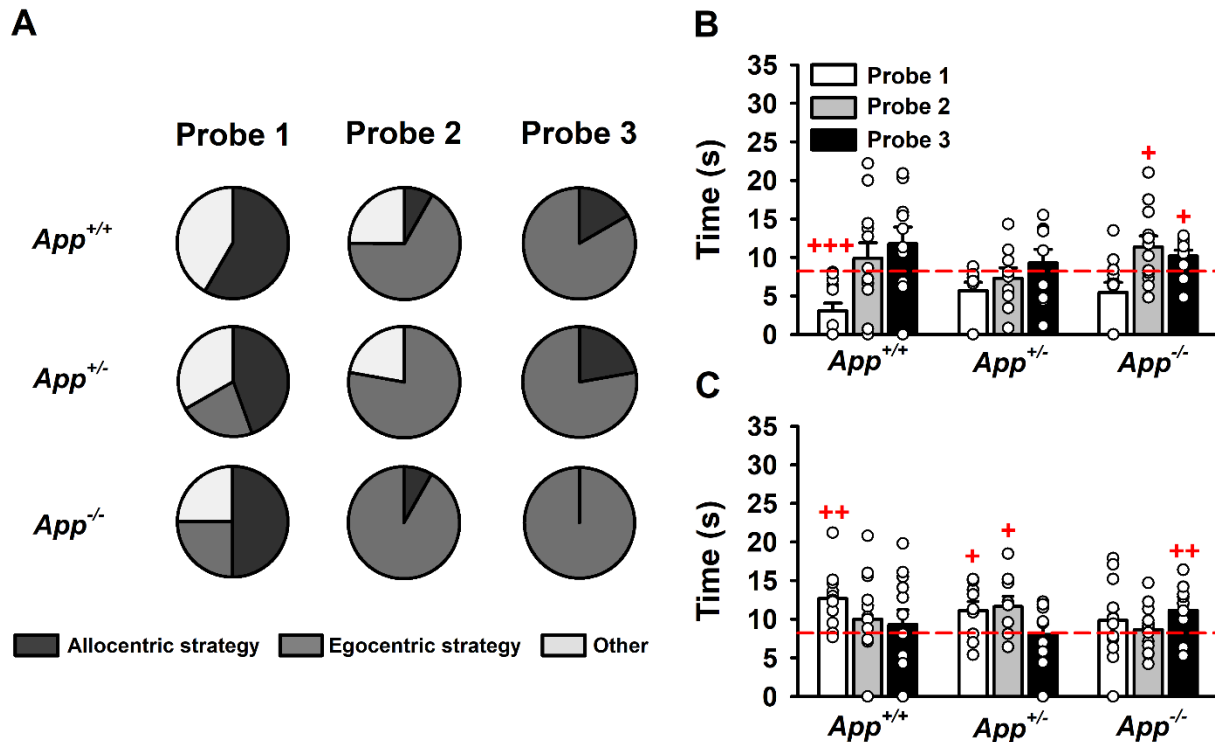
### 7.2.3- Analyse des résultats à l'âge de 18 mois

L'analyse de la **première stratégie (Figure 60-A)** mise en œuvre par les rats montre que, lors du 1<sup>er</sup> test de rappel, la stratégie allocentrique est principalement utilisée par tous les génotypes. A partir du second test de rappel, c'est la stratégie égocentrique qui devient majoritaire.

L'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Rappel) réalisée pour le **temps passé dans le bras N (Figure 60-B)** indique un effet significatif du Rappel ( $F_{2,60}=14,23$  ;  $p<0,001$ ). Globalement, les rats passent significativement plus de temps dans ce bras lors des 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> tests de rappel comparés au 1<sup>er</sup> ( $p<0,001$ ). Aucun effet du Génotype ( $F_{2,30}=0,60$ ) ou de l'interaction Génotype x Rappel ( $F_{4,60}=1,53$ ) n'est observé. De plus, le test *t* de Student montre que les rats *App<sup>-/-</sup>* passent significativement plus de 8,2s de leur temps dans le bras N lors des 2 derniers tests de rappel ( $p<0,05$ ). Enfin, l'ANOVA à 2 facteurs réalisée pour le **temps passé dans le bras NE (Figure 60-C)** ne met pas en évidence d'effet du Génotype ( $F_{2,30}=0,21$ ), du Rappel ( $F_{2,60}=1,37$ ), ni d'interaction Génotype x Rappel ( $F_{4,60}=1,93$ ). Par ailleurs, le test *t* de Student indique que les rats *App<sup>+/+</sup>* et *App<sup>+/-</sup>* passent significativement plus de 8,2s de leur temps dans le bras NE lors du 1<sup>er</sup> test de rappel ( $p<0,01$  et  $p<0,05$ , respectivement). Cela est également le cas lors du second test de rappel pour les rats *App<sup>+/-</sup>* ( $p<0,05$ ). Enfin, c'est seulement lors du 3<sup>ème</sup> test de rappel que les rats *App<sup>-/-</sup>* passent significativement plus de 8,2s dans le bras NE ( $p<0,01$ ).

En résumé, à l'exception du 1<sup>er</sup> test de rappel, les rats *App<sup>+/+</sup>* ne sont pas capables de rappeler la localisation de la plateforme. En effet, ils ne passent pas significativement plus de temps que le hasard dans le bras NE lors des deux derniers tests de rappel. Concernant les rats *App<sup>+/-</sup>*, lors des deux premiers tests de rappel, ils passent significativement plus de 8,2s dans le bras NE et sont capables de rappeler la localisation de la plateforme. Par ailleurs, lors du second rappel, ces rats utilisent principalement la stratégie égocentrique, ils sont donc capables de passer d'une stratégie égocentrique à une stratégie allocentrique, ce qui transparaît dans leur insistance à explorer le bras NE. Cependant, lors du 3<sup>ème</sup> test de rappel, ils ne sont plus capables de rappeler la localisation de la plateforme. Enfin, pour les rats *App<sup>-/-</sup>*, bien qu'ils insistent

dans le bras NE lors du 3<sup>ème</sup> test de rappel, ils passent aussi significativement plus de 8,2s dans le bras N. Ils ne sont donc pas capables de rappeler la localisation de la plateforme.



**Figure 60:** Capacités de rappel de l'emplacement de la plateforme chez les rats *App*<sup>+/+</sup> et *App*<sup>-/-</sup> à l'âge de 18 mois lors du test du Double H

(A) Analyse du premier bras visité par les animaux lors du test de rappel. Le premier bras visité nous permet de déterminer la première stratégie mise en place par les rats pour retrouver la plateforme. Lors du 1<sup>er</sup> test de rappel, l'ensemble des rats utilisent principalement la stratégie allocentrique. Pour les tests de rappel suivants, la stratégie égocentrique est principalement utilisée. (B) Temps passé dans le bras N lors du test de rappel. Les rats *App*<sup>-/-</sup> passent plus de 8,2s dans le bras N lors des deux derniers tests de rappel. (C) Temps passé dans le bras NE lors du test de rappel. Les rats *App*<sup>+/+</sup> sont capables de rappeler la localisation de la plateforme uniquement lors du 1<sup>er</sup> test de rappel. En effet, ils passent plus de 8,2s dans le bras NE uniquement lors de ce test de rappel. Les rats *App*<sup>+/-</sup> sont, quant à eux, capables de rappeler la localisation de la plateforme lors de deux premiers tests de rappel. Enfin, bien que les rats *App*<sup>-/-</sup> passent plus de 8,2s dans le bras NE lors du dernier test de rappel, ils insistent également dans le bras N. Ces rats ne sont donc pas capables de rappeler la localisation de la plateforme. Les valeurs représentent des moyennes ± erreur-type. Statistiques : +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$  et +++  $p < 0,001$  vs. hasard (8,2s).

#### 7.2.4- Conclusion

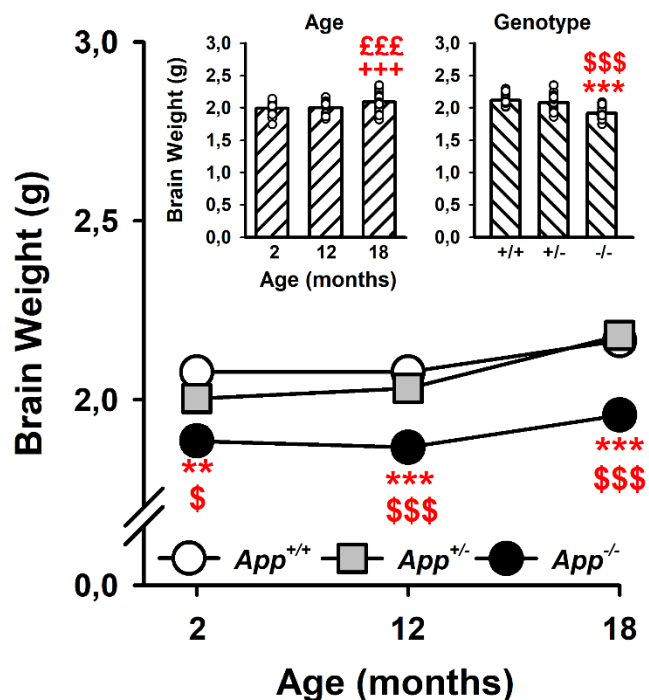
Les résultats obtenus avec le test du Double H ne permettent pas d'émettre de conclusion. En effet, bien que l'ensemble des rats soit capable d'apprendre la localisation de la plateforme lors de la phase d'acquisition, et ce quel que soit l'âge, les résultats obtenus lors des tests de rappel sont incohérents entre les différents âges étudiés. En effet, une amélioration des performances des rats *App*<sup>+/+</sup> est observée avec l'âge, visible par une augmentation du temps passé dans le bras NE où se trouvait la plateforme pendant

l'apprentissage. Par ailleurs, pour les rats *App<sup>+/-</sup>*, alors qu'ils n'étaient pas capables de rappeler la localisation de la plateforme aux âges de 2 et 12 mois, ils en sont capables lors des 2 premiers tests de rappel à l'âge de 18 mois. Enfin, pour les rats *App<sup>-/-</sup>*, à l'âge de 2 mois il faut attendre le 3<sup>ème</sup> test de rappel pour qu'ils soient capables de rappeler la localisation de la plateforme. En revanche, à l'âge de 12 mois, ils en sont capables dès le 1<sup>er</sup> test de rappel. Ces incohérences seront reprises plus en détails dans la partie Discussion. Au vu de ces résultats, aucune analyse de l'effet du vieillissement n'a été réalisée pour ce test.

## 8- Masse cérébrale

Lors des mises à mort, la masse cérébrale a été évaluée chez les animaux sélectionnés pour les analyses moléculaires (**Figure 61**). Les effectifs pour chaque groupe d'âge sont les suivants, pour la cohorte 2 mois : n=7 pour les *App<sup>+/+</sup>* et *App<sup>+/-</sup>* ; n=6 pour les *App<sup>-/-</sup>* ; pour la cohorte 12 mois : n=6 pour les *App<sup>+/+</sup>* ; n=7 pour les *App<sup>+/-</sup>* et n=5 pour les *App<sup>-/-</sup>* ; pour la cohorte 18 mois : n=10 pour les *App<sup>+/+</sup>* et *App<sup>+/-</sup>* et n=12 pour les *App<sup>-/-</sup>*. L'ANOVA à un facteur réalisée pour chaque âge met en évidence un effet significatif du Génotype (à 2 mois  $F_{2,17}=9,02$  -  $p<0,01$  ; à 12 mois  $F_{2,15}=24,41$  -  $p<0,001$  ; à 18 mois  $F_{2,29}=26,5$  -  $p<0,001$ ). Les rats *App<sup>-/-</sup>* possèdent un cerveau significativement plus léger comparés aux *App<sup>+/+</sup>* ( $p<0,01$  à 2 mois ;  $p<0,001$  à 12 et 18 mois) et *App<sup>+/-</sup>* ( $p<0,05$  à 2 mois ;  $p<0,001$  à 12 et 18 mois). Ainsi, une réduction de 9 à 10% est observée par rapport aux rats *App<sup>+/+</sup>* (9,3% à 2 mois ; 10,2% à 12 mois et 9,6% à 18 mois).

De plus, l'ANOVA à 2 facteurs (Age x Génotype) réalisée pour étudier **l'effet du vieillissement**, montre un effet significatif de l'Age ( $F_{2,61}=18,67$  ;  $p<0,001$ ) et du Génotype ( $F_{2,31}=43,52$  ;  $p<0,001$ ). L'interaction Age x Génotype n'est pas significative ( $F_{4,61}=1,20$ ). La masse cérébrale augmente avec l'âge. En effet, à 18 mois, la masse cérébrale est plus importante que celle mesurée aux âges de 2 et 12 mois ( $p<0,001$ ). L'effet du Génotype récapitule les observations faites à partir des ANOVA à un facteur, soit une réduction globale de la masse cérébrale chez les rats *App<sup>-/-</sup>* comparés aux rats *App<sup>+/+</sup>* et *App<sup>+/-</sup>* ( $p<0,001$ ).



**Figure 61: Evolution de la masse cérébrale chez les rats  $App^{+/-}$  et  $App^{-/-}$**

Les rats  $App^{-/-}$  présentent une masse cérébrale inférieure à celle des rats  $App^{+/+}$  et  $App^{+/-}$ . Cette réduction est visible aux 3 âges étudiés, elle est de l'ordre de 9 à 10% comparé aux  $App^{+/+}$ . Par ailleurs, de manière globale, la masse cérébrale est plus importante à l'âge de 18 mois. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type. Statistiques : \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$  vs.  $App^{+/+}$  ; \$  $p < 0,05$  et \$\$\$  $p < 0,001$  vs.  $App^{+/-}$  ; +++  $p < 0,001$  vs. 2 mois ; £££  $p < 0,001$  vs. 12 mois.

## 9- Conclusion

Les résultats de l'étude réalisée sur les rats  $App^{+/-}$  et  $App^{-/-}$  sont synthétisés dans le **Tableau 12**. Cette étude a permis de mettre en évidence une réduction de la masse corporelle et de la masse cérébrale chez les rats  $App^{-/-}$  aux 3 âges étudiés. Par ailleurs, il n'y a pas de différence du niveau d'anxiété chez les rats  $App^{+/-}$  et  $App^{-/-}$  quel que soit l'âge étudié. En effet, aucune différence n'est observée entre les génotypes que ce soit pour l'indice d'anxiété dans le labyrinthe en croix surélevé ou pour le temps passé à la périphérie vs. le centre de l'arène dans le test du champ ouvert. De plus, à l'âge de 2 mois les rats  $App^{-/-}$  apparaissent plus actifs. En effet, dans le labyrinthe en croix surélevé, ils présentent un nombre plus important d'entrées dans les bras. Ils ont également une activité locomotrice plus élevée lors de la phase nocturne du test de l'activité circadienne et parcourent une distance plus importante dans le test du champ ouvert. Cette augmentation d'activité est également observée chez les rats  $App^{+/-}$ , mais uniquement dans les tests de l'activité circadienne et du champ ouvert. Par ailleurs, ces différences ne sont pas retrouvées aux âges de 12 et 18 mois pour les rats  $App^{-/-}$ , cependant les rats  $App^{+/-}$  de 12 mois parcourent une distance plus

importante dans le champ ouvert. Concernant la coordination sensorimotrice évaluée par le test de la barre, aucune différence n'est observée entre les génotypes aux âges de 2 et 12 mois. Les rats *App<sup>+/-</sup>* et *App<sup>-/-</sup>* ne présentent donc pas d'altération de leur coordination sensorimotrice. A l'âge de 18 mois, les rats *App<sup>-/-</sup>* présentent de moins bonnes performances que les rats *App<sup>+/+</sup>* qui pourraient attester d'une moins bonne coordination sensorimotrice, cependant la variabilité interindividuelle est importante.

Le test de la piscine de Morris a permis de mettre en évidence un retard d'apprentissage spatial chez les rats *App<sup>-/-</sup>* à l'âge de 12 mois. Ce dernier n'est pas visible à l'âge de 2 mois, l'APP serait donc importante pour le maintien des capacités d'apprentissage spatial. Par ailleurs, ce retard d'apprentissage n'est plus visible à l'âge de 18 mois probablement lié à une dégradation des performances des animaux contrôles (*App<sup>+/+</sup>*) avec l'âge. Du fait de cette dégradation, les éventuels changements subtils liés à l'absence d'APP pourraient ne pas être visibles. De plus, aucun déficit de mémoire spatiale n'est observé. En effet, l'ensemble des rats est capable de rappeler la localisation de la plateforme lors du test de rappel et ce aux 3 âges étudiés. Enfin, un déficit d'extinction est mis en évidence à l'âge de 12 mois chez les rats *App<sup>+/-</sup>* et *App<sup>-/-</sup>* qui pourrait être le reflet d'un déficit de flexibilité comportementale. De plus, pour la cohorte de 18 mois, aucun processus d'extinction n'est observé y compris chez les rats *App<sup>+/+</sup>*. Enfin, pour le test du Double H, les résultats obtenus ne permettent pas d'émettre de conclusion.

L'analyse de l'effet du vieillissement a montré uniquement une apparition plus précoce du déficit d'extinction en l'absence d'APP. En effet, ce déficit n'est visible qu'à l'âge de 18 mois chez les rats *App<sup>+/+</sup>*. Pour les autres tests comportementaux, l'absence d'APP n'influence pas l'évolution des différents paramètres étudiés au cours du vieillissement des animaux.

Globalement, les déficits comportementaux relevés sont, lorsqu'ils sont significatifs, relativement faibles.

		2 mois		12 mois		18 mois	
		<i>App</i> <sup>+/-</sup>	<i>App</i> <sup>-/-</sup>	<i>App</i> <sup>+/-</sup>	<i>App</i> <sup>-/-</sup>	<i>App</i> <sup>+/-</sup>	<i>App</i> <sup>-/-</sup>
Masse	Corporelle	∅	∅ 9 sem ↘ 11 sem (9,3%)	∅	↘ (14,4%)	∅	↘ (12,7%)
	Cérébrale	∅	↘ (9,3%)	∅	↘ (10,2%)	∅	↘ (9,6%)
Labyrinthe en croix surélevé	Activité	∅	↗	∅		∅	
	Anxiété	∅		∅		∅	
Activité circadienne		↗ phase nocturne		∅		∅	
Champ ouvert	Activité	↗		↗	∅	∅	
	Anxiété	∅		∅		∅	
Test de la barre		∅		∅		∅	↘
Piscine de Morris	Acquisition	∅		∅	↘	∅	
	Rappel	∅		∅		∅	
	Extinction	∅		↘		↘ (présent aussi chez <i>App</i> <sup>+/+</sup> )	
Double H	Acquisition	∅		∅		∅	
	Rappel	↘	∅	↘		Pas de conclusion possible	
Effet vieillissement		Apparition plus précoce du déficit d'extinction chez les <i>App</i> <sup>+/-</sup> et <i>App</i> <sup>-/-</sup>					

**Tableau 12: Synthèse des résultats de l'étude comportementale réalisée chez les rats *App*<sup>+/-</sup> et *App*<sup>-/-</sup>**

↘ et ↗, indique respectivement une diminution et une augmentation par rapport aux *App*<sup>+/+</sup> ; ∅, indique une absence de différence avec les *App*<sup>+/+</sup>.

### III- Analyses histologiques

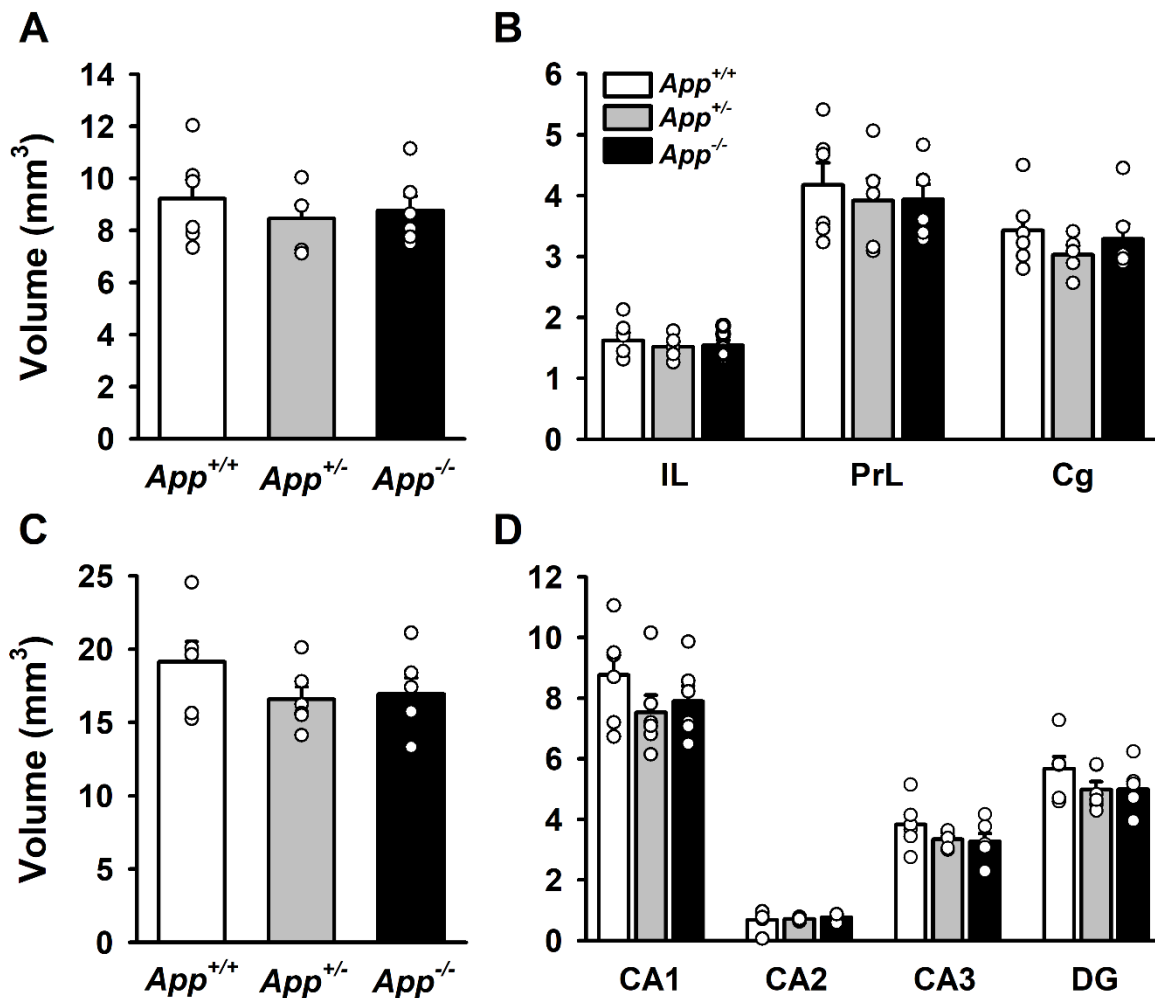
Suite à la mise en évidence d'une réduction de la masse cérébrale chez les rats *App*<sup>-/-</sup>, nous avons voulu savoir si cette réduction affectait toutes les structures cérébrales de façon similaire ou si elle affectait seulement certaines structures, ou certaines de façon plus marquée que d'autres. Pour ce faire, nous avons, dans un premier temps, réalisé des mesures de volume cérébral. Ces analyses ont été réalisées sur les cerveaux perfusés de la cohorte de 12 mois.

#### 1- Mesures de volumes de différentes régions cérébrales

Pour ces mesures, nous nous sommes focalisés sur l'hippocampe dorsal et le cortex préfrontal médian, deux structures jouant un rôle-clé dans la mémoire. Par ailleurs, pour chacune de ses structures, le volume



de leurs différentes sous-régions a été étudié. Le nombre d'animaux utilisé par condition génétique est le suivant : n=6 pour les *App*<sup>+/+</sup> ; n=5 pour le CPFm et 6 pour l'hippocampe pour les *App*<sup>+/-</sup> et n=6 pour les *App*<sup>-/-</sup>.



**Figure 62:** Volume des sous-régions du cortex préfrontal médian et de l'hippocampe dorsal chez la cohorte de 12 mois

(A) Cortex préfrontal médian dans sa globalité. (B) Différentes sous-régions du CPFm. Ce dernier se compose du cortex infralimbique (IL), du cortex prélimbique (PrL) et du cortex cingulaire (Cg). (C) Hippocampe dorsal dans sa globalité. (D) Différentes sous-régions de l'hippocampe dorsal. Ce dernier se compose des Corne d'Ammon 1, 2 et 3 (CA1, CA2, CA3) et du gyrus denté (DG). Pour le CPFm, l'hippocampe dorsal et leurs sous-régions, aucune différence n'est observée entre les génotypes. Les valeurs représentent des moyennes ± erreur-type.

Le **CPFm** peut être divisé en 3 sous-régions : le cortex infralimbique, le cortex prélimbique et le cortex cingulaire. Si l'on s'intéresse d'abord au CPFm dans sa globalité (**Figure 62-A**), l'ANOVA à un facteur ne montre pas d'effet significatif du Génotype ( $F_{2,14}=0,37$ ). De la même façon, les ANOVA à un facteur réalisées pour chaque sous-région ne mettent pas en évidence d'effet significatif du Génotype (**Figure 62-**

**B)** ( $F_{2,14}=0,26$  pour le cortex infralimbique ;  $F_{2,14}=0,20$  pour le cortex prélimbique ;  $F_{2,14}=0,75$  pour le cortex cingulaire).

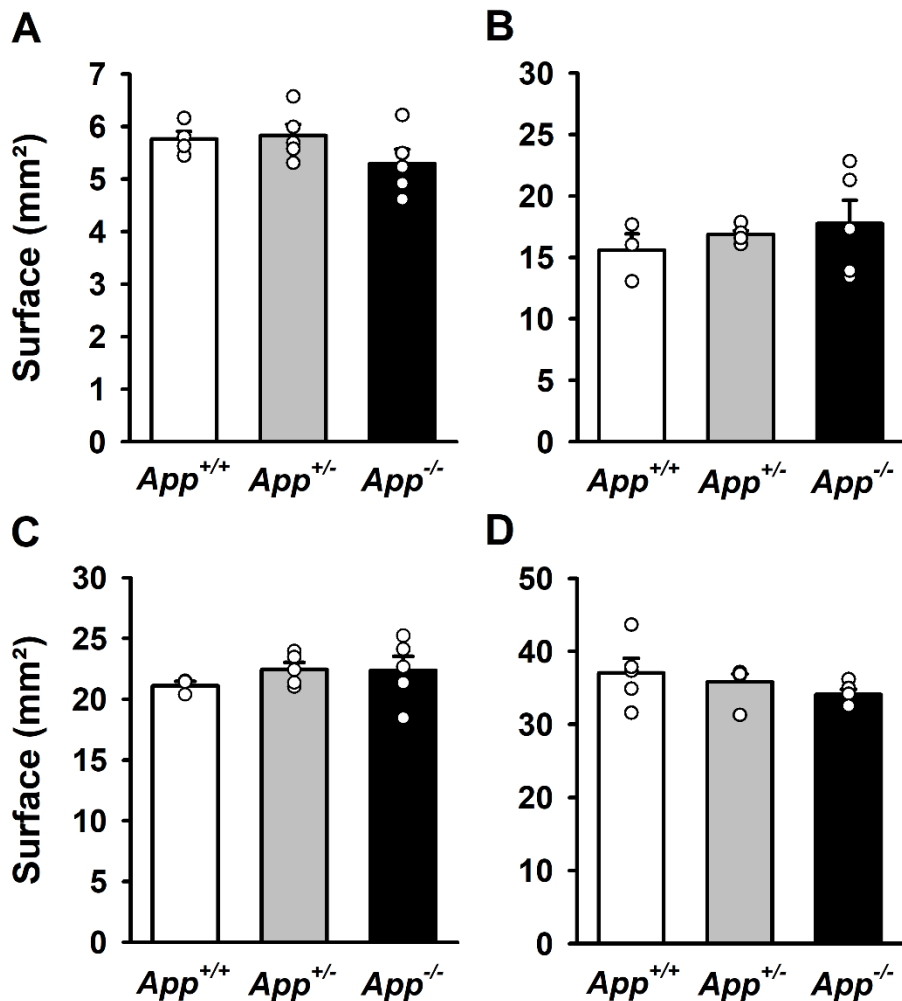
Concernant l'**hippocampe dorsal**, il se découpe en 4 sous-régions : les Cornes d'Ammon 1, 2 et 3, notées CA1, CA2 et CA3, et le gyrus denté. Pour l'hippocampe dorsal dans sa globalité (**Figure 62-C**), l'ANOVA à un facteur ne montre pas d'effet significatif du Génotype ( $F_{2,15}=1,48$ ). De façon similaire, aucune différence significative n'est observée entre les génotypes pour les différentes sous-régions de l'hippocampe dorsal (**Figure 62-D**) (ANOVA à un facteur,  $F_{2,15}=1,20$  pour CA1 ;  $F_{2,15}=1,55$  pour CA2 ;  $F_{2,15}=1,49$  pour CA3 ;  $F_{2,15}=1,41$  pour le gyrus denté).

En conclusion, la réduction de la masse cérébrale ne semble pas impacter le volume du CPFm et de l'hippocampe dorsal.

## 2- Mesures de surfaces de régions cérébrales

L'absence de différence constatée lors de l'étude des volumes, nous a amenés à nous demander si les potentielles différences étaient trop subtiles pour être visibles à l'échelle des volumes, en particulier du fait de nos petits effectifs. Nous avons alors réalisé des mesures de surfaces de différentes régions cérébrales. Pour cela, deux coupes par rat ont été étudiées. Les données sont à considérer comme préliminaires. Ainsi, la première coupe étudiée se situe au niveau du striatum, la seconde au niveau de l'hippocampe dorsal. Pour chacune, la surface de différentes structures cérébrales a été mesurée.

**Au niveau du striatum**, les structures qui ont été étudiées sont le genu du corps calleux (**Figure 63-A**), la région septale (**Figure 63-B**), l'association noyau caudé-putamen (**Figure 63-C**) et la région corticale (**Figure 63-D**). Une ANOVA à un facteur a été réalisée pour les données obtenues pour chaque structure. Aucune différence significative n'est observée entre les génotypes quelle que soit la structure étudiée ( $F_{2,11}=1,67$  pour le genu du corps calleux ;  $F_{2,10}=0,52$  pour le septum ;  $F_{2,10}=0,55$  pour le noyau caudé-putamen ;  $F_{2,12}=1,16$  pour la région corticale).

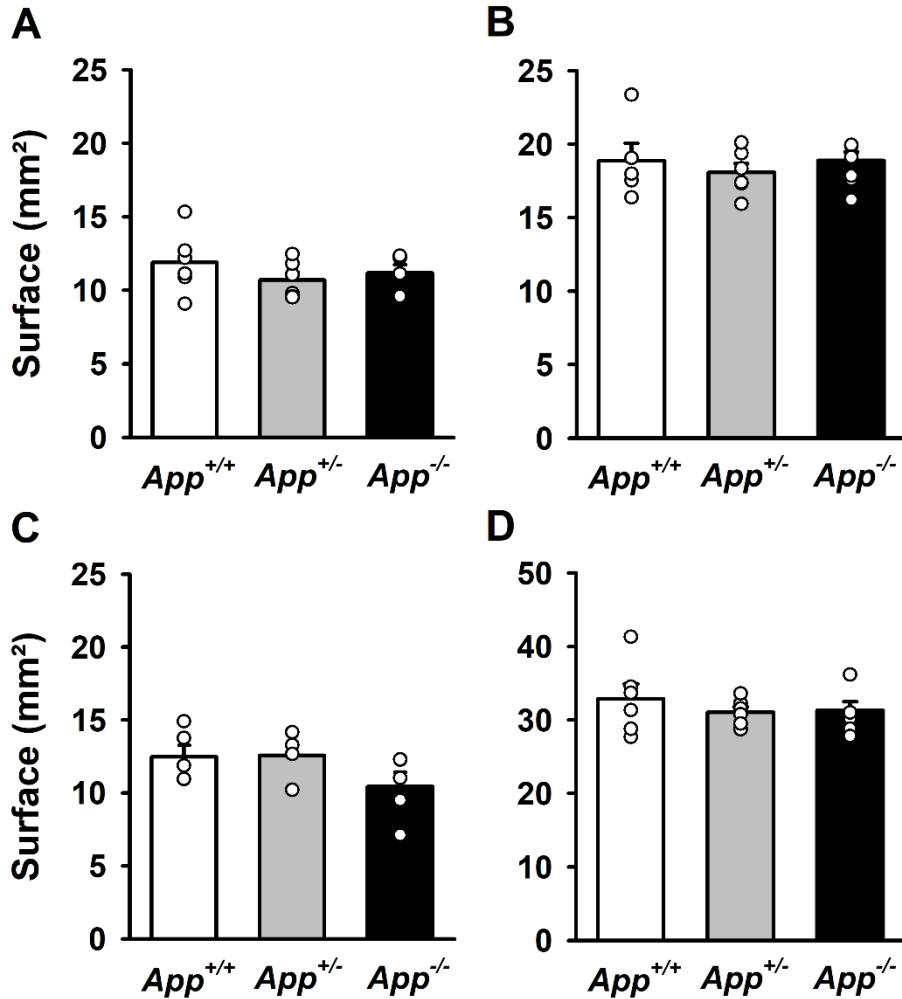


**Figure 63:** Surface de différentes structures cérébrales au niveau du striatum chez la cohorte de 12 mois

(A) Genu du corps calleux. (B) Région septale. (C) Noyau caudé et putamen. (D) Région corticale située au-dessus du striatum. Pour toutes les structures étudiées, aucune différence n'est observée entre les génotypes. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type.

Au niveau de l'hippocampe dorsal, les surfaces ont été évaluées pour l'hippocampe (Figure 64-A), le thalamus (Figure 64-B), l'hypothalamus (Figure 64-C) et la région corticale (Figure 64-D). De la même façon, aucun effet significatif du génotype n'est mis en évidence par l'ANOVA à un facteur, et ce pour toutes les structures étudiées ( $F_{2,15}=0,82$  pour l'hippocampe ;  $F_{2,14}=0,22$  pour le thalamus ;  $F_{2,11}=1,91$  pour l'hypothalamus ;  $F_{2,15}=0,67$  pour la région corticale).

En conclusion, la surface des structures cérébrales étudiées n'est pas impactée par la réduction de masse cérébrale observée chez les rats *App*<sup>-/-</sup>. Cette approche reste cependant très préliminaire.



**Figure 64:** Surface de différentes structures cérébrales au niveau de l'hippocampe dorsal chez la cohorte de 12 mois

(A) Hippocampe dorsal. (B) Thalamus. (C) Hypothalamus. (D) Région corticale située au-dessus de l'hippocampe dorsal. Pour toutes les structures étudiées, aucune différence n'est observée entre les génotypes. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type.

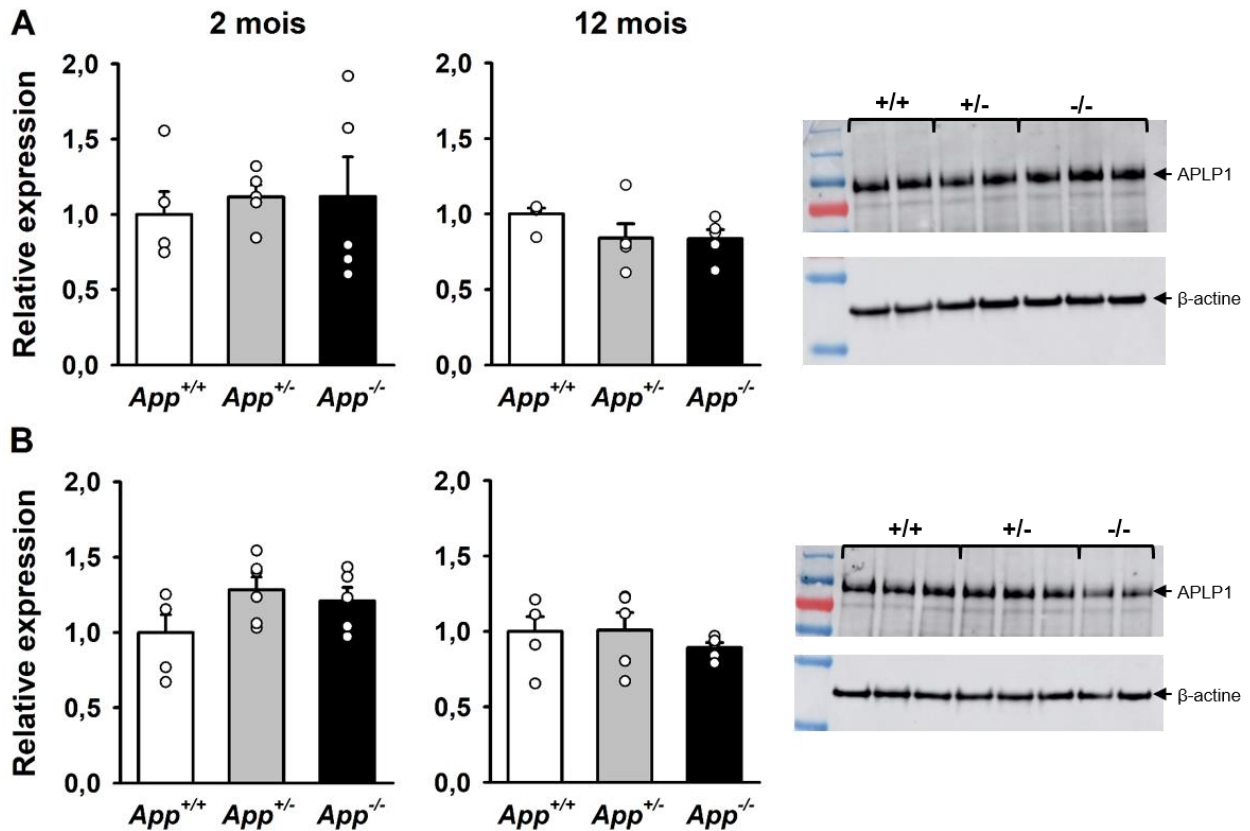
#### IV- Analyses moléculaires

L'effet de l'absence de l'APP sur l'expression de différentes protéines a été étudié par western blot. Ainsi, l'expression des protéines de la famille de l'APP, APLP1 et APLP2 a été étudiée afin de mettre en évidence un potentiel effet de compensation par ces protéines. L'expression des marqueurs synaptiques SNAP-25 et Synaptophysine, ainsi que des marqueurs astrocytaires GFAP et S100B ont également été mesurées. Cette étude a été réalisée dans un premier temps sur les cohortes de 2 et 12 mois pour l'hippocampe et le cortex préfrontal médian. Pour la cohorte de 18 mois, seules les protéines pour lesquelles une variation dans leur niveau d'expression a été observée à l'âge de 12 mois ont été étudiées.

Comme pour l'étude comportementale, les résultats de cette partie moléculaire sont exposés avec un grand nombre de détails. Il est possible de se référer directement au tableau synthétique (**Tableau 13**) présent à la page 182.

### 1- Etude de l'expression des protéines de la famille de l'APP

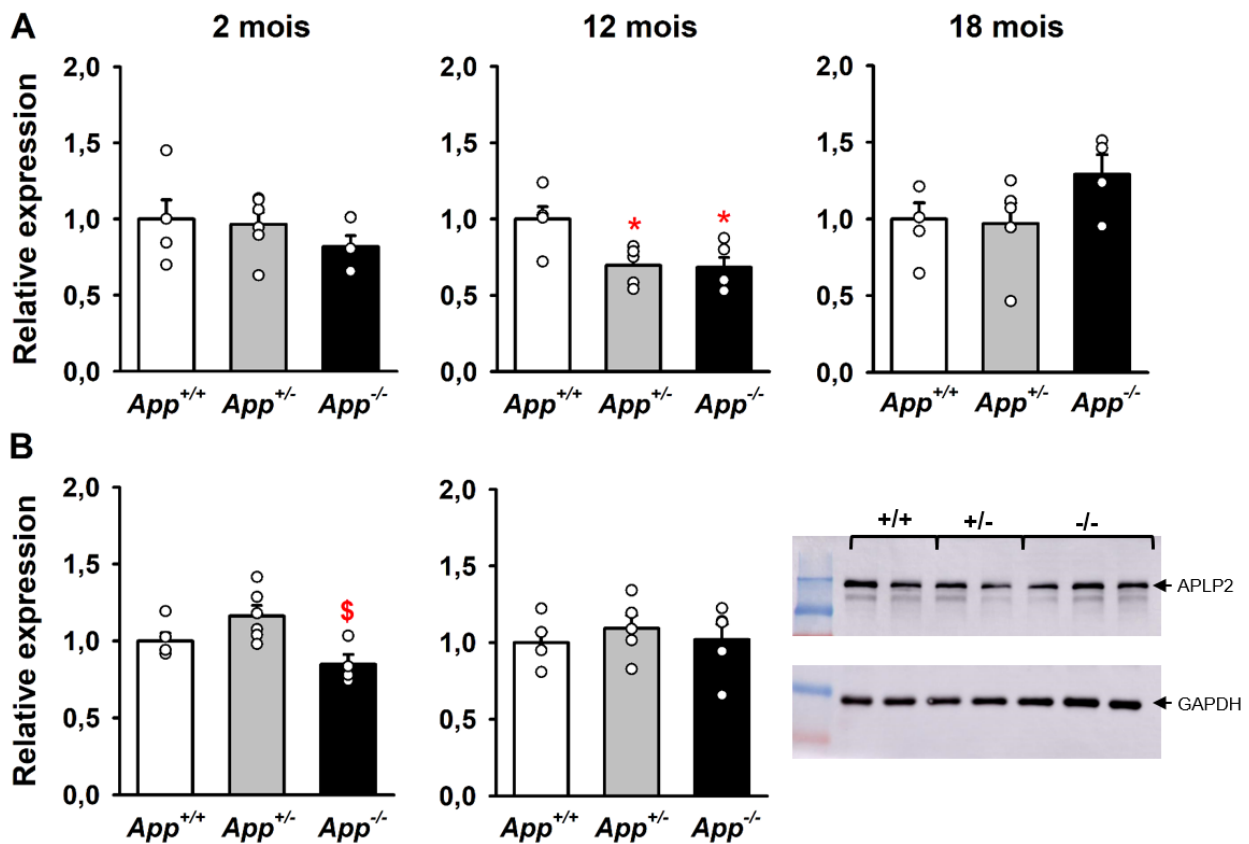
Tout d'abord, concernant l'expression d'APLP1 dans l'hippocampe (**Figure 65-A**), aucune différence significative n'est observée entre les génotypes, que ce soit à 2 ou à 12 mois (ANOVA à un facteur, à 2 mois  $F_{2,12}=0,14$  ; à 12 mois  $F_{2,12}=1,84$ ). De la même façon, dans le CPFm (**Figure 65-B**), les ANOVA à un facteur ne montrent pas de différence entre les génotypes pour l'expression d'APLP1 (à 2 mois  $F_{2,13}=2,27$  ; à 12 mois  $F_{2,12}=0,52$ ). Ainsi, la protéine APLP1 ne semble pas compenser l'absence d'APP.



**Figure 65:** Expression de la protéine APLP1 dans l'hippocampe et le cortex préfrontal médian des rats  $App^{+/-}$  et  $App^{-/-}$  par western blot

(A) Expression de la protéine APLP1 dans l'hippocampe. (B) Expression de la protéine APLP1 dans le CPFm. L'expression d'APLP1 est normalisée par l'expression de la protéine de référence, la  $\beta$ -actine. Pour chaque structure, un exemple de photos de gels obtenus est montré pour la protéine APLP1 et la protéine de référence. Aucune différence n'est observée entre les génotypes pour les 2 structures cérébrales et ce, aux 2 âges étudiés. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type.

Pour l'expression d'APLP2 dans l'hippocampe (Figure 66-A), l'ANOVA à un facteur n'indique aucun effet significatif du Génotype pour la cohorte de **2 mois** ( $F_{2,12}=0,86$ ). Ainsi, le niveau d'expression d'APLP2 est similaire entre les génotypes. En revanche, pour la cohorte de **12 mois**, l'ANOVA à un facteur met en évidence un effet significatif du Génotype ( $F_{2,12}=6,76$  ;  $p<0,05$ ). Une diminution de son expression, de l'ordre de 30%, est ainsi observée chez les rats  $App^{+/-}$  et  $App^{-/-}$  comparés aux  $App^{+/+}$  ( $p<0,05$ ). Cependant, à l'âge de **18 mois** cette diminution n'est pas retrouvée. En effet, à cet âge, aucune différence du niveau d'expression d'APLP2 dans l'hippocampe n'est observée entre les 3 génotypes (ANOVA à un facteur,  $F_{2,11}=1,90$ ).



**Figure 66: Expression de la protéine APLP2 dans l'hippocampe et le cortex préfrontal médian des rats  $App^{+/-}$  et  $App^{-/-}$  par western blot**

(A) Expression de la protéine APLP2 dans l'hippocampe. Une diminution de son expression est observée uniquement à 12 mois chez les rats  $App^{+/-}$  et  $App^{-/-}$ . (B) Expression de la protéine APLP2 dans le CPFm. Une diminution de l'expression d'ALP2 est observée chez les rats  $App^{-/-}$  comparés aux  $App^{+/+}$  à l'âge de 2 mois. L'expression d'APLP2 est normalisée par l'expression de la protéine de référence, la GAPDH. Un exemple de photos d'un gel est montré en bas à droite de la figure pour la protéine APLP2 et la protéine de référence. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type. Statistiques : \*  $p<0,05$  vs.  $App^{+/+}$  ; \$  $p<0,05$  vs.  $App^{+/-}$ .

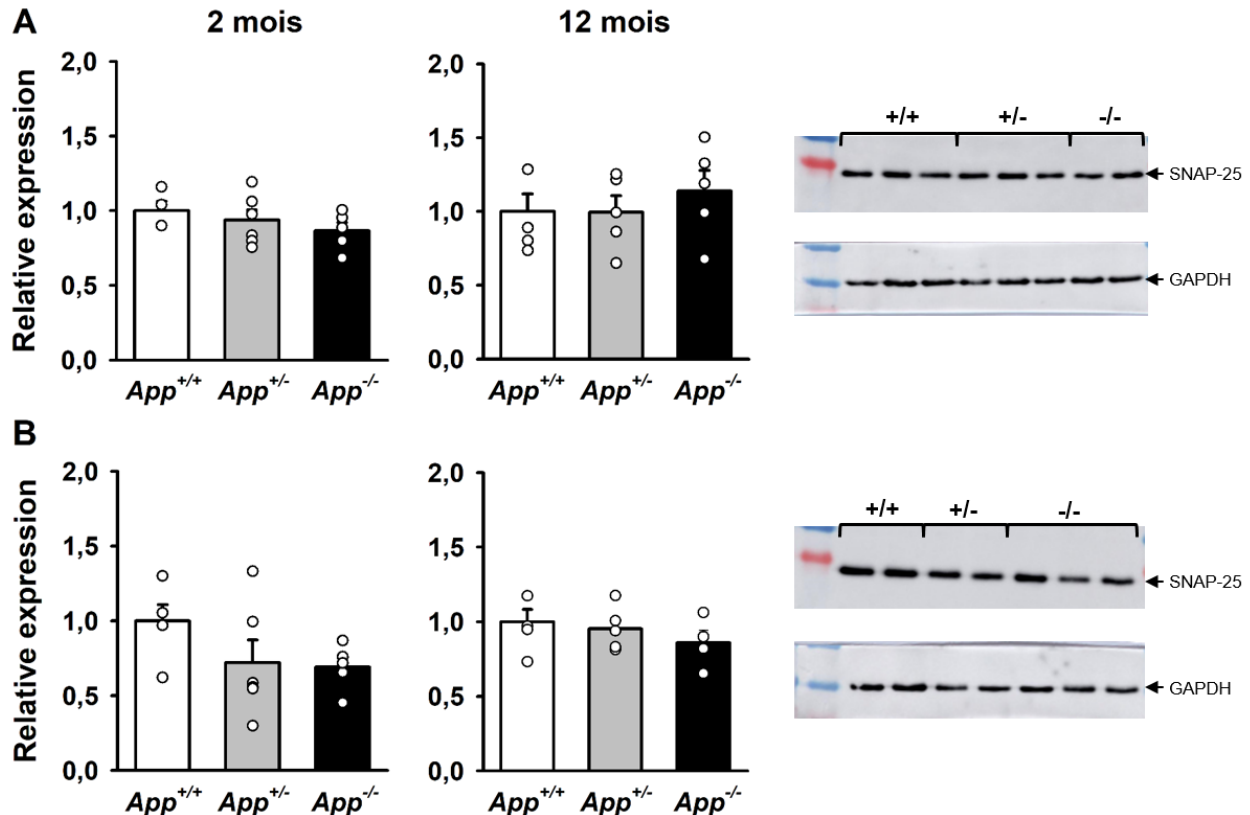
Enfin, dans le **CPFm (Figure 66-B)**, une diminution de l'expression d'APLP2 est également observée chez les rats *App<sup>-/-</sup>* comparés aux *App<sup>+/-</sup>* pour la cohorte de 2 mois (ANOVA à un facteur, effet du Génotype,  $F_{2,12}=6,05$  ;  $p<0,05$ ). Cette diminution est de 15,2%. En revanche, aucune différence significative n'est observée pour les *App<sup>+/-</sup>*. Par ailleurs, cette diminution n'est pas retrouvée pour la cohorte de **12 mois**. En effet, l'ANOVA à un facteur ne montre pas d'effet significatif du Génotype ( $F_{2,12}=0,32$ ).

Les résultats obtenus pour la protéine APLP2 indiquent que cette protéine ne semble pas non plus compenser pour l'absence d'APP chez nos animaux. En effet, son expression est soit inchangée, soit diminuée en fonction de l'âge et de la structure étudiés, mais jamais augmentée comme on pourrait s'y attendre dans le cadre d'un mécanisme de compensation.

## 2- Etude de l'expression de marqueurs synaptiques

Les protéines SNAP-25 et Synaptophysine sont toutes les deux des marqueurs pré-synaptiques. La première est ainsi exprimée au niveau de la membrane du neurone pré-synaptique, alors que la Synaptophysine est présente à la surface des vésicules synaptiques.

L'étude de l'expression de la **SNAP-25 dans l'hippocampe (Figure 67-A)** ne montre pas de différence entre les génotypes pour les cohortes de 2 et 12 mois (ANOVA à un facteur, à 2 mois  $F_{2,12}=0,95$  ; à 12 mois  $F_{2,12}=0,42$ ). De la même façon, dans le **CPFm (Figure 67-B)**, aucune différence du niveau d'expression de la SNAP-25 n'est observée entre les génotypes que ce soit pour la cohorte de 2 mois (ANOVA à un facteur,  $F_{2,13}=1,87$ ) ou pour la cohorte de 12 mois (ANOVA à un facteur,  $F_{2,11}=0,80$ ).



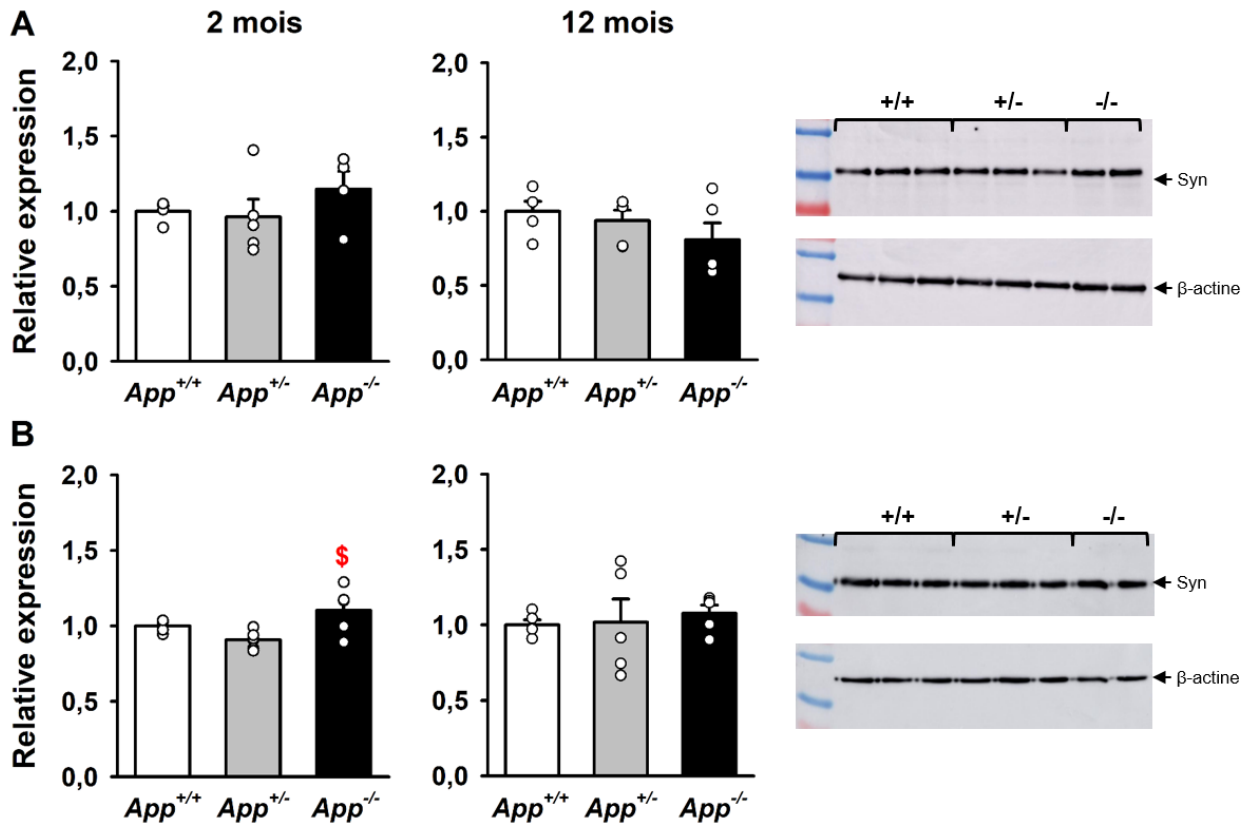
**Figure 67:** Expression de la protéine SNAP-25 dans l'hippocampe et le cortex préfrontal médian des rats *App*<sup>+/+</sup> et *App*<sup>-/-</sup> par western blot

(A) Expression de la protéine SNAP-25 dans l'hippocampe. (B) Expression de la protéine SNAP-25 dans le CPFm. L'expression de la SNAP-25 est normalisée par l'expression de la protéine de référence, la GAPDH. Pour chaque structure, un exemple de photos d'un gel est montré pour la protéine SNAP-25 et la protéine de référence. Pour les 2 structures, aucune différence n'est observée entre les génotypes, quel que soit l'âge étudié. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type.

Concernant la **Synaptophysine**, aucune différence n'est observée dans l'**hippocampe** (Figure 68-A) pour les cohortes de 2 (ANOVA à un facteur,  $F_{2,10}=0,85$ ) et 12 mois (Test de Kruskal-Wallis,  $p=0,33$ ). Dans le **CPFm** (Figure 68-B), en revanche, l'ANOVA à un facteur réalisée pour la cohorte de **2 mois** montre un effet significatif du Génotype ( $F_{2,13}=5,64$  ;  $p<0,05$ ). Ainsi, l'expression de la Synaptophysine est plus importante chez les *App*<sup>-/-</sup> comparés aux *App*<sup>+/+</sup>, avec une augmentation de 21,7% ( $p<0,05$ ). Cette différence n'est pas retrouvée chez la cohorte de **12 mois**, pour laquelle aucun effet significatif du Génotype n'est observé ( $F_{2,12}=0,18$ ).

En conclusion, le KO de l'APP n'a pas d'impact majeur sur l'expression des marqueurs pré-synaptiques SNAP-25 et Synaptophysine. La structure pré-synaptique semble donc préservée.





**Figure 68:** Expression de la protéine Synaptophysine dans l'hippocampe et le cortex préfrontal médian des rats *App*<sup>+/-</sup> et *App*<sup>-/-</sup> par western blot

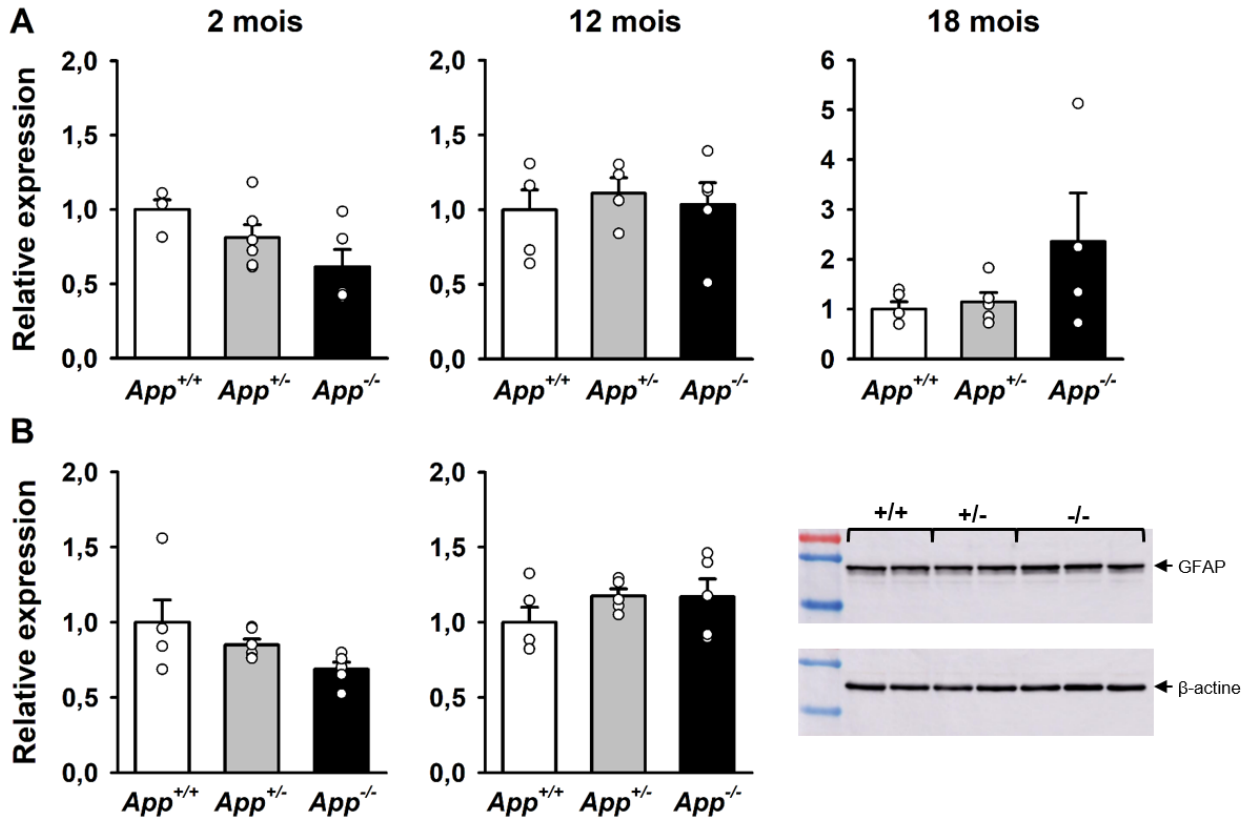
(A) Expression de la protéine Synaptophysine dans l'hippocampe. Aucune différence n'est observée entre les géotypes aux 2 âges étudiés. (B) Expression de la protéine Synaptophysine dans le CPFm. Une augmentation de son expression est observée chez les rats *App*<sup>-/-</sup> comparés aux rats *App*<sup>+/-</sup>. L'expression de la Synaptophysine est normalisée par l'expression de la protéine de référence, la β-actine. Pour chaque structure, un exemple de photos d'un gel est montré pour la protéine Synaptophysine (Syn) et la protéine de référence. Les valeurs représentent des moyennes ± erreur-type. Statistiques : \$  $p < 0,05$  vs. *App*<sup>+/-</sup>.

### 3- Etude de l'expression de marqueurs astrocytaires

Certaines études chez les modèles de souris APP-KO ont mis en évidence une augmentation de l'expression de la GFAP alors que d'autres études ne montrent aucune différence. Nous avons donc voulu savoir si des variations dans l'expression de marqueurs astrocytaires pouvaient être observées dans notre modèle de rat APP-KO. Pour cela, nous avons étudié l'expression de la GFAP et de S100B.

Tout d'abord, pour l'expression de la **GFAP**, aucune différence significative entre les géotypes n'a été observée dans l'**hippocampe** quel que soit l'âge étudié (**Figure 69-A**) (ANOVA à un facteur, à 2 mois  $F_{2,12}=3,57$  ; à 12 mois  $F_{2,11}=0,17$  ; à 18 mois  $F_{2,11}=2,1$ ). Des résultats similaires sont obtenus pour le **CPFm**

(Figure 69-B), l'ANOVA à un facteur ne montre pas d'effet significatif du Génotype que ce soit pour la cohorte de 2 ou de 12 mois (à 2 mois  $F_{2,13}=3,02$  ; à 12 mois  $F_{2,12}=1,15$ ).



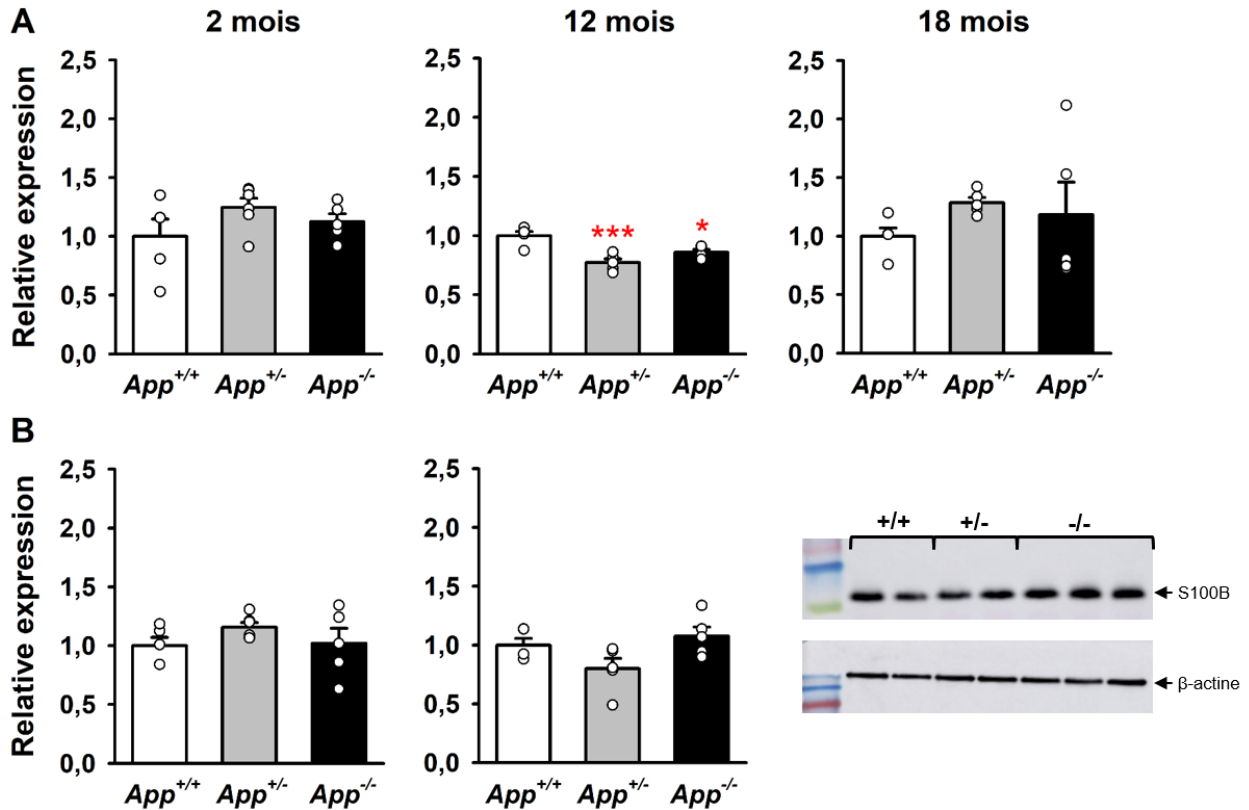
**Figure 69: Expression de la protéine GFAP dans l'hippocampe et le cortex préfrontal médian des rats *App*<sup>+/-</sup> et *App*<sup>-/-</sup> par western blot**

(A) Expression de la protéine GFAP dans l'hippocampe. Aucune différence n'est observée entre les génotypes pour les 3 âges étudiés. (B) Expression de la protéine GFAP dans le CPFm. Aucune différence entre les génotypes n'est mise en évidence que ce soit à 2 ou à 12 mois. L'expression de la GFAP est normalisée par l'expression de la protéine de référence, la β-actine. Un exemple de photos d'un gel est montré en bas à droite de la figure pour la protéine GFAP et la protéine de référence. Les valeurs représentent des moyennes ± erreur-type.

Concernant l'expression de **S100B dans l'hippocampe** (Figure 70-A), alors qu'aucune différence n'est observée entre les génotypes pour la cohorte de **2 mois** (ANOVA à un facteur,  $F_{2,13}=1,54$ ), un effet significatif du Génotype est mis en évidence pour la cohorte de **12 mois** (ANOVA à un facteur,  $F_{2,11}=14,55$  ;  $p<0,001$ ). Ainsi, une réduction de l'expression de S100B est observée chez les rats *App*<sup>+/-</sup> et *App*<sup>-/-</sup> par rapport aux *App*<sup>+/+</sup> ( $p<0,001$  et  $p<0,05$ , respectivement). Elle est de 22,8% chez les *App*<sup>+/-</sup> et de 14,2% chez les *App*<sup>-/-</sup>. Cette dernière n'est pas retrouvée pour la cohorte de 18 mois. En effet, l'ANOVA à un facteur ne montre pas d'effet significatif du Génotype ( $F_{2,12}=0,75$ ). Pour le **CPFm** (Figure 70-B), le niveau

d'expression de S100B ne diffère pas significativement entre les génotypes que ce soit pour la cohorte de 2 mois (ANOVA à un facteur,  $F_{2,13}=1,12$ ), ou pour la cohorte de 12 mois (Test de Kruskal-Wallis,  $p=0,17$ ).

D'après ces résultats, nous pouvons conclure que l'absence d'APP, chez le rat, ne semble pas avoir d'impact majeur au niveau des astrocytes. En effet, seule une réduction de l'expression de S100B est observée dans l'hippocampe pour la cohorte de 12 mois.



**Figure 70:** Expression de la protéine S100B dans l'hippocampe et le cortex préfrontal médian des rats *App*<sup>+/-</sup> et *App*<sup>-/-</sup> par western blot

(A) Expression de la protéine S100B dans l'hippocampe. Une diminution de son expression est observée chez les rats *App*<sup>+/-</sup> et *App*<sup>-/-</sup> à l'âge de 12 mois uniquement. (B) Expression de la protéine S100B dans le CPFm. Aucune différence n'est mise en évidence entre les génotypes que ce soit à 2 ou à 12 mois. L'expression de S100B est normalisée par l'expression de la protéine de référence, la β-actine. Un exemple de photos d'un gel est montré en bas à gauche de la figure pour la protéine S100B et la protéine de référence. Les valeurs représentent des moyennes ± erreur-type. Statistiques : \*  $p < 0,05$  et \*\*\*  $p < 0,001$  vs. *App*<sup>+/+</sup>.

#### 4- Tableau de synthèse

Les résultats de l'analyse moléculaire réalisée chez les rats *App<sup>+/-</sup>* et *App<sup>-/-</sup>* sont synthétisés dans le **Tableau 13**.

		2 mois		12 mois		18 mois	
		<i>App<sup>+/-</sup></i>	<i>App<sup>-/-</sup></i>	<i>App<sup>+/-</sup></i>	<i>App<sup>-/-</sup></i>	<i>App<sup>+/-</sup></i>	<i>App<sup>-/-</sup></i>
APLP1	Hipp	∅		∅		ne	
	CPFm	∅		∅		ne	
APLP2	Hipp	∅		↘		∅	
	CPFm	∅	↘ vs. <i>App<sup>+/-</sup></i>	∅		ne	
SNAP-25	Hipp	∅		∅		ne	
	CPFm	∅		∅		ne	
Synaptophysine	Hipp	∅		∅		ne	
	CPFm	∅	↗ vs. <i>App<sup>+/-</sup></i>	∅		ne	
GFAP	Hipp	∅		∅		∅	
	CPFm	∅		∅		ne	
S100B	Hipp	∅		↘		∅	
	CPFm	∅		∅		ne	

**Tableau 13:** Synthèse des résultats de l'analyse moléculaire réalisée par western blot chez les rats *App<sup>+/-</sup>* et *App<sup>-/-</sup>*

↘ et ↗, indique respectivement une diminution et une augmentation par rapport aux *App<sup>+/+</sup>* ; ∅, indique une absence de différence avec les *App<sup>+/+</sup>* ; ne : non étudié.

## Projet II : Caractérisation de modèles de rats du Syndrome de Down avec ou sans l'APP humanisée

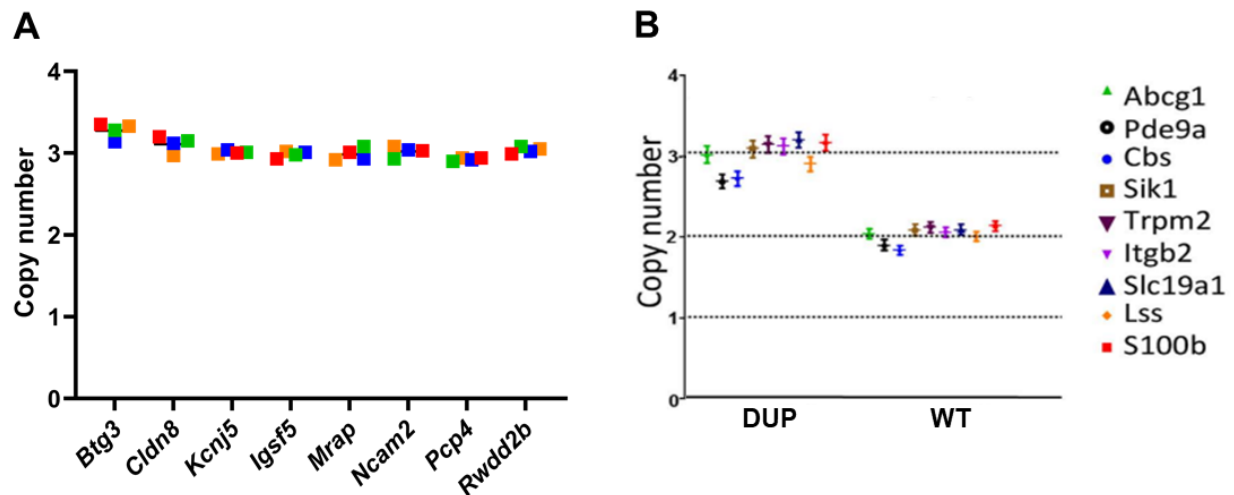
### Objectif 1 : Caractérisation des modèles de rats du Syndrome de Down

Le premier objectif de ce projet était de caractériser de tous nouveaux modèles de rat du SD. Comme pour le premier projet, ces modèles ont d'abord été caractérisés au niveau comportemental avec la réalisation d'une batterie de tests permettant d'évaluer l'activité locomotrice, la mémoire de travail, de reconnaissance ou encore la mémoire spatiale. Par la suite, une analyse de transcriptomique a été réalisée afin de mettre en évidence des voies de signalisation dérégulées. Le but était d'essayer d'établir des liens entre les déficits observés dans les tests comportementaux et les altérations au niveau moléculaire. Pour la partie transcriptomique, les données issues du séquençage sont en cours d'analyse, elles ne seront donc pas présentées dans le manuscrit.

### I- Validation des modèles

#### 1- Validation par ddPCR

La construction des modèles Dup(Rno11) et Dup(Rno20) a été validée dans un premier temps par l'étude du nombre de copies de certains gènes présents dans les régions dupliquées. Cette validation a été réalisée par ddPCR en collaboration avec le service de Validation des Modèles de l'ICS. Dans le cas du **modèle Dup(Rno11)**, huit gènes ont été étudiés : *Btg3*, *Cldn8*, *Kcnj15*, *Igsf5*, *Mrap*, *Ncam2*, *Pcp4* et *Rwdd2b*. Ces gènes sont bien présents en 3 copies chez tous les individus étudiés confirmant la duplication de la région du Rno11 homologue au Hsa21 (**Figure 71-A**). Pour le modèle Dup(Rno20), neuf gènes présents dans la région Rno20 dupliquée ont été étudiés, il s'agit des gènes : *Abcg1*, *Pde9a*, *Cbs*, *Sik1*, *Trpm2*, *Itgb2*, *Slc19a1*, *Lss* et *S100b*. Pour ce modèle, les résultats ont été publiés dans l'article Birling et al. (2017) et sont repris dans la **Figure 71-B**.

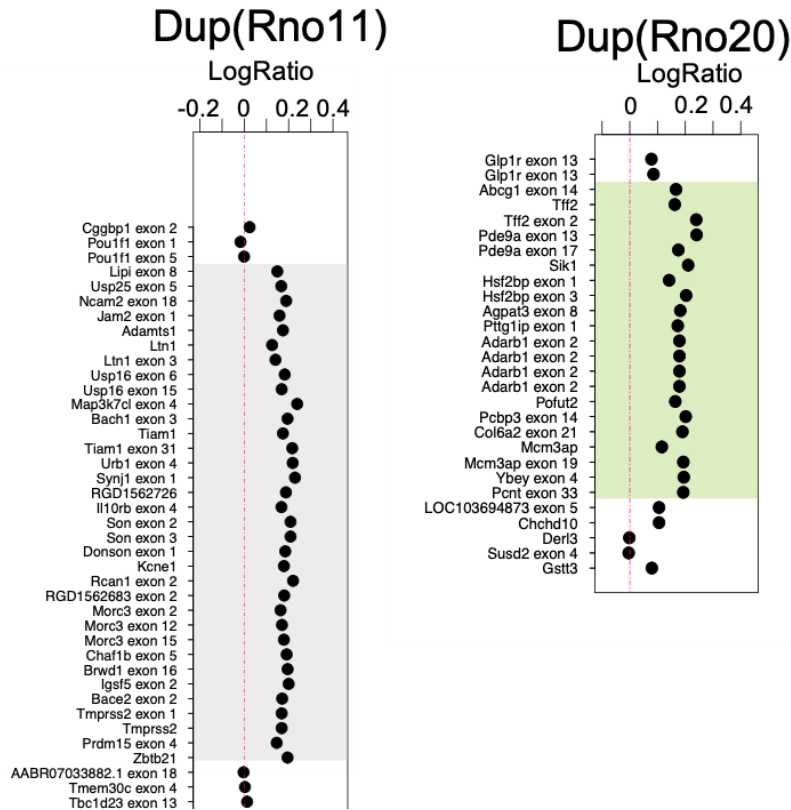


**Figure 71: Validation de la construction des modèles Dup(Rno11) et Dup(Rno20) par ddPCR**

**(A)** Validation de la construction du modèle Dup(Rno11). Le nombre de copies de 8 gènes présents dans la région Rno11 dupliquée a été étudié chez 4 individus. Le nom des gènes étudiés est indiqué sur l'axe des x. L'ensemble des gènes est présent en 3 copies, cela valide donc la construction. **(B)** Validation de la construction du modèle Dup(Rno20). Figure adaptée de Birling et al. (2017). Le nombre de copies de 9 gènes présents dans la région Rno20 dupliquée a été étudié chez 1 individu présentant la duplication. Un rat WT a été utilisé en tant que contrôle. Le nom des gènes étudiés est indiqué à droite du graphique. L'ensemble des gènes est bien présent en 3 copies, cela valide donc la construction.

## 2- Validation par CGH array

La validation des modèles Dup(Rno11) et Dup(Rno20) a été complétée par la réalisation d'un CGH array. Ainsi, le **modèle Dup(Rno11)** comporte une duplication de la région du Rno11 située entre les gènes *Lipi* et *Zbtb21*. Parmi les gènes du Rno11 ciblés par le CGH array ceux inclus dans la région dupliquée présentent bien une augmentation de leur nombre de copies (**Figure 72**). Un  $\text{Log}_{10}\text{Ratio}$  de 0,2 est observé pour ces gènes ce qui traduit une augmentation de 0,5 fois du nombre de copie des gènes, correspondant donc à leur présence en 3 copies. Par ailleurs, l'expression des gènes qui bordent la région dupliquée n'est pas affectée. Ces gènes présentent un  $\text{LogRatio}$  de 0, cela signifie que leur expression est identique entre le rat contrôle et le rat avec la Dup(Rno11). Le **modèle Dup(Rno20)** comporte, quant à lui, une duplication de la région du Rno20 comprise entre les gènes *Umodl1* et *Prmt2*. La réalisation du CGH array a permis de confirmer la duplication de la région située entre les gènes *Abcg1* et *Pcnt*. A noter cependant que le gène *Umodl1* est situé en amont du gène *Abcg1* et que le gène *Prmt2* est situé en aval du gène *Pcnt*. La duplication de ces extrémités n'est donc pas confirmée par le CGH array. Par ailleurs, si l'on s'intéresse aux gènes bordant la région dupliquée, leur expression semble impactée bien qu'elle ne le soit pas autant comparée aux gènes présents dans la région Rno20 dupliquée.



**Figure 72: Validation de la construction des modèles Dup(Rno11) et Dup(Rno20) par CGH array**

Les données issues du CGH array sont représentées sous la forme du logarithme base 10 du ratio de la fluorescence entre l'animal contrôle et l'animal mutant. Ainsi, un  $\log_{10}$ Ratio supérieur à 0 traduit une duplication du gène. Pour le modèle Dup(Rno11), la réalisation du CGH array a permis de confirmer pour les gènes du Rno11 ciblés, la duplication de ceux présents dans la région entre les gènes *Lipi* et *Zbtb21*, région indiquée en gris clair sur la figure. Pour le modèle Dup(Rno20), la duplication est confirmée pour la région entre les gènes *Abcg1* et *Pcnt*, en vert clair sur la figure. Par ailleurs, alors que l'expression des gènes bordant la région dupliquée n'est pas affectée dans le modèle Dup(Rno11), elle semble l'être légèrement dans le modèle Dup(Rno20).

## II- Tests de comportement

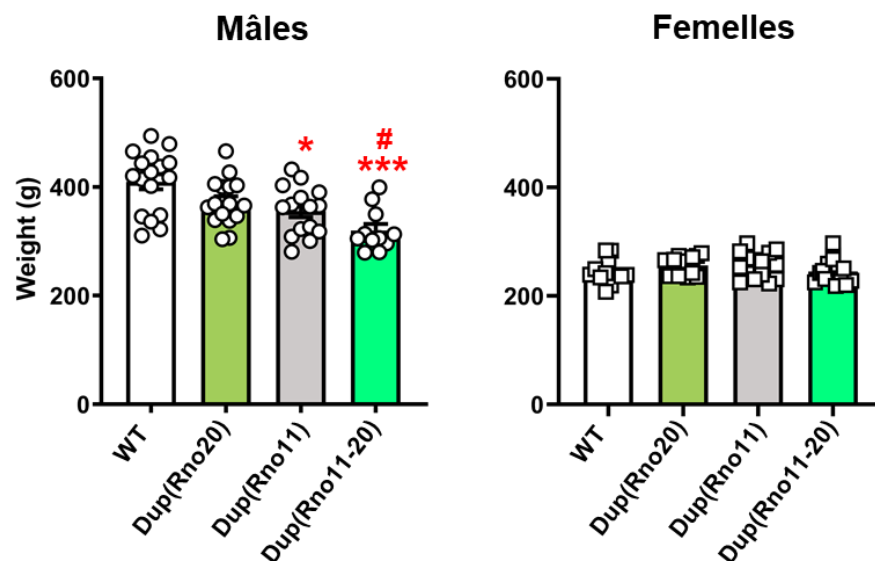
L'analyse comportementale a été réalisée à partir de l'âge de 6-7 semaines sur des mâles et des femelles. Les animaux ont été répartis en 4 cohortes, chaque cohorte étant constituée de 4 groupes génétiques. Les effectifs finaux pour chaque génotype sont les suivants : n=17 mâles et n=13 femelles pour les WT, n=16 mâles et n=15 femelles pour les Dup(Rno20), n=15 mâles et n=16 femelles pour les Dup(Rno11), n=11 mâles et n=14 femelles pour les Dup(Rno11-20). Les résultats obtenus pour ces tests sont présentés dans l'ordre dans lequel ils ont été réalisés. Les analyses statistiques pour les mâles et les femelles ont été faites séparément.

Comme précédemment, pour la lectrice/le lecteur qui le souhaite, un tableau de synthèse (**Tableau 14**) des résultats de l'analyse comportementale des modèles de rats SD se trouve en page 208.

### 1- Masse corporelle

La masse corporelle des rats a été suivie pendant toute la durée des tests comportementaux à raison d'une pesée par semaine. Les résultats des pesées sont ensuite organisés en fonction de l'âge des animaux. En effet, tous les animaux d'une même cohorte n'ont pas le même âge, avec des différences de 1 à 2 semaines. Par conséquent, pour certains âges, nous n'avons pas de valeur pour tous les animaux. Pour les analyses, nous avons pris en compte un âge auquel une valeur de masse corporelle a été obtenue pour tous les animaux de l'étude, soit 9 semaines (Figure 73).

L'ANOVA à un facteur réalisée pour les **mâles** met en évidence un effet significatif du Génotype ( $F_{3,55}=8,49$  ;  $p<0,001$ ). En effet, les mâles Dup(Rno11) présentent une réduction de 13,1% de leur masse corporelle comparés aux animaux WT ( $p<0,05$ ). Une réduction est également observée chez les mâles Dup(Rno11-20) chez lesquels une réduction de 21,9% par rapport aux WT ( $p<0,001$ ) et de 14% par rapport aux Dup(Rno20) ( $p<0,05$ ) sont observées. Concernant les **femelles**, aucune différence entre les génotypes n'est observée (ANOVA à un facteur, effet du Génotype,  $F_{3,56}=1,54$ ).



**Figure 73** : Masse corporelle des rats Dup(Rno20), Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20) à l'âge de 9 semaines

Une réduction de la masse corporelle est observée uniquement chez les mâles Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20). Aucune différence n'est observée chez les femelles. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type. Statistiques : \*  $p<0,05$  et \*\*\*  $p<0,001$  vs. WT ; #  $p<0,05$  vs. Dup(Rno20).



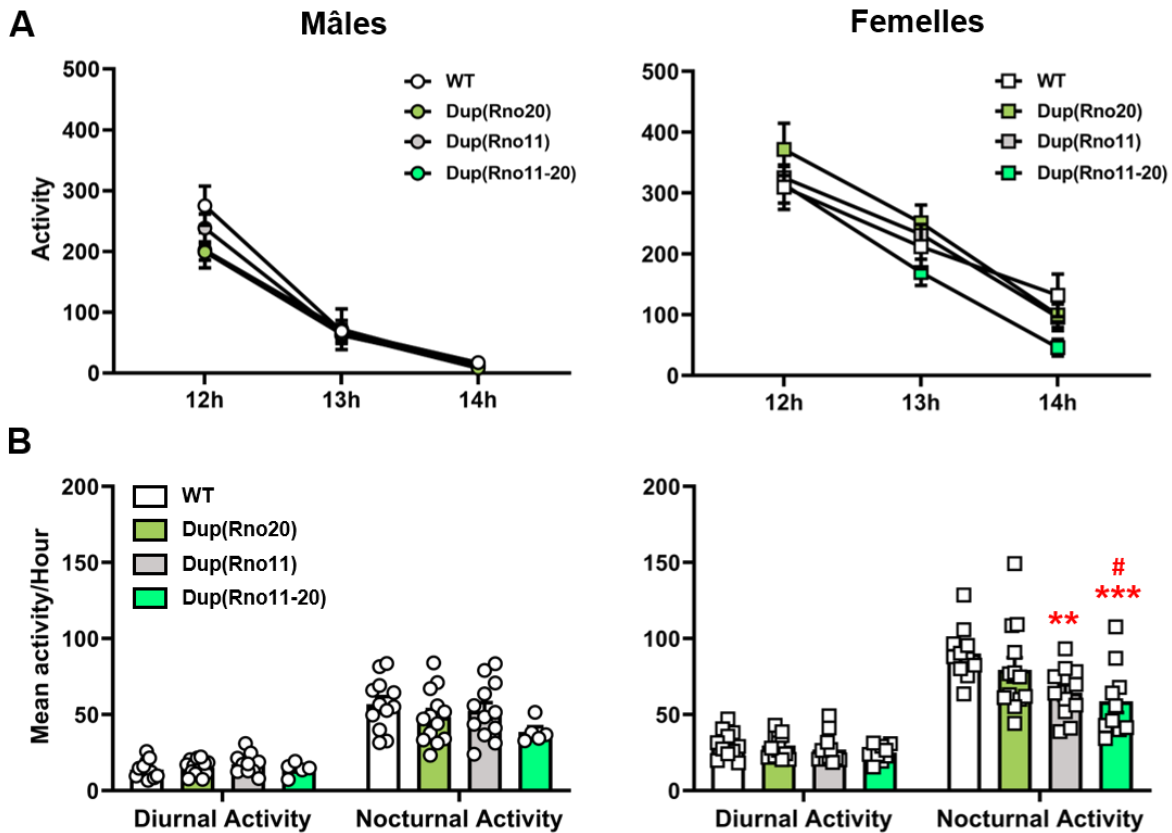
## 2- Test de l'activité circadienne

Dans le protocole utilisé pour ce projet, l'activité locomotrice des animaux est évaluée sur une période de 46h. Comme précédemment, les trois premières heures du test correspondent à la phase d'habituation (**Figure 74-A**). Pour les mâles comme pour les femelles, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Heure) montre un effet significatif de l'Heure ( $p < 0,001$  ; pour les mâles  $F_{2,76}=137,8$  ; pour les femelles  $F_{2,82}=96,79$ ). Cela traduit une diminution de l'activité locomotrice au cours du temps. Aucun effet du Génotype (pour les mâles  $F_{3,38}=1,90$  ; pour les femelles  $F_{3,41}=1,4$ ), ni d'interaction Génotype x Heure (pour les mâles  $F_{6,76}=1,24$  ; pour les femelles  $F_{6,82}=0,99$ ) ne sont observés. Ainsi, l'ensemble des animaux est capable de s'habituer aux conditions expérimentales.

Les 43h suivantes du test sont analysées sous la forme activité diurne *versus* nocturne (**Figure 74-B**). Tout d'abord, pour **les mâles**, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Période) montre un effet significatif de la Période ( $F_{1,38}=194,4$  ;  $p < 0,001$ ). En revanche, aucune différence n'est observée pour l'effet du Génotype ( $F_{3,38}=1,10$ ) ou pour l'interaction Génotype x Période ( $F_{3,38}=2,07$ ). L'effet de la Période est lié à une activité plus importante lors de la phase nocturne par rapport à la phase diurne comme attendu.

Concernant les **femelles**, cet effet de la Période est retrouvé ( $F_{1,41}=212,3$  ;  $p < 0,001$ ). De plus, un effet significatif du Génotype ( $F_{3,41}=4,28$  ;  $p < 0,05$ ), ainsi qu'une interaction Génotype x Période ( $F_{3,41}=3,56$  ;  $p < 0,05$ ) sont mis en évidence. Ainsi, les rats Dup(Rno11-20) sont globalement moins actifs comparés aux WT ( $p < 0,05$ ). L'interaction, quant à elle, montre que les rats Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20) sont moins actifs lors de la phase nocturne comparés aux WT ( $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ , respectivement). Par ailleurs, au cours de cette phase, les rats Dup(Rno11-20) sont également moins actifs que les Dup(Rno20) ( $p < 0,05$ ).

En résumé, une habituation aux conditions expérimentales est observée pour tous les groupes génétiques, à la fois chez les mâles et les femelles. Alors que chez les mâles aucune différence d'activité locomotrice n'est constatée lors des phases diurne et nocturne, les femelles Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20) sont hypoactives pendant la phase nocturne.



**Figure 74: Activité locomotrice des rats Dup(Rno20), Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20) lors du test de l'activité circadienne**

(A) Activité locomotrice des rats lors de la phase d'habituation aux conditions expérimentales correspondant aux trois premières heures du test. La diminution de l'activité locomotrice au cours des heures traduit une habitude des animaux. (B) Activité locomotrice des animaux au cours des phases diurne et nocturne. Une diminution de l'activité locomotrice des femelles Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20) est observée lors de la phase nocturne. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type. *Statistiques* : \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$  vs. WT ; #  $p < 0,05$  vs. Dup(Rno20).

### 3- Labyrinthe en Y

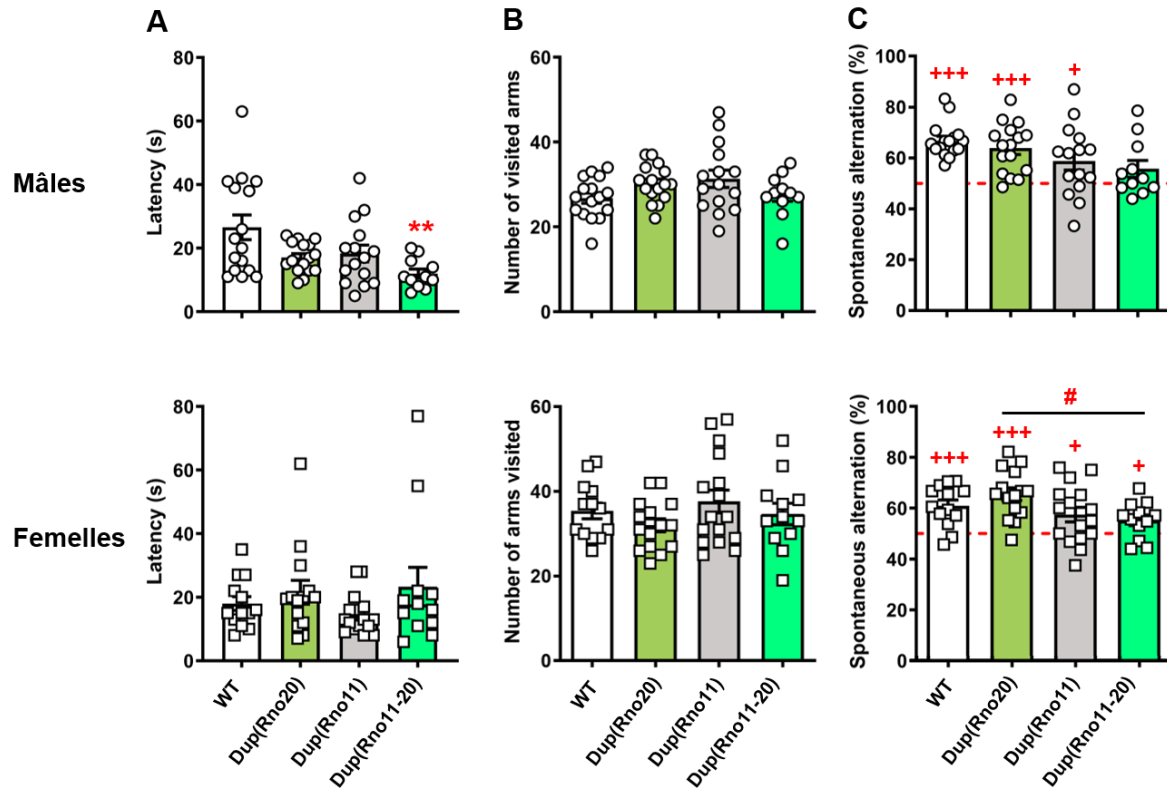
Le test du labyrinthe en Y a ensuite été réalisé. Il permet d'évaluer la mémoire de travail en s'intéressant au comportement d'alternance spontanée des animaux.

Les résultats obtenus pour les mâles montrent un effet significatif du Génotype pour la **latence de sortie du premier bras** (ANOVA à un facteur,  $F_{3,54}=4,84$  ;  $p < 0,01$ ) (Figure 75-A). Le test « post-hoc » révèle ainsi que les mâles Dup(Rno11-20) mettent moins de temps à sortir du bras comparativement aux WT ( $p < 0,01$ ). Par ailleurs, l'ANOVA à un facteur réalisée pour le **nombre de bras visités** ne montre pas d'effet significatif du Génotype ( $F_{3,54}=2,13$ ) (Figure 75-B). Chez les mâles, il n'y a donc pas de différence d'activité entre les différents groupes génétiques. En revanche, pour le **pourcentage d'alternances spontanées** (Figure 75-C),

un effet significatif du Génotype est mis en évidence (Test de Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ). Cependant, le test « post-hoc » de Dunn ne montre pas de différence significative. De plus, la comparaison du pourcentage d'alternance au hasard (50%, one sample  $t$ -Test) indique que tous les rats, à l'exception des Dup(Rno11-20), font significativement plus de 50% d'alternances spontanées ( $p < 0,001$  pour les WT et les Dup(Rno20) ;  $p < 0,05$  pour les Dup(Rno11) ;  $p = 0,12$  pour les Dup(Rno11-20)). Les mâles Dup(Rno11-20) présentent donc un déficit de mémoire de travail.

Les analyses réalisées pour les **femelles** montrent qu'il n'y a pas de différence entre les génotypes pour la **latence de sortie du premier bras** (Test de Kruskal-Wallis) (**Figure 75-A**). Concernant le **nombre de bras visités** (**Figure 75-B**), comme pour les mâles, l'ANOVA à un facteur ne montre pas d'effet significatif du Génotype ( $F_{3,52} = 1,19$ ). L'activité générale est donc similaire entre les groupes. Une différence entre les génotypes est observée pour le **pourcentage d'alternances spontanées** (ANOVA à un facteur, effet du Génotype,  $F_{3,52} = 3,18$  ;  $p < 0,05$ ) (**Figure 75-C**). Ainsi, les femelles Dup(Rno11-20) réalisent significativement moins d'alternances spontanées comparées aux Dup(Rno20) ( $p < 0,05$ ). De plus, la comparaison de ce pourcentage d'alternances à 50% (One sample  $t$ -Test) indique que tous les groupes génétiques font significativement plus de 50% d'alternances spontanées ( $p < 0,001$  pour les WT et Dup(Rno20) ;  $p < 0,05$  pour les Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20)). Les femelles ne présentent donc pas de déficit de mémoire de travail.

En résumé, ce test a permis de mettre en évidence chez les mâles Dup(Rno11-20) une réduction de la latence de sortie du premier bras. Cette réduction n'est pas liée à une hyperactivité des rats. En effet, aucune différence n'est observée entre les génotypes pour l'activité générale. Nous pouvons alors supposer que les mâles Dup(Rno11-20) sont moins anxieux et hésitent donc moins à sortir du bras pour aller explorer le reste du labyrinthe. Cette différence n'est pas retrouvée chez les femelles pour lesquelles aucune différence n'est observée pour la latence de sortie du premier bras. De plus, comme pour les mâles, les femelles ne présentent pas de différence dans leur activité générale. Enfin, un déficit de mémoire de travail est visible chez les mâles Dup(Rno11-20), alors qu'aucun déficit n'est visible chez les femelles.



**Figure 75: Anxiété et mémoire de travail dans le labyrinthe en Y chez les rats Dup(Rno20), Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20)**

(A) Latence de sortie du premier bras. Une réduction de la latence est observée uniquement chez les mâles Dup(Rno11-20). (B) Nombre total d'entrées dans les bras. Aucune différence n'est observée entre les génotypes que ce soit pour les mâles ou les femelles. (C) Pourcentage d'alternances spontanées. Seuls les mâles Dup(Rno11-20) ne font pas significativement plus de 50% d'alternances, ils présentent donc un déficit de mémoire de travail. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type. Statistiques : \*\*  $p < 0,01$  vs. WT ; #  $p < 0,05$  vs. Dup(Rno20) ; +  $p < 0,05$  et +++  $p < 0,001$  vs. hasard (50%).

#### 4- Champ ouvert

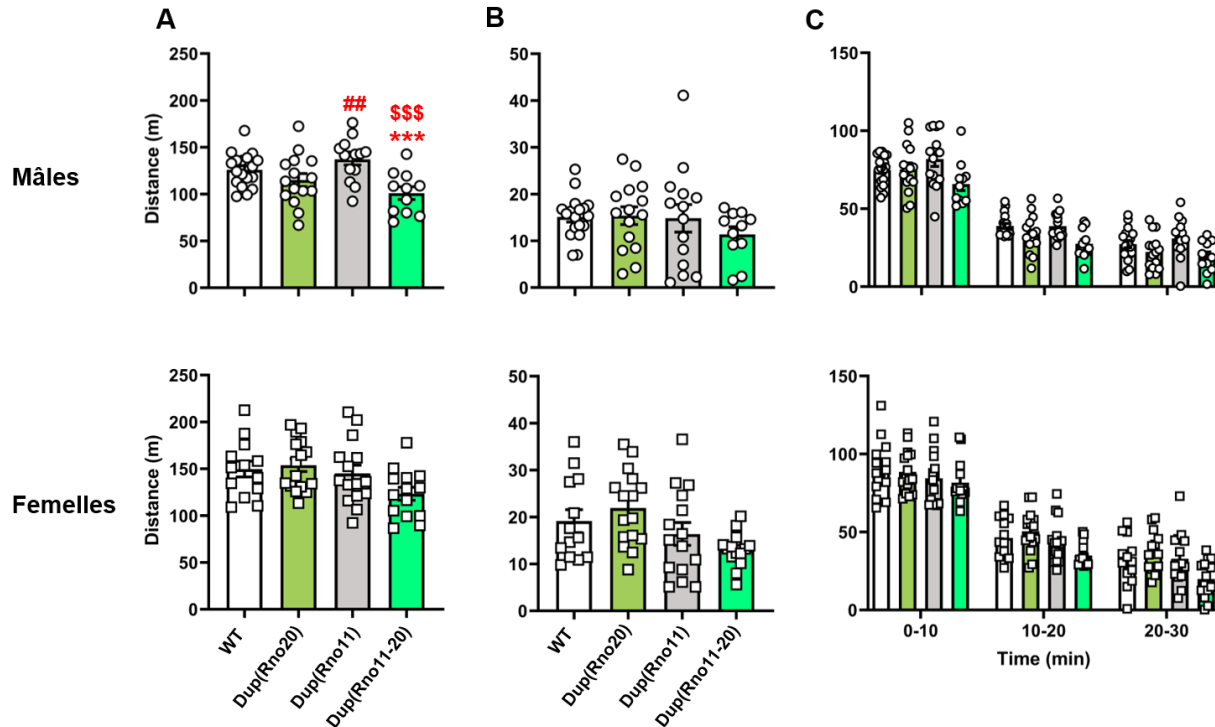
Dans le cadre de ce projet, les rats ont réalisé un unique essai d'une durée de 30 min. Les paramètres évalués sont la distance et le temps passé à la périphérie *versus* le centre du champ ouvert.

Commençons par la **distance parcourue à la périphérie versus le centre** de l'arène (Figure 76-A et B). Pour les mâles, comme pour les femelles, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Zone) montre un effet significatif de la Zone ( $p < 0,001$  ; pour les mâles  $F_{1,108} = 1116$  ; pour les femelles  $F_{1,108} = 961,8$ ) et du Génotype (pour les mâles  $F_{3,108} = 6,30$  -  $p < 0,001$  ; pour les femelles  $F_{3,108} = 4,52$  ;  $p < 0,01$ ). L'effet de la Zone s'explique par une distance parcourue à la périphérie qui est globalement plus importante que la distance parcourue au centre. Par ailleurs, les mâles Dup(Rno11-20) sont moins actifs, ils parcourent une distance globalement moins importante comparativement aux WT ( $p < 0,05$ ) et au Dup(Rno11) ( $p < 0,001$ ). Cette réduction est

retrouvée chez les **femelles** Dup(Rno11-20) comparés aux WT ( $p < 0,05$ ) et aux Dup(Rno20) ( $p < 0,01$ ). Pour les mâles, l'ANOVA indique également une interaction significative Génotype x Zone ( $F_{3,108}=4,57$  ;  $p < 0,01$ ). Ainsi, c'est à la périphérie de l'arène que les mâles Dup(Rno11-20) parcourent une plus faible distance par rapport aux WT et au Dup(Rno11) ( $p < 0,001$ ). A l'inverse, les mâles Dup(Rno11) parcourent une distance plus importante à la périphérie comparativement aux Dup(Rno20) ( $p < 0,01$ ). Concernant les femelles, l'interaction Génotype x Zone n'est pas significative ( $F_{3,108}=1,54$ ).

La **distance totale parcourue** au cours de ces 30 min de tests peut également être fractionnée par **intervalles de 10 min (Figure 76-C)**. Cela permet d'observer l'habituation des animaux à ce nouvel environnement. En temps normal, une diminution de la distance parcourue au cours du temps doit être observée ce qui traduit une habituation. L'ANOVA à 2 facteurs met ainsi en évidence un effet du Temps pour les deux sexes ( $p < 0,001$ , pour les mâles  $F_{2,108}=432,8$  ; pour les femelles  $F_{2,108}=489,4$ ). Ce dernier traduit une diminution de la distance parcourue au cours du temps comme attendu. Un effet significatif du Génotype est également observé (pour les mâles  $F_{3,54}=4,91$  -  $p < 0,01$  ; pour les femelles  $F_{3,54}=3,57$  -  $p < 0,05$ ). Comme mis en évidence précédemment, les mâles Dup(Rno11-20) sont moins actifs en comparaison des WT ( $p < 0,05$ ) et des Dup(Rno11) ( $p < 0,01$ ). C'est également le cas des femelles Dup(Rno11-20) qui parcourent une distance moins importante que les Dup(Rno20) ( $p < 0,05$ ). Enfin, pour les deux sexes, l'interaction Génotype x Temps n'est pas significative (pour les mâles  $F_{6,108}=0,64$  ; pour les femelles  $F_{6,108}=1,10$ ).

En conclusion, ces premières analyses montrent que les rats Dup(Rno11-20) sont globalement moins actifs et ce pour les 2 sexes. Cela est particulièrement vrai au niveau de la périphérie pour les mâles Dup(Rno11-20). Par ailleurs, une habituation à l'arène est observée de façon similaire chez tous les groupes génétiques, pour les mâles, comme pour les femelles.

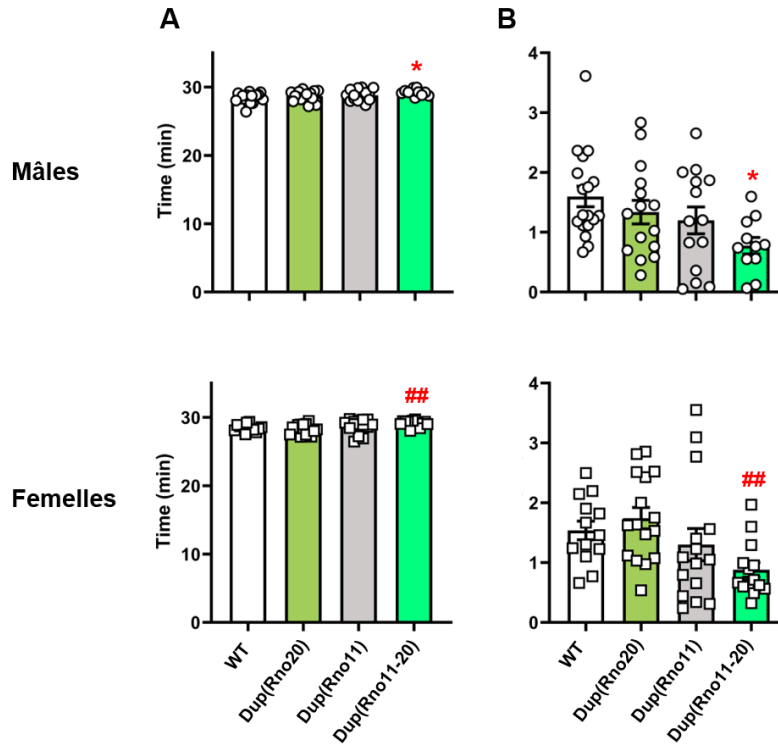


**Figure 76:** Distance parcourue dans le test du champ ouvert chez les rats Dup(Rno20), Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20)

(A) Distance parcourue à la Périphérie du champ ouvert. Les mâles Dup(Rno11) parcourent une distance significativement plus importante comparés aux Dup(Rno20). A l'inverse, les mâles Dup(Rno11-20) sont moins actifs comparés aux WT et aux Dup(Rno11). (B) Distance parcourue au Centre du champ ouvert. Aucune différence n'est observée entre les génotypes pour les deux sexes. (C) Distance totale parcourue par intervalles de 10 minutes. Une diminution de la distance parcourue au cours du temps est observée chez tous les animaux, mâles et femelles. Cette dernière traduit une habitude à l'arène. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type. Statistiques : \*\*\*  $p < 0,001$  vs. WT ; ##  $p < 0,01$  vs. Dup(Rno20) ; \$\$\$  $p < 0,001$  vs. Dup(Rno11).

Enfin, pour le **temps passé à la périphérie versus le centre de l'arène (Figure 77-A et B)**, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Zone) indique, pour les deux sexes, un effet significatif de la Zone ( $p < 0,001$ , pour les mâles  $F_{1,108}=40322$  ; pour les femelles  $F_{1,108}=39449$ ) et une interaction Génotype x Zone ( $p < 0,001$ , pour les mâles  $F_{3,108}=5,98$  ; pour les femelles  $F_{3,108}=7,41$ ). De la même façon que pour la distance périphérie versus centre, l'effet de la Zone traduit un temps passé à la périphérie du dispositif plus important que celui passé au centre. L'interaction, quant à elle, montre une augmentation du temps passé à la périphérie et, par conséquent, une diminution du temps passé au centre de l'arène chez les mâles Dup(Rno11-20) comparés aux WT ( $p < 0,05$ ). Cette observation est également retrouvée chez les femelles Dup(Rno11-20) par rapport aux Dup(Rno20) ( $p < 0,01$ ). Enfin, aucune différence entre les Génotypes n'est mise en évidence pour les deux sexes (pour les mâles  $F_{3,108}=6,53 \times 10^{-9}$  ; pour les femelles  $F_{3,108}=3,07 \times 10^{-9}$ ).

En conclusion, les mâles et les femelles Dup(Rno11-20) passent significativement plus de temps à la périphérie de l'arène, ils seraient donc plus anxieux.



**Figure 77: Temps passé à la périphérie et au centre du champ ouvert chez les rats Dup(Rno20), Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20)**

(A) Temps passé à la Périphérie du champ ouvert. Les mâles et les femelles Dup(Rno11-20) passent significativement plus de temps à la périphérie comparés aux WT et aux Dup(Rno20), respectivement. (B) Temps passé au Centre du champ ouvert. Les mâles et les femelles Dup(Rno11-20) passent significativement moins de temps au centre comparés aux WT et aux Dup(Rno20), respectivement. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type. Statistiques : \*  $p < 0,05$  vs. WT et ##  $p < 0,01$  vs. Dup(Rno20).

## 5- Interaction sociale

Les vidéos générées lors de la réalisation du test sont en cours d'analyse.

## 6- Test de reconnaissance de la localisation de l'objet (OLM)

Le test de l'OLM permet d'évaluer la mémoire spatiale. Plus précisément, dans le cadre de notre protocole, la mémoire spatiale à court terme. Ce test repose sur la tendance des rongeurs à explorer de façon plus importante un objet qui a été déplacé, qui leur apparaît alors comme nouveau, comparé à un objet non déplacé. Les rats sont ainsi placés dans le champ ouvert en présence de 2 objets identiques pour une phase

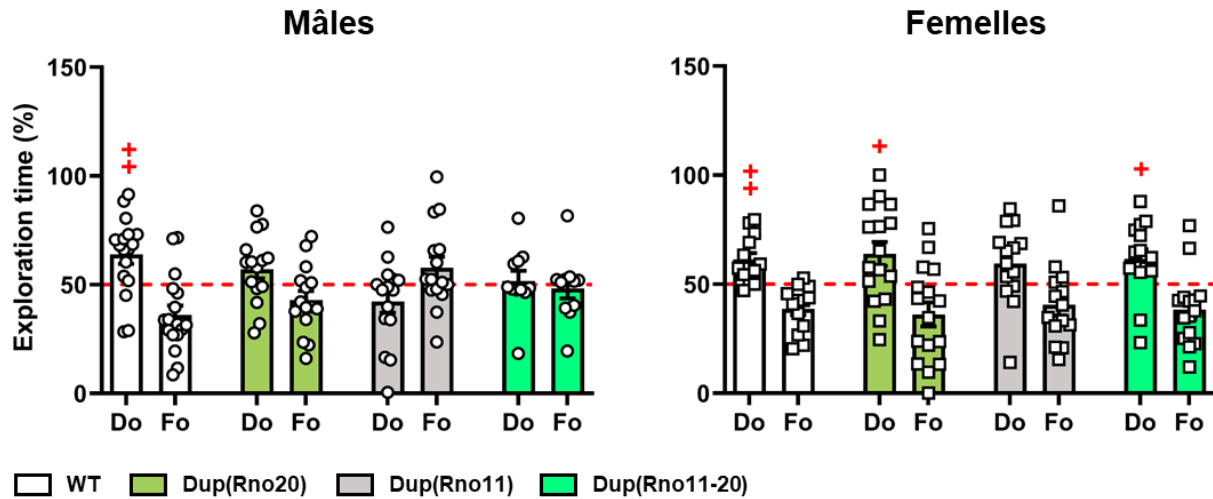
de présentation de 3 min. Ils sont ensuite sortis du champ ouvert pour une phase de rétention de 5 min avant de réaliser la phase de test. L'un des 2 objets est alors déplacé et les animaux sont libres d'explorer pendant 3 min. Le temps d'exploration des objets est évalué pour les phases de présentation et de test. Pour cette dernière, le pourcentage d'exploration de chaque objet est calculé en rapportant le temps d'exploration de l'objet au temps total d'exploration (**Figure 78**).

Pour les **mâles**, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Objet) réalisée pour la phase de test met en évidence un effet significatif de l'Objet ( $F_{1,108}=5,18$  ;  $p<0,05$ ) et une interaction Génotype x Objet ( $F_{3,108}=8,73$  ;  $p<0,001$ ). Le premier vient du fait que les rats explorent globalement plus l'objet déplacé par rapport à l'objet familier non déplacé. L'interaction, quant à elle, indique que les mâles Dup(Rno11) explorent significativement moins l'objet déplacé et significativement plus l'objet familier non déplacé comparés aux WT ( $p<0,01$ ). Par ailleurs, lorsque le pourcentage de temps passé à explorer les objets est comparé au hasard (50%), seul les mâles WT passent significativement plus de 50% de leur temps sur l'objet déplacé ( $p<0,01$ ). Cette différence n'est pas retrouvée pour les mâles Dup(Rno20), Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20).

Pour les **femelles**, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Objet) montre également un effet de l'Objet ( $F_{1,108}=49,17$  ;  $p<0,001$ ). Comme pour les mâles, les femelles passent significativement plus de temps à explorer l'objet déplacé que l'objet familier non déplacé. Aucun effet du Génotype ( $F_{3,108}=6,01 \times 10^{-20}$ ), ni d'interaction Génotype x Objet ( $F_{3,108}=0,31$ ) ne sont observés. La comparaison du pourcentage de temps d'exploration à 50% indique que les rats WT, Dup(Rno20) et Dup(Rno11-20) passent significativement plus de 50% de leur temps sur l'objet déplacé ( $p<0,01$  pour les WT ;  $p<0,05$  pour les Dup(Rno20) et les Dup(Rno11-20)). Cette différence par rapport à 50% n'est pas retrouvée pour les femelles Dup(Rno11) ( $p=0,074$ ). Cependant, lorsqu'on regarde le graphique de plus près, l'une des femelles Dup(Rno11) passe beaucoup plus de temps sur l'objet familier non déplacé que sur l'objet déplacé. Cela pourrait expliquer pourquoi la significativité n'est pas atteinte. En effet, lorsque l'analyse statistique est refaite sans ce rat, les femelles Dup(Rno11) passent significativement plus de 50% de leur temps sur l'objet déplacé ( $p<0,01$ ).

En conclusion, ces résultats mettent en évidence un déficit de mémoire spatiale à court terme chez les mâles Dup(Rno20), Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20). Ce déficit n'est pas retrouvé chez les femelles. Bien que la significativité par rapport à 50% ne soit pas atteinte pour les femelles Dup(Rno11), cela semble lié aux mauvaises performances de l'un des rats.





**Figure 78: Mémoire spatiale à court terme chez les rats Dup(Rno20), Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20) lors du test de l'OLM**

Le pourcentage de temps passé à explorer les objets est évalué lors de la phase de test. L'objet déplacé est noté Do, l'objet familier non déplacé est noté Fo. Un déficit de mémoire spatiale à court terme est observé chez les mâles Dup(Rno20), Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20). Ca ne semble pas être le cas chez les femelles, bien que les femelles Dup(Rno11) n'atteignent pas la significativité, cela semble être principalement lié à l'une des femelles qui passe plus de temps sur l'objet Fo par rapport à l'objet Do. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type. *Statistiques* : +  $p < 0,05$  et ++  $p < 0,01$  vs. hasard (50%).

## 7- Test de reconnaissance du nouvel objet (NOR)

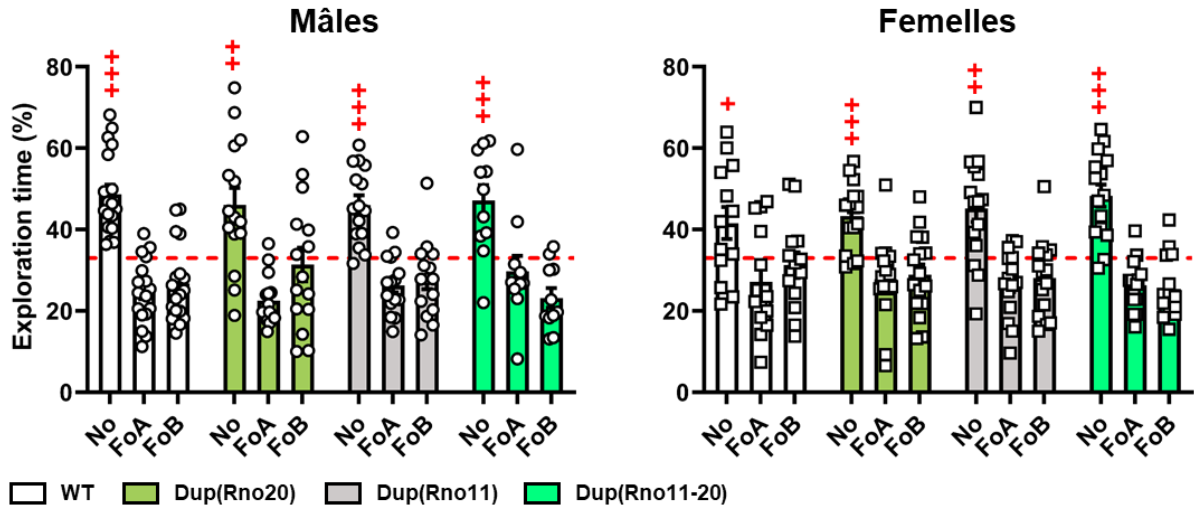
La mémoire de reconnaissance a ensuite été évaluée par le test du NOR. Comme pour le test de l'OLM, ce test se base sur le comportement naturel des rats à passer plus de temps à explorer un objet nouveau comparativement à l'exploration d'un objet familier. Ainsi, lors de la phase de présentation, le rat est placé dans l'arène en présence de 3 objets différents pendant 3 min. Le lendemain, la phase de test est réalisée, l'un des 3 objets est alors remplacé par un nouvel objet jamais rencontré par l'animal. Le temps passé à explorer chacun de ces objets est alors mesuré et le pourcentage de temps d'exploration de chacun est calculé. Ce dernier correspond au rapport du temps passé à explorer l'un des objets sur le temps total d'exploration des objets, le tout multiplié par 100. Afin de faciliter la compréhension, les objets familiers sont appelés A et B. Ainsi, l'objet familier A est noté FoA et l'objet familier B, FoB, le nouvel objet est noté No.

Tout d'abord, pour les **mâles** (Figure 79), l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Objet) montre un effet significatif de l'Objet ( $F_{2,165}=69,96$  ;  $p < 0,001$ ). Ainsi, les rats passent globalement plus de temps à explorer le nouvel objet comparé aux objets familiers ( $p < 0,001$  No vs. FoA et FoB). Aucun effet du Génotype ( $F_{3,165}=5,66 \times 10^{-18}$ ) ou de l'interaction Génotype x Objet ( $F_{6,165}=1,27$ ) ne sont observés. Les ANOVA à un

facteur réalisées pour chaque groupe génétique confirme pour chacun d'entre eux qu'ils passent significativement plus de temps sur le nouvel objet comparé aux objets familiers (pour les WT  $F_{2,51}=37,73$  -  $p<0,001$  No vs. FoA et FoB ; pour les Dup(Rno20)  $F_{2,42}=11,71$  -  $p<0,001$  No vs. FoA et  $p<0,05$  No vs. FoB ; pour les Dup(Rno11)  $F_{2,42}=24,89$   $p<0,001$  No vs. FoA et FoB ; pour les Dup(Rno11-20)  $F_{2,27}=25,20$  -  $p<0,001$  NO vs. FoA et FoB). Enfin, la comparaison du pourcentage de temps d'exploration au hasard (33%) indique que tous les groupes génétiques passent significativement plus de 33% de leur temps sur le nouvel objet ( $p<0,001$  pour les WT, les Dup(Rno11) et les Dup(Rno11-20) ;  $p<0,01$  pour le Dup(Rno20)).

Concernant les **femelles (Figure 79)**, des résultats similaires sont obtenus. Ainsi, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Objet) met en évidence un effet de l'Objet ( $F_{2,165}=52,87$  ;  $p<0,001$ ). Globalement, les femelles passent également plus de temps à explorer le nouvel objet comparé aux objets familiers ( $p<0,001$ ). Aucun effet du Génotype ( $F_{3,165}=1,40 \times 10^{-17}$ ) ou de l'interaction Génotype x Objet ( $F_{6,165}=0,97$ ) n'est pas observé. Les ANOVA à un facteur montrent également que tous les génotypes, à l'exception des femelles WT, passent significativement plus de temps sur le nouvel objet comparé aux objets familiers (pour les Dup(Rno20)  $F_{2,45}=13,44$  -  $p<0,001$  No vs. FoA et FoB ; pour les Dup(Rno11)  $F_{2,42}=14,67$  -  $p<0,001$  No vs. FoA et FoB ; pour les Dup(Rno11-20)  $F_{2,42}=36,43$  -  $p<0,001$  No vs. FoA et FoB). Pour les femelles WT, bien qu'elles passent significativement plus de temps sur le nouvel objet comparé à l'objet familial FoA ( $p<0,05$ ), il n'y a pas de différence significative entre le nouvel objet et l'objet familial FoB ( $p=0,12$ ). Enfin, la comparaison du pourcentage de temps d'exploration à 33% montre que pour les 4 génotypes le pourcentage de temps passé à explorer le nouvel objet est significativement supérieur à 33% ( $p<0,05$  pour les WT ;  $p<0,001$  pour les Dup(Rno20) et les Dup(Rno11-20) ;  $p<0,01$  pour les Dup(Rno11)).

Nous pouvons donc conclure que les mâles, comme les femelles, Dup(Rno20), Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20) ne présentent pas de déficit de leur mémoire de reconnaissance.



**Figure 79: Mémoire de reconnaissance chez les rats Dup(Rno20), Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20) lors du test du NOR**

Le pourcentage de temps passé à explorer les objets est évalué lors de la phase de test. Le nouvel objet est noté No, les objets familiers A et B sont notés, respectivement, FoA et FoB. L'ensemble des rats passe significativement plus de 33% de leur temps sur le No, aucun déficit de mémoire de reconnaissance n'est donc observé pour les deux sexes. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type. *Statistiques* : +  $p < 0,05$  ; ++  $p < 0,01$  et +++  $p < 0,001$  vs. hasard (33%).

## 8- Piscine de Morris

Le dernier test qui a été réalisé est celui de la piscine de Morris. Comme pour le premier projet, le protocole que nous avons utilisé ici comporte différentes phases. Tout d'abord, une phase d'acquisition de 5 jours, suivie d'un premier test de rappel 24h après le dernier jour d'acquisition. Ensuite, afin d'évaluer la flexibilité comportementale, une phase de *reversal* a été réalisée pour laquelle la position de la plateforme est modifiée. A la fin du *reversal*, soit 24h après le dernier jour, un second test de rappel est effectué. Pour chaque phase, différents paramètres sont évalués, ils sont décrits ci-dessous.

### 8.1- Phase d'acquisition

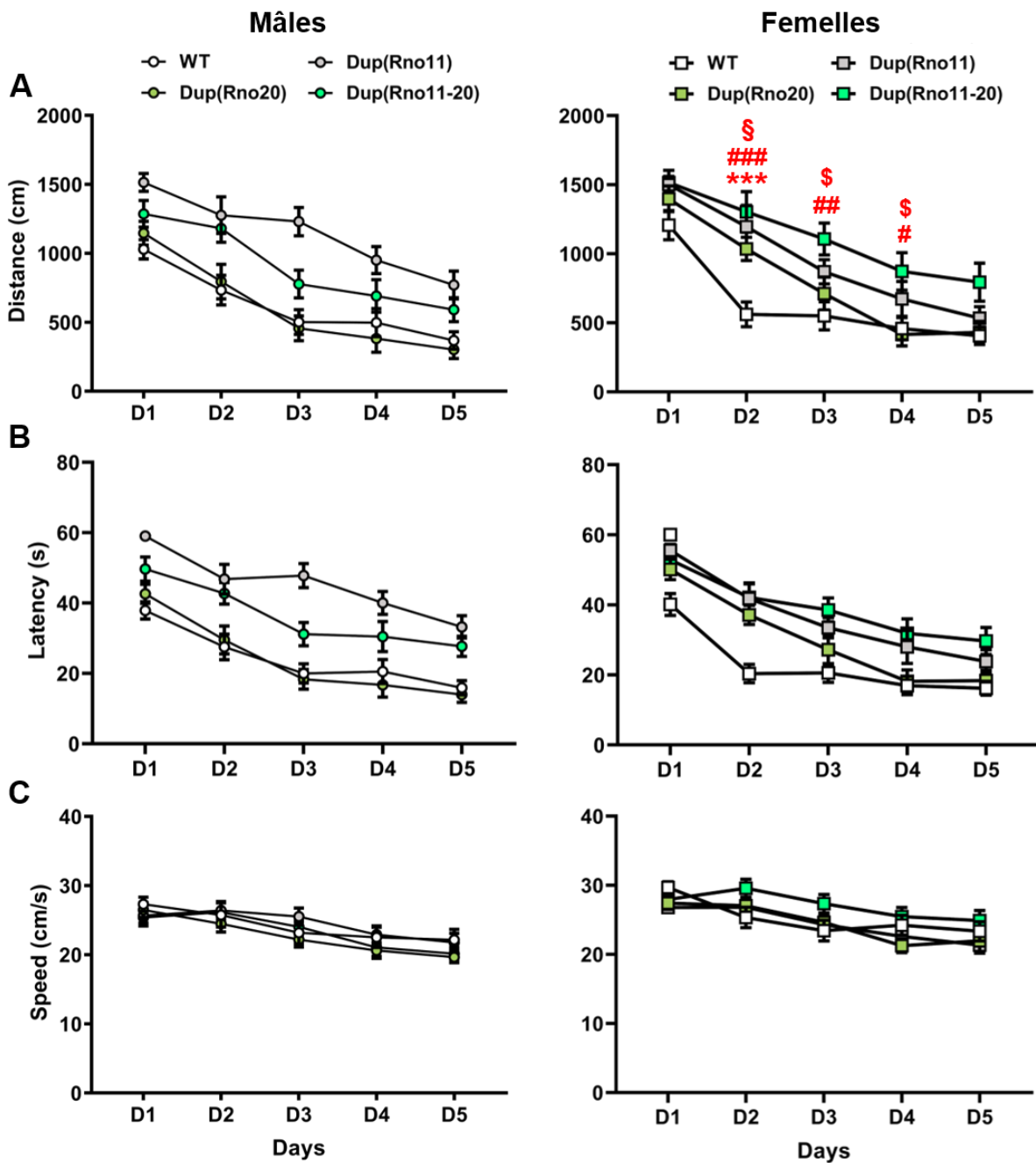
Les paramètres évalués lors de la phase d'acquisition sont la distance parcourue et la latence pour atteindre la plateforme ainsi que la vitesse de nage.

Concernant la **distance parcourue pour atteindre une plateforme (Figure 80-A)**, pour les deux sexes, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Jour) met en évidence un effet du Jour ( $p < 0,001$ , pour les mâles  $F_{4,220}=51,03$  ; pour les femelles  $F_{4,220}=70,44$ ). Cet effet s'explique par une diminution de la distance parcourue au cours des jours d'acquisition traduisant un apprentissage. Un effet significatif du Génotype

est également observé ( $p < 0,001$ , pour les mâles  $F_{3,55}=16,84$  ; pour les femelles  $F_{3,55}=7,23$ ). Ainsi, les mâles et les femelles Dup(Rno11) parcourent une distance significativement plus importante pour atteindre la plateforme comparativement aux WT ( $p < 0,001$  pour les mâles et  $p < 0,05$  pour les femelles). Chez les mâles, une différence est également observée entre les Dup(Rno11) et les Dup(Rno20), les premiers parcourant une distance plus importante ( $p < 0,001$ ). Enfin, une augmentation de la distance parcourue est observée chez les Dup(Rno11-20), mâles et femelles, comparés aux rats WT ( $p < 0,05$  pour les mâles et  $p < 0,001$  pour les femelles) et aux Dup(Rno20) ( $p < 0,05$  pour les mâles et les femelles). Concernant l'interaction Génotype x Jour, elle n'est pas significative pour les mâles ( $F_{12,220}=1,05$ ), mais tend à l'être pour les femelles ( $F_{12,220}=1,58$  ;  $p=0,099$ ). Le test « post-hoc » montre ainsi que les femelles Dup(Rno11-20) parcourent une distance plus importante que les WT aux jours 2, 3 et 4 ( $p < 0,001$  ;  $p < 0,01$  et  $p < 0,05$ , respectivement) et que les Dup(Rno20) aux jours 3 et 4 ( $p < 0,05$ ). Par ailleurs, les femelles WT parcourent une distance moins importante comparées aux Dup(Rno11) ( $p < 0,001$ ) et au Dup(Rno20) ( $p < 0,05$ ) au jour 2 d'apprentissage.

Des résultats similaires sont obtenus pour la **latence pour atteindre la plateforme (Figure 80-B)**. Pour les **deux sexes**, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Jour) montre un effet du Jour ( $p < 0,001$ , pour les mâles  $F_{4,220}=46,81$  ; pour les femelles  $F_{4,220}=68,43$ ) ainsi qu'un effet du Génotype ( $p < 0,001$ , pour les mâles  $F_{3,55}=29,64$  ; pour les femelles  $F_{3,55}=9,17$ ). Ainsi, de façon globale, la latence pour atteindre la plateforme diminue au cours des jours ce qui traduit également un apprentissage. Par ailleurs, tout comme pour la distance, les mâles et les femelles Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20) mettent plus de temps à atteindre la plateforme comparativement aux WT ( $p < 0,001$ ). Une différence est également observée entre les Dup(Rno20) et les Dup(Rno11-20) ( $p < 0,001$  pour les mâles et  $p < 0,05$  pour les femelles), les derniers mettant plus de temps à atteindre la plateforme. Enfin, uniquement chez les mâles, une augmentation de la latence pour atteindre la plateforme est observée chez les rats Dup(Rno11) comparés aux Dup(Rno20) ( $p < 0,001$ ) et aux Dup(Rno11-20) ( $p < 0,05$ ). Aucune interaction Génotype x Jour n'est observée (pour les mâles  $F_{12,220}=1,00$  ; pour les femelles  $F_{12,220}=1,35$ ).

En conclusion, l'analyse de la distance et de la latence pour atteindre la plateforme montre que les mâles et les femelles Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20) présentent un déficit d'apprentissage spatial. En effet, ils parcourent une distance significativement plus importante et mettent plus de temps à atteindre la plateforme que les WT. Cependant, ces animaux sont capables d'apprendre, une diminution de la distance et de la latence au cours des jours étant observée.



**Figure 80: Apprentissage spatial chez les rats Dup(Rno20), Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20) lors de la phase d'acquisition en piscine de Morris**

(A) Distance parcourue pour atteindre la plateforme. Les mâles et les femelles Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20) présentent un déficit d'apprentissage, ils parcourent une distance plus importante que les WT ( $p < 0,001$  et  $p < 0,05$  pour les mâles ;  $p < 0,05$  et  $p < 0,001$  pour les femelles, respectivement). (B) Latence pour atteindre la plateforme. Les rats Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20), mâles et femelles, mettent significativement plus de temps à atteindre la plateforme comparativement aux WT ( $p < 0,001$ ). (C) Vitesse de nage. Aucune différence n'est observée entre les génotypes. Statistiques : \*\*\*  $p < 0,001$  Dup(Rno11) vs. WT, #  $p < 0,05$  ; ##  $p < 0,01$  et ###  $p < 0,001$  Dup(Rno11-20) vs. WT, \$  $p < 0,05$  Dup(Rno20) vs. WT, \$\$  $p < 0,01$  Dup(Rno20) vs. Dup(Rno11-20).

Enfin, si l'on s'intéresse à la **vitesse de nage (Figure 80-C)**, un effet du Jour est mis en évidence avec l'ANOVA à 2 facteurs pour les deux sexes ( $p < 0,001$ , pour les mâles  $F_{4,220}=33,40$  ; pour les femelles  $F_{4,220}=30,71$ ). Cela s'explique par une diminution de la vitesse de nage au cours des jours d'apprentissage. Pour les 2 sexes, aucun effet du Génotype n'est observé (pour les mâles  $F_{3,55}=0,55$  ; pour les femelles  $F_{3,55}=1,50$ ). Concernant l'interaction Génotype x Jour, elle n'est pas significative pour les mâles ( $F_{12,220}=1,19$ ). Bien qu'elle soit significative pour les femelles ( $F_{12,220}=2,04$  ;  $p < 0,05$ ), le test « post-hoc » de Tukey ne montre pas de différence significative.

L'absence de différence entre les génotypes pour la vitesse de nage, que ce soit pour les mâles ou pour les femelles, permet de conclure que le déficit d'apprentissage observé chez les Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20) n'est pas lié à un problème moteur.

## 8.2- Test de rappel n°1

Le premier test de rappel est réalisé 24h après le dernier jour d'acquisition, le pourcentage de temps passé dans les différents quadrants ainsi que le nombre de croisements de l'emplacement de la plateforme sont évalués.

Tout d'abord, pour le **pourcentage de temps passé dans les quadrants (Figure 81-A)**, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Quadrant) met en évidence, chez les **mâles**, un effet du Quadrant ( $F_{3,220}=45,54$  ;  $p < 0,001$ ). Les rats passent ainsi significativement plus de temps dans le QC (quadrant NE), où se trouvait la plateforme, par rapport aux autres quadrants ( $p < 0,001$ ). Aucun effet du Génotype n'est observé ( $F_{3,220}=9,62 \times 10^{-18}$ ), en revanche, l'interaction Génotype x Quadrant est significative ( $F_{9,220}=2,47$  ;  $p < 0,05$ ). Les mâles Dup(Rno11) passent ainsi significativement moins de temps dans le QC comparés aux WT ( $p < 0,01$ ) et aux Dup(Rno20) ( $p < 0,05$ ). Lorsque le pourcentage de temps passé dans le QC est comparé à 25% (One sample *t*-Test), tous les groupes génétiques y passent significativement plus de 25% de leur temps ( $p < 0,001$  pour les WT et Dup(Rno20) ;  $p < 0,05$  pour les Dup(Rno11) et  $p < 0,01$  pour les Dup(Rno11-20)).

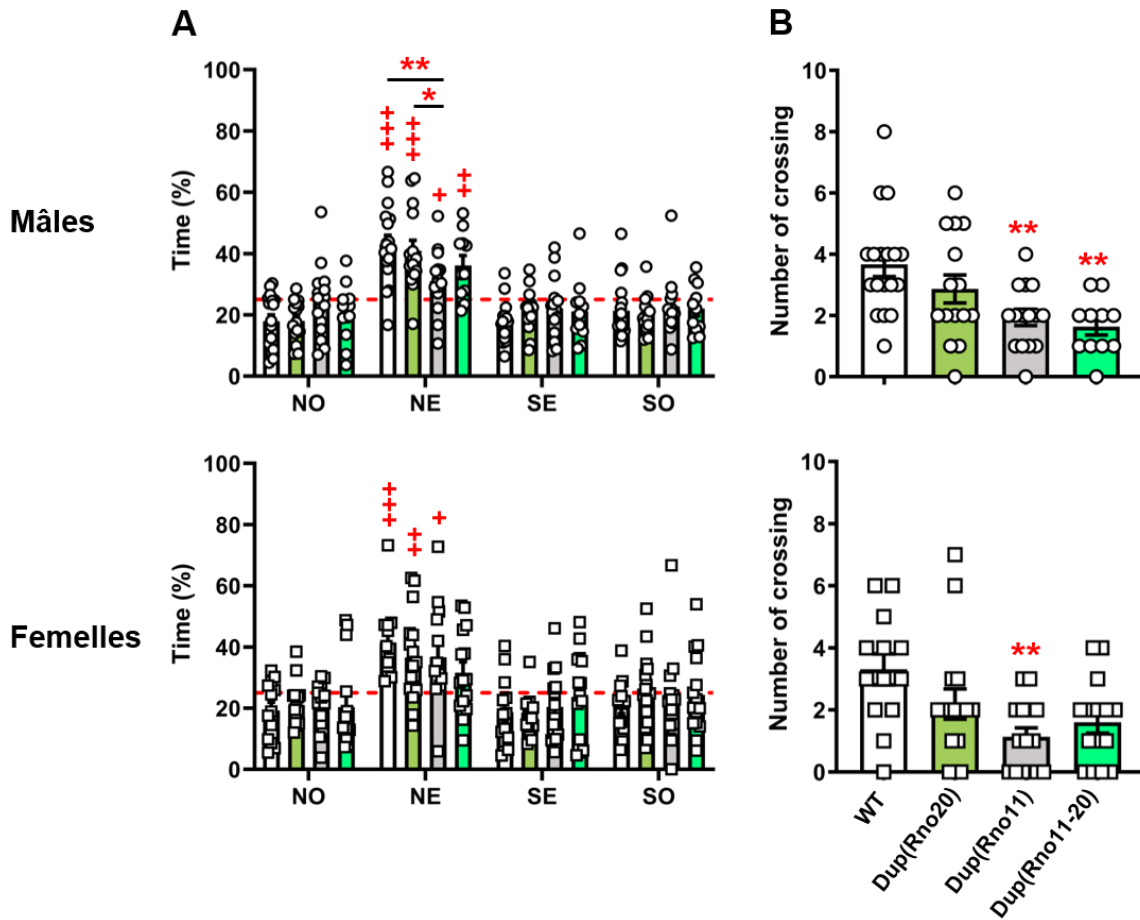
Pour les **femelles**, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Quadrant) montre également un effet significatif du Quadrant ( $F_{3,220}=25,06$  ;  $p < 0,001$ ). Comme pour les mâles, cela s'explique par un temps passé dans le QC significativement supérieur au temps passé dans les autres quadrants ( $p < 0,001$ ). L'effet du Génotype ( $F_{3,220}=1,2 \times 10^{-17}$ ) et l'interaction Génotype x Quadrant ( $F_{9,220}=1,02$ ) ne sont pas significatifs. La comparaison à 25% du pourcentage de temps passé dans le QC indique que seules les femelles Dup(Rno11-20) ne

passent pas significativement plus de 25% dans le QC ( $p=0,082$  ; pour les autres génotypes :  $p<0,001$  pour les WT ;  $p<0,01$  pour les Dup(Rno20) et  $p<0,05$  pour les Dup(Rno11)).

En conclusion, nous pouvons conclure que l'ensemble des mâles est capable de rappeler la localisation de la plateforme. Aucun déficit de mémoire spatiale n'est donc observé chez les mâles Dup(Rno20), Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20). En revanche, chez les femelles, les Dup(Rno11-20) ne sont pas capables de rappeler la localisation de la plateforme, ce qui est traduit dans le fait qu'elles n'insistent pas dans le QC. Elles présentent donc un déficit de mémoire spatiale.

Concernant le **nombre de croisements de l'emplacement de la plateforme (Figure 81-B)**, l'ANOVA à un facteur réalisée pour les **mâles** indique un effet significatif du Génotype ( $F_{3,55}=6,1$  ;  $p<0,01$ ). Ainsi, les mâles Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20) croisent significativement moins l'emplacement de la plateforme comparés aux WT ( $p<0,01$ ). De la même façon, pour les femelles, le test de Kruskal-Wallis met en évidence un effet significatif du Génotype ( $p<0,01$ ). Les femelles Dup(Rno11) croisent ainsi significativement moins l'emplacement de la plateforme comparées aux WT ( $p<0,01$ ).

La réduction du nombre de croisements de l'emplacement de la plateforme observée chez les mâles et femelles Dup(Rno11) et les mâles Dup(Rno11-20) traduit une moins bonne précision de leur mémoire. Ainsi, bien qu'ils soient capables de rappeler la localisation de la plateforme, ils le font avec moins de précision comparés aux WT



**Figure 81: Mémoire spatiale chez les rats Dup(Rno20), Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20) lors du premier test de rappel en piscine de Morris**

(A) Pourcentage de temps passé dans les différents quadrants. Tous les animaux, à l'exception des femelles Dup(Rno11-20), passent significativement plus de 25% de leur temps dans le quadrant cible (NE). Ils sont donc capables de rappeler la localisation de la plateforme. Les femelles Dup(Rno11-20) présentent ainsi un déficit de mémoire spatiale. (B) Nombre de croisements de l'emplacement de la plateforme. Chez les mâles, les Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20) croisent significativement moins l'emplacement de la plateforme comparés aux WT (\*\*  $p < 0,01$ ). C'est également le cas des femelles Dup(Rno11) (\*\*  $p < 0,01$ ). Ces animaux présentent donc une moins bonne précision de leur mémoire. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type. *Statistiques* : +  $p < 0,05$  ; ++  $p < 0,01$  et +++  $p < 0,001$  vs. hasard (25%), \*  $p < 0,05$  et \*\*  $p < 0,01$ .

### 8.3- Phase de reversal

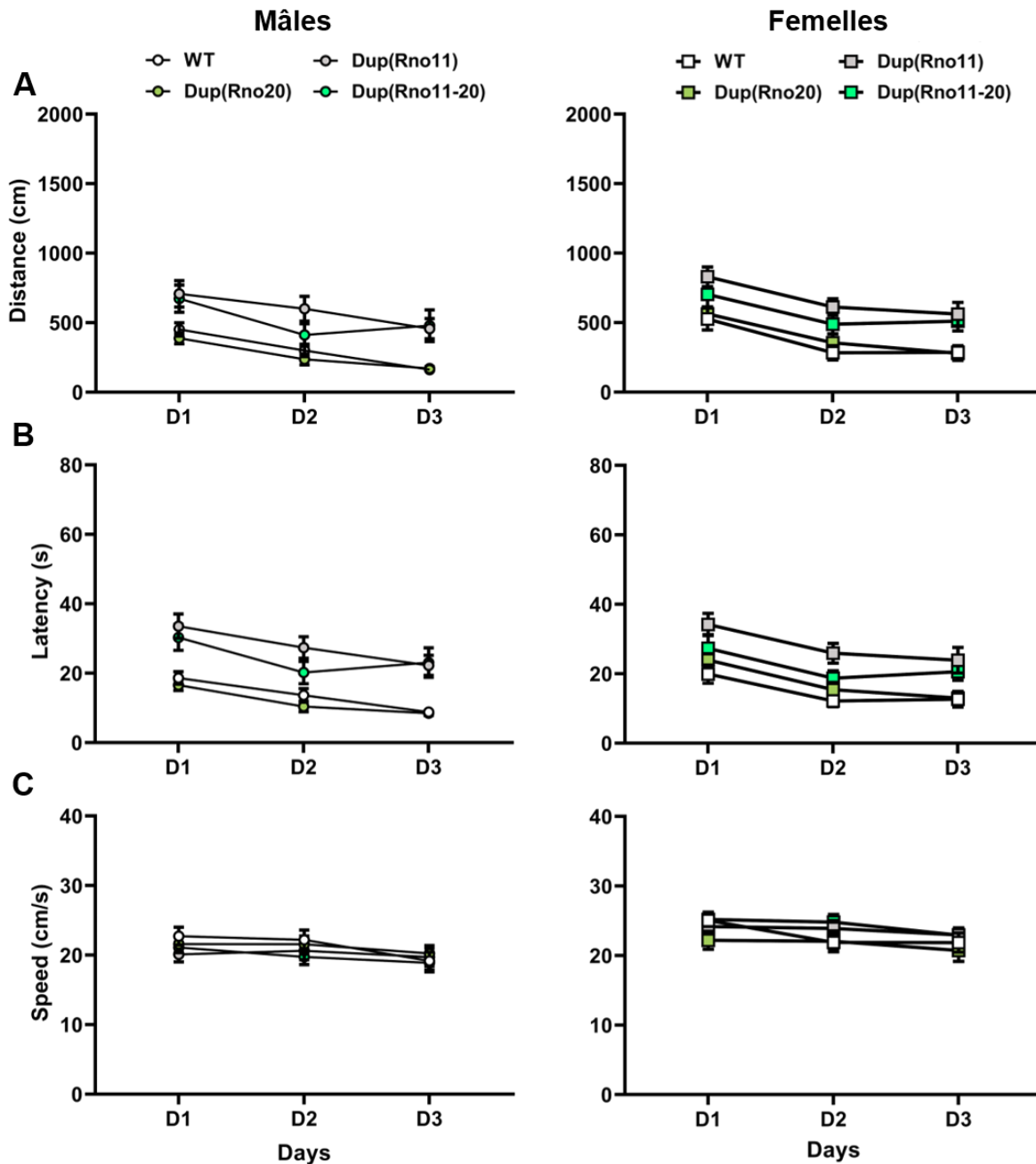
La phase de *reversal* se déroule dans les mêmes conditions que la phase d'acquisition. Le seul changement concerne la localisation de la plateforme qui est modifiée. Alors qu'elle était placée dans le quadrant NE lors de l'acquisition, elle est déplacée dans le quadrant SO pour le reversal. Les paramètres mesurés sont les mêmes que ceux de l'acquisition.



Si l'on s'intéresse d'abord à la **distance parcourue pour atteindre la plateforme (Figure 82-A)**, pour les deux sexes, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Jour) montrent un effet du Jour ( $p < 0,001$ , pour les mâles  $F_{2,110}=28,24$  ; pour les femelles  $F_{2,110}=25,36$ ) et du Génotype ( $p < 0,001$ , pour les mâles  $F_{3,55}=9,38$  ; pour les femelles  $F_{3,55}=6,71$ ). Le premier correspond à une diminution de la distance parcourue au cours des jours du *reversal* ce qui traduit donc un apprentissage. Concernant l'effet du Génotype, chez les **mâles**, il indique une augmentation significative de la distance parcourue par les Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20) comparés aux WT ( $p < 0,001$  et  $p < 0,05$ , respectivement) et aux Dup(Rno20) ( $p < 0,001$  et  $p < 0,05$ , respectivement). Chez les **femelles**, seules les Dup(Rno11) présentent une augmentation significative de la distance parcourue pour atteindre la plateforme, comparées aux WT ( $p < 0,01$ ) et aux Dup(Rno20) ( $p < 0,01$ ). Par ailleurs, pour les deux sexes, aucune interaction Génotype x Jour n'est observée (pour les mâles  $F_{6,110}=1,08$  ; pour les femelles  $F_{6,110}=0,24$ ).

Concernant la **latence (Figure 82-B)**, des résultats similaires sont obtenus. Pour les deux sexes, l'ANOVA à 2 facteurs indique également un effet du Jour ( $p < 0,001$ , pour les mâles  $F_{2,110}=26,23$  ; pour les femelles  $F_{2,110}=25,78$ ) et du Génotype ( $p < 0,001$ , pour les mâles  $F_{3,55}=16,86$  ; pour les femelles  $F_{3,55}=7,15$ ). Comme pour la distance, l'effet du Jour traduit une diminution de la latence pour atteindre la plateforme au cours des jours d'apprentissage. Chez les **mâles**, l'effet du Génotype est lié à une augmentation de la latence pour atteindre la plateforme chez les Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20) par rapport aux WT ( $p < 0,001$  et  $p < 0,01$ , respectivement) et aux Dup(Rno20) ( $p < 0,001$ ). Chez les femelles, cette augmentation n'est visible que chez les Dup(Rno11) par rapport aux WT ( $p < 0,001$ ) et aux Dup(Rno20) ( $p < 0,01$ ). Pour les deux sexes, l'interaction Génotype x Jour n'est pas significative (pour les mâles  $F_{6,110}=0,94$  ; pour les femelles  $F_{6,110}=0,40$ ).

L'analyse de la distance et de la latence pour atteindre la plateforme met en évidence un déficit d'apprentissage chez les mâles Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20) ainsi que chez les femelles Dup(Rno11). Comme pour la phase d'acquisition, ces animaux présentent plus de difficultés, mais sont quand même capables d'apprendre la localisation de la plateforme. En effet, comme pour les WT et les Dup(Rno20), une diminution de la distance parcourue et de la latence pour atteindre la plateforme au cours des jours est observée chez les Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20). Cela permet donc de conclure à l'absence de déficit de flexibilité comportementale.



**Figure 82: Flexibilité comportementale chez les rats Dup(Rno20), Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20) lors de la phase de *reversal* en piscine de Morris**

(A) Distance parcourue pour atteindre la plateforme. Les Dup(Rno11), mâles et femelles, et les mâles Dup(Rno11-20) présentent un déficit d'apprentissage. Ils sont cependant capables d'apprendre la nouvelle localisation de la plateforme, visible par la diminution de la distance au cours des jours. (B) Latence pour atteindre la plateforme. Les résultats sont similaires à ceux obtenus pour la distance, les Dup(Rno11), mâles et femelles, et les mâles Dup(Rno11-20) mettent plus de temps à atteindre la plateforme. (C) Vitesse de nage. Aucune différence n'est observée entre les génotypes. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type.

Enfin, pour la **vitesse de nage (Figure 82-C)**, l'ANOVA à 2 facteurs, pour les mâles comme pour les femelles, indique uniquement un effet du Jour ( $p < 0,001$ , pour les mâles  $F_{2,110}=9,50$  ; pour les femelles  $F_{2,110}=13,79$ ), l'effet du Génotype (pour les mâles  $F_{3,55}=0,38$  ; pour les femelles  $F_{3,55}=1,12$ ) et l'interaction Génotype x Jour (pour les mâles  $F_{6,110}=1,55$  ; pour les femelles  $F_{6,110}=1,83$ ) ne sont pas significatifs. Ainsi, une diminution de la vitesse de nage est observée au cours des jours du *reversal*.

En conclusion, le déficit d'apprentissage observé chez les mâles Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20) et chez les femelles Dup(Rno11) n'est pas lié à un problème au niveau moteur. En effet, aucune différence entre les génotypes n'est observée, que ce soit pour les mâles ou pour les femelles.

#### 8.4- Test de rappel n°2

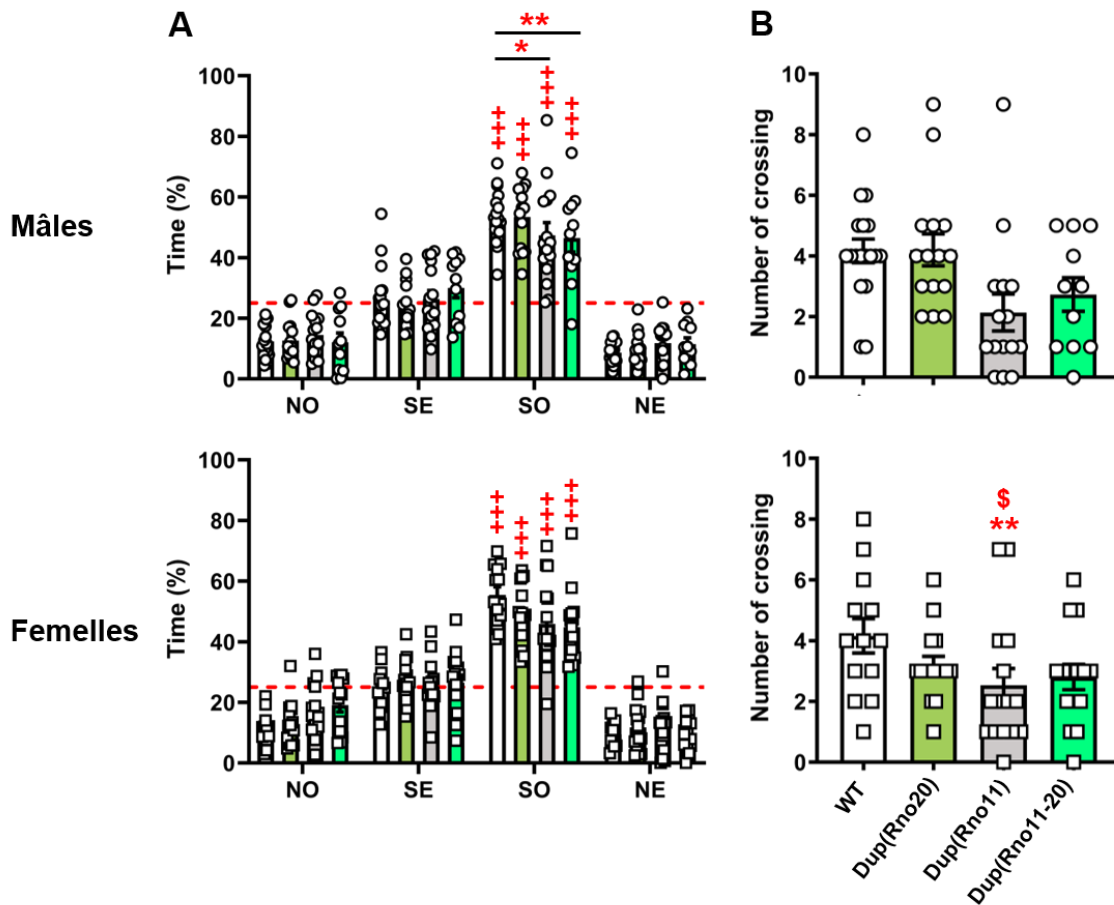
Le second test de rappel a été réalisé 24h après le dernier jour de *reversal*. Si l'on regarde d'abord le **pourcentage de temps passé dans les quadrants (Figure 83-A)**, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Quadrant) met en évidence pour les **mâles** un effet du Quadrant ( $F_{3,220}=222,7$  ;  $p < 0,001$ ). Globalement, les mâles passent significativement plus de temps dans le QC (quadrant SO) comparativement aux autres quadrants ( $p < 0,001$ ). Aucun effet du Génotype ( $F_{3,220}=6,87 \times 10^{-19}$ ), ni d'interaction Génotype x Quadrant ( $F_{9,220}=1,24$ ) ne sont observés. La comparaison à 25% du pourcentage de temps passé dans le QC indique que tous les groupes génétiques passent significativement plus de 25% de leur temps dans le QC ( $p < 0,001$  pour les WT, Dup(Rno20) et Dup(Rno11) ;  $p < 0,01$  pour les Dup(Rno11-20)).

Concernant les **femelles**, l'ANOVA à 2 facteurs met en évidence un effet du Quadrant ( $F_{3,220}=228,7$  ;  $p < 0,001$ ) et une interaction Génotype x Jour ( $F_{9,220}=2,52$  ;  $p < 0,01$ ). Comme pour les mâles, les femelles passent significativement plus de temps dans le QC par rapport aux autres quadrants ( $p < 0,001$ ). Le test « post-hoc » réalisé pour l'interaction Génotype x Quadrant met en évidence que les femelles Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20) passent significativement moins de temps dans la QC comparés aux WT ( $p < 0,05$  et  $p < 0,01$ , respectivement). La comparaison à 25% du pourcentage de temps passé dans le QC indique que tous les génotypes passent significativement plus de 25% de leur temps dans le QC ( $p < 0,001$  pour tous les génotypes).

En conclusion, pour les mâles, comme pour les femelles, l'ensemble des animaux est capable de rappeler la localisation de la plateforme. Aucun déficit de mémoire spatiale n'est donc observé. Cependant, les femelles Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20) présentent de moins bonnes performances comparativement aux WT.

Enfin, pour le **nombre de croisements de l'emplacement de la plateforme (Figure 83-B)**, chez les mâles, le test de Kruskal-Wallis met en évidence un effet significatif du Génotype ( $p < 0,01$ ). Ainsi, les mâles Dup(Rno11) croisent significativement moins l'emplacement de la plateforme comparés aux WT ( $p < 0,01$ ) et aux Dup(Rno20) ( $p < 0,05$ ). Concernant les femelles, l'ANOVA à un facteur ne montre pas d'effet significatif du Génotype ( $F_{3,55} = 2,22$ ).

Ainsi, bien que les mâles Dup(Rno11) soient capables de rappeler la localisation de la plateforme, ils présentent une moins bonne précision de leur mémoire, comme observé lors du premier rappel.



**Figure 83: Mémoire spatiale chez les rats Dup(Rno20), Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20) lors du second test de rappel en piscine de Morris**

(A) Pourcentage de temps passé dans les différents quadrants. Tous les animaux passent significativement plus de 25% de leur temps dans le quadrant cible (SO). Ils sont donc capables de rappeler la localisation de la plateforme. (B) Nombre de croisements de l'emplacement de la plateforme. Chez les mâles, les Dup(Rno11) croisent significativement moins l'emplacement de la plateforme comparés aux WT (\*\*  $p < 0,01$ ) et Dup(Rno20) (§  $p < 0,05$ ). Ils présentent donc une moins bonne précision de leur mémoire. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type. *Statistiques* : +++  $p < 0,001$  vs. hasard (25%), \*  $p < 0,05$  et \*\*  $p < 0,01$ .

## 9- Conclusion générale

Les résultats de l'étude comportementale réalisée chez les modèles de rat du SD sont synthétisés dans le **Tableau 14**. Cette étude a permis de mettre en évidence une réduction de la **masse corporelle** de 13,1% chez les mâles Dup(Rno11) et de 21,9% chez les mâles Dup(Rno11-20). Aucune différence n'est observée chez les femelles. Concernant l'activité locomotrice, le test de l'**activité circadienne** a révélé une réduction de l'activité locomotrice des femelles Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20) lors de la phase nocturne. Pour les mâles, l'activité locomotrice est similaire entre les 4 groupes génétiques. Cette réduction observée pour les femelles Dup(Rno11-20) est retrouvée dans le test du **champ ouvert**. Cela confirme donc une hypoactivité chez ces animaux. Par ailleurs, ce test indique également une réduction de la distance parcourue par les mâles Dup(Rno11-20). Enfin, les mâles et les femelles Dup(Rno11-20) passent significativement plus de temps à la périphérie du champ ouvert. Ces animaux semblent donc plus anxieux.

Concernant les tests utilisés pour évaluer la mémoire, le **labyrinthe en Y** a permis de mettre en évidence un déficit de mémoire de travail uniquement chez les mâles Dup(Rno11-20). Pour les femelles, tous les génotypes réalisent significativement plus de 50% d'alternances spontanées, ce qui traduit des capacités de mémoire de travail préservées. Ce test permet également d'évaluer l'activité générale des animaux en évaluant le nombre total d'entrées dans les bras. Ainsi, aucune différence n'est observée entre les génotypes, que ce soit pour les mâles ou pour les femelles. Le test de l'**OLM**, qui évalue la mémoire spatiale à court terme, montre un déficit uniquement chez les mâles pour les Dup(Rno20), Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20). La mémoire de reconnaissance est, quant à elle, préservée chez l'ensemble des animaux comme l'indique le test du **NOR**. En effet, pour les deux sexes, les 4 génotypes passent significativement plus de 33% de leur temps sur le nouvel objet.

Enfin, le test de la **piscine de Morris**, montre un déficit d'apprentissage spatial chez les Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20), mâles et femelles. Ces animaux restent cependant capables d'apprendre la localisation de la plateforme. Par ailleurs, lors du premier test de rappel, seules les femelles Dup(Rno11-20) ne sont pas capables de rappeler la localisation de la plateforme. Elles présentent donc un déficit de mémoire spatiale. Par ailleurs, bien que les Dup(Rno11), mâles et femelles, et les mâles Dup(Rno11-20) soient capables de rappeler la localisation de la plateforme, ils présentent une moins bonne précision de leur mémoire. Lors de la phase de *reversal*, le déficit d'apprentissage observé au cours de l'acquisition est retrouvé chez les mâles Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20), ainsi que chez les femelles Dup(Rno11). Ils restent cependant capables d'apprendre la nouvelle localisation de la plateforme, ils ne présentent donc pas de déficit de flexibilité. De plus, lors du second test de rappel, réalisé 24h après le dernier jour de *reversal*, l'ensemble

des animaux est capable de rappeler la localisation de la plateforme et ne présente donc pas de déficit de mémoire. Cependant, les mâles Dup(Rno11) restent toujours moins précis comme l'indique le fait qu'ils croisent significativement moins l'emplacement de la plateforme.

		Dup(Rno20)		Dup(Rno11)		Dup(Rno11-20)	
		Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles
Masse Corporelle		∅		↘ (13,1%)	∅	↘ (21,9%)	∅
Activité circadienne		∅		∅	↘ activité nocturne	∅	↘ activité nocturne
Labyrinthe en Y	Anxiété	∅		∅		↗	∅
	Activité	∅		∅		∅	
	Alternance	∅		∅		↘	∅
Champ ouvert	Activité	∅		∅		↘	
	Anxiété	∅		∅		↗	↗ vs. Dup(Rno20)
OLM		↘	∅	↘	∅	↘	∅
NOR		∅		∅		∅	
Piscine de Morris	Acquisition	∅		↘		↘	
	Rappel n°1	∅		∅		∅	↘
	Reversal	∅		↘		↘	∅
	Rappel n°2	∅		∅		∅	

**Tableau 14 : Synthèse des résultats de l'étude comportementale réalisée chez les rats Dup(Rno20), Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20)**

↘ et ↗, indique respectivement une diminution et une augmentation par rapport aux WT, lorsque qu'il s'agit d'une différence par rapport à un autre génotype, ce dernier est indiqué dans le tableau ; ∅, indique une absence de différence avec les WT.

## **Objectif 2 : Caractérisation des modèles de rats du Syndrome de Down avec l'APP humanisée**

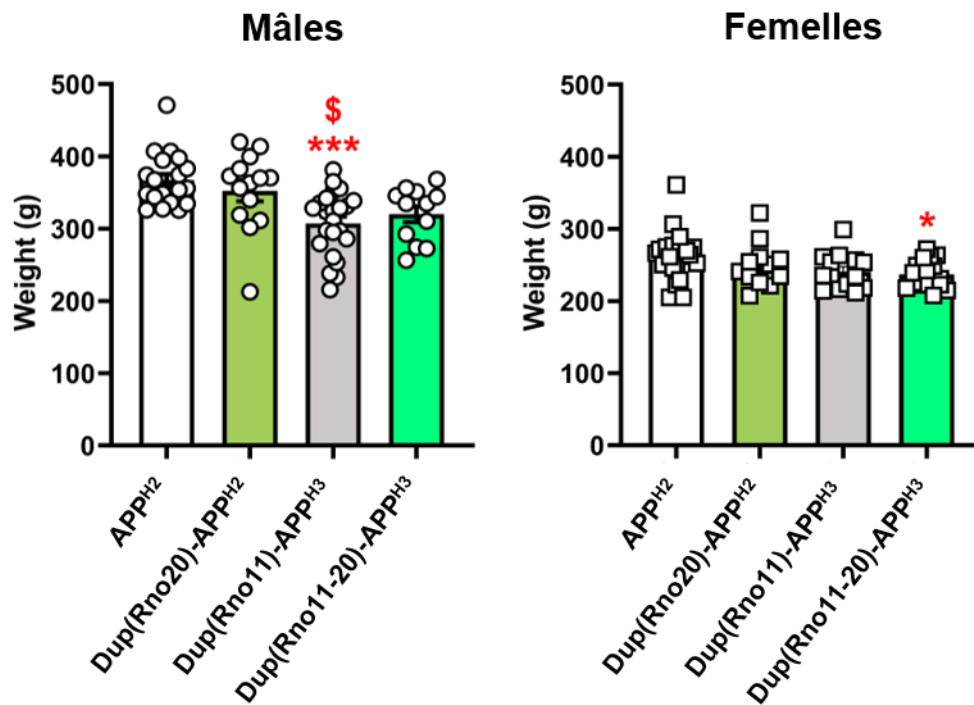
Le second objectif de ce projet consistait à caractériser les modèles de rat SD chez lesquels l'APP humanisée a été introduite, soit les rats Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>, Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>. Le but est ainsi d'étudier les mécanismes de la MA dans un contexte de SD. Dans un premier temps, ces modèles ont été caractérisés au niveau comportemental. Pour cela, la même batterie de tests comportementaux que celle réalisée chez les modèles sans l'APP<sup>H</sup> a été reproduite au même âge chez les modèles avec l'APP<sup>H</sup>, soit à partir de 6-7 semaines. Par ailleurs, la MA étant une maladie liée à l'âge, une étude de vieillissement a été réalisée. Ainsi, les mêmes rats ont été retestés dans la même batterie de tests à l'âge de 12 mois environ. Cette étude de vieillissement est toujours en cours, les données déjà recueillies ne permettant pas encore d'émettre de conclusion, elles ne seront pas présentées dans ce manuscrit. Par ailleurs, nous avons également souhaité réaliser une analyse transcriptomique chez ces modèles afin d'étudier d'une part l'effet de l'APP<sup>H</sup> dans nos modèles, mais également celui du vieillissement. En effet, les prélèvements des modèles de rat SD avec l'APP<sup>H</sup> ont été réalisés chez des animaux âgés de 57-65 semaines contre 13-16 semaines pour les modèles de rat SD sans l'APP<sup>H</sup>. Les échantillons des rats SD avec l'APP<sup>H</sup> sont en cours de séquençage et nous n'avons pas les données pour le moment.

De ce fait, seuls les résultats de l'étude comportementale réalisée à partir de l'âge de 6-7 semaines seront présentés dans ce manuscrit. Cette étude a été réalisée sur des mâles et des femelles, les animaux ayant été répartis sur 4 cohortes. Chaque cohorte est constituée de 4 groupes génétiques, les effectifs finaux pour chaque génotype sont les suivants : n=19 mâles et n=20 femelles pour les APP<sup>H2</sup> (rats contrôles), n=14 mâles et n=12 femelles pour les Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>, n=23 mâles et n=14 femelles pour les Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup>, n=12 mâles et n=18 femelles pour les Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>. Les résultats obtenus sont présentés dans l'ordre des tests. Les analyses statistiques pour les mâles et les femelles ont été faites séparément. De la même façon que pour les études précédentes, il est possible de se reporter directement à un tableau synthétique (**Tableau 15**) qui se trouve en page 232.

## I- Masse corporelle

Comme pour les modèles SD non humanisés, le poids des animaux a été suivi pendant toute la période de tests comportementaux. Pour les mêmes raisons que celles décrites dans l'Objectif I, Partie II, Point 1, les résultats présentés sont ceux obtenus à l'âge de 9 semaines (**Figure 84**).

Pour les **mâles**, le test de Kruskal-Wallis montre un effet significatif du Génotype ( $p < 0,001$ ). Ainsi, les mâles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> présentent une réduction de leur masse corporelle de 16,6% comparés aux APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,001$ ) et de 13,1% par rapport aux Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,05$ ). Par ailleurs, une réduction de la masse corporelle est également observée chez les mâles Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> bien qu'elle ne soit pas significative ( $p = 0,055$ ). Elle est de 12,5% comparée aux APP<sup>H2</sup>. Chez les **femelles**, l'ANOVA à un facteur montre également un effet significatif du Génotype ( $F_{3,60} = 3,06$  ;  $p < 0,05$ ). Ainsi, les femelles Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> présentent une masse corporelle plus faible comparées aux femelles APP<sup>H2</sup>. Une réduction de 9,8% est ainsi observée ( $p < 0,05$ ).



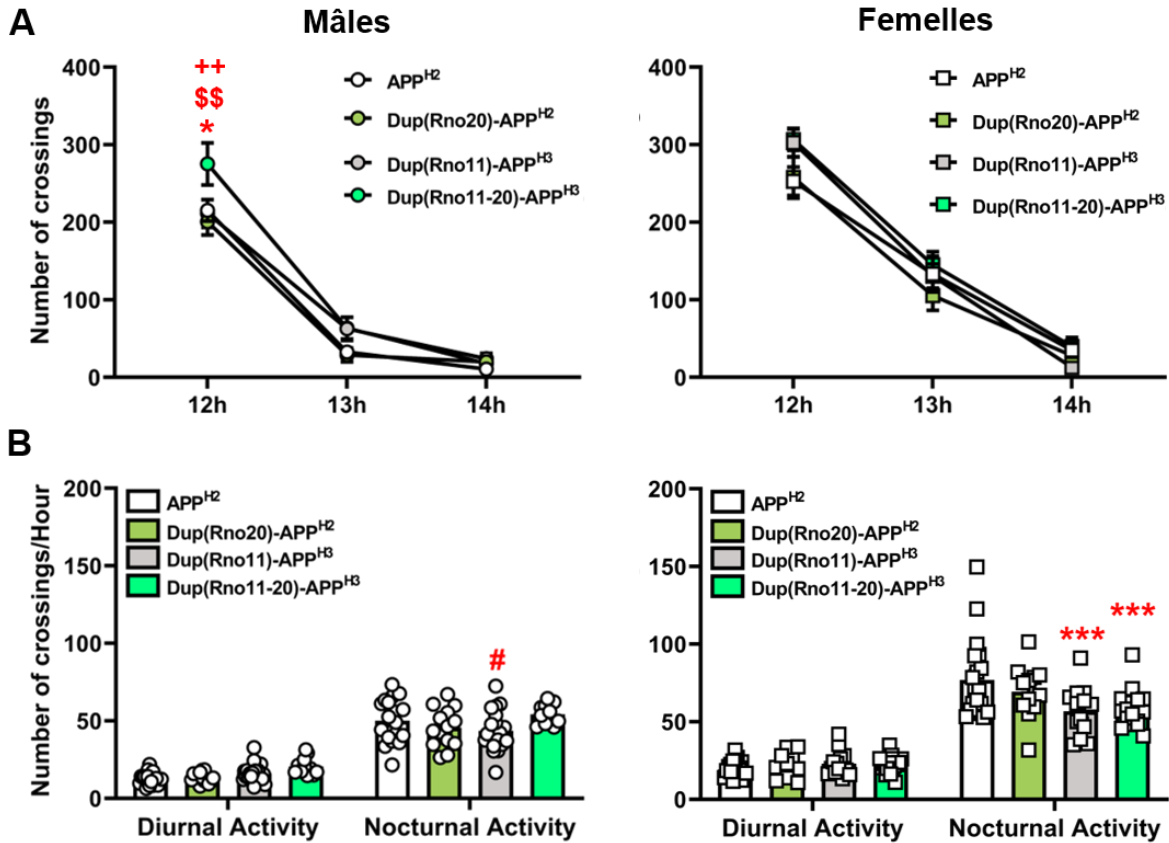
**Figure 84: Masse corporelle des rats Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>, Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> à l'âge de 9 semaines**

Une réduction significative de la masse corporelle est observée chez les mâles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> (-16,6% vs. APP<sup>H2</sup>) et chez les femelles Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> (-9,8% vs. APP<sup>H2</sup>). Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type. Statistiques : \*  $p < 0,05$  et \*\*\*  $p < 0,001$  vs. APP<sup>H2</sup> ; \$  $p < 0,05$  vs. Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>.



## II- Test de l'activité circadienne

Si l'on s'intéresse tout d'abord à l'activité locomotrice lors de la **phase d'habituation (Figure 85-A)**, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Heure) montre un effet significatif de l'Heure pour les 2 sexes ( $p < 0,001$ , pour les mâles  $F_{2,116}=318,3$  ; pour les femelles  $F_{2,114}=418,2$ ). Ainsi, l'ensemble des rats présente une diminution de leur activité locomotrice au cours du temps. Cela traduit une habituation des animaux aux conditions expérimentales. Par ailleurs, pour les **mâles**, un effet significatif du Génotype est mis en évidence ( $F_{3,58}=3,29$  ;  $p < 0,05$ ). Les mâles Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> sont ainsi plus actifs comparés aux APP<sup>H2</sup> et aux Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,05$ ). De plus, l'interaction Génotype x Heure tend vers la significativité ( $F_{6,116}=2,001$  ;  $p = 0,071$ ). Les mâles Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> sont significativement plus actifs lors de la première heure d'habituation comparés aux autres génotypes ( $p < 0,05$  vs. APP<sup>H2</sup> ;  $p < 0,01$  vs. Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> et Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup>). Cette différence d'activité n'est pas retrouvée pour les deux heures suivantes. Ainsi, cette hyperactivité pourrait être causée par un stress ou une exploration exacerbée en réponse au nouvel environnement. Concernant les femelles, l'ANOVA à 2 facteurs ne montre pas d'effet significatif du Génotype ( $F_{3,57}=1,05$ ), ni d'interaction Génotype x Heure ( $F_{6,114}=2,14$ ).



**Figure 85: Activité locomotrice des modèles rats Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>, Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> lors du test de l'activité circadienne**

(A) Activité locomotrice lors de la phase d'habituation. Les mâles Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> sont plus actifs au cours de la 1<sup>ère</sup> heure. Pour l'ensemble des animaux, la diminution d'activité locomotrice observée au cours du temps traduit une habituation. (B) Activité locomotrice au cours des phases diurne et nocturne. Une diminution de l'activité locomotrice est observée chez les mâles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> par rapport aux Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> lors de la phase nocturne. Par ailleurs, les femelles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> sont également moins actives lors de la phase nocturne. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type. *Statistiques* : \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  vs. APP<sup>H2</sup>; \$\$  $p < 0,01$  vs. Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>; ++  $p < 0,01$  vs. Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup>; #  $p < 0,05$  vs. Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>.

L'activité au cours des 43h suivant la phase d'habituation a été analysée en distinguant l'**activité diurne de l'activité nocturne (Figure 85-B)**. Pour les 2 sexes, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Période) met en évidence un effet significatif de la Période ( $p < 0,001$ , pour les mâles  $F_{1,58} = 574,9$ ; pour les femelles  $F_{1,57} = 327,1$ ) et une interaction Génotype x Période (pour les mâles  $F_{3,58} = 2,91$  -  $p < 0,05$ ; pour les femelles  $F_{3,57} = 6,11$  -  $p < 0,01$ ). L'effet de la Période s'explique par le fait que les rats sont plus actifs lors de la phase nocturne par rapport à la phase diurne. Par ailleurs, chez les **mâles**, les Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> sont plus actifs que les Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> lors de la phase nocturne ( $p < 0,05$ ). Chez les **femelles**, les rats Dup(Rno11)-

APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> sont moins actifs que les rats APP<sup>H2</sup> lors de la phase nocturne ( $p < 0,001$ ). Aucun effet significatif du génotype n'est observé, que ce soit pour les mâles ( $F_{3,58}=2,72$ ) ou les femelles ( $F_{3,57}=2,35$ ).

En résumé, l'ensemble des rats, mâles et femelles, est capable de s'habituer aux conditions expérimentales. Par ailleurs, des changements de l'activité locomotrice sont observés lors de la phase nocturne. Ainsi, les femelles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> sont hypoactives lors de cette phase. Cette hypoactivité n'est pas observée chez les mâles.

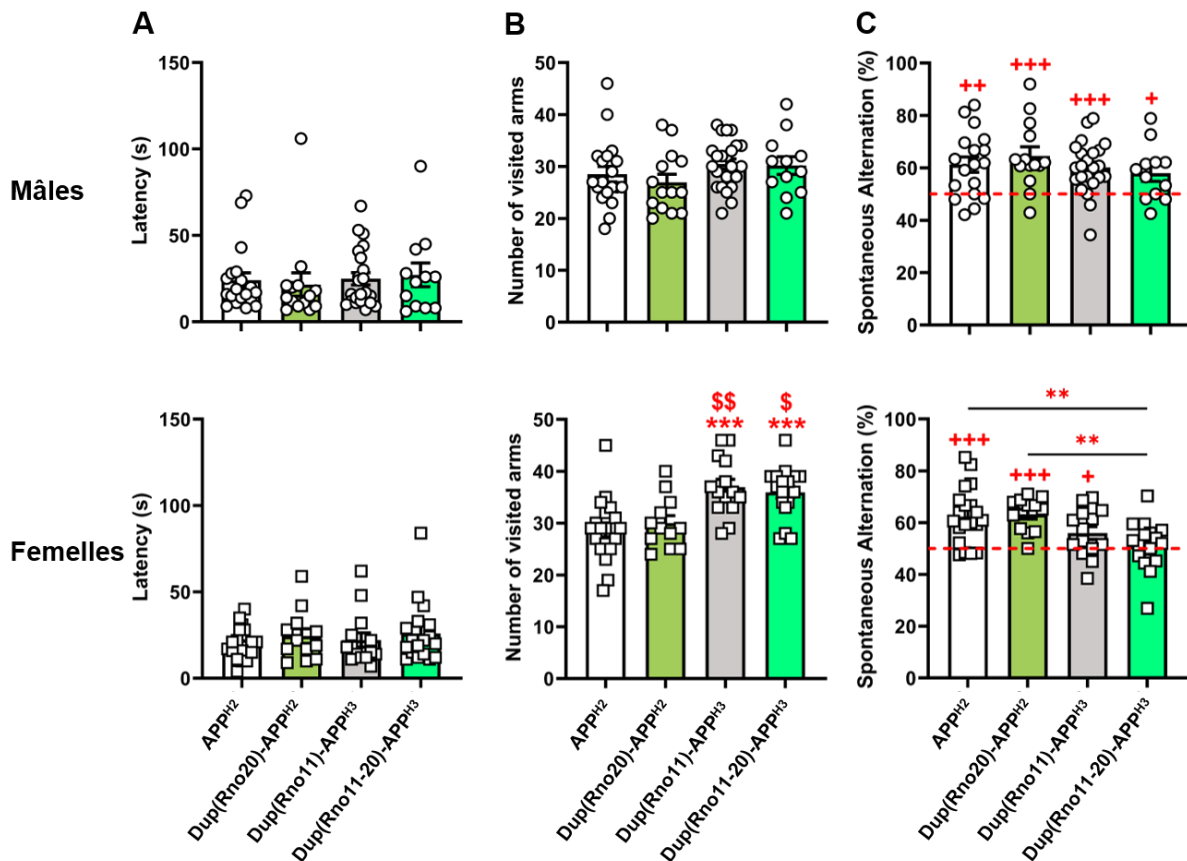
### III- Labyrinthe en Y

La mémoire de travail a été évaluée grâce au test du labyrinthe en Y. Les résultats obtenus pour la **latence de sortie du premier bras (Figure 86-A)** ne montrent pas de différence entre les génotypes, que ce soit pour les mâles ou pour les femelles (Test de Kruskal-Wallis, pour les mâles  $p=0,63$  ; pour les femelles  $p=0,72$ ). Il n'y a donc pas de différence du niveau d'anxiété chez nos modèles de rat du SD avec l'APP<sup>H</sup>.

Concernant le **nombre de bras visités (Figure 86-B)**, chez les **mâles**, l'ANOVA à un facteur n'indique pas d'effet significatif du Génotype ( $F_{3,64}=1,33$ ). En revanche, chez les **femelles**, un effet significatif du Génotype est mis en évidence ( $F_{3,60}=9,62$  ;  $p < 0,001$ ). Ainsi, les femelles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> sont significativement plus actives que les femelles APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,001$ ) et Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,01$  et  $p < 0,05$ , respectivement).

Enfin, pour le **pourcentage d'alternances spontanées (Figure 86-C)**, paramètre étudié pour évaluer la mémoire de travail, l'ANOVA à un facteur pour les **mâles** ne montre pas d'effet significatif du Génotype ( $F_{3,63}=0,79$ ). Par ailleurs, la comparaison de ce pourcentage à 50%, correspondant au hasard, indique que les 4 génotypes présentent significativement plus de 50% d'alternances spontanées (One sample t-Test,  $p < 0,01$  pour les APP<sup>H2</sup> ;  $p < 0,001$  pour les Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> et les Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> ;  $p < 0,05$  pour les Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>). Les mâles Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>, Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> ne présentent donc pas de déficit de mémoire de travail. Pour les **femelles**, l'ANOVA à un facteur met en évidence un effet significatif du Génotype ( $F_{3,60}=6,30$  ;  $p < 0,001$ ). Ainsi, les femelles Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> font significativement moins d'alternances spontanées comparés aux APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,01$ ) et aux Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,01$ ). De plus, la comparaison du pourcentage d'alternances à 50% indique que tous les rats, à l'exception des femelles Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>, présentent significativement plus de 50% d'alternances

spontanées (One sample *t*-Test,  $p < 0,001$  pour les APP<sup>H2</sup> et les Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>;  $p < 0,05$  pour les Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup>). Les femelles Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> présentent donc un déficit de mémoire de travail.



**Figure 86: Anxiété et mémoire de travail dans le labyrinthe en Y chez les rats Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>, Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>**

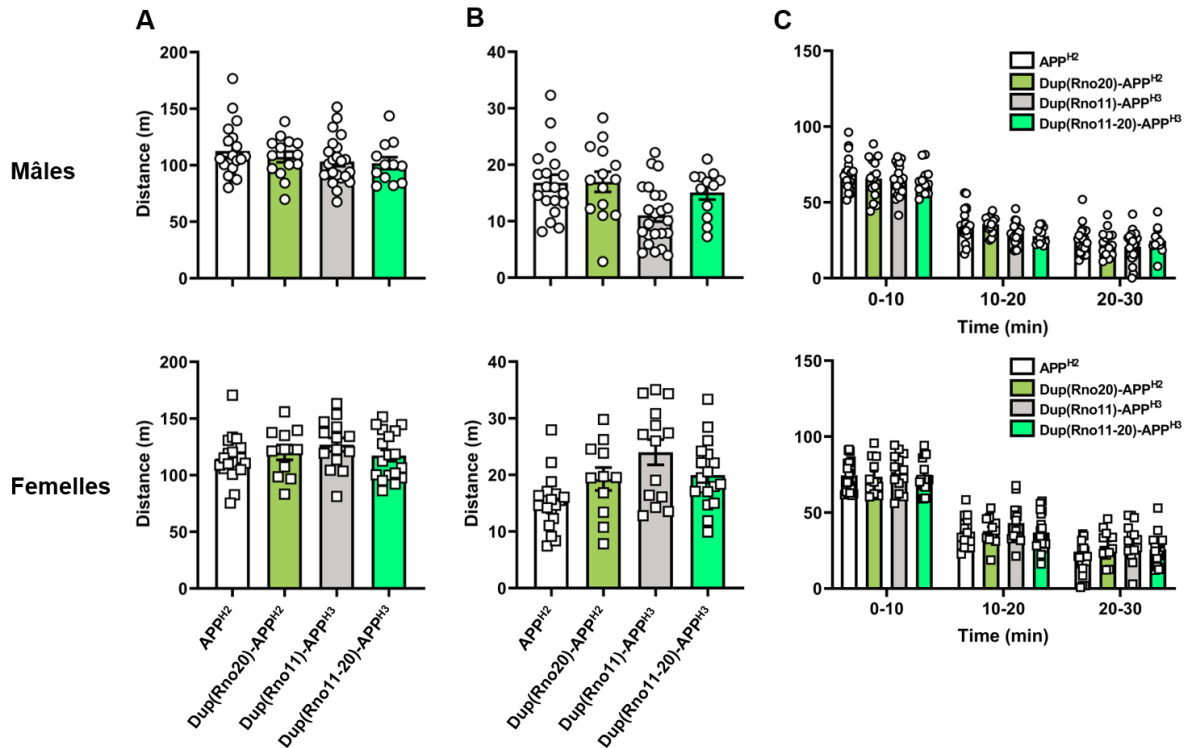
(A) Latence de sortie du premier bras. Aucune différence n'est observée entre les génotypes pour les 2 sexes. (B) Nombre total d'entrées dans les bras. Une augmentation du nombre de bras visités est mise en évidence chez les femelles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>. Aucune différence d'activité n'est constatée chez les mâles. (C) Pourcentage d'alternances spontanées. Seules les femelles Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> ne font pas significativement plus de 50% d'alternances, et présentent donc un déficit de mémoire de travail. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type. Statistiques : pour le nombre de bras visités (B) \*\*\*  $p < 0,001$  vs. APP<sup>H2</sup>; \$  $p < 0,05$  et \$\$  $p < 0,01$  vs. Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>; pour le pourcentage d'alternance (C) +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$  et +++  $p < 0,001$  vs. hasard (50%); \*\*  $p < 0,01$ .

En résumé, le test du labyrinthe en Y a permis de montrer que les modèles de rat SD avec l'APP humanisée ne présentent pas de modification de leur niveau d'anxiété et ceci, quel que soit le sexe. Par ailleurs, une augmentation de l'activité locomotrice est observée chez les femelles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>. Alors qu'aucun déficit de mémoire de travail n'est observé chez les mâles quel que soit le génotype, un déficit est mis en évidence chez les femelles Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>.

#### IV- Test du champ ouvert

Le test du champ ouvert a ensuite été réalisé avec, comme pour les modèles de rat SD non humanisé, un unique essai par rat d'une durée de 30 min. Tout d'abord, concernant la **distance parcourue à la périphérie par rapport au centre** de l'arène (**Figure 87-A et B**), l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Zone) indique un effet significatif de la Zone pour les 2 sexes ( $p < 0,001$ , pour les mâles  $F_{1,128}=1142$  ; pour les femelles  $F_{1,116}=1222$ ). Comme attendu, les rats parcourent une distance plus importante à la périphérie comparée au centre du champ ouvert. De plus, pour les **mâles**, aucun effet significatif du Génotype ( $F_{3,128}=1,93$ ), ni d'interaction Génotype x Zone ( $F_{3,128}=0,47$ ) ne sont mis en évidence. Ainsi, aucune différence d'activité locomotrice n'est observée entre les 4 génotypes chez les mâles. Pour les **femelles**, alors qu'aucune interaction Génotype x Zone n'est mise en évidence ( $F_{3,116}=0,18$ ), une tendance à la significativité est observée pour l'effet du Génotype ( $F_{3,116}=2,48$  ;  $p=0,065$ ). Le test « post-hoc » de Tukey révèle ainsi que les femelles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> parcourent globalement une distance plus importante comparée aux APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,05$ ). Elles sont donc plus actives.

La **distance totale parcourue** au cours des 30 min de test a également été analysée par **intervalles de 10 min (Figure 87-C)** afin d'étudier l'habituation des animaux au champ ouvert. Un effet significatif du Temps est mis en évidence par l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Temps) pour les mâles ( $F_{2,128}=617,1$  ;  $p < 0,001$ ) et les femelles ( $p < 0,001$  ;  $F_{2,116}=444$ ). Il s'explique par une diminution de la distance parcourue au cours du temps traduisant donc une habituation des animaux à ce nouvel environnement. Par ailleurs, aucun effet du Génotype (pour les mâles  $F_{3,64}=1,82$  ; pour les femelles  $F_{3,58}=2,03$ ), ni d'interaction Génotype x Temps (pour les mâles  $F_{6,128}=1,11$  ; pour les femelles  $F_{6,116}=1,15$ ) ne sont mis en évidence, que ce soit pour les mâles ou pour les femelles.



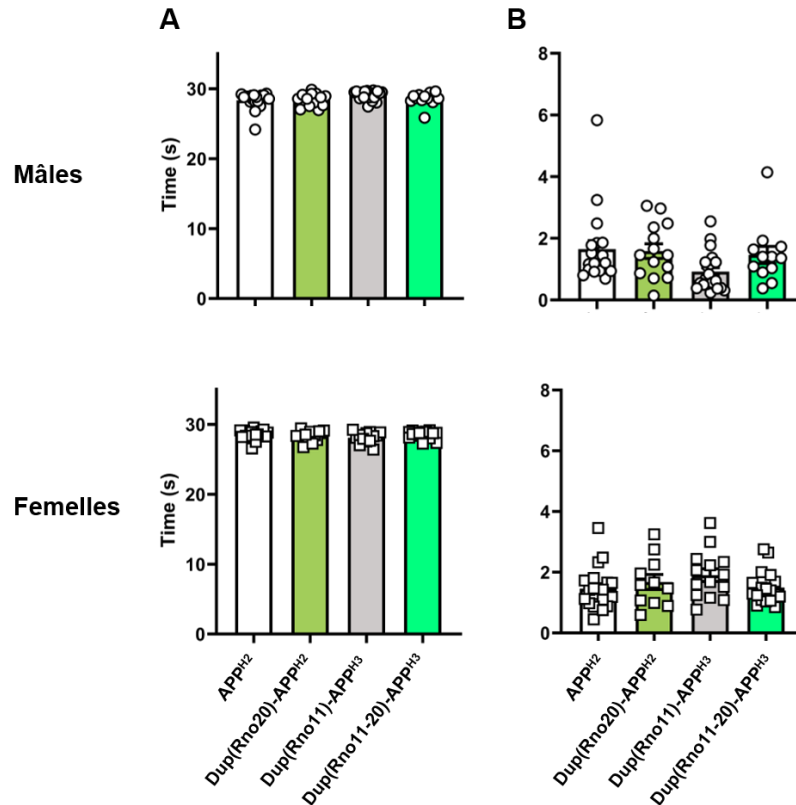
**Figure 87:** Distance parcourue chez les rats Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>, Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> dans le test du champ ouvert

(A) Distance parcourue à la Périphérie du champ ouvert. Pour les 2 sexes, aucune différence n'est observée entre les génotypes. (B) Distance parcourue au Centre du champ ouvert. Aucune différence n'est observée entre les génotypes, que ce soit pour les mâles ou pour les femelles. (C) Distance totale parcourue par intervalles de 10 min. Une diminution de la distance parcourue au cours du temps est observée chez tous les animaux, mâles et femelles. Cette dernière traduit une habitude à l'arène. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type.

Le **temps passé à la périphérie vs. le centre** du dispositif donne une indication sur l'anxiété des animaux (Figure 88-A et B). Pour les 2 sexes, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Zone) met en évidence un effet significatif de la Zone ( $p < 0,001$ , pour les mâles  $F_{1,128}=28133$  ; pour les femelles  $F_{1,116}=42514$ ). Comme pour la distance, les animaux passent globalement beaucoup plus de temps à la périphérie par rapport au centre du champ ouvert. Par ailleurs, pour les **mâles**, une interaction significative Génotype x Zone est observée ( $F_{3,128}=5,41$  ;  $p < 0,01$ ). Cependant, le test « post-hoc » ne montre pas de différence significative. De plus, aucun effet du Génotype n'est observé ( $F_{3,128}=9,87 \times 10^{-10}$ ). Pour les **femelles**, l'ANOVA à 2 facteurs n'indique pas d'effet significatif du Génotype ( $F_{3,116}=2,51 \times 10^{-6}$ ), ni d'interaction Génotype x Zone ( $F_{3,116}=2,60$ ).

En conclusion, il n'y a pas de différence d'activité locomotrice chez les mâles. A l'inverse, les femelles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> sont hyperactives. Par ailleurs, une habitude au champ ouvert est observée de façon

similaire chez tous les animaux des 2 sexes. Enfin, l'absence de différence entre les génotypes pour le temps passé à la périphérie vs. le centre du dispositif, indique que les rats SD avec l'APP<sup>H</sup> ne présentent pas de modification de leur niveau d'anxiété.



**Figure 88:** Temps passé à la périphérie et au centre du champ ouvert chez les rats Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>, Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>

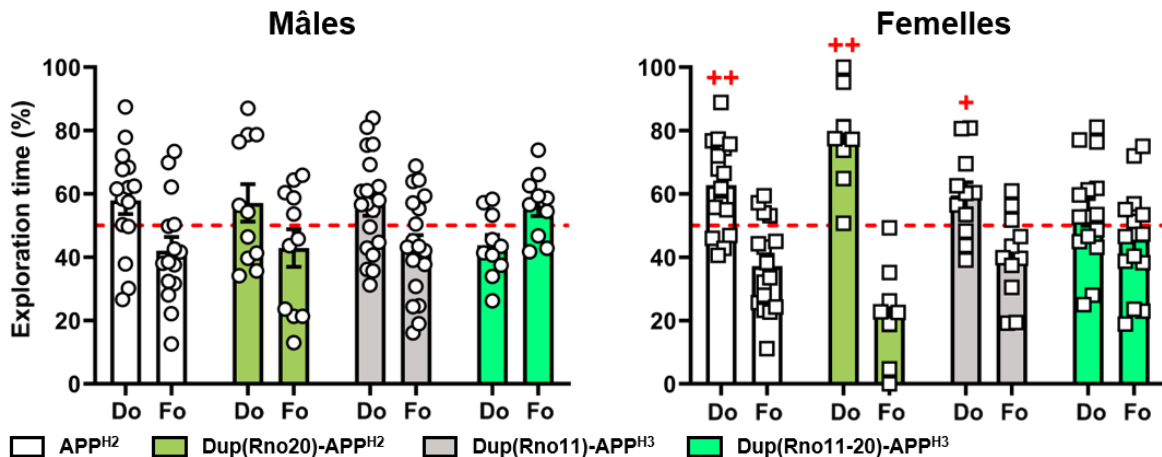
(A) Temps passé à la Périphérie du champ ouvert. (B) Temps passé au Centre du champ ouvert. Pour les 2 sexes, aucune différence n'est observée entre les génotypes pour le temps passé à la périphérie ou au centre du champ ouvert. Les rats Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>, Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>, mâles et femelles, ne présentent donc pas de modification de leur niveau d'anxiété. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type.

## V- Interaction sociale

Les vidéos générées lors de la réalisation du test sont en cours d'analyse.

## VI- Test de reconnaissance de la localisation de l'objet (OLM)

Le test de l'OLM a été réalisé dans les mêmes conditions que celles décrites pour les modèles de rats sans l'APP<sup>H</sup>. Comme précédemment, le pourcentage de temps passé à explorer les objets lors de la phase de test a été évalué (Figure 89).



**Figure 89: Mémoire spatiale à court terme chez les rats Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>, Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> lors du test de l'OLM**

Le pourcentage de temps passé à explorer les objets est évalué lors de la phase de test. L'objet déplacé est noté Do, l'objet familier non déplacé est noté Fo. Les mâles APP<sup>H2</sup>, qui sont utilisés comme contrôle, ne passent pas significativement plus de 50% de leur temps sur l'objet déplacé. Il n'est donc pas possible de conclure quant aux résultats de l'OLM pour les mâles. Chez les femelles, seules les Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> ne différencient pas l'objet Do de l'objet Fo. Elles présentent donc un déficit de mémoire spatiale à court terme. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type. Statistiques : +  $p < 0,05$  et ++  $p < 0,01$  vs. hasard (50%).

Tout d'abord, pour les **mâles**, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Objet) montre un effet significatif de l'Objet ( $F_{1,102}=5,95$  ;  $p < 0,05$ ) et une interaction Génotype x Objet ( $F_{3,102}=3,85$  ;  $p < 0,05$ ). Ainsi, de manière globale, les mâles passent significativement plus de temps sur l'objet déplacé par rapport à l'objet familier non déplacé. Le test « post-hoc » réalisé pour l'interaction Génotype x Objet ne montre pas de différence significative. Par ailleurs, aucun effet du Génotype n'est mis en évidence ( $F_{3,102}=0$ ). Le pourcentage de temps passé sur l'objet déplacé a également été comparé à 50% (One sample t-Test). Pour les 4 groupes génétiques, aucune différence par rapport à 50% n'est observée. Ainsi, l'ensemble des animaux, incluant les rats contrôles APP<sup>H2</sup>, ne différencie pas l'objet déplacé de l'objet familier non déplacé.

Concernant les **femelles**, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Objet) met en évidence un effet significatif de l'Objet ( $F_{1,92}=75,13$  ;  $p < 0,001$ ) et une interaction Génotype x Objet ( $F_{3,92}=8,66$  ;  $p < 0,001$ ). Le premier s'explique par le fait que les femelles passent globalement plus de temps sur l'objet déplacé que sur l'objet familier non déplacé. Le test « post-hoc » réalisé pour l'interaction Génotype x Objet indique que les femelles Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> passent significativement moins de temps sur les objets déplacés et non déplacés comparativement aux femelles Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,01$ ). Par ailleurs, aucun effet significatif du Génotype n'est observé ( $F_{3,92}=0$ ). Le one sample t-Test réalisé pour comparer le pourcentage de temps



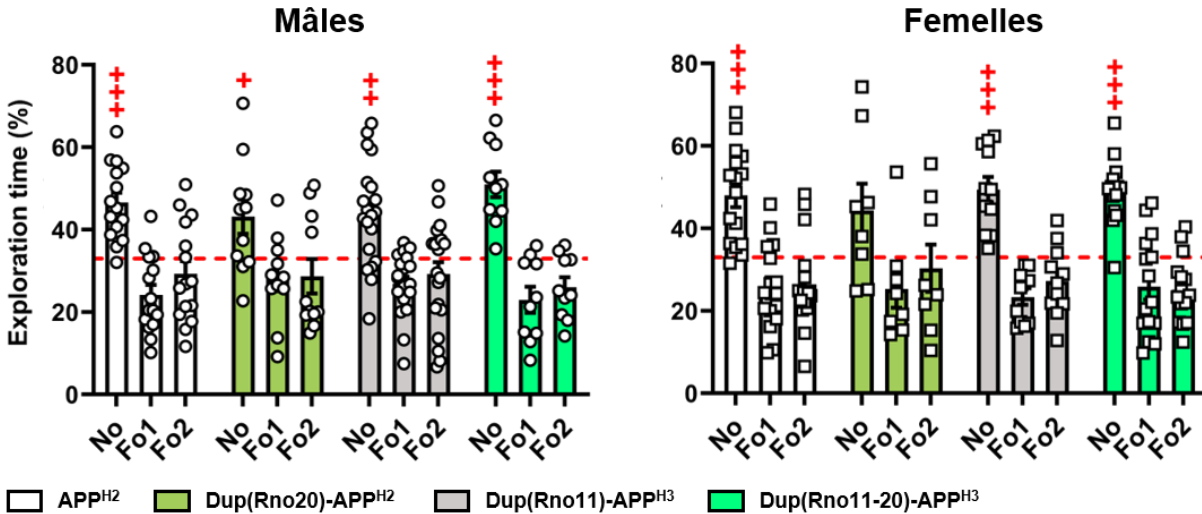
passé sur l'objet déplacé au hasard (50%) indique que tous les rats, à l'exception des femelles Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>, passent significativement plus de 50% de leur temps sur l'objet déplacé ( $p < 0,01$  pour les APP<sup>H2</sup> et les Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>;  $p < 0,05$  pour les Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup>;  $p = 0,34$  pour les Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>). Ainsi, les femelles Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> et Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> sont capables de différencier l'objet déplacé de l'objet familier non déplacé ce qui n'est pas le cas des femelles Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>. Ces dernières présentent donc un déficit de mémoire spatiale à court terme.

En résumé, il n'est pas possible de conclure quant aux résultats des mâles. En effet, les rats contrôles, APP<sup>H2</sup>, ne sont pas capables de différencier entre l'objet déplacé et l'objet familier non déplacé. En revanche, chez les femelles, un déficit de mémoire spatiale à court terme est mis en évidence, mais uniquement chez Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>.

## VII- Test de reconnaissance du nouvel objet

Le test du NOR a ensuite permis d'évaluer la mémoire de reconnaissance. Comme précédemment, le temps passé à explorer chacun des 3 objets est mesuré lors de la phase de test. Un pourcentage de temps d'exploration est ensuite calculé pour chacun des objets (**Figure 90**).

Pour les **mâles**, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Objet) montre un effet significatif de l'Objet ( $F_{2,156} = 53,92$ ). Les mâles passent ainsi globalement plus de temps à explorer le nouvel objet comparé aux objets familiers ( $p < 0,001$  No vs. FoA et FoB). Aucun effet du Génotype ( $F_{3,156} = 3,38 \times 10^{-8}$ ), ni d'interaction Génotype x Objet ( $F_{6,156} = 0,99$ ) ne sont observés. Les ANOVA à un facteur réalisées pour chaque groupe génétique confirment que chacun d'entre eux passe significativement plus de temps sur le nouvel objet comparativement aux objets familiers (pour les APP<sup>H2</sup>  $F_{2,42} = 19,57$  -  $p < 0,001$  No vs. FoA et FoB ; pour les Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>  $F_{2,30} = 4,85$  -  $p < 0,05$  No vs. FoA et FoB ; pour les Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup>  $F_{2,57} = 13,49$  -  $p < 0,001$  No vs. FoA et FoB ; Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>  $F_{2,27} = 27,73$  -  $p < 0,001$  No vs. FoA et FoB). Enfin, la comparaison du pourcentage de temps d'exploration au hasard (33%) indique que tous les groupes génétiques passent significativement plus de 33% de leur temps sur le nouvel objet ( $p < 0,001$  pour les APP<sup>H2</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>;  $p < 0,05$  pour les Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>;  $p < 0,01$  pour les Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup>).



**Figure 90: Mémoire de reconnaissance chez les rats Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>, Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> lors du test du NOR**

Le pourcentage de temps passé à explorer les objets est évalué lors de la phase de test. Le nouvel objet est noté No, les objets familiers A et B sont notés, respectivement, FoA et FoB. Seules les femelles Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> passent un pourcentage de leur temps sur le nouvel objet qui ne diffère pas significativement du hasard. Elles présentent donc un déficit de mémoire de reconnaissance. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type. *Statistiques* : +  $p < 0,05$  ; ++  $p < 0,01$  et +++  $p < 0,001$  vs. hasard (33%).

Concernant les **femelles**, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Objet) montre uniquement un effet significatif de l'Objet ( $F_{2,138}=60,17$  ;  $p < 0,001$ ). Comme pour les mâles, les femelles passent significativement plus de temps à explorer le nouvel objet comparativement aux objets familiers ( $p < 0,001$  No vs. FoA et FoB). L'effet du Génotype ( $F_{3,138}=9,48 \times 10^{-8}$ ) et l'interaction Génotype x Jour ( $F_{6,138}=0,46$ ) ne sont pas significatifs. Par ailleurs, les ANOVA à un facteur ou test de Kruskal-Wallis réalisés pour chaque génotype indiquent que seules les femelles Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> ne différencient pas le nouvel objet des objets familiers (Test de Kruskal-Wallis,  $p=0,075$ ). En effet, pour les autres génotypes, l'ANOVA à un facteur montre un effet significatif de l'Objet (pour les APP<sup>H2</sup>  $F_{2,45}=21,67$  -  $p < 0,001$  No vs. FoA et FoB ; pour les Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup>  $F_{2,30}=31,01$  -  $p < 0,001$  No vs. FoA et FoB ; pour les Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>  $F_{2,42}=30,70$  -  $p < 0,001$ ). Dans ces groupes, les rats passent plus de temps sur le nouvel objet comparé aux objets familiers. De plus, le one sample t-Test utilisé indique que seules les femelles Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> ne passent pas significativement plus de 33% de leur temps sur le nouvel objet ( $p < 0,001$  pour les APP<sup>H2</sup>, Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>,  $p=0,12$  pour les Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>).

Nous pouvons donc conclure que les mâles Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>, Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> ne présentent pas de déficit de mémoire de reconnaissance. En revanche, les femelles Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> présentent un déficit de mémoire de reconnaissance qui n'est pas observé chez les femelles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>.

## VIII- Piscine de Morris

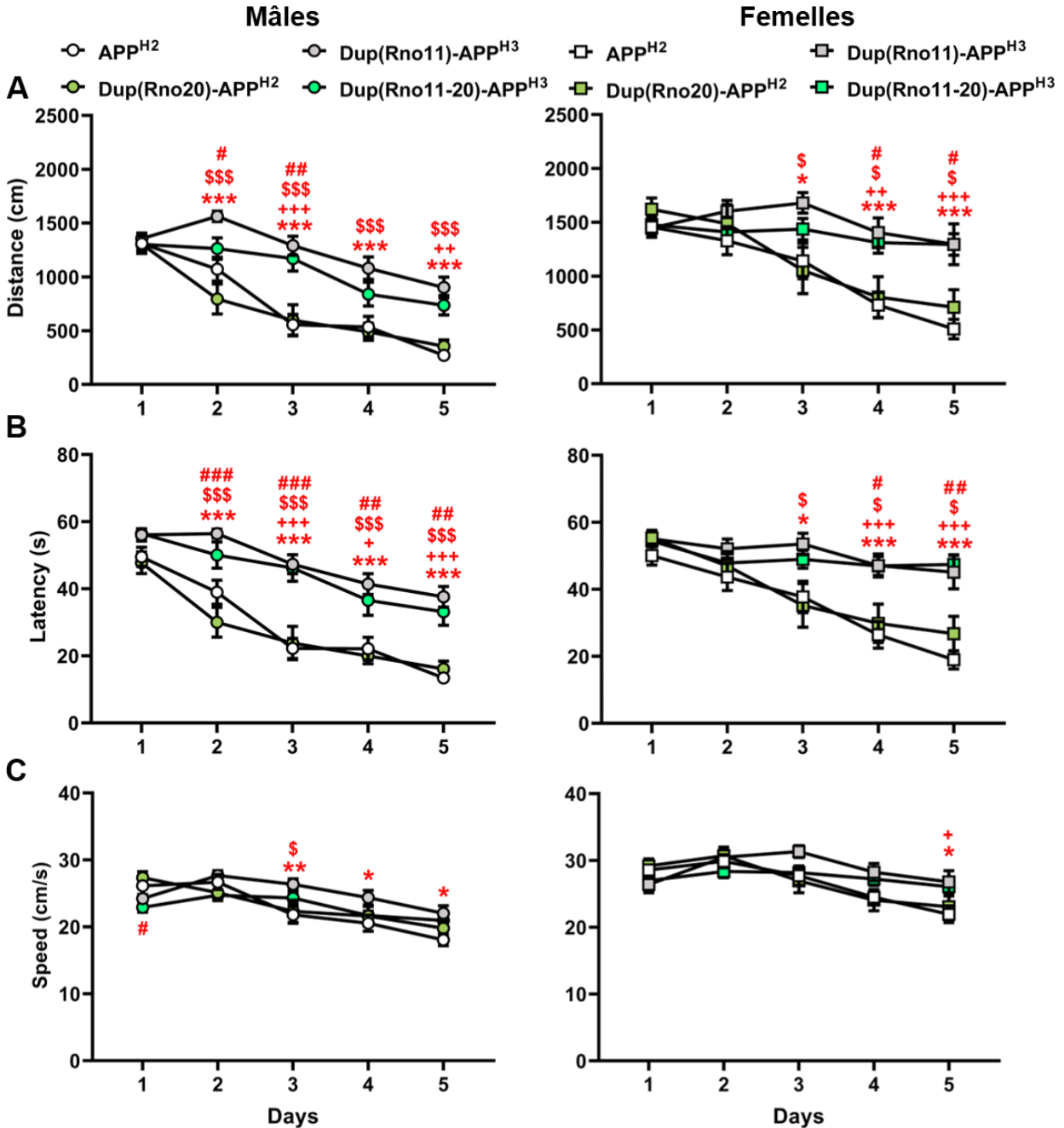
Le protocole de piscine utilisé est identique à celui de l'étude des modèles de rats SD sans l'APP humanisée. Il comporte ainsi 4 phases, la phase d'acquisition de 5 jours suivie d'un premier test de rappel à 24h. Suite à cela, une phase de *reversal* est réalisée afin d'évaluer la flexibilité comportementale. La phase de *reversal* est elle-même suivie d'un second test de rappel 24h après le dernier jour.

### 1- Phase d'acquisition

Concernant la **distance parcourue pour atteindre la plateforme (Figure 91-A)**, pour les 2 sexes, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Jour) montre un effet significatif du Jour ( $p < 0,001$ , pour les mâles  $F_{4,208}=63,68$  ; pour les femelles  $F_{4,184}=25,25$ ), du Génotype (pour les mâles  $F_{3,52}=17,67$  -  $p < 0,001$  ; pour les femelles  $F_{3,46}=5,21$  -  $p < 0,01$ ), et une interaction Génotype x Jour ( $p < 0,001$ , pour les mâles  $F_{12,208}=4,39$  ; pour les femelles  $F_{12,184}=4,53$ ). L'effet du Jour traduit ainsi une diminution de la distance parcourue au cours des jours d'acquisition, ce qui témoigne d'un apprentissage. Pour les **mâles**, l'effet du Génotype montre que les rats Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> parcourent une distance significativement plus importante comparativement aux APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,001$  et  $p < 0,05$ , respectivement) et aux Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,001$  et  $p < 0,01$ , respectivement). Par ailleurs, le test « post-hoc » pour l'interaction Génotype x Jour indique une augmentation de la distance parcourue pour atteindre la plateforme dès le 2<sup>ème</sup> jour d'acquisition chez les mâles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>. Cette distance plus importante se maintient jusqu'au dernier jour d'acquisition. De même, chez les **femelles**, les Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> parcourent une distance plus importante, mais uniquement par rapport aux femelles APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,01$  et  $p < 0,05$ , respectivement). Plus particulièrement, l'interaction Génotype x Jour montre que les femelles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> parcourent une distance plus importante à partir du 3<sup>ème</sup> jour d'acquisition. Pour les femelles Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>, la distance parcourue pour atteindre la plateforme devient significativement plus importante à partir du 4<sup>ème</sup> jour d'apprentissage.

Des résultats similaires sont obtenus pour la **latence d'atteinte de la plateforme (Figure 91-B)**. En effet, pour les 2 sexes, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Jour) met également en évidence un effet du Jour ( $p < 0,001$ , pour les mâles  $F_{4,208}=63,54$  ; pour les femelles  $F_{4,184}=28,87$ ), du Génotype ( $p < 0,001$ , pour les mâles  $F_{3,52}=28,71$  ; pour les femelles  $F_{3,46}=8,43$ ) et une interaction Génotype x Jour (pour les mâles  $F_{12,208}=2,54$  -  $p < 0,01$  ; pour les femelles  $F_{12,184}=4,31$  -  $p < 0,001$ ). Comme pour la distance, l'effet du Jour traduit une diminution globale de la latence pour atteindre la plateforme au cours des jours d'apprentissage, ce qui témoigne d'un apprentissage. L'effet du Génotype, quant à lui, indique pour les **mâles** une augmentation de la latence pour atteindre la plateforme pour les Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> comparés aux APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,001$ ) et Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,001$ ). Ainsi, les mâles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> mettent plus de temps à atteindre la plateforme dès le 2<sup>ème</sup> jour d'apprentissage. Cette latence plus importante se maintient jusqu'à la fin de l'apprentissage. Concernant les **femelles**, les Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> mettent globalement plus de temps pour atteindre la plateforme comparativement aux APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,001$  et  $p < 0,05$ , respectivement). Par ailleurs, une augmentation de la latence est également observée chez les femelles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> par rapport aux femelles Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,05$ ). Cette augmentation de la latence est visible dès le 3<sup>ème</sup> jour d'apprentissage pour les femelles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> alors qu'elle n'apparaît qu'au 4<sup>ème</sup> jour pour les Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>.

En conclusion, l'analyse de la distance et de la latence pour atteindre la plateforme met en évidence un déficit d'apprentissage chez les Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>, pour les mâles comme pour les femelles.



**Figure 91 : Apprentissage spatial chez les rats Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>, Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> lors de la phase d'acquisition en piscine de Morris**

(A) Distance parcourue pour atteindre la plateforme. Pour les 2 sexes, les Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> présentent un déficit d'apprentissage. (B) Latence pour atteindre la plateforme. Pour les 2 sexes, les Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> mettent significativement plus de temps à atteindre la plateforme, confirmant le déficit d'apprentissage. (C) Vitesse de nage. Pour les 2 sexes, quelques variations de la vitesse de nage peuvent être observées. Statistiques : \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> vs. APP<sup>H2</sup>, #  $p < 0,05$ ; +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$ , +++  $p < 0,001$  Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> vs. APP<sup>H2</sup>, \$  $p < 0,05$ , \$\$\$  $p < 0,001$  Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> vs. Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup>; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> vs. Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>.

Enfin, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Jour) réalisée pour la **vitesse de nage (Figure 91-C)** met en évidence, pour les 2 sexes, un effet significatif du Jour ( $p < 0,001$ , pour les mâles  $F_{4,208}=38,51$  ; pour les femelles  $F_{4,184}=26,27$ ) et une interaction Génotype x Jour ( $p < 0,001$ , pour les mâles  $F_{12,208}=4,84$  ; pour les femelles  $F_{12,184}=4,38$ ). Le premier traduit une diminution de la vitesse de nage au cours des jours d'acquisition. Pour les **mâles**, l'interaction Génotype x Jour montre quelques variations de la vitesse de nage en fonction des jours chez les rats Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>. Ainsi, les premiers nagent significativement plus vite que les mâles APP<sup>H2</sup> aux jour 3 ( $p < 0,01$ ), jour 4 ( $p < 0,05$ ) et jour 5 ( $p < 0,05$ ) et que les Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> au jour 3 ( $p < 0,05$ ) d'acquisition. Par ailleurs, les mâles Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> nagent significativement moins vite que les Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> au premier jour d'acquisition ( $p < 0,05$ ). Pour les **femelles**, le test « post-hoc » réalisé pour l'interaction Génotype x Jour montre une augmentation de la vitesse de nage uniquement au dernier jour d'acquisition chez les Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> par rapport aux APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,05$ ). Pour les 2 sexes, aucun effet du Génotype n'est observé (pour les mâles  $F_{3,52}=2,22$  ; pour les femelles  $F_{3,46}=0,94$ ).

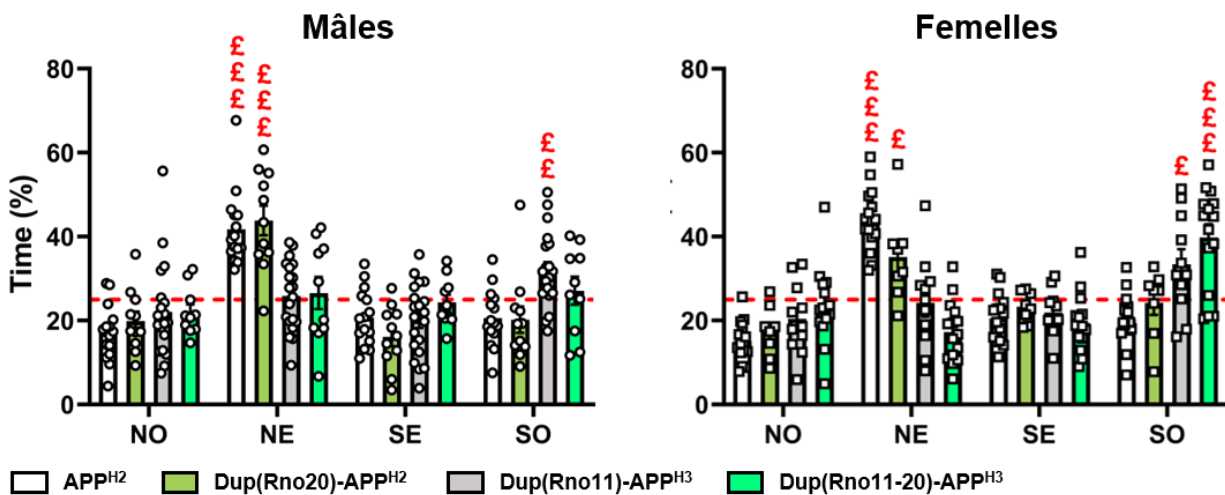
En résumé, l'analyse de la vitesse de nage permet de dire que le déficit d'apprentissage spatial observé chez les Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>, mâles et femelles, n'est pas lié à un problème moteur affectant leurs capacités de nage.

## 2- Test de rappel n°1

L'analyse du **pourcentage de temps passé dans les quadrants (Figure 92)** lors du premier test de rappel met en évidence pour les mâles un effet du Quadrant ( $F_{3,208}=30,21$  ;  $p < 0,001$ ). Ainsi, les mâles passent globalement plus de temps dans le QC où se trouvait la plateforme (quadrant NE) comparé aux autres quadrants. Par ailleurs, une interaction significative Génotype x Quadrant est observée ( $F_{9,208}=8,59$  ;  $p < 0,001$ ). Ainsi, les mâles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> passent significativement moins de temps dans le QC comparés aux APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,001$ ) et Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,001$ ). De plus, les mâles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> passent significativement plus de temps dans le quadrant SO, correspondant au quadrant de lâcher, comparés aux APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,01$ ). Aucun effet significatif du Génotype n'est observé ( $F_{3,208}=1,58 \times 10^{-7}$ ). Enfin, la comparaison du pourcentage de temps passé dans le QC au hasard (25%) indique que seuls les mâles APP<sup>H2</sup> et Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> passent significativement plus de 25% de leur temps dans le QC. Ces rats sont donc capables de rappeler la localisation de la plateforme, ce qui n'est pas le cas des mâles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>. Ces derniers présentent donc un déficit de mémoire spatiale.

Pour les **fémmelles**, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Quadrant) montre également un effet significatif du Quadrant ( $F_{3,184}=22,59$  ;  $p<0,001$ ) et de l'interaction Génotype x Quadrant ( $F_{9,184}=17,20$  ;  $p<0,001$ ). Comme pour les mâles, les femelles passent plus de temps dans la QC comparé aux autres quadrants. Il n'y a cependant pas de différence significative entre le QC et le quadrant SO. Par ailleurs, les femelles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> passent significativement moins de temps dans le QC par rapport aux APP<sup>H2</sup> ( $p<0,001$ ) et Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> ( $p<0,05$  et  $p<0,001$ , respectivement). A l'inverse, les femelles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> passent significativement plus de temps dans le quadrant SO comparativement aux APP<sup>H2</sup> ( $p<0,001$ ). C'est également le cas des femelles Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> par rapport aux APP<sup>H2</sup> ( $p<0,001$ ) et aux Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> ( $p<0,001$ ). De plus, les femelles Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> passent également plus de temps dans le quadrant NO comparés aux APP<sup>H2</sup> ( $p<0,05$ ). Par ailleurs, le one sample t-Test par rapport à 25% montre que seules les femelles APP<sup>H2</sup> et Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> passent significativement plus de 25% de leur temps dans le QC ( $p<0,001$  et  $p<0,01$ , respectivement). Elles sont donc capables de rappeler la localisation de la plateforme.

En conclusion, les mâles, comme les femelles, Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> ne sont pas capables de rappeler la localisation de la plateforme et présentent donc un déficit de mémoire spatiale.



**Figure 92: Mémoire spatiale chez les rats Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>, Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> lors du premier test de rappel en piscine de Morris**

Le pourcentage de temps passé dans les différents quadrants a été mesuré. Pour les 2 sexes, les Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> ne passent pas significativement plus de 25% de leur temps dans le QC (quadrant NE). Ces rats présentent donc un déficit de mémoire spatiale. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type. Statistiques : F  $p<0,05$  ; FF  $p<0,01$  et FFF  $p<0,001$  vs. hasard (25%).

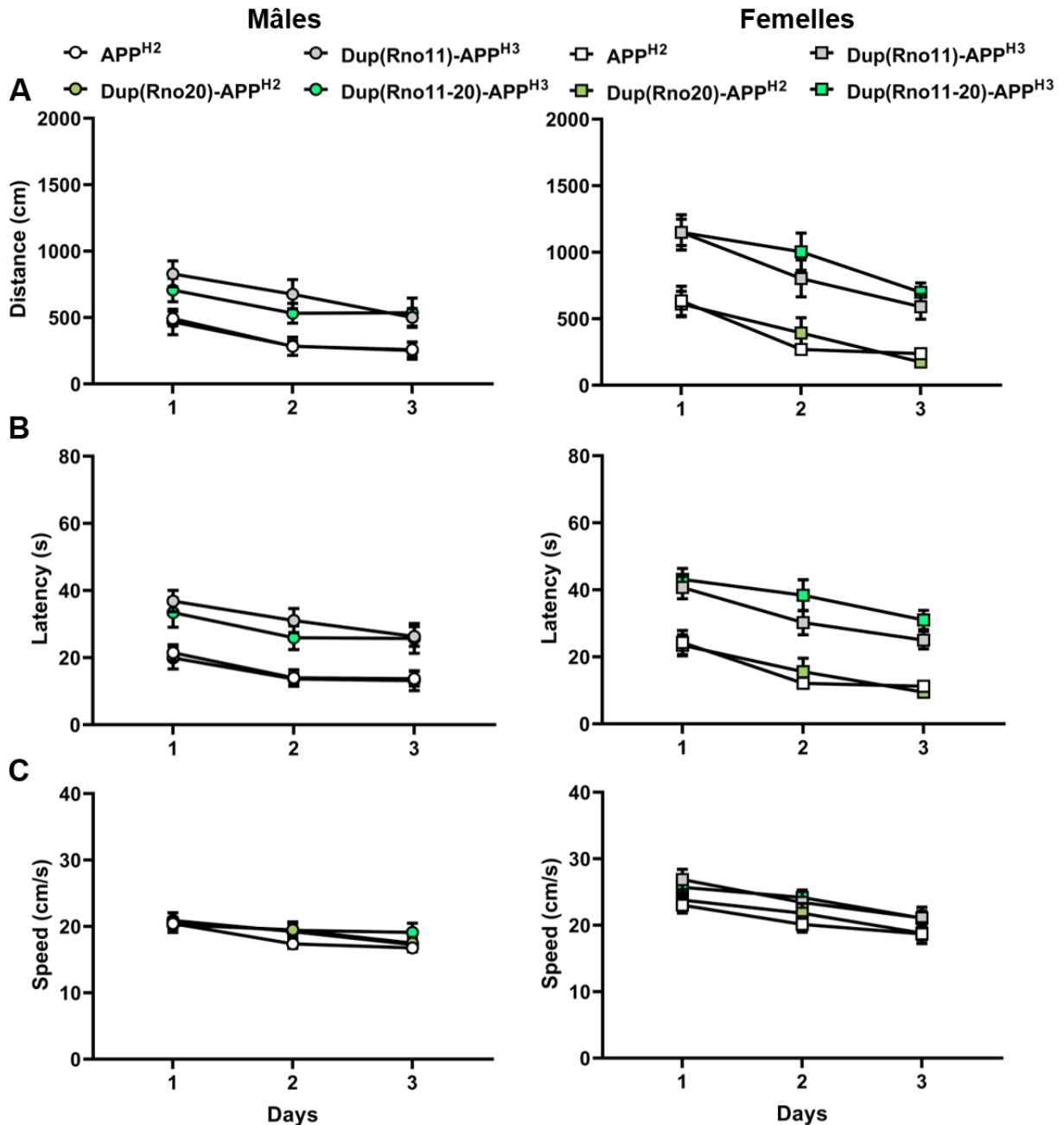
### 3- Phase de *reversal*

Les analyses indiquent pour la **distance parcourue pour atteindre la plateforme (Figure 93-A)**, un effet significatif du Jour pour les 2 sexes (ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Jour) ;  $p < 0,001$ , pour les mâles  $F_{2,104}=16,16$  ; pour les femelles  $F_{2,92}=43,20$ ). Cela est lié à une diminution globale de la distance parcourue au cours des jours de *reversal* qui traduit un apprentissage. Par ailleurs, un effet significatif du Génotype est mis en évidence pour les mâles, comme pour les femelles (pour les mâles  $F_{3,52}=6,31$  -  $p < 0,01$  ; pour les femelles  $F_{3,46}=13,6$  -  $p < 0,001$ ). Ainsi, pour les 2 sexes, les Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> parcourent une distance plus importante pour atteindre la plateforme, comparés aux APP<sup>H2</sup> et aux Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,01$  pour les 2 sexes et 2 génotypes). Par ailleurs, les femelles Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> parcourent une distance significativement plus importante comparativement aux APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,001$ ) et aux Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,001$ ). Aucune interaction Génotype x Jour n'est constatée (pour les mâles  $F_{6,104}=0,61$  ; pour les femelles  $F_{6,92}=1,21$ ).

Des résultats similaires sont obtenus pour la **latence d'atteinte de la plateforme (Figure 93-B)**. Ainsi, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Jour) met en évidence, pour les 2 sexes, un effet significatif du Jour ( $p < 0,001$ , pour les mâles  $F_{2,104}=14,96$  ; pour les femelles  $F_{2,92}=36,40$ ) et du Génotype ( $p < 0,001$ , pour les mâles  $F_{3,52}=9,87$  ; pour les femelles  $F_{3,46}=19,39$ ). Comme précédemment, l'effet du Jour traduit un apprentissage qui se reflète dans la diminution de la latence pour atteindre la plateforme au cours des jours du *reversal*. L'effet du Génotype indique, pour les mâles comme pour les femelles, une augmentation de la latence pour atteindre la plateforme chez les rats Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> par rapport aux rats APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,001$  pour les 2 sexes) et Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,001$  pour les mâles ;  $p < 0,01$  pour les femelles). Les rats Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> mettent également plus de temps à atteindre la plateforme comparativement aux APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,05$  pour les mâles ;  $p < 0,001$  pour les femelles) et aux Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,05$  pour les mâles ;  $p < 0,001$  pour les femelles). L'interaction Génotype x Jour n'est pas significative pour les 2 sexes (pour les mâles  $F_{6,104}=0,35$  ; pour les femelles  $F_{6,92}=0,83$ ).

En résumé, ces résultats mettent en évidence un déficit d'apprentissage chez les mâles et les femelles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>. Cependant, malgré ce déficit, la distance parcourue et la latence pour atteindre la plateforme diminue au cours des jours montrant qu'ils sont capables d'apprendre la nouvelle localisation de la plateforme. Ils ne présentent pas de déficit de mémoire spatiale.





**Figure 93: Flexibilité comportementale chez les rats Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>, Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> lors de la phase de reversal en piscine de Morris**

(A) Distance parcourue pour atteindre la plateforme. Les mâles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et les mâles et femelles Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> parcourent une distance plus importante. (B) Latence pour atteindre la plateforme. Pour les 2 sexes, les rats Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> mettent plus de temps à atteindre la plateforme. Ces rats présentent donc un déficit d'apprentissage spatial. Cependant, ils sont capables d'apprendre la nouvelle localisation de la plateforme, comme le montre la diminution de la distance et de la latence au cours des jours. (C) Vitesse de nage. Aucune différence n'est observée entre les génotypes pour les 2 sexes. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type.

Enfin, la **vitesse de nage** a été étudiée (**Figure 93-C**). Pour les mâles, comme pour les femelles, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Jour) montre uniquement un effet significatif du Jour ( $p < 0,001$ , pour les mâles  $F_{2,104}=21,12$  ; pour les femelles  $F_{2,92}=48,28$ ). Ainsi, de manière globale, la vitesse de nage diminue au cours des jours d'apprentissage. Pour les 2 sexes, aucun effet significatif Génotype (pour les mâles  $F_{3,52}=0,41$  ; pour les femelles  $F_{3,46}=1,96$ ), ni d'interaction Génotype x Jour (pour les mâles  $F_{6,104}=1,37$  ; pour les femelles  $F_{6,92}=0,64$ ) ne sont mis en évidence.

Ainsi, l'absence de différence entre les génotypes pour la vitesse de nage permet de dire que le déficit d'apprentissage observé chez les mâles et les femelles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> n'est pas lié à un problème moteur.

#### 4- Test de rappel n°2

Tout d'abord pour les **mâles**, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Quadrant) réalisée pour le **pourcentage de temps passé dans les quadrants** montre un effet significatif du Quadrant ( $F_{3,208}=163,2$  ;  $p < 0,001$ ) et une interaction Génotype x Quadrant ( $F_{9,208}=3,3$  ;  $p < 0,001$ ) (**Figure 94-A**). Ainsi, les mâles passent significativement plus de temps dans le QC (quadrant SO) comparé aux autres quadrants. Cependant, les mâles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> passent significativement moins de temps dans le QC comparés aux APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,01$  et  $p < 0,05$ , respectivement). De plus, les mâles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> passent significativement plus de temps dans le quadrant SE, correspondant au quadrant de lâcher, comparés aux APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,05$ ). Aucun effet du génotype n'est observé ( $F_{3,208}=4,55 \times 10^{-8}$ ). Le one sample t-Test réalisé pour comparer le pourcentage de temps passé dans le QC au hasard (25%) indique que l'ensemble des rats passent significativement plus de 25% du temps dans le QC ( $p < 0,001$  pour tous les génotypes). Ainsi, tous les rats sont capables de rappeler la localisation de la plateforme.

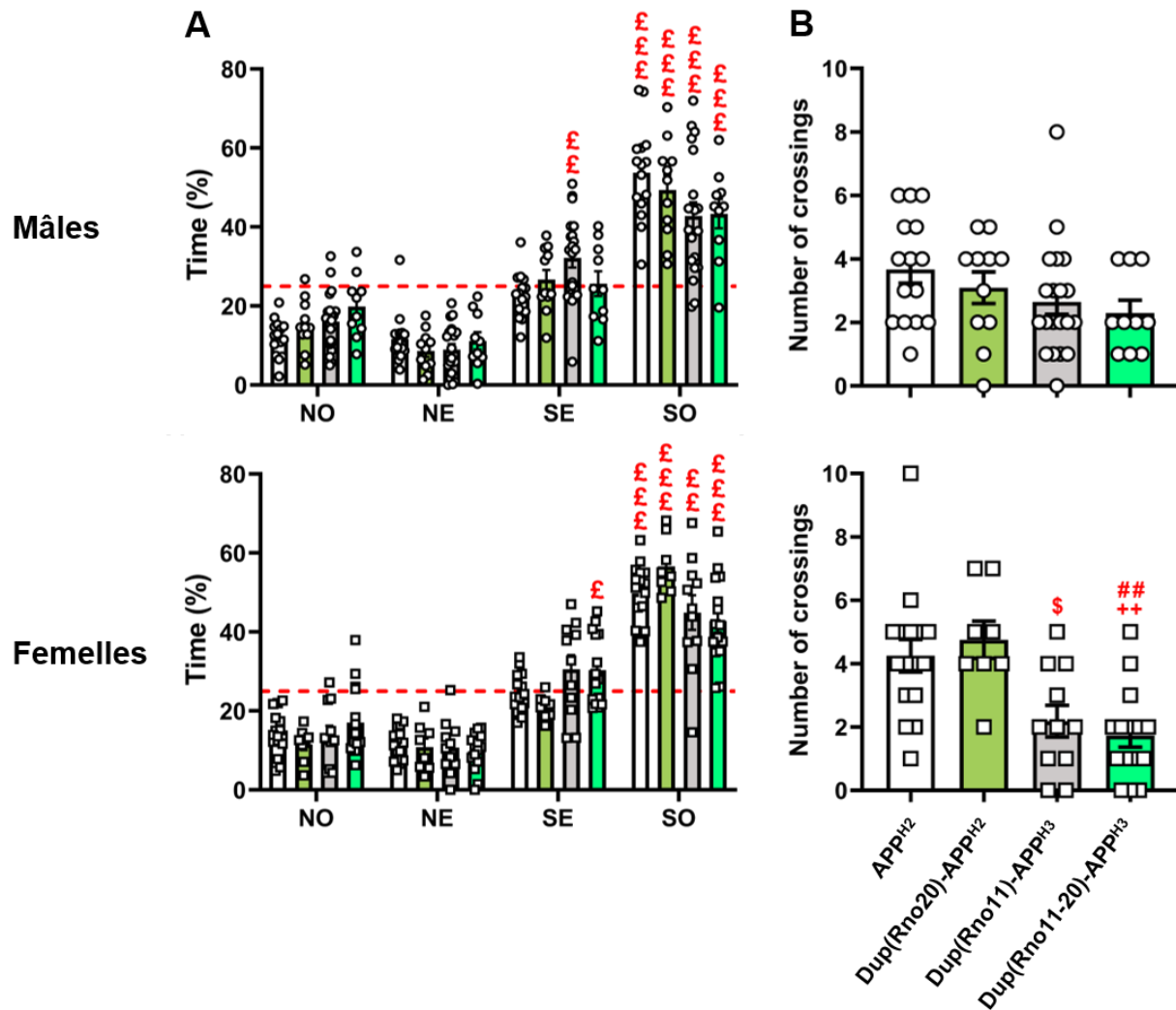
Pour les **femelles**, l'ANOVA à 2 facteurs (Génotype x Quadrant) met également en évidence un effet significatif du Quadrant ( $F_{3,184}=217$  ;  $p < 0,001$ ) et une interaction Génotype x Quadrant ( $F_{9,184}=3,67$  ;  $p < 0,001$ ). Comme pour les mâles, l'effet du Quadrant indique un temps passé dans le QC supérieur au temps passé dans les autres quadrants. Par ailleurs, les femelles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> passent significativement moins de temps dans le QC comparées aux femelles Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ , respectivement). A l'inverse, elles passent plus de temps dans le quadrant SE, correspondant au quadrant de lâcher, comparés aux Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,05$ ). Par ailleurs, tous les rats sont capables de rappeler la localisation de la plateforme, ils passent significativement plus de 25% de leur

temps dans le QC ( $p < 0,001$  pour les APP<sup>H2</sup>, les Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> et les Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> ;  $p < 0,01$  pour les Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup>).

En conclusion, lors du second test de rappel, l'ensemble des rats des 2 sexes sont capables de rappeler la localisation de la plateforme. Aucun déficit de mémoire spatiale n'est observé. Cependant, les Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>, mâles et femelles, présentent de moins bonnes performances.

Enfin, le **nombre de croisements de l'emplacement de la plateforme** a également été évalué (**Figure 94-B**). Ainsi, chez les **mâles**, le test de Kruskal-Wallis réalisé ne met pas en évidence de différence entre les génotypes ( $p = 0,13$ ). En revanche, chez les **femelles**, une différence est observée entre les génotypes (Test de Kruskal-Wallis,  $p < 0,001$ ). Ainsi, les femelles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> croisent significativement moins l'emplacement de la plateforme par rapport aux Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,05$ ). Une diminution est également observée chez les femelles Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> par rapport aux APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,01$ ) et Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> ( $p < 0,01$ ).

Ainsi, bien que les mâles et les femelles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> soient capables de rappeler la localisation de la plateforme, ils présentent une réduction dans la précision de leur mémoire.



**Figure 94: Mémoire spatiale chez les rats Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>, Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> lors du second test de rappel en piscine de Morris**

(A) Pourcentage de temps passé dans les différents quadrants. Tous les animaux passent significativement plus de 25% de leur temps dans le quadrant cible (SO). Ils sont donc capables de rappeler la localisation de la plateforme. *Statistiques* : £  $p < 0,05$ , ££  $p < 0,01$  et £££  $p < 0,001$  vs. hasard (25%). (B) Nombre de croisements de l'emplacement de la plateforme. Chez les mâles, aucune différence n'est observée entre les génotypes, chez les femelles, les Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> croisent significativement moins l'emplacement de la plateforme. Elles présentent donc une moins bonne précision de leur mémoire. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  erreur-type. *Statistiques* : \$  $p < 0,05$  et ##  $p < 0,01$  vs. Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>; ++  $p < 0,01$  vs. APP<sup>H2</sup>.

## IX- Conclusion générale

Les résultats de l'étude comportementale réalisée chez les rats SD avec l'APP<sup>H</sup> à l'âge de 6-7 semaines sont synthétisés dans le **Tableau 15**. Cette étude montre une réduction de la **masse corporelle** des mâles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> (16,6%) et des femelles Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> (9,8%) par rapport aux APP<sup>H2</sup>. Cette

réduction de la masse corporelle est aussi présente chez les mâles Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>, bien qu'elle n'atteigne pas la significativité à l'âge de 9 semaines. Par ailleurs, aucune différence n'est observée pour le **niveau d'anxiété** des animaux, que ce soit pour les mâles ou pour les femelles, évalué dans les tests du labyrinthe en Y et du champ-ouvert.

Concernant **l'activité locomotrice**, aucune différence n'est observée pour les mâles, que ce soit dans le test de l'activité circadienne, du champ ouvert ou encore pour le nombre d'entrées dans les bras du labyrinthe en Y. Pour les femelles, des résultats contradictoires sont obtenus. En effet, le test de l'activité circadienne met en évidence une réduction de l'activité locomotrice lors de la phase nocturne chez les Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> mesurée en cage d'élevage. En revanche, dans un champ ouvert, les femelles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> sont hyperactives. De même, dans le labyrinthe en Y, une activité générale plus importante est observée chez les femelles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>. Ces différences pourraient s'expliquer par les conditions expérimentales. En effet, pour les tests du champ ouvert et du labyrinthe en Y, l'animal est exposé à un nouvel environnement et l'activité locomotrice évaluée sur une courte période. Pour le test de l'activité circadienne, les rats sont placés dans des cages d'hébergement. Bien que celles-ci soient différentes de leur cage d'hébergement sur portoirs ventilés, une phase d'habituation de 3h est laissée aux animaux pour s'acclimater.

Enfin, pour les **fonctions cognitives**, le test du labyrinthe en Y a mis en évidence un déficit de mémoire de travail chez les femelles Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> uniquement. Ce déficit n'est pas observé chez les mâles. Pour le test de mémoire de localisation d'objets (OLM), il n'est pas possible de conclure pour les mâles, les rats APP<sup>H2</sup> (les contrôles) ayant présenté de mauvaises performances. En revanche, pour les femelles, un déficit est observé chez les Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> qui atteste donc un déficit de mémoire spatiale à court terme. Pour le test de reconnaissance d'objets (NOR), aucune différence n'est observée entre les génotypes pour les mâles, la mémoire de reconnaissance est donc préservée. Chez les femelles, il semblerait y avoir un déficit pour les Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>, cependant, le petit effectif de ce groupe génétique pourrait expliquer les résultats non significatifs.

Enfin, le test de la piscine de Morris a mis en évidence un déficit net d'apprentissage chez les Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>, mâles et femelles, ainsi que du rappel lors du 1<sup>er</sup> test à 24h. Ils présentent donc un déficit de mémoire spatiale. Lors de la phase de *reversal*, le déficit d'apprentissage est à nouveau observé chez les mâles et femelles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>. Ils restent cependant capables d'apprendre la nouvelle localisation de la plateforme, démontrant une flexibilité

comportementale. Lors du 2<sup>ème</sup> test de rappel à 24h, l'ensemble des rats est capable de rappeler la localisation de la plateforme.

		Dup(Rno20)-APP <sup>H2</sup>		Dup(Rno11)-APP <sup>H3</sup>		Dup(Rno11-20)-APP <sup>H3</sup>	
		Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles
Masse Corporelle		∅		↘ (16,6%)	∅	∅	↘ (9,8%)
Activité circadienne		∅		∅	↘ activité nocturne	∅	↘ activité nocturne
Labyrinthe en Y	Anxiété	∅		∅		∅	
	Activité	∅		∅	↗	∅	↗
	Alternance	∅		∅		∅	↘
Champ ouvert	Activité	∅		∅	↗	∅	
	Anxiété	∅		∅		∅	
OLM		?	∅	?	∅	?	↘
NOR		∅	↘	∅		∅	
Piscine de Morris	Acquisition	∅		↘		↘	
	Rappel n°1	∅		↘		↘	
	Reversal	∅		↘		↘	
	Rappel n°2	∅		∅		∅	

**Tableau 15** : Synthèse des résultats de l'étude comportementale réalisée chez les rats Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup>, Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>

↘ et ↗, indique respectivement une diminution et une augmentation par rapport aux APP<sup>H2</sup> ; ∅, indique une absence de différence avec les APP<sup>H2</sup> ; ? : indique l'impossibilité d'émettre une conclusion.



---

# **DISCUSSION**

---





Le point central de cette thèse est le gène de l'APP étudié à la fois sous ses aspects physiologiques et pathologiques. Ce gène possède de nombreuses fonctions physiologiques comme le démontrent les études réalisées au cours de ces dernières années. L'APP semble jouer un rôle important dans le développement. En effet, elle a été montrée comme étant impliquée dans la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire, ou encore dans la croissance neuritique et la synaptogénèse (Allinquant et al. 1995; Kirazov et al. 2001; T. L. Young-Pearse et al. 2007; Hu et al. 2013). Autant de fonctions qui sont indispensables pour le bon développement du cerveau. L'APP joue également un rôle en dehors du développement puisqu'elle est aussi nécessaire au maintien des fonctions synaptiques au cours du vieillissement (Tyan et al. 2012). Bien que de nombreuses fonctions lui soit associées, les mécanismes qui sous-tendent celles-ci restent pour l'heure pas, peu ou mal compris. En effet, l'APP reste principalement étudiée pour son implication dans la maladie d'Alzheimer (MA). Le gène *APP*, localisé sur le chromosome 21, est la cible de nombreuses mutations conduisant à une augmentation de la production du peptide A $\beta$  issu du clivage de la protéine correspondant à ce gène. Ce peptide s'accumule alors à l'extérieur des neurones et forme les plaques amyloïdes caractéristiques de la MA. En dehors des mutations de l'APP, la simple duplication de ce gène est suffisante pour induire le développement d'une MA (Anne Rovelet-Lecrux et al. 2006; A. Rovelet-Lecrux et al. 2007). Ainsi, les personnes atteintes du syndrome de Down (SD) présentent un risque élevé de développer de façon précoce une démence de type Alzheimer. Les mécanismes responsables du développement de cette pathologie dans le contexte du SD ne sont, pour l'heure, pas compris.

Ma thèse s'articulait autour de deux projets majeurs. Le premier avait pour but d'étudier les fonctions physiologiques de l'APP au cours du vieillissement. Pour cela, un tout nouveau modèle de rat APP-KO a été caractérisé aussi bien au niveau comportemental qu'au niveau moléculaire. Le second projet avait deux objectifs. Le premier était de caractériser au niveau comportemental de nouveaux modèles de rat du SD. Ces modèles présentent ainsi une duplication de la région Rno11 et/ou de la région Rno20 homologue au Hsa21. Le but était d'étudier le rôle de ces régions dans la physiopathologie du SD. Par la suite, une version humanisée de l'APP a été introduite dans ces modèles afin d'essayer d'induire le développement de la MA. Le but était alors d'étudier les mécanismes de cette pathologie dans le contexte du SD. Ces modèles ont à leur tour été caractérisés par réalisation de la même batterie de tests comportementaux que celle utilisée chez les modèles non humanisés afin d'étudier l'effet de cette humanisation de l'APP.

## **Projet I : Caractérisation d'un modèle rat APP-KO**

A ce jour, 4 modèles de souris APP-KO ont été décrits dans la littérature, trois d'entre eux présentant un KO complet de l'APP (U. Müller et al. 1994; Zheng et al. 1995; Z. W. Li et al. 1996; Senechal, Kelly, et Dev 2008). Leur caractérisation a permis de mettre en évidence différents phénotypes liés à l'absence d'APP. Cependant, des différences inter-espèces peuvent exister, et les observations faites chez une espèce ne s'appliquent par forcément à une autre. Il est donc important de réaliser les études chez différents organismes-modèles. La création de ce modèle rat APP-KO représentait l'opportunité de déterminer si des résultats similaires à ceux de la souris étaient obtenus chez le Rat. Par ailleurs, le rat est physiologiquement et génétiquement plus proche de l'Homme que ne l'est la souris, ce qui lui confère un intérêt supplémentaire.

Alors que les modèles de souris avec un KO complet de l'APP ciblent le promoteur et/ou l'exon 1 du gène (Zheng et al. 1995; Senechal, Kelly, et Dev 2008), ou se basent sur la délétion d'une grande séquence nucléotidique (200kb) (Z. W. Li et al. 1996), la construction de notre modèle, cible l'exon/intron 16 du gène. Ainsi, une délétion de 43 pb au niveau de cette région est suffisante pour induire un KO complet comme le démontre les western blots réalisés dans l'hippocampe et le CPFm de nos rats. L'importance de cette région peut s'expliquer par le fait qu'elle se trouve juste en amont du domaine transmembranaire de l'APP. Cette délétion pourrait donc empêcher son ancrage à la membrane plasmique et entraîner sa dégradation.

### **Effet de la déficience en APP sur la masse corporelle**

Comme pour les modèles souris, une réduction de la **masse corporelle** est observée chez les rats *App*<sup>-/-</sup>. Cette réduction est de l'ordre de 11 à 14%, ce qui est plutôt proche des observations faites chez les souris, chez lesquelles, la réduction pondérale varie entre 7 et 20% (U. Müller et al. 1994; Zheng et al. 1995; Tremml et Lipp 1998; Dawson et al. 1999; Phinney et al. 1999; Ring et al. 2007; Senechal, Kelly, et Dev 2008). Par ailleurs, dans notre étude, la différence de masse corporelle n'apparaît qu'entre 9 et 10 semaines d'âge, et on la retrouve jusqu'après 18 mois. Cela diffère des observations faites dans l'étude de Tremml et al. (1998) qui montre une différence dès 12 jours après la naissance, mais cette différence disparaît à l'âge de 6 mois. Les divergences observées entre ces résultats pourraient être liées au fait que le modèle utilisé dans l'étude de Tremml et al. (1998) n'est pas un KO total. En effet, l'expression d'une plus petite protéine à un faible niveau est observée. Or, cette protéine pourrait influencer l'expression de certains phénotypes. Une hypothèse pour expliquer cette réduction de masse corporelle chez les rats *App*<sup>-/-</sup>

<sup>-/-</sup> pourrait impliquer une altération du métabolisme énergétique. En effet, chez un modèle de souris de la MA, double transgénique pour APP/PS1, une diminution du métabolisme du glucose a été mise en évidence, entraînant une augmentation du niveau de glucose dans le sérum et le pancréas (X. Liu et al. 2019). Des observations similaires ont également été réalisées pour d'autres organes chez ces souris. C'est le cas du foie, des reins, de la rate, du thymus, ou encore du cerveau (González-Domínguez et al. 2015; Zhou et al. 2018). Nous pourrions alors supposer que les rats *App<sup>-/-</sup>* présentent une augmentation de leur métabolisme énergétique se traduisant par une augmentation du métabolisme du glucose.

### **Effet de la déficience en APP sur des fonctions non-mnésiques**

Nous avons également évalué **l'anxiété, la coordination sensorimotrice et l'activité locomotrice** chez nos rats *App<sup>+/-</sup>* et *App<sup>-/-</sup>*. Ainsi, aucune différence n'est observée pour le niveau d'anxiété, quel que soit l'âge étudié. Ces résultats sont en accord avec les observations faites chez les modèles souris, pour lesquels aucune modification du niveau d'anxiété n'a été relevé chez ces derniers (Tremml et Lipp 1998; Ring et al. 2007). En revanche, une altération de la coordination sensorimotrice est constatée chez les rats *App<sup>-/-</sup>* à 18 mois. En effet, ces derniers présentent de moins bonnes performances au test de la barre. Cependant, ces moins bonnes performances seraient plus liées au fait que les rats *App<sup>-/-</sup>* traversent la barre plus rapidement comparativement aux *App<sup>+/+</sup>* (données non montrées). Il s'agirait donc plutôt d'imprudence que d'un réel problème moteur. Chez les modèles souris, la réalisation du test du rotarod n'a pas mis en évidence d'atteinte motrice (Dawson et al. 1999).

En ce qui concerne l'activité locomotrice, des résultats sont inconsistants. En effet, notre étude montre une hyperactivité chez les rats *App<sup>+/-</sup>* et *App<sup>-/-</sup>* à l'âge de 2 mois, mais celle-ci disparaît par la suite. Les études réalisées chez les souris montrent, quant à elles, une hypoactivité à l'âge de 2-4 mois (Zheng et al. 1995; U. Müller et al. 1994; Tremml et Lipp 1998; Dawson et al. 1999; Ring et al. 2007; Senechal, Kelly, et Dev 2008). Cette différence d'activité locomotrice disparaît également à des stades plus âgés. Ainsi, aux âges de 8 et 10 mois, aucune différence d'activité locomotrice n'est observée chez les souris APP-KO (Senechal, Kelly, et Dev 2008). De plus, l'étude de Ring et al. (2007) a mis en évidence des variations de l'activité des souris APP-KO au cours de la phase nocturne. Alors qu'elles apparaissent plus actives au début de cette phase, elles présentent une hypoactivité à la fin de la phase nocturne. Nous nous sommes donc également intéressés à cette activité en début et fin de phase nocturne. Hormis quelques variations ponctuelles de l'activité des rats *App<sup>-/-</sup>*, aucun effet majeur n'est observé. Les divergences observées entre les résultats obtenus avec les modèles souris et le modèle rat pourraient être liées aux protocoles utilisés. En effet, ceux-ci varient entre les études. Par exemple, la durée d'évaluation de l'activité locomotrice varie

entre 10 min et 3h, le dispositif utilisé n'est pas toujours le même, cage d'activité ou dispositif de la piscine à sec. Par ailleurs, si l'on prend l'exemple de l'étude de Zheng et al. (1995), les cages comportent un revêtement grillagé et possèdent des capteurs infrarouges au niveau de leur plafond. Ces derniers permettent d'évaluer l'activité verticale des souris. Cependant, il a été montré que les souris APP-KO présentent une réduction de leur force musculaire (Zheng et al. 1995; Tremml et Lipp 1998; Dawson et al. 1999; Ring et al. 2007; Senechal, Kelly, et Dev 2008). Nous pouvons alors supposer que les souris APP-KO escaladent moins que les souris contrôles ce qui, par conséquent, impacte l'activité générale sans pour autant que l'activité horizontale des animaux ne soit impactée. Ces conditions diffèrent donc du protocole que nous avons utilisé avec le test du champ ouvert. Par ailleurs, l'activité locomotrice des souris APP-KO au cours du nyctémère a été évaluée dans une seule étude (Ring et al. 2007). De la même façon, le protocole utilisé ainsi que l'analyse des données diffèrent de ce que nous avons réalisé dans notre étude. En effet, dans cette étude, l'activité est mesurée sur 4 jours à la suite d'une phase d'habituation de 18h alors que dans notre cas, l'activité locomotrice est évaluée pendant 45h à la suite d'une habituation de 3h. Leur phase d'habituation est donc relativement longue. Par ailleurs, le profil d'activité des souris APP-KO est déterminé en moyennant les enregistrements issus de ces 4 jours alors que les analyses que nous avons réalisées évaluent l'activité des deux phases nocturnes de façon séparée.

### **Effet de la déficience en APP sur des fonctions mnésiques**

Nous avons également réalisé le test de la piscine de Morris afin d'évaluer **l'apprentissage et la mémoire spatial**. Ce test a permis de mettre en évidence un retard d'apprentissage chez les rats *App<sup>-/-</sup>* visible uniquement pour la cohorte de 12 mois. Par ailleurs, aucun déficit de mémoire spatiale n'est observé et ce, quel que soit l'âge étudié. En effet, tous les rats sont capables de rappeler la localisation de la plateforme. Les études réalisées chez les souris montrent, quant à elle, un déficit d'apprentissage en piscine de Morris dès l'âge de 2-4 mois, ce qui diffère de nos observations faites chez le rat (U. Müller et al. 1994; Tremml et Lipp 1998; Dawson et al. 1999; Ring et al. 2007). Cependant, l'étude réalisée par Dawson et al. (1999) impliquait du vieillissement et montre, à l'âge de 4 mois, un déficit d'apprentissage qui semble même plus marqué à l'âge de 10 mois. Ainsi, bien que l'âge d'apparition de ce déficit diffère entre les modèles souris et rat, dans les 2 cas, les effets liés à l'absence de l'APP sont évolutifs. Ils se traduisent par l'apparition d'un déficit avec l'âge chez les rats *App<sup>-/-</sup>*, alors que chez les souris une accentuation des déficits avec l'âge est observée. De plus, ces études ne mettent pas en évidence de déficit lors du test de rappel ce qui est en accord avec nos observations. Une étude s'est également intéressée aux effets de l'absence d'APP sur l'apprentissage et la mémoire spatiale à un stade plus tardif. Ce test a été

réalisé chez des souris âgées de 18-28 mois et a mis en évidence un déficit aussi bien lors de l'apprentissage que lors de la phase de rappel (Phinney et al. 1999). De tels déficits ne sont pas observés dans notre modèle, les rats *App<sup>+/-</sup>* et *App<sup>-/-</sup>* présentant des performances similaires à celles des *App<sup>+/+</sup>* à l'âge de 18 mois. Les divergences observées dans ces résultats peuvent également être liées aux protocoles utilisés, qui diffèrent entre les modèles souris et notre étude. Ainsi, la plupart des études chez les souris APP-KO utilisent un protocole avec une phase d'acquisition courte de 3 jours en instaurant un délai de 30 à 60 min entre chaque essai réalisé (U. Müller et al. 1994; Tremml et Lipp 1998; Phinney et al. 1999). Le protocole que nous avons utilisé comporte, quant à lui, 6 jours d'acquisition et des essais qui sont consécutifs. Par ailleurs, il a été montré qu'en piscine les souris présentent des performances inférieures à celles des rats (Whishaw et Tomie 1996). Nous pourrions alors supposer que la déficience en APP combinée à ces performances qui sont dès le départ moins bonnes puissent entraîner l'apparition plus précoce d'un déficit.

Nous nous sommes également intéressés à la **flexibilité comportementale** chez notre modèle. Pour cela, nous avons étudié le processus d'extinction en piscine de Morris. Les rats *App<sup>+/-</sup>* et *App<sup>-/-</sup>* présentent ainsi un déficit à l'âge de 12 mois. Ce déficit se généralise à 18 mois, âge auquel même les rats *App<sup>+/+</sup>* ne sont plus capables « d'éteindre » le souvenir spatial. En effet, le processus d'extinction se traduit par une diminution du temps passé dans le quadrant où se trouvait la plateforme lors de l'apprentissage (QC). Les rats apprennent ainsi que la plateforme n'est plus présente dans ce quadrant et vont la chercher dans les autres quadrants. Cette diminution a disparu à l'âge de 18 mois. Ce résultat n'est cependant pas surprenant. En effet, il a été montré qu'une trace mnésique plus faible est plus difficile à éteindre (Lopez, Vasconcelos, et Cassel 2008). Lorsqu'on s'intéresse au temps passé dans le QC lors du test de rappel, on peut constater que les rats *App<sup>+/+</sup>* de 18 mois y passent moins de temps comparativement aux âges de 2 et 12 mois. Ils auraient une trace mnésique plus faible et présenteraient donc plus de difficultés à l'éteindre.

Par ailleurs, la flexibilité comportementale a également été étudiée chez les modèles de souris APP-KO. Cette dernière a été étudiée non pas sous la forme d'une phase d'extinction, mais par la mise en œuvre d'un protocole d'inversion de consigne (*reversal*) pour lequel la plateforme est toujours présente dans la piscine mais à une position différente de celle utilisée pour la phase d'acquisition. Deux études réalisées chez des souris âgées de 2-3 mois montrent que même si ces souris présentent plus de difficultés à apprendre la nouvelle localisation de la plateforme, elles finissent par l'acquérir (Tremml et Lipp 1998; Ring et al. 2007). En effet, elles parcourent une distance plus importante ou mettent plus de temps à

atteindre la plateforme, mais une diminution de ces paramètres est observée au cours des jours, ce qui traduit un apprentissage. La distance et la latence plus importantes observées lors de cette phase seraient plutôt liées à un déficit d'apprentissage, comme observé lors de l'acquisition, et non liées à un déficit de flexibilité comportementale. Ces observations seraient en accord avec l'absence de déficit de flexibilité comportementale chez les rats APP-KO de 2 mois. En revanche, deux autres études mettent en évidence un déficit de flexibilité chez la souris, la distance parcourue lors des 2 jours de *reversal* ne diminuant pas d'un jour à l'autre (U. Müller et al. 1994; Phinney et al. 1999). Ces dernières utilisent le même protocole que Tremml et al. (1998), cependant, l'étude de Phinney et al. (1999) n'utilise pas le même modèle : modèle de Zheng et al. (1995) vs. Müller et al. (1994). Par ailleurs, les âges auxquels les tests ont été réalisés divergent : 2-3 mois pour Tremml et al. (1998) contre 18-28 mois pour Phinney et al. (1999). Deux éléments qui pourraient donc expliquer les divergences entre ces études. En revanche, Müller et al. (1994) ont utilisé le même modèle, et réalisé les analyses au même âge, environ 2 mois, que l'étude de Tremml et al. (1998). L'origine de ces divergences n'est donc pas évidente à identifier.

Concernant le test du **Double H**, il permet également d'évaluer l'apprentissage et la mémoire spatiale, ainsi que la flexibilité comportementale en étudiant la capacité des animaux à changer de stratégies. Les résultats obtenus pour ce test sont inconsistants entre les 3 âges, ils ne permettent donc pas d'émettre de conclusion. En effet, si l'on s'intéresse aux performances au cours des tests de rappel, pour chaque génotype séparément, des incohérences sont mises en évidence. Tout d'abord, si l'on s'intéresse aux rats **App<sup>+/+</sup>**, on peut constater que lors des deux premiers tests de rappel, ils présentent de moins bonnes performances à l'âge de 2 mois comparé aux âges de 12 et 18 mois. Ainsi, à l'âge de 2 mois, le temps passé dans le bras NE, où se trouvait la plateforme, est inférieur à celui obtenu aux âges de 12 et 18 mois lors du premier (à 2 mois :  $9,28 \pm 1,78s$  ; à 12 mois :  $12,21 \pm 1,90s$  ; à 18 mois  $12,67 \pm 1,03s$ ) et second tests de rappel (à 2 mois :  $8,20 \pm 1,51s$  ; à 12 mois :  $11,63 \pm 1,71$  ; à 18 mois :  $10,01 \pm 1,76$ ). C'est également le cas lors du troisième rappel pour lequel les rats **App<sup>+/+</sup>** de 2 mois passent moins de temps dans le bras NE comparé aux rats **App<sup>+/+</sup>** de 12 mois (à 2 mois :  $12,95 \pm 1,79s$  ; à 12 mois :  $15,40 \pm 2,13s$ ). Ces résultats sont surprenants. En effet, comme pour les autres tests, une dégradation des performances au cours de l'âge était attendue et non pas une amélioration. Par ailleurs, aux âges de 2 et 12 mois, les rats **App<sup>+/+</sup>** ne sont capables de rappeler la localisation de la plateforme qu'au 3<sup>ème</sup> test de rappel. Cependant, il a déjà été montré, avec un protocole identique, que les rats contrôles sont en mesure de rappeler la localisation de la plateforme dès le 1<sup>er</sup> test de rappel (Cholvin et al. 2013). Enfin, à l'âge de 18 mois, alors que les rats **App<sup>+/+</sup>** sont capables de rappeler la localisation de la plateforme lors du 1<sup>er</sup> test de rappel, visible par le fait qu'ils insistent dans le bras NE, ils n'en sont plus capables lors des deux tests de rappel suivant.

Concernant les **rats *App*<sup>+/-</sup>**, à l'âge de 2 mois, bien qu'ils utilisent en première approche une stratégie allocentrique, ils ne sont pas capables de rappeler la localisation de la plateforme. En effet, ils n'insistent pas dans le bras NE où se trouvait la plateforme lors de l'acquisition. A l'âge de 12 mois, ils ne présentent pas de meilleures performances. Cependant, la stratégie utilisée en première approche n'est plus la même ; cette fois, ils utilisent principalement une stratégie égocentrique. Nous pouvons donc supposer qu'ils ne sont pas capables de passer d'une stratégie égocentrique à une stratégie allocentrique, et qu'ils présentent donc un déficit de flexibilité comportementale. Cependant, les résultats obtenus avec la cohorte de 18 mois montrent que les rats *App*<sup>+/-</sup> sont capables de rappeler la localisation de la plateforme au cours des deux premiers tests de rappel. Lors du 1<sup>er</sup> test de rappel, ces animaux utilisent principalement une stratégie allocentrique alors que pour le second test, ils utilisent une stratégie égocentrique. Cela signifie donc qu'ils sont capables de passer d'une stratégie égocentrique à une stratégie allocentrique, seule stratégie leur permettant de rappeler la localisation de la plateforme. Ces résultats sont donc incohérents avec les observations faites aux âges précédents.

Enfin, pour les **rats *App*<sup>-/-</sup>**, à l'âge de 2 mois il faut attendre le troisième test de rappel pour qu'ils soient en mesure de rappeler la localisation de la plateforme. En effet, c'est uniquement lors de ce test qu'ils passent significativement plus de 8,2s dans le bras NE, donc dans le bras où se trouvait la plateforme auparavant. Par ailleurs, ils utilisent principalement une stratégie égocentrique en première approche. Cela signifie donc qu'ils sont capables de passer d'une stratégie égocentrique à une stratégie allocentrique. En revanche, à l'âge de 12 mois, ils sont en mesure de rappeler la localisation de la plateforme dès le 1<sup>er</sup> test de rappel alors qu'ils utilisent aussi principalement la stratégie égocentrique en première approche. Par ailleurs, ils ne sont plus capables de rappeler la localisation de la plateforme lors des tests de rappel suivants. Cela signifierait donc qu'ils perdent leur capacité à passer d'une stratégie à l'autre au cours de l'apprentissage du test.

### **Effet de la déficience en APP sur la morphologie cérébrale et de l'expression de marqueurs cellulaires et synaptiques**

Par la suite, la masse cérébrale a été évaluée et a permis de mettre en évidence une réduction de cette dernière chez les rats *App*<sup>-/-</sup> et ce aux 3 âges étudiés. Cette réduction est de l'ordre de 9-10%. Elle est similaire aux observations faites chez les modèles souris pour lesquels une réduction de 10-11% est constatée (Magara et al. 1999; Ring et al. 2007). L'origine de cette réduction n'est pas connue. En effet, les mesures de volumes et surfaces que nous avons réalisés n'ont pas mis en évidence de différence significative pour les structures étudiées. Cela n'empêche cependant pas que d'autres structures qui n'ont



pas été prise en compte dans notre étude soient impliquées dans cette réduction. Par ailleurs, ces analyses ont été réalisées sur un faible nombre d'individus et les analyses de surfaces effectuées restent préliminaires. En effet, ces mesures ont été réalisées sur une unique coupe par animal, que ce soit au niveau du striatum ou de l'hippocampe dorsal, ainsi nous ne pouvons pas garantir de que le même niveau d'antéropostériorité aura été pris en compte. Il serait donc nécessaire de compléter cette étude en augmentant le nombre de coupes. Par ailleurs, l'étude globale des marqueurs astrocytaires, GFAP et S100B, ne montre pas d'effet majeur de la déficience en APP. En effet, seule une réduction de l'expression de S100B est observée dans l'hippocampe à 12 mois, chez les rats *App<sup>+/-</sup>* et *App<sup>-/-</sup>*. D'après ces résultats, nous pouvons en déduire que le nombre d'astrocytes reste similaire entre les génotypes et n'est pas à l'origine de la diminution de la masse cérébrale. On notera au passage que l'étude de Phinney et al. (1999) ne montre aucune différence pour le nombre de neurones au niveau du gyrus denté et de la région CA1 de l'hippocampe chez les souris APP-KO. Ainsi, une réduction du nombre de neurones ne semble pas être la cause de la réduction de masse cérébrale. Cependant, Seabrook et al. (1999) ont montré qu'une sous-population de neurones de la région CA1 présentent une taille réduite et des projections plus courtes. Nous pourrions alors supposer que la présence de sous-populations de neurones de petite taille et/ou une réduction de l'arborisation des dendrites dans chaque structure cérébrale pourrait contribuer à la réduction globale de la masse cérébrale. A l'échelle de la structure, pourtant, cette réduction pourrait être trop subtile pour être détectée par nos mesures de volumes/surfaces.

Enfin, nous avons étudié l'expression des marqueurs pré-synaptiques SNAP-25 et Synaptophysine, pour lesquels aucune différence n'est observée, que se soit dans l'hippocampe ou le CPFm. L'absence d'APP chez notre modèle rat ne semble donc pas avoir d'impact majeur au niveau synaptique, ou du moins affecter quelque chose qui puisse être détecté par western blot. Cela semble être en accord avec les observations faites dans la majorité des études réalisées chez les souris. En effet, ces études ne mettent pas en évidence de diminution de l'expression de la synaptophysine (Phinney et al. 1999; Seabrook et al. 1999; Ring et al. 2007; Tyan et al. 2012).

### **Comparaison des modèles souris et rat**

Comme décrit ci-dessus, des similitudes peuvent être observées entre les modèles rat et souris comme pour la masse corporelle et la masse cérébrale. Cependant, un certain nombre de divergences sont observées dans les résultats. En dehors des différences dans les protocoles utilisés, d'autres éléments peuvent expliquer ces divergences. L'un de ces facteurs, non négligeable, est le fond génétique. En effet, il est connu que d'un fond génétique à un autre les résultats peuvent différer. Ainsi, les études sur les

modèles souris APP-KO ont été principalement réalisées sur des fonds mixtes, alors que la souche de rat que nous avons utilisée est non-consanguine. Cela implique donc plus de variabilité génétique entre nos animaux, ce qui est par conséquent plus proche de la population humaine. Par ailleurs, n'oublions pas que même si la souris et le rat se ressemblent par certains aspects, leur séparation phylogénétique remonte à 12, voir jusqu'à 24 millions d'années (Mullins et Mullins 2004). Cela en fait donc des espèces bien distinctes l'une de l'autre. Par conséquent, il n'est pas surprenant d'observer des différences entre des modèles similaires. Par ailleurs, le rat est une espèce qui s'adapte plus facilement aux conditions de laboratoire et à l'expérimentateur. Ainsi, le stress qui peut être généré chez les animaux lors de la manipulation est bien moins important chez les rats que chez les souris. Ces dernières restent plus stressées et anxieuses, malgré une habituation préalable à l'expérimentateur, ce qui peut éventuellement impacter les résultats et l'interprétation des études de comportement.

## Conclusion

En résumé, notre étude ne montre pas d'impact majeur de l'absence d'APP. Ainsi, à l'âge de 2 mois seul un effet au niveau locomoteur est observé, mais il disparaît par la suite. Par ailleurs, il faut attendre l'âge de 12 mois pour voir apparaître des déficits au niveau cognitif. Ceux-ci restent cependant subtils, avec un retard d'apprentissage et un déficit de flexibilité comportementale. De plus, ces déficits ne sont plus visibles à l'âge de 18 mois, probablement du fait du vieillissement des animaux contrôles qui, à leur tour, commencent à avoir des difficultés cognitives. Ces derniers présentent donc de moins bonnes performances qui pourraient cacher d'éventuels effets subtils de l'absence d'APP. Cette absence d'effet majeur, dans deux modèles animaux, souris (U. Müller et al. 1994; Zheng et al. 1995; Tremml et Lipp 1998; Dawson et al. 1999; Ring et al. 2007; Senechal, Kelly, et Dev 2008), et rat (cette étude), conduit à émettre deux hypothèses : la première serait que l'APP n'est pas indispensable, son absence n'impactant pas de façon importante le développement et le vieillissement des animaux. Cela semble cependant peu probable au vu des nombreuses fonctions dans lesquelles cette protéine est impliquée (U. C. Müller, Deller, et Korte 2017). La seconde hypothèse est que cette protéine est tellement importante qu'un mécanisme de compensation s'est mis en place. L'APP fait partie d'une famille de protéine incluant les protéines APLP1 et APLP2. Nous pourrions donc supposer que ces protéines puissent compenser l'absence d'APP. L'étude de l'expression de ces protéines par western blot n'a pas mis en évidence d'augmentation de leur expression dans l'hippocampe et le CPFm, quel que soit l'âge étudié. A l'inverse, une diminution de l'expression d'APLP2 est même observée dans l'hippocampe des rats *App<sup>+/-</sup>* et *App<sup>-/-</sup>* chez la cohorte de 12 mois. De même, chez les souris, aucune différence n'a été observée au niveau de l'ARN pour APLP1 comme

pour APLP2 (Zheng et al. 1995). Cela ne veut cependant pas dire que ces protéines ne compensent pas pour la perte de l'APP. En effet, nous pourrions supposer que leur expression à un niveau normal pourrait être suffisant pour pallier l'absence d'APP. Plusieurs arguments pourraient permettre d'aller dans ce sens. En effet, ces protéines possèdent des structures qui sont relativement similaires, ce sont toutes les trois des protéines transmembranaires de type I. Par ailleurs, comme décrit dans l'introduction, certains des domaines présents dans la structure de l'APP sont également retrouvés dans celle des protéines APLP1 et APLP2 (U. C. Müller, Deller, et Korte 2017). Par ailleurs, l'APP et l'APLP2 présentent un pattern d'expression similaire (Lorent et al. 1995). Il existe également des modèles KO pour les protéines APLP1 et APLP2 qui ne présentent pas de phénotypes majeurs (von Koch et al. 1997; Heber et al. 2000; U. C. Müller, Deller, et Korte 2017). En effet, ces souris sont viables et ne présentent aucune anomalie de la morphologie du cerveau ou d'altération de la LTP dans le cerveau. Seule une réduction de la masse corporelle est observée chez les souris APLP1-KO. Cependant, la réalisation de double KO APP-APLP2 ou APLP1-APLP2 sont léthaux. Cela souligne donc l'importance de la protéine APLP2 qui, en plus d'avoir des fonctions spécifiques, semble en mesure de compenser la perte de l'APP ou APLP1. Cela est d'autant plus vrai que le double KO APP-APLP1 n'induit pas de phénotype majeur alors que le triple KO APP-APLP1-APLP2 est léthal. Enfin, l'APP possède également de nombreux interacteurs (U. C. Müller, Deller, et Korte 2017), nous ne pouvons donc pas exclure que l'expression de ces derniers puisse avoir augmentée afin de pallier l'absence d'APP.

## **Projet II : Caractérisation de modèles de rats du Syndrome de Down avec ou sans l'APP humanisée**

### **1- Etude des modèles de rat du SD sans l'APP<sup>H</sup>**

Comme décrit précédemment, ce second projet s'est déroulé en plusieurs étapes avec tout d'abord la caractérisation au niveau comportemental des modèles Dup(Rno20), Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20) sans l'APP<sup>H</sup>. Cette étude a permis de mettre en évidence un rôle majeur de la région Rno11 dans l'apparition des déficits cognitifs. En effet, chez les rats Dup(Rno20) seul un déficit de mémoire spatiale à court terme a été mis en évidence dans le test de localisation d'objets (OLM), uniquement pour les mâles. Ce déficit est également observé chez les mâles Dup(Rno11). Par ailleurs, cette duplication entraîne l'apparition d'un déficit d'apprentissage spatial en piscine de Morris aussi bien chez les mâles que chez les femelles. La mémoire spatiale à long terme reste, quant à elle, relativement bien préservée, avec seulement une moins bonne précision des animaux lors des tests de rappel. Cependant, la duplication de la région Rno11 n'affecte pas que les capacités cognitives des animaux. En effet, une réduction de la masse corporelle est

observée chez les mâles Dup(Rno11), de même qu'une augmentation de l'activité locomotrice chez les femelles Dup(Rno11) lors de la phase nocturne dans le test de l'activité circadienne. Ces déficits sont retrouvés chez le modèle de trisomie complète, Dup(Rno11-20), pour lequel des phénotypes supplémentaires sont observés. Ainsi, un déficit de mémoire de travail a été mis en évidence chez les mâles dans le labyrinthe en Y. Par ailleurs, pour les 2 sexes, une hypoactivité est observée dans le test du champ ouvert, ces animaux semblent également plus anxieux. De plus, bien qu'une réduction de masse corporelle soit observée chez les mâles Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20), celle-ci semble plus marquée chez ces derniers, tout du moins à l'âge de 9 semaines. En effet, cette réduction atteint 21,9% chez les Dup(Rno11-20) contre 13,1% chez les Dup(Rno11). Cela souligne l'importance des interactions entre ces 2 régions, qui sont nécessaires pour l'apparition de certains phénotypes ou l'accentuation d'autres.

Par ailleurs, certains des tests réalisés mettent en évidence des différences entre les mâles et les femelles. En effet, des déficits sont observés chez un sexe mais pas chez l'autre. L'origine de ces différences n'est pas connue. Une explication possible serait des variations du profil d'expression des protéines entre les mâles et les femelles (Block et al. 2015). En effet, l'étude de Block et al. (2015) montre que, dans l'hippocampe de souris contrôles, le niveau d'expression de 40% des protéines étudiées diffère entre les 2 sexes par la technique de « *reverse phase protein arrays* ». Ils se sont également intéressés au modèle de souris Dp(10)1Yey qui présentent une duplication de la région du Mmu10 homologue au Hsa21. Ainsi, des perturbations sexes-spécifiques sont également mises en évidence chez ce modèle. L'hippocampe apparaît comme plus affecté par la duplication chez les mâles, alors que chez les femelles c'est le cervelet. En effet, la comparaison des profils d'expression avec les animaux contrôles indique, dans l'hippocampe, un niveau d'expression perturbé pour 18 protéines chez les femelles Dp(10)1Yey contre 49 chez les mâles. A l'inverse, pour le cervelet, alors que 62 protéines diffèrent dans leur niveau d'expression chez les femelles Dp(10)1Yey comparativement aux femelles contrôles, seules 21 protéines sont affectées chez les mâles Dp(10)1Yey par rapport aux mâles contrôles. Nous pourrions alors supposer que de telles différences existent également chez nos modèles rats. Par conséquent, ces différences au niveau protéines impacteraient les phénotypes observés. Chez les personnes atteintes du SD, les différences homme-femme, restent peu étudiées. Cependant, il a été montré chez des enfants atteints du SD âgés de 2 ans, que les filles présentent de meilleures capacités cognitives et linguistiques (Aoki, Yamauchi, et Hashimoto 2018). Par ailleurs, à l'âge de 10 ans, elles présenteraient de meilleures capacités intellectuelles et un meilleur fonctionnement adaptatif (Marchal et al. 2016). Cela souligne donc l'importance d'étudier les deux sexes dans ces types de modèle.

Contrairement aux rats, les régions homologues au Hsa21 se trouvent chez la souris sur 3 chromosomes différents, les chromosomes 10, 16 et 17. Ainsi, différents modèles présentant une duplication de l'une de ces régions ont été développés. Le premier modèle comporte une duplication du chromosome 16 entre les gènes *Lipi* et *Zbtb21* (Z. Li et al. 2007). Ce modèle, appelé Dp(16)1Yey, est donc identique au modèle Dup(Rno11). Concernant la région Rno20, qui est dupliquée dans le modèle Dup(Rno20), elle est répartie sur les chromosomes 10 et 17 chez la souris. Ainsi, deux modèles ont été créés, le premier, cité précédemment, est le modèle Dp(10)1Yey, le second est porteur de la duplication de la région du Mmu17, homologue au Hsa21 ; ce modèle est appelé Dp(17)1Yey (Yu et al. 2010). De plus, très récemment, un modèle de trisomie complète a été mis au point chez les souris. Ce modèle combine ainsi les duplications des 3 modèles précédents (Y. Li et al. 2021).

Tout d'abord, si l'on s'intéresse au modèle Dp(16)1Yey des résultats différents sont obtenus d'un laboratoire à l'autre. En effet, par exemple pour le labyrinthe en Y, alors qu'une diminution du pourcentage d'alternances spontanées est observée dans deux études (Souchet et al. 2019; Duchon et al. 2021), traduisant donc un déficit de mémoire de travail, une autre étude ne montre pas de différence (Goodliffe et al. 2016). De la même façon, pour l'activité locomotrice, une augmentation, une diminution ou aucune différence est observée selon l'étude. Le test de la piscine de Morris a également été réalisé chez ces souris. L'étude de Yu et al. (2010) montre ainsi un retard d'apprentissage, cependant les souris Dp(16)1Yey sont capables de rappeler la localisation de la plateforme bien qu'elles passent moins de temps dans le QC. A l'inverse, les études réalisées par Goodliffe et al. (2016) et Duchon et al. (2021) ne mettent pas en évidence de déficit d'apprentissage spatial avec des souris Dp(16)1Yey qui sont, par ailleurs, capables de rappeler la localisation de la plateforme avec des performances similaires aux contrôles. Cependant, lorsqu'une phase de *reversal* est réalisée, les souris Dp(16)1Yey ont plus de difficultés à apprendre la nouvelle localisation de la plateforme, bien qu'elles soient capables d'apprendre, et cela se traduit par de moins bonnes performances lors du test de rappel (Goodliffe et al. 2016). Les souris Dp(16)1Yey présentent donc un déficit de flexibilité comportementale. Les différences observées entre ces études sont probablement liées aux conditions expérimentales qui ne sont pas les mêmes d'une étude à l'autre. Cela attire l'attention sur complexité qu'il y a à comparer des études. On peut aussi regretter l'absence de protocoles standardisés. Enfin, le test de reconnaissance d'objets (NOR) réalisé chez ces souris met en évidence un déficit de mémoire de reconnaissance lorsqu'un délai de rétention de 24h est utilisé (Nguyen et al. 2018; Souchet et al. 2019; Duchon et al. 2021). Au vue des différences observées entre les études, il est difficile de faire une comparaison avec le modèle rat Dup(Rno11). Chez ce dernier, nous n'observons pas de déficit dans le labyrinthe en Y, ce qui serait davantage en accord avec les résultats obtenus par

Goodliffe et al. (2016). Par ailleurs, dans notre cas aucune différence n'est observée pour l'activité locomotrice chez les rats Dup(Rno11) dans le test du champ ouvert, comme mis en évidence chez les souris Dp(16)1Yey dans l'étude de Duchon et al. (2021). En piscine de Morris, les résultats que nous mettons en évidence semblent plus proches des observations faites par Yu et al. (2010), bien que nos rats n'atteignent pas le niveau des WT au dernier jour d'apprentissage. Enfin, pour le test du NOR, aucun déficit n'est observé chez les rats Dup(Rno11) contrairement aux souris. Pour ce test, le protocole utilisé chez la souris et le rat n'est pas le même. En effet, 2 objets sont utilisés chez la souris contre 3 chez le rat. Nous pouvons alors supposer que le test est trop simple pour les rats ce qui ne permettrait pas de mettre en évidence d'éventuels déficits. Une autre possibilité est que tout simplement, chez le rat, la duplication de la région Rno11 n'est pas impliquée dans le développement d'un déficit de mémoire de reconnaissance.

Concernant les modèles Dp(10)1Yey et Dp(17)1Yey, ils ont été très peu étudiés. Ainsi, seul le test de la piscine de Morris a été réalisé chez ces derniers, et il ne met pas en évidence de différence avec les animaux contrôles. Cela semble cohérent avec nos résultats pour le modèle Dup(Rno20), chez lequel aucun déficit d'apprentissage ou de mémoire spatial n'est observé.

Enfin, pour le modèle de souris avec une trisomie complète, une réduction de la masse corporelle et de la longueur du corps a été mise en évidence (Y. Li et al. 2021). Cela est en accord avec les observations faites chez le modèle de rat de trisomie complète, Dup(Rno11-20). En effet, celui-ci présente une réduction de sa masse corporelle. Cependant, la longueur du corps n'a pas été évaluée chez ce dernier. Par ailleurs, chez les souris de Li et al. (2021), aucune différence n'est observée pour l'activité locomotrice dans le test du champ ouvert. De même, lors du test de la piscine de Morris, aucun déficit d'apprentissage et de mémoire spatial n'est observé. En revanche, les souris présentent un déficit de flexibilité comme en atteste de moins bonnes performances lors de la phase de reversal. Ces résultats sont encore une fois distincts de nos observations. En effet, les rats Dup(Rno11-20) présentent une hypoactivité dans le test du champ ouvert. Par ailleurs, un déficit d'apprentissage est observé en piscine aussi bien lors de la phase d'acquisition que lors du reversal. Cependant, aucun déficit de flexibilité comportementale n'est observé chez nos rats. Enfin, cette étude montre également une réduction du pourcentage d'alternances spontanées dans le labyrinthe en T. Cela traduit donc un déficit de mémoire de travail. Bien que ce test soit différent du labyrinthe en Y, le déficit mis en évidence est en accord avec le déficit de mémoire de travail observé chez les rats Dup(Rno11-20) dans ce test.

Ainsi, les différences entre les études menées chez la souris et chez le rat révèlent la difficulté de comparer les résultats obtenus entre deux espèces. Par ailleurs, cela renforce le fait que la souris et le rat sont deux

espèces bien distinctes avec des comportements différents, il n'est donc pas surprenant de trouver des différences.

Enfin, nous pouvons comparer les résultats obtenus chez nos modèles rats avec les phénotypes observés chez les personnes atteintes du SD. Chez ces dernières, un déficit de mémoire de travail est mis en évidence lorsqu'elle fait appel à une composante verbale (Rowe, Lavender, et Turk 2006; S. Lanfranchi et al. 2010; Borella, Carretti, et Lanfranchi 2013). La mémoire de travail visuo-spatiale est, quant à elle, atteinte uniquement lorsque la tâche nécessite un exercice mental important (S. Lanfranchi et al. 2010; Silvia Lanfranchi, Jerman, et Vianello 2009). La composante verbale ne peut pas être évaluée chez les rats. Cependant, un déficit de mémoire de travail est observé chez les mâles Dup(Rno11-20) dans le test du labyrinthe en Y. Par ailleurs, un déficit de mémoire épisodique est présent chez les personnes atteintes du SD (Carlesimo, Marotta, et Vicari 1997; Vicari, Bellucci, et Carlesimo 2000). Il n'est pas possible d'évaluer la mémoire épisodique à proprement parlé chez les rongeurs, cette dernière se basant sur un rappel conscient des informations et sur leur verbalisation. Cependant, cette mémoire comporte une composante spatiale. Ainsi, la mémoire spatiale évaluée en piscine de Morris est considérée comme modélisant une mémoire de type épisodique (*episodic-like*). Chez les rats Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20), un déficit d'apprentissage spatial est observé. De plus, bien qu'un déficit de mémoire spatiale ne soit relevé que chez les femelles Dup(Rno11-20) lors du test de rappel, les autres rats porteurs de la duplication de la région Rno11 présentent une moins bonne précision de leur mémoire. Un déficit de flexibilité cognitive est également observé chez les adolescents et adultes atteints du SD (S. Lanfranchi et al. 2010; Rowe, Lavender, et Turk 2006). Ce déficit n'est pas retrouvé dans nos modèles, cet aspect du comportement ayant été évalué lors du reversal en piscine. Cependant, les rats Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20) présentant dès le départ un déficit d'apprentissage, il est difficile de mettre en évidence un déficit de flexibilité dans ce test. Il pourrait donc être nécessaire de mettre en œuvre d'autres tests permettant d'évaluer la flexibilité afin de confirmer qu'aucun déficit n'est présent dans nos modèles. Nous pouvons conclure que les modèles comportant la duplication de la région Rno11 homologue au Hsa21 récapitulent, au moins en partie, les phénotypes observés chez les personnes atteintes du SD. Cela en fait donc un bon modèle de la pathologie et renforce l'importance du rôle joué par cette région dans le développement des déficits cognitifs observés dans le SD.

## 2- Etude des modèles de rat du SD avec l'APP<sup>H</sup>

L'introduction de l'APP<sup>H</sup> dans nos modèles de rat du SD avait pour but d'induire la MA chez ces derniers afin d'en étudier les mécanismes dans le cadre du SD. Nous sommes encore au début de la caractérisation de ces modèles. Pour l'heure, seule l'étude comportementale à un stade jeune est terminée. Nous avons ainsi reproduit les mêmes tests comportementaux que pour les modèles SD sans l'APP<sup>H</sup> et au même âge, soit vers 6-7 semaines. Le but est de mettre en évidence l'effet de la présence de l'APP<sup>H</sup>.

Comme chez les modèles non humanisés à l'âge de 9 semaines, une réduction de la masse corporelle est observée chez les mâles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> (16,6%) et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> (12,5%), bien que chez ces derniers, la significativité ne soit pas atteinte. Par ailleurs, une réduction de la masse corporelle est également observée chez les femelles Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> (9,8%), alors qu'aucune différence n'a été mise en évidence chez les femelles Dup(Rno11-20). De plus, dans le test de l'activité circadienne, les femelles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> sont hypoactives lors de la phase nocturne, comme c'était le cas chez leurs homologues avec l'APP non humanisée. De même, aucun déficit n'est observé dans le test du NOR chez nos modèles humanisés. En effet, seules les femelles Dup(Rno20)-APP<sup>H2</sup> présentent un déficit dans ce test, mais cela serait plutôt lié à un petit effectif qu'à un réel déficit. Cependant, certains résultats diffèrent des observations faites chez les modèles non humanisés. Ainsi, le déficit de mémoire de travail mis en évidence chez les mâles Dup(Rno11-20) n'est pas retrouvé. De la même façon, aucune différence n'est observée chez les rats Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>, mâles et femelles, pour le temps passé à la périphérie et la distance parcourue dans le test du champ ouvert. L'origine de ces divergences n'est pas connue. Nous travaillons sur un fond non-consanguin et de nombreuses générations de croisements ont été nécessaires pour obtenir ces modèles. Nous pourrions alors supposer que le brassage génétique ayant eu lieu au cours de ces multiples croisements pourrait avoir induit la disparition de ces phénotypes qui n'étaient finalement peut-être pas si robustes.

Par ailleurs, la présence de l'APP<sup>H</sup> induit l'apparition de nouveaux phénotypes. Les femelles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup> présentent une hyperactivité dans le labyrinthe en Y. Cette dernière est retrouvée pour les femelles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> dans le test du champ ouvert. De façon très intéressante, un déficit de mémoire de travail et de mémoire spatiale à court terme est mis en évidence chez les femelles Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>, déficits qui n'étaient pas visibles en l'absence d'APP<sup>H</sup>. Par ailleurs, dans le test de la piscine de Morris, comme chez les modèles sans l'APP<sup>H</sup>, un déficit d'apprentissage spatial est observé chez les mâles et les femelles Dup(Rno11)-APP<sup>H3</sup> et Dup(Rno11-20)-APP<sup>H3</sup>. Cependant, ce déficit semble plus



important ; en effet, on constate un déficit de mémoire spatiale lors du premier test de rappel qui n'était pas visible en l'absence d'APP<sup>H</sup>.

D'après ces résultats, nous pouvons donc dire que la présence de l'APP<sup>H</sup> a déjà un effet chez les modèles de rat du SD à un stade précoce. Par ailleurs, des études de vieillissement sont en cours afin d'étudier l'effet de l'APP<sup>H</sup> à un stade plus avancé (12-13 mois). La prise en compte du vieillissement est importante, la MA étant une maladie évolutive liée à l'âge. Par ailleurs, une analyse transcriptomique est prévue chez ces modèles. Les échantillons sont actuellement en cours de séquençage. Ces données seront comparées à celles obtenues pour les modèles de rats non-humanisés afin de mettre en évidence de potentielles altérations de voies de signalisation qui pourraient être spécifiques au développement de la MA. Enfin, des analyses histologiques sont également prévues avec, entre autres, un marquage des plaques amyloïdes.

Par ailleurs, chez le modèle de souris Ts65Dn, différents phénotypes associés à la MA ont été observés. Ce modèle est porteur d'un mini-chromosome comportant la région du Mmu16 entre les gènes *App* et *Zbtb21* et la région centromérique du Mmu17. Il possède donc 3 copies du gène *App*. Ainsi, une neurodégénérescence des neurones cholinergiques du cerveau antérieur basal a été mise en évidence (Holtzman et al. 1996; Granholm, Sanders, et Crnic 2000; Salehi et al. 2006). Une atteinte de ces neurones est également observée dans la MA et le SD (Arendt et al. 2015; D. M. A. Mann et al. 1985). De plus, cette neurodégénérescence est progressive. En effet, elle est observée chez les souris Ts65Dn âgées de 6 mois, alors qu'elle n'est pas visible à l'âge de 4 mois. De la même façon, une perte neuronale est constatée dans le locus coeruleus chez ces souris (Lockrow et al. 2011), comme c'est le cas chez les personnes atteintes du SD avec une MA (D. M. A. Mann et al. 1987). Ces souris présentent également une microgliose et une hypertrophie des astrocytes dans l'hippocampe, deux signes clairs de neuroinflammation (Holtzman et al. 1996; Lockrow et al. 2011). Enfin, une hyperphosphorylation de la protéine Tau est constatée, cette dernière étant caractéristique de la MA (F. Liu et al. 2008). Par conséquent, il serait intéressant de vérifier si de telles observations sont retrouvées dans nos modèles de rat du SD, tout en étudiant l'impact que pourrait avoir l'humanisation de l'APP sur ces phénotypes.

---

# REFERENCES

---



- « 2020 Alzheimer's Disease Facts and Figures ». 2020. *Alzheimer's & Dementia* 16 (3): 391-460. <https://doi.org/10.1002/alz.12068>.
- Allinquant, B., P. Hantraye, P. Maillieux, K. Moya, C. Bouillot, et A. Prochiantz. 1995. « Downregulation of Amyloid Precursor Protein Inhibits Neurite Outgrowth in Vitro ». *The Journal of Cell Biology* 128 (5): 919-27. <https://doi.org/10.1083/jcb.128.5.919>.
- Altuna, Miren, Sandra Giménez, et Juan Fortea. 2021. « Epilepsy in Down Syndrome: A Highly Prevalent Comorbidity ». *Journal of Clinical Medicine* 10 (13): 2776. <https://doi.org/10.3390/jcm10132776>.
- Andrade-Moraes, C. H., A. V. Oliveira-Pinto, E. Castro-Fonseca, C. G. da Silva, D. M. Guimaraes, D. Szczupak, D. R. Parente-Bruno, et al. 2013. « Cell Number Changes in Alzheimer's Disease Relate to Dementia, Not to Plaques and Tangles ». *Brain* 136 (12): 3738-52. <https://doi.org/10.1093/brain/awt273>.
- Andrew, Robert J., Katherine A.B. Kellett, Gopal Thinakaran, et Nigel M. Hooper. 2016. « A Greek Tragedy: The Growing Complexity of Alzheimer Amyloid Precursor Protein Proteolysis ». *Journal of Biological Chemistry* 291 (37): 19235-44. <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.746032>.
- Annus, Tiina, Liam R. Wilson, Young T. Hong, Julio Acosta-Cabronero, Tim D. Fryer, Arturo Cardenas-Blanco, Robert Smith, et al. 2016. « The Pattern of Amyloid Accumulation in the Brains of Adults with Down Syndrome ». *Alzheimer's & Dementia* 12 (5): 538-45. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2015.07.490>.
- Antonarakis, Stylianos E., Brian G. Skotko, Michael S. Rafii, Andre Strydom, Sarah E. Pape, Diana W. Bianchi, Stephanie L. Sherman, et Roger H. Reeves. 2020. « Down Syndrome ». *Nature Reviews Disease Primers* 6 (1): 9. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0143-7>.
- Aoki, Sayaka, Yuko Yamauchi, et Keiji Hashimoto. 2018. « Developmental Trend of Children with Down's Syndrome – How Do Sex and Neonatal Conditions Influence Their Developmental Patterns? ». *Brain and Development* 40 (3): 181-87. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2017.10.001>.
- Arendt, Thomas, Martina K Brückner, Markus Morawski, Carsten Jäger, et Hermann-Josef Gertz. 2015. « Early Neurone Loss in Alzheimer's Disease: Cortical or Subcortical? ». *Acta Neuropathologica Communications* 3 (1): 10. <https://doi.org/10.1186/s40478-015-0187-1>.
- Asai, Masashi, Chinatsu Hattori, Beáta Szabó, Noboru Sasagawa, Kei Maruyama, Sei-ichi Tanuma, et Shoichi Ishiura. 2003. « Putative Function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP - Secretase ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301 (1): 231-35. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02999-6](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02999-6).
- Austeng, Marit Erna, Harriet Akre, Britt Øverland, Michael Abdelnoor, Eva-Signe Falkenberg, et Kari Jorunn Kværner. 2013. « Otitis Media with Effusion in Children with in Down Syndrome ». *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 77 (8): 1329-32. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2013.05.027>.
- Aylward, Elizabeth H, Nancy A Honeycutt, Patrick E Barta, et Matthew Jerram. 1999. « MRI Volumes of the Hippocampus and Amygdala in Adults With Down's Syndrome With and Without Dementia ». *Am J Psychiatry*, 5.
- Ball, Sarah L., Anthony J. Holland, Johnny Hon, Felicia A. Huppert, Peter Treppner, et Peter C. Watson. 2006. « Personality and Behaviour Changes Mark the Early Stages of Alzheimer's Disease in Adults with Down's Syndrome: Findings from a Prospective Population-Based Study ». *International Journal of Geriatric Psychiatry* 21 (7): 661-73. <https://doi.org/10.1002/gps.1545>.
- Bayen, Eleonore, Katherine L. Possin, Yingjia Chen, Laurent Cleret de Langavant, et Kristine Yaffe. 2018. « Prevalence of Aging, Dementia, and Multimorbidity in Older Adults With Down Syndrome ». *JAMA Neurology* 75 (11): 1399. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.2210>.
- Bergstrom, S., H. Carr, G. Petersson, O. Stephansson, A.-K. E. Bonamy, A. Dahlstrom, C. P. Halvorsen, et S. Johansson. 2016. « Trends in Congenital Heart Defects in Infants With Down Syndrome ». *PEDIATRICS* 138 (1): e20160123-e20160123. <https://doi.org/10.1542/peds.2016-0123>.

- Bhattacharyya, R., C. Barren, et D. M. Kovacs. 2013. « Palmitoylation of Amyloid Precursor Protein Regulates Amyloidogenic Processing in Lipid Rafts ». *Journal of Neuroscience* 33 (27): 11169-83. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4704-12.2013>.
- Birling, Marie-Christine, Laurence Schaeffer, Philippe André, Loic Lindner, Damien Maréchal, Abdel Ayadi, Tania Sorg, Guillaume Pavlovic, et Yann Héroult. 2017. « Efficient and Rapid Generation of Large Genomic Variants in Rats and Mice Using CRISMERE ». *Scientific Reports* 7 (1): 43331. <https://doi.org/10.1038/srep43331>.
- Bittles, A H, et E J Glasson. 2007. « Clinical, Social, and Ethical Implications of Changing Life Expectancy in Down Syndrome ». *Developmental Medicine & Child Neurology* 46 (4): 282-86. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.2004.tb00483.x>.
- Bittner, T., M. Fuhrmann, S. Burgold, C. K. E. Jung, C. Volbracht, H. Steiner, G. Mitteregger, H. A. Kretschmar, C. Haass, et J. Herms. 2009. « -Secretase Inhibition Reduces Spine Density In Vivo via an Amyloid Precursor Protein-Dependent Pathway ». *Journal of Neuroscience* 29 (33): 10405-9. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2288-09.2009>.
- Block, Aaron, Md. Mahiuddin Ahmed, A. Ranjitha Dhanasekaran, Suhong Tong, et Kathleen J. Gardiner. 2015. « Sex Differences in Protein Expression in the Mouse Brain and Their Perturbations in a Model of Down Syndrome ». *Biology of Sex Differences* 6 (1): 24. <https://doi.org/10.1186/s13293-015-0043-9>.
- Blok, J. B., J. G. M. Scheirs, et N. S. Thijm. 2017. « Personality and Behavioural Changes Do Not Precede Memory Problems as Possible Signs of Dementia in Ageing People with Down Syndrome: Signs of Dementia in Down Syndrome ». *International Journal of Geriatric Psychiatry* 32 (12): 1257-63. <https://doi.org/10.1002/gps.4606>.
- Bolduc, David M., Daniel R. Montagna, Yongli Gu, Dennis J. Selkoe, et Michael S. Wolfe. 2016. « Nicastrin Functions to Sterically Hinder  $\gamma$ -Secretase-Substrate Interactions Driven by Substrate Transmembrane Domain ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (5): E509-18. <https://doi.org/10.1073/pnas.1512952113>.
- Borella, Erika, Barbara Carretti, et Silvia Lanfranchi. 2013. « Inhibitory Mechanisms in Down Syndrome: Is There a Specific or General Deficit? ». *Research in Developmental Disabilities* 34 (1): 65-71. <https://doi.org/10.1016/j.ridd.2012.07.017>.
- Braak, Heiko, Irina Alafuzoff, Thomas Arzberger, Hans Kretschmar, et Kelly Del Tredici. 2006. « Staging of Alzheimer Disease-Associated Neurofibrillary Pathology Using Paraffin Sections and Immunocytochemistry ». *Acta Neuropathologica* 112 (4): 389-404. <https://doi.org/10.1007/s00401-006-0127-z>.
- Braak, Heiko, Dietmar R Thal, Estifanos Ghebremedhin, et Kelly Del Tredici. 2011. « Stages of the Pathologic Process in Alzheimer Disease: Age Categories From 1 to 100 Years ». *J Neuropathol Exp Neurol* 70 (11): 10.
- Buckley, Sue, et Bonamy Oliver. 1994. « The Language Development of Children with Down Syndrome: First Words to Two-Word Phrases ». *Down Syndrome Research and Practice* 2 (2): 71-75. <https://doi.org/10.3104/reports.33>.
- Bull, Marilyn J. 2020. « Down Syndrome ». *The New England Journal of Medicine* 382 (24): 2344-52. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1706537>.
- Buxbaum, Joseph D., Kang-Nian Liu, Yuxia Luo, Jennifer L. Slack, Kim L. Stocking, Jacques J. Peschon, Richard S. Johnson, Beverly J. Castner, Douglas Pat Cerretti, et Roy A. Black. 1998. « Evidence That Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Converting Enzyme Is Involved in Regulated  $\alpha$ -Secretase Cleavage of the Alzheimer Amyloid Protein Precursor ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (43): 27765-67. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.43.27765>.
- Caillé, Isabelle, Bernadette Allinquant, Edmond Dupont, Colette Bouillot, Andreas Langer, Ulrike Müller, et Alain Prochiantz. 2004. « Soluble Form of Amyloid Precursor Protein Regulates Proliferation of

- Progenitors in the Adult Subventricular Zone ». *Development* 131 (9): 2173-81.  
<https://doi.org/10.1242/dev.01103>.
- Carlesimo, G. A., L. Marotta, et S. Vicari. 1997. « Long-Term Memory in Mental Retardation: Evidence for a Specific Impairment in Subjects with Down's Syndrome ». *Neuropsychologia* 35 (1): 71-79.  
[https://doi.org/10.1016/s0028-3932\(96\)00055-3](https://doi.org/10.1016/s0028-3932(96)00055-3).
- Cataldo, Anne M., Suzana Petanceska, Nicole B. Terio, Corrinne M. Peterhoff, Robert Durham, Marc Mercken, Pankaj D. Mehta, Joseph Buxbaum, Vahram Haroutunian, et Ralph A. Nixon. 2004. « Abeta Localization in Abnormal Endosomes: Association with Earliest Abeta Elevations in AD and Down Syndrome ». *Neurobiology of Aging* 25 (10): 1263-72.  
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.02.027>.
- Cavalieri, B. 1635. *Geometrica Indivisibilibus Continuorum*. Bononi: Typis Clementis Feronij. Reprinted as *Geometrica degli Indivisibili*. Torino: Unione Tipografico-Editrice Torinese.
- Chasseigneaux, Stéphanie, Levent Dinc, Christiane Rose, Claude Chabret, Fanny Couplier, Piotr Topilko, Gweltas Mauger, et Bernadette Allinquant. 2011. « Secreted Amyloid Precursor Protein  $\beta$  and Secreted Amyloid Precursor Protein  $\alpha$  Induce Axon Outgrowth in Vitro through Egr1 Signaling Pathway ». *PLoS One* 6 (1): e16301. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016301>.
- Chen, Xu-Qiao, et William C. Mobley. 2019. « Alzheimer Disease Pathogenesis: Insights From Molecular and Cellular Biology Studies of Oligomeric A $\beta$  and Tau Species ». *Frontiers in Neuroscience* 13 (juin): 659. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00659>.
- Chen, Xu-Qiao, Zhuo Xing, Quang-Di Chen, Richard J. Salvi, Xuming Zhang, Benjamin Tycko, William C. Mobley, et Y. Eugene Yu. 2021. « Mechanistic Analysis of Age-Related Clinical Manifestations in Down Syndrome ». *Frontiers in Aging Neuroscience* 13: 700280.  
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.700280>.
- Cholvin, Thibault, Michaël Loureiro, Raphaëlle Cassel, Brigitte Cosquer, Karine Geiger, David De Sa Nogueira, Hélène Raingard, et al. 2013. « The Ventral Midline Thalamus Contributes to Strategy Shifting in a Memory Task Requiring Both Prefrontal Cortical and Hippocampal Functions ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33 (20): 8772-83.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0771-13.2013>.
- Choong, Xun Yu, Justin L. Tosh, Laura J. Pulford, et Elizabeth M. C. Fisher. 2015. « Dissecting Alzheimer Disease in Down Syndrome Using Mouse Models ». *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 9 (octobre). <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00268>.
- Chyung, Jay H., Daniel M. Raper, et Dennis J. Selkoe. 2005. «  $\gamma$ -Secretase Exists on the Plasma Membrane as an Intact Complex That Accepts Substrates and Effects Intramembrane Cleavage\* ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (6): 4383-92. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409272200>.
- Coppus, A, H Evenhuis, et C van Duijn. 2006. « Dementia and Mortality in Persons with Down's Syndrome ». *Journal of Intellectual Disability Research*, 12.
- Corder, E., A. Saunders, W. Strittmatter, D. Schmechel, P. Gaskell, G. Small, A. Roses, J. Haines, et M. Pericak-Vance. 1993. « Gene Dose of Apolipoprotein E Type 4 Allele and the Risk of Alzheimer's Disease in Late Onset Families ». *Science* 261 (5123): 921-23.  
<https://doi.org/10.1126/science.8346443>.
- Daigle, I., et C. Li. 1993. « Apl-1, a Caenorhabditis Elegans Gene Encoding a Protein Related to the Human Beta-Amyloid Protein Precursor. ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 (24): 12045-49. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.24.12045>.
- Davidson, Yvonne S., Andrew Robinson, Vee P. Prasher, et David M. A. Mann. 2018. « The Age of Onset and Evolution of Braak Tangle Stage and Thal Amyloid Pathology of Alzheimer's Disease in Individuals with Down Syndrome ». *Acta Neuropathologica Communications* 6 (1): 56.  
<https://doi.org/10.1186/s40478-018-0559-4>.

- Davisson, M. T., C. Schmidt, et E. C. Akesson. 1990. « Segmental Trisomy of Murine Chromosome 16: A New Model System for Studying Down Syndrome ». *Progress in Clinical and Biological Research* 360: 263-80.
- Dawson, G R, G R Seabrook, H Zheng, D W Smith, S Graham, G O'Dowd, B J Bowery, S Boyce, M E Trumbauer, et H Y Chen. 1999. « AGE-RELATED COGNITIVE DEFICITS, IMPAIRED LONG-TERM POTENTIATION AND REDUCTION IN SYNAPTIC MARKER DENSITY IN MICE LACKING THE - AMYLOID PRECURSOR PROTEIN », 13.
- De Graaf, G., G. Van Hove, et M. Haveman. 2014. « A Quantitative Assessment of Educational Integration of Students with Down Syndrome in the Netherlands ». *Journal of Intellectual Disability Research: JIDR* 58 (7): 625-36. <https://doi.org/10.1111/jir.12060>.
- De Strooper, B., M. Simons, G. Multhaup, F. Van Leuven, K. Beyreuther, et C. G. Dotti. 1995. « Production of Intracellular Amyloid-Containing Fragments in Hippocampal Neurons Expressing Human Amyloid Precursor Protein and Protection against Amyloidogenesis by Subtle Amino Acid Substitutions in the Rodent Sequence ». *The EMBO Journal* 14 (20): 4932-38.
- DeFreitas, M. F., C. K. Yoshida, W. A. Frazier, D. L. Mendrick, R. M. Kypta, et L. F. Reichardt. 1995. « Identification of Integrin Alpha 3 Beta 1 as a Neuronal Thrombospondin Receptor Mediating Neurite Outgrowth ». *Neuron* 15 (2): 333-43. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90038-1](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90038-1).
- DeKosky, Steven T., et Stephen W. Scheff. 1990. « Synapse Loss in Frontal Cortex Biopsies in Alzheimer's Disease: Correlation with Cognitive Severity ». *Annals of Neurology* 27 (5): 457-64. <https://doi.org/10.1002/ana.410270502>.
- Del Turco, Domenico, Mandy H. Paul, Jessica Schlaudraff, Meike Hick, Kristina Endres, Ulrike C. Müller, et Thomas Deller. 2016. « Region-Specific Differences in Amyloid Precursor Protein Expression in the Mouse Hippocampus ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 9 (novembre). <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00134>.
- Delabar, J. M., D. Theophile, Z. Rahmani, Z. Chettouh, J. L. Blouin, M. Prieur, B. Noel, et P. M. Sinet. 1993. « Molecular Mapping of Twenty-Four Features of Down Syndrome on Chromosome 21 ». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 1 (2): 114-24. <https://doi.org/10.1159/000472398>.
- Dembélé, Doulaye, et Philippe Kastner. 2014. « Fold Change Rank Ordering Statistics: A New Method for Detecting Differentially Expressed Genes ». *BMC Bioinformatics* 15 (janvier): 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-14>.
- Devenny, D. A., E. J. Zimmerli, P. Kittler, et S. J. Krinsky-McHale. 2002. « Cued Recall in Early-Stage Dementia in Adults with Down's Syndrome ». *Journal of Intellectual Disability Research* 46 (6): 472-83. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2788.2002.00417.x>.
- Doran, Eric, David Keator, Elizabeth Head, Michael J. Phelan, Ron Kim, Minodora Totoiu, Jorge R. Barrio, Gary W. Small, Steven G. Potkin, et Ira T. Lott. 2017. « Down Syndrome, Partial Trisomy 21, and Absence of Alzheimer's Disease: The Role of APP ». Édité par Juan Fortea. *Journal of Alzheimer's Disease* 56 (2): 459-70. <https://doi.org/10.3233/JAD-160836>.
- Dubois, Bruno, Howard H Feldman, Claudia Jacova, Jeffrey L Cummings, Steven T DeKosky, Pascale Barberger-Gateau, André Delacourte, et al. 2010. « Revising the Definition of Alzheimer's Disease: A New Lexicon ». *The Lancet Neurology* 9 (11): 1118-27. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70223-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70223-4).
- Duchon, Arnaud, Maria Del Mar Muniz Moreno, Sandra Martin Lorenzo, Marcia Priscilla Silva de Souza, Claire Chevalier, Valérie Nalesso, Hamid Meziane, et al. 2021. « Multi-Influential Genetic Interactions Alter Behaviour and Cognition through Six Main Biological Cascades in Down Syndrome Mouse Models ». *Human Molecular Genetics* 30 (9): 771-88. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddab012>.

- Dulabon, L., E. C. Olson, M. G. Taglienti, S. Eisenhuth, B. McGrath, C. A. Walsh, J. A. Kreidberg, et E. S. Anton. 2000. « Reelin Binds Alpha3beta1 Integrin and Inhibits Neuronal Migration ». *Neuron* 27 (1): 33-44. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)00007-6](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)00007-6).
- Edbauer, Dieter, Edith Winkler, Joerg T. Regula, Brigitte Pesold, Harald Steiner, et Christian Haass. 2003. « Reconstitution of  $\gamma$ -Secretase Activity ». *Nature Cell Biology* 5 (5): 486-88. <https://doi.org/10.1038/ncb960>.
- Ennaceur, A., et J. Delacour. 1988. « A New One-Trial Test for Neurobiological Studies of Memory in Rats. 1: Behavioral Data ». *Behavioural Brain Research* 31 (1): 47-59. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(88\)90157-X](https://doi.org/10.1016/0166-4328(88)90157-X).
- Ennaceur, A., Nick Neave, et John P. Aggleton. 1997. « Spontaneous Object Recognition and Object Location Memory in Rats: The Effects of Lesions in the Cingulate Cortices, the Medial Prefrontal Cortex, the Cingulum Bundle and the Fornix ». *Experimental Brain Research* 113 (3): 509-19. <https://doi.org/10.1007/PL00005603>.
- Ennaceur, Abdelkader, et Kamel Meliani. 1992. « A New One-Trial Test for Neurobiological Studies of Memory in Rats. III. Spatial vs. Non-Spatial Working Memory ». *Behavioural Brain Research* 51 (1): 83-92. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(05\)80315-8](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(05)80315-8).
- Farrer, Lindsay A. 1997. « Effects of Age, Sex, and Ethnicity on the Association Between Apolipoprotein E Genotype and Alzheimer Disease: A Meta-Analysis ». *JAMA* 278 (16): 1349. <https://doi.org/10.1001/jama.1997.03550160069041>.
- Faulks, D., V. Collado, M.-N. Mazille, J.-L. Veyrone, et M. Hennequin. 2008. « Masticatory Dysfunction in Persons with Down's Syndrome. Part 1: Aetiology and Incidence ». *Journal of Oral Rehabilitation* 35 (11): 854-62. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.2008.01877.x>.
- Ferreira, A., A. Caceres, et K. S. Kosik. 1993. « Intraneuronal Compartments of the Amyloid Precursor Protein ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 13 (7): 3112-23.
- Firth, Nicholas C., Silvia Primativo, Razvan-Valentin Marinescu, Timothy J. Shakespeare, Aida Suarez-Gonzalez, Manja Lehmann, Amelia Carton, et al. 2019. « Longitudinal Neuroanatomical and Cognitive Progression of Posterior Cortical Atrophy ». *Brain: A Journal of Neurology* 142 (7): 2082-95. <https://doi.org/10.1093/brain/awz136>.
- Foley, Charlene, et Orla G Killeen. 2019. « Musculoskeletal Anomalies in Children with Down Syndrome: An Observational Study ». *Archives of Disease in Childhood* 104 (5): 482-87. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2018-315751>.
- Fong, Angie Hon Chi, Jennifer Shum, Alex L K Ng, Kenneth K W Li, Sarah McGhee, et David Wong. 2013. « Prevalence of Ocular Abnormalities in Adults with Down Syndrome in Hong Kong ». *British Journal of Ophthalmology* 97 (4): 423-28. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2012-302327>.
- Forcet, Christelle, Elke Stein, Laurent Pays, Véronique Corset, Fabien Llambi, Marc Tessier-Lavigne, et Patrick Mehlen. 2002. « Netrin-1-Mediated Axon Outgrowth Requires Deleted in Colorectal Cancer-Dependent MAPK Activation ». *Nature* 417 (6887): 443-47. <https://doi.org/10.1038/nature748>.
- Freude, Kristine K., Mahmud Penjwini, Joy L. Davis, Frank M. LaFerla, et Mathew Blurton-Jones. 2011. « Soluble Amyloid Precursor Protein Induces Rapid Neural Differentiation of Human Embryonic Stem Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 286 (27): 24264-74. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.227421>.
- Geggel, Robert L., Jane E. O'Brien, et Murray Feingold. 1993. « Development of Valve Dysfunction in Adolescents and Young Adults with down Syndrome and No Known Congenital Heart Disease ». *The Journal of Pediatrics* 122 (5): 821-23. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(06\)80036-3](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(06)80036-3).



- Gholipour, Taha, Sara Mitchell, Rani A. Sarkis, et Zeina Chemali. 2017. « The Clinical and Neurobehavioral Course of Down Syndrome and Dementia with or without New-Onset Epilepsy ». *Epilepsy & Behavior* 68 (mars): 11-16. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.12.014>.
- Giorgi, Filippo Sean, Luigi Francesco Saccaro, Carla Letizia Busceti, Francesca Biagioni, et Francesco Fornai. 2020. « Epilepsy and Alzheimer's Disease: Potential Mechanisms for an Association ». *Brain Research Bulletin* 160 (juillet): 107-20. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.04.009>.
- Giri, Mohan, Man Zhang, et Yang Lü. 2016. « Genes Associated with Alzheimer's Disease: An Overview and Current Status ». *Clinical Interventions in Aging* 11: 665-81. <https://doi.org/10.2147/CIA.S105769>.
- Goldgaber, D., M. I. Lerman, O. W. McBride, U. Saffiotti, et D. C. Gajdusek. 1987. « Characterization and Chromosomal Localization of a cDNA Encoding Brain Amyloid of Alzheimer's Disease ». *Science (New York, N.Y.)* 235 (4791): 877-80. <https://doi.org/10.1126/science.3810169>.
- Gomez-Isla, T., J. L. Price, D. W. McKeel, J. C. Morris, J. H. Growdon, et B. T. Hyman. 1996. « Profound Loss of Layer II Entorhinal Cortex Neurons Occurs in Very Mild Alzheimer's Disease ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 16 (14): 4491-4500.
- González-Domínguez, Raúl, Tamara García-Barrera, Javier Vitorica, et José Luis Gómez-Ariza. 2015. « High Throughput Multiorgan Metabolomics in the APP/PS1 Mouse Model of Alzheimer's Disease: General ». *ELECTROPHORESIS* 36 (18): 2237-49. <https://doi.org/10.1002/elps.201400544>.
- Goodliffe, J. W., J. L. Olmos-Serrano, N. M. Aziz, J. L. A. Pennings, F. Guedj, D. W. Bianchi, et T. F. Haydar. 2016. « Absence of Prenatal Forebrain Defects in the Dp(16)1Yey/+ Mouse Model of Down Syndrome ». *Journal of Neuroscience* 36 (10): 2926-44. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2513-15.2016>.
- Granhölm, Ann-Charlotte E., Linda A. Sanders, et Linda S. Crnic. 2000. « Loss of Cholinergic Phenotype in Basal Forebrain Coincides with Cognitive Decline in a Mouse Model of Down's Syndrome ». *Experimental Neurology* 161 (2): 647-63. <https://doi.org/10.1006/exnr.1999.7289>.
- Grieco, Julie, Margaret Pulsifer, Karen Seligsohn, Brian Skotko, et Alison Schwartz. 2015. « Down Syndrome: Cognitive and Behavioral Functioning across the Lifespan ». *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* 169 (2): 135-49. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31439>.
- Guidi, Sandra, Paola Bonasoni, Claudio Ceccarelli, Donatella Santini, Fabio Gualtieri, Elisabetta Ciani, et Renata Bartesaghi. 2008. « Neurogenesis Impairment and Increased Cell Death Reduce Total Neuron Number in the Hippocampal Region of Fetuses with Down Syndrome ». *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 18 (2): 180-97. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00113.x>.
- Guo, Qinxi, Hongmei Li, Samson S. K. Gaddam, Nicholas J. Justice, Claudia S. Robertson, et Hui Zheng. 2012. « Amyloid Precursor Protein Revisited: Neuron-Specific Expression and Highly Stable Nature of Soluble Derivatives ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (4): 2437-45. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.315051>.
- Gyure, Kimberly A, Robert Durham, Walter F Stewart, John E Smialek, et Juan C Troncoso. 2001. « Intraneuronal A<sup>β</sup>-Amyloid Precedes Development of Amyloid Plaques in Down Syndrome ». *Arch Pathol Lab Med* 125: 4.
- Haass, C., C. Kaether, G. Thinakaran, et S. Sisodia. 2012. « Trafficking and Proteolytic Processing of APP ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (5): a006270-a006270. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006270>.
- Handen, Benjamin L., Ann D. Cohen, Umopathy Channamalappa, Peter Bulova, Sheila A. Cannon, William I. Cohen, Chester A. Mathis, Julie C. Price, et William E. Klunk. 2012. « Imaging Brain Amyloid in

- Nondemented Young Adults with Down Syndrome Using Pittsburgh Compound B ». *Alzheimer's & Dementia* 8 (6): 496-501. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.09.229>.
- Harati, Hayat, Alexandra Barbelivien, Karine Herbeaux, Marc-Antoine Muller, Michel Engeln, Christian Kelche, Jean-Christophe Cassel, et Monique Majchrzak. 2013. « Lifelong Environmental Enrichment in Rats: Impact on Emotional Behavior, Spatial Memory Vividness, and Cholinergic Neurons over the Lifespan ». *Age (Dordrecht, Netherlands)* 35 (4): 1027-43. <https://doi.org/10.1007/s11357-012-9424-8>.
- Harati, Hayat, Monique Majchrzak, Brigitte Cosquer, Rodrigue Galani, Christian Kelche, Jean-Christophe Cassel, et Alexandra Barbelivien. 2011. « Attention and Memory in Aged Rats: Impact of Lifelong Environmental Enrichment ». *Neurobiology of Aging* 32 (4): 718-36. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.03.012>.
- Hasle, H. 2001. « Pattern of Malignant Disorders in Individuals with Down's Syndrome ». *The Lancet. Oncology* 2 (7): 429-36. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(00\)00435-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(00)00435-6).
- Hasle, Henrik, Jan M. Friedman, Jørgen H. Olsen, et Sonja A. Rasmussen. 2016. « Low Risk of Solid Tumors in Persons with Down Syndrome ». *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 18 (11): 1151-57. <https://doi.org/10.1038/gim.2016.23>.
- Hattori, M., A. Fujiyama, T. D. Taylor, H. Watanabe, T. Yada, H. S. Park, A. Toyoda, et al. 2000. « The DNA Sequence of Human Chromosome 21 ». *Nature* 405 (6784): 311-19. <https://doi.org/10.1038/35012518>.
- Heber, Sabine, Jochen Herms, Vladan Gajic, Johannes Hainfellner, Adriano Aguzzi, Thomas Rüdicke, Hans Kretschmar, et al. 2000. « Mice with Combined Gene Knock-Outs Reveal Essential and Partially Redundant Functions of Amyloid Precursor Protein Family Members ». *The Journal of Neuroscience* 20 (21): 7951-63. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-21-07951.2000>.
- Herault, Yann, Jean M. Delabar, Elizabeth M. C. Fisher, Victor L. J. Tybulewicz, Eugene Yu, et Veronique Brault. 2017. « Rodent Models in Down Syndrome Research: Impact and Future Opportunities ». *Disease Models & Mechanisms* 10 (10): 1165-86. <https://doi.org/10.1242/dmm.029728>.
- Hersi, Mona, Brittany Irvine, Pallavi Gupta, James Gomes, Nicholas Birkett, et Daniel Krewski. 2017. « Risk Factors Associated with the Onset and Progression of Alzheimer's Disease: A Systematic Review of the Evidence ». *NeuroToxicology* 61 (juillet): 143-87. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.03.006>.
- Hoe, Hyang-Sook, Kea Joo Lee, Rosalind S. E. Carney, Jiyeon Lee, Alexandra Markova, Ji-Yun Lee, Brian W. Howell, et al. 2009. « Interaction of Reelin with Amyloid Precursor Protein Promotes Neurite Outgrowth ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (23): 7459-73. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4872-08.2009>.
- Hof, Patrick R. 1995. « Age-Related Distribution of Neuropathologic Changes in the Cerebral Cortex of Patients With Down's Syndrome: Quantitative Regional Analysis and Comparison With Alzheimer's Disease ». *Archives of Neurology* 52 (4): 379. <https://doi.org/10.1001/archneur.1995.00540280065020>.
- Hoffmire, Claire A., Caroline I. Magyar, Heidi V. Connolly, I. Diana Fernandez, et Edwin van Wijngaarden. 2014. « High Prevalence of Sleep Disorders and Associated Comorbidities in a Community Sample of Children with Down Syndrome ». *Journal of Clinical Sleep Medicine* 10 (04): 411-19. <https://doi.org/10.5664/jcsm.3618>.
- Holland, A. J., J. Hon, F. A. Huppert, et F. Stevens. 2001. « Incidence And Course Of Dementia In People With Down's Syndrome: Findings From A Population-Based Study: Incidence of Dementia in Down's Syndrome ». *Journal of Intellectual Disability Research* 44 (2): 138-46. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2788.2000.00263.x>.
- Holtzman, D. M., D. Santucci, J. Kilbridge, J. Chua-Couzens, D. J. Fontana, S. E. Daniels, R. M. Johnson, et al. 1996. « Developmental Abnormalities and Age-Related Neurodegeneration in a Mouse Model

- of Down Syndrome ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (23): 13333-38.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.23.13333>.
- Hooli, B. V., G. Mohapatra, M. Mattheisen, A. R. Parrado, J. T. Roehr, Y. Shen, J. F. Gusella, et al. 2012. « Role of Common and Rare APP DNA Sequence Variants in Alzheimer Disease ». *Neurology* 78 (16): 1250-57. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182515972>.
- Horgan, A. M., et P. F. Copenhagen. 1998. « G Protein-Mediated Inhibition of Neuronal Migration Requires Calcium Influx ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 18 (11): 4189-4200.
- Howard, Vyvyan, et Matt G. Reed. 2010. *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*. 2nd ed. Liverpool: QTP.
- Howell, Brian W., Richard Hawkes, Philippe Soriano, et Jonathan A. Cooper. 1997. « Neuronal Position in the Developing Brain Is Regulated by Mouse Disabled-1 ». *Nature* 389 (6652): 733-37.  
<https://doi.org/10.1038/39607>.
- Hu, Yanling, Amos C. Hung, Hao Cui, Edgar Dawkins, Marta Bolós, Lisa Foa, Kaylene M. Young, et David H. Small. 2013. « Role of Cystatin C in Amyloid Precursor Protein-Induced Proliferation of Neural Stem/Progenitor Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 288 (26): 18853-62.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.443671>.
- Hung, Albert Y, EDWARD H Koo, Christian Haass, et Dennis J Selkoe. 1992. « Increased Expression of  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein during Neuronal Differentiation Is Not Accompanied by Secretory Cleavage ». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 5.
- Itagaki, S, P McGeer, H Akiyama, S Zhu, et D Selkoe. 1989. « Relationship of Microglia and Astrocytes to Amyloid Deposits of Alzheimer Disease ». *Journal of Neuroimmunology* 24 (3): 173-82.  
[https://doi.org/10.1016/0165-5728\(89\)90115-X](https://doi.org/10.1016/0165-5728(89)90115-X).
- Iwatsubo, Takeshi, David M. A. Mann, Asano Odaka, Nobuhiro Suzuki, et Yasuo Ihara. 1995. « Amyloid  $\beta$  Protein (A $\beta$ ) Deposition: A $\beta$ 42(43) Precedes A $\beta$ 40 in down Syndrome ». *Annals of Neurology* 37 (3): 294-99. <https://doi.org/10.1002/ana.410370305>.
- Jedlicka, Peter, Mirka Owen, Matej Vnencak, Jakob-A. Tschäpe, Meike Hick, Ulrike C. Müller, et Thomas Deller. 2012. « Functional Consequences of the Lack of Amyloid Precursor Protein in the Mouse Dentate Gyrus in Vivo ». *Experimental Brain Research* 217 (3-4): 441-47.  
<https://doi.org/10.1007/s00221-011-2911-9>.
- Jernigan, T. L., U. Bellugi, E. Sowell, S. Doherty, et J. R. Hesselink. 1993. « Cerebral Morphologic Distinctions Between Williams and Down Syndromes ». *Archives of Neurology* 50 (2): 186-91.  
<https://doi.org/10.1001/archneur.1993.00540020062019>.
- Kamiya, Atsushi, Ken-ichiro Kubo, Toshifumi Tomoda, Manabu Takaki, Richard Youn, Yuji Ozeki, Naoya Sawamura, et al. 2005. « A Schizophrenia-Associated Mutation of DISC1 Perturbs Cerebral Cortex Development ». *Nature Cell Biology* 7 (12): 1167-78. <https://doi.org/10.1038/ncb1328>.
- Kanehisa, M., et S. Goto. 2000. « KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes ». *Nucleic Acids Research* 28 (1): 27-30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>.
- Kang, Jie, Hans-Georg Lemaire, Axel Unterbeck, J. Michael Salbaum, Colin L. Masters, Karl-Heinz Grzeschik, Gerd Multhaup, Konrad Beyreuther, et Benno Müller-Hill. 1987. « The Precursor of Alzheimer's Disease Amyloid A4 Protein Resembles a Cell-Surface Receptor ». *Nature* 325 (6106): 733-36. <https://doi.org/10.1038/325733a0>.
- Kang, Jie, et Benno Müller-Hill. 1990. « Differential Splicing of Alzheimer's Disease Amyloid A4 Precursor RNA in Rat Tissues: PreA4695 mRNA Is Predominantly Produced in Rat and Human Brain ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 166 (3): 1192-1200.  
[https://doi.org/10.1016/0006-291X\(90\)90992-V](https://doi.org/10.1016/0006-291X(90)90992-V).

- Kant, Rik van der, et Lawrence S. B. Goldstein. 2015. « Cellular Functions of the Amyloid Precursor Protein from Development to Dementia ». *Developmental Cell* 32 (4): 502-15. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.022>.
- Kennedy, A. M., J. Brown, et M. Rossor. 1994. « The Genetics of Alzheimer's Disease ». *Bailliere's Clinical Neurology* 3 (2): 217-40.
- Kinney, Jefferson W., Shane M. Bemiller, Andrew S. Murtishaw, Amanda M. Leisgang, Arnold M. Salazar, et Bruce T. Lamb. 2018. « Inflammation as a Central Mechanism in Alzheimer's Disease ». *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions* 4 (1): 575-90. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2018.06.014>.
- Kinoshita, Ayae, Hiroaki Fukumoto, Tejal Shah, Christa M. Whelan, Michael C. Irizarry, et Bradley T. Hyman. 2003. « Demonstration by FRET of BACE Interaction with the Amyloid Precursor Protein at the Cell Surface and in Early Endosomes ». *Journal of Cell Science* 116 (16): 3339-46. <https://doi.org/10.1242/jcs.00643>.
- Kirazov, Evgeni, Ludmil Kirazov, Volker Bigl, et Reinhard Schliebs. 2001. « Ontogenetic Changes in Protein Level of Amyloid Precursor Protein (APP) in Growth Cones and Synaptosomes from Rat Brain and Prenatal Expression Pattern of APP mRNA Isoforms in Developing Rat Embryo ». *International Journal of Developmental Neuroscience* 19 (3): 287-96. [https://doi.org/10.1016/S0736-5748\(01\)00012-0](https://doi.org/10.1016/S0736-5748(01)00012-0).
- Koch, C.S. von, H. Zheng, H. Chen, M. Trumbauer, G. Thinakaran, L.H.T. van der Ploeg, D.L. Price, et S.S. Sisodia. 1997. « Generation of APLP2 KO Mice and Early Postnatal Lethality in APLP2/APP Double KO Mice ». *Neurobiology of Aging* 18 (6): 661-69. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(97\)00151-6](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(97)00151-6).
- Koike, Hisashi, Shigeo Tomioka, Hiroyuki Sorimachi, Takaomi C Saido, Kei Maruyama, Akira Okuyama, Atsuko Fujisawa-Sehara, Shigeo Ohno, Koichi Suzuki, et Shoichi Ishiura. 1999. « Membrane-Anchored Metalloprotease MDC9 Has an  $\alpha$ -Secretase Activity Responsible for Processing the Amyloid Precursor Protein », 5.
- Koo, E. H., S. S. Sisodia, D. R. Archer, L. J. Martin, A. Weidemann, K. Beyreuther, P. Fischer, C. L. Masters, et D. L. Price. 1990. « Precursor of Amyloid Protein in Alzheimer Disease Undergoes Fast Anterograde Axonal Transport ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (4): 1561-65. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.4.1561>.
- Korbel, J. O., T. Tirosh-Wagner, A. E. Urban, X.-N. Chen, M. Kasowski, L. Dai, F. Grubert, et al. 2009. « The Genetic Architecture of Down Syndrome Phenotypes Revealed by High-Resolution Analysis of Human Segmental Trisomies ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (29): 12031-36. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813248106>.
- Korenberg, J. R., X. N. Chen, R. Schipper, Z. Sun, R. Gonsky, S. Gerwehr, N. Carpenter, C. Daumer, P. Dignan, et C. Disteche. 1994. « Down Syndrome Phenotypes: The Consequences of Chromosomal Imbalance. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (11): 4997-5001. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.11.4997>.
- Kraeuter, Ann-Katrin, et Paul C Guest. 2019. « The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice », 7.
- Krinsky-McHale, Sharon J., Darlynn A. Devenny, Hong Gu, Edmund C. Jenkins, Phyllis Kittler, Vundavalli V. Murty, Nicole Schupf, et al. 2008. « Successful Aging in a 70-Year-Old Man With Down Syndrome: A Case Study ». Édité par Steven J. Taylor. *Intellectual and Developmental Disabilities* 46 (3): 215-28. <https://doi.org/10.1352/2008.46:215-228>.
- Kuhn, Peer-Hendrik, Huanhuan Wang, Bastian Dislich, Alessio Colombo, Ulrike Zeitschel, Joachim W Ellwart, Elisabeth Kremmer, Steffen Roßner, et Stefan F Lichtenthaler. 2010. « ADAM10 Is the Physiologically Relevant, Constitutive  $\alpha$ -Secretase of the Amyloid Precursor Protein in Primary Neurons ». *The EMBO Journal* 29 (17): 3020-32. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.167>.

- Lammich, S., E. Kojro, R. Postina, S. Gilbert, R. Pfeiffer, M. Jasionowski, C. Haass, et F. Fahrenholz. 1999. « Constitutive and Regulated  $\gamma$ -Secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by a Disintegrin Metalloprotease ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (7): 3922-27. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3922>.
- Lanfranchi, S., O. Jerman, E. Dal Pont, A. Alberti, et R. Vianello. 2010. « Executive Function in Adolescents with Down Syndrome: Executive Function in Down Syndrome ». *Journal of Intellectual Disability Research* 54 (4): 308-19. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2788.2010.01262.x>.
- Lanfranchi, Silvia, Olga Jerman, et Renzo Vianello. 2009. « Working Memory and Cognitive Skills in Individuals with Down Syndrome ». *Child Neuropsychology* 15 (4): 397-416. <https://doi.org/10.1080/09297040902740652>.
- LaVoie, Matthew J., Patrick C. Fraering, Beth L. Ostaszewski, Wenjuan Ye, W. Taylor Kimberly, Michael S. Wolfe, et Dennis J. Selkoe. 2003. « Assembly of the  $\gamma$ -Secretase Complex Involves Early Formation of an Intermediate Subcomplex of Aph-1 and Nicastrin ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (39): 37213-22. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303941200>.
- LeBlanc, A.C., H.Y. Chen, L. Autilio-Gambetti, et P. Gambetti. 1991. « Differential APP Gene Expression in Rat Cerebral Cortex, Meninges, and Primary Astroglial, Microglial and Neuronal Cultures ». *FEBS Letters* 292 (1-2): 171-78. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80861-V](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80861-V).
- Lee, K.J., C.E.H. Moussa, Y. Lee, Y. Sung, B.W. Howell, R.S. Turner, D.T.S. Pak, et H.S. Hoe. 2010. « Beta Amyloid-Independent Role of Amyloid Precursor Protein in Generation and Maintenance of Dendritic Spines ». *Neuroscience* 169 (1): 344-56. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.04.078>.
- Lejeune, J., R. Turpin, et M. Gautier. 1959. « [Mongolism; a chromosomal disease (trisomy)] ». *Bulletin De l'Academie Nationale De Medecine* 143 (11-12): 256-65.
- Li, Yichen, Zhuo Xing, Tao Yu, Annie Pao, Marcel Daadi, et Y. Eugene Yu. 2021. « Coat Color-Facilitated Efficient Generation and Analysis of a Mouse Model of Down Syndrome Triplicated for All Human Chromosome 21 Orthologous Regions ». *Genes* 12 (8): 1215. <https://doi.org/10.3390/genes12081215>.
- Li, Z. W., G. Stark, J. Gotz, T. Rulicke, M. Gschwind, G. Huber, U. Muller, et C. Weissmann. 1996. « Generation of Mice with a 200-Kb Amyloid Precursor Protein Gene Deletion by Cre Recombinase-Mediated Site-Specific Recombination in Embryonic Stem Cells. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (12): 6158-62. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.12.6158>.
- Li, Zhongyou, Tao Yu, Masae Morishima, Annie Pao, Jeffrey LaDuca, Jeffrey Conroy, Norma Nowak, Sei-Ichi Matsui, Isao Shiraishi, et Y. Eugene Yu. 2007. « Duplication of the Entire 22.9 Mb Human Chromosome 21 Syntenic Region on Mouse Chromosome 16 Causes Cardiovascular and Gastrointestinal Abnormalities ». *Human Molecular Genetics* 16 (11): 1359-66. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm086>.
- Lin, Xinli, Gerald Koelsch, Shili Wu, Debbie Downs, Azar Dashti, et Jordan Tang. 2000. « Human Aspartic Protease Memapsin 2 Cleaves The », 5.
- Lindner, Loic, Pauline Cayrou, Sylvie Jacquot, Marie-Christine Birling, Yann Herault, et Guillaume Pavlovic. 2021. « Reliable and Robust Droplet Digital PCR (DdPCR) and RT-DdPCR Protocols for Mouse Studies ». *Methods* 191 (juillet): 95-106. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.07.004>.
- Lindner, Loic, Pauline Cayrou, Thomas W. Rosahl, Heather H. Zhou, Marie-Christine Birling, Yann Herault, et Guillaume Pavlovic. 2021. « Droplet Digital PCR or Quantitative PCR for In-Depth Genomic and Functional Validation of Genetically Altered Rodents ». *Methods* 191 (juillet): 107-19. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2021.04.001>.
- Liu, Fei, Zhihou Liang, Jerzy Wegiel, Yu-Wen Hwang, Khalid Iqbal, Inge Grundke-Iqbal, Narayan Ramakrishna, et Cheng-Xin Gong. 2008. « Overexpression of Dyrk1A Contributes to

- Neurofibrillary Degeneration in Down Syndrome ». *The FASEB Journal* 22 (9): 3224-33.  
<https://doi.org/10.1096/fj.07-104539>.
- Liu, Xia, Wei Wang, Hua-li Chen, Hai-yan Zhang, et Nai-xia Zhang. 2019. « Interplay between Alzheimer's Disease and Global Glucose Metabolism Revealed by the Metabolic Profile Alterations of Pancreatic Tissue and Serum in APP/PS1 Transgenic Mice ». *Acta Pharmacologica Sinica* 40 (10): 1259-68. <https://doi.org/10.1038/s41401-019-0239-3>.
- Lockrow, Jason, Heather Boger, Heather Bimonte-Nelson, et Ann-Charlotte Granholm. 2011. « Effects of Long-Term Memantine on Memory and Neuropathology in Ts65Dn Mice, a Model for Down Syndrome ». *Behavioural Brain Research* 221 (2): 610-22.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.03.036>.
- Löffler, Jürgen, et Gerda Huber. 1992. «  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein Isoforms in Various Rat Brain Regions and During Brain Development ». *Journal of Neurochemistry* 59 (4): 1316-24.  
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb08443.x>.
- Lopez, Joëlle, Anne Pereira de Vasconcelos, et Jean-Christophe Cassel. 2008. « Differential Sensitivity of Recent vs. Remote Memory Traces to Extinction in a Water-Maze Task in Rats ». *Neurobiology of Learning and Memory* 90 (2): 460-66. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.05.011>.
- Lorent, K., L. Overbergh, D. Moechars, B. De Strooper, F. Van Leuven, et H. Van den Berghe. 1995. « Expression in Mouse Embryos and in Adult Mouse Brain of Three Members of the Amyloid Precursor Protein Family, of the Alpha-2-Macroglobulin Receptor/Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein and of Its Ligands Apolipoprotein E, Lipoprotein Lipase, Alpha-2-Macroglobulin and the 40,000 Molecular Weight Receptor-Associated Protein ». *Neuroscience* 65 (4): 1009-25. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)00555-j](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)00555-j).
- Lott, Ira T., Eric Doran, Vinh Q. Nguyen, Anne Tournay, Nina Movsesyan, et Daniel L. Gillen. 2012. « Down Syndrome and Dementia: Seizures and Cognitive Decline ». *Journal of Alzheimer's Disease* 29 (1): 177-85. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-111613>.
- Love, Michael I., Wolfgang Huber, et Simon Anders. 2014. « Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2 ». *Genome Biology* 15 (12): 550.  
<https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.
- Luo, Wen-jie, Hong Wang, Hongqiao Li, Benny S. Kim, Sanjiv Shah, Hahn-Jun Lee, Gopal Thinakaran, Tae-Wan Kim, Gang Yu, et Huaxi Xu. 2003. « PEN-2 and APH-1 Coordinately Regulate Proteolytic Processing of Presenilin 1 ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (10): 7850-54.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.C200648200>.
- Lyle, Robert, Frédérique Béna, Sarantis Gagos, Corinne Gehrig, Gipsy Lopez, Albert Schinzel, James Lespinasse, et al. 2009. « Genotype-Phenotype Correlations in Down Syndrome Identified by Array CGH in 30 Cases of Partial Trisomy and Partial Monosomy Chromosome 21 ». *European Journal of Human Genetics* 17 (4): 454-66. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2008.214>.
- Määttä, Tuomo, Tuula Tervo-Määttä, Anja Taanila, Markus Kaski, et Matti Iivanainen. 2006. « Mental Health, Behaviour and Intellectual Abilities of People with Down Syndrome ». *Down's Syndrome, Research and Practice: The Journal of the Sarah Duffen Centre* 11 (1): 37-43.  
<https://doi.org/10.3104/reports.313>.
- Magara, F., U. Muller, Z.-W. Li, H.-P. Lipp, C. Weissmann, M. Stagljar, et D. P. Wolfer. 1999. « Genetic Background Changes the Pattern of Forebrain Commissure Defects in Transgenic Mice Underexpressing the  $\beta$ -Amyloid-Precursor Protein ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (8): 4656-61. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.8.4656>.
- Mai, Cara T., James E. Kucik, Jennifer Isenburg, Marcia L. Feldkamp, Lisa K. Marengo, Erin M. Bugenske, Phoebe G. Thorpe, et al. 2013. « Selected Birth Defects Data from Population-Based Birth Defects Surveillance Programs in the United States, 2006 to 2010: Featuring Trisomy

- Conditions ». *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology* 97 (11): 709-25. <https://doi.org/10.1002/bdra.23198>.
- Mann, D. M. A. 1988. « Alzheimer's Disease and Down's Syndrome ». *Histopathology* 13 (2): 125-37. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1988.tb02018.x>.
- Mann, D. M. A., P. O. Yates, B. Marcyniuk, et C. R. Ravindra. 1985. « PATHOLOGICAL EVIDENCE FOR NEUROTRANSMITTER DEFICITS IN DOWN'S SYNDROME OF MIDDLE AGE ». *Journal of Intellectual Disability Research* 29 (2): 125-35. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2788.1985.tb00320.x>.
- Mann, D. M., et M. M. Esiri. 1988. « The Site of the Earliest Lesions of Alzheimer's Disease ». *The New England Journal of Medicine* 318 (12): 789-90. <https://doi.org/10.1056/NEJM198803243181218>.
- Mann, D.M.A., P.O. Yates, B. Marcyniuk, et C.R. Ravindra. 1987. « Loss of Neurones from Cortical and Subcortical Areas in Down's Syndrome Patients at Middle Age ». *Journal of the Neurological Sciences* 80 (1): 79-89. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(87\)90223-1](https://doi.org/10.1016/0022-510X(87)90223-1).
- Marchal, Jan Pieter, Heleen Maurice-Stam, Bregje A. Houtzager, Susanne L. Rutgers van Rozenburg-Marres, Kim J. Oostrom, Martha A. Grootenhuys, et A.S. Paul van Trotsenburg. 2016. « Growing up with Down Syndrome: Development from 6 Months to 10.7 Years ». *Research in Developmental Disabilities* 59 (décembre): 437-50. <https://doi.org/10.1016/j.ridd.2016.09.019>.
- Margallo-Lana, M. L., P. B. Moore, D. W. K. Kay, R. H. Perry, B. E. Reid, T. P. Berney, et S. P. Tyrer. 2007. « Fifteen-Year Follow-up of 92 Hospitalized Adults with Down's Syndrome: Incidence of Cognitive Decline, Its Relationship to Age and Neuropathology ». *Journal of Intellectual Disability Research* 51 (6): 463-77. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2788.2006.00902.x>.
- Masliah, Eliezer, Margaret Mallory, Lawrence Hansen, DeTeresa Richard, Michael Alford, et Robert Terry. 1994. « Synaptic and Neuritic Alterations during the Progression of Alzheimer's Disease ». *Neuroscience Letters* 174 (1): 67-72. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90121-X](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90121-X).
- McCarron, M., P. McCallion, E. Reilly, P. Dunne, R. Carroll, et N. Mulryan. 2017. « A Prospective 20-Year Longitudinal Follow-up of Dementia in Persons with Down Syndrome ». *Journal of Intellectual Disability Research: JIDR* 61 (9): 843-52. <https://doi.org/10.1111/jir.12390>.
- Milward, E. A., R. Papadopoulos, S. J. Fuller, R. D. Moir, D. Small, K. Beyreuther, et C. L. Masters. 1992. « The Amyloid Protein Precursor of Alzheimer's Disease Is a Mediator of the Effects of Nerve Growth Factor on Neurite Outgrowth ». *Neuron* 9 (1): 129-37. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90228-6](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90228-6).
- Morris, A. F., Susan E. Vaughan, et P. Vaccaro. 1982. « MEASUREMENTS OF NEUROMUSCULAR TONE AND STRENGTH IN DOWN'S SYNDROME CHILDREN ». *Journal of Intellectual Disability Research* 26 (1): 41-46. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2788.1982.tb00127.x>.
- Morris, R. 1984. « Developments of a Water-Maze Procedure for Studying Spatial Learning in the Rat ». *Journal of Neuroscience Methods* 11 (1): 47-60. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(84\)90007-4](https://doi.org/10.1016/0165-0270(84)90007-4).
- Müller, U., N. Cristina, Z. W. Li, D. P. Wolfer, H. P. Lipp, T. Rüllicke, S. Brandner, A. Aguzzi, et C. Weissmann. 1994. « Behavioral and Anatomical Deficits in Mice Homozygous for a Modified Beta-Amyloid Precursor Protein Gene ». *Cell* 79 (5): 755-65. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90066-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90066-3).
- Müller, Ulrike C., Thomas Deller, et Martin Korte. 2017. « Not Just Amyloid: Physiological Functions of the Amyloid Precursor Protein Family ». *Nature Reviews. Neuroscience* 18 (5): 281-98. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.29>.
- Mullins, Linda J., et John J. Mullins. 2004. « Insights from the Rat Genome Sequence ». *Genome Biology* 5 (5): 221. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-5-221>.
- Nguyen, Thu Lan, Arnaud Duchon, Antigoni Manousopoulou, Nadège Loaëc, Benoît Villiers, Guillaume Pani, Meltem Karatas, et al. 2018. « Correction of Cognitive Deficits in Mouse Models of Down Syndrome by a Pharmacological Inhibitor of DYRK1A ». *Disease Models & Mechanisms* 11 (9): dmm035634. <https://doi.org/10.1242/dmm.035634>.

- Nightengale, Emily, Patricia Yoon, Kristy Wolter-Warmerdam, Dee Daniels, et Fran Hickey. 2017. « Understanding Hearing and Hearing Loss in Children With Down Syndrome ». *American Journal of Audiology* 26 (3): 301-8. [https://doi.org/10.1044/2017\\_AJA-17-0010](https://doi.org/10.1044/2017_AJA-17-0010).
- Niu, Sanyong, Amy Renfro, Carlo C. Quattrocchi, Michael Sheldon, et Gabriella D'Arcangelo. 2004. « Reelin Promotes Hippocampal Dendrite Development through the VLDLR/ApoER2-Dab1 Pathway ». *Neuron* 41 (1): 71-84. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00819-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00819-5).
- Norstrom, Eric. 2017. « Metabolic Processing of the Amyloid Precursor Protein -- New Pieces of the Alzheimer's Puzzle ». *Discovery Medicine* 23 (127): 269-76.
- Ohsawa, Ikuroh, Chizuko Takamura, Takako Morimoto, Mariko Ishiguro, et Shinichi Kohsaka. 1999. « Amino-Terminal Region of Secreted Form of Amyloid Precursor Protein Stimulates Proliferation of Neural Stem Cells: SAPP Stimulates Neural Stem Cell Proliferation ». *European Journal of Neuroscience* 11 (6): 1907-13. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00601.x>.
- Ohta, Masaru, Tetsuyuki Kitamoto, Toru Iwaki, Tetsuya Ohgami, Masashi Fukui, et Jun Tateishi. 1993. « Immunohistochemical Distribution of Amyloid Precursor Protein during Normal Rat Development ». *Developmental Brain Research* 75 (2): 151-61. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(93\)90019-7](https://doi.org/10.1016/0165-3806(93)90019-7).
- O'Keefe, John, et Lynn Nadel. 1979. « Précis of O'Keefe & Nadel's *The Hippocampus as a Cognitive Map* ». *Behavioral and Brain Sciences* 2 (4): 487-94. <https://doi.org/10.1017/S0140525X00063949>.
- Oltersdorf, T., P. J. Ward, T. Henriksson, E. C. Beattie, R. Neve, I. Lieberburg, et L. C. Fritz. 1990. « The Alzheimer Amyloid Precursor Protein. Identification of a Stable Intermediate in the Biosynthetic/Degradative Pathway ». *The Journal of Biological Chemistry* 265 (8): 4492-97.
- Orsi, Giuseppe d', Luigi M. Specchio, et Apulian Study Group on Senile Myoclonic Epilepsy. 2014. « Progressive Myoclonus Epilepsy in Down Syndrome Patients with Dementia ». *Journal of Neurology* 261 (8): 1584-97. <https://doi.org/10.1007/s00415-014-7376-x>.
- Ott, M. O., et S. L. Bullock. 2001. « A Gene Trap Insertion Reveals That Amyloid Precursor Protein Expression Is a Very Early Event in Murine Embryogenesis ». *Development Genes and Evolution* 211 (7): 355-57. <https://doi.org/10.1007/s004270100158>.
- Pasternak, Stephen H., Richard D. Bagshaw, Marianne Guiral, Sunqu Zhang, Cameron A. Ackerley, Brian J. Pak, John W. Callahan, et Don J. Mahuran. 2003. « Presenilin-1, Nicastrin, Amyloid Precursor Protein, and  $\gamma$ -Secretase Activity Are Co-Localized in the Lysosomal Membrane ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (29): 26687-94. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304009200>.
- Phinney, A L, M E Calhoun, D P Wolfer, H P Lipp, H Zheng, et M Jucker. 1999. « NO HIPPOCAMPAL NEURON OR SYNAPTIC BOUTON LOSS IN LEARNING-IMPAIRED AGED b-AMYLOID PRECURSOR PROTEIN-NULL MICE », 10.
- Pinter, Joseph D., Stephan Eliez, J. Eric Schmitt, George T. Capone, et Allan L. Reiss. 2001. « Neuroanatomy of Down's Syndrome: A High-Resolution MRI Study ». *American Journal of Psychiatry* 158 (10): 1659-65. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.158.10.1659>.
- Pol-Bodetto, Sarah, H el ene Jeltsch-David, Lucas Lecourtier, Nathalia Rusnac, C elia Mam-Lam-Fook, Brigitte Cosquer, Karin Geiger, et Jean-Christophe Cassel. 2011. « The Double-H Maze Test, a Novel, Simple, Water-Escape Memory Task: Acquisition, Recall of Recent and Remote Memory, and Effects of Systemic Muscarinic or NMDA Receptor Blockade during Training ». *Behavioural Brain Research* 218 (1): 138-51. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.043>.
- Prasher, V. P., M. J. Farrer, A. M. Kessling, E. M. Fisher, R. J. West, P. C. Barber, et A. C. Butler. 1998. « Molecular Mapping of Alzheimer-Type Dementia in Down's Syndrome ». *Annals of Neurology* 43 (3): 380-83. <https://doi.org/10.1002/ana.410430316>.



- Priller, C., T. Bauer, G. Mitteregger, B. Krebs, H. A. Kretzschmar, et J. Herms. 2006. « Synapse Formation and Function Is Modulated by the Amyloid Precursor Protein ». *Journal of Neuroscience* 26 (27): 7212-21. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1450-06.2006>.
- Puig, Kendra L., et Colin K. Combs. 2013. « Expression and Function of APP and Its Metabolites Outside the Central Nervous System ». *Experimental Gerontology* 48 (7): 608-11. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2012.07.009>.
- Rafii, Michael S., Ana S. Lukic, Randolph D. Andrews, James Brewer, Robert A. Rissman, Stephen C. Strother, Miles N. Wernick, et al. 2017. « PET Imaging of Tau Pathology and Relationship to Amyloid, Longitudinal MRI, and Cognitive Change in Down Syndrome: Results from the Down Syndrome Biomarker Initiative (DSBI) ». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 60 (2): 439-50. <https://doi.org/10.3233/JAD-170390>.
- Rama, Nicolas, David Goldschneider, Véronique Corset, Jérémy Lambert, Laurent Pays, et Patrick Mehlen. 2012. « Amyloid Precursor Protein Regulates Netrin-1-Mediated Commissural Axon Outgrowth ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (35): 30014-23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.324780>.
- Ramaker, J. M., T. L. Swanson, et P. F. Copenhaver. 2013. « Amyloid Precursor Proteins Interact with the Heterotrimeric G Protein Go in the Control of Neuronal Migration ». *Journal of Neuroscience* 33 (24): 10165-81. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1146-13.2013>.
- Rice, Heather C., Matthew Townsend, Jilin Bai, Seiyam Suth, William Cavanaugh, Dennis J. Selkoe, et Tracy L. Young-Pearse. 2012. « Pancortins Interact with Amyloid Precursor Protein and Modulate Cortical Cell Migration ». *Development* 139 (21): 3986-96. <https://doi.org/10.1242/dev.082909>.
- Ring, S., S. W. Weyer, S. B. Kilian, E. Waldron, C. U. Pietrzik, M. A. Filippov, J. Herms, et al. 2007. « The Secreted  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein Ectodomain APPs Is Sufficient to Rescue the Anatomical, Behavioral, and Electrophysiological Abnormalities of APP-Deficient Mice ». *Journal of Neuroscience* 27 (29): 7817-26. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1026-07.2007>.
- Rohan de Silva, H. A., A. Jen, C. Wickenden, L. S. Jen, S. L. Wilkinson, et A. J. Patel. 1997. « Cell-Specific Expression of Beta-Amyloid Precursor Protein Isoform MRNAs and Proteins in Neurons and Astrocytes ». *Brain Research. Molecular Brain Research* 47 (1-2): 147-56. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(97\)00045-4](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(97)00045-4).
- Roizen, Nancy J., Caroline I. Magyar, Emily S. Kuschner, Steven B. Sulkes, Charlotte Druschel, Edwin van Wijngaarden, Lisa Rodgers, Alison Diehl, Richard Lowry, et Susan L. Hyman. 2014. « A Community Cross-Sectional Survey of Medical Problems in 440 Children with Down Syndrome in New York State ». *The Journal of Pediatrics* 164 (4): 871-75. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.11.032>.
- Rosen, D. R., L. Martin-Morris, L. Q. Luo, et K. White. 1989. « A Drosophila Gene Encoding a Protein Resembling the Human Beta-Amyloid Protein Precursor ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (7): 2478-82. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.7.2478>.
- Rossjohn, J., R. Cappai, S. C. Feil, A. Henry, W. J. McKinstry, D. Galatis, L. Hesse, et al. 1999. « Crystal Structure of the N-Terminal, Growth Factor-like Domain of Alzheimer Amyloid Precursor Protein ». *Nature Structural Biology* 6 (4): 327-31. <https://doi.org/10.1038/7562>.
- Rovelet-Lecrux, A., T. Frebourg, H. Tuominen, K. Majamaa, D. Campion, et A. M. Remes. 2007. « APP Locus Duplication in a Finnish Family with Dementia and Intracerebral Haemorrhage ». *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 78 (10): 1158-59. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2006.113514>.
- Rovelet-Lecrux, Anne, Didier Hannequin, Gregory Raux, Nathalie Le Meur, Annie Laquerrière, Anne Vital, Cécile Dumanchin, et al. 2006. « APP Locus Duplication Causes Autosomal Dominant Early-Onset Alzheimer Disease with Cerebral Amyloid Angiopathy ». *Nature Genetics* 38 (1): 24-26. <https://doi.org/10.1038/ng1718>.

- Rowe, John, Anthony Lavender, et Vicky Turk. 2006. « Cognitive Executive Function in Down's Syndrome ». *British Journal of Clinical Psychology* 45 (1): 5-17. <https://doi.org/10.1348/014466505X29594>.
- Salbaum, J. Michael, et Frank H. Ruddle. 1994. « Embryonic Expression Pattern of Amyloid Protein Precursor Suggests a Role in Differentiation of Specific Subsets of Neurons ». *Journal of Experimental Zoology* 269 (2): 116-27. <https://doi.org/10.1002/jez.1402690205>.
- Salehi, Ahmad, Jean-Dominique Delcroix, Pavel V. Belichenko, Ke Zhan, Chengbiao Wu, Janice S. Valletta, Ryoko Takimoto-Kimura, et al. 2006. « Increased App Expression in a Mouse Model of Down's Syndrome Disrupts NGF Transport and Causes Cholinergic Neuron Degeneration ». *Neuron* 51 (1): 29-42. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.05.022>.
- Scheff, S. W., D. A. Price, F. A. Schmitt, S. T. DeKosky, et E. J. Mufson. 2007. « Synaptic Alterations in CA1 in Mild Alzheimer Disease and Mild Cognitive Impairment ». *Neurology* 68 (18): 1501-8. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000260698.46517.8f>.
- Scheff, Stephen W., Steven T. DeKosky, et Douglas A. Price. 1990. « Quantitative Assessment of Cortical Synaptic Density in Alzheimer's Disease ». *Neurobiology of Aging* 11 (1): 29-37. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(90\)90059-9](https://doi.org/10.1016/0197-4580(90)90059-9).
- Schmitz, C., et P.R. Hof. 2005. « Design-Based Stereology in Neuroscience ». *Neuroscience* 130 (4): 813-31. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.08.050>.
- Schubert, Walter, Reinhard Prior, Andreas Weidemann, et Heinrich Dirksen. 1991. « Localization of Alzheimer FIA4 Amyloid Precursor Protein at Central and Peripheral Synaptic Sites », 11.
- Seabrook, G.R., D.W. Smith, B.J. Bowery, A. Easter, T. Reynolds, S.M. Fitzjohn, R.A. Morton, et al. 1999. « Mechanisms Contributing to the Deficits in Hippocampal Synaptic Plasticity in Mice Lacking Amyloid Precursor Protein ». *Neuropharmacology* 38 (3): 349-59. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(98\)00204-4](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(98)00204-4).
- Senechal, Yann, Peter H. Kelly, et Kumlesh K. Dev. 2008. « Amyloid Precursor Protein Knockout Mice Show Age-Dependent Deficits in Passive Avoidance Learning ». *Behavioural Brain Research* 186 (1): 126-32. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.08.003>.
- Serrano-Pozo, Alberto, Matthew L. Mielke, Teresa Gómez-Isla, Rebecca A. Betensky, John H. Growdon, Matthew P. Frosch, et Bradley T. Hyman. 2011. « Reactive Glia Not Only Associates with Plaques but Also Parallels Tangles in Alzheimer's Disease ». *The American Journal of Pathology* 179 (3): 1373-84. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.05.047>.
- Simons, M., E. Ikonen, P. J. Tienari, A. Cid-Arregui, U. Mönning, K. Beyreuther, et C. G. Dotti. 1995. « Intracellular Routing of Human Amyloid Protein Precursor: Axonal Delivery Followed by Transport to the Dendrites: Intracellular Routing of Human APP ». *Journal of Neuroscience Research* 41 (1): 121-28. <https://doi.org/10.1002/jnr.490410114>.
- Sinai, Amanda, Claire Mokrysz, Jane Bernal, Ingrid Bohnen, Simon Bonell, Ken Courtenay, Karen Dodd, et al. 2018. « Predictors of Age of Diagnosis and Survival of Alzheimer's Disease in Down Syndrome ». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 61 (2): 717-28. <https://doi.org/10.3233/JAD-170624>.
- Sinha, Sukanto, John P Anderson, Robin Barbour, Guriqbal S Basi, Russell Caccavello, David Davis, Minhtam Doan, et al. 1999. « Puri<sup>®</sup>cation and Cloning of Amyloid Precursor Protein B-Secretase from Human Brain » 402: 4.
- Souchet, Benoit, Arnaud Duchon, Yuchen Gu, Julien Dairou, Claire Chevalier, Fabrice Daubigny, Valérie Nalesso, et al. 2019. « Prenatal Treatment with EGCG Enriched Green Tea Extract Rescues GAD67 Related Developmental and Cognitive Defects in Down Syndrome Mouse Models ». *Scientific Reports* 9 (1): 3914. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40328-9>.
- Startin, Carla M., Sarah Hamburg, Rosalyn Hithersay, Tamara Al-Janabi, Kin Y. Mok, John Hardy, LonDownS Consortium, et Andre Strydom. 2019. « Cognitive Markers of Preclinical and

- Prodromal Alzheimer's Disease in Down Syndrome ». *Alzheimer's & Dementia* 15 (2): 245-57. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.08.009>.
- Stelzmann, Rainulf A., H. Norman Schnitzlein, et F. Reed Murtagh. 1995. « An English Translation of Alzheimer's 1907 Paper, ?ber Eine Eigenartige Erkankung Der Hirnrinde? » *Clinical Anatomy* 8 (6): 429-31. <https://doi.org/10.1002/ca.980080612>.
- Sureshbabu, Rengasamy, Rashmi Kumari, Subramaniam Ranugha, Ramanathan Sathyamoorthy, Carounanidy Udayashankar, et Paquirissamy Oudeacoumar. 2011. « Phenotypic and Dermatological Manifestations in Down Syndrome ». *Dermatology Online Journal* 17 (2): 3.
- Takashima, S, et K Iida. 1994. « Dendritic and Histochemical Development and Ageing in Patients with Down's Syndrome », 10.
- Tanabe, Chiaki, Nika Hotoda, Noboru Sasagawa, Atsuko Sehara-Fujisawa, Kei Maruyama, et Shoichi Ishiura. 2007. « ADAM19 Is Tightly Associated with Constitutive Alzheimer's Disease APP  $\alpha$ -Secretase in A172 Cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 352 (1): 111-17. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.10.181>.
- Tanaka, Seigo, Satoshi Shiojiri, Yasuyuki Takahashi, Nobuya Kitaguchi, Hirataka Ito, Masakuni Kameyama, Jun Kimura, Shigenobu Nakamura, et Kunihiro Ueda. 1989. « Tissue-Specific Expression of Three Types of  $\beta$ -Protein Precursor mRNA: Enhancement of Protease Inhibitor-Harboring Types in Alzheimer's Disease Brain ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 165 (3): 1406-14. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(89\)92760-5](https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)92760-5).
- Tanzi, R. E., J. F. Gusella, P. C. Watkins, G. A. Bruns, P. St George-Hyslop, M. L. Van Keuren, D. Patterson, S. Pagan, D. M. Kurnit, et R. L. Neve. 1987. « Amyloid Beta Protein Gene: CDNA, MRNA Distribution, and Genetic Linkage near the Alzheimer Locus ». *Science (New York, N.Y.)* 235 (4791): 880-84. <https://doi.org/10.1126/science.2949367>.
- Teller, J. K., C. Russo, L. M. DeBusk, G. Angelini, D. Zaccheo, F. Dagna-Bricarelli, P. Scartezzini, et al. 1996. « Presence of Soluble Amyloid Beta-Peptide Precedes Amyloid Plaque Formation in Down's Syndrome ». *Nature Medicine* 2 (1): 93-95. <https://doi.org/10.1038/nm0196-93>.
- Thal, Dietmar R, Udo Rüb, Mario Orantes, et Heiko Braak. 2002. « Phases of A <sup>$\beta$</sup> -Deposition in the Human Brain and Its Relevance for the Development of AD », 11.
- Thinakaran, Gopal, David R Borchelt, Michael K Lee, Hilda H Slunt, Lia Spitzer, Grace Kim, Tamara Ratovitsky, et al. 1996. « Endoproteolysis of Presenilin 1 and Accumulation of Processed Derivatives In Vivo ». *Neuron* 17 (1): 181-90. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80291-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80291-3).
- Thinakaran, Gopal, et Edward H. Koo. 2008. « Amyloid Precursor Protein Trafficking, Processing, and Function ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (44): 29615-19. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800019200>.
- Tissir, Fadel, et André M. Goffinet. 2003. « Reelin and Brain Development ». *Nature Reviews Neuroscience* 4 (6): 496-505. <https://doi.org/10.1038/nrn1113>.
- Tolman, E. C. 1948. « Cognitive Maps in Rats and Men ». *Psychological Review* 55 (4): 189-208. <https://doi.org/10.1037/h0061626>.
- Trapp, B. D., et P. E. Hauer. 1994. « Amyloid Precursor Protein Is Enriched in Radial Glia: Implications for Neuronal Development ». *Journal of Neuroscience Research* 37 (4): 538-50. <https://doi.org/10.1002/jnr.490370413>.
- Tremml, Philippe, et Hans-Peter Lipp. 1998. « Neurobehavioral Development, Adult Openfield Exploration and Swimming Navigation Learning in Mice with a Modified i-Amyloid Precursor Protein Gene », 12.
- Tulving, E. 1972. « Organization of Memory ». In *Episodic and Semantic Memory. In Organization of Memory*, 381-403. New York, NY: Cambridge, MA. <https://www.scirp.org/reference/referencespapers.aspx?referenceid=2919588>.

- Tyan, Sheue-Houy, Ann Yu-Jung Shih, Jessica J. Walsh, Hiroko Maruyama, Floyd Sarsoza, Lawrence Ku, Simone Eggert, Patrick R. Hof, Edward H. Koo, et Dara L. Dickstein. 2012. « Amyloid Precursor Protein (APP) Regulates Synaptic Structure and Function ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 51 (1-2): 43-52. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.07.009>.
- Vassar, Robert, Brian D Bennett, Safura Babu-Khan, Steve Kahn, Elizabeth A Mendiaz, Paul Denis, David B Teplow, et al. 1999. «  $\gamma$ -Secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE » 286: 8.
- Vicari, Stefano, Samantha Bellucci, et Giovanni Augusto Carlesimo. 2000. « Implicit and Explicit Memory: A Functional Dissociation in Persons with Down Syndrome ». *Neuropsychologia* 38 (3): 240-51. [https://doi.org/10.1016/S0028-3932\(99\)00081-0](https://doi.org/10.1016/S0028-3932(99)00081-0).
- Villemagne, Victor L., Suzuka Ataka, Toshiki Mizuno, William S. Brooks, Yasuhiro Wada, Masaki Kondo, Gareth Jones, et al. 2009. « High Striatal Amyloid  $\beta$ -Peptide Deposition Across Different Autosomal Alzheimer Disease Mutation Types ». *Archives of Neurology* 66 (12). <https://doi.org/10.1001/archneurol.2009.285>.
- Walf, Alicia A, et Cheryl A Frye. 2007. « The Use of the Elevated plus Maze as an Assay of Anxiety-Related Behavior in Rodents ». *Nature Protocols* 2 (2): 322-28. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>.
- Walsh, R. N., et R. A. Cummins. 1976. « The Open-Field Test: A Critical Review ». *Psychological Bulletin* 83 (3): 482-504.
- Walter, Jochen, Anja Capell, Albert Y. Hung, Hanno Langen, Martina Schnölzer, Gopal Thinakaran, Sangram S. Sisodia, Dennis J. Selkoe, et Christian Haass. 1997. « Ectodomain Phosphorylation of  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein at Two Distinct Cellular Locations ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (3): 1896-1903. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.3.1896>.
- Wang, Pei, Guang Yang, Dennis R. Mosier, Paul Chang, Tahire Zaidi, Yan-Dao Gong, Nan-Ming Zhao, et al. 2005. « Defective Neuromuscular Synapses in Mice Lacking Amyloid Precursor Protein (APP) and APP-Like Protein 2 ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (5): 1219-25. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4660-04.2005>.
- Wang, Zilai, Baiping Wang, Li Yang, Qinxi Guo, Nadia Aithmitti, Zhou Songyang, et Hui Zheng. 2009. « Presynaptic and Postsynaptic Interaction of the Amyloid Precursor Protein Promotes Peripheral and Central Synaptogenesis ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (35): 10788-801. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2132-09.2009>.
- Wasco, W., K. Bupp, M. Magendantz, J. F. Gusella, R. E. Tanzi, et F. Solomon. 1992. « Identification of a Mouse Brain cDNA That Encodes a Protein Related to the Alzheimer Disease-Associated Amyloid Beta Protein Precursor ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (22): 10758-62. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.22.10758>.
- Wasco, W., S. Gurubhagavatula, M. D. Paradis, D. M. Romano, S. S. Sisodia, B. T. Hyman, R. L. Neve, et R. E. Tanzi. 1993. « Isolation and Characterization of APLP2 Encoding a Homologue of the Alzheimer's Associated Amyloid Beta Protein Precursor ». *Nature Genetics* 5 (1): 95-100. <https://doi.org/10.1038/ng0993-95>.
- Weidemann, Andreas, Gerhard König, Dirk Bunke, Peter Fischer, J. Michael Salbaum, Colin L. Masters, et Konrad Beyreuther. 1989. « Identification, Biogenesis, and Localization of Precursors of Alzheimer's Disease A4 Amyloid Protein ». *Cell* 57 (1): 115-26. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90177-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90177-3).
- Weidemann, Andreas, Krzysztof Paliga, Ulrike Dürrwang, Friedrich B.M. Reinhard, Oliver Schuckert, Geneviève Evin, et Colin L. Masters. 1999. « Proteolytic Processing of the Alzheimer's Disease Amyloid Precursor Protein within Its Cytoplasmic Domain by Caspase-like Proteases ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (9): 5823-29. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.9.5823>.

- Weisfeld-Adams, James D, Amanda K Tkachuk, Kenneth N Maclean, Naomi L Meeks, et Stuart A Scott. 2016. « A de Novo 2.78-Mb Duplication on Chromosome 21q22.11 Implicates Candidate Genes in the Partial Trisomy 21 Phenotype ». *Npj Genomic Medicine* 1 (1): 16003. <https://doi.org/10.1038/npjgenmed.2016.3>.
- West, Mark J. 2012. « Introduction to Stereology ». *Cold Spring Harbor Protocols* 2012 (8): pdb.top070623. <https://doi.org/10.1101/pdb.top070623>.
- . 2013. « Getting Started in Stereology ». *Cold Spring Harbor Protocols* 2013 (4): 287-97. <https://doi.org/10.1101/pdb.top071845>.
- Whishaw, I. Q., et J. A. Tomie. 1996. « Of Mice and Mazes: Similarities between Mice and Rats on Dry Land but Not Water Mazes ». *Physiology & Behavior* 60 (5): 1191-97. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(96\)00176-x](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(96)00176-x).
- Wisniewski, K. E. 1990. « Down Syndrome Children Often Have Brain with Maturation Delay, Retardation of Growth, and Cortical Dysgenesis ». *American Journal of Medical Genetics. Supplement 7*: 274-81. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320370755>.
- Wolfe, Michael S, Weiming Xia, Beth L Ostaszewski, Thekla S Diehl, W Taylor Kimberly, et Dennis J Selkoe. 1999. « Two Transmembrane Aspartates in Presenilin-1 Required for Presenilin Endoproteolysis and g-Secretase Activity » 398: 5.
- Young-Pearse, T. L., J. Bai, R. Chang, J. B. Zheng, J. J. LoTurco, et D. J. Selkoe. 2007. « A Critical Function for -Amyloid Precursor Protein in Neuronal Migration Revealed by In Utero RNA Interference ». *Journal of Neuroscience* 27 (52): 14459-69. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4701-07.2007>.
- Young-Pearse, T. L., S. Suth, E. S. Luth, A. Sawa, et D. J. Selkoe. 2010. « Biochemical and Functional Interaction of Disrupted-in-Schizophrenia 1 and Amyloid Precursor Protein Regulates Neuronal Migration during Mammalian Cortical Development ». *Journal of Neuroscience* 30 (31): 10431-40. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1445-10.2010>.
- Young-Pearse, Tracy L., Allen C. Chen, Rui Chang, Cesar Marquez, et Dennis J. Selkoe. 2008. « Secreted APP Regulates the Function of Full-Length APP in Neurite Outgrowth through Interaction with Integrin Beta1 ». *Neural Development* 3 (juin): 15. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-3-15>.
- Yu, Tao, Chunhong Liu, Pavel Belichenko, Steven J. Clapcote, Shaomin Li, Annie Pao, Alexander Kleschevnikov, et al. 2010. « Effects of Individual Segmental Trisomies of Human Chromosome 21 Syntenic Regions on Hippocampal Long-Term Potentiation and Cognitive Behaviors in Mice ». *Brain Research* 1366 (décembre): 162-71. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.09.107>.
- Zheng, H., M. Jiang, M. E. Trumbauer, D. J. Sirinathsinghji, R. Hopkins, D. W. Smith, R. P. Heavens, et al. 1995. « Beta-Amyloid Precursor Protein-Deficient Mice Show Reactive Gliosis and Decreased Locomotor Activity ». *Cell* 81 (4): 525-31. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90073-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90073-x).
- Zhou, Qi, Hong Zheng, Jiuxia Chen, Chen Li, Yao Du, Huanhuan Xia, et Hongchang Gao. 2018. « Metabolic Fate of Glucose in the Brain of APP/PS1 Transgenic Mice at 10 Months of Age: A 13C NMR Metabolomic Study ». *Metabolic Brain Disease* 33 (5): 1661-68. <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0274-7>.

## Rôle du gène codant pour le précurseur du peptide $\beta$ -amyloïde dans des conditions physiologiques et dans la Trisomie 21 chez le Rat

### Résumé

La protéine précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde («  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein », APP) est une glycoprotéine transmembranaire, exprimée de façon ubiquitaire. Elle possède de nombreuses fonctions physiologiques comme dans la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire ou encore dans la plasticité synaptique. Cependant, les mécanismes qui sous-tendent ces fonctions ne sont pas ou peu connus. L'APP reste principalement étudiée pour son implication dans la maladie d'Alzheimer (MA), le gène APP étant la cible de nombreuses mutations. Par ailleurs, la simple duplication de ce gène, situé sur le chromosome 21, est suffisante pour induire le développement d'une MA. Les personnes atteintes du Syndrome de Down (SD) possèdent 3 copies de ce gène et présentent donc un risque accru de développer une MA. La physiopathologie de la MA dans le contexte du SD n'est pas connue. Les objectifs de cette thèse étaient d'étudier, d'une part, le rôle physiologique de l'APP au cours du vieillissement, et d'autre part les mécanismes de la MA dans le contexte du SD chez des nouveaux modèles de rat.

Mots-clés : APP, Rôle physiologique, Syndrome de Down, Maladie d'Alzheimer, Vieillesse, Rat

### Résumé en anglais

The  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein (APP) is a transmembrane glycoprotein expressed ubiquitously. This protein has many physiological functions, is involved mainly in proliferation, differentiation and cell migration and synaptic plasticity. However, the mechanisms underlying these functions are poorly known. Indeed, APP is target of many studies for its involvement in Alzheimer's disease (AD), where the APP gene presents numerous mutations. Moreover, the simple duplication of this gene, located on chromosome 21, is sufficient to induce the development of AD. Thus, people with Down Syndrome (DS) who have 3 copies of the APP gene, show higher risk of developing AD. However, the pathophysiology of AD in the context of DS is unknown. The purpose of this thesis was first, to study the physiological role of APP during aging and second, to identify the mechanisms of AD in the context of DS by using new rats models.

Keywords: APP, Physiological function, Down Syndrome, Alzheimer disease, Aging, Rat