

INTERACTION ZINC-GLUTAMATE DANS L'HIPPOCAMPE DORSAL DE LA SOURIS

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2007
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Emilie BOUHSIRA

Née le 10 SEPTEMBRE 1981, à VILLENEUVE/LOT (47)

Directeur de thèse : M. le Professeur Jean SAUTET

JURY

PRESIDENT :

M. Jacques GUITARD

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. Jean SAUTET
M. Michel FRANCO

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE

M. Jean-Michel LASSALLE

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

A mon président de thèse,

Monsieur le Professeur Jacques GUITARD

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Anatomie et chirurgie infantile

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse.

Hommages respectueux.

A mon jury de thèse,

Monsieur le Professeur Jean SAUTET

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Anatomie

Qui m'a fait l'honneur de diriger cette thèse.

Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Michel FRANC

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Parasitologie et Maladies Parasitaires

Qui m'a fait l'honneur de participer à mon jury de thèse.

Sincères remerciements pour sa disponibilité et sa gentillesse tout au long de cette année. Ce fut un réel plaisir de travailler à vos côtés.

Monsieur le Professeur Jean-Michel LASSALLE

Professeur des Universités

Grâce à qui ce travail a pu être réalisé et qui m'a fait l'honneur de participer à mon jury de thèse.

Sincères remerciements pour son aide tout au long de ce travail et pour m'avoir fait bénéficier de ses compétences et de sa gentillesse.

A mon père et son insondable culture, et que j'admire chaque jour un peu plus. **A ma mère** pour sa générosité et son infinie patience... (En souvenir d'un certain oral à Paris...). Sans votre soutien, je ne serais pas allée si loin...Merci ...

A mon oncle et ma tante, je vous dédie spécialement cette thèse. Merci pour tout ce qui a été possible grâce à vous.

A ma sœur, mais que ferais-je sans toi ??? Il y aurait tellement de choses à dire, mais the best of the best : en souvenir d'une certaine virée nocturne en Tunisie, les clés du coffre, les allemands, à ta jolie robe rose si bien portée un certain soir au Blue Cargo, à ton stress nocturne, à ton irrépressible faiblesse pour les offres publicitaires et les bibelots inutiles... Waffles !

A ma cousine Michèle, prochaines randonnées en Guadeloupe !!

A Christelle, à notre longue amitié. Merci à toi et à Arnaud de m'avoir fait un si joli cadeau un certain jour de juin 2006...

A Agnès et Bambou, des colloqs en or... !!!

A Marie et Elsa pour m'avoir fait découvrir, dans le désordre, les joies du camping en Ecosse (sous un arbre par temps de tempête c'est encore mieux !!!), les merveilleux repas dans des cantines militaires, la technique de la dégustation de la tomate en Italie, les Eurockéennes et leur Pogo..., les Dandy, le martini salade, le fil à linge dans la voiture...et c'est pas fini !!! Bien joué Inspecteur Derrick !!!

A Sabrina et en souvenir d'un certain été 2004, probablement un des meilleurs...à ton incomparable hélage de taxis parisiens, à ta joie de vivre, à tes bons plans, tes conseils avisés à toute heure... merci pour tout !!

A VB, ma voisine préférée !! Merci pour toutes les soirées passées avec toi et pour ta motivation sans limite...

A Coline, Angie et Emilie O, surtout ne changez rien...

A Lucile et Caro, pour toutes nos discussions philosophiques et pour toujours avoir été à la pointe de l'information grâce à vous...

A Guibo et JB et aux gens avec qui j'ai passé de drôles de soirées...

A Pedro et ses incomparables galettes bretonnes et son excellent chocolat !! Merci d'avoir animé si grandiosément et avec autant de superbe nos soirées, tu vas devoir rester à Toulouse à présent...

A Martine et Solange, merci pour votre bonne humeur quotidienne et votre gentillesse, c'était super de refaire le monde autour d'une tasse de café...

Enfin un grand merci à **Hélène, John, Stéphanie, Laure et Alex**, ce fut un réel plaisir de travailler avec vous. Merci pour votre aide. Je garderai un excellent souvenir de mon passage au CRCA !

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS.....	1
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	2
INTRODUCTION.....	3
1.SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
1.1. Organisation hippocampique.....	4
1.2. L'hippocampe au sein du Système Nerveux Central.....	7
1.2.1. Les afférences hippocampiques.....	7
1.2.2. Les efférences hippocampiques.....	9
1.3..Hippocampe et apprentissage.....	10
1.4. Le Zinc : un oligo-élément essentiel du Système Nerveux Central.....	11
1.4.1. Développement et transport.....	12
1.4.2. Hippocampe et Fibres Moussues.....	13
1.5. Le Zinc : un neurotransmetteur atypique ?.....	13
1.5.1. Interaction zinc vésiculaire / récepteurs glutamatergiques.....	15
1.5.2. Zinc et potentialisation à long terme.....	15
1.6. Perturbation de l'homéostasie du zinc: rôle dans les processus cognitifs et pathologiques.....	16
1.6.1. Etudes comportementales.....	16
1.6.2. Zinc et pathologies.....	17
1.7. But de l'étude.....	19
2. MATERIEL ET METHODE.....	20
2.1. Sujets et opérations.....	20
2.1.1. Les animaux.....	20
2.1.2. Chirurgie.....	20
2.2. Produits et injections.....	23
2.2.1.Molécules utilisées.....	23
2.2.2 Injections.....	24

2.3. Appareils et tests comportementaux.....	24
2.3.1. Epreuve de navigation spatiale en piscine de Morris.....	24
2.3.2. Test de peur conditionnée au contexte.....	26
2.4. Analyse des données.....	27
2.4.1. Résultats obtenus en piscine de Morris.....	27
2.4.2. Résultats obtenus lors du test de peur conditionnée au contexte.....	28
3. RESULTATS EXPERIMENTAUX ET DISCUSSION.....	29
3.1. Résultats expérimentaux.....	29
3.1.1. Résultats obtenus en piscine de Morris.....	29
3.1.2. Résultats obtenus dans le test de peur conditionnée au contexte.....	31
3.2. Discussion.....	33
CONCLUSION.....	39
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	40

LISTE DES ABREVIATIONS

AMPA : A (amino-3-hydroxy-5méthyl-propionate)

AP5 : D-2-amino-5-phosphonopentanoate

CA1 : Corne d'Ammon 1 de l'hippocampe

CA3 : Corne d'Ammon 3 de l'hippocampe

CaEDTA: Ca²⁺-ethylenediamine tetra acétate

DEDTC: diéthylthiocarbamate

FM : Fibres moussues

GD : Gyrus Denté

NaCl : Chlorure de sodium

NMDA : N-méthyl-di-Aspartate

PF : Plate-forme

PLT : Potentialisation à Long Terme

SEM : Erreur standard à la moyenne

ZnEDTA : Zn²⁺- ethylenediamine tetra acétate

TABLE DES ILLUSTRATIONS

<u>Figure 1.1</u> : Localisation de la formation hippocampique en vue latérale chez l'homme et en vue dorsale chez la souris.....	3 (verso)
<u>Figure 1.2</u> : Coupe transversale d'encéphale humain au niveau des corps calleux.....	4
<u>Figure 1.3</u> : Représentation schématique de l'hippocampe de rat.....	6
<u>Figure 1.4</u> : Localisation de l'hippocampe au sein du lobe temporal chez l'homme.....	6 (verso)
<u>Figure 1.5</u> : Coupe schématique de l'hippocampe avec ses principales afférences sensorielles et glutamatergiques.....	8
<u>Figure 1.6</u> : Schéma des efférences entorhinales et des connexions intra-hippocampiques.....	9
<u>Figure 1.7</u> : Représentation schématique de la synapse entre les fibres moussues et les cellules pyramidales de la région CA3.....	14
<u>Figure 2.1</u> : Coupe transversale de l'hippocampe dorsal d'une souris après coloration à la thionine.....	21 (verso)
<u>Figure 2.2</u> : Vue dorsale de crâne de souris et localisation du bregma.....	22
<u>Figure 2.3</u> : Dispositif expérimental pour le test de navigation spatiale en piscine de Morris.....	23 (verso)
<u>Figure 2.4</u> : Dispositif et protocole expérimentaux pour le test de peur conditionnée au contexte.....	25 (verso)
<u>Figure 3.1</u> : Résultats obtenus lors de l'apprentissage spatial en piscine de Morris....	28 (verso)
<u>Figure 3.2</u> : Résultats obtenus lors du paradigme de peur conditionnée au contexte...	30 (verso)
<u>Figure 3.3</u> : Effets des 4 traitements administrés immédiatement après le conditionnement sur le taux de freezing et relevés lors du test au contexte modifié.....	32
<u>Figure 3.4</u> : Comparaison des taux de freezing moyens obtenus lors du test au contexte modifiés et induits par les différents traitements réalisés dans le présent travail et ceux réalisés précédemment.....	36
<u>Figure 3.5</u> : Tableaux comparatifs et schématiques des résultats obtenus pour un apprentissage massé versus distribué en piscine de Morris.....	37
<u>Figure 3.6</u> : Tableau représentant les résultats obtenus lors d'un apprentissage massé dans le paradigme de peur au contexte.....	38

INTRODUCTION

Le rôle prépondérant de l'hippocampe dans certaines formes d'apprentissage et de mémoire n'est plus à démontrer. Cette structure occupe la face médiale du lobe temporal et a très bien été conservée au cours de l'évolution. Son ablation bilatérale chez l'homme, mais également chez l'animal entraîne une perte des capacités mnésiques. De nombreuses études lésionnelles ont démontré le rôle prépondérant de l'hippocampe dans deux types d'apprentissages : spatial et contextuel.

Des travaux antérieurs ont utilisé la forte concentration en zinc des fibres moussues de la région CA3 de l'hippocampe pour bloquer de manière réversible la synapse Fibres Moussues-cellules pyramidales de CA3, à l'aide de microinjections de chélateurs intracellulaire ou extracellulaire du zinc. Il apparaît que la chélation du zinc extracellulaire perturbe l'acquisition, mais pas la consolidation ni le rappel d'une mémoire spatiale de référence, lors d'un protocole distribué de navigation spatiale en piscine de Morris. Par contre, dans le cadre d'une étude d'un autre type de mémoire, la mémoire contextuelle, pouvant être mise en évidence par le paradigme expérimental de la peur conditionnée au contexte, la chélation du zinc extracellulaire génère une importante perturbation de la consolidation mnésique.

Notre étude s'inscrit dans la suite de ces résultats contradictoires, et se propose d'essayer de préciser l'effet de l'interaction du zinc avec les récepteurs NMDA au glutamate, dans deux situations d'apprentissage : un apprentissage spatial massé en piscine de Morris, et un apprentissage contextuel mis en évidence par le paradigme de la peur conditionnée au contexte.

Pour cela notre travail se présente en trois parties. Dans la première, nous ferons un rappel anatomique de l'organisation de la formation hippocampique, et nous verrons l'importance du zinc au sein du système nerveux central. Le protocole expérimental utilisé et les deux paradigmes comportementaux seront exposés en détail dans la deuxième partie. Enfin, les résultats statistiques et leur interprétation seront soumis à une discussion dans une troisième et dernière partie.

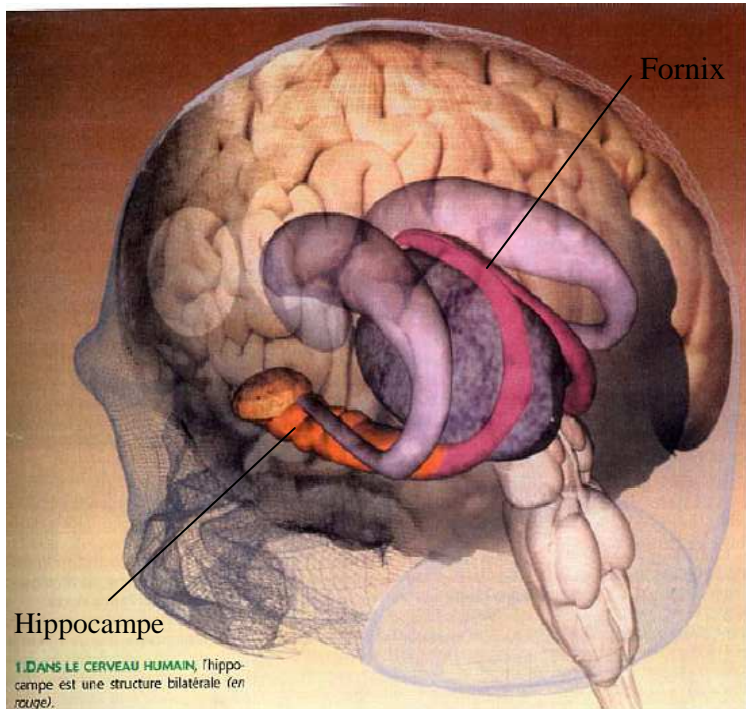


Figure 1.1.A

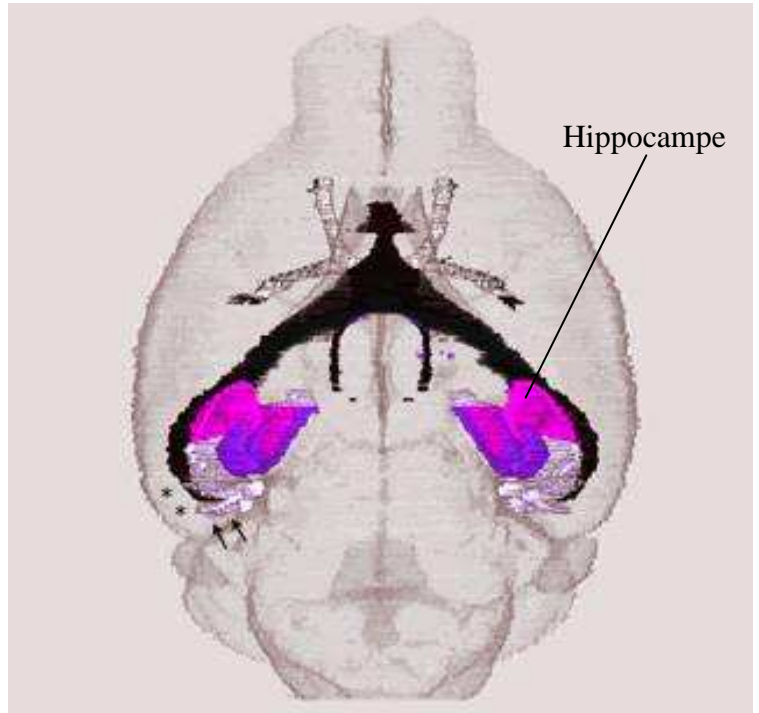


Figure 1.1.B

Figure 1.1 : Localisation de la formation hippocampique en vue latérale chez l'homme (A) et en vue dorsale chez la souris (B).

D'après le site Harvard Center for Neurodegeneration and Repair: www.hcnr.med.harvard.edu.

L'hippocampe est une structure bilatérale et symétrique qui occupe la face médiale du lobe temporal et qui a été très bien conservée au cours de l'évolution. De nombreuses études lésionnelles ont permis de montrer son implication dans les processus de mémoire et d'apprentissage.

1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Organisation hippocampique

L'hippocampe (voir Figure 1.1) est une circonvolution bilatérale et symétrique, appartenant au télencéphale, qui s'est repliée sur elle-même au cours de l'embryogenèse. L'hippocampe est appelé ainsi pour sa ressemblance avec l'animal marin. On l'appelle également la Corne d'Ammon (CA) en raison de sa forme recourbée suggérant les cornes de bélier du dieu Ammon de la mythologie égyptienne. Il représente la partie la plus importante de l'archicortex.

Chez l'homme, l'hippocampe est une structure médo-temporale basale de forme oblongue et ventrale uniquement, alors que chez les rongeurs elle est beaucoup plus volumineuse et arbore une forme assez caractéristique de C allongé partant des noyaux septaux rostro-dorsaux du cerveau antérieur pour aboutir au niveau caudo-ventral du lobe temporal. Ce long axe de l'hippocampe est appelé axe septotemporal (voir Figure 1.3). Ainsi, chez l'homme l'hippocampe ne sera visible que ventralement sur une coupe transversale d'encéphale (voir Figure 1.2.), alors que chez les rongeurs on distingue un hippocampe dorsal et ventral.

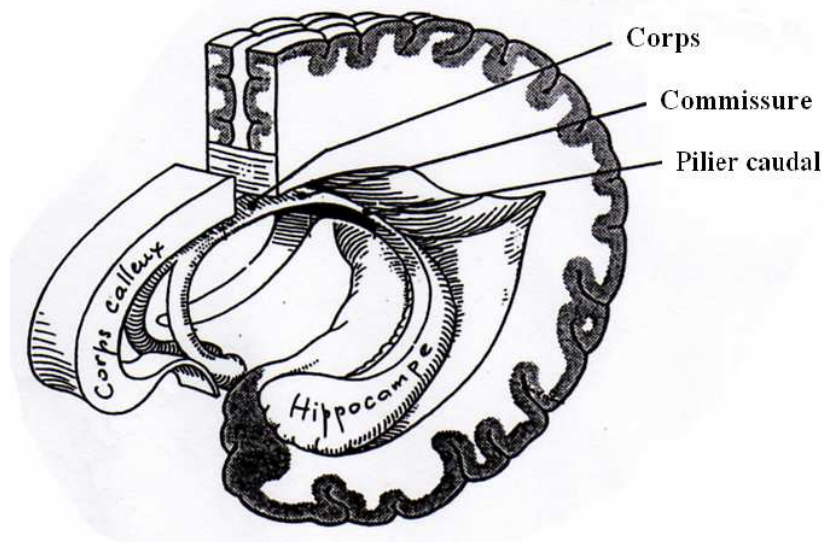


Figure 1.2 : Coupe transversale d'encéphale humain au niveau des corps calleux (d'après Feneis).

Le ruban cortical de l'hippocampe est subdivisé en 4 parties suivant son épaisseur, la taille de ses cellules et la densité cellulaire. On distingue ainsi 4 couches allant de CA1 (corne d'ammon) à CA4. Le champ CA1 contient de petites cellules pyramidales. Le champ CA2 est caractérisé par une bande étroite mais dense de grandes cellules pyramidales alors que le champ CA3 se présente comme une large bande de cellules pyramidales volumineuses et dispersées. Enfin le champ CA4 est circonscrit par la bande cellulaire du gyrus denté (Cabrol, 1981). Ainsi la taille des cellules pyramidales augmente de CA1 à CA4. Chez les rongeurs, les parties CA1 et CA3 sont les plus développées et par conséquent les plus étudiées, c'est pourquoi nous nous concentrerons précisément sur ces zones dans la suite de cet exposé.

On parle généralement de « formation hippocampique » par rapport à sa structure cytoarchitectonique, et elle comprend le gyrus denté (dentate gyrus : DG), l'hippocampe ou corne d'Ammon avec ses aires CA1 et CA 3, le complexe subiculaire ainsi que le cortex entorhinal. Cependant, le terme d'*hippocampe* est en général utilisé pour se référer à l'ensemble formé par : le DG, la corne d'Ammon et le subiculum. Acceptation plus large qui sera par la suite utilisée.

La morphologie de la formation hippocampique est extrêmement variable suivant la situation du plan de coupe. En effet, comme on peut le voir sur la figure 1.3.B, les coupes horizontales successives de l'hippocampe ne permettent pas de voir la totalité des structures le composant. Au niveau le plus rostral, seuls le Gyrus Denté et les aires CA1 et CA3 peuvent être distinguées. Les coupes frontales de la structure hippocampique vont quant à elles révéler au niveau le plus rostral l'hippocampe dorsal et ses sous régions.

L'hippocampe fait partie du système limbique qui englobe un groupe très étendu de noyaux cérébraux qui s'innervent mutuellement pour former un réseau fortement impliqué dans les mécanismes responsables de l'émotion, de l'apprentissage et de la mémoire. Le système limbique englobe l'hippocampe, le thalamus, le cortex cingulaire, le fornix, le bulbe olfactif, l'amygdale et les corps mamillaires.

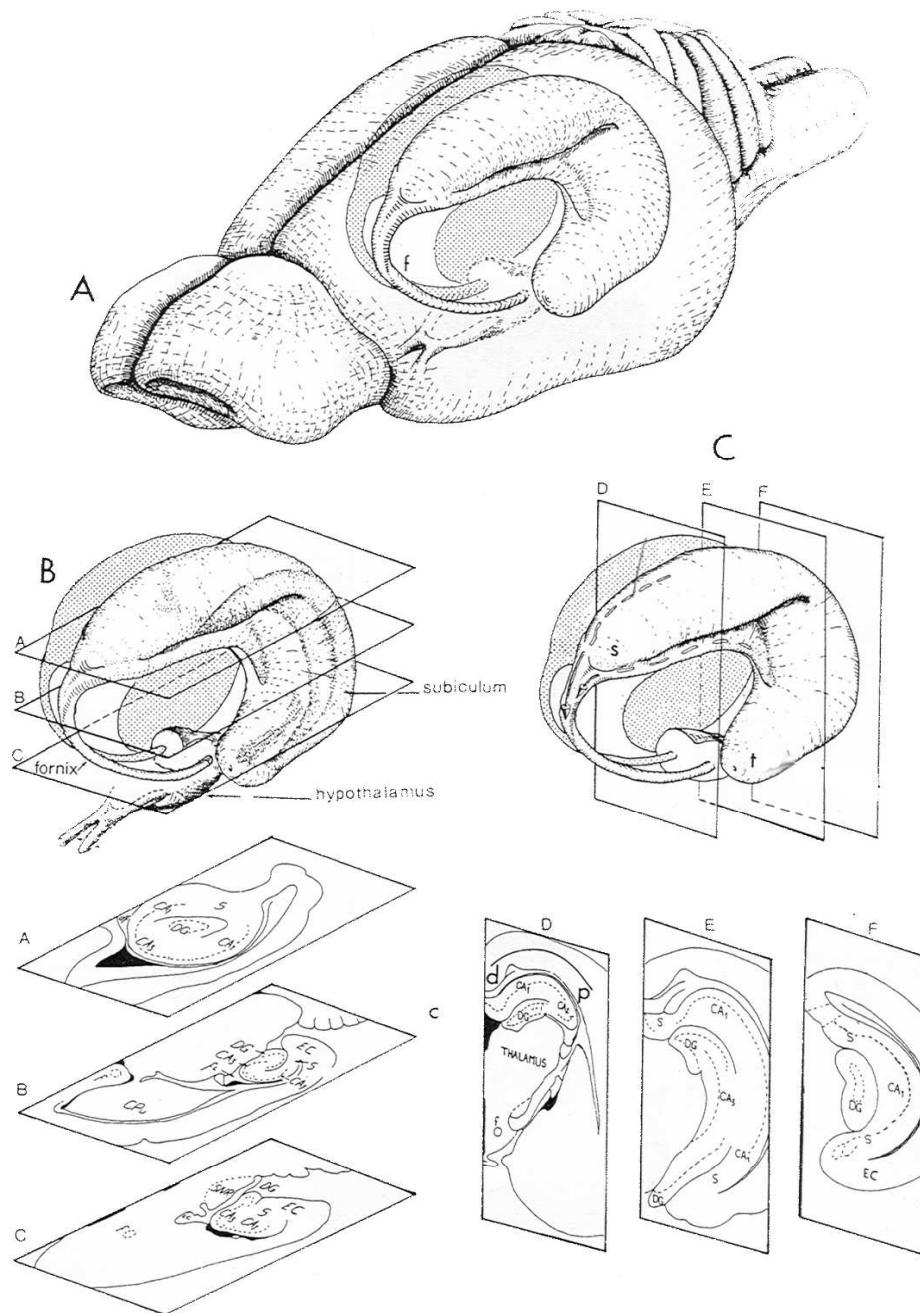


Figure 1.3: Représentation schématique de l'hippocampe de rat.

A : Vue par transparence de la forme en C caractéristique de la structure hippocampique dans les hémisphères cérébraux avec le fornix (f). B : Sections horizontales de l'hippocampe (petit A, B et C) à différents niveaux dorso-ventraux. C : Sections coronales de l'hippocampe (petite D, E et F) à différents niveaux rostro-caudaux. Les pôles septal et temporal sont indiqués sur les figures par les lettres s et t. EC : cortex entorhinal ; CPU : noyau caudé et putamen ; fi : fimbria ; S : subiculum ; DG : gyrus denté ; CA1 et CA3 de la corne d'Ammon. D'après Amaral et Witter, 1995.

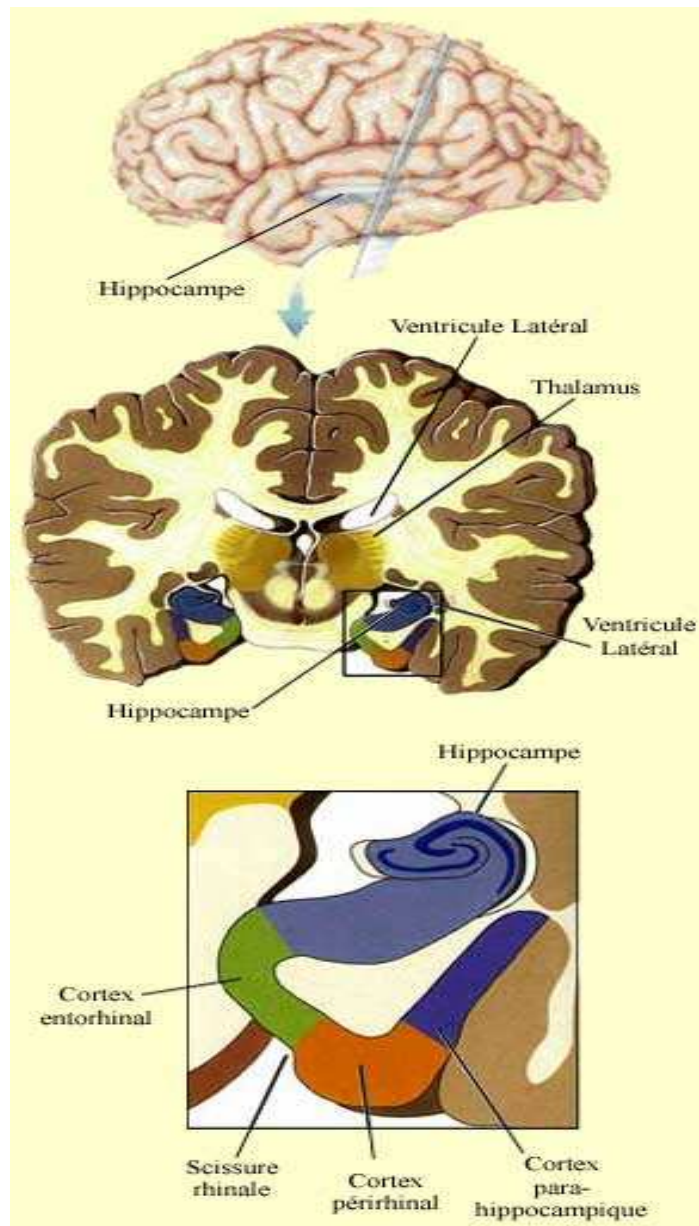


Figure 1.4 : Localisation de l'Hippocampe au sein de lobe temporal chez l'homme.

Sur la face médiane du lobe temporal, se trouve un ensemble de structures interconnectées qui paraissent importantes pour la consolidation de la mémoire déclarative. Celles qui semblent jouer un rôle clé sont l'hippocampe, les aires corticales proches, et les voies neuronales qui relient ces structures à d'autres parties du cerveau.

D'après le site : Le cerveau à tous les niveaux: <http://www.lecerveau.mcgill.ca>.

Trois régions corticales importantes situées ventralement par rapport à l'hippocampe entourent la scissure rhinale : le cortex entorhinal, qui occupe la partie interne de la scissure rhinale, le cortex périrhinal, qui occupe la partie latérale, et le cortex parahippocampique qui siège latéralement par rapport à la scissure rhinale (voir Figure 1.4).

L'hippocampe est relié aux autres aires cérébrales par deux principales routes bidirectionnelles. La première le connecte à diverses aires subcorticales, c'est le fornix. Cette voie exerce des influences modulatrices multiples sur le fonctionnement de l'hippocampe, telles que le contrôle attentionnel ou rythmique de l'activité hippocampique. La seconde se fait via le système parahippocampique. Cette route, contrairement à celle du fornix, permet l'acheminement d'informations spécifiques entre une variété d'aires corticales et l'hippocampe, et réciproquement.

1.2. L'hippocampe au sein du Système nerveux central

1.2.1. Les afférences hippocampiques

Les principales afférences de l'hippocampe proviennent du cortex entorhinal, qui est en relation directe avec les cortex préfrontal, cingulaire, temporal, piriforme et visuel (O'Keefe et Nadel, 1978), régions de forte intégration de modalités sensorielles de tout ordre. Ces afférences vont innerver, par l'intermédiaire de la voie perforante, les cellules granulaires du gyrus denté et les cellules pyramidales de la région CA3. Une autre partie innerve la région CA1 et le subiculum.

La région CA3 est donc intéressante car elle occupe une position stratégique dans l'hippocampe. Elle reçoit en effet des informations sensorielles multimodales depuis l'environnement interne et externe via deux voies principales provenant du cortex entorhinal (voir Figure 1.5) : la voie perforante et la voie trisynaptique. Les premiers contacts synaptiques de ce réseau se font au niveau des cellules pyramidales du Gyrus Denté (DG). Leurs axones, les fibres moussues, se projettent sur la partie proximale des dendrites des cellules pyramidales de la région CA3. Enfin, ces cellules pyramidales vont émettre de nombreuses collatérales se terminant sur d'autres cellules pyramidales de CA3, ce sont les collatérales récurrentes ou fibres associatives. Dans un troisième temps, les cellules pyramidales donnent lieu à des collatérales dites de *Schäffer*. En raison de cette boucle récurrente, la région CA3 est considérée comme un réseau auto-associatif pour le stockage et le rappel de l'information, en particulier dans les processus de mémoire de travail.

L'information multimodale pourrait y être stockée et unifiée en une information unique, suggérant ainsi un rôle prépondérant de cette région pour l'acquisition d'une mémoire de type contextuel.

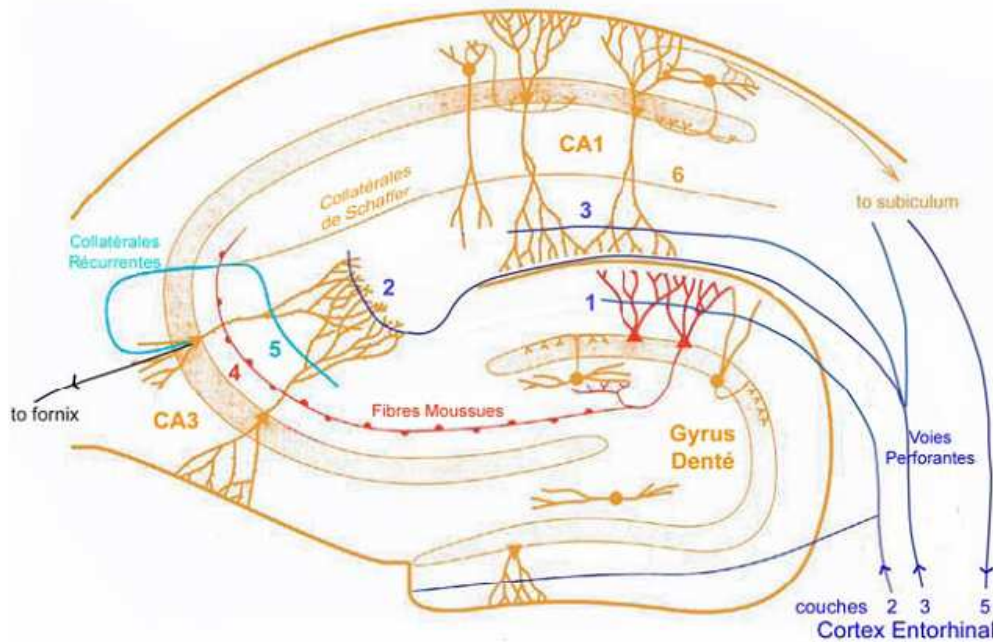


Figure 1.5: Coupe schématique de l'hippocampe avec ses principales afférences sensorielles et glutamatergiques.

Le réseau CA3 reçoit diverses afférences provenant du cortex entorhinal : une directe (2) ou voie perforante qui va directement faire synapse avec les terminaisons dendritiques des cellules pyramidales de CA3 et une indirecte ou trisynaptique. Le premier relais de cette voie se fait au niveau du gyrus denté (1) où les cellules granulaires envoient leurs axones, les fibres moussues (4), faire synapse avec les cellules pyramidales de la région CA3. Au niveau de ces mêmes neurones, on peut noter la présence de collatérales récurrentes (5). Les axones des cellules pyramidales de la région CA3, ou collatérales de Schäffer, vont aller faire synapse avec les neurones pyramidaux de l'aire CA1. L'ensemble des synapses 2, 4 et 5 forme le réseau auto-associatif de la région CA3.

1.2.2. Les efférences hippocampiques (voir Figure 1.6).

La voie de sortie principale de l'hippocampe est le subiculum, par lequel l'hippocampe envoie les informations vers les structures extra-hippocampiques (Amaral et al., 1991). Les neurones pyramidaux projettent leurs axones vers le noyau accumbens, la formation réticulée, l'aire préoptique et le tronc cérébral, constituant le circuit de Papez. Le cortex entorhinal reçoit des projections provenant du subiculum d'une façon strictement organisée. (Swanson et Cowan, 1977). Par le fornix, le subiculum innerve également le thalamus, via les corps mamillaires et le complexe de l'amygdale. (Zimond et al., 1999).

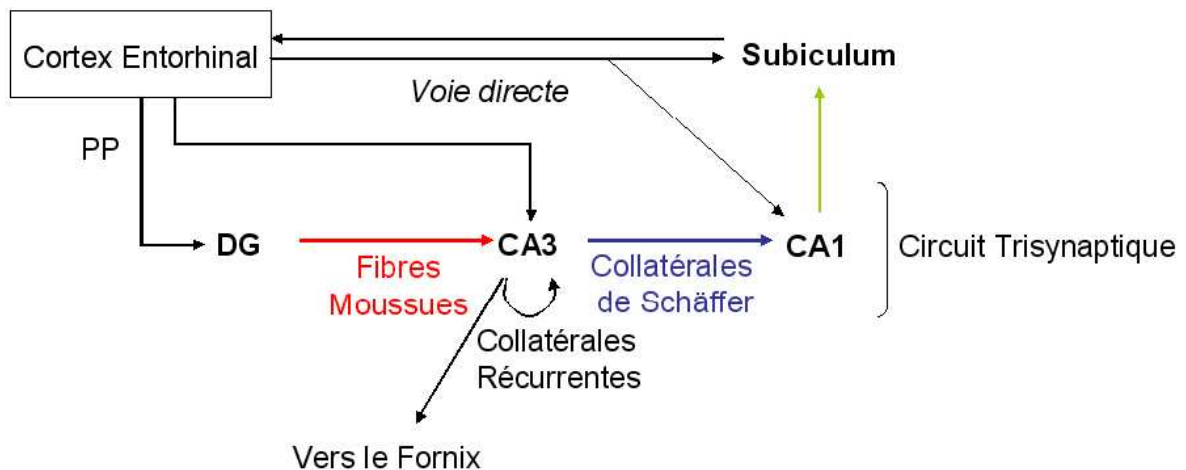


Figure 1.6: Schéma des efférences entorhinal et des connexions intra-hippocampiques. Illustration de la voie directe et du circuit trisynaptique. PP : voie perforante. (D'après S.Daumas, 2004).

1.3. Hippocampe et apprentissage

Le rôle prépondérant de la formation hippocampique dans certaines formes d'apprentissage et de mémoire n'est plus à démontrer. En effet, une ablation bilatérale partielle ou totale de l'hippocampe entraîne une perte de la mémorisation chez l'homme mais également chez l'animal. Alors que les souvenirs anciens restent conservés, les événements nouveaux ne peuvent être retenus que pour quelques secondes. L'hippocampe est reconnu comme étant le support de différents types d'apprentissage.

Selon O'Keefe et ses collègues (1970), l'hippocampe a entre autre pour fonction de recréer une représentation spatiale de l'environnement. Cela serait permis par des neurones spécialisés, les cellules de lieu. En effet, ces neurones hippocampiques entrent en activité lorsque l'individu se trouve dans une région précise de son environnement. Ainsi si chaque cellule se voit assignée une certaine portion de l'espace, leur ensemble permet donc l'élaboration d'une cartographie mnésique très précise de l'environnement. L'individu est donc capable de se repérer et de se déplacer à tout moment dans l'espace à partir de cette représentation mentale. Ce type d'apprentissage peut être mis en évidence chez le rat et la souris grâce au labyrinthe aquatique de Morris, car une bonne performance dans ce test nécessite un hippocampe intègre. A un endroit précis de la piscine se trouve une plate-forme submergée d'eau rendue opaque. Une souris ou un rat normal apprend rapidement la localisation de la plate-forme et cherche à cet endroit lors des tests suivants. (Le protocole sera détaillé dans la partie 2).

Dans un apprentissage de type configural, l'individu doit élaborer une représentation unifiée du contexte à partir des différents éléments qu'il a à sa disposition, en se remémorant les relations qui existent entre les indices environnementaux. Ce type d'apprentissage peut être mis en évidence par le paradigme* de peur au contexte (Phillips et Le Doux, 1992), dans lequel l'individu associe le contexte (une cage) à un ou plusieurs chocs électriques (le protocole sera détaillé dans la partie 2). On sait que ce paradigme est en partie amygdalo-dépendant, car la composante émotionnelle de l'expérience y est formée et stockée. Cependant l'hippocampe dorsal est également nécessaire à la formation de la représentation unifiée du contexte (Anagnostaras et al., 2001).

***paradigme expérimental**= protocole expérimental standardisé et reconnu, servant de référence pour tester un type d'apprentissage.

En Neurosciences comportementales, le test de référence pour étudier un apprentissage de navigation spatiale est le **labyrinthe aquatique de Morris**, et pour étudier un apprentissage contextuel (ou configural) on utilise le **test de peur conditionnée au contexte**.

De nombreuses études lésionnelles ont permis de confirmer l'implication de l'hippocampe dans des apprentissages de type spatial ou contextuel. Cependant ces lésions irréversibles ne permettent pas d'établir clairement l'implication respective des régions CA3 et CA1 dans les différents processus mnésiques, c'est-à-dire l'acquisition, la consolidation et le rappel. Ainsi plus récemment des lésions de type pharmacologique et par conséquent réversibles ont utilisé une des particularités des FM, leur forte concentration en zinc, pour réaliser un blocage réversible de l'aire CA3, afin de spécifier son implication dans les processus mnésiques. En effet, la forte concentration de cet élément dans l'hippocampe, et plus spécifiquement dans chaque élément du circuit trisynaptique de CA3, suggère qu'il pourrait avoir une implication particulière dans les processus de mémorisation et d'apprentissage.

Les résultats de travaux antérieurs (Bataille et al., 2000 ; Daumas et al., 2004 ; Florian et al., 2004) ont mis en évidence une implication différentielle du zinc selon le type d'apprentissage (spatial versus contextuel). La chélation du zinc libre perturbe en effet fortement un apprentissage de type contextuel, alors qu'elle ne génère aucun changement dans un apprentissage spatial. Ces résultats suggèrent que ces deux apprentissages pourtant hippocampo-dépendants pourraient éventuellement solliciter de manière différente le réseau CA3-fibres moussues, et que le zinc pourrait avoir des effets différents en fonction du type d'apprentissage. Il semble en effet indispensable pour un apprentissage de type contextuel, alors que cela ne semble pas le cas pour un apprentissage spatial.

Le zinc pourrait ainsi être considéré comme un neuromodulateur. Il occupe par ailleurs un rôle important dans le système nerveux central.

1.4. Le zinc: un oligo-élément essentiel du Système Nerveux Central

Le zinc est un oligo-élément essentiel présent dans l'organisme à l'état de traces. Cependant, il a un rôle déterminant dans de nombreux processus biologiques. Il est indispensable au fonctionnement de plus de 300 enzymes, est nécessaire à la réplication de l'ADN, intervient dans la synthèse protéique, et influence la division et la différenciation cellulaire. Par ailleurs, les protéines à doigt de zinc sont impliquées dans l'expression génétique de nombreux facteurs de croissance et de récepteurs stéroïdes (Prasad, 1995). Une carence en zinc subvenant pendant la croissance génère un retard de croissance et une absence de développement des gonades mâles.

Le zinc est, avec le fer, l'oligoélément le plus concentré dans le cerveau. Il contribue à la structure et au fonctionnement cérébral (revue de Sanstead, 2003). Il est présent dans les métalloprotéines des neurones et des cellules gliales. Environ 90 % du zinc présent dans le cerveau est lié aux métalloprotéines. Son mécanisme d'action n'est pas encore complètement élucidé, mais il semblerait qu'il module la transmission des signaux nerveux. Le zinc est présent dans les vésicules pré-synaptiques des neurones qui utilisent le glutamate comme neurotransmetteur. Dans ces neurones, le rôle du zinc est encore controversé, mais il pourrait être impliqué dans le stockage, le relargage, la captation du glutamate et la modulation des récepteurs glutamatergiques (Li et al., 2001). Il pourrait donc agir en tant que neuromodulateur, en plus de son pouvoir neurotoxique, gliotoxique et de son rôle pathologique dans les désordres neurologiques (épilepsie, ischémie, maladie d'Alzheimer, de Pick...) (Schmid et al., 1999). Il joue en tous cas un rôle central dans la croissance cellulaire et le développement neurologique, dans la transmission axonale et synaptique, et il est nécessaire au métabolisme des acides nucléiques et à la croissance de la tubuline cérébrale.

1.4.1 Développement et transport.

La concentration en zinc dans le cerveau augmente au cours de l'enfance, mais reste constante dans le cerveau adulte, et ne varie pas lors du processus de vieillissement.

Le zinc est présent à 90 % sous forme liée aux métalloprotéines, et seulement 5% est stocké dans les vésicules synaptiques des neurones zincergiques, et il semble être indispensable pour le maintien des capacités d'apprentissage. La majeure partie du zinc est liée à l'albumine ou à la L-histidine qui est responsable de son transport au niveau central via la barrière hémato-méningée. Le zinc rentre alors soit dans les neurones (via deux sites de capture : le corps cellulaire ou la terminaison synaptique), soit dans les cellules gliales. Dans les deux cas il sera incorporé à des protéines (Takeda, 2000).

Dans les neurones glutamatergiques contenant du zinc, ce dernier est transporté dans les vésicules pré-synaptiques via un transporteur transmembranaire spécifique : ZnT3. Ce transporteur est particulièrement exprimé dans les régions cérébrales riches en zinc, telles l'hippocampe, l'amygdale et le cortex entorhinal. Ce transporteur semble assurer le pompage du zinc dans les vésicules synaptiques (Palmiter et al., 1996).

Une autre protéine semble impliquée dans le maintien de l'homéostasie du zinc : la métallothionine-III, appartenant à une famille de protéines liant des métaux. Cette dernière est également fortement exprimée dans les neurones glutamatergiques zincergiques. Il s'agirait d'un régulateur du zinc dans le cerveau, et son absence serait impliquée dans le développement de la maladie d'Alzheimer (Séverin, thèse Université Toulouse III, 2006).

1.4.2. Hippocampe et FM.

Le zinc est très concentré dans le système limbique. On le trouve entre autres au niveau des terminaisons synaptiques des fibres moussues hippocampiques (FM), des collatérales de Schaffer, du CA1-subiculum, de la voie perforante latérale... Outre sa forte concentration dans l'amygdale, sa concentration est la plus importante dans l'hippocampe où elle peut atteindre 300-350 μM dans les vésicules des boutons géants des FM.

Par ailleurs, tous les neurones zincergiques ont été répertoriés comme étant glutamatergiques, alors que la réciproque n'est pas vraie (Frederickson et al., 1983). Une corrélation a été établie entre le niveau de zinc dans les FM et un déficit de mémoire spatiale chez des rats adultes (Guidolin et al, 1992).

1.5. Le zinc : un neuromodulateur atypique ?

De nombreuses études ont permis de montrer qu'une stimulation électrique intense des cellules granulaires, la présence d'une forte concentration en potassium ou une administration de kaïnate (Takeda, 2000) génère une forte activité neuronale, corrélée à une augmentation de la concentration en zinc extracellulaire (Assaf et Chung, 1984 ; Howell et al. 1984). L'utilisation d'un marqueur fluorescent sensible au zinc (FluoZin-3) a permis de démontrer que le zinc vésiculaire est co-libéré avec le glutamate, avec lequel il est co-localisé dans les vésicules synaptiques des fibres moussues hippocampiques (voir Figure 1.7), au cours de l'exocytose générée par un potentiel d'action (Qian et Noebels, 2005). Cependant, la mise en évidence de la libération de zinc lors d'une activité synaptique physiologique n'a pas été encore clairement réalisée, et la question de savoir si le zinc est bien libéré lors d'une transmission synaptique normale est encore non élucidée.

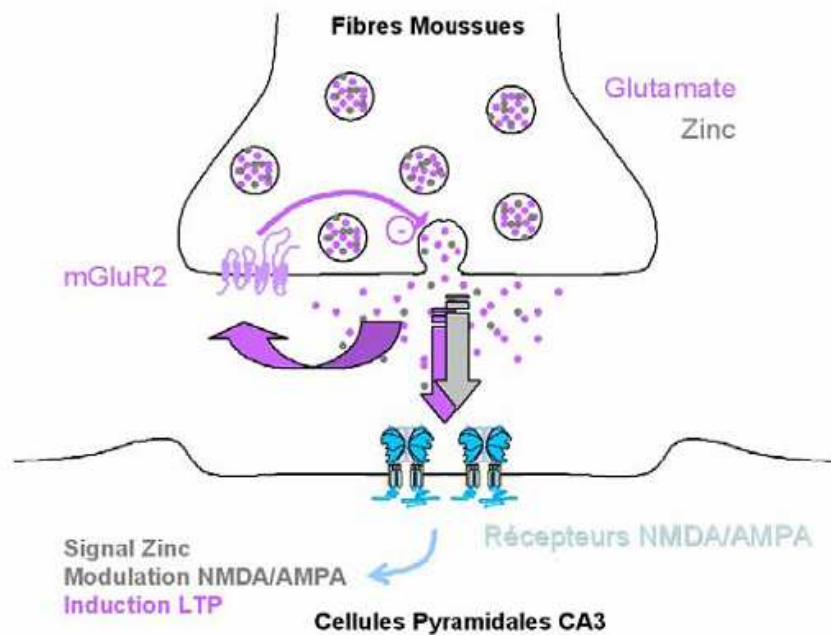


Figure 1. 7 : Représentation schématique de la synapse entre les fibres moussues et les cellules pyramidales de la région CA3.

Le zinc est co-localisé avec le glutamate dans des vésicules au niveau des terminaisons synaptiques des fibres moussues. Après exocytose, le glutamate peut interagir au niveau post-synaptique avec les récepteurs AMPA et NMDA et induire une potentialisation à long terme (PLT). Il peut également se fixer sur les récepteurs métabotropiques pré-synaptiques.

Le zinc est co-libéré avec le glutamate. Il a une action modulatrice sur les récepteurs AMPA et NMDA et sur l'induction de la PLT.

Après libération, le zinc agit principalement au niveau des récepteurs glutamatergiques selon trois modalités éventuelles : au niveau vésiculaire, au niveau de la fente synaptique et enfin au niveau du neurone post-synaptique. Une partie du zinc libéré est re-capté au niveau pré-synaptique, et une autre partie est captée par l'élément post-synaptique par des mécanismes impliquant des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants, les récepteurs NMDA, et les récepteurs AMPA/kainate (Takeda, 2000). Cette mobilisation du zinc en réponse à une forte stimulation électrique, et l'implication de nombreux canaux ioniques ainsi que des récepteurs à certains neurotransmetteurs suggèrent pour le zinc un rôle de neurotransmetteur atypique au niveau de la synapse fibre moussue-cellules pyramidales au sein de CA3 (Li et al., 2001).

1.5.1. Interaction zinc vésiculaire/récepteurs glutamatergiques.

Les récepteurs métabotropiques pré-synaptiques (mGluR2 des fibres moussues) exercent une influence inhibitrice sur la libération glutamatergique par un mécanisme de feedback corrélé à la fréquence de décharge. Au niveau post-synaptique, la transmission glutamatergique due aux récepteurs NMDA et AMPA est potentialisée suite à l'augmentation de la fréquence du potentiel d'action pré-synaptique (Min et al., 1998).

Une fois libéré, le zinc atténue l'activation des récepteurs NMDA à des concentrations comprises entre 10 et 100 μM . L'inhibition de ces récepteurs se fait selon deux mécanismes : une inhibition de haute affinité voltage-indépendante et une inhibition de basse affinité voltage-dépendante.

Le zinc interagit avec les récepteurs métabotropiques pré-synaptiques dont il diminue la réponse induite par le glutamate. Cependant le fonctionnement des récepteurs AMPA est quant à lui potentialisé en présence de zinc. En effet, l'application de zinc exogène peut augmenter le courant synaptique dû aux récepteurs AMPA au niveau des synapses FM-cellules pyramidales de CA3 (Lin et al., 2001). Ces récepteurs sont par ailleurs indispensables à la phase précoce de l'acquisition d'une tâche, suggérant ainsi une implication particulière du zinc dans les processus d'acquisition.

Il apparaît donc que le zinc est un modulateur à effets complexes de l'activité des récepteurs glutamatergiques.

1.5.2. Zinc et potentialisation à long terme.

Comme on l'a vu précédemment, le zinc peut être considéré comme un neurotransmetteur atypique de par sa capacité à interagir avec l'activité des récepteurs post-synaptiques. Il peut également pénétrer dans l'élément post-synaptique et interagir avec de nombreuses enzymes appartenant à des voies de transduction de signaux, conduisant à la modulation de l'expression de certains gènes.

Il a été démontré que la stimulation des récepteurs NMDA et la dépolarisation post-synaptique qui s'en suit est à l'origine de l'induction de la potentialisation à long terme (PLT). La potentialisation à Long terme est une forme de plasticité synaptique qui permet d'augmenter l'efficacité de la transmission synaptique. Mise en évidence par Bliss et Lomo en 1973 dans l'hippocampe de lapin, elle se définit comme une augmentation stable et durable de l'amplitude des réponses de certains neurones, après que des cellules afférentes de la région aient été stimulées par des trains de stimulation électrique de fréquence modérément élevée (>100Hz). La caractéristique la plus intéressante de ce mécanisme est qu'il permet le renforcement durable des synapses entre deux neurones qui sont activés simultanément, et par

conséquent la PLT se définit comme un processus permettant la transformation d'un souvenir labile en une forme mnésique durable et stable.

La PLT a été observée dans des zones riches en neurones glutamatergiques contenant du zinc, comme dans la région CA3 et dans le gyrus denté (Takeda, 2001). Une stimulation téτανique de la voie des fibres moussues entraîne la libération de zinc qui interagit avec les récepteurs des acides aminés excitateurs, ce qui génère une modulation de la potentialisation à long terme (PLT) des cellules pyramidales. Des études récentes rapportent en effet que la translocation de zinc dans l'élément post-synaptique lors d'une stimulation électrique haute fréquence sur tranche d'hippocampe peut provoquer l'induction de la PLT, tandis que la chélation du zinc libre par du CaEDTA bloque cette PLT. Ce blocage est réversible par l'ajout de zinc exogène, mimant ainsi sa libération par les fibres moussues lors de l'exocytose (Li et al., 2001).

La privation de zinc alimentaire ou sa chélation par le DEDTC entraîne une forte diminution de la PLT. Le zinc endogène semble donc être spécifiquement nécessaire pour l'induction de la PLT des fibres moussues de la région CA3 hippocampique (Lu et al., 2000), et donc indispensable à la consolidation mnésique. Enfin, le zinc est impliqué dans une forme particulière de PLT au niveau des FM, la PLT indépendante des récepteurs NMDA et qui est exprimée au niveau présynaptique (Nicoll et Malenka, 1995).

1.6. Perturbation de l'homéostasie du zinc : rôle dans les processus cognitifs et pathologiques

1.6.1. Etudes comportementales.

Des études animales ont permis de mettre en évidence l'impact du statut en zinc sur le fonctionnement cérébral. Ainsi, il a été montré que la carence en zinc pendant la phase de croissance cérébrale rapide affecte la mémoire et les capacités d'apprentissage, et augmente la réactivité émotionnelle (Takeda et al., 2000).

Les déficits en zinc lors de la gestation chez la mère ont un effet négatif sur les fonctions cérébrales du nouveau né. Ainsi, au cours de la gestation, les déficits en zinc chez la souris, le rat ou le singe entraînent à la naissance des troubles de l'attention et de la mémoire. Chez le rat adulte et carencé en zinc, la baisse des concentrations en zinc dans l'hippocampe, et les altérations de la fonction cognitive (mémoire, apprentissage) qui lui sont corrélées, sont corrigées par la simple restauration des apports en zinc (Takeda et al., 2000). Chez l'homme, le zinc influence à la fois le développement et le fonctionnement du cerveau (Bentley et al.,

1997) et le déficit en zinc est impliqué dans l'altération des fonctions cognitives à la fois de l'enfant et de l'adulte (Kretsch, 1999).

Une diète en zinc chez l'adulte génère une diminution des performances mnésiques, qui est cependant réversible et ne touche pas la mémoire formée antérieurement à cette diète. Cette carence en zinc, touche surtout au niveau du cerveau, la concentration au sein des fibres moussues hippocampiques (Takeda et al., 2000). Cependant ces observations sont à moduler, car la déficience mnésique observée pourrait être due à une augmentation de la concentration en cuivre, en réponse à la diminution du taux de zinc.

Le turnover du zinc dans le cerveau est beaucoup plus lent que dans le foie, mais, paradoxalement, des régions du cerveau comme l'hippocampe, au niveau duquel les neurones glutamatergiques contenant du zinc sont très concentrés, sont très sensibles aux déficits en zinc, qui entraînent des altérations cognitives, des troubles de l'apprentissage, de la pensée, de la mémoire et de l'attention.

1.6.2. Zinc et pathologies.

Si le rôle du zinc dans des conditions physiologiques reste encore mal identifié, toute perturbation de son homéostasie génère d'importantes perturbations au sein de l'organisme. L'homéostasie du pool de zinc libre dans le cerveau est en effet au cœur du maintien des performances intellectuelles, et des altérations de cette homéostasie sont observées dans la maladie de Parkinson et dans celle d'Alzheimer, comme dans l'ischémie cérébrale. Plusieurs études ont montré l'élévation des concentrations de zinc dans le cerveau dans la maladie d'Alzheimer, et des modifications des transporteurs du zinc (ZnT) ont été récemment impliquées dans la formation des plaques amyloïdes chez l'animal (Lovell et al., 2005 ; Mocchegiani et al., 2005). Il est important de souligner que les bénéfices des suppléments associant plusieurs micronutriments dont le zinc dans la maladie d'Alzheimer ne sont pas clairement établis (Planas, 2004). Le plus souvent, la part due au zinc est difficile à établir, car les essais incluent le zinc dans des suppléments combinés qui rendent impossible l'estimation de l'effet bénéfique de chaque nutriment séparément.

Parallèlement, un excès extracellulaire de zinc peut être neurotoxique. In vitro, il faciliterait l'agrégation du peptide B-amyloïde et donc la formation de plaques séniles en cause dans la maladie d'Alzheimer.

L'altération de la concentration cérébrale en zinc peut être associée à l'étiologie et la manifestation de lésions épileptiques. Il a été montré que chez les souris épileptiques, la concentration en zinc au sein du gyrus denté est en dessous de la normale. Par ailleurs, le zinc

libéré par les fibres mossues semble permettre une dépolarisation des cellules pyramidales du champ CA3. Une trop forte stimulation des fibres mossues entraîne une forte diminution de la concentration en zinc dans les vésicules, observée après une ischémie ou une crise d'épilepsie.

Enfin il a été montré que des patients atteints de troubles dépressifs primaires présentaient un taux de zinc significativement plus bas que celui des patients contrôle. Une relation entre la sévérité de la dépression et le taux sériques en zinc semble pouvoir être établie. Le zinc pourrait donc avoir un effet antidépresseur, et Nowak et Szewczyk suggèrent qu'une supplémentation en zinc chez le patient dépressif permettrait de diminuer la dose nécessaire d'antidépresseur, réduisant ainsi les effets secondaires néfastes de la thérapie. (Nowak et al., 2002).

1.7. But de l'étude

Ainsi le zinc est un oligo-élément essentiel pour l'organisme et qui remplit de nombreuses fonctions au sein du système nerveux central. Pour mieux comprendre son implication dans les processus mnésiques, divers chélateurs de cet oligo-élément ont été utilisés. Le DEDTC est capable de chélater le zinc intravésiculaire et perturbe l'exocytose. Le CaEDTA, quant à lui, ne peut traverser les membranes plasmiques et par conséquent chélate le zinc libre après exocytose. Ces deux types de chélation ont été utilisés dans des apprentissages spatial et contextuel.

L'injection de DEDTC génère une perturbation de l'acquisition d'une mémoire spatiale dans un paradigme de navigation spatiale en piscine de Morris avec apprentissage distribué*, alors que ni la consolidation, ni le rappel ne semblent modifiés (Lassalle et al., 2000). Cependant l'utilisation d'un protocole massé* en piscine de Morris a permis à Florian et Roulet (2003) de mettre en évidence l'implication du zinc dans la phase de consolidation d'une mémoire spatiale de référence. Dans ces deux études, la capture du zinc vésiculaire par le DEDTC entraîne une forte altération de la mémoire spatiale, alors que la chélation du zinc libre par le CaEDTA n'a aucun effet et sert par conséquent de contrôle. Ces résultats soulignent d'une part l'importance du protocole expérimental choisi et d'autre part, soulignent le fait que le DEDTC chélatant le zinc intravésiculaire au niveau du neurone présynaptique empêcherait l'exocytose et donc la colibération zinc-glutamate, ces deux éléments étant colocalisés au niveau vésiculaire.

Plus récemment (Daumas et al., 2004), des résultats contradictoires ont été obtenus lors de l'utilisation du paradigme de peur au contexte. Le DEDTC perturbe l'apprentissage contextuel comme précédemment, cependant la chélation du zinc libre par le CaEDTA génère une forte altération de l'apprentissage contextuel. Ainsi, il a été montré pour la première fois *in vivo* que le zinc libre extracellulaire est impliqué dans l'acquisition et la consolidation d'un apprentissage de type contextuel. Le blocage de la libération du zinc après le conditionnement perturbe fortement la consolidation dans ce type d'apprentissage, traduisant une perte de la représentation contextuelle (Daumas et al., 2004). Le zinc semblerait donc jouer un rôle neuromodulateur dans ce type d'apprentissage.

*le protocole de la piscine de Morris se déroule en 3 phases (voir partie 2): **la familiarisation**, au cours de laquelle la souris ou le rat découvre le dispositif expérimental, **l'apprentissage**, au cours duquel l'animal apprend la localisation de la plate-forme par plusieurs passages successifs dans le dispositif, et **le test de biais spatial**, au cours duquel on vérifie que l'animal a bien appris. On peut utiliser 2 types de protocole expérimental, soit avec un apprentissage **massé** : tous les passages dans la piscine se font de manière successives le même jour, soit avec un apprentissage **distribué** : les passages se font sur plusieurs jours consécutifs (en général 3).

Dans le but de mieux comprendre le rôle du zinc libéré dans la fente synaptique, cette étude se propose de préciser l'effet de l'interaction de cet oligo-élément avec les récepteurs NMDA au glutamate dans deux situations d'apprentissage, l'apprentissage spatial en piscine de Morris et l'apprentissage de la peur conditionnée au contexte, dans lesquels le zinc semble avoir des implications différentielles.

Pour vérifier cela, des micro-injections de chélateur du zinc extracellulaire (CaEDTA : Ca²⁺-ethylenediamine tetracétate) et d'antagoniste des récepteurs NMDA, l'AP5 (D-2-amino-5-phosphonopentanoate) ont été réalisées dans la région CA3 après apprentissage de manière à perturber spécifiquement les étapes précoces de la consolidation mnésique.

Les résultats des travaux antérieurs obtenus avec le CaEDTA seul et le DEDTC seul sont admis et n'ont pas été refaits ici.

Nous émettons comme hypothèse que le glutamate est suffisant pour permettre la consolidation d'un apprentissage spatial, tandis qu'il ne l'est pas pour une consolidation correcte d'un apprentissage contextuel. En effet, dans ce type d'apprentissage la présence du zinc semble indispensable. Nous nous attendons donc à ce que la chélation du glutamate perturbe la consolidation des apprentissages spatial et contextuel, et que la chélation du zinc associée au blocage des récepteurs NMDA au glutamate perturbe de manière significativement plus importante la mémorisation d'un apprentissage contextuel. Les lésions réversibles ainsi produites devraient permettre de déterminer si le zinc est nécessaire ou/et suffisant pour permettre un apprentissage contextuel satisfaisant.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Sujets et opérations

2.2.1. Les animaux.

Les animaux utilisés sont des souris mâles de la lignée C57BL/6 J, obtenues à partir de l'élevage d'Iffa Credo à l'âge minimum de 5 semaines. Pour éviter toute influence du cycle hormonal sur le comportement et les performances mnésiques des animaux, seuls les mâles ont été utilisés au cours des différentes expériences. Les souris utilisées ont entre 9 et 12 semaines au moment des expériences et ont un poids moyen de 26g.

Les animaux sont en groupes de 3 à 5 par cage et placés dans une pièce thermostatée (21+/- 1°C) suivant un nyctémère de 12 heures avec un cycle lumineux commençant à 8h00. La nourriture et l'eau sont disponibles à volonté pendant toute la durée des expériences. Les expériences se déroulent entre 9 et 17 h.

2.2.2. Chirurgie.

Les différents produits utilisés seront injectés dans l'hippocampe dorsal via des canules implantées de façon définitive par stéréotaxie. Les souris sont anesthésiées avec un mélange de kétamine 1000 (100mg/kg, i.p) et de xylazine (15 mg/ kg, i.p), avant d'être placées sur l'appareil de stéréotaxie (La Précision Cinématographique, LPC). Une fois l'animal correctement positionné, le scalp est incisé, le crâne nettoyé et deux trous sont percés afin de pouvoir descendre les canules (24G, 7 mm) au niveau du cortex, juste au dessus de l'hippocampe dorsal. La position des canules a été déterminée par rapport aux coordonnées prises sur l'atlas de Franklin et Paxinos (1997), afin de les positionner au niveau de CA3, qui sera le lieu de toutes les injections :

	Rostro-caudal (par rapport à bregma)	Latéralité	Dorso-ventral (à partir du crâne)
Région CA3	-1,7 mm	+/- 2,5 mm	- 1,5 mm

Bregma : ce point est considéré comme un repère anatomique et correspond à la réunion entre la suture sagittale et la suture coronale. Ce point sert d'origine pour les coordonnées stéréotaxiques. A partir de Bregma, on peut définir des coordonnées selon le plan (x, y, z), voir Figure 2.2.

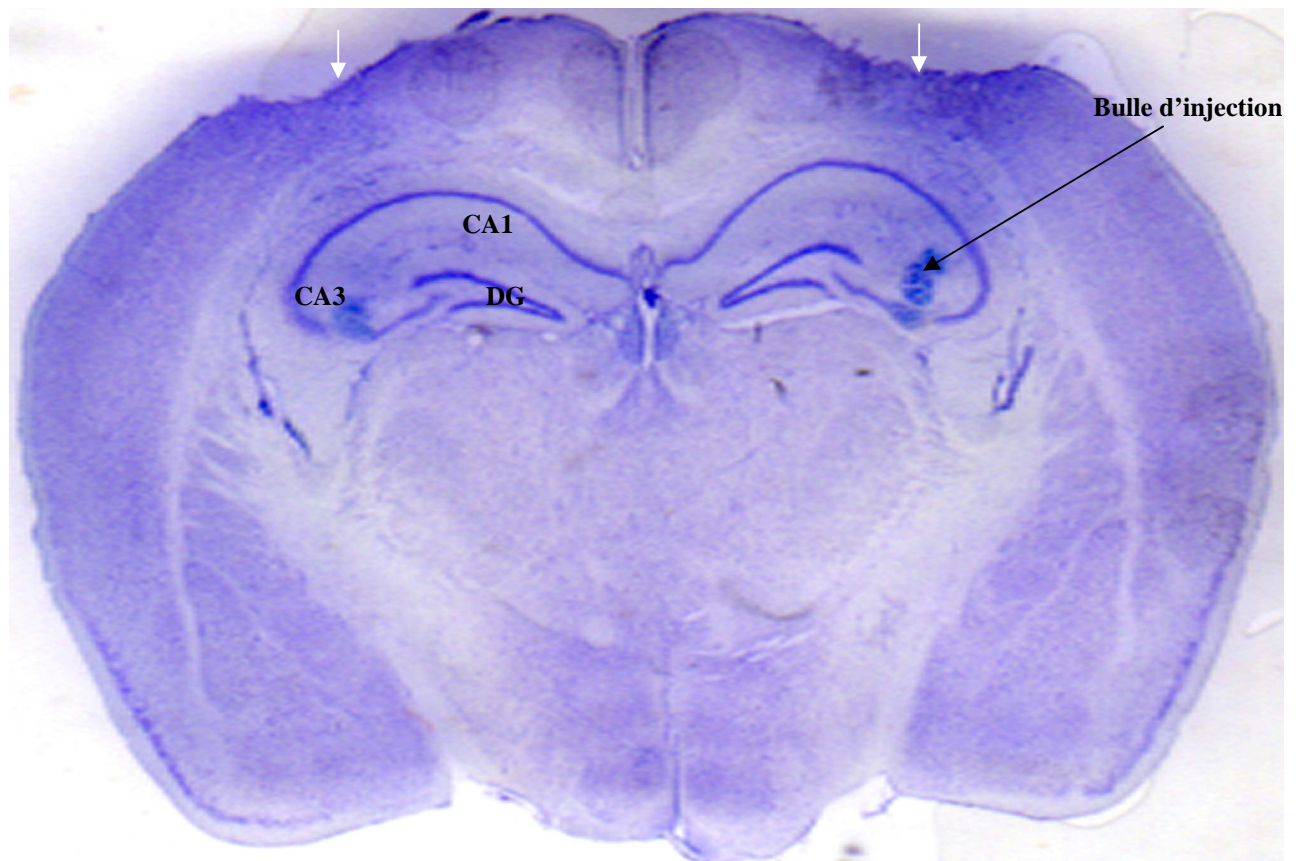


Figure 2.1 : Coupe transversale de l'hippocampe dorsal d'une souris après coloration à la thionine.

On peut voir les deux bulles d'injection au niveau de la région CA3 des hippocampes droit et gauche. Les flèches blanches indiquent la localisation du passage des canules.

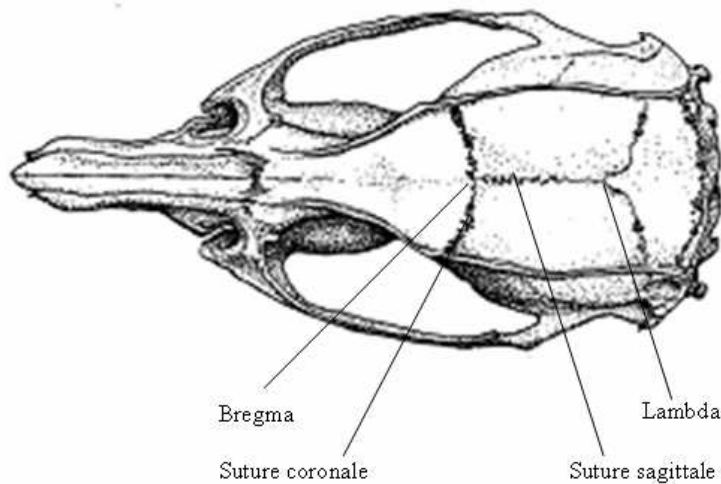


Figure 2.2 : Vue dorsale de crâne de souris et localisation du bregma.
(D'après le site : www.hcnr.med.harvard.edu.)

Du ciment dentaire est utilisé afin de fixer les canules au crâne (polycarboxylate, Sigma, France). Des mandrins sont introduits en attendant le moment de l'injection afin d'éviter toute obstruction des canules. Une fois l'opération effectuée, les souris disposent de 7 jours afin de récupérer de la chirurgie.

A la fin des tests comportementaux, les souris sont euthanasiées avec une overdose d'Hydrate de Chloral (800 mg/kg, i.p). Les cerveaux sont ensuite prélevés et placés dans un bain de glutaraldehyde 2,5% et de sucrose 30% pendant 24 h afin de fixer les tissus, les cerveaux sont ensuite placés dans un bain de sucrose 30% à 4°C de manière à générer une déshydratation des tissus.

Ce traitement permet de réaliser par la suite des coupes de 40µm d'épaisseur des cerveaux. Les tranches sont ensuite déposées sur des lames gélatinées à 1%. Une observation des coupes à la loupe binoculaire a permis de vérifier la bonne implantation des canules et le site d'injection (voir figure 2.1). Les individus mal implantés et/ou mal injectés ont été exclus de l'analyse.

2.2. Produits et injections

2.2.3. Molécules utilisées: *tous les produits proviennent de chez Sigma Chemical Co. (Lyon, France).*

2.2.3.1. Chélateurs du Zn extra-cellulaire: l'acide tetraacetic éthylenediamine saturé en calcium (**CaEDTA**) est utilisé pour sa capacité à chélater le zinc car c'est un chélateur de cations divalents avec une très grande affinité pour le zinc. Le CaEDTA ne peut pas pénétrer dans les cellules, son action sera donc restreinte à la chélation du zinc vésiculaire après libération dans la fente synaptique. Le ZnEDTA est utilisé comme contrôle, en raison de sa très haute affinité pour le zinc. Il est en effet saturé en zinc et ne pourra chélater aucun autre ion. L'affinité de ces 2 chélateurs pour le zinc est très haute, tandis que leur affinité pour le calcium ou le magnésium est très basse. Par conséquent, le CaEDTA chélatera le zinc sans chélater le calcium ou le magnésium, le ZnEDTA ne chélatera aucun de ces trois ions, et pourra en conséquence servir de contrôle.

2.2.3.2. Blocage des récepteurs NMDA: l'AP5 (D-2-amino-5-phosphonopentanoate) est un antagoniste des récepteurs NMDA. Il se fixe de manière spécifique sur les récepteurs NMDA, empêchant ainsi toute fixation du glutamate après sa libération synaptique.

Les chélateurs sont dissous dans une solution saline isotonique de NaCl (pH 7) afin d'obtenir une concentration finale de 200 mM. La concentration en AP5 (0,15µg par côté) ayant un effet comportemental moyen a été déterminée à partir de travaux antérieurs (Rouillet *et al.*, 2002). La durée d'action des produits a été estimée à environ une heure.

Les différentes solutions sont injectées immédiatement après l'apprentissage de manière à perturber de manière spécifique les étapes précoces de la consolidation mnésique. L'AP5 risque par ailleurs de diminuer l'activité motrice des souris, il est donc préférable de l'injecter après l'apprentissage afin d'éviter tout biais d'interprétation, ainsi que tout effet sur l'acquisition en cas d'administration pré-apprentissage.

Quatre groupes sont prévus : chaque souris reçoit un volume de 0,25 µl par hippocampe.

- **Groupe 1 :** les animaux reçoivent comme injection **uniquement de l'AP5** à une concentration de 0,15 µg par hippocampe.
- **Groupe 2 :** les souris reçoivent un mélange de CaEDTA et d'AP5.
- **Groupe 3 :** les souris reçoivent un mélange de ZnEDTA et d'AP5.

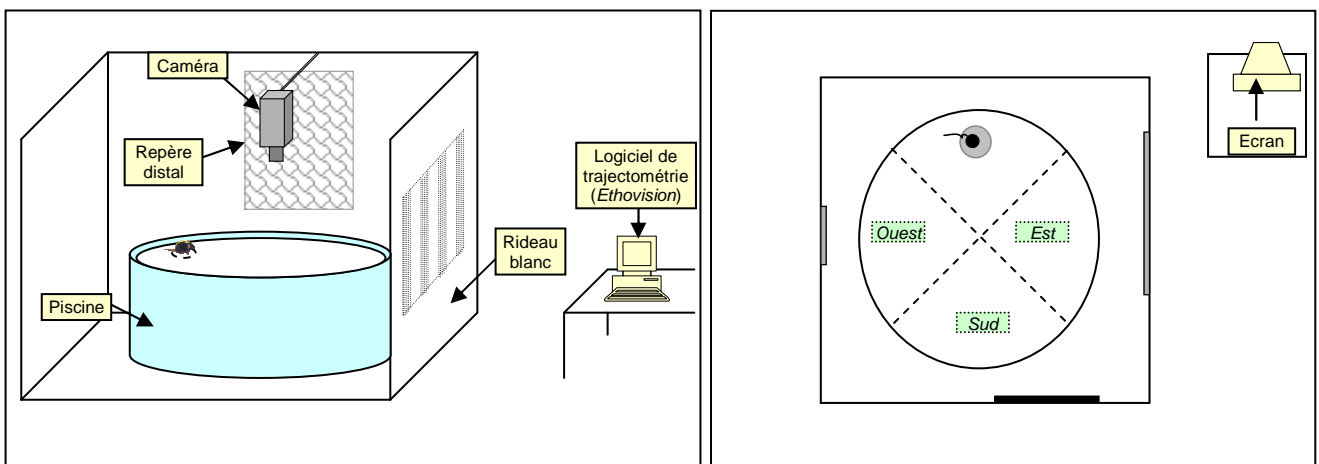
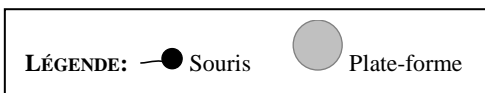


Figure 2.3 : Dispositif expérimental pour le test de navigation spatiale en piscine de Morris.



- **Groupe 4** : il s'agit du groupe contrôle injecté uniquement au ZnEDTA. Cela permet de vérifier l'effet non spécifique de l'EDTA : ici l'EDTA étant saturé en zinc, il ne pourra chélater aucun autre ion.
- *Groupe 5* : il s'agit du groupe injecté uniquement au DEDTC de manière à ne chélater que le zinc intravésiculaire
- *Groupe 6* : ce groupe est uniquement injecté au CaEDTA, seul le zinc libre sera chélaté.

Pour des raisons de temps, il n'a pas été possible de réaliser le groupe injecté au CaEDTA seul. Les résultats des groupes CaEDTA et DEDTC étant considérés comme reconnus et reproductibles seront repris des travaux antérieurs (Daumas, thèse Universitaire Toulouse III, 2004). Cela permettra d'effectuer une comparaison entre les effets comportementaux obtenus pour une injection de DEDTC et de CaEDTA seuls avec ceux obtenus lors du présent travail.

2.2.4. Injections.

Le jour de l'injection, les mandrins placés dans les canules sont retirés afin de permettre l'administration des molécules via des seringues d'injection. La longueur de l'injecteur est de 8,2 mm afin d'atteindre la région CA3. Les canules d'injection sont connectées à une micro-seringue Hamilton de 1 µl par un tube flexible en polyéthylène. La seringue est montée sur une pompe Bioblock qui délivre le produit à une vitesse de 0,11 µl/min. L'injection se fait en deux temps, chaque hippocampe reçoit un volume total de 0,25 µl, l'un après l'autre. Après chaque injection, les injecteurs restent en place une minute de plus dans les canules, afin d'éviter la remontée du liquide injecté par capillarité.

2.3. Appareils et tests comportementaux

2.3.1. Epreuve de navigation spatiale en piscine de Morris.

2.3.1.1. Dispositif (voir Figure 2.3): il est constitué d'une piscine en PVC ivoire et de forme circulaire (diamètre 110 cm, hauteur 50cm) remplie d'eau rendue opaque par l'ajout d'Opacifier 301 (Brenntag) et est maintenue à une température de 23-24°C. La plate-forme est circulaire (9 cm de diamètre) et amovible. La piscine se situe dans une pièce thermostatée (21-22°C) et comprenant 4 indices visuels accrochés sur les rideaux entourant la piscine et situés à une distance de 0,5 m de la piscine. Il est à noter qu'aucun indice n'est situé directement derrière la plate-forme de manière à n'avoir aucun indice directionnel direct.

2.3.1.2. Protocole expérimental : il consiste en une familiarisation au dispositif effectuée le premier jour : les souris doivent comprendre la composante procédurale de la tâche: « quoi faire » (s'échapper de l'eau) et « comment le faire » (par le biais de la plate-forme). Pour cela, chaque souris réalise 3 essais consécutifs. Un essai se déroule de la manière suivante : l'animal est d'abord placé pendant 1 min sur la plate-forme (PF) émergée de 5 mm au-dessus de la surface de l'eau, puis la souris est mise à l'eau par le manipulateur et dispose de 60 secondes maximum de recherche de la PF. A l'issue de ces 60 secondes, la souris est guidée vers la PF si elle n'a pas réussi à la trouver. Enfin, l'animal dispose de 1 minute de repos sur la PF. Au début de chaque essai, la souris est remise à l'eau en un point de départ différent (sud, est, ouest) choisi selon un mode pseudo-aléatoire, la plate-forme étant toujours placée au nord.

L'apprentissage massé se fait 24 heures après. Chaque souris réalise 4 sessions de 3 essais.

Chaque essai se déroule comme précédemment : une minute sur la PF, puis mise à l'eau (au Sud, à l'Est ou à l'Ouest selon un mode pseudo-aléatoire), 60 secondes de recherche maximum de la PF immergée à 5 mm sous la surface de l'eau, et 1 min de repos sur celle-ci. La souris est guidée vers la PF si elle ne la trouve pas à l'issue des 60 secondes. Pour pouvoir rejoindre la PF en ligne directe, la souris va donc devoir apprendre, au cours des essais d'acquisition, la localisation spatiale de la PF. Pour cela, elle va pouvoir s'orienter à l'aide des indices visuels attachés aux murs entourant la piscine.

Après chaque session, la souris est replacée dans sa cage.

A la **fin** des 4 sessions, chaque souris reçoit une injection dans CA3 d'une des 4 solutions (AP5 seul, AP5+ CaEDTA, AP5 +ZnEDTA ou ZnEDTA) selon le groupe auquel appartient l'animal.

24 h après l'apprentissage, chaque souris réalise un **test de biais spatial** de 60 secondes, au cours duquel on évalue la précision avec laquelle elle arrive à déterminer la position de la PF, celle-ci ayant été retirée de la piscine.

L'environnement restant le même d'une tâche à l'autre, les performances des animaux sont donc dépendantes de l'association « événement-environnement » acquise au cours des essais précédents.

L'ordinateur et l'expérimentateur se situent dans la même pièce mais restent cachés derrière un rideau situé à l'ouest de la piscine.

Tous les essais ont été analysés grâce au système de tracking Ethovision 2.3 de Noldus. Ce logiciel permet de digitaliser les trajets, de diviser le dispositif en quartiers (Nord, Sud, Est et Ouest), ainsi qu'en annuli (N, S, E, O). Un annulus représente le nombre de fois

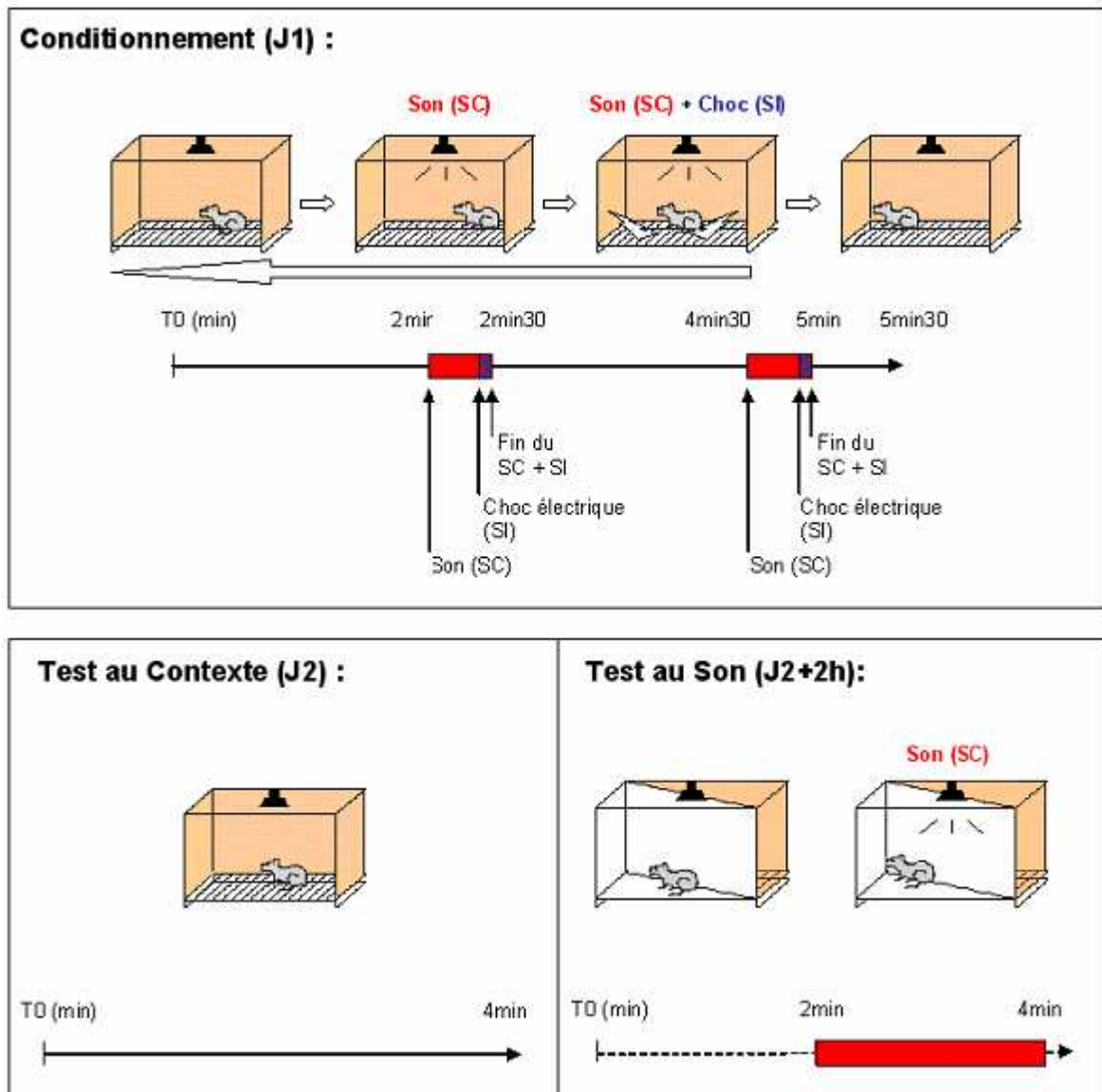


Figure 2.4 : Dispositif et protocole expérimentaux pour le test de peur conditionnée au contexte.

Ce paradigme expérimental utilise la capacité des animaux qui, dans la nature, apprennent à anticiper le danger en associant les stimuli environnementaux aux événements aversifs qui se produisent conjointement. Dans le conditionnement pavlovien de peur, un stimulus neutre (SN), comme le contexte (la cage expérimentale, l'environnement de la pièce...) et/ou un son (stimulus conditionnel, SC), entraîne une réponse comportementale conditionnée après avoir été associée à un stimulus inconditionnel tel qu'un choc électrique (SI).

que la souris croise un cercle factice correspondant aux quatre localisations possibles de la plate-forme au sein de chaque quadrant (N, S, E, O).

On obtient ainsi lors du probe-test le temps passé dans chaque quadrant ainsi que le nombre de croisements d'annuli.

2.3.2. Test de conditionnement de peur au contexte.

2.3.2.1. Dispositif (voir Figure 2.4): le conditionnement est réalisé dans une chambre de PVC rectangulaire (135cm, L 20cm, H 25cm) avec trois côtés opaques de couleur ivoire et un pan transparent à travers lequel les sujets sont filmés. Le sol de la cage est constitué de barreaux en acier inoxydable de 4mm de diamètre, distants de 1 cm les uns des autres. Il est relié à un générateur délivrant des chocs électriques de 2 sec de durée, et de 0.7 mA d'intensité par l'intermédiaire d'un scrambler. Un papier est placé sous la grille de manière à absorber les défécations et l'urine. Le haut-parleur, situé sur le couvercle de la boîte, délivre un son aigu de 85 dB. Une seule source de lumière blanche (60 W) éclaire le dispositif. Deux indices visuels noir et blanc de 32 cm x 41 cm sont fixés en avant de la cage, contre les rideaux blancs séparant le dispositif du reste de la pièce. Entre chaque individu, le dispositif est nettoyé à l'éthanol à 70°.

Les expériences sont enregistrées à l'aide d'une caméra vidéo placée en face de la cage et reliée à un téléviseur magnétoscope, situé dans la pièce adjacente.

La mémorisation de l'apprentissage contextuel est étudiée dans les mêmes conditions expérimentales que lors du conditionnement, alors que celle de l'apprentissage au son est relevée dans un contexte modifié. La modification du contexte consiste en l'ajout d'un cache en PVC blanc (murs et sol) qui coupe en diagonale la chambre de conditionnement, modifiant ainsi sa forme, en une modification de l'éclairage (l'ampoule de 60 W utilisée lors du conditionnement est remplacée par une ampoule de 40W) et des odeurs (la cage de conditionnement est cette fois nettoyée à l'acide acétique entre chaque passage), enfin les indices visuels distaux sont retirés.

2.3.2.2. Protocole expérimental: une demi-heure avant le début des expériences, les animaux sont sortis de l'animalerie et placés en attente.

- **conditionnement de peur au contexte** : il est réalisé 4 jours après le probe-test en piscine de Morris, et consiste en une seule séance d'apprentissage faite de deux essais. La souris est introduite dans la chambre de conditionnement par le couvercle du dispositif. Après deux minutes d'exploration libre, un son est émis pendant 30 secondes et se co-termine avec

un choc électrique de 2 secondes. Cette séquence est répétée une seconde fois, à la suite de laquelle 30 secondes sont laissées à l'animal avant de le remettre dans sa cage. L'animal reste donc 5 min et 30 secondes dans le dispositif lors du conditionnement au contexte. A la fin du conditionnement, chaque souris reçoit une injection de 0,25 µl dans chaque hippocampe, la solution injectée est fonction du groupe auquel appartient la souris.

- **test au contexte** : vingt-quatre heures après, la souris est replacée dans le même contexte pendant 4 minutes afin de relever son niveau de conditionnement au contexte. Aucun autre stimulus ne lui est présenté.

- **test au contexte modifié et au son** : deux heures après le test au contexte, le test au son est effectué dans le contexte modifié. La souris, ayant été replacée entre temps dans sa cage d'élevage, est introduite dans la chambre modifiée et au bout de 2 minutes, un son est émis en continu pendant les deux dernières minutes du test.

2.3.2.3. Mesures: l'indice comportemental retenu dans ce paradigme comme permettant de quantifier le taux de conditionnement au contexte est le freezing. Cet indice est défini comme une immobilisation tonique, avec absence totale de mouvement, exceptés ceux dus à la respiration (Blanchard et Blanchard, 1969). Ce comportement a été sélectionné par l'évolution chez les rongeurs en raison de sa forte valeur adaptative face aux prédateurs.

L'occurrence du freezing est relevée toutes les 5 secondes pendant 2 secondes au cours du conditionnement ainsi que lors des tests au contexte et au contexte modifié, selon la méthode d'échantillonnage instantané à intervalles de temps fixe (Martin et Bateson, 1986).

On a choisi de commencer les tests comportementaux par l'épreuve de navigation spatiale et de procéder par la suite au test de la peur au contexte, de manière à ce que les manipulations standardisées en piscine de Morris tiennent lieu de manipulation préalables et nécessaires pour le paradigme de peur au contexte.

2.4. Analyses des données

2.4.1. Résultats obtenus en piscine de Morris.

La collecte des données est réalisée en direct grâce au logiciel éthovision. Au cours des sessions d'apprentissage, la latence pour monter sur la plate-forme a été enregistrée pour chaque essai. Ces données ont permis d'établir une courbe d'apprentissage moyenne des individus pour chaque session d'apprentissage. Lors test de biais spatial, deux mesures ont été principalement enregistrées: le temps passé dans chaque quadrant de la piscine, ainsi que le nombre de croisements d'annuli.

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel Systat 10.2 pour Windows.

La phase d'apprentissage a été analysée avec une ANOVA à un facteur (groupe). Pour le test de biais spatial lors du rappel, une ANOVA à mesures répétées a permis de comparer la recherche de la plate-forme pour chacun des groupes traités. De manière à rendre l'analyse de variable possible, un changement de variable a été réalisé sur la fréquence de croisements d'annuli, en utilisant la racine carrée de cette valeur. Puis pour chaque traitement, une ANOVA à mesures répétées a également été réalisée de manière à analyser la variation de fréquentation des différents annuli. Lorsqu'une variation significative de fréquentation des annuli a été détectée, un test post-hoc a permis de déterminer quel annulus était le plus croisé.

2.4.2. Résultats obtenus lors du test de peur conditionnée au contexte.

Les données de freezing (p) exprimées en pourcentage de temps d'immobilité ont été transformées grâce à la formule $Q = \arcsin(\text{Racine}(p)/100)$, de manière à homogénéiser la variance. Les analyses statistiques ont ensuite été réalisées sur la variable Q. Les valeurs ainsi obtenues ont été traitées par des analyses de variance (ANOVA) à un facteur (traitement) en utilisant le logiciel Systat (version 10.2 pour Windows). Les comparaisons post-hoc ont été faites en utilisant le test de Fisher's LSD lorsqu'une interaction était détectée.

Les niveaux alpha sont déterminés à $p < 0,05$ pour tous les tests dans les analyses des résultats obtenus avec les deux paradigmes expérimentaux utilisés.

LATENCE D'EVASION (Apprentissage)

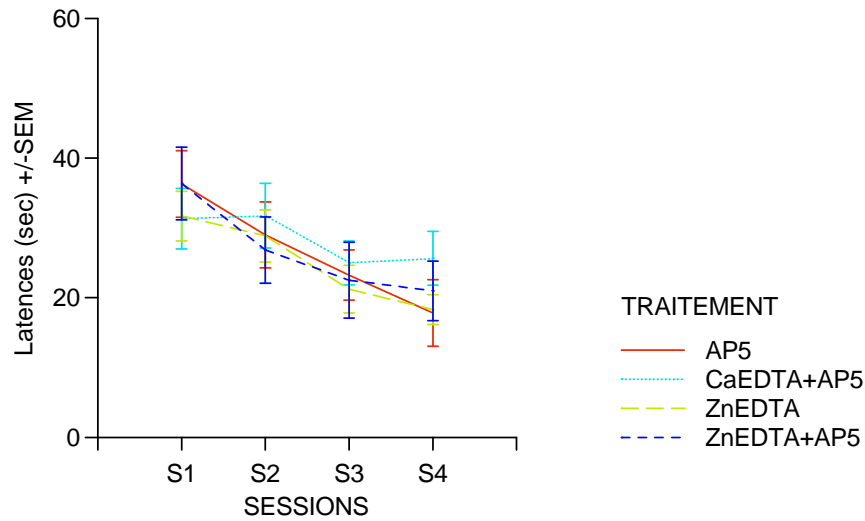


Figure 3.1.A.

TEST DE BIAIS SPATIAL

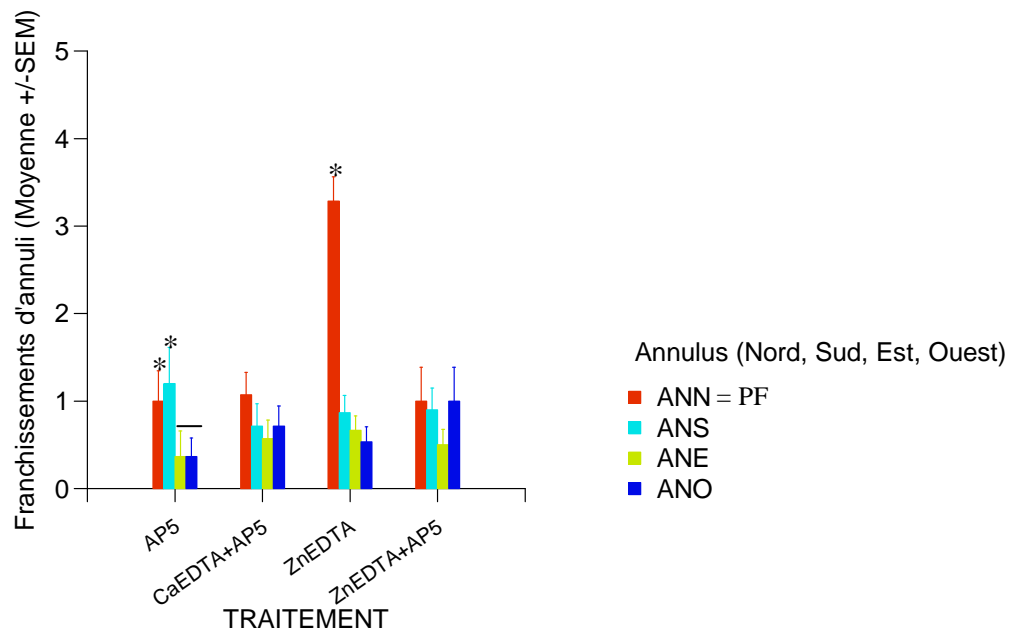


Figure 3.1.B

Figure 3.1 : Résultats obtenus lors de l'apprentissage spatial en piscine de Morris.

- Acquisition** : latence moyenne des différents groupes pour retrouver la plate-forme (située au Nord) au cours de l'apprentissage massé en piscine de Morris, avant injection.
- Test de biais spatial** : effets des 4 traitements (ZnEDTA, AP5, CaEDTA+AP5, ZnEDTA+AP5), administrés après le conditionnement, sur le nombre moyen de passages au travers des annuli de chaque quadrant, lors du rappel à 24 h.

3. RESULTATS EXPERIMENTAUX ET DISCUSSION

3.1. Résultats expérimentaux

Après examen histologique des coupes de cerveaux, 37 individus ont été retirés des analyses en raison d'un mauvais emplacement des canules et/ou des injections. Le nombre d'animaux retenus pour chaque groupe afin de réaliser les analyses statistiques est le suivant : ZnEDTA : n = 13, AP5 : n = 15, CaEDTA+AP5 : n = 12 et ZnEDTA+AP5 : n = 8.

3.1.1. Résultats obtenus en piscine de Morris.

- **Apprentissage :**

La figure 3.1.A représente l'évolution du temps moyen nécessaire aux individus pour atteindre la plate-forme lors de l'apprentissage massé, constitué de 4 sessions de 3 essais chacune.

Sur l'ensemble des souris, la latence d'évasion moyenne diminue de façon significative au cours des essais ($F_{(3,138)} = 12.077$, $p < 0.001$). L'analyse de variance ne révèle aucune différence significative entre les groupes ($F_{(3,46)} = 0.345$, $p = 0.793$), ce qui est normal car à ce stade les animaux n'ont encore reçu aucun traitement différentiel.

Les souris des différents groupes ont donc toutes appris à retrouver la plate-forme immergée en s'aidant notamment des repères distaux. Tous les individus présentent donc le même profil d'apprentissage.

- **Test de rappel à 24h :**

La figure 3.1.B illustre le nombre moyen de passages à travers chacun des quatre annuli pour les quatre groupes d'individus. On peut noter que les quatre groupes d'animaux présentent un profil de croisement d'annuli différent. En effet, pour le groupe contrôle (ZnEDTA), le croisement préférentiel est le Nord, ce qui correspond à la localisation de la plate-forme. Pour le groupe AP5, la fréquentation préférentielle est le Sud qui correspond au

point de départ lors de ce test, tandis que les groupes CaEDTA+AP5 et ZnEDTA+AP5 croisent tous les annuli de manière équivalente.

Les analyses statistiques confirment un profil de recherche différent sur l'ensemble des groupes ($F_{(3,138)} = 12.307$, $p < 0.001$), et une interaction traitement x croisement d'annulus est observée ($F_{(9, 138)} = 4.661$, $p < 0.001$).

Des ANOVA en mesures répétées réalisées au sein de chaque groupe permettent de montrer une hétérogénéité dans le croisement des différents annuli pour les groupes ZnEDTA ($F_{(3,42)} = 25.846$, $p < 0.001$) et AP5 ($F_{(3,30)} = 3.805$, $p = 0.020$), tandis que les individus des groupes CaEDTA+AP5 et ZnEDTA+AP5 ne présentent pas une telle hétérogénéité ($F_{(3, 39)} = 1.491$, $p = 0.232$ et $F_{(3, 27)} = 0.656$, $p = 0.586$).

Le test post-hoc de Fischer a permis de faire des comparaisons de fréquentations entre annuli pour les groupes ZnEDTA et AP5. Pour le groupe contrôle (ZnEDTA), la mémorisation est normale car l'annulus préférentiellement fréquenté est le Nord ($p < 0.001$). On confirme donc que le ZnEDTA ne perturbe pas l'apprentissage et peut donc servir de contrôle.

Le blocage de la fixation du glutamate sur les récepteurs NMDA, causée par l'AP5, en association ou pas avec des chélateurs du zinc (ZnEDTA ou CaEDTA) perturbe la mémorisation de l'apprentissage. Le chélateur de zinc extracellulaire (CaEDTA) seul ne semble pas avoir d'effet propre, comme le montrent les résultats de Florian et Rouillet (2003). En effet, on n'observe pas de différence entre les profils de recherche des groupes CaEDTA+AP5 et ZnEDTA+AP5. La présence du chélateur du zinc avec l'AP5 n'apporte aucun effet particulier par rapport à la solution neutre de ZnEDTA. Curieusement, le groupe traité à l'AP5 seul présente un profil particulier. Les souris qui ne se souviennent pas mieux de la localisation de la plate-forme que les autres groupes traités (AP5+chélateurs) ont tendance à revenir systématiquement au point de départ de l'essai (ici le Sud). On a en effet un croisement préférentiel de l'annulus Sud par rapport à l'annulus Est ($p = 0.036$) et l'annulus Ouest ($p = 0.029$).

EVOLUTION DU FREEZING LORS DE L'APPRENTISSAGE

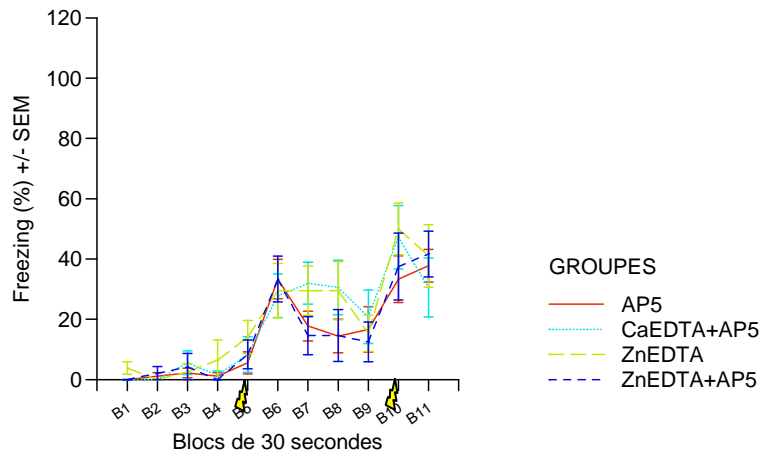


Figure 3.2.A.

FREEZING AU CONTEXTE (Rappel)

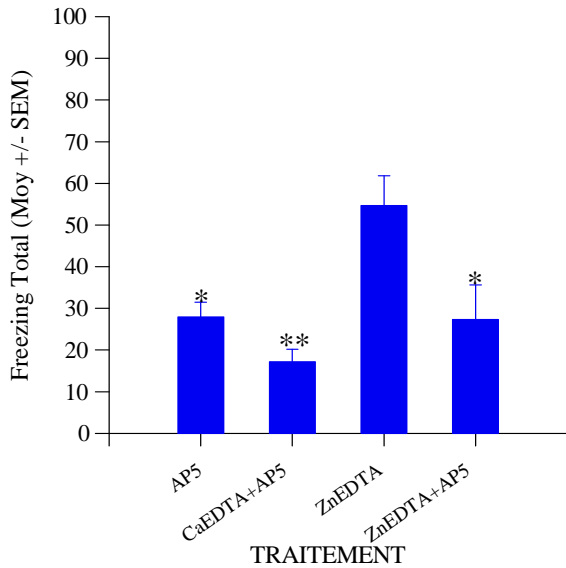


Figure 3.2.B

FREEZING AU SON (Rappel)

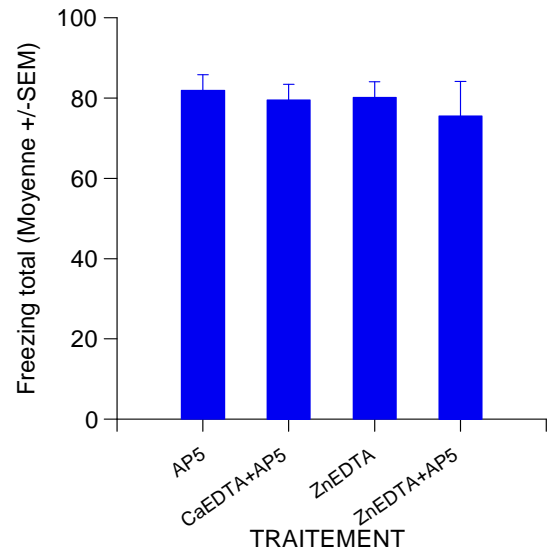


Figure 3.2.C

Figure 3.2. : Résultats obtenus lors du paradigme de peur conditionnée au contexte.

A. Cinétique du freezing au cours du conditionnement pour les différents groupes, avant injection. L'émission du choc électrique, simultanée avec le son, est représentée par les flèches jaunes sur l'axe des abscisses.

B, C. Effets des 4 traitements (ZnEDTA, AP5, CaEDTA+AP5, ZnEDTA+AP5) administrés dans la région CA3 immédiatement après le conditionnement et relevés lors du test au contexte (B) et du test au son (C).

3.1.2. Résultats obtenus dans le test de peur conditionnée au contexte.

- **Conditionnement :**

La figure 3.2.A montre l'évolution du freezing au cours du temps. L'observation de cette courbe montre que les animaux ne manifestent aucun freezing au cours des premières minutes, et que ce n'est qu'après le premier choc et surtout après le second qu'une réponse notable apparaît chez l'ensemble des individus. Une ANOVA sur ces données, avec pour facteurs le groupe et le temps, montre un effet significatif du temps, mais aucun effet significatif du facteur groupe ($F_{(3,44)} = 0.681$, $p = 0.568$), ainsi qu'une absence d'interaction entre ces deux facteurs. Ce qui est normal puisque les groupes n'ont encore subi aucun traitement différentiel.

- **Tests de mémoire :**

Test au contexte :

La figure 3.2.B montre la réponse conditionnée au contexte évaluée au cours des 4 minutes du test. L'observation de cette figure montre que la réponse au contexte varie en fonction du traitement reçu par les individus. En effet, alors que le taux de freezing est de l'ordre de 60% pour les individus traités au ZnEDTA (contrôles), il est de l'ordre 30% pour ceux du groupe AP5 et ZnEDTA+AP5 et d'environ 18% pour les individus du groupe CaEDTA+AP5. L'analyse statistique confirme cette description des données puisqu'une ANOVA révèle une variation significative du taux de freezing entre les groupes ($F_{(3,45)} = 9.309$, $p < 0.001$, $R^2 = 0.384$). Le test post-hoc de Fischer confirme une différence significative du taux de freezing, entre le groupe contrôle ZnEDTA et les groupes : AP5 ($p = 0.003$), CaEDTA+AP5 ($p < 0.001$) et ZnEDTA+AP5 ($p = 0.002$).

Le test de Fischer révèle une diminution significativement plus importante du taux de freezing pour le groupe injecté au CaEDTA+AP5 par rapport à celui injecté à l'AP5 ($p = 0.032$).

Par ailleurs aucune différence significative n'existe entre les groupes AP5 et ZnEDTA+AP5 ($p = 0.580$), confirmant l'absence d'effet propre du ZnEDTA seul.

Test au son :

On peut observer sur la figure 3.2.C un taux très important de freezing lors du test au son pour les différents groupes, suggérant ainsi que les différentes injections n'ont en rien perturbé l'acquisition amygdalienne de la tâche, c'est-à-dire l'association son-choc.

L'ANOVA réalisée confirme l'absence de variation significative des taux de freezing entre les différents groupes ($F_{(3,44)} = 0.488$, $p = 0.692$).

Test au contexte modifié:

La figure 3.3 montre le comportement de freezing des animaux lors du test au contexte modifié. On observe un faible niveau de réponse des individus, suggérant ainsi que les animaux discriminent correctement le contexte de conditionnement du contexte modifié. L'ANOVA confirme cette description, avec une absence d'effet significatif du facteur traitement ($F_{(3,44)} = 0.363$, $p = 0.780$).

FREEZING AU CONTEXTE MODIFIE (Rappel)

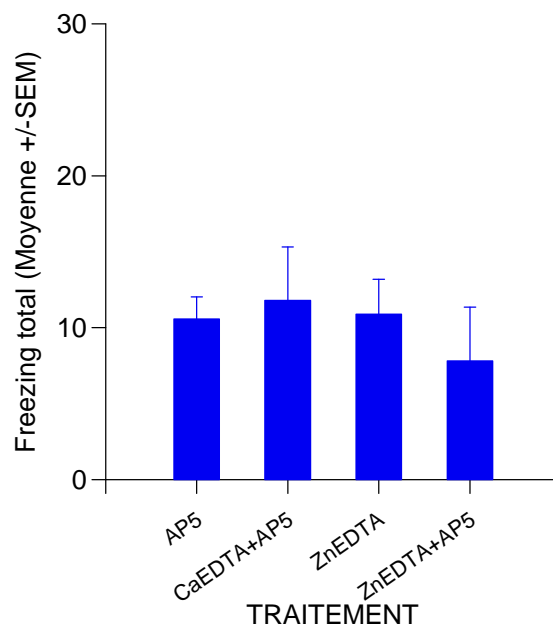


Figure 3.3 : Effets des 4 traitements (ZnEDTA, AP5, CaEDTA+AP5, ZnEDTA+AP5) administrés immédiatement après le conditionnement sur le taux de freezing et relevés lors du test au contexte modifié.

3.2. Discussion

Les travaux antérieurs avaient pour but de démontrer l'implication de la région CA3 de l'hippocampe dorsal dans 2 types d'apprentissages hippocampo-dépendants: l'apprentissage spatial mis en évidence par le test de navigation spatiale en piscine de Morris et l'apprentissage contextuel mis en évidence par le paradigme de peur conditionnée au contexte, et ce, en bloquant l'activité des fibres moussues à l'aide de différents chélateurs de zinc, soit pendant l'acquisition soit pendant la consolidation. Nous rappelons que les processus mnésiques se déroulent en 3 principales étapes : l'acquisition, la consolidation et le rappel.

Pour bloquer le zinc de la région CA3, différents types de chélateurs ont été utilisés : le DEDTC, à action intra synaptique sur le zinc vésiculaire, et le CaEDTA, à effet extra synaptique sur le zinc libre. Nous supposons que le DEDTC agit sur les éléments vésiculaires présents au niveau des terminaisons synaptiques des fibres moussues, à savoir : le zinc et le glutamate. La chélation du zinc par le DEDTC va donc perturber la co-libération de ces deux éléments. L'injection de ces chélateurs peut se faire avant la séance d'apprentissage, de manière à perturber l'acquisition et la consolidation, compte tenu de la durée d'action des produits. De même, nous nous attendons à perturber spécifiquement la consolidation en injectant immédiatement après l'apprentissage. Enfin la phase de rappel peut être étudiée en administrant les drogues juste avant le test de rappel. Il est important de souligner que ces différents chélateurs ont une très forte affinité pour le zinc et ne chélateront pas le calcium.

Les résultats précédemment obtenus au sein de notre laboratoire et utilisant un paradigme de navigation spatiale en apprentissage distribué (une session d'apprentissage par jour pendant 4 jours) ont montré l'implication du zinc, via l'utilisation de DEDTC, dans l'acquisition d'une mémoire spatiale, mais non dans sa consolidation et son rappel (Bataille et al., 2000). Par contre, le chélateur de zinc extracellulaire (CaEDTA) ne génère aucune perturbation. Cependant, l'utilisation d'un protocole relativement massé (les 4 sessions d'apprentissage sont faites de manière consécutive sur une seule journée et en 2-3 heures environ pour 4 souris) en piscine de Morris a mis en évidence un effet du DEDTC sur l'acquisition mais également sur la consolidation d'une mémoire spatiale de référence (Florian et Roulet, 2003). L'injection de CaEDTA juste après le conditionnement ne perturbe en rien le profil de recherche de la plate-forme, permettant ainsi aux auteurs d'utiliser le

groupe injecté au CaEDTA comme contrôle. Nous pouvons souligner ici l'importance du protocole expérimental utilisé qui semble être un élément important à considérer.

Dans le paradigme de peur conditionnée au contexte, le blocage réversible du zinc par le DEDTC (Daumas et al., 2003) a permis de démontrer que la voie des FM est également nécessaire à l'acquisition et la consolidation d'une mémoire contextuelle, mais non à son rappel. Il est important de rappeler que ce type d'apprentissage présente une forte composante émotionnelle et que l'apprentissage se fait de manière massée, l'individu recevant en effet deux associations chocs électriques-son en une séance de 5 minutes. De manière inattendue, la chélation du zinc extracellulaire par le CaEDTA a résulté en une altération de l'acquisition et de la consolidation de la mémoire contextuelle, contrairement aux résultats obtenus en apprentissage spatial. Cet effet du CaEDTA est par ailleurs spécifique, car dans les mêmes conditions, l'utilisation d'un chélateur saturé en zinc, le ZnEDTA, n'entraîne aucune perturbation. Il semble donc que le zinc libéré dans la fente synaptique ait un effet propre sur l'acquisition et la consolidation de cette tâche.

La question soulevée ici est de savoir pour quelles raisons on observe une telle différence d'effet du CaEDTA entre ces deux tâches pourtant hippocampo-dépendantes. Elles sollicitent en effet les mêmes réseaux hippocampiques et nécessitent toutes deux la constitution d'une représentation mnésique spatiale (pour le Morris) ou configurale (pour le test de peur au contexte). Nous pouvons supposer que cette dépendance hippocampique est plus forte pour le test de navigation spatiale, car les souris injectées au DEDTC avant ou après l'apprentissage ne sont pas capables de retrouver la localisation correcte de la plate-forme (Florian et Rouillet, 2003 ; Bataille et al., 2000). On peut considérer que cette dépendance est plus modérée pour un apprentissage contextuel, car le taux de freezing n'est jamais ramené à zéro, quel que soit le traitement (DEDTC, CaEDTA). On observe en effet toujours un apprentissage résiduel (Daumas et al., 2003).

S'il est fort délicat d'envisager une implication différentielle du zinc dans ces deux types d'apprentissages, on peut cependant remarquer que ces trois tâches (spatial distribué, spatial « relativement » massé et massé en une seule séance pour le contextuel) présentent un protocole d'apprentissage différent, ce qui semble être une composante essentielle à prendre en compte. On a en effet un gradient entre une forme distribuée de l'apprentissage faite sur quatre jours (Bataille et al., 2000), un apprentissage « relativement » massé sur une demi-journée (environ 2 heures) et un apprentissage qui peut être réalisé en une seule fois (2 essais en 5 minutes). Or Kogan et al. (1997) ont souligné l'importance du protocole expérimental

utilisé, car ils ont montré que des souris KO partiel pour la protéine CREB exprimaient une mémoire à long terme (contextuelle et spatiale) presque normale quand le protocole utilisé était distribué, alors que celle-ci se trouvait fortement perturbée après un conditionnement massé (Kogan et al., 1997). Ainsi par analogie, nous pouvons supposer que les différences de résultats en ce qui concerne la phase de consolidation mnésique pourraient s'expliquer par la différence de procédure utilisée. La consolidation semble rendue possible par un apprentissage distribué en Morris, en raison du conditionnement se déroulant sur plusieurs jours. Par ce biais, la consolidation pourrait se faire malgré l'utilisation de DEDTC, ce qui est impossible lors d'un protocole massé en Morris, ainsi qu'en contextuel où même le CaEDTA altère fortement la consolidation.

Pour expliquer ces résultats expérimentaux, nous pouvons également nous intéresser aux effets propres à chacun des chélateurs. Comme nous l'avons vu précédemment, le DEDTC agit au niveau de l'élément présynaptique et va empêcher la libération du zinc et du glutamate. Les travaux de Li et al. (2001, voir supra) ont montré qu'in vitro le zinc est nécessaire à l'induction de la PLT des FM, car une chélation du zinc génère un blocage de celle-ci. De même, nous savons que le glutamate est nécessaire à l'induction de la PLT postsynaptique au niveau FM-CA3.

Le CaEDTA, quand à lui, agit seulement au niveau de la fente synaptique en chélatant le zinc après sa libération lors de la transmission synaptique. Cette chélation va donc empêcher la PLT induite par le zinc au niveau des fibres moussues, mais ne perturbera en rien la PLT postsynaptique induite par le glutamate seul.

Ainsi ces résultats suggèrent une implication du zinc et du glutamate dans l'acquisition et la consolidation. Le zinc est nécessaire à l'induction de la PLT des FM (Li et al., 2003) qui est impliquée dans les processus d'acquisition et de consolidation, il peut également jouer le rôle de neurotransmetteur atypique en pénétrant dans l'élément postsynaptique et en interagissant avec de nombreuses cascades enzymatiques (Takeda, 2000), et enfin il intervient dans une forme particulière de PLT, la PLT présynaptique des FM, et qui est indépendante des récepteurs NMDA (Nicoll et Malenka, 1995). Elle peut donc se faire en l'absence de glutamate. Le zinc semble également favoriser la consolidation.

Notre étude reprend les protocoles de Morris avec apprentissage massé (Florian et al., 2003) et d'apprentissage contextuel (Daumas et al., 2003). On s'intéresse cette fois à

dissocier les rôles respectifs du zinc et du glutamate après leur libération, ce que l'utilisation de DEDTC ne peut pas faire, puisqu'il empêche la libération de ces deux éléments à la fois.

Nos résultats en Morris montrent que le blocage de la fixation du glutamate sur les récepteurs NMA par l'AP5 empêche la consolidation dans une procédure d'apprentissage partiellement massé (l'apprentissage complet de 4 sessions consécutives se déroule sur environ 3-4 heures pour un groupe de 5 souris). On observe en effet pour les individus traités au : CaEDTA+AP5, ZnEDTA+AP5 et à l'AP5 une forte perturbation du profil de recherche de la plate-forme, lors du test de biais spatial. De même, on confirme que le CaEDTA n'a pas d'effet propre car les individus ayant reçu du CaEDTA+AP5 ou du ZnEDTA+AP5 sont pareillement perturbés.

La figure ci-dessous (Figure 3.4) regroupe l'ensemble des résultats obtenus en contextuel par Daumas et al (2003) et ceux obtenus dans le cadre de cette étude.

TAUX DE FREEZING MOYEN AU CONTEXTE

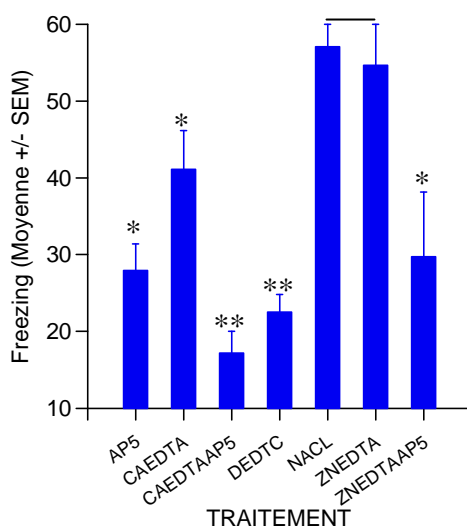


Figure 3.4 : Comparaison des taux de freezing moyens obtenus lors du test au contexte et induits par les différents traitements réalisés dans le présent travail : ZnEDTA, AP5, CaEDTA+AP5, ZnEDTA+AP5 et ceux réalisés précédemment (Daumas et al., 2003) : CaEDTA, DEDTC et NaCl.

On voit ici que la consolidation est maximale pour les groupes NaCl et ZnEDTA, c'est-à-dire lorsque le glutamate **et** le zinc sont présents. La consolidation est diminuée (taux de freezing de l'ordre de 40%) pour le groupe injecté au CaEDTA seul, c'est-à-dire lorsque le glutamate seul est présent. On observe une consolidation encore plus faible induite par un injection

d'AP5 ou de ZnEDTA+AP5 (28% de freezing), enfin on a une consolidation très dégradée en l'absence de zinc et de glutamate (lot CaEDTA+AP5). Il est intéressant de remarquer que la réaction au contexte induite par le DEDTC ou le CaEDTA+AP5 est équivalente et très basse. On confirme bien que le DEDTC, en plus de chélater le zinc intravésiculaire, empêche également la libération de glutamate, puisque son effet équivaut à une chélation du zinc libre associée à un blocage des récepteurs NMDA au glutamate.

Ainsi les procédures en piscine de Morris, que ce soit avec un apprentissage distribué ou dans des conditions d'apprentissage relativement massé, permettent tout de même la consolidation, même en l'absence de zinc (CaEDTA), du moment que le glutamate est libéré. Par contre lors d'un apprentissage à forte composante émotionnelle effectué en une seule séance (apprentissage contextuel), l'absence de zinc perturbe fortement la consolidation.

En comparant les résultats obtenus en fonction de la procédure d'apprentissage, nous pouvons résumer ainsi l'action des différents traitements sur la consolidation mnésique :

- Pour un apprentissage spatial en piscine de Morris nous obtenons :

A. Apprentissage distribué

	Avec glutamate	Sans glutamate
avec zinc	Consolidation mnésique normale	Non réalisé
sans zinc	Non réalisé	Consolidation mnésique normale

B. Apprentissage massé

	Avec glutamate	Sans glutamate
avec zinc	Consolidation mnésique normale	Consolidation mnésique défectueuse
sans zinc	Consolidation mnésique normale	Consolidation mnésique défectueuse

Figure 3.5. : Tableaux comparatifs schématiques des résultats obtenus dans le présent travail pour un apprentissage massé (A) versus distribué (B) en piscine de Morris. Comparaison du degré de consolidation mnésique en fonction de la présence ou l'absence de zinc et/ou de glutamate.

- Pour un apprentissage de type contextuel dans le paradigme de la peur conditionnée au contexte, nous avons :

Apprentissage massé

	Avec glutamate	Sans glutamate
avec zinc	Consolidation mnésique normale	Consolidation mnésique défectueuse
sans zinc	Consolidation mnésique défectueuse	Consolidation mnésique défectueuse

Figure 3.6 : Tableau représentant les résultats obtenus lors d'un apprentissage massé dans le paradigme de la peur conditionnée au contexte. On note la présence ou la diminution de la consolidation mnésique en fonction de la présence ou l'absence de zinc et/ou de glutamate.

Aucun apprentissage de type distribué n'a été pour l'instant décrit dans le cadre de l'utilisation du paradigme de peur au contexte.

CONCLUSION

Le but de ce travail était d'essayer de comprendre quelle était l'implication particulière du zinc contenu dans les fibres moussues de la région CA3 hippocampique, lors d'apprentissage spatial et contextuel aux vues des résultats expérimentaux précédemment obtenus dans notre laboratoire.

A l'issue de ce travail, nous pouvons conclure que le zinc et le glutamate sont indispensables à la consolidation pour un apprentissage en une seule séance, comme c'est le cas dans un apprentissage de type contextuel. Lorsque la procédure d'apprentissage est partiellement massée, la consolidation peut se réaliser en l'absence de zinc (groupe CaEDTA). Lorsque la procédure est très distribuée (intervalles de 24 h entre les séances), la consolidation peut se faire en l'absence de zinc et de glutamate (groupe DEDTC). Il y a donc compensation d'une perturbation du système fibres moussues - cellules pyramidales par le protocole utilisé.

De manière à vérifier ces hypothèses, il serait intéressant de comparer des cas extrêmes de protocole en utilisant le test de peur conditionnée au contexte avec :

- un apprentissage en un seul essai suivi de l'injection d'un des chélateurs. On peut également augmenter l'intensité du choc électrique afin d'assurer un taux de freezing équivalent à celui de la procédure à 2 essais. On devrait alors avoir un effet maximal du DEDTC et du CaEDTA+AP5 et qui devrait réduire le taux de freezing à une valeur proche de zéro.
- un apprentissage en 5 essais ou bien un protocole constitué de 2 essais par jour à 2 heures d'intervalle. Cela devrait permettre d'observer une tendance vers un effet moyen induit par les injections d'AP5, de CaEDTA+AP5 et de DEDTC.

Ainsi, contrairement à notre hypothèse de départ, dans laquelle nous avons suggéré une éventuelle implication différentielle de l'hippocampe en fonction du type d'apprentissage à effectuer (spatial versus contextuel), il semblerait que les modalités de consolidation puissent varier en fonction de la procédure d'apprentissage utilisée. En effet, les apprentissages spatial et contextuel sont bien hippocampo-dépendants et nécessitent tous deux la présence du zinc et du glutamate pour une consolidation optimale. Cependant il apparaît ici que le choix de la procédure massée ou distribuée est une composante essentielle lorsque le fonctionnement de l'hippocampe est dégradé, et il semble qu'un protocole distribué permette de pallier un blocage du réseau FM-CA3.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

Amaral, D. G., Dolorfo, C., and Alvarez-Royo, P. (1991). Organisation of CA1 projections to the subiculum: a PHA-L analysis in the rat. *Hippocampus* *1*, 415-435.

Anagnostaras, S. G., Gale, G. D., and Fanselow, M. S. (2001). Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippocampus* *11*, 8-17.

Assaf, S. Y., and Chung, S. H. (1984). Release of endogenous Zn²⁺ from brain tissue during activity. *Nature* *308*, 734-736.

Blanchard, R. J., and Blanchard, D. C. (1969). Crouching as an index of fear. *J Comp Physiol Psychol* *67*, 370-375.

Bentley, M. E., Caulfield, L. E., Ram, M., Santizo, M. C., Hurtado, E., Rivera, J. A., Ruel, M. T., and Brown, K. H. (1997). Zinc supplementation affects the activity patterns of rural Guatemalan infants. *J Nutr* *127*, 1333-1338.

Butcher, S. P., Davis, S., and Morris, R. G. (1990). A dose-related impairment of spatial learning by the NMDA receptor antagonist, 2-amino-5-phosphonovalerate (AP5). *Eur Neuropsychopharmacol* *1*, 15-20.

Daumas, S. (2004). Analyse pharmacologique du rôle de l'hippocampe dorsal dans le traitement de la mémoire contextuelle: du rôle des afférences sensorielles aux neuromodulateurs des fibres moussues, Doctorat de Neurosciences, Université Toulouse III, 198 p.

Daumas, S., Halley, H., and Lassalle, J. M. (2004). Disruption of hippocampal CA3 network: effects on episodic-like memory processing in C57BL/6J mice. *Eur J Neurosci* *20*, 597-600.

Florian, C., and Roulet, P. (2004). Hippocampal CA3-region is crucial for acquisition and memory consolidation in Morris water maze task in mice. *Behav Brain Res* *154*, 365-374.

- Frederickson, C. J., Klitenick, M. A., Manton, W. I., and Kirkpatrick, J. B. (1983). Cytoarchitectonic distribution of zinc in the hippocampus of man and the rat. *Brain Res* 273, 335-339.
- Frederickson, C. J., Suh, S. W., Koh, J. Y., Cha, Y. K., Thompson, R. B., Labuda, C. J., Balaji, R. V., Cuajungco, M. P. (2002). Depletion of intracellular zinc from neurons by use of an extracellular chelator in vivo and in vitro. *J Histochem Cytochem* 50 (12), 1659-1662.
- Guidolin, D., Polato, P., Venturin, G., Zanotti, A., Mocchegiani, E., Fabris, N., and Nunzi, M. G. (1992). Correlation between zinc level in hippocampal mossy fibers and spatial memory in aged rats. *Ann N Y Acad Sci* 673, 187-193.
- Harvard Center for Neurodegeneration and Repair, 2006.
Adresse URL: <http://www.hcnr.med.harvard.edu/>
- Howell, G. A., Welch, M. G., and Frederickson, C. J. (1984). Stimulation-induced uptake and release of zinc in hippocampal slices. *Nature* 308, 736-738.
- Kahle, W., Anatomie Système nerveux (tome 3).
Flammarion-Médecine-Sciences, 1981, 372 p.
- Kelly, E. J., Quaife, C. J., Froelick, G. J., and Palmiter, R. D. (1996). Metallothionein I and II protect against zinc deficiency and zinc toxicity in mice. *J Nutr* 126, 1782-1790.
- Kogan, J. H., Frankland, P. W., Blendy, J. A., Coblenz, J., Marowitz, Z., Schutz, G., and Silva, A. J. (1997). Spaced training induces normal long-term memory in CREB mutant mice. *Curr Biol* 7, 1-11.
- Lassalle, J. M., Bataille, T., and Halley, H. (2000). Reversible inactivation of the hippocampal mossy fiber synapses in mice impairs spatial learning, but neither consolidation nor memory retrieval, in the Morris navigation task. *Neurobiol Learn Mem* 73, 243-257.
- Li, Y., Hough, C. J., Frederickson, C. J., and Sarvey, J. M. (2001a). Induction of mossy fiber -> Ca³ long-term potentiation requires translocation of synaptically released Zn²⁺. *J Neurosci* 21, 8015-8025.

Li, Y., Hough, C. J., Suh, S. W., Sarvey, J. M., and Frederickson, C. J. (2001b). Rapid translocation of Zn(2+) from presynaptic terminals into postsynaptic hippocampal neurons after physiological stimulation. *J Neurophysiol* 86, 2597-2604.

Lin, D. D., Cohen, A. S., and Coulter, D. A. (2001). Zinc-induced augmentation of excitatory synaptic currents and glutamate receptor responses in hippocampal CA3 neurons. *J Neurophysiol* 85, 1185-1196.

Lu, Y. M., Taverna, F. A., Tu, R., Ackerley, C. A., Wang, Y. T., and Roder, J. (2000). Endogenous Zn(2+) is required for the induction of long-term potentiation at rat hippocampal mossy fiber-CA3 synapses. *Synapse* 38, 187-197.

Mac Gill, 2006. Le cerveau à tous les niveaux.

Adresse URL: http://lecerveau.mcgill.ca/flash/index_d.html

Martin, P., and Bateson, P. (1986). *Measuring behaviour: an introductory guide*. Cambridge Univ Press.

Min, M. Y., Rusakov, D. A., and Kullmann, D. M. (1998). Activation of AMPA, kainate, and metabotropic receptors at hippocampal mossy fiber synapses: role of glutamate diffusion. *Neuron* 21, 561-570.

Nicoll, R. A., and Malenka, R. C. (1995). Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 377, 115-118.

Nowak, G., and Szewczyk, B. (2002). Mechanisms contributing to antidepressant zinc actions. *Pol J Pharmacol* 54, 587-592.

O'Keefe, J., and Nadel, L. (1978). *The hippocampus as a Cognitive Map*, Oxford University Press, Oxford.

Palmiter, R. D., Cole, T. B., Quaipe, C. J., and Findley, S. D. (1996). ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14934-14939.

Phillips, R. G., and LeDoux, J. E. (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 106, 274-285.

Qian, J., and Noebels, J. L. (2005). Visualization of transmitter release with zinc fluorescence detection at the mouse hippocampal mossy fibre synapse. *J Physiol* 566, 747-758.

Schmid, G., Chittolini, R., Raiteri, L., and Bonanno, G. (1999). Differential effects of zinc on native GABA(A) receptor function in rat hippocampus and cerebellum. *Neurochem Int* 34, 399-405.

Séverin, L. (2006). Zinc et maladie d'Alzheimer, Doctorat de pharmacie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Toulouse III, 120 p.

Stewart, G. R., Frederickson, C. J., Howell, G. A., and Gage, F. H. (1984). Cholinergic denervation-induced increase of chelatable zinc in mossy-fiber region of the hippocampal formation. *Brain Res* 290, 43-51.

Stupien, G., Florian, C., and Roullet, P. (2003). Involvement of the hippocampal CA3-region in acquisition and in memory consolidation of spatial but not in object information in mice. *Neurobiol Learn Mem* 80, 32-41.

Takeda, A. (2000). Movement of zinc and its functional significance in the brain. *Brain Res Brain Res Rev* 34, 137-148.

Takeda, A., Takefuta, S., Okada, S., and Oku, N. (2000). Relationship between brain zinc and transient learning impairment of adult rats fed zinc-deficient diet. *Brain Res* 859, 352-357.

Wang, Z., Li, J. Y., Dahlstrom, A., and Danscher, G. (2001). Zinc-enriched GABAergic terminals in mouse spinal cord. *Brain Res* 921, 165-172.

Zigmond, M. J., Bloom, F. E., Landis, S.C., Roberts, J. L., and Squire, L.R. (1999). *Fundamental Neuroscience*, Academic Press, San Diego.

Toulouse, 2007

NOM : BOUHSIRA

Prénom : Emilie

TITRE : Interaction Zinc-Glutamate dans l'hippocampe dorsal de la souris.

RESUME: Cette étude a pour but de mieux comprendre les effets du zinc et du glutamate dans l'hippocampe dorsal de la souris, ainsi que leurs rôles respectifs dans la consolidation mnésique. Pour cela, des souris ont été soumises à un apprentissage de type contextuel grâce au paradigme de la peur conditionnée au contexte et à un apprentissage spatial en piscine de Morris, avec une procédure massée. Après l'apprentissage, elles ont reçu des injections dans la région hippocampique CA3 de différents chélateurs du zinc et d'un antagoniste des récepteurs NMDA, ou bien d'un mélange des 2.

La comparaison des résultats obtenus suite à une seule ou plusieurs sessions d'acquisition dans le cadre d'une procédure massée ou distribuée, suggèrent que le Zinc et le Glutamate sont nécessaires pour la consolidation mnésique dans des conditions d'apprentissage sévères, alors qu'un apprentissage de type distribué permettrait une consolidation mnésique quand seul le glutamate ou le zinc sont présents.

MOTS-CLES : Hippocampe, zinc, glutamate, apprentissage, chélation du zinc.

ENGLISH TITLE: Zinc-Glutamate interaction in dorsal hippocampus of mice.

ABSTRACT: In order to further understand the effects of zinc and glutamate in the dorsal hippocampus of mice, and their specific effects on memory consolidation, mice were submitted to contextual fear conditioning and spatial learning with massed practice, and then received infusions in the CA3 area of different zinc chelators and an antagonist of NMDA receptors, or a mixture of them.

Comparison of results obtained under a single session acquisition and multiple sessions learning procedures under massed or distributed practice, suggest that both Zinc and Glutamate are necessary for memory consolidation in the more stringent learning conditions, whereas distributed practice could allow memory consolidation when only Zinc or Glutamate are present.

KEYWORDS: Hippocampus, zinc, glutamate, learning, zinc chelators.