

## Neurobiologie Douleur

# Les bases moléculaires de la mémoire et de l'apprentissage testées par l'invalidation localisée d'un gène dans le cerveau

Le rêve de beaucoup de neurobiologistes est d'unifier les multiples aspects de leur discipline, en supprimant les solutions de continuité entre les approches les plus moléculaires et les plus intégrées, en particulier comportementales. Ce qui a été possible dans d'autres branches de la biologie, comme la génétique ou l'immunologie, devrait l'être aussi pour l'étude du système nerveux. Une série récente d'articles dans *Cell* émanant de plusieurs groupes autour de celui de Susumu Tonegawa au MIT, illustre à merveille les progrès en cours dans cette direction [1-3]. Les auteurs utilisent les méthodes les plus sophistiquées de la biologie moléculaire *in vivo* pour tenter de répondre à une question qui occupe de nombreux laboratoires depuis une vingtaine d'années: quelles sont les bases moléculaires et cellulaires de l'apprentissage et de la mémoire. Si l'ensemble des neurobiologistes est maintenant convaincu que ce sont des changements durables d'efficacité des synapses qui sous-tendent les phénomènes d'apprentissage et de mémoire, les mécanismes et le rôle de cette plasticité synaptique sont loin d'être complètement élucidés.

### Potentialisation à long terme (LTP)

Le modèle le plus étudié dans ce domaine est certainement la potentialisation à long terme (*long term potentiation*, LTP) de l'efficacité de certaines synapses dans l'hippocampe, découverte par Bliss et Lomo en 1973 (voir [4] pour une revue). L'engouement pour ce modèle découle d'une série d'observations

dont on ne sait pas encore s'il s'agit de séduisantes coïncidences ou de phénomènes reliés par une solide relation de causalité. L'hippocampe est une région du cerveau qui joue un rôle important dans la mémorisation chez les mammifères. Chez l'homme, le rôle de l'hippocampe dans la mémoire a été mis en évidence par l'observation du célèbre cas H.M., par Brenda Milner à Montréal. Ce patient qui avait subi une destruction bilatérale de l'hippocampe pour traiter une épilepsie résistante, était (ou plutôt est, car il est toujours vivant) complètement incapable de mémoriser les faits ou les visages nouveaux. En revanche, ses capacités d'apprentissage moteur (mémoire procédurale) étaient intactes. D'autres cas cliniques et des études expérimentales chez l'animal ont conforté le rôle de l'hippocampe dans la mémoire. Chez le rat, la lésion bilatérale de l'hippocampe est responsable d'une incapacité de mémoriser l'environnement visuel dans lequel il est placé. Cette incapacité est bien mise en évidence par le test de Morris, au cours duquel le rat, placé dans une piscine cylindrique contenant un liquide opaque, doit retrouver l'emplacement d'une plateforme immergée en s'aidant d'indices visuels. De façon tout à fait remarquable, l'hippocampe contient des neurones appelés «*place cells*» qui déchargent spécifiquement lorsque l'animal est placé dans un environnement particulier [5]. Chacune de ces cellules peut décharger dans plusieurs environnements différents, et plusieurs cellules peuvent reconnaître des environnements voisins, se recoupant partiellement. On suppose

donc que l'ensemble de ces neurones forment une carte cognitive visuo-spatiale permettant au rat de s'orienter dans l'espace.

On comprend facilement, dans un tel contexte, l'intérêt suscité par les observations de Bliss et Lomo. Ceux-ci avaient montré que la stimulation à une fréquence élevée des fibres afférentes (fibres perforantes) de certains neurones de l'hippocampe (cellules granulaires du gyrus dentelé) entraînait une augmentation prolongée de l'efficacité (LTP) des synapses formées par ces fibres. Cette observation a été étendue à d'autres régions de l'hippocampe, en particulier les synapses entre les fibres collatérales de Schaffer et les cellules pyramidales de la corne d'Ammon 1 (CA1), puis à d'autres régions du cerveau. Il était donc tentant de proposer que la modulation de l'efficacité des synapses des neurones de l'hippocampe par la LTP puisse être le support de la mémoire visuo-spatiale chez le rat et, par extension, de la mémoire non procédurale chez l'homme.

### Mécanismes moléculaires de la LTP

Les mécanismes moléculaires sous-tendant la LTP ne sont qu'en partie connus. Dans les cas que nous avons évoqués (gyrus dentelé et CA1), c'est la mise en jeu des récepteurs canaux ioniques de type NMDA du glutamate qui semble le facteur déclenchant (*m/s n°8, vol. 6, p. 824*) [4]. L'ouverture de ces canaux nécessite simultanément la liaison du glutamate (libéré par la fibre présynaptique) et la dépolarisation du neurone postsynaptique (levant l'obstruction du canal par les

ions  $Mg^{2+}$ ). Cette double condition est réalisée lors de la stimulation à fréquence élevée des fibres afférentes, qui, libérant de grandes quantités de glutamate, provoque la dépolarisation des neurones postsynaptiques par l'intermédiaire de récepteurs non-NMDA du glutamate (*m/s n°4, vol. 13, p. 614*). L'ouverture des canaux NMDA laisse alors entrer des quantités importantes d'ions  $Ca^{2+}$  dans le neurone postsynaptique. La stimulation des récepteurs NMDA et l'augmentation du  $Ca^{2+}$  qui en résulte sont nécessaires à l'installation de la LTP. En revanche, les événements biochimiques ultérieurs, sous-tendant l'expression de la LTP, sont moins bien connus, même si plusieurs protéines kinases semblent impliquées ( $Ca^{2+}$ /calmoduline kinase de type II, protéine kinase C, tyrosine kinases). En fait, la part respective des modifications pré- et postsynaptiques dans l'expression de la LTP, est encore un sujet de débat parmi les spécialistes.

La découverte de substances antagonistes des récepteurs NMDA a permis de tester le rôle de la LTP dans la mémoire visuo-spatiale. Les antagonistes du NMDA injectés dans l'hippocampe, bloquent à la fois l'installation de la LTP et la mémoire visuo-spatiale dans le test de Morris. Toutefois, ces résultats soulèvent deux types d'objections. D'une part, la spécificité pharmacologique (possibilité d'actions sur d'autres cibles que le récepteur NMDA) et la spécificité topographique (possibilité d'action dans d'autres régions du cerveau que l'hippocampe) de telles expériences ne sont pas parfaites. D'autre part, ce qui est plus gênant, le fait qu'un même traitement entraîne la disparition de la LTP et celle de la mémoire visuo-spatiale, ne montre pas que le premier de ces deux phénomènes est la cause du second. Plusieurs travaux récents ont d'ailleurs révélé que, dans certains cas bien spécifiques, une mémoire visuo-spatiale pouvait être acquise par le rat ou la souris dans le test de Morris, malgré le blocage de la LTP dans l'hippocampe. Ces exceptions montrent donc que, même si la LTP est importante, elle n'est pas indispensable à la mémorisation visuo-spatiale. Le problème reste donc entier.

### Induction d'une recombinaison génétique dans les neurones de l'hippocampe

Les récepteurs NMDA sont constitués de plusieurs sous-unités, NMDAR1 qui est indispensable, et NMDAR2, dont il existe plusieurs types (A, B, C, D). L'inactivation des gènes de NMDAR1 ou NMDAR2B est létale à la naissance ou peu après (*m/s n°6/7, vol. 10, p. 722*) [6, 7], alors que l'inactivation du gène de NMDAR2A est compatible avec la vie et s'accompagne d'une diminution de la LTP dans CA1 et de la mémoire visuo-spatiale [8]. Les expériences rapportées par Tonegawa et ses collaborateurs (MIT, MA, USA) marquent un progrès significatif dans l'application de l'approche génétique à ce problème. Ces auteurs sont en effet les premiers à rapporter les résultats de l'inactivation d'un gène dans une population neuronale spécifique, mettant à profit le système Cre/Lox, déjà utilisé pour réaliser l'inactivation de gènes *in vivo* dans d'autres cellules [9]. La recombinaison Cre est une enzyme du phage P1 qui catalyse la recombinaison entre 2 séquences d'ADN de 34 paires de base appelées Lox P. Lorsque ces deux séquences sont placées de part et d'autre d'un segment d'ADN, l'enzyme Cre catalyse la délétion de ce segment, ne laissant en place qu'une seule séquence Lox P [10]. L'utilisation de ce système *in vivo* nécessite le croisement de deux lignées différentes de souris transgéniques: l'une exprimant Cre, l'autre ayant un gène cible contenant deux séquences Lox P (en jargon on dit que le gène est «floxé», c'est-à-dire flanqué par des séquences Lox P). Dans l'étude de Tsien *et al.*, Cre est exprimée sous le contrôle du promoteur d'un gène à expression spécifiquement neuronale, la sous-unité  $\alpha$  de la  $Ca^{2+}$ /calmoduline kinase de type II. Selon son site d'insertion dans le génome, ce promoteur a la particularité de ne permettre l'expression du transgène que dans certaines populations neuronales très restreintes [11]. Ainsi, plusieurs lignées obtenues n'exprimaient Cre que dans la région CA1 de l'hippocampe. Deux types de gènes cibles ont été utilisés, l'un démontrant la

validité de la méthode, l'autre permettant de tester le rôle du récepteur NMDA (*figure 1*).

Dans un premier temps les auteurs ont eu recours à des souris transgéniques exprimant le gène *LacZ* sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire (le promoteur de l'actine) [1]. Toutefois, ce gène était modifié de façon à ce que la  $\beta$ -galactosidase ne puisse fonctionner qu'après excision d'un exon contenant un codon stop flanqué de deux séquences Lox P. Lorsque de telles souris (appelées souris rapporteurs) sont croisées avec des souris transgéniques pour Cre, l'apparition d'une activité  $\beta$ -galactosidase dans un type cellulaire donné traduit l'expression de Cre dans ces cellules. Le croisement de souris rapporteurs et de souris exprimant Cre sous le contrôle du promoteur de la sous-unité  $\alpha$  de la  $Ca^{2+}$ /calmoduline kinase de type II, a permis d'obtenir la synthèse de  $\beta$ -galactosidase dans des populations neuronales très restreintes, en particulier les cellules pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe dans une lignée (T29-1). De façon tout à fait remarquable, la synthèse de la  $\beta$ -galactosidase est apparue au cours de la troisième semaine postnatale. Comme ces neurones cessent de se diviser à la fin de la vie embryonnaire et sont déjà bien différenciés une semaine après la naissance, ces expériences montrent clairement que la recombinaison peut avoir lieu dans des neurones mûrs.

### Invalidation conditionnelle des gènes des récepteurs du NMDA

Dans un deuxième temps, Tsien *et al.* ont produit par recombinaison homologue des souris chez lesquelles un grand fragment du gène du récepteur NMDAR1 était flanqué de séquences Lox P (*fNR1*) [2]. Des souris homozygotes (*fNR1/fNR1*) pour la modification de ce gène ont été croisées avec des souris transgéniques Cre hétérozygotes de la lignée T29-1. Parmi la descendance de tels croisements, chez les souris de génotype Cre/+ et *fNR1/fNR1*, l'ARNm de NMDAR1 était absent de la région CA1 de l'hippocampe, alors qu'il était normalement synthétisé dans le reste du cerveau. L'absence d'anomalie

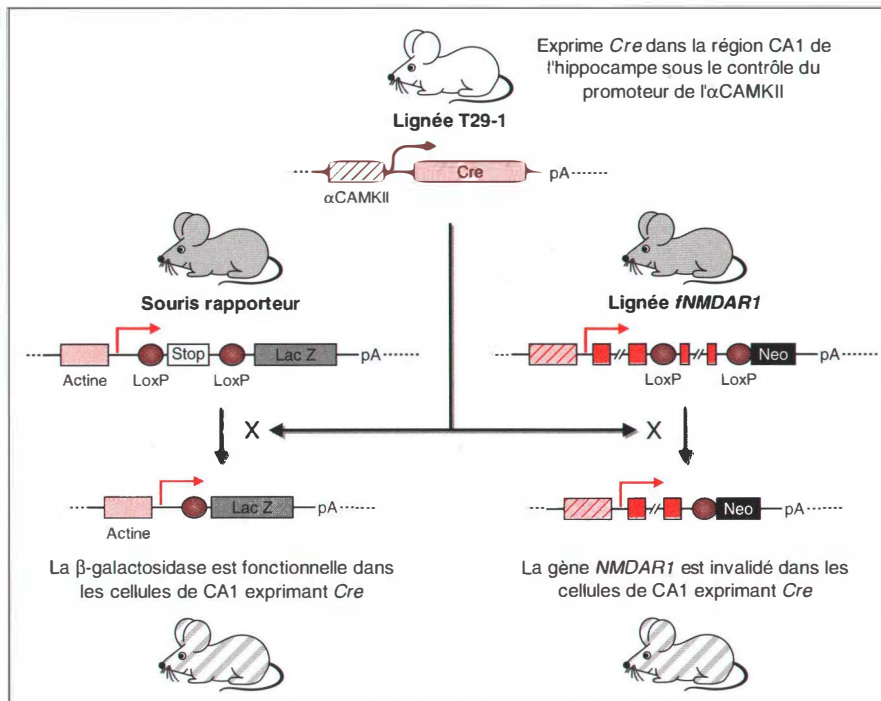


Figure 1. **Stratégie utilisée pour l'inactivation localisée d'un gène dans la région CA1 de l'hippocampe.** Dans une première série d'expériences, on a produit une lignée de souris (T29-1) chez laquelle le gène Cre est placé sous le contrôle du promoteur du gène de la sous-unité  $\alpha$  de la protéine kinase II dépendante de la calmoduline ( $\alpha$ CAMKII). La spécificité d'expression de la recombinase Cre dans la région CA1 de l'hippocampe a été vérifiée en croisant ces souris avec d'autres souris transgéniques exprimant le gène LacZ sous le contrôle du promoteur ubiquitaire de l'actine (souris rapporteur). Chez celles-ci, le gène LacZ, précédé de séquences LoxP encadrant un codon stop, ne peut s'exprimer que lorsque ce codon et une séquence LoxP ont été excisés par la recombinase Cre. Dans une deuxième série d'expériences, les souris T29-1 ont été croisées avec des souris transgéniques chez lesquelles le gène codant pour le récepteur du NMDA, NMDAR1, a été flanqué de séquences LoxP par recombinaison homologue (lignée fNMDAR1). Dans la descendance de ces croisements les souris doublement transgéniques présentaient une inactivation du gène NMDAR1 spécifiquement dans les cellules de la région CA1 de l'hippocampe (pA: site de polyadénylation).

majeure, morphologique ou comportementale, ainsi qu'un certain nombre de contrôles histochimiques démontraient le caractère restreint de l'inactivation du gène NMDAR1. Chez ces souris, les réponses électrophysiologiques de type NMDA ainsi que la LTP étaient absentes de CA1, alors que les réponses non-NMDA dans CA1 et la LTP dans le reste de l'hippocampe étaient normales. Dans divers tests comportementaux, ces souris étaient légèrement déficientes dans les tâches de mémoire visuo-spa-

tiale, alors que les autres types d'apprentissage étaient normaux. Enfin, une étude électrophysiologique très élégante des neurones pyramidaux de CA1 sensibles à l'environnement (*place cells*) a été effectuée *in vivo* chez ces souris [3]. Bien que de tels neurones aient été trouvés chez les souris normales, la sélectivité de leur champ de sensibilité était nettement diminuée. De plus, une absence de corrélation dans la décharge de cellules sensibles à des environne-

ments proches était observée. Ainsi, les souris spécifiquement dépourvues de récepteur NMDA dans la région CA1 de l'hippocampe, présentent un déficit de la LTP, de la mémorisation visuo-spatiale et de la représentation de l'espace au niveau cellulaire, alors que de nombreuses autres fonctions sont normales. Ces résultats renforcent considérablement l'idée d'une association entre ces trois niveaux de fonctionnement. Si la relation reliant ces différents niveaux reste corrélative, il s'agit d'une corrélation plus étroite que celle qui avait pu être montrée précédemment.

## Conclusion

Ce travail démontre avec élégance qu'une combinaison d'approches multidisciplinaires, tirant profit de la précision de l'inactivation localisée de gènes dans le système nerveux, permet de progresser dans la compréhension des bases moléculaires et cellulaires de fonctions intégrées complexes du système nerveux central. Ce type d'approche qui dépend essentiellement de la découverte de promoteurs permettant l'expression restreinte de transgènes dans des populations neuronales ciblées, devrait connaître un grand succès. En outre, il est parfaitement envisageable d'améliorer encore la méthode en rendant la recombinaison inducible par l'expérimentateur [12]. Par exemple, l'expression spécifique dans certaines cellules d'une molécule hybride entre un mutant du récepteur à la tétracycline et un domaine d'activation transcriptionnelle pourrait permettre l'induction par la tétracycline de l'expression de Cre transgénique placé sous le contrôle d'un élément de réponse à la tétracycline (opérateur tet). Un tel système aurait toutefois l'inconvénient de nécessiter une souris triplement transgénique. La possibilité de contrôler directement l'activité de Cre par fusion de la recombinase avec le récepteur muté de l'œstrogène [13] ou de la progestérone [14] pourrait donc – si cette molécule hybride est fonctionnelle *in vivo*, c'est-à-dire si son activité enzymatique est contrôlée par l'hormone correspondante – représenter une alternative encore plus attrayante ■

## RÉFÉRENCES

1. Tsien JZ, Chen DF, Gerber D, Tom C, Mercer EH, Anderson DJ, Mayford M, Kandel ER, Tonegawa S. Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell* 1996; 87: 1317-26.
2. Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 1996; 87: 1327-38.
3. McHugh TJ, Blum KI, Tsien JZ, Tonegawa S, Wilson MA. Impaired hippocampal representation of space in CA1-specific NMDAR1 knockout mice. *Cell* 1996; 87: 1339-49.
4. Bliss TVP, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993; 361: 31-9.
5. O'Keefe J, Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 1971; 34: 171-5.
6. Li Y, Erzurumlu RS, Chen C, Jhaveri S, Tonegawa S. Whisker-related neuronal patterns fail to develop in the trigeminal brainstem nuclei of NMDAR1 knockout mice. *Cell* 1994; 76: 427-37.
7. Kutsuwada T, Sakimura K, Manabe T, Takayama C, Katakura N, Kushiya E, Natsume R, Watanabe M, Inoue Y, Yagi T, Aizawa S, Arakawa M, Takahashi T, Nakamura Y, Mori H, Mishina M. Impairment of suckling response, trigeminal neuronal pattern formation, and hippocampal LTD in NMDA receptor  $\epsilon 2$  subunit mutant mice. *Neuron* 1996; 16: 333-44.
8. Sakimura K, Kutsuwada T, Ito I, Manabe T, Takayama C, Kushiya E, Yagi T, Aizawa S, Inoue Y, Sugiyama H, Mishina M. Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor  $\epsilon 1$  subunit. *Nature* 1995; 373: 151-5.
9. Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K. Deletion of a DNA polymerase gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 1994; 265: 103-6.
10. Viville S. Recombinaison homologue: nouveaux vecteurs, nouvelles perspectives. *Med Sci* 1995; 11: 735-46.
11. Mayford M, Bach ME, Huang YY, Wang L, Hawkins RD, Kandel ER. Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science* 1996; 274: 1678-83.
12. Kühn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K. Inducible gene targeting in mice. *Science* 1995; 269: 1427-9.
13. Metzger D, Clifford J, Chiba H, Chambon P. Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 6991-5.
14. Kellendonk C, Tronche F, Monaghan AP, Angrand PO, Stewart F, Schütz G. Regulation of Cre recombinase activity by the synthetic steroid RU486. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 1404-11.

## Jean-Antoine Girault

Inserm U. 114, chaire de neuropharmacologie, Collège de France, 11, place Marcelin-Berthelot, 75231 Paris Cedex 05, France.

## TIRÉS À PART

J.A. Girault.

## BRÈVES

Les mastocytes en association avec les terminaisons des fibres sensorielles primaires constituent les principaux acteurs de l'action hyperalgique du NGF dans l'inflammation. Trois types cellulaires sont susceptibles de relayer à la périphérie l'action hyperalgique inflammatoire du NGF, parce qu'ils synthétisent TrkA, le récepteur à forte affinité du NGF: les neurones sensoriels primaires dont les fibres périphériques sont de petit diamètre; les neurones postganglionnaires du système orthosympathique qui peuvent intervenir en association avec les neurones sensoriels primaires dans la composante neurogène de l'inflammation; les cellules mastocytaires qui peuvent, sous l'action du NGF, libérer leur contenu cytoplasmique (amines, cytokines, enzymes), augmentant la sensibilité des nocicepteurs périphériques. Pour rechercher leur mise en jeu respective dans l'action hyperalgique inflammatoire du NGF, on a étudié les effets d'une

sympathectomie chimique irréversible (guanéthidine néonatale) et d'une dégranulation préalable des mastocytes par un agent cationique sécrétagogue, le composé 48/80 [1]. Les auteurs ont utilisé comme modèle inflammatoire l'injection intraplantaire d'adjuvant de Freund dans une patte postérieure: l'hyperalgie inflammatoire est réduite dans sa phase précoce par la sympathectomie, ce qui souligne l'action essentiellement transitoire du NGF sur cette cible. En revanche, la dégranulation des mastocytes atténue l'hyperalgie dans ses phases précoce et tardive, bloquant l'excès de NGF libéré à la suite de l'inflammation; ce qui tend à montrer l'importance de ces cellules, en interaction avec les fibres sensorielles primaires, comme site d'action du NGF dans l'hyperalgie inflammatoire.

[1. Woolf C, *et al.* *J Neurosci* 1996; 16: 2716-23.]



**BIODOCS**  
L'A association des Etudiants-Chercheurs en Biologie

### Vous voulez faire un DEA, une thèse ? Vous cherchez un laboratoire de recherche ?

BioDocs

- propose un annuaire des formations doctorales et des laboratoires avec des contacts étudiants;
- offre des informations administratives et techniques sur la formation doctorale:
  - déroulement (inscriptions, sécurité sociale, service militaire...),
  - financements (montant et droits des bourses...),
  - débouchés publics et privés dans l'enseignement et la recherche;
- développe un réseau d'échanges scientifiques

### Vous êtes inquiet pour votre statut et votre avenir dans la recherche ?

BioDocs

- en tant que Membre de la CEC (Confédération des Etudiants-Chercheurs) agit auprès des institutions universitaires et politiques (Conseils Scientifiques d'Université...)
- défend les intérêts et le statut social des étudiants-chercheurs;
  - œuvre dans le sens d'une augmentation du recrutement dans la recherche publique et l'enseignement supérieur

### Vous êtes inquiet sur les débouchés dans la recherche ?

BioDocs

- cherche à valoriser la formation doctorale auprès des entreprises privées;
- propose un annuaire de vos compétences aux entreprises privées;
- organise des forums de rencontre entre les étudiants, les grands organismes de recherche et les sociétés privées de biologie et biotechnologies

**BioDocs vous invite**

à consulter le serveur web (Internet) <http://157.136.20.60>  
Contactez-nous également par e-mail ([analenn@pasteur.fr](mailto:analenn@pasteur.fr))