

Une approche génétique de la plasticité synaptique et des processus d'apprentissage et de mémoire

L'apprentissage et la mémoire sont des processus cognitifs complexes dont les mécanismes cellulaires et moléculaires sont encore mal appréciés. Ainsi, comment la mémoire est formée, stockée, récupérée après différents espaces de temps n'est pas totalement compris. Il a été suggéré que la plasticité synaptique dans le cerveau, c'est-à-dire la modification de l'efficacité de la communication entre les neurones ou efficacité synaptique, pourrait constituer une base cellulaire de la mémoire. Le renforcement ou l'affaiblissement de l'efficacité synaptique pourraient représenter des modifications durables impliquées dans la mémorisation et l'oubli des informations. Plusieurs formes de plasticité synaptique ont été mises en évidence dans le cerveau, notamment *in vitro* et *in vivo* dans l'hippocampe, structure activée lors de la formation de traces mnésiques. La potentialisation à long terme (LTP) et la dépression à long terme (LTD) sont deux formes de plasticité synaptique induites par stimulation électrique et servant de modèles expérimentaux pour l'étude des mécanismes moléculaires de certaines fonctions de l'hippocampe.

Afin d'étudier les mécanismes moléculaires de la plasticité synaptique et des processus d'apprentissage et de mémoire, nous avons examiné le rôle joué dans ces processus par une enzyme, la phosphatase calcineurine ou phosphatase 2B (PP2B). Nous nous sommes intéressés à la calcineurine car des études pharmacologiques ont montré que son inhibition conduit à un blocage de la LTD et, dans certains cas de la LTP, et ont suggéré un rôle de la calcineurine dans la mémoire à long terme. Selon certaines de ces études, la cal-

calcineurine réglerait l'activité de kinases, notamment de la protéine-kinase A (PKA), ainsi que de phosphatases, telles que les phosphatases 1 et 2A (PP1/PP2A) [1]. Selon le modèle avancé, la calcineurine serait la première phosphatase d'une cascade composée de la PKA et de PP1/PP2A, déclenchée par le flux entrant de Ca^{2+} au travers des récepteurs NMDA (*m/s n° 8, vol. 6, p. 824*). Dans cette cascade, la calcineurine conduirait à une diminution de la réponse synaptique et à un affaiblissement des connexions entre les neurones [2, 3].

Pour tenter d'élucider le rôle de la calcineurine *in vivo* dans la plasticité synaptique, l'apprentissage et la mémoire, nous avons employé une approche génétique. Nous avons créé des souris transgéniques (ou mutantes), génétiquement modifiées par injection d'un fragment d'ADN étranger dans un œuf fécondé, chez lesquelles l'activité de la calcineurine est augmentée dans des régions spécifiques du cerveau. L'analyse des conséquences de l'augmentation de l'activité de la calcineurine dans le cerveau a montré qu'une nouvelle forme de LTP, la LTP intermédiaire (I-LTP), est réduite chez les souris mutantes et que cette forme de LTP dépend de la calcineurine et de la PKA [4]. Les analyses ont aussi révélé que, parallèlement au défaut de I-LTP, les souris mutantes présentent des troubles de la mémoire spatiale et non spatiale qui affectent plus précisément la phase de transition entre la mémoire à court terme et la mémoire à long terme [5]. Nous avons observé que les défauts de I-LTP et de mémoire sont corrigés quand, chez des souris adultes, l'expression du transgène calcineu-

rine est bloquée grâce à un système de régulation fondé sur la doxycycline (un antibiotique). Ces résultats suggèrent donc que les défauts observés sont directement liés au transgène calcineurine.

Une nouvelle forme intermédiaire de LTP (I-LTP) est défectueuse chez les souris mutantes

Afin d'augmenter l'activité de la calcineurine dans des régions spécifiques du cerveau de souris, une forme activée de la calcineurine [6] a été exprimée sous le contrôle de séquences régulatrices spécifiques permettant de cibler localement le transgène (*m/s n° 5, vol. 13, p. 698*) [7]. Plusieurs lignées de souris transgéniques ont été créées, chacune obtenue à partir d'un œuf injecté indépendamment. Dans une des lignées, l'activité de la calcineurine est augmentée d'environ 75 % dans l'hippocampe adulte. Pour examiner les conséquences fonctionnelles de cette augmentation de l'activité de la calcineurine sur la plasticité neuronale, nous avons étudié la LTP et la LTD dans l'hippocampe.

Classiquement, deux formes de LTP sont décrites chez la souris et le rat, la LTP précoce (*early LTP* ou E-LTP) et la LTP tardive (*late LTP* ou L-LTP) [8, 9]. Ces deux formes de plasticité sont induites par différents protocoles de stimulation et leur mise en place implique une gradation des modifications biochimiques. Ainsi, l'E-LTP, induite par un train d'une seconde de stimulations à haute fréquence (100 Hz), ne dépend pas de l'activation de la PKA ni de la synthèse de nouvelles protéines. La L-LTP est induite par quatre trains d'une seconde de stimulations à

haute fréquence (100 Hz) et nécessite l'activation de la PKA et la synthèse de nouvelles protéines. Deux formes de LTD ont aussi été décrites, elles sont induites par une stimulation à basse fréquence (1 Hz) de quinze minutes et se distinguent par les différents récepteurs membranaires dont elles dépendent. Des analyses électrophysiologiques dans des tranches d'hippocampe de souris adulte ont révélé un défaut de LTP mais une LTD normale. La L-LTP est sévèrement réduite chez les souris mutantes (*figure 1B*) alors que la E-LTP est normale (*figure 1A*). Afin d'examiner si les mécanismes de la L-LTP sont totalement altérés chez les souris mutantes, nous avons utilisé un autre protocole permettant d'induire la L-LTP sans stimulation électrique mais par des agents pharmacologiques (des agonistes des récepteurs D1-D5 de la dopamine ou un agoniste de la PKA, le Sp-cAMPS). La L-LTP obtenue pharmacologiquement est normale chez les souris mutantes, ce qui suggère que les mécanismes d'expression de la LTP sont normaux et que le défaut de L-LTP observé réside probablement dans la phase d'initiation de la LTP. Afin d'isoler plus précisément cette phase d'initiation, nous avons utilisé un protocole de stimulation de deux trains d'une seconde à 100 Hz et induit une LTP intermédiaire, entre la E-LTP et la L-LTP. Nous avons montré que la I-LTP est robuste et durable et présente des caractéristiques biochimiques intermédiaires entre celles de la E-LTP et de la L-LTP. Elle dépend de la PKA mais ne nécessite pas la synthèse de nouvelles protéines. La I-LTP est réduite chez les souris mutantes, par rapport aux souris témoins (*figure 1C*). Ces résultats indiquent qu'un excès de calcineurine perturbe la LTP dépendante de la PKA et suggèrent que la calcineurine module la LTP en s'opposant aux effets de la PKA. Enfin, la I-LTP et la L-LTP reposeraient en partie sur un équilibre entre calcineurine et PKA.

Les souris mutantes ont des troubles de mémoire spatiale

Quelles sont les conséquences des défauts de I-LTP et L-LTP sur les pro-

cessus d'apprentissage et de mémoire? Afin de répondre à cette question, nous avons fait subir aux souris transgéniques une batterie de tâches comportementales. Le labyrinthe circulaire de Barnes, par exemple, permet de tester la mémoire spatiale qui dépend de l'hippocampe [10]. Ce labyrinthe est une plateforme circulaire comprenant 40 ouvertures à la périphérie dont l'une cache un tunnel permettant à la souris de s'échapper (*figure 2A*). La souris placée au centre de la plate-forme doit trouver le tunnel pour échapper à des signaux désagréables (lumière et signal sonore intenses). Pour localiser le tunnel, une souris procède suivant trois stratégies de recherche: au hasard, sérielle et spatiale. La stratégie de recherche au hasard consiste à chercher le tunnel de façon aléatoire et conduit à un grand nombre d'erreurs. La stratégie de recherche sérielle, pour laquelle le nombre d'erreurs diminue, consiste à vérifier les ouvertures de manière consécutive jusqu'à celle menant au tunnel, la première ouverture étant sélectionnée de manière aléatoire. La stratégie de recherche spatiale consiste à se positionner dans l'espace et à localiser le tunnel en utilisant la relation entre les repères disposés dans la salle d'expérimentation. Cette stratégie est la plus efficace et dépend étroitement de l'activité de l'hippocampe. Dans cette tâche comportementale, la performance des souris est mesurée par le nombre d'erreurs faites durant chaque session d'entraînement. Le nombre d'erreurs correspond au nombre de visites d'ouvertures sous lesquelles il n'y a pas de tunnel. Le critère d'apprentissage est atteint quand trois, ou moins de trois erreurs sont faites pendant cinq jours consécutifs sur six, les souris subissant le test une fois par jour.

Sur la plate-forme circulaire de Barnes, les souris mutantes ont un déficit de mémoire spatiale (*figure 2B*). Malgré une diminution du nombre d'erreurs au cours du temps, elles n'atteignent pas le critère d'apprentissage et ne sont pas capables de trouver le tunnel échappatoire. L'analyse de l'emploi des stratégies a révélé que les souris mutantes n'utilisent pratiquement

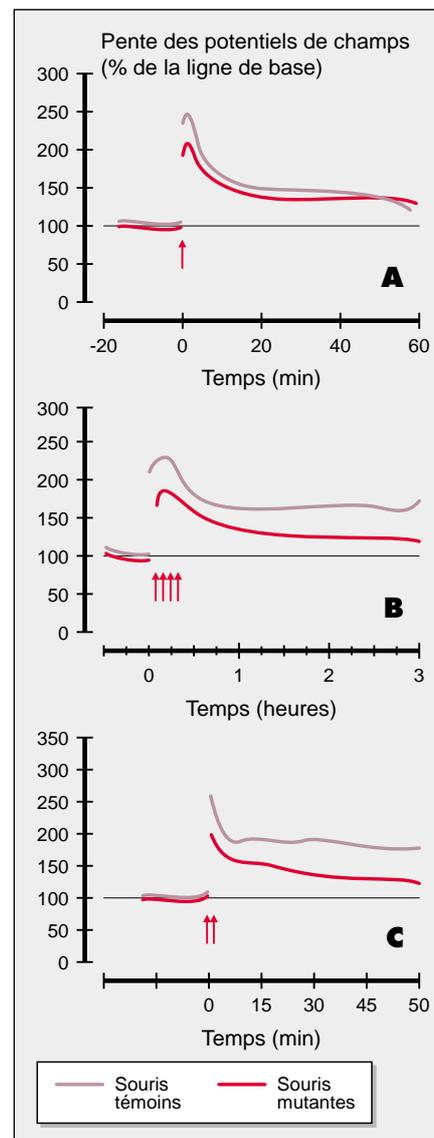


Figure 1. **L'augmentation de l'activité de la calcineurine dans l'hippocampe conduit à des déficits de L-LTP et I-LTP.** **A.** Les souris mutantes ont une E-LTP (early-long term potentiation) induite par un train d'une seconde de stimulations à haute fréquence (100 Hz) normale. **B-C.** La L-LTP (B) (late-long term potentiation) induite par quatre trains d'une seconde de stimulations à haute fréquence (100 Hz) et la I-LTP (C) (intermediary-long term potentiation) induite par deux trains d'une seconde de stimulations à haute fréquence (100 Hz) sont déficientes chez les souris mutantes.

pas la stratégie de recherche spatiale mais essentiellement les stratégies de recherche au hasard et sérielle. Ainsi,

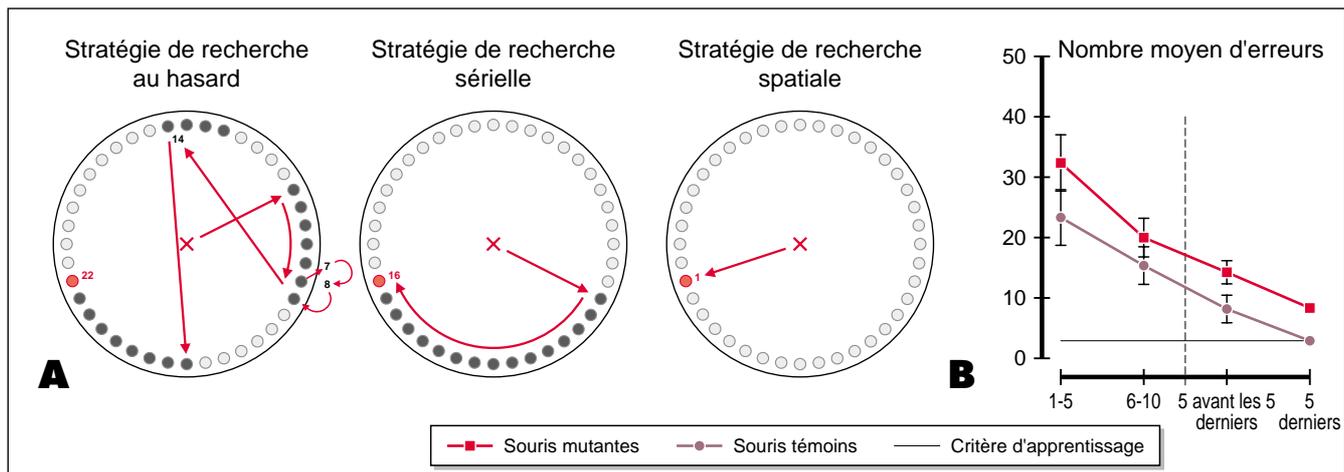


Figure 2. **La mémoire spatiale des souris mutantes est déficiente.** **A.** Schéma de la plate-forme circulaire de Barnes et des différentes stratégies de recherche employées. **B.** Nombre d'erreurs faites en fonction du temps sur la plate-forme de Barnes durant les cinq premiers jours (1-5), les cinq jours suivants (6-10), les cinq derniers jours (5 derniers) et les cinq jours précédant les cinq derniers (5 avant les 5 derniers).

les souris mutantes n'apprennent la tâche de Barnes que partiellement, elles sont capables de stocker certaines informations en mémoire mais ont un déficit spécifique dans le stockage de la mémoire spatiale. Pour évaluer la gravité du défaut de stockage des informations chez les souris mutantes, un protocole intensif permettant de renforcer l'apprentissage a été utilisé sur la tâche de Barnes. Ce protocole consiste à tester les souris quatre fois par jour au lieu d'une seule fois, chaque essai étant séparé du suivant par 90 secondes. Dans ces conditions, les souris mutantes se comportent comme les souris témoins et atteignent le critère d'apprentissage en faisant un nombre équivalent d'erreurs. Le déficit de mémoire spatiale peut donc être compensé par un apprentissage soutenu. Les souris mutantes sont en réalité capables de stocker des informations spatiales mais présenteraient un déficit dans l'acquisition ou la consolidation des informations.

Les souris mutantes ont un déficit dans une phase de transition entre la mémoire à court terme et la mémoire à long terme

La plate-forme circulaire de Barnes permet de tester la mémoire spatiale formée par l'acquisition progressive d'informations accumulées jour après jour. Cette tâche ne permet pas de

décomposer les différentes phases de la mémoire et, dans le cas des souris mutantes, de déterminer si le déficit réside dans la mémoire à court terme ou dans la mémoire à long terme. Pour définir quelle phase de la mémoire est altérée chez les souris mutantes, nous avons employé une tâche d'identification de nouvel objet dépendant de l'hippocampe et permettant de tester la mémoire à différents intervalles de temps [11]. La tâche d'identification d'un nouvel objet consiste à exposer une souris à deux objets pendant quinze minutes, à la remettre dans sa cage puis, après différents intervalles de temps (court terme: 30 min, moyen terme: 2 h et long terme: 24 h), à la replacer en présence d'un seul des objets familiers et d'un nouvel objet. Lors de la première exposition, la souris va naturellement explorer les deux objets de manière équivalente. Après un temps de latence, la souris, replacée en présence d'un des objets familiers et d'un nouvel objet, va préférentiellement explorer le nouvel objet car elle conserve une mémoire de l'objet familier et ne manifeste plus d'intérêt à l'explorer (figure 3A). La performance de la souris est évaluée par un indice de préférence qui représente le degré de préférence pour le nouvel objet. Un indice de préférence de 100 % indique que l'animal ne manifeste aucune préférence pour l'un ou l'autre des objets, un indice de préfé-

rence supérieur à 100 % indique une préférence pour le nouvel objet et un indice inférieur à 100 %, une préférence pour l'objet familier. Dans ce test, les souris mutantes et témoins manifestent une préférence pour le nouvel objet après un intervalle de rétention de 30 min. Cela indique qu'après une latence de 30 minutes, la mémoire pour l'objet familier est normale (figure 3B). Après 24 h, alors que les souris témoins continuent à avoir une préférence pour le nouvel objet, les souris mutantes explorent l'objet familier et le nouvel objet de manière similaire. Elles ne se souviennent plus de l'objet familier et l'explorent comme un nouvel objet. Ce défaut de mémoire, très marqué à 24 h, commence à apparaître après un intervalle de 2 h (figure 3B). Ainsi, les souris mutantes ont une mémoire à court terme normale mais une mémoire à long terme déficiente et le déficit commence à apparaître à moyen terme. Il semble donc que le défaut de mémoire réside dans la phase de transition entre la mémoire à court terme et la mémoire à long terme.

Les défauts de I-LTP et de mémoire sont corrigés par la suppression de l'expression du transgène chez des souris adultes

Par la méthode classique de transgénèse, il n'est pas possible de déterminer si un déficit observé chez des

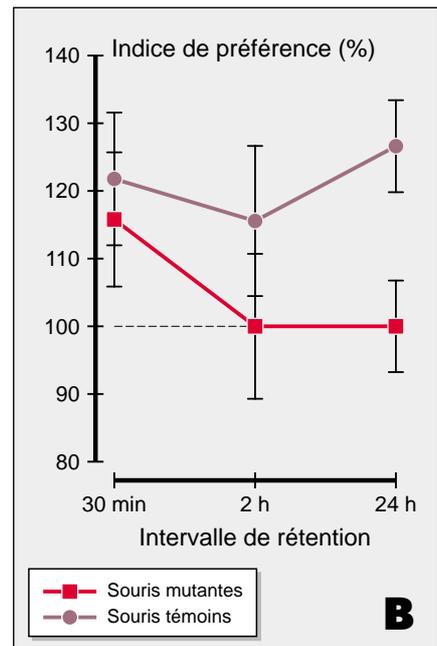
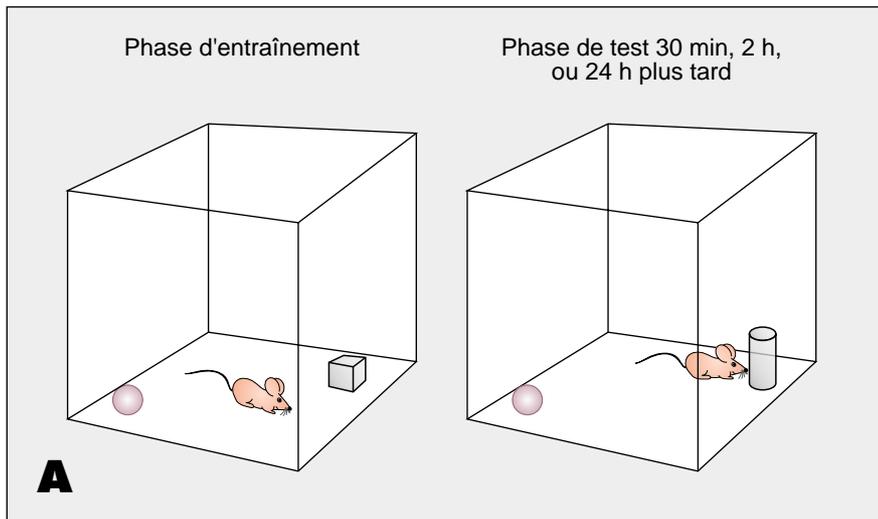


Figure 3. **Les souris mutantes ont une mémoire à court terme normale mais une mémoire à long terme déficiente.** **A.** La tâche d'identification d'objet. Schéma de la boîte contenant les deux objets (deux nouveaux objets à gauche pour la phase d'entraînement, un familier et un nouveau à droite pour la phase de test) explorés par la souris. **B.** Diagramme représentant l'indice de préférence en fonction des intervalles de rétention pour les souris mutantes et témoins. L'indice de préférence représente le temps passé par la souris à explorer le nouvel objet, divisé par le temps passé à explorer les deux objets. Il est exprimé en pourcentage (car divisé par 0,5 qui représente l'absence de préférence puis multiplié par 100).

souris transgéniques est directement lié à l'expression du transgène ou bien s'il résulte d'une anomalie développementale induite par l'expression du transgène au cours du développement précoce. Pour distinguer ces deux effets, nous avons développé un système d'expression réglable, le système tTA, qui permet de réprimer par la tétracycline l'expression du transgène chez l'adulte [7, 12]. Le système tTA est constitué d'une protéine hybride (tTA) capable d'activer la transcription d'un gène cible placé en aval de séquences régulatrices spécifiques de tTA. La transcription du gène cible par tTA est bloquée par la tétracycline et ses analogues tels que la doxycycline [12]. L'étude de souris mutantes adultes chez lesquelles l'expression du transgène calcineurine est sous le contrôle du système tTA, montre que les défauts de I-LTP et de mémoire spatiale sont corrigés après un traitement par la doxycycline administrée dans l'eau de boisson pendant plusieurs semaines. Ces résultats indiquent que les défauts observés ne sont pas dus à une ano-

malie du développement mais sont probablement liés à un effet direct de l'excès de calcineurine sur les fonctions neuronales.

Conclusion

Les résultats décrits montrent qu'un excès de calcineurine dans le cerveau conduit à un défaut de I-LTP mais n'affecte pas la LTD et produit un déficit de mémoire spatiale et non-spatiale. Ces résultats, associés à d'autres études effectuées sur différents types de souris modifiées génétiquement [13-15] suggèrent une similitude dans les mécanismes qui sous-tendent la LTP et l'apprentissage. Ces recherches illustrent aussi comment la génétique peut être mise à profit pour tenter de comprendre les mécanismes moléculaires des processus cognitifs tels que la mémoire. Ainsi, combinée à des analyses électrophysiologiques et comportementales, la génétique permet d'élucider certains des mécanismes élémentaires de la plasticité synaptique et d'identifier quelles molécules sont susceptibles d'intervenir dans les pro-

cessus de stockage de la mémoire. Les implications médicales de ces recherches sont de tenter d'améliorer à moyen ou long terme les maladies affectant directement ou indirectement la mémoire. Les données concernant la calcineurine et son rôle dans les processus de stockage de la mémoire pourraient peut-être expliquer certains effets secondaires de la ciclosporine, un inhibiteur de la calcineurine à propriété immunosuppressive utilisé dans le traitement contre le rejet de greffe et dont la prise chronique est souvent accompagnée de troubles neurologiques ■

Remerciements

Je remercie Danny Winder pour les analyses électrophysiologiques, Mary Elizabeth Bach pour les études comportementales et Eric Kandel pour son appui scientifique et matériel, et son enthousiasme constant durant la réalisation de ce travail. Je remercie aussi vivement Marika Nosten-Bertrand et Bruno Giros pour leur soutien, leurs suggestions et leur encouragement durant l'écriture de cet article.

RÉFÉRENCES

1. Yankel JL. Calcineurin regulation of synaptic function: from ion channels to transmitter release and gene transcription. *Trends Neurosci* 1997; 18: 124-34.
2. Lisman J. The CaM kinase II hypothesis for the storage of synaptic memory. *Trends Neurosci* 1994; 17: 406-12.
3. Blitzer RD, Wong T, Nouranifar R, Iyengar R, Landau EM. Postsynaptic cAMP pathway gates early LTP in hippocampal CA1 region. *Neuron* 1995; 15: 1403-14.
4. Winder DG, Mansuy IM, Osman M, Moalem TM, Kandel ER. Genetic and pharmacological evidence for a novel, intermediate phase of long-term potentiation suppressed by calcineurin. *Cell* 1998; 92: 25-37.
5. Mansuy IM, Mayford M, Jacob B, Kandel ER, Bach M. Restricted and regulated overexpression reveals calcineurin as a key component in the transition from short-term to long-term memory. *Cell* 1998; 92: 39-49.
6. O'Keefe SJ, Tamura J, Kincaid R, Tocci MJ, O'Neill EA. FK-506 and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature* 1992; 357: 692-4.
7. Mayford M, Baranes D, Podsypanina K, Kandel ER. The 3'-untranslated region of CaMKII α is a cis-acting signal for the localization and translation of mRNA in dendrites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 13250-5.
8. Huang YY, Nguyen PV, Abel T, Kandel ER. Long-lasting forms of synaptic potentiation in the mammalian hippocampus. *Learn Mem* 1996; 3: 74-85.
9. Roberson ED, English JD, Sweatt JD. A biochemist's view of long-term potentiation. *Learn Mem* 1996; 3: 1-24.
10. Barnes C. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 1979; 93: 74-104.
11. Aggleton JP. One-trial object recognition by rats. *Quart J Exp Psychol* 1985; 37: 279-94.
12. Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 5547-51.
13. Mayford M, Abel T, Kandel ER. Transgenic approaches to cognition. *Curr Opin Neurobiol* 1995; 5: 141-8.
14. Mayford M, Mansuy IM, Muller RU, Kandel ER. Memory and behavior: a second generation of genetically modified mice. *Curr Biol* 1997; 7: 580-9.
15. Wilson MA, Tonegawa S. Synaptic plasticity, place cells and spatial memory: study with second generation knockouts. *Trends Neurosci* 1997; 20: 102-6.

Isabelle Mansuy

Inserm U. 288, c/o Bruno Giros, 91, boulevard de l'Hôpital, 75634 Paris Cedex 13, France, et Center for neurobiology and behavior, Howard Hughes Medical Institute, Columbia University, New York, NY 10032, États-Unis.

TIRÉS À PART

I. Mansuy.

Alsace-France, 25-28 septembre / September 25-28

Cascades de prolifération et proto-oncogènes Proliferation cascades and protooncogenes



Hormones et Régulation Cellulaire XXIII^e Symposium Européen du Mont S¹-Odile

Hormones and Cell Regulation XXIIIrd European Symposium of Mont S¹-Odile

INSCRIPTION ET SOUMISSION DES RÉSUMÉS
REGISTRATION AND SUBMISSION OF ABSTRACTS
DATE LIMITE : 15 JUIN 98 / DEADLINE: JUNE 15, 98

INFORMATION ET INSCRIPTION
INFORMATION AND INSCRIPTION
Jacques E. Duront, Symposium S¹-Odile
IRBPH, ULB, Faculté de Médecine, Campus Erasme (CP 601)
Rue de la Loi 808, B - 1070 Bruxelles, Belgique
Fax: (32) 22 355 46 55 - E-mail: jduront@ulb.ac.be

Récepteurs et cascades prolifératives
Receptors and proliferative cascades

Protéines kinases
Protein kinases

Facteurs de transcription
Transcription factors

Cyclines CDK, Rb
CDK, Rb cyclins

AVEC L'AIDE DE
SUPPORTED BY

INSERM
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ
ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE

COMITÉ SCIENTIFIQUE / SCIENTIFIC COMMITTEE

E.H. Chambaz (France)	F. Hofmann (Allemagne)
J.E. Drenth (Belgique)	R.F. Irvine (Royaume-Uni)
S. Gammeltoft (Danemark)	M. Parker (Royaume-Uni)
B. Groner (Allemagne)	L.A. Pines (Israël)
J. Hiscouze (France)	

COMITÉ D'ORGANISATION / ORGANISING COMMITTEE

Présidents / Chairman	S. Gammeltoft (Danemark)
J.E. Drenth (Belgique)	B. Groner (Allemagne)
	L.A. Pines (Israël)

ORGANISATEURS LOCAUX / LOCAL ORGANISERS

M-F. Bader (France)	F. Hader (France)
---------------------	-------------------

CONFÉRENCIERS CONFIRMÉS / CONFIRMED LECTURERS

D.B. Alexander (Royaume-Uni)	G. Kremer (France)
B. Anas (Suisse)	H. Lind (Royaume-Uni)
K. Anderson (Royaume-Uni)	J.R. Nevins (États-Unis)
J. Barak (Israël)	E. Nigg (Suisse)
R. Bernards (États-Unis)	L. Rosenblatt (Israël)
J.L. Bos (Pays-Bas)	Franz Dijkshuis (Suisse)
P. Chambaz (France)	J.-P. Thiery (France)
G.F. Draetta (Israël)	G. Thomas (Suisse)
B. Groner (Allemagne)	A. Ultsch (Allemagne)
E. Gubits (Allemagne)	G. Vassart (Belgique)
K. Halle (Israël)	R.A. Weinberg (États-Unis)
P.A. Kelly (France)	A. Weizsäcker (Allemagne)

CONFÉRENCES JACQUES MONOD 1998 INTERACTIONS ENTRE LES PARASITES ET LE SYSTÈME IMMUNITAIRE : Protection ou pathologie ?

AUSSOIS (France) - 14-18 septembre 1998

Président : WILSON R. Alan
University of York, Department of Biology, P.O. Box 373, UK-York YO1 5YW, United Kingdom
Phone - Téléphone : + 44 1904 432 830 - Fax - Télécopie : + 44 1904 432 884
E-mail - Courrier électronique : raw3@york.ac.uk

Conférenciers : Barreletto M., Behr C., Buzoni-Gatel D., Capron A., Capron M., Correa-Oliveira R., Desein A., Dobbelaere D., Druilhe P., Dubremetz J.-F., Finkelman F., Grau G., Grecis R., Grimaud J.-A., Gross U., Hill A., Hoffman S., Hontebeyrie M., Kaslow D., Langhorne J., Louis J., Maizels R., Miller H., Milon G., Nutman T., Pujjalon O., Riley E., Scott P., Sher A., Wilson R.A.

DATE LIMITE D'INSCRIPTION : 15 AVRIL 1998