

Calcium et olfaction chez un insecte modèle : du marqueur d'activité à l'acteur de plasticité

Jean-Christophe Sandoz,
Valérie Raymond-Delpech, Nina Deisig,
Monique Gauthier, Martin Giurfa



Calcium et régulation
des gènes en conditions
normales et pathologiques

GDR 2688

GDR 2688, Centre de Recherches sur la Cognition Animale,
CNRS UMR 5169, Université Paul Sabatier,
118, route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 04, France.
sandoz@cict.fr

➤ Jusqu'à ces dernières années, le fonctionnement du système nerveux olfactif était mal connu. Les données anatomiques montraient une remarquable conservation des circuits nerveux olfactifs des invertébrés aux vertébrés. Ainsi, le premier relais nerveux olfactif, le bulbe olfactif des vertébrés ou le lobe antennaire des insectes, présente une organisation très semblable en sous-unités anatomiques, les glomérules [1]. Leur nombre, allant d'une quarantaine chez la drosophile à plusieurs milliers chez les mammifères, correspond à peu près au nombre de récepteurs membranaires aux odeurs potentiellement exprimés dans chaque espèce. Enfin, il avait été montré, chez le rat en particulier, que les neurones sensoriels olfactifs exprimant un type donné de récepteur membranaire aux odeurs se projettent dans le même glomérule [2]. On suspectait donc que les glomérules sont à la base de la représentation nerveuse des odeurs mais encore fallait-il le démontrer. Le développement des techniques d'imagerie fonctionnelle a fourni les moyens de le faire [3], bien que nombre de ces techniques (2 désoxyglucose radioactif, *c-fos*) ne permettaient pas de marquages chez l'animal vivant. C'est donc grâce à l'imagerie calcique, et aux sondes fluorescentes permettant de révéler des variations fines de concentration du Ca^{2+} intracellulaire dans le cerveau *in vivo*, que ce champ de la neurobiologie a véritablement pu se développer. C'est aussi, de manière inattendue, chez un invertébré, l'abeille domestique, que cet exploit a été réalisé pour la première fois

[4]. Cette espèce au cerveau simple (*Figure 1A-B*, 10^{-3} cm³ et 10^6 neurones contre 1400 cm³ et 10^{11} neurones pour l'homme) mais néanmoins capable d'exploits cognitifs étonnants, est un modèle phare dans l'étude des bases nerveuses de la perception et de l'apprentissage olfactifs [5].

Ca^{2+} marqueur d'activité

Au cours d'une expérience d'imagerie calcique *in vivo*, l'abeille entière est placée dans une chambre d'enregistrement. La cuticule (non innervée) de sa tête est découpée et le cerveau est découvert. Une sonde fluorescente calcique qui a la propriété de pénétrer dans les cellules (Ca^{2+} Green-2AM) est déposée en bain sur le cerveau. Après marquage, la présentation d'une odeur induit une augmentation topique de fluorescence dans le lobe antennaire, au niveau de zones sphériques de 30-50 μ m de diamètre (*Figure 1C*). Des marquages anatomiques montrent que l'activité nerveuse ainsi révélée est localisée au sein des glomérules. Cette technique a permis de démontrer que les odeurs induisent des motifs d'activation glomérulaire spécifiques : à chaque odeur correspond une combinaison particulière de glomérules [4]. Ces motifs d'activité sont reproductibles non seulement chez un même individu, mais aussi d'un individu à l'autre. La morphologie du lobe antennaire étant particulièrement bien conservée, on peut reconnaître chaque glomérule par sa localisation, sa taille ou sa forme chez des individus différents. Il a donc été possible

de cartographier systématiquement les réponses des glomérules à de nombreuses odeurs classées en fonction de leur formule chimique (fonction aldéhyde, alcool ou cétone, longueur de la chaîne aliphatique) [6]. Ainsi, une similitude de structure chimique entre odeurs se traduit par une superposition des motifs d'activité glomérulaire. Il semble donc qu'on ait réussi à décrypter une partie du «code olfactif» dans le cerveau de l'abeille. Il subsistait cependant une question importante : à quel point les phénomènes physiologiques enregistrés grâce à l'imagerie calcique correspondent-ils aux «sensations» olfactives de l'abeille ? Pour répondre à cette question, nous avons réalisé une expérience d'apprentissage olfactif dont le but était d'établir les critères de similarité entre odeurs au niveau perceptuel [7]. Au laboratoire (*Figure 1A*), les abeilles peuvent apprendre à associer une odeur à un renforcement alimentaire, au cours du conditionnement de l'extension du proboscis (trompe). Cette réponse réflexe est déclenchée normalement par la stimulation des antennes avec de l'eau sucrée. Pour conditionner cette réponse, on présente une odeur (stimulus conditionnel) juste avant le renforcement sucré (stimulus inconditionnel). Après apprentissage, l'odeur apprise, présentée seule, déclenchera l'extension du proboscis. De même, une autre odeur perçue par l'abeille comme similaire à l'odeur apprise, pourra déclencher une réponse, dite de généralisation. Nous avons ainsi mesuré les réponses de

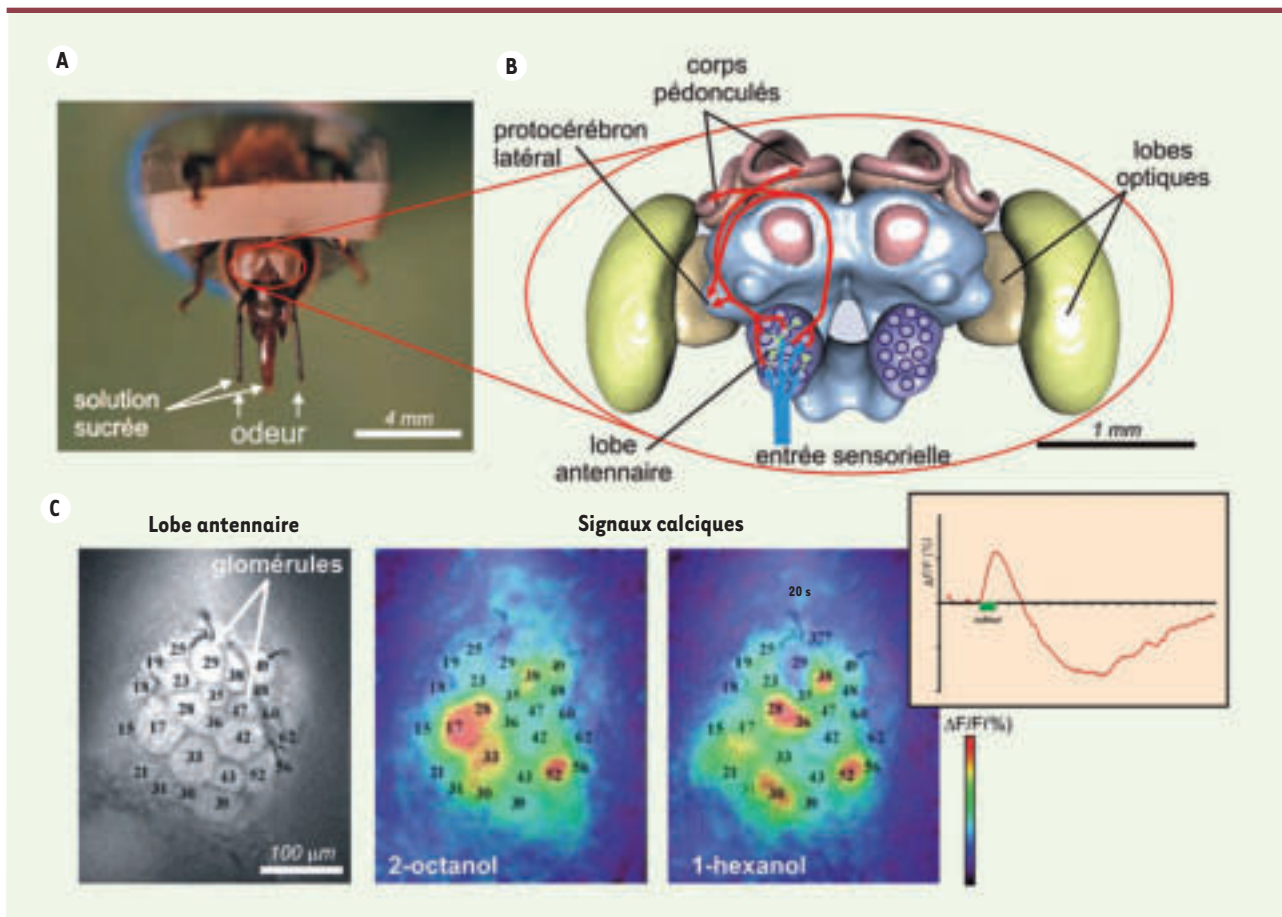


généralisation de plus de 2 000 abeilles mesurant ainsi la similitude perceptuelle parmi 120 paires d'odeurs. La forte corrélation obtenue entre les données comportementales et les données d'imagerie calcique a ainsi prouvé que deux odeurs induisant des motifs d'activation glomérulaire similaires dans le cerveau sont traitées comme similaires par les abeilles dans leur comportement. On a donc bien accès, grâce à l'imagerie calcique *in vivo*, à une partie du « code olfactif ».

Ca²⁺ acteur de plasticité

Le lobe antennaire est une des structures cérébrales impliquées dans la formation de la mémoire olfactive. Des travaux d'imagerie calcique ont montré une plasticité des signaux glomérulaires [8, 9]. Une de ces études a ainsi comparé les signaux calciques obtenus avant et après un apprentissage olfactif dans lequel une odeur A est récompensée et une odeur B ne l'est pas [8]. Quelques minutes après l'apprentissage, les signaux calciques induits par l'odeur A

étaient significativement augmentés, ce qui n'était pas le cas pour l'odeur B. L'importance du Ca²⁺ comme acteur précoce dans les phénomènes de plasticité synaptique est bien admise. Il peut agir aussi bien au niveau pré- que post-synaptique, et provenir du milieu extracellulaire ou des réserves intracellulaires [10]. Chez les insectes, la formation d'une mémoire olfactive à long terme, dépendante comme chez les vertébrés de la synthèse de nouvelles protéines, peut être induite par une stimulation cal-





cique. Ainsi, chez le grillon, un traitement induisant une augmentation intracellulaire de Ca^{2+} , associé à une seule association odeur-récompense (qui ne produit normalement qu'une mémoire à court terme) est suffisant pour produire une mémoire à long terme [11].

La connaissance de l'origine des flux calciques révélés par l'imagerie *in vivo* dans le lobe antennaire [4, 6, 8, 9] est déterminante pour comprendre les phénomènes de perception et d'apprentissage olfactifs. Au sein des glomérules, différents types neuronaux s'associent en réseau. Les neurones sensoriels olfactifs (~60 000) se connectent avec des neurones de deuxième ordre, les neurones de projection (~800), qui transmettent l'information traitée dans le lobe antennaire vers les centres nerveux supérieurs (Figure 1B). Dans les glomérules, des neurones inhibiteurs locaux (~4 000) se connectent avec les deux autres types cellulaires. De nombreux éléments indiquent que les neurones sensoriels et neurones de projection sont cholinergiques. C'est pourquoi l'acétylcholine (ACh) est présentée comme le neurotransmetteur de la voie nerveuse olfactive. De plus, si l'on bloque la transmission liée à l'ACh à l'aide d'agents pharmacologiques, on observe des troubles de l'apprentissage et de la mémoire olfactive qui indiquent que des récepteurs nicotiniques et muscariniques sont présents, et sont impliqués dans des processus mnésiques différents [12]. Les récepteurs ionotropes nicotiniques (AChRn) sont perméables aux cations et induisent une entrée de Ca^{2+} , soit par le canal ionique, soit du fait de la dépolarisation. Les récepteurs métabotropes muscariniques (AChRm) entraînent l'activation de

cascades intracellulaires pouvant conduire à la mobilisation des stocks calciques intracellulaires. On pense que les deux types de récepteurs sont présents dans le lobe antennaire. En particulier, des ARN messagers codant pour des sous-unités entrant dans la composition de différents types de récepteurs nicotiniques ont été révélés par hybridation *in situ* dans les cellules du lobe antennaire [13]. Lors de la formation de la mémoire à long terme, le Ca^{2+} libéré par les deux voies citées plus haut, peut agir soit directement sur les facteurs de transcription (par exemple, facteurs DREAM), soit de manière indirecte (par exemple, facteurs CREB), par l'intermédiaire des protéines liant le Ca^{2+} (calmodulines) et d'autres acteurs intermédiaires. Chez l'abeille, le monoxyde d'azote (NO), l'AMPc et la PKA sont tous impliqués dans la formation de la mémoire olfactive à long terme [14]. Les travaux ultérieurs devront expliquer comment la signalisation calcique au sein des glomérules donne lieu à une mémoire stable et spécifique de l'odeur apprise (donc liée au motif d'activité glomérulaire) et quels sont les gènes dépendant du Ca^{2+} qui sont alors exprimés. Le développement de méthodes permettant d'imager sélectivement les différentes populations neuronales du lobe, ou de révéler *in vivo* les flux des autres acteurs de la plasticité (NO, AMPc, etc.) seront des étapes importantes. Enfin, la relation existant entre les processus mnésiques ayant lieu dans le lobe antennaire et ceux impliquant les centres cérébraux supérieurs, sera aussi analysée. ♦

Calcium and olfaction in an insect model: activity marker and actor of plasticity

RÉFÉRENCES

- Hildebrand JG, Shepherd GM. Mechanisms of olfactory discrimination: converging evidence for common principles across phyla. *Annu Rev Neurosci* 1997; 18 : 5999-6008.
- Vassar R, Chao SK, Sitcheran R, et al. Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell* 1994; 79 : 981-91.
- Rodrigues V. Spatial coding of olfactory information in the antennal lobe of *Drosophila melanogaster*. *Brain Res* 1988; 453 : 299-307.
- Joerges J, Kuttner A, Galizia CG, et al. Representations of odours and odour mixtures visualized in the honeybee brain. *Nature* 1997; 387 : 285-8.
- Menzel R, Giurfa M. Cognitive architecture of a mini-brain: the honeybee. *Trends Cogn Sci* 2001; 5 : 62-71.
- Sachse S, Rappert A, Galizia CG. The spatial representation of chemical structures in the antennal lobe of honeybees: steps towards the olfactory code. *Eur J Neurosci* 1999; 11 : 3970-82.
- Guerrieri F, Schubert M, Sandoz JC, et al. Perceptual and neural olfactory similarity in honeybees. *PLoS Biol* 2005; 3 : 1-14.
- Faber T, Joerges J, Menzel R. Associative learning modifies neural representations of odors in the insect brain. *Nat Neurosci* 1999; 2 : 74-8.
- Sandoz JC, Galizia CG, Menzel R. Side-specific olfactory conditioning leads to more specific odor representation between sides but not within sides in the honeybee antennal lobes. *Neurosci* 2003; 120 : 1137-48.
- Berridge MJ. Neuronal calcium signaling. *Neuron* 1998; 21 : 13-26.
- Matsumoto Y, Unoki S, Aonuma H, et al. Critical role of nitric oxide-cGMP cascade in the formation of cAMP-dependent long-term memory. *Learn Mem* 2006; 13 : 35-44.
- Gauthier M, Dacher M, Thany S, et al. Involvement of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic brain receptors in long-term memory formation in the honeybee (*Apis mellifera*). *Neurobiol Learn Mem* 2006; 86 : 164-74.
- Thany SH, Crozatier M, Raymond-Delpech V, et al. G. Apis α 2, Apis α 7-1 and Apis α 7-2: three new neuronal nicotinic acetylcholine receptor α -subunits in the honeybee brain. *Gene* 2005; 344 : 125-32.
- Müller U. Prolonged activation of cAMP-dependent protein kinase during conditioning induces long-term memory in honeybees. *Neuron* 2000; 27 : 159-68.
- Brandt R, Rohlfing T, Rybak J, et al. Three-dimensional average-shape atlas of the honeybee brain and its applications. *J Comp Neurol* 2005; 492 : 1-19.

ILLUSTRATIONS DES ARTICLES (vignettes) : p. 53 : structure présumée du canal P/Q comportant les différentes mutations répertoriées, ainsi qu'une trace de ce type de courant calcique. Le fait qu'un canal calcique spécifiquement exprimé dans les neurones soit impliqué dans la migraine hémiplegique familiale a beaucoup frappé les esprits (© photo Norbert Weiss) - p. 64 : motoneurone (photo Christopher Henderson - © Photothèque Inserm) - p. 67 : le marqueur lysosomal Lamp-1 est représenté en vert, alors que les complexes CMH de classe I sont en rouge. Les cellules colorées sont des cellules dendritiques humaines, produites par culture de monocytes de sang humain en présence d'IL-4 et de GM-CSF pendant une semaine. La photo montre des cellules non activées, où l'on trouve une bonne partie des molécules du CMH-I dans l'appareil de Golgi, et LAMP-1 dans des structures tubulaires (© photo Peter van Endert) - p. 75 : ovocyte humain juste après la fécondation (photo Jean Parinaud - © Photothèque Inserm) - p. 81, p. 88, p. 93 : lésion d'athérome au niveau de la racine de l'aorte (© photo Giuseppina Caligiuri) - p. 95 : triple hélice d'ADN (photo Sheng Sun-Jian - © Photothèque Inserm) - p. 102 : embryon au stade blastocyste (© photo Jean-Paul Renard) - p. 105 : image d'hémophagocytose (© photo Geneviève de Saint-Basile).

Calcium et contrôle de la photosynthèse C₄ Mécanisme de signalisation et phosphorylation de la phosphoénolpyruvate carboxylase

Jean Vidal, Jean-Noël Pierre, Aurélie Gousset-Dupont, Bénédicte Leboutteiller, Patrice Meimoun, Jose-Antonio Monreal, Anna Feria Bourrellier, Sofia García-Mauriño, Cristina Echevarría



Calcium et régulation des gènes en conditions normales et pathologiques
GDR 2688

J. Vidal, J.N. Pierre, A. Gousset-Dupont, B. Leboutteiller, P. Meimoun, A. Feria Bourrellier : Institut de Biotechnologie des Plantes, Université de Paris-Sud, UMR CNRS 8618 et GDR 2688, 91405 Orsay Cedex, France.

J.A. Monreal, S. García-Mauriño, C. Echevarría : Laboratoire de Physiologie Végétale, Faculté de Biologie, 91405 Orsay Cedex, France.

Jean.vidal@ibp.u-psud.fr

Cadre anatomique et métabolique de la photosynthèse C₄

Les plantes de type C₄ présentent des caractéristiques anatomiques et biochimiques qui composent ce que l'on nomme communément le syndrome C₄. L'architecture de la feuille est en couronne (anatomie Kranz), formée de deux strates cellulaires concentriques, le mésophylle et la gaine périvasculaire (Figure 1). Il existe plusieurs variantes du modèle C₄ mais le schéma général de division des tâches dans ces deux types cellulaires est conservé. Ainsi, deux cycles, C₄ et de Benson-Calvin coopèrent à la fonction d'assimilation du CO₂ par la feuille (Figure 1). Dans ce contexte photosynthétique fondé sur une séparation physique des enzymes et impliquant un intense trafic intercellulaire de métabolites, la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC, EC 4.1.1.31) catalyse la première étape de la voie métabolique (carboxylation du PEP par le bicarbonate) dans le mésophylle et fait l'objet d'une régulation particulièrement élaborée.

La phosphorylation de la PEPC photosynthétique par la PEPC kinase module ses propriétés fonctionnelles

La PEPC photosynthétique est un homotétramère de masse 440 kDa dont l'activité est sous contrôle métabolique ; le malate (rétro-inhibiteur), le glucose-6-P (G-6P), les trioses-P (T-P) et la glycine (activateurs allostériques) en sont les

principaux effecteurs. La phosphorylation de l'enzyme à la lumière sur une sérine du domaine amino-terminal de la sous-unité (ERHHSIDAQLR) module l'affinité des effecteurs, de sorte qu'une protection accrue contre le malate est observée (par exemple, V_{max} et K_i malate augmentent, K_a G-6P diminue) [1, 2].

Le clonage de l'ADNc et des gènes de PEPC kinase (PEPCK) a été réalisé récemment à partir de plantes C₃, C₄ et CAM [3, 4], permettant d'établir la structure primaire de l'enzyme et de révéler des caractéristiques originales : (1) sa taille (32 kDa) est celle d'une sous-unité catalytique, sans extensions ; (2) son activité est contrôlée au niveau transcriptionnel (quantité), processus fortement stimulé par les stress salins (NaCl, LiCl) [5], et par des métabolites effecteurs (malate et G-6P) ; (3) elle est phylogénétiquement apparentée aux CDPK (*calcium dependent protein kinases*, superfamille des CDPK/SnRK), bien qu'elle ne possède pas de site de fixation du calcium : (4) enfin, la seule cible physiologique connue de cette enzyme est la PEPC.

L'inhibition de la phosphorylation de la PEPC *in vivo* lors d'un traitement des feuilles par la cycloheximide (CHX : composé bloquant la synthèse de la PEPC et l'augmentation de son activité catalytique) [6] provoque une perte presque totale de la fixation photosynthétique de CO₂ [7]. Nous avons recherché par quel mécanisme l'activité de

la PEPCk est mise en place à la lumière dans le mésophylle.

L'activité de la PEPCk est contrôlée par une chaîne de transduction du signal lumineux impliquant les flux calciques dans le mésophylle

Une technique d'obtention de protoplastes de cellules de mésophylle (*Digitaria sanguinalis* et sorgho), et une approche combinant la pharmacologie cellulaire, la microscopie confocale et la cytométrie de flux ont été mises au point pour décrypter le mécanisme de transduction du signal lumineux [8]. Cette démarche expérimentale nous a permis dans un premier temps d'identifier certains relais de la chaîne, notamment et en séquence : (1) un métabolite photosynthétique, l'acide 3-phosphoglycérique (formé dans la gaine périvasculaire par le cycle de Benson-Calvin et transporté dans les chloroplastes des cellules de mésophylle sous forme protonée) provoque l'alcalinisation du pH cytosolique (pH_c) : (2) un efflux de Ca²⁺ vacuolaire dû à une phospholipase C (PI-PLC) et la production transitoire d'IP₃ ; (3) l'activation d'une protéine kinase dépendante du Ca²⁺ ; (4) la synthèse de la PEPCk, indépendante du Ca²⁺.

Dans ce mécanisme de transduction, l'implication du calcium n'est qu'inférée des données pharmacologiques. Appliquées aux protoplastes de mésophylle C₄, les techniques classiques d'image-