



## Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints> ID : 9604

**To cite this version :**

Lafaix, Olivier. *Implication du récepteur au NMDA dans le vieillissement, l'apprentissage et la mémorisation : approche expérimentale par sur-régulation de la sous-unité GluN2B du récepteur au NMDA dans l'hippocampe de souris*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2013, 80 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: [staff-oatao@inp-toulouse.fr](mailto:staff-oatao@inp-toulouse.fr).

# **IMPLICATION DU RÉCEPTEUR AU NMDA DANS LE VIEILLISSEMENT, L'APPRENTISSAGE ET LA MÉMORISATION :**

## **APPROCHE EXPÉRIMENTALE PAR SUR- RÉGULATION DE LA SOUS-UNITÉ GluN2B DU RÉCEPTEUR AU NMDA DANS L'HIPPOCAMPE**

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

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

*par*

**LAFAIX Olivier**

Né, le 16 septembre 1986 à ANNECY (74)

---

**Directeur de thèse : Mme Martine KOLF-CLAUW**

---

### **JURY**

PRESIDENT :

**M. Christian VIRENQUE**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

**Mme Martine KOLF-CLAUW**

**M. Jean-Yves SAUTET**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE



**Ministère de l'Agriculture et de la Pêche  
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

**Directeur** : M. A. MILON

**Directeurs honoraires** M. G. VAN HAVERBEKE  
M. P. DESNOYERS

**Professeurs honoraires** :

M. L. FALIU	M. J. CHANTAL	M. BODIN ROZAT DE MENDRES NEGRE
M. C. LABIE	M. JF. GUELFY	M. DORCHIES (émérite)
M. C. PAVAU	M. EECKHOUTTE	M. BRAUN (émérite)
M. F. LESCURE	M. D.GRIESS	M. TOUTAIN (émérite)
M. A. RICO	M. CABANIE	
M. A. CAZIEUX	M. DARRE	
Mme V. BURGAT	M. HENROTEAUX	

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

M. **AUTEFAGE André**, Pathologie chirurgicale  
M. **CORPET Denis**, Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires  
M. **DELVERDIER Maxence**, Anatomie Pathologique  
M. **ENJALBERT Francis**, Alimentation  
M. **EUZEBY Jean**, Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie  
M. **FRANC Michel**, Parasitologie et Maladies parasitaires  
M. **MARTINEAU Guy**, Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour  
M. **PETIT Claude**, Pharmacie et Toxicologie  
M. **REGNIER Alain**, Physiopathologie oculaire  
M. **SAUTET Jean**, Anatomie  
M. **SCHELCHER François**, Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour

**PROFESSEURS 1° CLASSE**

M. **BERTHELOT Xavier**, Pathologie de la Reproduction  
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, Physiologie et Thérapeutique  
Mme **CLAUW Martine**, Pharmacie-Toxicologie  
M. **CONCORDET Didier**, Mathématiques, Statistiques, Modélisation  
M. **FOUCRAS Gilles**, Pathologie des ruminants  
M. **LEFEBVRE Hervé**, Physiologie et Thérapeutique

**PROFESSEURS 2° CLASSE**

Mme **BENARD Geneviève**, Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale  
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, Pathologie infectieuse  
Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, Pathologie de la Reproduction  
M. **DUCOS Alain**, Zootechnie  
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, Parasitologie et Maladies parasitaires

- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie  
M **GUERRE Philippe**, Pharmacie et Toxicologie  
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, Pathologie de la Reproduction  
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*  
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*  
M **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*  
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*  
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*  
Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

#### PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, Professeur d'Anglais  
M **SEVERAC Benoît**, Professeur d'Anglais

#### MAÎTRES DE CONFERENCE HORS CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale  
M. **BERGONIER Dominique**, Pathologie de la Reproduction  
Mlle **BOULLIER Séverine**, Immunologie générale et médicale  
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, Histologie, Anatomie pathologique  
M. **BRUGERE Hubert**, Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale  
Mlle **DIQUELOU Armelle**, Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores  
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour  
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, Anatomie pathologique  
M. **LYAZRHI Faouzi**, Statistiques biologiques et Mathématiques  
M. **MATHON Didier**, Pathologie chirurgicale  
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, Alimentation

#### MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, Pathologie chirurgicale  
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, Physique et Chimie biologiques et médicales  
Mlle **BIBBAL Delphine**, Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale  
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, Biologie cellulaire et moléculaire  
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, Dermatologie  
M. **CONCHOU Fabrice**, Imagerie médicale  
M. **CORBIERE Fabien**, Pathologie des ruminants  
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, Chirurgie Equine  
M. **DOSSIN Olivier**, Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores  
Mlle **FERRAN Aude**, Physiologie  
M. **GUERIN Jean-Luc**, Elevage et Santé avicoles et cunicoles  
M. **JAEG Jean-Philippe**, Pharmacie et Toxicologie  
Mlle **LACROUX Caroline**, Anatomie Pathologique des animaux de rente  
M. **LIENARD Emmanuel**, Parasitologie et maladies parasitaires  
M. **MAILLARD Renaud**, Pathologie des Ruminants  
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, Pathologie Chirurgicale  
M. **MOGICATO Giovanni**, Anatomie, Imagerie médicale  
M. **NOUVEL Laurent**, Pathologie de la reproduction  
Mlle **PALIERNE Sophie**, Chirurgie des animaux de compagnie  
Mlle **PAUL Mathilde**, Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins  
Mme **PRADIER Sophie**, Médecine interne des équidés  
M. **ROBISSON Didier**, Productions animales (ruminants)  
Mme **TROGELER-MEYNADIER Annabelle**, Alimentation  
M. **VOLMER Romain**, Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)  
M. **VERWAERDE Patrick**, Anesthésie, Réanimation

**MAITRES DE CONFERENCES ET AGENTS CONTRACTUELS**

M. **BOURRET Vincent**, *Microbiologie et infectiologie*  
Mme **FERNANDEZ Laura**, *Pathologie de la reproduction*

**ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS**

Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*  
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*  
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*  
Mlle **PASTOR Mélanie**, *Médecine Interne*  
M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*  
Mme **WARET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*



A notre Président de thèse

**Monsieur le Professeur Christian VIRENQUE**

Professeur des Universités

*Anesthésiologie*

Qui nous a fait l'honneur de présider notre jury de thèse

Hommages respectueux.

A notre jury de thèse

**Madame le Professeur Martine KOLF-CLAUW**

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Pharmacologie-Toxicologie*

Qui nous a aidé et dirigé dans notre travail

Qu'elle trouve ici l'expression de notre plus grand respect.

**Monsieur le Professeur Jean-Yves SAUTET**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Anatomie-Embryologie*

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse

Sincères remerciements.



## Remerciements

### **Mme le Dr Kathy Magnusson**

*De l'Université d'Etat d'Oregon*

Pour sa gentillesse et son accueil,

Et sans qui cette thèse n'aurait jamais vu le jour.

### **A l'équipe du *Merial Veterinary Scholars Program***

Pour leur disponibilité, leur écoute,

Et pour cette merveilleuse expérience humaine qu'ils m'ont permis de vivre.

### **Dr Sylvia Wirth**

*Chercheur au Centre des Neurosciences Cognitives*

Pour m'avoir fait découvrir pour la première fois la recherche biomédicale

Et pour son amitié, durable au fil des ans.

*A ma famille,*

*Que ce travail soit une bien modeste preuve de  
l'amour et de l'admiration que je vous porte.*

*A mes amis,*

*Pour votre amitié sans faille durant toutes ces années.*

*The world is a stage, but the play is badly cast.*

*Oscar wilde, Lord Arthur Savile's Crime*

*Aussi étroit soit le chemin,*

*Nombreux les châtiments infâmes,*

*Je suis le maître de mon destin,*

*Je suis le capitaine de mon âme.*

*William Ernest Henley « Invictus »*

## Table des matières

<b>Introduction</b>	<b>13</b>
<b>Première partie : La mémoire et le récepteur au NMDA: classification, stockage, exploration</b>	<b>15</b>
I- Les différentes formes de mémoire : définition et classification	15
I-1 Définition des notions de mémorisation et d'apprentissage	15
I-2 Les différentes formes de mémoires	15
I-2-1 Présentation	15
I-2-2 La mémoire à court terme et la mémoire de travail	17
I-2-3 La mémoire à long terme	17
I-2-3-1 La mémoire explicite	17
I-2-3-2 La mémoire implicite	18
I-3 La Potentialisation à Long Terme (PLT)	24
I-3-1 La théorie de Donald Hebb	24
I-3-2 Définition	25
I-3-3 Bases physiologiques de la PLT	25
I-3-4 PLT et récepteur au NMDA	27
I-4 Les bases anatomiques et cellulaires du stockage mnésique chez les mammifères	28
I-4-1 Particularités de l'hippocampe	28
I-4-2 Structure interne de l'hippocampe	29
I-4-3 Connexions neuronales internes à l'hippocampe	30
I-4-4 Importance de l'hippocampe dans l'établissement de la mémoire spatiale	31
I-4-4-1 Carte cognitive et apprentissage latent	31
I-4-4-2 Les cellules de lieu	31
I-4-5 Hippocampe et vieillissement	32
II – Les méthodes expérimentales d'exploration de la mémoire	32
II-1 La boîte de Skinner	33
II-2 Les labyrinthes	33
II-2-1 Le labyrinthe en T	34
II-2-2 Le labyrinthe en T multiple	35
II-2-3 Le labyrinthe radial	36
II-2-4 La piscine de Morris	38
III – Neurobiologie du récepteur au NMDA	40
III-1 Importance de l'étude du récepteur au NMDA	40
III-2 Biologie moléculaire du récepteur au NMDA	41
III-2-1 La famille GluN1	42
III-2-2 La famille GluN2 : importance de l'étude de la sous-unité GluN2B	42
III-2-3 La famille GluN3 : une famille encore peu connue	44
IV – Implication du récepteur au NMDA en toxicologie : exemple du bisphénol A	44

## **Deuxième partie: effets d'une sur-régulation de la sous-unité GluN2B sur les fonctions de mémorisation et d'apprentissage chez les rongeurs jeunes et séniles** \_\_\_\_\_ **46**

I- Objectifs de l'étude _____	46
II- Matériels et Méthodes _____	47
II-1 Le vecteur viral _____	47
II-2 Les animaux _____	47
II-3 La chirurgie stéréotaxique _____	48
II-3-1 Principe général _____	48
II-3-2 Procédure de chirurgie stéréotaxique _____	48
II-3-3 Anesthésie et analgésie _____	48
II-3-4 Les injections de vecteurs viraux _____	49
III-5 Contrôles histologiques _____	49
III-5-1 Efficacité de l'adénovirus en tant que vecteur _____	50
III-5-2 Spécificité de l'expression du gène GluN2B dans les cellules de l'hippocampe _____	51
II-4 Les tests comportementaux _____	52
II-4-1 Entraînement _____	52
II-4-2 Les tests comportementaux _____	53
II-4-2-1 L'essai pilote _____	53
II-4-2-2 Les essais tests _____	55
II-4-2-3 L'essai enquête _____	56
II-4-2-4 Les essais inversés _____	57
II-4-2-5 Les essais enquête inversés _____	57
II-4-2-6 Les essais témoins _____	57
II-5 Enregistrement des données _____	59
II-6 Analyse des données _____	60
II-6-1 Un échantillon _____	61
II-6-2 La distance cumulée _____	62
II-6-3 La distance moyenne à la plateforme _____	62
II-6-4 Coordonnées X et Y _____	63
II-6-5 Le chemin idéal _____	63
II-6-6 La proximité cumulée du chemin idéal _____	64
II-6-7 La proximité cumulée corrigée _____	64
II-6-8 Les échantillons du chemin idéal _____	65
II-6-9 Les échantillons corrigés _____	65
II-6-10 La proximité moyenne corrigée _____	65
III- Résultats _____	65
III-1 La tâche de mémoire spatiale à long terme _____	65
III-2 Les essais pilote et enquêtes _____	66
III-3 Les essais inversés _____	67
III-4 Les essais témoins _____	68
IV- Discussion _____	68

## **Conclusion** \_\_\_\_\_ **73**

## **Annexe 1: Feuille utilisée pour l'anesthésie des souris en vue de la procédure de chirurgie stéréotaxique** \_\_\_\_\_ **75**

## **Annexe 2: Feuille utilisée pour les tests comportementaux** \_\_\_\_\_ **76**

## **Bibliographie** \_\_\_\_\_ **77**

## Table des illustrations

Figure 1: Classification des différentes formes de mémoires identifiées chez l'Homme .....	16
Figure 2: Illustration du comportement classique décrit par Pavlov.....	19
Figure 3 : Illustration de la boîte à problèmes imaginée par E. Thorndike.....	21
Figure 4 : Illustration du mécanisme de Potentialisation à Long Terme .....	26
Figure 5 : Représentation de l'hippocampe de rat (Sautet, 2012). .....	28
Figure 6 : Vue en coupe transversale de l'hippocampe de souris .....	29
Figure 7 : Schématisation du flux d'information au sein de l'hippocampe .....	30
Figure 8 : Illustration de la boîte de Skinner .....	33
Figure 9: Illustration du labyrinthe en T .....	34
Figure 10: Illustration du labyrinthe en T multiple .....	35
Figure 12 : Illustration de la piscine de Morris pour les essais témoins.....	39
Figure 13 : Représentation du récepteur au NMDA .....	41
Figure 14 : Classification des différents variants de la sous-unité GluN1 du récepteur au NMDA en fonction des ARN messagers .....	43
Figure 15 : Points de chirurgie stéréotaxique sur le crâne du rat. ....	49
Figure 16: Cellules de peau de lapin injectées à la fois avec le gène GFP et le gène GluN2B et seulement avec le gène GFP. ....	50
Figure 17: Coupe histologique de l'hippocampe montrant l'expression de la sous-unité GluN2B, de la protéine GFP, et de la protéine GFAP chez des souris âgées .....	51
Figure 18 : Organisation de la tâche de la mémoire à long terme .....	54
Figure 19 : Illustration du déroulement des essais tests.....	55
Figure 20 : Exemples de trajets suivis par les rongeurs lors des essais enquêtes.....	56
Figure 21: Illustration de la piscine de Morris lors des essais témoins .....	58
Figure 22: Vue de la piscine de Morris depuis la caméra .....	59
Figure 23 : Illustration du calcul de la distance cumulée .....	62
Figure 24: Méthode de calcul pour le chemin idéal .....	63
Figure 25: Illustration du calcul de la distance cumulée du chemin idéal .....	64
Figure 26 : Proximité cumulée pour les animaux âgés et jeunes .....	66
Figure 27 : Essais pilote et enquêtes pour les animaux âgés et jeunes .....	67
Figure 29 : Essais témoins pour les animaux âgés et jeunes.....	68
Tableau 1 : Les quatre formes de conditionnement opérant .....	22
Tableau 2: Nombre d'animaux utilisés par chaque traitement et par tranche d'âge .....	47
Tableau 3 : Extrait d'un fichier Excel généré après extraction des données fournies par le logiciel SMART.....	61

## Introduction

L'Homme, en essayant de découvrir l'origine de la pensée, n'a pas tout d'abord envisagé que le cerveau en soit le siège. Certes, le premier manuscrit médical où le cerveau apparaît sous un nom qui lui est propre est égyptien et daté de 3000 ans avant Jésus-Christ. Toutefois, Egyptiens, Mésopotamiens et Hébreux n'avaient pas conscience de son importance : tous croyaient que l'organe qui recèle intelligence et sentiments était le cœur et non l'encéphale. Cette théorie dite « cardiocentriste » fût reprise par Aristote dans la Grèce Antique. Ce n'est qu'avec Platon puis Galien que se développe la thèse dite « céphalocentriste » selon laquelle pensée et sentiments siègent dans le cerveau. L'opinion erronée d'Aristote survivra jusqu'au dix-huitième siècle. Cette incertitude se retrouve en effet chez Shakespeare dans *Le marchand de Venise* : « Dis-moi où siège l'amour, dans le cœur ou dans la tête ? ».

Les recherches sur le cerveau ont permis, au cours des siècles, d'en établir des cartes et de découvrir ces cellules si particulières qui le composent. Toutefois, ce que l'on appelle aujourd'hui les neurosciences cognitives ne sont réellement apparues que dans le courant des années soixante. Au cours du siècle dernier, de grandes avancées ont été réalisées dans la compréhension de la biologie du cerveau. D'abord, la biologie cellulaire et la biochimie ont permis aux scientifiques de mieux comprendre la neurophysiologie dans sa globalité. Ensuite, la neurobiologie – science du cerveau – et la psychologie cognitive – science de l'esprit - ont permis aux chercheurs une approche plus globale dans de nombreuses fonctions cérébrales telles que le langage, la perception, l'action, l'apprentissage et la mémoire. Mais ces deux domaines de la biologie se trouvent à deux interfaces distinctes des sciences biologiques : la première envisage la chimie des cellules, et la seconde le monde de la psychologie. Ceci pose alors une question : dans quelle mesure ces deux sciences peuvent être reliées ? En effet l'unification de la biologie moléculaire - la compréhension des mécanismes neurophysiologiques du cerveau - d'une part, et la nature de l'esprit, ainsi que ses fonctions d'autre part, constitue l'un des enjeux les plus importants des neurosciences du vingt-et-unième siècle.

Dans la recherche de la compréhension du fonctionnement du cerveau, et à travers la quête d'une unification des neurosciences cognitives dans leur globalité, l'étude

des processus cognitifs relatifs à la mémorisation et à l'apprentissage constitue un domaine d'intérêt particulier. En effet, chez l'Homme, la mémoire constitue l'une des premières fonctions cognitives à être affectée au cours du vieillissement (Magnusson, 2010). Les déclin de la mémoire liés à l'âge constituent ainsi un problème significatif pour une large partie de la population âgée. Dans l'étude de la mémoire, celle liée à la mémorisation spatiale s'intéresse à la manière dont tout individu envisage l'environnement qui l'entoure. Cette mémoire peut être testée chez les rongeurs, qui constituent des modèles biologiques pour comprendre les mécanismes de pertes de mémoire chez les individus âgés. L'identification des causes de pertes de mémoire est nécessaire pour proposer des traitements, pour prévenir les pertes de mémoire au cours du vieillissement ainsi que pour retarder certains des symptômes de la maladie d'Alzheimer. Maintenir les fonctions de mémorisation au cours de la vie constitue un problème de qualité de vie, mais il peut également devenir un problème économique s'il permet de retarder l'entrée des personnes âgées dans des centres de soins spécialisés.

Dans une première partie, nous nous intéresserons à la classification des diverses formes de mémoire et aux bases anatomiques et cellulaires du stockage mnésique. Nous étudierons également les méthodes d'exploration de la mémoire chez les rongeurs de laboratoire. Enfin, nous nous intéresserons à la neurobiologie du récepteur au N-méthyle-D-aspartate (NMDA) avant d'illustrer un exemple de questionnement impliquant ce récepteur en toxicologie. Dans une deuxième partie, nous présenterons une étude préliminaire des effets d'une sur-régulation de la sous-unité GluN2B du récepteur au NMDA sur la mémorisation et l'apprentissage de souris jeunes et séniles.

## **Première partie : La mémoire et le récepteur au NMDA: classification, stockage, exploration**

« *L'univers m'embarrasse et je ne puis songer que cette horloge existe et n'ait pas d'horloger.* »

Voltaire

### **I- Les différentes formes de mémoire : définition et classification**

#### **I-1 Définition des notions de mémorisation et d'apprentissage**

Les premières tentatives de localiser la mémoire remontent à plus de deux-cents ans. A cette époque, les scientifiques pensaient que chaque fonction cérébrale pouvait être définie et localisée dans une région géographique précise de l'encéphale. Aujourd'hui, nous savons que toutes les régions du cerveau interagissent étroitement entre elles, et que les fonctions cérébrales résultent de ces interactions complexes.

Les scientifiques ont tenté à de nombreuses reprises de définir les notions de « mémoire » et « d'apprentissage ». Selon Eric Kandel « L'apprentissage correspond au processus par lequel on acquiert de la connaissance à propos du monde » (Kandel *et al.*, 2000). Cet apprentissage correspondrait ainsi à toute modification stable du comportement ou des activités psychologiques attribuables à l'expérience d'un individu. La mémoire, en revanche, porte sur la disponibilité et l'emploi d'un apprentissage. Elle correspond à la propriété de conserver des informations, mais également de les restituer ou de les reconnaître. Eric Kandel écrit ainsi que si « l'apprentissage correspond à l'acquisition d'une nouvelle information à propos du monde », la mémoire correspond à « la rétention de cette information au cours du temps » (Kandel *et al.*, 2000).

#### **I-2 Les différentes formes de mémoires**

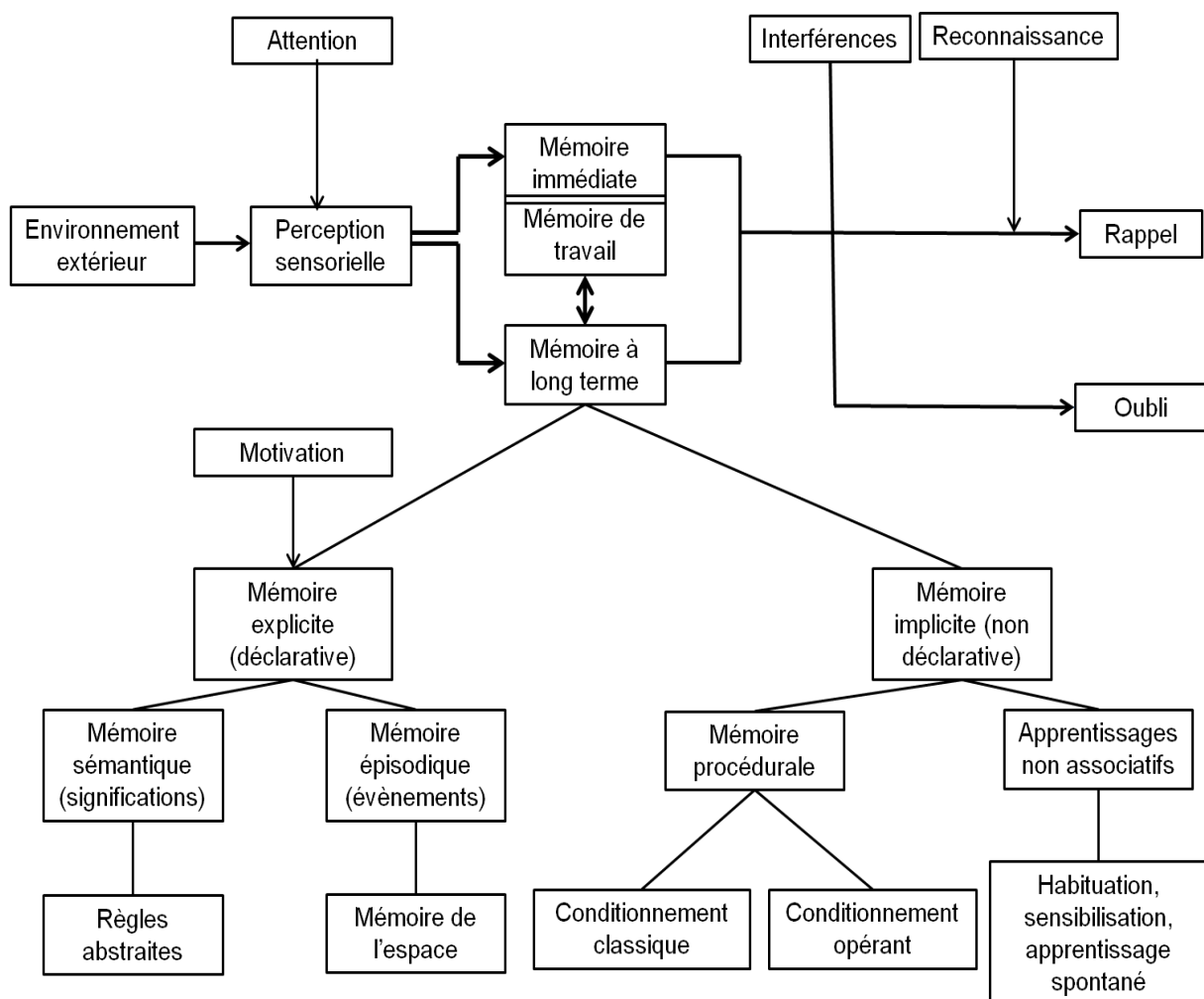
##### **I-2-1 Présentation**

La mémoire constitue un ensemble de phénomènes biochimiques et psychologiques complexes, qui demeurent, aujourd'hui encore, largement incompris. En réalité, chez les animaux vertébrés, de nombreuses formes de mémoires ont pu être identifiées, chacune d'entre elles possédant des fonctions distinctes. Aucun accord n'a pu être



établi concernant le classement de ces formes de mémoires. Une classification peut être proposée chez l'Homme, mais ne constitue pas un répertoire exhaustif de l'ensemble des mémoires existantes (figure 1). Elle permet toutefois d'appréhender par une première approche l'organisation de cet ensemble complexe des mémoires chez l'Homme, ainsi que les relations qui ont pu être identifiées entre elles.

La mémoire est classiquement divisée en mémoire à court terme et mémoire à long terme. La mémoire à court terme est subdivisée en mémoire immédiate et mémoire de travail. La mémoire à long terme est subdivisée en mémoire explicite (ou déclarative) et mémoire implicite (ou non déclarative).



**Figure 1:** Classification des différentes formes de mémoires identifiées chez l'Homme (d'après Chapouthier, 2006 ; Meunier and Shvaloff, 1996)

L'information sensorielle est stockée transitoirement sous forme de mémoire immédiate ou de travail. Elle peut ensuite être oubliée, ou stockée de manière permanente sous forme de mémoire à long terme. Cette dernière se décompose en mémoire explicite et implicite, ces deux formes de mémoire étant elles-mêmes divisées en plusieurs sous-catégories.

### I-2-2 La mémoire à court terme et la mémoire de travail

Au cours de chaque instant, tout individu reçoit depuis l'environnement extérieur des stimuli, perçus par les récepteurs sensoriels. Cette information sensorielle est enregistrée dans le cortex cérébral, où elle est stockée de manière transitoire, puis rapidement oubliée en l'absence de stimulation ultérieure. La définition précise de ce type de mémoire diffère selon les auteurs. Selon Squire et Kandel, cette mémoire est définie comme « un processus mnésique qui maintient l'information de façon temporaire, jusqu'à ce qu'elle soit oubliée, ou au contraire incorporée dans un stock à long terme plus stable et potentiellement rémanent » (Squire and Kandel, 2002). Selon certains auteurs, la mémoire à court terme se divise en mémoire immédiate et mémoire de travail. La mémoire immédiate correspond à la rétention d'une information durant moins de trente secondes. Il s'agit d'un stockage actif de l'information, limité en quantité et dans le temps. L'extension active dans le temps du stockage de cette information – durant plusieurs minutes - est appelée mémoire de travail. La mémoire de travail est ainsi utilisée dans de nombreuses situations du quotidien telles que mémoriser un numéro de téléphone.

### I-2-3 La mémoire à long terme

Des processus biochimiques complexes interviennent dans la transition du stockage temporaire de l'information vers un stockage à long terme. Ces processus ne seront pas détaillés ici. Nous allons en revanche présenter les différentes formes de mémoires à long terme identifiées chez l'Homme.

#### I-2-3-1 La mémoire explicite

Encore appelée mémoire déclarative, elle correspond à la collection consciente d'expériences antérieures, et permet de répondre à la question « quoi ? » (Sharma *et al.*, 2010). Nous utilisons la mémoire explicite au cours de la journée pour nous rappeler de l'heure d'un rendez-vous, pour nous souvenir de personnes, de lieux, ou collecter des informations d'un événement survenu plusieurs années auparavant. Elle est elle-même divisée en mémoire épisodique, relative aux événements passés,

et en mémoire sémantique, relative notamment aux connaissances factuelles du monde et des définitions de concepts abstraits. La mémoire de l'espace, utilisée par les rongeurs lors des tests dans les labyrinthes, est classiquement considérée comme une forme de mémoire épisodique (Paul *et al.*, 2009).

### I-2-3-2 La mémoire implicite

Encore appelée mémoire non déclarative, elle réfère à des aptitudes motrices, des habitudes, et répond à la question « comment ? » (Sharma *et al.*, 2010). Elle se divise en deux formes d'apprentissage : l'apprentissage non associatif, dans lequel l'animal apprend les propriétés de chaque stimulus, et l'apprentissage associatif, dans lequel l'animal apprend les relations entre deux stimuli (Squire and Kandel, 2002). L'apprentissage non associatif regroupe des types de mémorisations tels que l'habituation et la sensibilisation. L'apprentissage associatif est relatif à la mémoire procédurale, regroupant notamment les conditionnements classique et opérant.

#### I-2-3-2-1 La mémoire procédurale

Au début du XXème siècle, le célèbre physiologiste russe Ivan Pavlov et le psychologue américain Edward Thorndike découvrent respectivement le conditionnement classique et le conditionnement opérant, deux formes de mémoires procédurales. Nous allons étudier successivement ces deux formes de conditionnement, ainsi que sur leurs limites.

##### *I-2-3-2-1-1 Le conditionnement classique*

Ivan Pavlov était un médecin et physiologiste du début du XIXème siècle, connu pour ses expérimentations des fonctions salivaires et gastriques chez le chien.

L'expérience la plus connue de Pavlov illustre le conditionnement classique (ou de type I), une forme d'apprentissage où l'animal apprend à relier deux stimuli entre eux (Pavlov and Anrep, 1927). La figure 2, présentée page suivante, illustre ces expériences.











Avant conditionnement		 Stimulus Inconditionnel, SI	 Réponse Inconditionnelle, RI
		 Stimulus Neutre, SN	 Pas de réponse
Début du conditionnement	 Stimulus Neutre, SN	 Stimulus Inconditionnel, SI	 Réponse Inconditionnelle, RI
Après conditionnement	 Stimulus Conditionnel, SC	 Réponse Conditionnelle, RC	 Stimulus Inconditionnel, SI

Figure 2: Illustration du comportement classique décrit par Pavlov (d'après Mauriès, 2007)

SI : Stimulus Inconditionnel ; SC : Stimulus Conditionnel ; SN : Stimulus Neutre ; RI : Réponse Inconditionnée

Un animal apprend à donner une réponse comportementale – salivation – à la suite de la présentation d'un stimulus primitivement neutre – son d'une cloche – consécutivement à son association à un stimulus non neutre – poudre de viande. Si l'association de ces deux stimuli est répétée un nombre suffisant de fois, le Stimulus Neutre suffit à lui seul à engendrer la réponse comportementale attendue – la salivation – avant la présentation de la poudre de viande. Il prend alors le nom de Stimulus Conditionnel.

Un chien salive lors de présentation de poudre de viande. Si un son retentit moins d'une seconde avant la présentation de la viande, alors, après plusieurs répétitions, l'animal associe ce bruit à la viande, et il salive dès le retentissement du bruit. La salivation est observée pendant un certain temps même en l'absence de présentation de la poudre de viande. Si le son ne précède plus la présentation de la

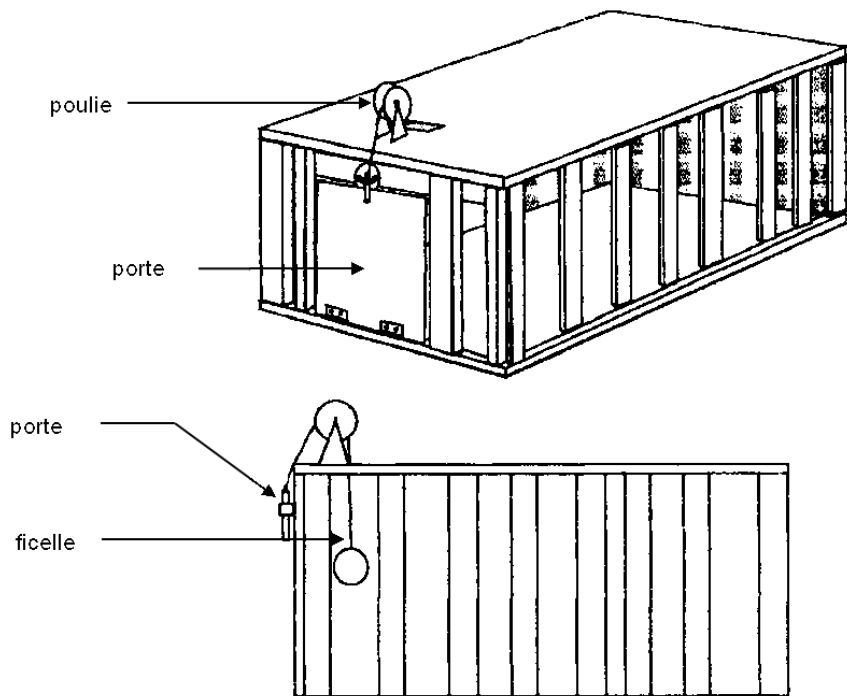
viande, alors le chien ne salive plus en entendant le bruit : il s'agit d'un processus dit d'*extinction*.

Pavlov a imaginé une terminologie pour les diverses formes de stimuli et pour les réponses comportementales qui leur sont associées. Ainsi, la poudre de viande, qui peut à elle seule provoquer la salivation du chien, est nommée *Stimulus Inconditionnel*, SI. La réponse – salivation – après présentation de ce stimulus correspond à une *Réponse Inconditionnelle*, RI. A l'inverse, le son d'une cloche ne suffit pas à lui seul à déclencher la salivation. Ce type de stimulus est nommé *Stimulus Neutre*, SN. Ce dernier doit être associé à un Stimulus Inconditionnel, au cours d'un intervalle de temps réduit pour pouvoir provoquer la salivation. Cette réponse comportementale engendrée par le son de la cloche – alors nommé *Stimulus Conditionnel*, SC – avant présentation de la poudre de viande est nommée *Réponse Conditionnelle*, RC. Notons que les Réponses Inconditionnelle et Conditionnelle sont généralement similaires dans leur expression.

#### *I-2-3-2-1-2 Le conditionnement opérant*

Edward Lee Thorndike était un psychologue américain du début du XXème siècle. Ses expériences sont à l'origine du conditionnement opérant (ou de type II), une forme d'apprentissage où l'animal apprend à relier un stimulus et son propre environnement. Thorndike a publié l'ensemble de ses travaux en 1911 dans son livre « *Animal intelligence : experimental studies* » (Thorndike and Bruce, 1911).

L'expérience la plus connue de Thorndike est celle dite de la « boîte à problèmes » (*puzzle box*), illustrée par la figure 3, page suivante. Un chat est placé dans une cage en bois possédant une seule sortie bloquée par une porte. Afin d'ouvrir la porte, l'animal doit tirer sur une ficelle. Thorndike a montré que l'apprentissage de la solution au problème proposé - ouvrir la porte - se réalise par une série de comportements liés au hasard. Le temps nécessité par l'animal pour ouvrir la porte diminue au cours des répétitions de manière asymptotique.



**Figure 3** : Illustration de la « boîte à problèmes » (*puzzle box*) imaginée par E. Thorndike (Chance, 1999)

Un chat est placé dans la cage dont l'issue est bloquée par une porte. L'animal doit apprendre à ouvrir la cage en tirant sur une ficelle, reliée à la porte par une poulie. L'apprentissage se réalise par une série de comportements liés au hasard.

A la suite de ses expériences, Thorndike a énoncé en 1911 la « Loi de l'effet » (*Law of effect*) selon laquelle le comportement change à cause de ses conséquences : un comportement est répété s'il procure une satisfaction, et abandonné s'il procure une insatisfaction.

La théorie de Thorndike a été par la suite reprise par le psychologue américain Burrhus Frederic Skinner, dans les années 1930, ce dernier ayant établi le concept de conditionnement opérant (Skinner, 1938). Le conditionnement opérant se base sur les principes de renforcement et de punition. Le renforcement correspond à la conséquence d'un comportement qui rend plus probable le comportement observé. A l'inverse, la punition correspond à la conséquence d'un comportement qui rend moins probable le comportement observé. Le renforcement et la punition peuvent être positifs lors de l'ajout d'un stimulus, ou au contraire négatifs lors du retrait d'un stimulus. Le tableau 1, page suivante, présente les quatre formes de conditionnement opérant distinguées. Le paramètre étudié (augmenté ou diminué) correspond à la fréquence d'apparition d'un comportement.

Tableau 1 : Les quatre formes de conditionnement opérant

	Positif	Négatif
Renforcement	Augmentation suite à l'ajout d'un stimulus appétitif	Augmentation suite au retrait d'un stimulus aversif
Punition	Diminution suite à l'ajout d'un stimulus aversif	Diminution suite au retrait d'un stimulus appétitif

Les quatre formes de conditionnement opérant sont explicitées, en fonction du caractère positif ou négatif de la punition/récompense. Le paramètre étudié (augmenté ou diminué) correspond à la fréquence d'apparition d'un comportement.

Le conditionnement opérant possède de nombreuses applications dans la vie quotidienne. A titre d'exemples, nous pouvons citer l'apprentissage de la porte de la cuisine par le chien, ce dernier apprenant que l'ouverture de la porte apporte chaleur et nourriture. Un chien apprend également que la simulation d'une boiterie augmente l'attention que lui porte son propriétaire, ce qui lui procure une satisfaction. Enfin, un chat apprend que si la sonnerie du téléphone retentit pendant que sa propriétaire prépare le repas, alors la nourriture devient accessible (Mauriès, 2007)

Le conditionnement opérant a constitué une base fondamentale dans la mise en place des tests comportementaux de la mémoire à long terme. Cette forme de conditionnement a en effet été à l'origine de la boîte de Skinner et des labyrinthes.

### *1-2-3-2-1-3 Les limites du conditionnement pavlovien et les avantages du conditionnement Skinnérien*

La technique de conditionnement proposée par Pavlov et représentant l'école russe s'est radicalement opposée à celle proposée par Skinner et représentant l'école américaine. Bien au-delà la différence d'espèces utilisées (les chiens pour Pavlov, et les rats pour Skinner), certains inconvénients majeurs de l'école russe, et certains avantages de l'école américaine ont permis à cette dernière de s'imposer comme technique incontournable dans les tests comportementaux utilisés actuellement.

Le comportement classique implique une réponse du sujet – de type physiologique - postérieure à la présentation du stimulus inconditionnel. Par ailleurs, pour la réalisation de ces expériences, les animaux sont toujours immobilisés par des sangles, et donc dans des conditions relativement artificielles.

Le conditionnement opérant, en revanche implique une réponse du sujet – de type comportementale – antérieure au renforcement – récompense ou punition. De plus, les animaux sont beaucoup plus libres de leurs mouvements, et se trouvent ainsi dans des conditions plus proches des conditions naturelles. Pour toutes ces raisons, cette technique s'est imposée dans les protocoles expérimentaux actuels.

#### I-2-3-2-2 La mémoire non associative

##### *I-2-3-2-2-1 L'habituation*

Elle correspond à la baisse de réactivité par rapport à un même stimulus, lorsque celui-ci est présenté de manière répétée dans un intervalle de temps limité. L'habituation correspond à une forme de mémoire très rudimentaire, présente chez tous les animaux vertébrés. Le cerveau peut ainsi « s'habituer » au bruit de passage d'un train ou d'un avion. Il s'accoutume à un timbre particulier, qui provoque chez l'animal ou l'individu une réaction diminuée en réponse à ce stimulus.

Ce phénomène est utilisé pour des études comportementales chez les primates telles que l'étude de la reconnaissance des visages : lorsqu'un visage est présenté de manière séquentielle au cours d'un intervalle de temps réduit, un animal qui reconnaît le visage présenté fini par montrer une baisse d'intérêt à ce visage, ce qui se traduit par une baisse du temps d'observation. Cette baisse d'intérêt peut être encore d'avantage mise en évidence par la présentation d'un nouveau visage. L'animal, surpris, montre un gain d'intérêt brutal face à cette personne nouvelle, et présente ainsi une hausse brutale du temps d'observation (Dahl *et al.*, 2007).

##### *I-2-3-2-2-2 La sensibilisation*

Elle correspond à l'exact inverse du processus d'habituation. De manière comportementale, elle se traduit par une hausse de réactivité par rapport à un même stimulus, lorsque celui-ci est présenté de manière répétée dans un intervalle de temps limité.



### I-3 La Potentialisation à Long Terme (PLT)

Au cours de cette partie, nous aborderons la théorie historique à l'origine de ce mécanisme, puis les mécanismes cellulaires de la Potentialisation à Long Terme, notamment le rôle du récepteur au N-Méthyle-D-Aspartate (NMDA).

#### I-3-1 La théorie de Donald Hebb

Donald Olding Hebb était un psychologue du XXème siècle, influant dans le domaine de la neuropsychologie. Il a cherché à comprendre comment le fonctionnement des neurones contribue aux phénomènes psychologiques tels que l'apprentissage. Le travail le plus important de Hebb est l'écriture en 1949 de son livre « L'organisation du comportement » (*The Organisation of Behavior*) (Hebb, "Organization of behavior" 1950), dans lequel il énonce une nouvelle théorie qui unit les données les plus récentes de son époque concernant le comportement. Cette théorie est énoncée comme suit :

*“When an axon of cell A is near enough to excite cell B and repeatedly or persistently takes part in firing it, some growth process or metabolic change takes place in one or both cells such that A's efficiency, as one of the cells firing B, is increased”*

L'idée de Hebb est souvent résumée dans ladite « Loi de Hebb » (*Hebb's Law*) : deux neurones en activité au même moment créent ou renforcent leurs connexions de sorte que l'activation de l'un par l'autre sera plus aisée lors de stimulations ultérieures. Cette loi est souvent paraphrasée ainsi : « *Neurons that fire together wire together* ». Les ensembles de neurones qui peuvent être groupés en tant qu'unité de fonctionnement ont été appelés par Hebb les « groupements de neurones » (*cell assemblies*). Ces groupements de cellules, qui restent activés après la présentation d'un stimulus seraient ainsi à l'origine d'une représentation mentale de ce stimulus. Le cheminement cognitif résulterait alors de l'activation séquentielle de ces divers groupements de neurones.

Cette théorie a par la suite été complétée d'explications cellulaires et moléculaires lorsque Bliss et Lømo découvrirent le phénomène de Potentialisation à Long Terme,

qui expliquerait le mécanisme de stockage mnésique à long terme chez les mammifères.

### I-3-2 Définition

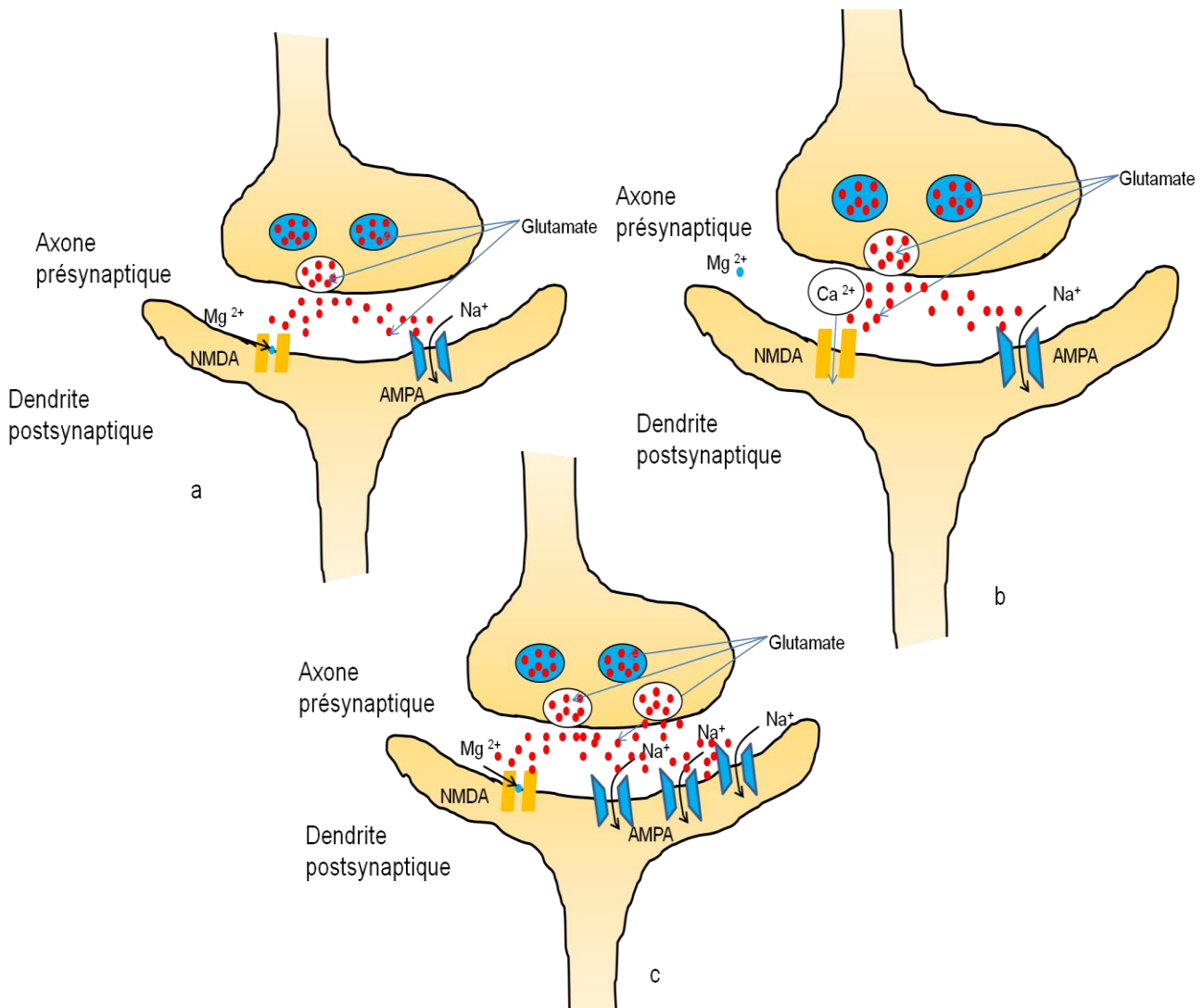
La Potentialisation à Long Terme (PLT) a été pour la première fois mise en évidence par Bliss et Lømo en 1973, alors que ces derniers s'intéressaient aux mécanismes de stockage de l'information dans les synapses des neurones de l'hippocampe. Ils ont montré qu'une salve de stimulation à haute fréquence provoquée de manière artificielle sur des neurones de l'hippocampe de lapins anesthésiés pouvait augmenter la transmission synaptique durant plusieurs heures. Ils ont nommé ce mécanisme de facilitation à long terme de l'information « Potentialisation à Long Terme » (Bliss and Lømo, 1973).

La PLT, correspond à une augmentation durable de la transmission synaptique entre deux neurones suite à une salve de stimulation à haute fréquence - stimulation tétanique. De nombreuses formes de PLT ont pu être identifiées dans des régions telles que l'hippocampe, le cortex cérébral, l'amygdale. Les données actuelles ne permettent pas d'expliquer totalement les mécanismes moléculaires impliqués dans la PLT, notamment parce que ces derniers varient en fonction des régions cérébrales et des espèces considérées. Néanmoins, ce phénomène reste encore largement étudié, car il est considéré comme l'un des mécanismes cellulaires capables d'expliquer la mémorisation et l'apprentissage (Cooke, 2006).

### I-3-3 Bases physiologiques de la PLT

La PLT améliore la transmission synaptique. Cette potentialisation de la communication neuronale se produit par une augmentation de la sensibilité de la membrane postsynaptique aux signaux présynaptiques, notamment par une augmentation du nombre et de l'activité des récepteurs au glutamate appelés récepteurs à l'acide  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate (ou récepteurs à l'AMPA) sur la membrane postsynaptique.

Les mécanismes cellulaires et moléculaires se produisant au niveau synaptique lors de la PLT sont complexes, et ne seront pas détaillés ici. Toutefois, la figure 4, permet de comprendre le processus général de la Potentialisation à Long Terme.



**Figure 4 :** Illustration du mécanisme de Potentialisation à Long Terme

a : Dans les conditions physiologiques, le canal du récepteur au N-méthyl-D-aspartate (NMDA) est obstrué par l'ion magnésium, et ne peut ainsi pas laisser passer le calcium. Ainsi, lors de la libération de glutamate dans l'espace synaptique, ce dernier va se fixer à la fois sur les récepteurs au NMDA et AMPA, mais active

Dans les conditions physiologiques (figure 4a), le canal du récepteur au N-méthyl-D-aspartate (NMDA) est obstrué par l'ion magnésium, et ne peut ainsi pas laisser passer le calcium. Ainsi, lors de la libération de glutamate dans l'espace synaptique, ce dernier va se fixer à la fois sur les récepteurs au NMDA et AMPA, mais active

seulement les récepteurs AMPA. En effet, seul un signal de dépolarisation à la fois fort et durable au niveau de la membrane présynaptique est capable de provoquer une dépolarisation postsynaptique suffisante pour permettre d'enlever le bouchon de magnésium qui bloque le canal du récepteur au NMDA (figure 4b) (Cooke, 2006). Dans ces conditions, le glutamate libéré dans l'espace synaptique peut ouvrir les récepteurs au NMDA, et permettre une entrée de calcium dans la dendrite postsynaptique. Cette entrée de calcium est à l'origine d'une cascade réactionnelle, qui aboutit à la fois à une augmentation de la quantité de glutamate libérée par l'axone présynaptique, et à une augmentation du nombre de récepteurs AMPA sur la membrane de la dendrite postsynaptique (figure 4c) (Rosenzweig and Barnes, 2003). Les étapes de formation de la PLT conduisent à l'amélioration persistante de la transmission synaptique, fournissant ainsi une explication expérimentale à la théorie de Hebb (Lynch, 2004).

#### I-3-4 PLT et récepteur au NMDA

La PLT constitue un mécanisme uniquement révélé dans des conditions artificielles. Elle est toutefois reconnue par la communauté scientifique comme constituant un mécanisme de plasticité synaptique capable d'expliquer la formation de certaines formes de mémoires à long terme (Lynch, 2004).

Dans la plupart des mécanismes de PLT, le flux d'entrée de calcium à l'intérieur du neurone post-synaptique est dépendant du récepteur au NMDA (Lynch, 2004). Ainsi, un blocage des récepteurs au NMDA détériore les capacités de mémorisation chez les rongeurs dans diverses tâches d'apprentissage spatial (Cooke, 2006). Au niveau de l'hippocampe, le récepteur au NMDA a été montré comme pouvant améliorer la PLT et l'apprentissage: Cao et ses collaborateurs (Cao et al., 2007) ont produit une lignée de souris surexprimant la sous-unité GluN2B du récepteur au NMDA dans les neurones de l'hippocampe. Ces souris ont montré une augmentation de la PLT associée à une augmentation des performances dans des tâches de mémorisation et d'apprentissage. Cette étude a ainsi apporté des preuves en faveur de l'importance d'un phénomène proche de la PLT dans le stockage mnésique au niveau de l'hippocampe.

L'étude expérimentale proposée dans la deuxième partie explore les liens entre l'hippocampe, le récepteur au NMDA, la mémorisation spatiale et le vieillissement cérébral.

## **I-4 Les bases anatomiques et cellulaires du stockage mnésique chez les mammifères**

### I-4-1 Particularités de l'hippocampe

La mémoire constitue une fonction cognitive complexe, impliquant pour son fonctionnement normal la participation de nombreuses structures cérébrales telles que l'amygdale, l'hippocampe et le lobe temporal du cortex cérébral. Néanmoins, nous nous intéresserons dans cette partie et pour la suite de cette étude uniquement à l'hippocampe, structure centrale pour les fonctions de mémorisation et d'apprentissage.

L'hippocampe, ainsi nommé en rappel de sa ressemblance morphologique avec l'animal marin, correspond à une circonvolution bilatérale, symétrique, appartenant au télencéphale. Il appartient au système limbique, regroupant le thalamus, le fornix, le cortex cingulaire, le bulbe olfactif, l'amygdale, les corps mamillaires, et l'hippocampe. Cet organe joue un rôle dans les fonctions d'inhibition, de mémorisation, et de représentation dans l'espace (figure 5).

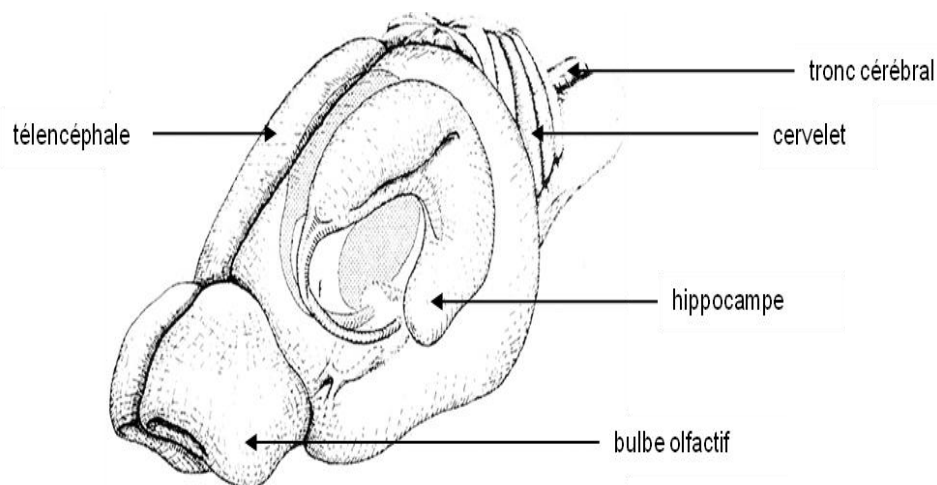


Figure 5 : Représentation de l'hippocampe de rat (Sautet, 2012).

L'hippocampe correspond à une circonvolution bilatérale, symétrique, située dans le télencéphale.

### I-4-2 Structure interne de l'hippocampe

Observé en coupe transversale, l'hippocampe est divisé au niveau morphologique en deux structures en U inversés: la corne d'Ammon (CA) et le Gyrus Denté (*Dentate Gyrus*, DG) (figure 6).

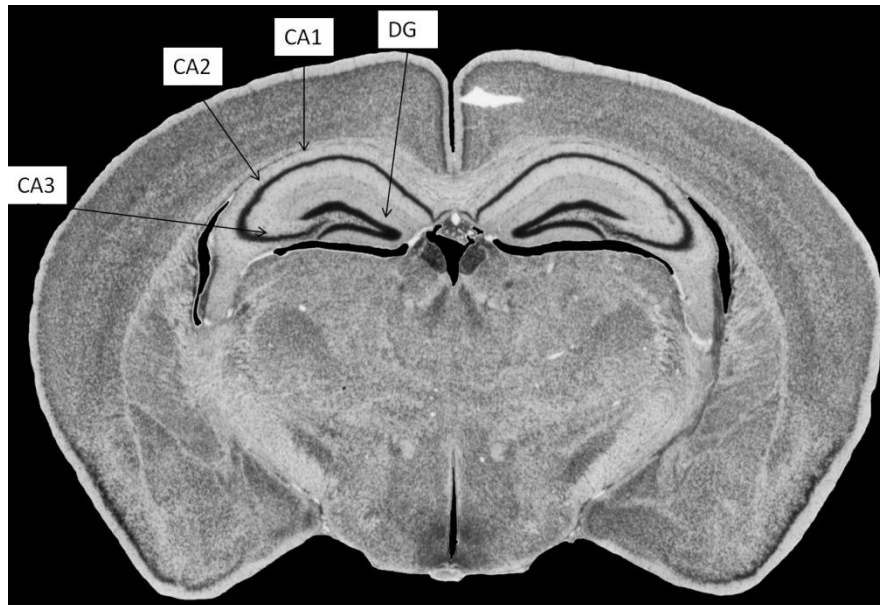


Figure 6 : Vue en coupe transversale de l'hippocampe de souris (Rosen *et al.*, 2000)

CA1; CA2; CA3: subdivisions histologiques 1, 2 et 3 de la Corne d'Ammon (CA) ; DG : Gyrus Denté

Au niveau histologique, la corne d'Ammon peut être divisée en trois parties, en fonction notamment de la taille des cellules, de la densité cellulaire, ainsi que des connexions synaptiques : CA1, CA2, CA3. Les cellules composant majoritairement la corne d'Ammon sont les neurones pyramidaux, correspondant à des excitateurs glutamatergiques, nommés ainsi en raison de leur forme. Les régions CA2 et CA3 sont formées de neurones plus larges, mais moins condensés que la région CA1. Le gyrus denté est composé majoritairement de neurones granulaires projetant des axones appelés fibres mousses vers la région CA3.

### I-4-3 Connexions neuronales internes à l'hippocampe

Le flux d'informations au sein de l'hippocampe est unidirectionnel. Le circuit le plus simple est constitué de quatre groupes de neurones, formant la voie excitatrice trisynaptique (figure 7) : les cellules pyramidales du cortex entorhinal envoient des afférences axonales vers les cellules granulaires du Gyrus Denté, formant la voie perforante. Les cellules granulaires envoient à leur tour des informations vers les cellules pyramidales de la région CA3 de la Corne d'Ammon, par des projections axonales formant les fibres mousses. L'information circule ensuite vers la région CA1 par des axones formant les collatérales de Schäffer, pour aller ensuite hors de l'hippocampe, vers la région du subiculum, qui relaye l'information vers le cortex entorhinal, formant ainsi une boucle anatomique.

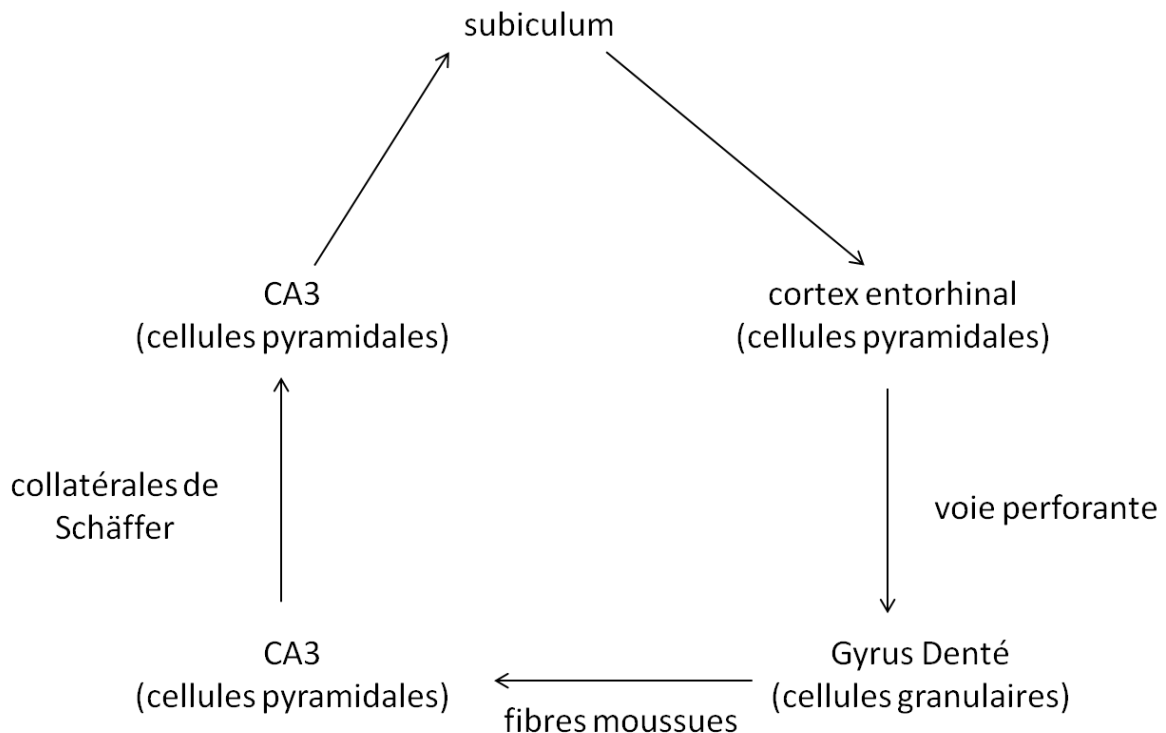


Figure 7. Schématisation du flux d'information au sein de l'hippocampe (d'après Bouhsira, 2007)

CA1, CA3 : subdivisions histologiques 1 et 3 de la Corne d'Ammon (CA)

Le circuit le plus simple est formé par la voie excitatrice trisynaptique. Cette voie est formée de quatre groupes de neurones constituant une boucle anatomique.

#### I-4-4 Importance de l'hippocampe dans l'établissement de la mémoire spatiale

Dans la formation et le stockage des souvenirs, l'hippocampe joue un rôle central. Nous nous intéresserons dans cette partie aux structures cellulaires impliquées dans la formation de la mémoire spatiale, explorée lors d'études avec des labyrinthes réalisées chez les rongeurs.

##### I-4-4-1 Carte cognitive et apprentissage latent

Dans le courant des années 1930, Tolman et Honzic, dans une expérience historique, ont pour la première fois suggéré la formation d'une « carte cognitive » (*cognitive map*) dans le cerveau, et ont ainsi mis en évidence la notion d'apprentissage latent (Tolman and Honzic, 1930). Cette expérience leur a permis d'avancer la thèse selon laquelle les rats sont capables de former une représentation mentale de l'agencement spatial de leur environnement. La « carte » ainsi formée dans le cerveau a été nommée « carte cognitive ». La formation d'une telle carte mentale ne constitue pas un élément immédiatement visible, et ne produit pas nécessairement des répercussions observables ou mesurables sur le comportement des animaux. Un tel apprentissage dit « latent » se produit en l'absence d'agents de renforcements. Il nous fournit des informations à propos de notre environnement, nous permettant par exemple de retrouver notre voiture sur le parking d'un supermarché.

##### I-4-4-2 Les cellules de lieu

Suite à la mise en évidence de la formation d'une carte cognitive dans le cerveau des rongeurs, les scientifiques ont par la suite recherché les structures anatomiques et cellulaires du cerveau impliquées dans la formation de telles représentations mentales. Ainsi, O'Keefe et Dostrovsky, dans une étude menée en 1971 (O'Keefe and Dostrovsky, 1971), ont identifié un type cellulaire dans l'hippocampe de rat présentant un schéma de décharge particulier : les cellules de lieu. Ces cellules sont responsables de la formation de cartes cognitives, permettant aux animaux de se repérer dans l'espace. Par la suite, O'Keefe et Nadel ont émis l'hypothèse en 1978 que la fonction première de l'hippocampe est de former de telles cartes cognitives de



l'environnement (O'Keefe and Nadel, 1978). Chez l'Homme, des cellules de l'hippocampe possédant les mêmes propriétés ont été mises en évidence en 2003 par Ekstrom et ses collaborateurs (Ekstrom *et al.*, 2003).

Les cellules de lieu correspondent à des neurones de l'hippocampe présentant une forte activité lorsque l'animal se trouve dans un endroit particulier de l'environnement, correspondant au champ d'activité de ces cellules. Dans un environnement donné, chaque cellule possède un champ d'activité généralement unique, répondant ainsi de manière localisée.

#### I-4-5 Hippocampe et vieillissement

Que le processus de vieillissement cérébral se produise de manière normale ou pathologique, les individus âgés souffrent de déficits dans les performances de mémorisation, notamment lors des tâches de mémorisation spatiale. Les scientifiques ont longtemps pensé que cette altération de la mémoire spatiale pouvait être expliquée par une baisse du nombre de neurones dans l'hippocampe. En réalité, les études chez les rongeurs montrent une stabilité du nombre de cellules neuronales entre les individus jeunes (4mois) et âgés (24 mois) (Kennard and Woodruff-Pak, 2011). La baisse des performances des individus dans les tâches de mémorisation et d'apprentissage spatial serait ainsi due à une altération des liens synaptiques (Kennard and Woodruff-Pak, 2011) et à une baisse de la plasticité neuronale (Rosenzweig and Barnes, 2003 ; Kennard and Woodruff-Pak, 2011).

## **II – Les méthodes expérimentales d'exploration de la mémoire**

Les protocoles expérimentaux liés à l'exploration du comportement animal sont largement en relation avec la méthode de conditionnement opérant, intégrant les notions de « renforcement positif » et « renforcement négatif ». Nous allons à présent étudier successivement les deux types d'outils utilisés pour l'exploration de cette forme de comportement : la boîte de Skinner et les labyrinthes.

## II-1 La boîte de Skinner

La boîte de Skinner correspond à un prolongement de la boîte à problèmes imaginée par Edward Thorndike (figure 8).

L'animal (rat ou pigeon dans la forme imaginée par Skinner) doit apprendre à associer le comportement souhaité par l'expérimentateur – appuyer sur un levier – uniquement suite à la présentation de certains stimuli tels qu'un son ou un signal lumineux. La récompense – renforcement positif – correspond alors à la distribution de nourriture ou de boisson, suivant l'état de privation de l'animal. La punition – renforcement négatif – correspond à un choc électrique. L'expérimentateur peut demander à l'animal d'appuyer sur le levier uniquement après émission d'un son aigu ou d'un signal lumineux.

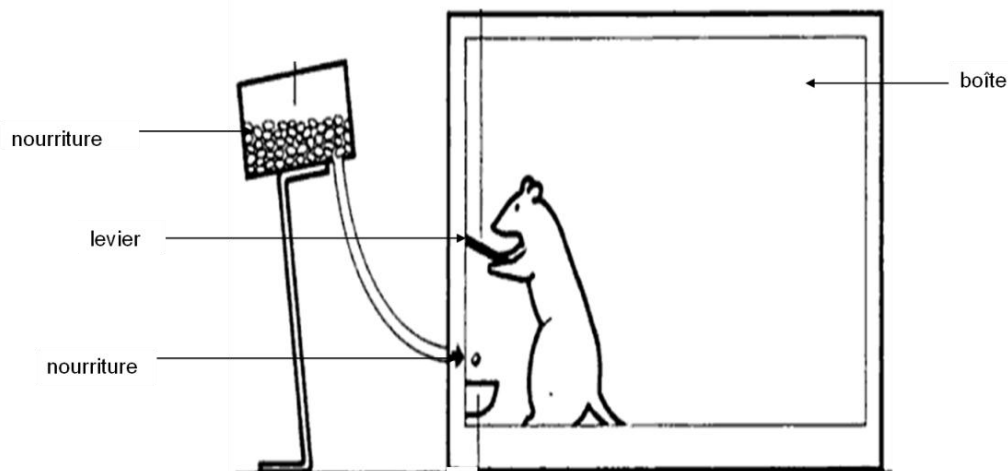


Figure 8 : Illustration de la boîte de Skinner (d'après Richelle, 1977)

Afin d'obtenir la nourriture, le rat doit apprendre à appuyer sur un levier à la suite de l'émission d'un son. Si l'animal ne réalise pas correctement la tâche, la punition correspond à un choc électrique.

## II-2 Les labyrinthes

Les labyrinthes constituent des outils devenus incontournables dans les études comportementales. L'utilisation des animaux – le plus souvent des rongeurs – dans de tels labyrinthes implique l'utilisation de leur mémoire spatiale dont les cellules de lieu situées dans l'hippocampe constituent les principaux acteurs. Les labyrinthes sont utilisés afin de déterminer si divers traitements ou conditions expérimentales peuvent modifier les capacités de mémorisation et d'apprentissage des rongeurs.

Nous allons à présent étudier les principaux types de labyrinthes utilisés, en nous attachant d'une part sur les labyrinthes terrestres (classique, en T, en T-multiple et radial), et d'autre part sur le labyrinthe aquatique.

### II-2-1 Le labyrinthe en T

Ce labyrinthe a la forme de la lettre T et figure parmi les outils les plus simples dans le cadre de l'exploration de la mémoire spatiale à court terme chez les rongeurs (figure 9, page suivante). Pour les souris, la base de la lettre mesure trente-cinq centimètres de long et chaque bras mesure vingt-huit centimètres de long (contre cinquante centimètres et quarante centimètres respectivement pour les rats). Au départ, l'animal est placé à la base du T. En montant la base de la lettre, l'animal arrive à un croisement, où il peut choisir la branche droite ou gauche. Une récompense peut être donnée à l'arrivée de la première branche choisie. L'animal est ensuite repris et, après un temps d'attente, replacé à la base de la lettre. En arrivant une seconde fois au croisement des deux bras, l'animal choisira, de manière classique, le bras non visité à l'essai précédent. Ce comportement, dit d'alternance, est généralement considéré comme un paramètre pour évaluer le comportement exploratoire des animaux dans un nouvel environnement. Ce comportement d'alternance peut également être observé en l'absence de récompense, et prend alors la dénomination d'alternance spontanée.

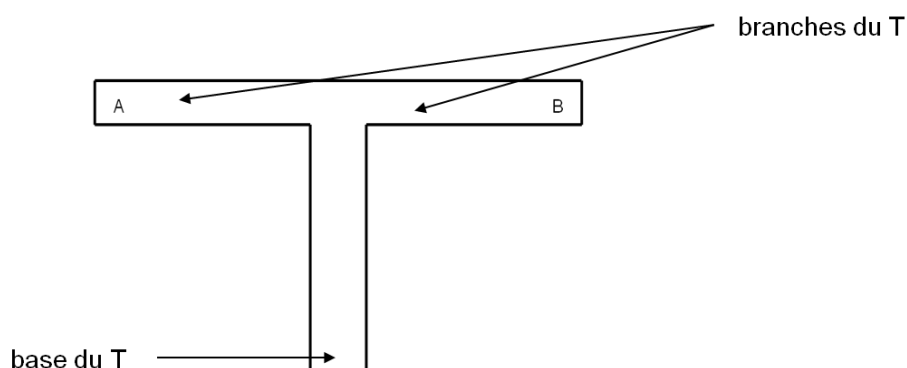


Figure 9: Illustration du labyrinthe en T

L'animal est placé à la base du labyrinthe, et doit ensuite choisir l'une ou l'autre des branches du T, en fonction du comportement souhaité par l'expérimentateur

Ce labyrinthe présente l'avantage de constituer un outil très simple dans l'étude de la mémoire spatiale à court terme : il ne requiert pas de matériel spécifique pour l'enregistrement vidéo des animaux (mais un fort investissement de la part de l'expérimentateur). Les données recueillies sont également très reproductibles. Le principal inconvénient de ce labyrinthe est d'offrir un double choix pour l'animal, et donc cinquante pour cent de chance de réussite par le jeu du hasard pour chaque essai. Ainsi, l'animal peut par exemple utiliser des données olfactives pour résoudre le problème proposé.

Le labyrinthe en T a été utilisé dans de nombreuses études, par exemple pour évaluer la mémorisation spatiale chez des souris transgéniques (Cao *et al.*, 2007) ou l'effet de xénobiotiques sur les performances de mémorisation spatiale (Ito and Canseliet, 2010).

### II-2-2 Le labyrinthe en T multiple

Ce labyrinthe est formé de multiples croisements en T (figure 10).

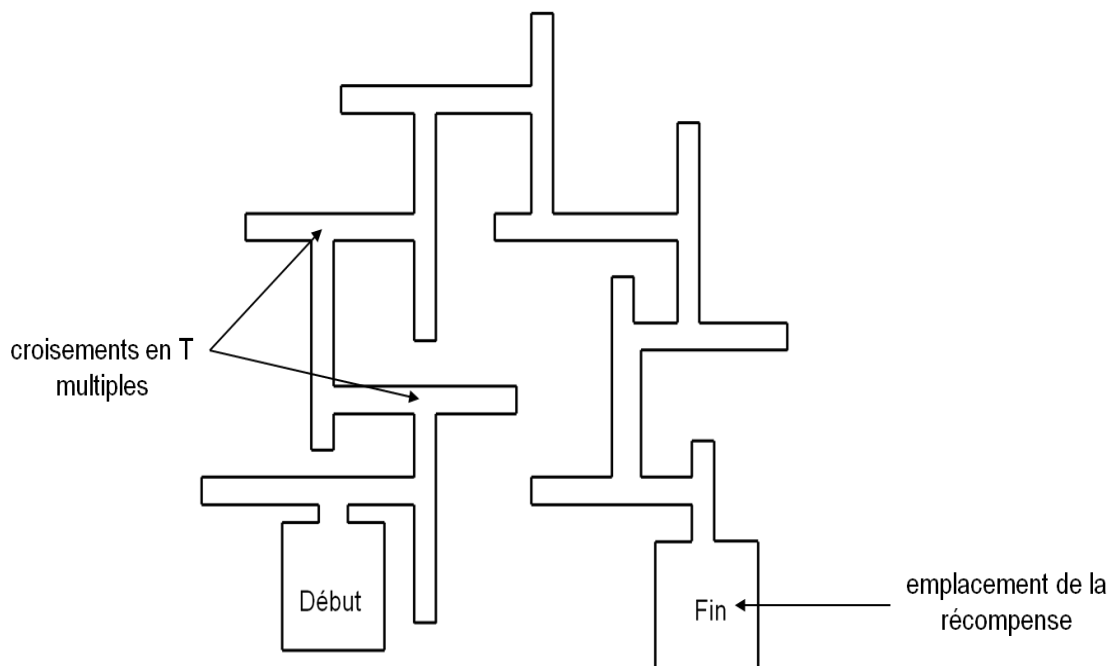


Figure 10: Illustration du labyrinthe en T multiple

Ce labyrinthe est formé d'une succession de labyrinthes en T. L'animal est placé au début du labyrinthe, et doit trouver la récompense, située à la fin du labyrinthe.

Au début de l'essai, les animaux sont placés dans une boîte cylindrique noire durant quelques secondes. Puis, cette boîte noire est retirée et l'essai commence. Après cinq minutes, si l'animal n'a pas trouvé la récompense, il est retiré du labyrinthe et l'essai est interrompu. Afin d'éviter toute contamination olfactive, le labyrinthe est nettoyé après chaque essai par une solution alcoolique à 70%. Les souris sont entraînées durant quatre jours, avec trois essais par jour, et vingt secondes d'attente entre chaque essai. Les paramètres utilisés pour l'analyse de données sont les suivants : décision correcte ou incorrecte, distance parcourue, temps pour atteindre la récompense, vitesse de déplacement.

L'avantage de ce labyrinthe est qu'il augmente de manière significative la difficulté du labyrinthe en T, avec de nombreux choix et alternatives possibles. Puisque la récompense – distribution de nourriture ou de boisson – est placée à un endroit précis du labyrinthe, invariant d'un essai à l'autre, les animaux doivent apprendre un chemin complexe qui les mènera jusqu'à la récompense. Ce labyrinthe permet d'étudier la mémoire spatiale à long terme, mesurée par une baisse dans le temps de réponse et du nombre d'erreurs (Sharma *et al.*, 2010). Cependant, cet outil requiert un système automatique de suivi des déplacements des animaux, dont le coût n'est pas toujours abordable pour les équipes de recherche.

Un tel labyrinthe a été utilisé dans l'étude menée par Tolman et Honzic en 1930, qui leur a permis d'avancer l'hypothèse de la formation de cartes cognitives dans le cerveau (Tolman and Honzic, 1930). Cet outil reste aujourd'hui largement utilisé pour tester la mémorisation spatiale chez les rongeurs (Patil *et al.*, 2009 ; Zheng *et al.*, 2009).

### II-2-3 Le labyrinthe radial

Ce labyrinthe est constitué d'une plateforme centrale avec huit ou douze bras mesurant chacun cinq centimètres de largeur et trente-cinq centimètres de longueur pour les souris (respectivement dix et cinquante centimètres pour les rats) (figure 11, page suivante).

Un animal est placé au centre du labyrinthe, et une récompense est placée à la fin de chaque bras. La meilleure stratégie pour l'animal consiste alors à visiter une seule

fois chaque bras. Chaque visite d'un bras vide – et donc déjà visité – est considérée comme une erreur.

Un avantage important du labyrinthe radial est que la mise en place du protocole et la récolte des données sont relativement simples, dans la version la plus basique du test. De plus, ce type de labyrinthe permet l'évaluation de la mémoire spatiale à court et à long terme chez les rongeurs (Hodges, 1996). Enfin, les tests mis en place grâce à ce labyrinthe sont moins stressants pour les animaux (Hodges, 1996), différemment d'autres tests tels que la piscine de Morris.

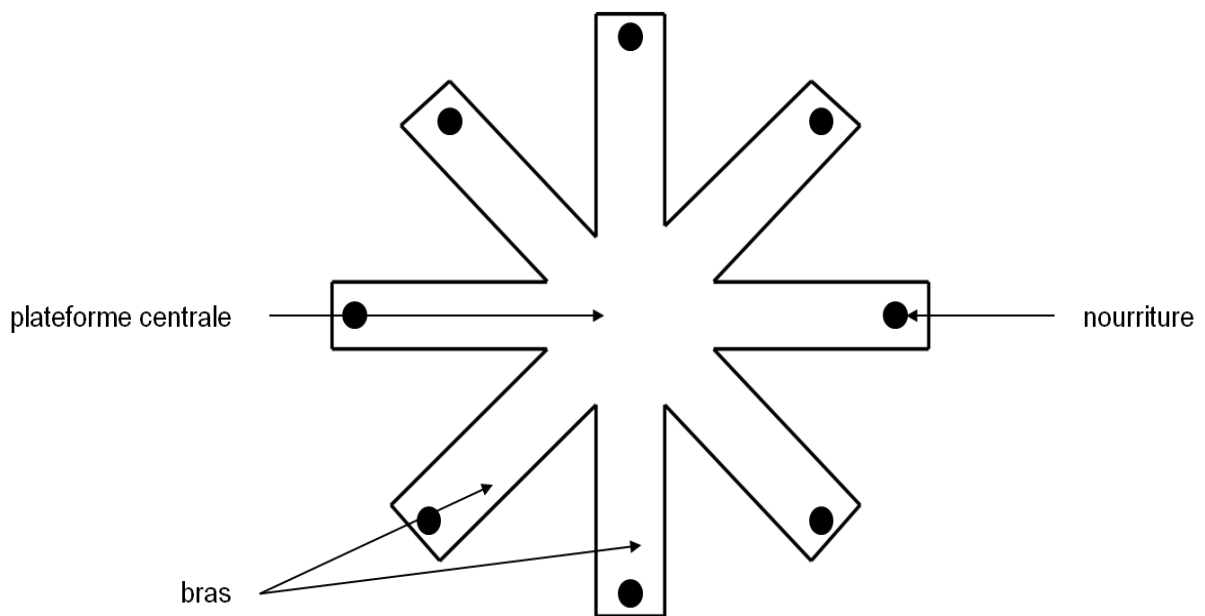


Figure 11 : Illustration du labyrinthe radial

L'animal est placé au niveau de la plateforme centrale, et doit visiter une seule fois chaque bras afin d'obtenir la récompense. Chaque visite de bras vide – donc déjà visité – est considérée comme une erreur.

Un des inconvénients majeurs de ce test est la possibilité pour les animaux d'avoir un accès à chaque bras adjacent sans utilisation de la mémoire spatiale, mais au contraire en se déplaçant dans un sens horaire ou anti-horaire. De plus, ce labyrinthe a des chemins pré-établis – les bras – qui mènent directement à la récompense.

Différemment d'autres tests tels que la piscine de Morris, l'animal ne nécessite pas de se souvenir du chemin le plus court menant à la récompense. Enfin, les animaux peuvent utiliser les indices non spatiaux tels que des indices olfactifs pour savoir si un bras a déjà été visité, et ainsi savoir s'il contient ou non une récompense. Certains auteurs utilisent une méthode de saturation aromatique, permettant aux animaux d'explorer librement le labyrinthe avant les essais, sans aucune récompense, dans le but de saturer l'atmosphère (Dudchenko, 2004).

Ce labyrinthe a été développé pour la première fois par Olton et Samuelson en 1976 dans le but d'évaluer la mémoire spatiale à court terme (Olton and Samuelson, 1976). Cet outil est aujourd'hui largement utilisé pour tester de nombreux xénobiotiques (Paul *et al.*, 2009) et les déficits cognitifs chez plusieurs modèles de souris (Sharma *et al.*, 2010).

#### II-2-4 La piscine de Morris

La piscine de Morris, développée pour la première fois par R. Morris dans les années 80 (Morris, 1984), correspond à un outil fondamental, devenu incontournable dans l'étude de la mémoire chez les rongeurs. Il permet de réaliser des tests comportementaux d'apprentissage spatial. L'animal – rat ou souris – est lâché dans une piscine circulaire remplie d'eau rendue opaque par du lait ou de la peinture blanche et contenant une plateforme échappatoire. Une fois dans l'eau, l'animal a naturellement envie de trouver un endroit échappatoire, qui correspond à la plateforme, située à un centimètre en dessous du niveau de l'eau. La découverte de la plateforme correspond au renforcement positif. Au premier essai, les animaux trouvent la plateforme par hasard. Puis, ils retrouvent leur chemin à l'aide d'indices spatiaux situés autour de la pièce. Ces derniers permettent aux cellules de l'hippocampe de former une carte spatiale de l'environnement et aux animaux de retrouver le chemin vers la plateforme.

Dans une version plus simple de ce test explorant la mémoire non spatiale, la plateforme est signalée par un drapeau et est ainsi visible directement (figure 12). Ces tests, utilisés comme essais témoins dans tes tâches de mémorisation, permettent de tester la mémoire associative des animaux : puisque les indices spatiaux situés autour de la pièce sont enlevés, la capacité des animaux à

associer la plateforme au drapeau est testée. La souris peut ainsi se déplacer directement vers le drapeau, sans utiliser les indices spatiaux. La mémoire associative constitue une catégorie de mémoire distincte de la mémoire spatiale, impliquant des régions cérébrales distinctes de l'hippocampe. De plus, le processus de vieillissement n'affecte pas cette mémoire. Les essais témoins testent l'acuité visuelle et l'habileté physique des animaux à réaliser les tâches, ainsi que leur motivation pour aller sur la plateforme.

La piscine de Morris permet un apprentissage plus rapide par rapport à d'autres tests, grâce à l'effet aversif de l'eau sur les rongeurs. De plus, cet outil permet de différencier une épreuve spatiale et une épreuve non spatiale, ce qui constitue un avantage majeur pour de nombreux auteurs (D'Hooge and De Deyn, 2001). En outre contrairement aux labyrinthes terrestres, la possibilité pour les animaux d'utiliser des indices olfactifs est considérablement réduite (D'Hooge and De Deyn, 2001). Enfin, la piscine de Morris permet une mesure à la fois précise et reproductible de la mémoire spatiale, et constitue un outil très sensible pour évaluer les dommages causés à l'hippocampe (Sharma *et al.*, 2010)

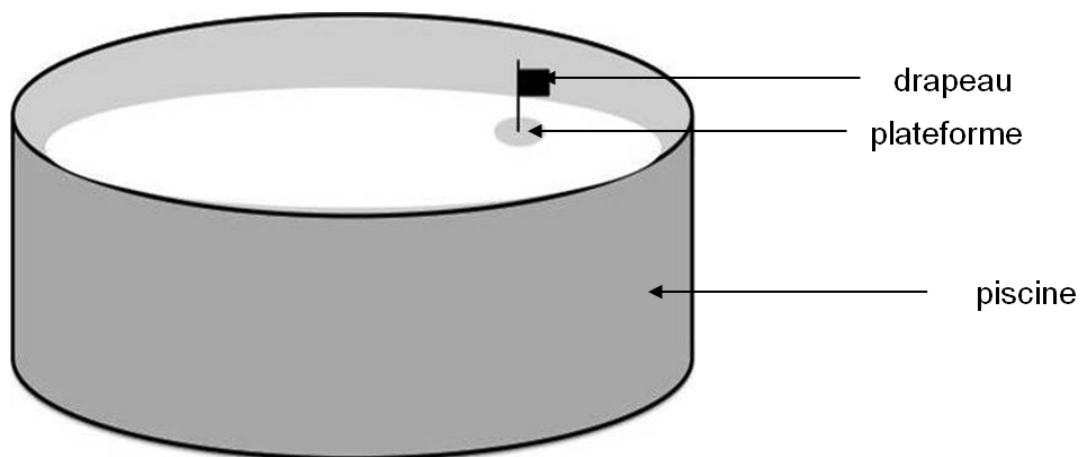


Figure 12 : Illustration de la piscine de Morris pour les essais témoins

L'animal doit associer la présence du drapeau à la plateforme, sans l'utilisation d'indices spatiaux. Ces essais sont utilisés pour tester la capacité des animaux à réaliser les tâches comportementales.

Il a est à noter que l'inconvénient majeur de la piscine de Morris est le stress occasionné par la présence de l'eau. Ce dernier pourrait interférer avec les fonctions cognitives (Sharma *et al.*, 2010). C'est pourquoi certains auteurs procèdent à une période d'habituation des animaux à la nage avant les épreuves de mémorisation



spatiale (Paul *et al.*, 2009). De plus, la récolte des données doit être réalisée par un système vidéo, pas toujours abordable pour les équipes de recherche.

La piscine de Morris a été utilisée avec de très nombreux modèles animaux de maladies humaines, notamment de la Maladie d'Alzheimer (Paul *et al.*, 2009). Cet outil a également été utilisé avec des modèles animaux transgéniques (Cao *et al.*, 2007) ainsi que pour comprendre les mécanismes du déclin cognitif chez les individus âgés (Zhao *et al.*, 2009).

### **III – Neurobiologie du récepteur au NMDA**

#### **III-1 Importance de l'étude du récepteur au NMDA**

Le récepteur au NMDA, un type de récepteur au glutamate, est présent en grande quantité dans le cortex cérébral et l'hippocampe. Il est impliqué dans de nombreux mécanismes physiopathologiques tels que la locomotion, la douleur (Mohamad *et al.*, 2013; Cull-Candy *et al.*, 2001), la mémorisation et l'apprentissage (Magnusson, 2010).

Le récepteur au NMDA constitue une cible d'intérêt particulier pour élucider les mécanismes de déclin des fonctions cognitives liées à la mémorisation et l'apprentissage : des études montrent que la baisse de la synthèse du récepteur au NMDA dans les régions de l'hippocampe et du cortex préfrontal dans le cerveau de rongeurs âgés (Brim *et al.*, 2013) est reliée à un déclin des performances de mémorisation (Magnusson, 2010).

L'équipe Cao et ses collaborateurs (Cao *et al.*, 2007) ont montré que des souris transgéniques âgées surexprimant la sous-unités GluN2B du récepteur au NMDA montrent une amélioration des performances de mémorisation et d'apprentissage. Brenna Brim et son équipe, ont montré par la suite qu'une augmentation de la synthèse de la sous-unité GluN2B dans les neurones du cortex et de l'hippocampe par injections virales chez des souris âgées permet d'améliorer les performances de mémorisation et de transmission synaptique. De tels résultats suggèrent en outre que les thérapies augmentant la synthèse de la sous-unité GluN2B du récepteur au

NMDA chez les individus âgés constitue une piste pour améliorer les déclin cognitifs liés à l'âge (Brim *et al.*, 2013).

### III-2 Biologie moléculaire du récepteur au NMDA

Le récepteur au NMDA est un complexe de protéines transmembranaires post-synaptiques, formant un tétramère, constitué le plus généralement de deux sous-unités GluN1 et deux sous-unités GluN2 (figure 13).

Il est à noter que l'une des deux sous-unités GluN2 peut-être remplacée par une sous-unité GluN3, dont les fonctions physiologiques restent encore peu connues. Le récepteur possède des sites de fixation pour de nombreux ligands, dont celui pour le NMDA. Chacun de ces sites de fixation peut fixer plusieurs molécules (Magnusson, 2010) : ainsi, le site de fixation au NMDA fixe également des antagonistes endogènes tels que le L-glutamate et le L-aspartate, et des antagonistes exogènes tels que l'acide D-2-5-phosphonopentanoïque (AP5).

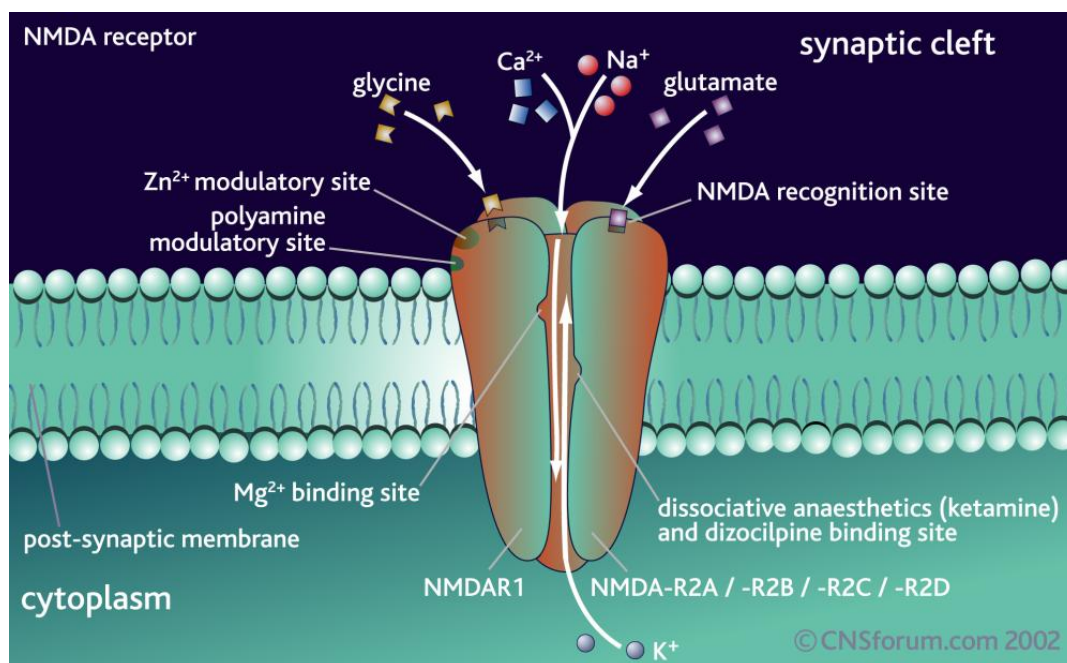


Figure 13 : Représentation du récepteur au NMDA (Lundbeck Institute, 2011)

Le récepteur au NMDA est constitué de 4 protéines formant un canal par lequel peuvent transiter les ions calcium, sodium et potassium. En conditions physiologiques, le canal est obstrué par l'ion magnésium, qui possède un site de fixation à l'intérieur du canal. Le récepteur possède des sites de fixation pour le NMDA, mais aussi pour la glycine et le zinc. Les 4 protéines formant le canal peuvent appartenir aux familles des sous-unités GluN1, GluN2 ou GluN3.

La nomenclature de classification des sous-unités du récepteur NMDA est complexe, et a été modifiée à plusieurs reprises. La « *International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification* » (NC- IUPHAR) a publié des consignes de classification qui visent à standardiser la nomenclature utilisée pour se référer au récepteur NMDA (Collingridge *et al.*, 2009). Nous utiliserons par la suite cette nouvelle nomenclature pour se référer aux différentes sous-unités de ce récepteur. Trois familles de sous-unités ont été identifiées pour le récepteur au NMDA : GluN1, GluN2 et GluN3, que nous allons à présent détailler.

### III-2-1 La famille GluN1

Dans le cerveau, huit différents variants de l'ARN messager pour la famille GluN1 ont été identifiés, générés par la recombinaison entre une cassette N-terminale et deux cassettes C-terminales dans l'ARN messager (Cull-Candy *et al.*, 2001). La cassette C2 contient un codon stop. Lorsque celui-ci est absent, une séquence additionnelle, jusqu'au prochain codon stop, nommée cassette C2', devient partie intégrante de l'ARN messager (Magnusson, 2010).

La figure 14, page suivante résume la formation des ARN messagers en fonction de la présence ou de l'absence des cassettes N et C-terminales. Les dénominations des huit variants GluN1 sont également présentées, en combinant les terminologies utilisées pour les parties N-terminale et C-terminale. Dans cette figure, le signe – indique l'absence de la cassette, le signe + indique la présence de la cassette, et les parenthèses indiquent l'une ou l'autre de ces conditions.

Ces divers variants sont indispensables à la biologie du récepteur NMDA, puisqu'il existe une hétérogénéité entre ces différents variants par rapport à l'affinité aux agonistes et aux antagonistes de ce récepteur (Magnusson, 2010).

### III-2-2 La famille GluN2 : importance de l'étude de la sous-unité GluN2B

Quatre membres appartiennent actuellement à la famille GluN2 : GluN2A, GluN2B, GluN2C et GluN2D.

Certaines études ont démontré que la sous-unité GluN2B est particulièrement importante dans la genèse de la mémoire : des souris qui surexpriment la sous-unité GluN2B montrent une habilité supérieure dans de nombreuses tâches, en particulier des tâches de mémorisation et d'apprentissage (Tang *et al.*, 1999). De plus, chez la souris, les effets les plus importants liés à l'âge et reliés au récepteur au NMDA sont observés en relation avec l'expression de la sous-unité GluN2B : chez des souris âgées, l'expression de l'ARN messenger de la sous-unité GluN2B décroît significativement avec l'âge dans le cortex cérébral et dans certaines régions de l'hippocampe (Magnusson, 2000). Enfin, la baisse de glutamate se liant au récepteur NMDA chez les individus âgés semble être reliée à une baisse de synthèse de l'ARN messenger codant pour la sous-unité GluN2B (Magnusson, 2000).

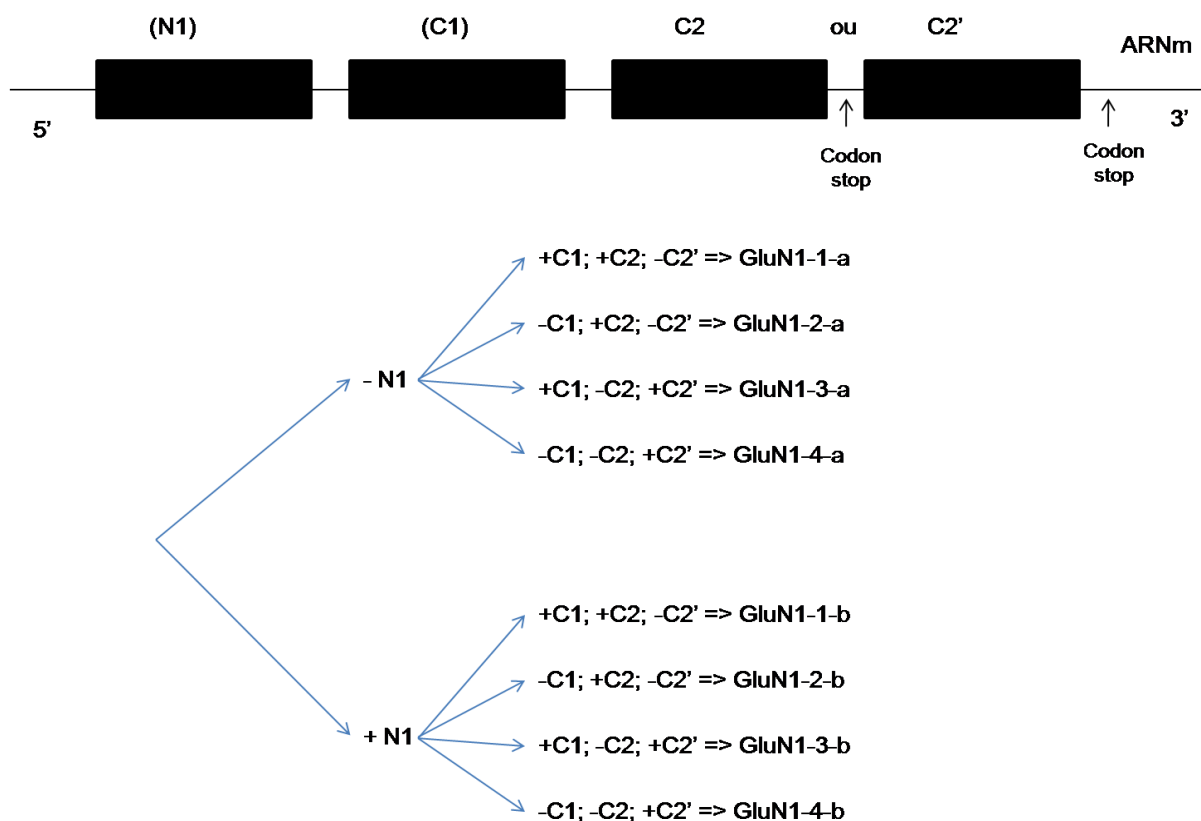


Figure 14 : Classification des différents variants de la sous-unité GluN1 du récepteur au NMDA en fonction des ARN messagers (d'après Cull-Candy *et al.*, 2001)

Signe « - » : absence de cassette ; Signe « + » : présence de la cassette ; Parenthèses : présence ou absence de la cassette.

Huit variants de la sous-unité GluN1 ont été recensés, en fonction de la présence ou de l'absence de cassettes dans l'ARN messenger.

### III-2-3 La famille GluN3 : une famille encore peu connue

Deux membres de la famille GluN3 ont pu être mis en évidence : GluN3A et GluN3B. Une récente étude montre que les sous-unités GluN3 seraient impliquées dans les fonctions de locomotion, de perception de la douleur, de mémorisation et d'apprentissage (Mohamad *et al.*, 2013). Les auteurs de cette étude ajoutent que les sous-unités GluN3 pourraient constituer de potentielles cibles thérapeutiques pour les troubles neurologiques associés au récepteur au NMDA.

Découverts il y a environ quinze ans, les rôles physiologiques de ces deux sous-unités restent encore peu connus. Il est probable que l'étude de ces deux sous-unités permettra de comprendre encore d'avantage les mécanismes qui sous-tendent le stockage mnésique chez les mammifères.

## **IV – Implication du récepteur au NMDA en toxicologie : exemple du bisphénol A**

Historiquement, certains agents tels que le méthyl-mercure et le plomb sont reconnus comme des neurotoxiques du développement. L'accent a toutefois été plus récemment mis sur les troubles du développement du système nerveux en relation avec une exposition périnatale aux perturbateurs endocriniens. Les mécanismes d'action de certains de ces contaminants semblent impliquer le récepteur au NMDA. Exposés à ces polluants durant les stades critiques du développement neuronal, les individus seraient ainsi susceptibles de souffrir à l'âge adulte de troubles comportementaux divers, notamment de baisses de performances de mémorisation et d'apprentissage spatial. Nous allons dans cette partie prendre l'exemple du bisphénol A, une molécule considérée comme un perturbateur endocrinien.

Le bisphénol A (ou BPA) est un composé chimique, utilisé en très grande quantité à travers le monde pour la production de plastiques durs et de résines époxy. Cette molécule se retrouve ainsi dans la composition de nombreux produits de la vie quotidienne tels que les lunettes de soleil, les boîtes de conserve, et, jusqu'en 2008 en France, les biberons. La population des pays industrialisés se trouve de fait largement exposée de manière chronique à de faibles doses au bisphénol A. Chez

l'Homme, le rapport d'expertise de l'ANSES (ANSES, 2013), a reconnu des situations à risques pour l'enfant à naître, concernant la glande mammaire, le cerveau, le comportement, le métabolisme, l'obésité et l'appareil reproducteur féminin. Compte-tenu du manque de données disponibles pour l'évaluation des risques, les experts ne peuvent en revanche pas conclure quand à un risque potentiel d'une exposition au bisphénol A pour les autres populations (nourrissons, enfants, adolescents).

L'exposition d'individus à des perturbateurs endocriniens tels que le bisphénol A durant les stades critiques du développement pourrait avoir un impact négatif sur les fonctions de mémorisation et d'apprentissage chez l'individu adulte. Xu et son équipe ont montré qu'une exposition chronique de rongeurs au bisphénol A durant l'adolescence et l'âge adulte peut altérer les fonctions d'exploration, d'apprentissage et de mémorisation spatiale, sans changement significatif du taux d'hormones sexuelles dans le sérum (Xu *et al.*, 2011).

Puisque les fonctions de mémorisation et d'apprentissage sont largement liées à la présence et au bon fonctionnement du récepteur au NMDA dans l'hippocampe, certaines équipes ont cherché un éventuel effet d'une exposition au bisphénol A sur la synthèse des sous-unités du récepteur au NMDA. Xu et son équipe ont montré qu'une exposition périnatale au bisphénol A altère durablement la mémoire spatiale de la descendance (Xu *et al.*, 2010) et induit une baisse de la synthèse des sous-unités GluN1, GluN2A et GluN2B du récepteur au NMDA dans l'hippocampe (Xu *et al.*, 2010).

Les connaissances acquises depuis le début du XX<sup>ème</sup> siècle ont permis d'acquérir une vision globale des diverses formes de mémoires existantes chez les mammifères. Les expériences réalisées ont identifié l'hippocampe comme structure anatomique centrale du stockage de l'information et la Potentialisation à Long Terme comme un mécanisme capable d'expliquer le stockage de l'information, notamment par l'intermédiaire du récepteur au N-méthyl-D-Aspartate (NMDA). Ce dernier constitue un acteur majeur de la mémorisation et l'apprentissage spatial, étudiés grâce aux labyrinthes aquatique et terrestres.

## **Deuxième partie: effets d'une sur-régulation de la sous-unité GluN2B sur les fonctions de mémorisation et d'apprentissage chez les rongeurs jeunes et séniles**

*« Il y a ceux qui voient les choses telles qu'elles sont et qui se demandent pourquoi. Moi je vois les choses telles qu'elles pourraient être, et je me dis pourquoi pas. »*

George Bernard Shaw

### **I- Objectifs de l'étude**

Des animaux génétiquement modifiés présentant une synthèse augmentée de la sous-unité GluN2B dans l'hippocampe ont montré une augmentation des performances dans les tâches de mémorisation et d'apprentissage (Tang *et al.*, 1999 ; Cao *et al.*, 2007). Ces études ont permis de montrer que des animaux présentant une synthèse accrue de la sous-unité GluN2B dès la naissance montrent des performances de mémorisation et d'apprentissage augmentées à l'âge adulte. La question a alors été posée de savoir si certains médicaments ciblant ce récepteur pourraient être utilisés à des fins thérapeutiques chez des individus âgés présentant des troubles de la mémorisation (Cull-Candy *et al.*, 2001). Afin de répondre à cette problématique, cette étude explore les effets d'une surexpression de la sous-unité GluN2B dans les neurones de l'hippocampe, chez des souris jeunes et âgées, dont le génotype n'a pas été modifié. Les résultats obtenus permettront de déterminer l'intérêt de développer des médicaments possédant comme cible thérapeutique le gène de la sous-unité GluN2B, à destination des personnes âgées.

Les résultats présentés dans ce travail se placent dans le cadre d'une investigation plus large, menée par le Dr Kathy Magnusson et son équipe, visant à explorer les effets d'une surexpression de la sous-unité GluN2B dans l'hippocampe et le cortex frontal chez les rongeurs. Ils constituent donc des résultats préliminaires, complétés par la suite et publiés en janvier 2013 dans le journal Behavioural Brain Research (Brim *et al.*, 2013).

## II- Matériels et Méthodes

### II-1 Le vecteur viral

L'expression de la sous-unité GluN2B a été augmentée au sein des neurones en insérant le gène correspondant dans un vecteur viral, grâce à une procédure de chirurgie stéréotaxique. Seul l'adénovirus Humain de type 5 (*Replication-deficient adenovirus* type 5) constitue un vecteur viral de taille suffisante pour contenir le gène codant pour la sous-unité GluN2B, d'une taille de 6,2 mégabases. Deux types de vecteurs ont été utilisés. Le premier (« vecteur *GluN2B* ») exprimait à la fois le gène codant pour la sous-unité GluN2B et celui de la Protéine de Fluorescence Verte (Green Fluorescent Protein ou GFP). Le second (« vecteur contrôle ») exprimait uniquement le gène de fluorescence verte. Un promoteur de cytomégalovirus (CMV) contrôlait les gènes codant à la fois pour la sous-unité GluN2B et pour la protéine GFP. Puisque ce promoteur est fort, sa transcription n'était pas à même d'être altérée par les changements qui ont lieu dans les cellules sénescents.

### II-2 Les animaux

Cent huit souris de sexe mâle, de souche C57BL/6 ont été utilisées. Ces animaux ont été divisés en deux groupes principaux : les souris jeunes (3 mois) et âgées (21-26 mois). Les animaux des deux groupes d'âge ont été aléatoirement répartis en trois traitements différents, et ont reçu soit le véhicule (animaux témoins) soit le vecteur contrôle, soit le vecteur GluN2B (tableau 2).

Tableau 2: Nombre d'animaux utilisés par chaque traitement et par tranche d'âge

Traitement	Véhicule	Vecteur contrôle	Vecteur GluN2B
3 mois	18	18	18
21-26 mois	18	18	18

Les animaux ont été divisés en deux groupes principaux : les souris jeunes (3 mois) et les souris âgées (21-26 mois). Les souris ont reçu soit le véhicule (animaux témoins) soit le vecteur contrôle (contenant uniquement le gène codant pour la protéine de fluorescence verte, GFP) soit le vecteur GluN2B (contenant les gènes codant pour la GFP et la sous-unité GluN2B).

Par la suite, les groupes de souris seront nommés par le nom du groupe auquel elles appartiennent. Les animaux ont reçu une administration de l'un ou l'autre des trois



traitements dans l'hippocampe par chirurgie stéréotaxique. Avant de commencer les tests comportementaux, les animaux ont été en convalescence durant une semaine après la chirurgie. A la fin du protocole comportemental, les souris ont été euthanasiées par exposition au dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>).

## **II-3 La chirurgie stéréotaxique**

### II-3-1 Principe général

La chirurgie stéréotaxique correspond à une technique chirurgicale très utilisée, et constitue le fondement à toute technique d'exploration neurophysiologique. Elle repose sur l'existence d'une relation étroite entre la configuration crânienne et les structures cérébrales sous-jacentes. Cette technique permet d'atteindre une zone particulière du cerveau avec une grande précision en autorisant l'introduction ciblée de canules et de sondes.

Les coordonnées de chirurgie stéréotaxique sont définies en prenant comme repères les sutures crâniennes qui sont reliées aux structures cérébrales sous-jacentes (figure 15). Le point bregma, correspond au point d'intersection entre la suture sagittale et la suture coronale. Le point lambda, correspond au point d'intersection - imaginaire - entre la suture sagittale, et la meilleure courbe de la suture lambdoïde (Laval *et al.*, 2012).

### II-3-2 Procédure de chirurgie stéréotaxique

Tous les animaux ont été soumis à une procédure de chirurgie stéréotaxique (Annexe 1). En particulier, sont notés les différents pourcentages d'isoflurane utilisés durant la chirurgie ainsi que les mesures réalisées sur le crâne pour les injections dans l'hippocampe.

### II-3-3 Anesthésie et analgésie

L'isoflurane a permis l'induction et la maintenance de l'anesthésie durant toute la procédure. Après incision cutanée, une perforation circulaire de 1-2 mm a ouvert la voie vers l'hippocampe dorsal. Après la procédure, un analgésique opioïde, la buprénorphine, a été administré à la dose de 0,1 mg/kg par voie sous-cutanée, afin de poursuivre l'analgésie. Les animaux ont reçu un traitement analgésique post-

opérateur par ingestion de paracétamol (1,2 mg/kg) et de codéine (0,12 mg/kg) dans l'eau de boisson durant les 72 heures suivant la chirurgie.

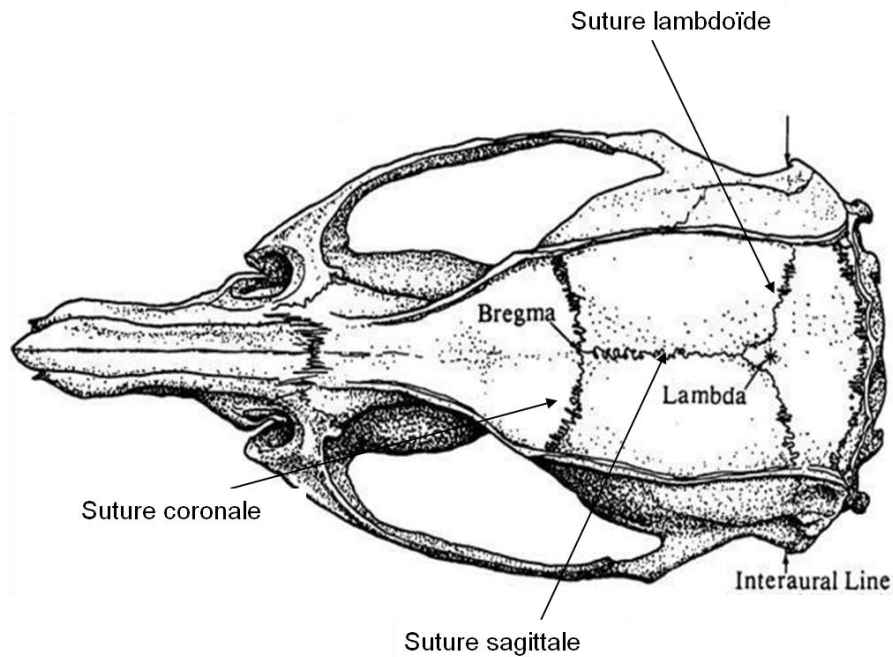


Figure 15 : Points de chirurgie stéréotaxique sur le crâne du rat (d'après Paxinos and Watson, 2007).

Les points de chirurgie stéréotaxique sont déterminés selon les différentes sutures crâniennes, reliées aux structures cérébrales sous-jacentes. On distingue ainsi le point bregma (à l'intersection entre les sutures coronale et sagittale) et le point lambda (point d'intersection imaginaire entre la suture sagittale et la meilleure courbure de la suture lambdoïde).

#### II-3-4 Les injections de vecteurs viraux

Les injections de vecteurs viraux ont été réalisées dans les deux côtés du gyrus denté de l'hippocampe en utilisant une pompe seringue. Trois microlitres par site ont été administrés à la vitesse de 0,5  $\mu$ L/minute à la fois pour les vecteurs GluN2B et contrôle ainsi que pour le véhicule.

#### **III-5 Contrôles histologiques**

Bien que, pour des raisons pratiques, les contrôles histologiques aient été réalisés après les études comportementales, ces derniers seront explicités en premier, pour une plus grande clarté. L'équipe du Dr Kathy Magnusson a vérifié par analyse histologique l'efficacité de l'adénovirus en tant que vecteur d'une part, et d'autre part la spécificité d'expression du gène codant pour la protéine GluN2B dans les neurones de l'hippocampe. Les résultats histologiques présentés plus bas sont relatifs à ceux publiés par l'équipe (Brim *et al.*, 2013).

### III-5-1 Efficacité de l'adénovirus en tant que vecteur

L'efficacité de l'adénovirus en tant que vecteur a été testée grâce à une lignée de cellules de peau de lapin générée en laboratoire (figure 16). Les figures A à C (re-coloriées en fausses couleurs) représentent des cellules injectées à la fois avec le gène codant pour la protéine GluN2B et celui codant pour le gène de fluorescence verte (GFP) visualisées par immunofluorescence. La protéine GluN2B a été marquée par des anticorps primaire et secondaire, ce dernier étant attaché à une rhodamine (B). Excitée à une longueur d'onde de 557 nm, la rhodamine émet à une longueur d'onde de 576 nm. La protéine de fluorescence verte (A) émet une lumière d'une longueur d'onde de 525 nm après une excitation à une longueur d'onde de 490 nm. La figure C montre une reconstitution des deux images A et B, par recouvrement. Ceci nous montre que le vecteur viral utilisé est efficace dans le transfert de gènes d'intérêt dans les cellules. Ces résultats montrent en outre que l'expression de la protéine GFP n'interfère pas avec la synthèse de la protéine GluN2B.

Les images D et E montrent des cellules de peau de lapin ayant reçu seulement le gène GFP, visualisées par immunofluorescence. De manière similaire aux techniques présentées ci-dessus, ces images montrent que les cellules expriment la protéine du gène GFP (D), mais pas celle du gène GluN2B (E). L'injection du gène GFP dans les cellules n'augmente donc pas l'expression de la protéine GluN2B.

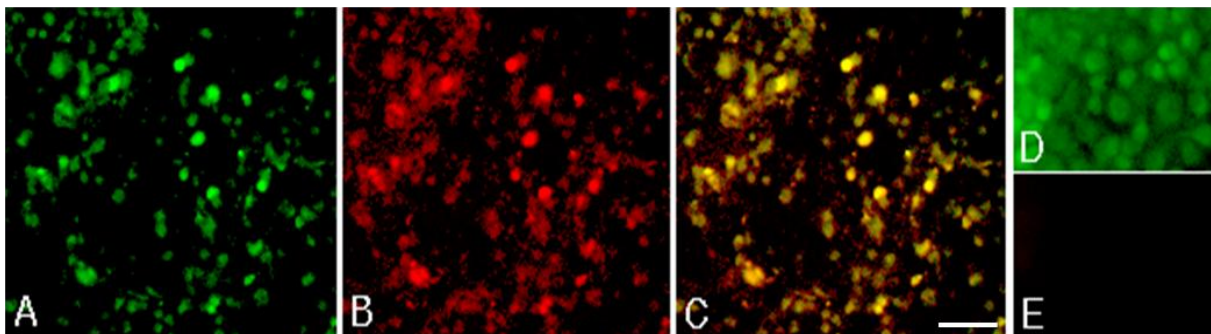
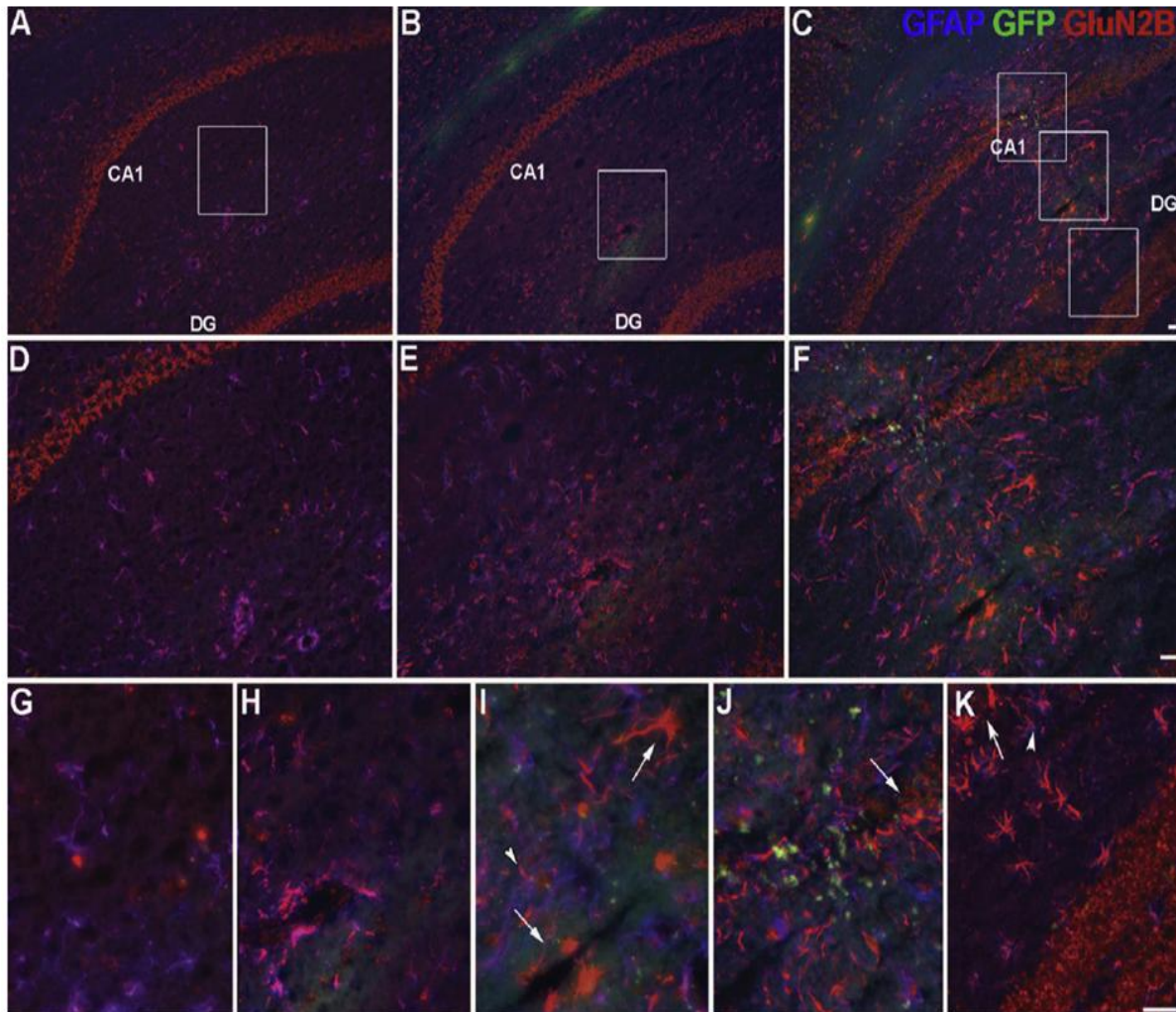


Figure 16: Cellules de peau de lapin injectées à la fois avec le gène GFP et le gène GluN2B (A-C) et seulement avec le gène GFP (D et E) (Brim *et al.*, 2013).

L'observation montre que le vecteur viral utilisé permet de faire exprimer les gènes codant pour la GFP, celui codant pour la protéine GluN2B, et les deux simultanément (figures A à C). En outre, ceci permet de vérifier que l'expression de la protéine GFP n'augmente pas la transcription de la protéine GluN2B (figures D et E). Echelle : 25µm

### III-5-2 Spécificité de l'expression du gène GluN2B dans les cellules de l'hippocampe

Les tissus neuronaux des souris ont été visualisés par immunofluorescence afin de vérifier la surexpression de la protéine GluN2B dans les neurones de l'hippocampe.



**Figure 17:** Coupe histologique de l'hippocampe montrant l'expression de la sous-unité GluN2B, de la protéine GFP, et de la protéine GFAP (marqueur glial) chez des souris âgées selon trois traitements :

le véhicule (A, D, G), le vecteur contrôle (B, E, H) le vecteur GluN2B (C, F, I, J, K) (Brim *et al.*, 2013). Les images D à K représentent des grossissements des images A à C. Les flèches représentent la sous-unité GluN2B surexprimée dans les cellules neuronales ; les têtes de flèches représentent la sous-unité GluN2B dans les astrocytes. Echelle : 25µm

La figure 17, ci-dessus représente des coupes histologiques de l'hippocampe de souris âgées injectées soit avec le véhicule (A, D, G), soit avec le vecteur contrôle (B, E, H), soit avec le vecteur GluN2B (C, F, I, J, K). Un marquage immunohistochimique a également été réalisé afin de visualiser l'expression de la protéine GluN2B (rouge), de la protéine GFP (vert) et de la protéine GFAP (bleu).

Ces résultats montrent une augmentation du marquage immunohistochimique – et donc de la surexpression – de la protéine GluN2B chez les souris traitées avec le vecteur GluN2B en comparaison avec une synthèse endogène (figure 32 C, F, I, J, K). Chez les souris injectées avec le vecteur contrôle et le véhicule, aucune augmentation de synthèse de la sous-unité GluN2B n'a été observée, en comparaison à une synthèse endogène (figure 32 A, D, G et B, E, H). En outre, si l'augmentation de synthèse de la sous-unité GluN2B a été observée, cette dernière n'était pas restreinte aux cellules neuronales.

#### **II-4 Les tests comportementaux**

Nous avons testé la mémoire à long terme, ainsi que la flexibilité des animaux. Pour chacun de ces paramètres, des tests spécifiques ont été utilisés.

Pour la mémoire à long terme des essais tests ont été conduits sur 3 journées consécutives. A la fin de chaque journée de tests, un essai enquête a été réalisé, afin de déterminer si l'animal trouvait la plateforme par chance ou par mémoire véritable.

Pour tester la flexibilité des animaux, des essais inversés ont été réalisés, consistant en 1 seul essai le quatrième jour, dans lequel la plateforme est placée dans le cadran opposé auquel elle était précédemment disposée.

Enfin, des essais témoins ont également été conduits le cinquième jour, afin de déterminer la capacité physique des animaux à réaliser les tests.

##### II-4-1 Entraînement

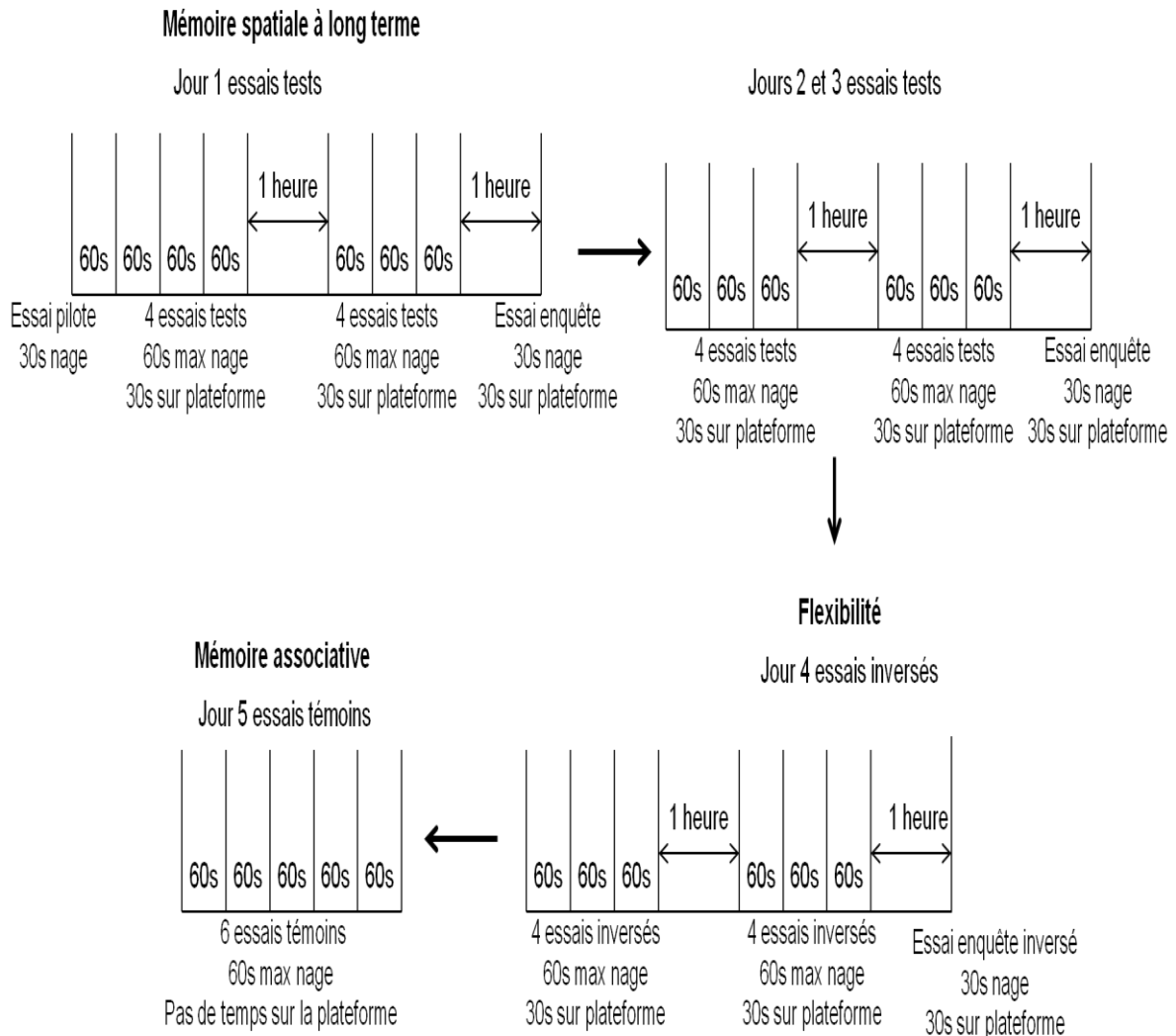
Avant de commencer les essais, les souris ont été entraînées à la fois à nager et à rester sur la plateforme : puisque les souris participant au protocole n'ont jamais nagé, il est important de les entraîner à cette tâche. Chaque animal est donc placé dans la piscine pendant une durée de 60 secondes, sans plateforme. Puis, chaque souris est habituée à rester sur la plateforme durant 30 secondes. En effet, avant l'entraînement, les animaux ne restent pas spontanément sur la plateforme échappatoire, diminuant de fait leur apprentissage spatial, ce qui constitue une source importante de variabilité interindividuelle. Puisque l'objectif de ces séances préparatoires n'est pas d'entraîner les animaux à retrouver la plateforme, aucun indice n'est présent dans la salle durant ces deux premiers jours.

## II-4-2 Les tests comportementaux

Les tests comportementaux ont été réalisés au cours de cinq journées consécutives (figure 18, page suivante). Au cours de ces cinq journées, cinq types d'essais distincts d'essais sont réalisés : l'essai pilote, l'essai test, l'essai enquête, l'essai inversé et l'essai témoin. La mémoire spatiale à long terme est testée au cours des trois premiers jours. Puis, la flexibilité des animaux ainsi que la mémoire associative sont testées au cours des journées 4 et 5, respectivement. Nous allons à présent détailler le déroulement et les objectifs de chacun de ces tests

### II-4-2-1 L'essai pilote

Cet essai est réalisé une seule fois pour chaque souris au début de la tâche de mémorisation à long terme. Il consiste en une nage d'une durée de trente secondes sans aucune plateforme présente dans le tank. Il possède comme objectif de déterminer si la souris testée a une prédisposition à nager dans une région spécifique de la piscine. Le cas échéant, l'animal est éliminé du groupe et ne participe pas aux essais ultérieurs.



**Figure 18** : Organisation de la tâche de la mémoire à long terme (d'après Brim et al., 2013)

La tâche de mémorisation à long terme est réalisée au cours de 3 journées consécutives. Le premier jour, un essai pilote est d'abord mis en place, afin de tester si les animaux ont ou non une prédisposition à aller dans une zone particulière de la piscine. Puis, 2 séries de 4 essais tests sont réalisées, séparées par une heure d'intervalle. Un temps de pause de 60 secondes minimum est respecté entre deux essais tests. A la fin de la journée, un essai enquête est également réalisé, afin de déterminer si l'animal trouvait la plateforme par chance ou par mémoire véritable. Les jours 2 et 3 sont identiques au jour 1, à l'exception de l'essai pilote, qui n'est plus réalisé. Le jour 4, deux séries de 4 essais inversés séparés par une heure de pause et se déroulant de manière similaire aux essais tests est mise en place pour tester la flexibilité des animaux. De même que pour les tâches de mémorisation à long terme, un essai enquête est également réalisé à la fin. Le jour suivant, 6 essais témoins sont réalisés, afin de tester la capacité des animaux à réaliser les tâches de mémorisation.

### II-4-2-2 Les essais tests

Ils se déroulent durant 3 journées consécutives. Chaque journée consiste en deux sessions de quatre essais, séparées par une heure d'intervalle. Au cours de chaque test, les souris nagent à partir de points d'entrée distincts entre chaque essai (Nord-Est ; Nord-Ouest ; Sud-Est). L'ordre des points d'entrée change également entre deux sessions de quatre essais. En revanche, la plateforme reste toujours située dans le quadrant sud-est, comme présenté dans la figure 19, page suivante. Les souris nagent pendant un maximum de soixante secondes. A la fin des soixante secondes, si l'animal ne trouve pas la plateforme, il est mené à celle-ci. Puis, l'animal est laissé sur la plateforme durant 30 secondes afin de mémoriser les indices spatiaux présents autour de la pièce. A l'intérieur d'une session de quatre essais tests, un temps de pause minimum de 60 secondes est respecté entre deux temps de nage consécutifs.

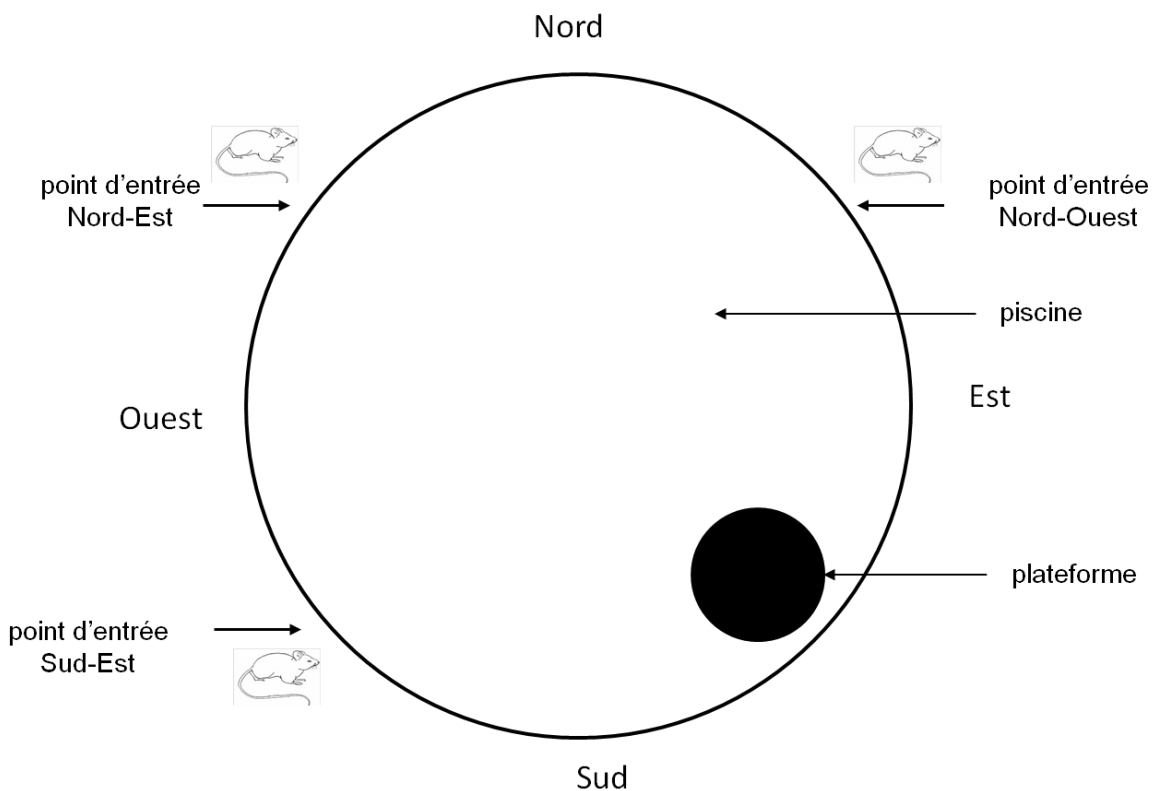


Figure 19 : Illustration du déroulement des essais tests

Au cours de chaque essai test, l'animal est placé aléatoirement dans l'un des 3 points d'entrée (Nord-Est ; Sud-Est ; Nord-Ouest). La tâche consiste à trouver la plateforme échappatoire durant 60 secondes de nage. Si l'animal ne trouve pas la plateforme à la fin des 60 secondes, il est mené à celle-ci. Puis, l'animal est laissé sur la plateforme durant 30 secondes afin de mémoriser les indices spatiaux présents autour de la pièce.



### II-4-2-3 L'essai enquête

A la fin de chaque journée, les souris participent à un essai enquête. Cet essai vise à déterminer si l'animal trouvait la plateforme par chance ou par mémoire véritable : une souris qui sait bien où se situe la plateforme la cherchera à l'endroit où elle est supposée se trouver (figure 20-A). A l'inverse, un animal qui ne connaît pas réellement la position théorique de la plateforme nagera en cercles concentriques autour de la piscine, sans jamais croiser la position de la plateforme (figure 20-B). L'essai consiste en 30 secondes de nage, sans plateforme. A la fin des trente secondes, la plateforme est remontée à la position initiale et l'animal doit la trouver dans les quinze secondes suivantes. De manière similaire aux essais tests, si la souris ne trouve pas la plateforme, elle est menée à celle-ci. A la fin de l'essai, l'animal est placé durant 30 secondes sur la plateforme afin de mémoriser les indices spatiaux présents dans la pièce.

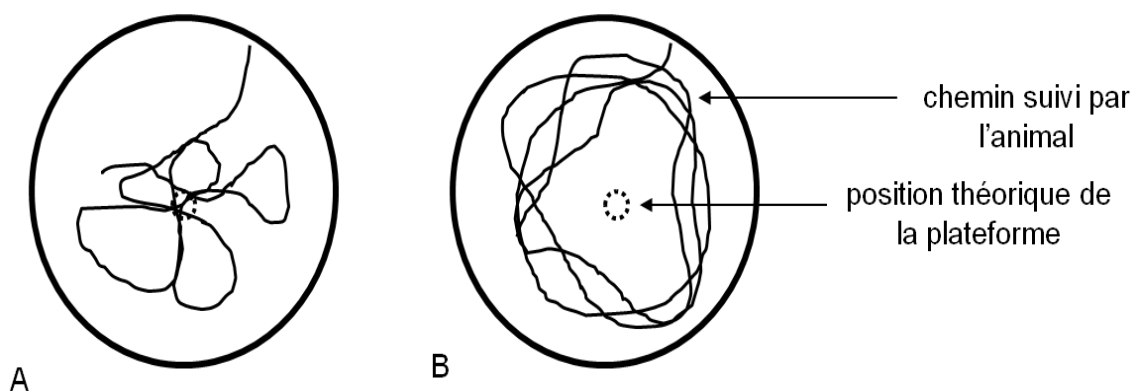


Figure 20 : Exemples de trajets suivis par les rongeurs lors des essais enquêtes (*d'après* Gallagher *et al.*, 1993).

Ces essais visent à déterminer si l'animal trouvait la plateforme par chance ou par mémoire véritable. Un animal qui sait où se trouve la plateforme nagera à l'endroit où elle est supposée se trouver (A). A l'inverse, un animal qui ne sait pas où se trouve la plateforme nagera en cercles concentriques autour de la piscine (B).

#### II-4-2-4 Les essais inversés

Ils possèdent comme objectif de tester la flexibilité de mémorisation de chaque animal, leur aptitude d'adaptation face à un changement de la position de la plateforme. Cette dernière, qui se trouvait dans la position sud-est est déplacée en position nord-ouest. L'adaptabilité des animaux face à cette nouvelle position est alors mesurée. Les indices spatiaux situés dans la pièce restent strictement identiques. Les essais se déroulent au cours de la quatrième journée, et s'organisent de manière similaire aux essais tests : 2 sessions de 4 essais consécutifs, séparées par une heure de d'intervalle. Un temps de pause de 60 secondes au moins entre chaque essai est respecté pour chaque animal. De plus, si l'animal ne trouve pas la plateforme à la fin des 60 secondes, il est mené à celle-ci et autorisé à rester dessus durant 30 secondes.

#### II-4-2-5 Les essais enquête inversés

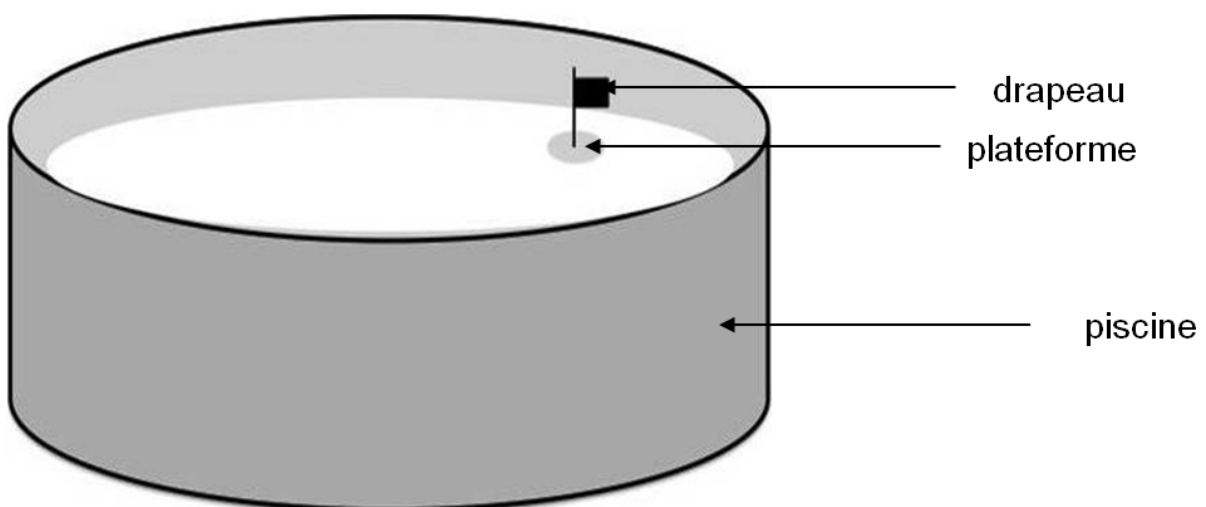
Ils se déroulent à la fin des 2 sessions de 4 essais d'essais inversés, et possède un objectif identique à celui des essais enquêtes mis en place les jours 1 à 3 : déterminer si l'animal trouvait la plateforme par chance ou par mémoire véritable. De même que pour les essais enquêtes, les essais enquêtes inversés consistent en 30 secondes de nage, sans plateforme. A la fin des trente secondes, la plateforme est remontée à la position initiale et l'animal doit la trouver dans les quinze secondes suivantes. Si la souris ne trouve pas la plateforme, elle est menée à celle-ci. A la fin de l'essai, l'animal est placé durant 30 secondes sur la plateforme afin de mémoriser les indices spatiaux présents dans la pièce.

#### II-4-2-6 Les essais témoins

Les essais témoins permettent de tester la mémoire associative des animaux: puisque les indices extérieurs sont retirés, la capacité des animaux à associer un drapeau situé sur la plateforme est testée. La mémoire associative constitue un genre de mémoire distinct de la mémoire spatiale, impliquant des régions cérébrales distinctes de l'hippocampe. De plus, le processus de vieillissement n'affecte pas

cette mémoire. Ces essais testent les capacités physiques et visuelles des animaux à réaliser les tâches de mémorisation et d'apprentissage.

La figure 21, présentée page suivante, illustre la piscine de Morris agencée pour les essais témoins. Réalisés à la fin de la cinquième journée, après les tâches de mémoire de référence (essais tests et essais inversés), ils permettent de tester l'acuité visuelle et l'habilité physique des animaux à réaliser les essais, ainsi que leur motivation pour aller sur la plateforme. Si une différence est observée entre les individus jeunes et les individus âgés, les résultats obtenus pour les essais de mémoire à long terme ne peuvent pas être interprétés. Pour des raisons pratiques, ces tests n'ont pas pu être réalisés au début de l'expérience. En effet, si ces essais de contrôle sont réalisés avant les tests de mémorisation et d'apprentissage, alors



les animaux peuvent associer la présence du drapeau avec la plateforme, ce qui peut engendrer par la suite des difficultés d'apprentissage dans les autres tests.

Figure 21: Illustration de la piscine de Morris lors des essais témoins

Les essais témoins testent la capacité physique des animaux à réaliser les tâches de mémorisation, et sont relatifs à la mémoire associative, une forme de mémoire distincte de la mémoire spatiale non affectée par le processus de vieillissement. Aucun indice spatial n'est disposé dans la pièce. La plateforme est signalée par un drapeau. Cinq positions sont testées pour la plateforme. Les animaux disposent de 60 secondes de nage pour trouver la plateforme. A la fin des 60 secondes, si l'animal n'a pas trouvé la plateforme, il est mené à celle-ci.

Six essais témoins consécutifs sont réalisés, un pour chaque position possible de la plateforme dans la piscine. Tous les animaux sont testés successivement sur une position de la plateforme. Dans l'ordre de réalisation des essais, les positions de la

plateforme ont été les suivantes : Nord-Est ; Sud-Est ; Sud-Ouest- Nord-Ouest ; Centre. Entre chaque essai, le point de départ de chaque animal varie de manière aléatoire. De même que pour les tâches de mémorisation, les animaux disposent de 60 secondes de nage pour trouver la plateforme. Lorsque les 60 secondes se sont écoulées, si l'animal n'a pas trouvé la plateforme, il est mené à celle-ci. Un temps minimal de 60 secondes est respecté entre deux temps de nage. Enfin, puisque cet essai n'a pas pour objectif de tester la mémorisation spatiale des animaux, ces derniers ne sont pas laissés sur la plateforme à la fin de chaque essai, mais directement déposés dans leurs cages.

## II-5 Enregistrement des données

Durant les essais, les chemins suivis par les souris ont été enregistrés par une caméra au dessus de la piscine grâce au logiciel « SMART » (San Diego Instruments, San Diego, Californie). La figure 22, présentée ci-dessous, montre une image de la piscine vue depuis la caméra. Elle montre également la plateforme utilisée pour les essais, dans la position sud-est. Dans l'objectif d'une meilleure visualisation des différents éléments, l'eau n'a pas été rendue trouble par la peinture.

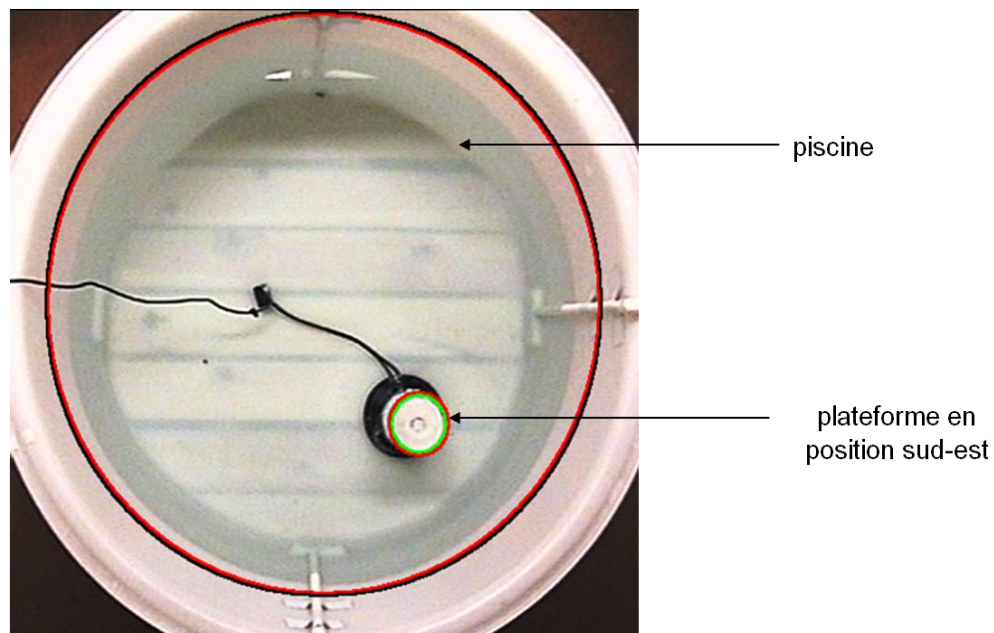


Figure 22: Vue de la piscine de Morris depuis la caméra (vue de dessus)

La piscine est remplie d'eau, normalement rendue opaque par de la peinture (non utilisée ici pour une meilleure visibilité). La plateforme est située en position sud-est, 1 cm en dessous de la surface de l'eau.

Le temps nécessaire pour chaque souris pour atteindre la plateforme est enregistré sur une feuille spécifique (voir annexe 2). Ces feuilles contiennent le numéro de chaque essai, l'identification de chaque animal, le temps nécessité par l'animal pour réaliser chaque essai, et l'heure à laquelle devait commencer la session suivante, après la pause d'une heure. La variable quantitative individuelle mesurée est donc le temps en secondes nécessaire à l'animal pour atteindre la plateforme.

## **II-6 Analyse des données**

Le temps (ou latence) nécessité par chaque souris durant chaque essai pour atteindre la plateforme constitue la variable reportée sur la feuille durant l'expérience. Ces données sont notées dans l'hypothétique cas d'un enregistrement vidéo non utilisable. Mais en réalité, ces données ne sont pas celles utilisées pour les analyses car elles dépendent de la vitesse à laquelle nage l'animal. Ainsi, un mauvais nageur peut se rappeler parfaitement où se trouve la plateforme, mais peut nécessiter d'avantage de temps pour l'atteindre. A l'inverse, une souris qui nage vite peut ne pas se souvenir de la localisation de la plateforme mais réaliser un meilleur temps pour l'atteindre.

Ainsi, le logiciel « SMART » analyse de nombreuses variables qui sont ensuite transformées afin de réaliser des analyses statistiques (tableau 3, page suivante). Nous présenterons par la suite le type de données générées par le logiciel ainsi que la transformation de ces données pour l'analyse statistique. Cette explication aidera à la compréhension de l'interprétation des résultats de l'expérience.

L'ordinateur crée automatiquement un fichier Excel composé des colonnes suivantes: numéro de la souris, le numéro de l'essai, la distance moyenne à la plateforme, la longueur du trajet, la vitesse moyenne, le nombre d'échantillons, et les coordonnées X et Y du point de départ.

## II-6-1 Un échantillon

Chaque 0,2 seconde, l'ordinateur mesure la distance entre la souris et le centre de la plateforme. Chaque calcul sera par la suite appelé « un échantillon ».

Tableau 3 : Extrait d'un fichier Excel généré après extraction des données fournies par le logiciel SMART

	Position de la plateforme	Coordonnées du centre de la plateforme	
Labyrinthe 710	Sud-est	Coor X	Coor Y
		104.88816	99.091357

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Numéro souris	Numéro de l'essai	Distance moyenne à la plateforme (en cm)	Longueur du trajet (en cm)	Vitesse moyenne (en cm/s)	Nombre d'échantillons	Proximité cumulée (en cm)	Coordonnées du point de départ Coor X Coor Y	
425	1	64.6	531.1	17.7	151	9754.6	110.76	27.956
426	2	69	563.3	18.8	151	10419	105.43	23.921
427	3	49.7	646.7	21.6	151	7504.7	115.52	33.72
428	4	45.7	631	21	151	6900.7	104.59	27.091
429	5	46.3	653.5	21.8	151	6991.3	111.32	33.432
430	6	62.7	669.1	22.3	151	9467.7	100.1	21.904
431	7	51.6	687.6	22.9	151	7791.6	106.83	26.515
432	8	57.5	547.2	18.2	151	8682.5	111.6	32.279

1	10	11	12	13	14	15
Numéro souris	Chemin idéal (en cm)	Proximité cumulée du chemin idéal (en cm)	Proximité cumulée corrigée (en cm)	Nombre d'échantillons du chemin idéal	Nombre d'échantillons corrigés	Moyenne de proximité corrigée (en cm)
425	69.14	1349.4	8465.6	20.17	130.83	64.7
426	60.2	66.82	9087.78	19.53	131.47	69.123
427	61.65	1752.273	8666.73	16.01	134.99	64.2
428	66.26	857.12	6647.58	14.27	136.73	48.62
429	59.8	510.154	6390.55	15.78	135.22	47.26
430	71.18	762.96	6228.334	13.72	137.28	45.37
431	66.86	1854.2	7613.5	15.96	135.04	56.38
432	61.31	708.25	7083.35	14.56	136.4	51.93

Pour chaque animal identifié (colonne1), et pour chaque essai (colonne 2), 6 paramètres sont mesurés pendant l'essai (colonnes 3 à 6 et 8-9) et 7 calculés après l'essai (colonnes 7 et 10 à 15). Les coordonnées X/Y de la plateforme sont connues au début de chaque essai. Seules les données des colonnes 12 (Distance cumulée corrigée) et 15 (Moyenne de proximité corrigée) sont utilisées pour l'analyse statistique.

### II-6-2 La proximité cumulée (colonne 7)

Encore appelée distance cumulée, elle correspond à l'addition de toutes les distances entre la souris et le centre de la plateforme, calculées toutes les 0,2 secondes (figure 23).

Sur cette figure, seules trois distances entre le trajet de l'animal et le centre de la plateforme ont été représentées. A partir de cet exemple, la distance cumulée correspond à l'addition des distances a, b et c. Il est important de comprendre que, plus petite est cette distance, meilleur est le résultat pour la souris.

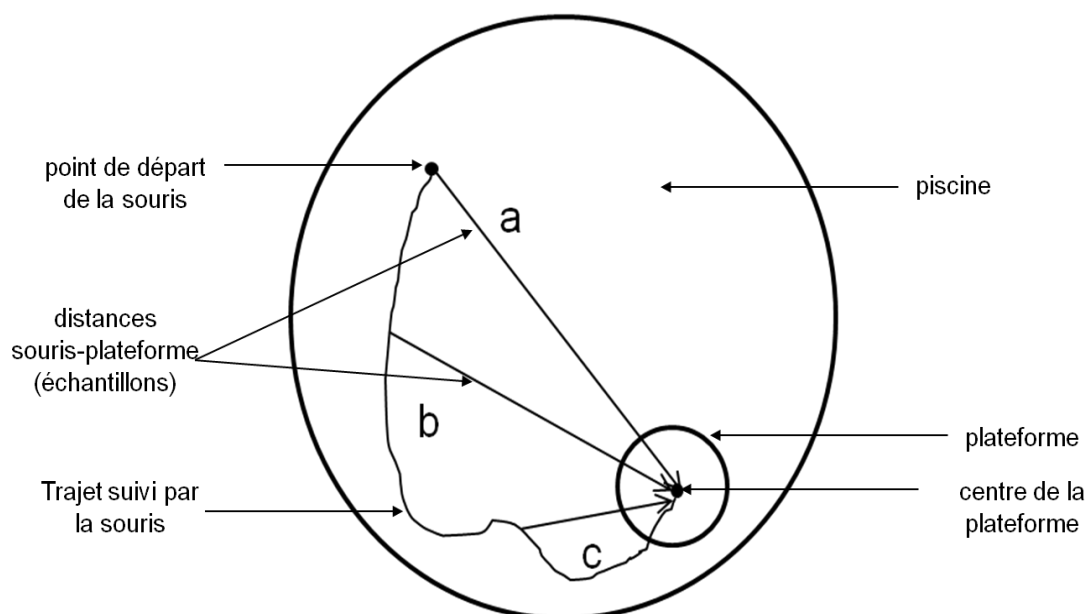


Figure 23 : Illustration du calcul de la distance cumulée

Les longueurs a ;b et c (échantillons) correspondent à la distance entre la souris et le centre de la plateforme. Ces distances sont calculées toutes les 0.2 secondes. La distance cumulée correspond alors à l'addition de toutes ces distances (sur le schéma :  $a+b+c$ ).

### II-6-3 La distance moyenne à la plateforme (colonne 3)

La distance moyenne correspond au ratio entre la distance cumulée et le nombre d'échantillons pour l'essai. Ainsi, la distance moyenne n'inclut pas directement dans son calcul le temps de l'essai. Mais sachant que chaque échantillon est généré toutes les 0,2 secondes, alors la durée de l'essai est bien incluse, indirectement. Cette donnée est fournie par le système d'enregistrement.

#### II-6-4 Coordonnées X et Y (colonnes 8 et 9)

*Coor X/Coor Y*: ce sont les coordonnées de la souris à son point de départ, au début de l'essai. Sachant que chaque souris ne commence pas exactement au même point, ces coordonnées sont variables entre chaque essai. Cette variabilité peut-être supprimée en utilisant une autre variable, nommée moyenne de proximité corrigée expliquée plus bas.

$X=104.88816$  and  $Y=99.091357$ : ce sont les coordonnées du centre de la plateforme, en position sud-est.

#### II-6-5 Le chemin idéal (colonne 10)

Ce chemin idéal correspond au chemin le plus court pour la souris pour aller depuis le point de départ jusqu'à la plateforme. La figure 24 illustre la piscine avec la plateforme dans la position sud-est. En utilisant le théorème de Pythagore, le chemin idéal correspond à : RACINE CARREE  $((Ax-Bx)^2 + (Ay-By)^2)$

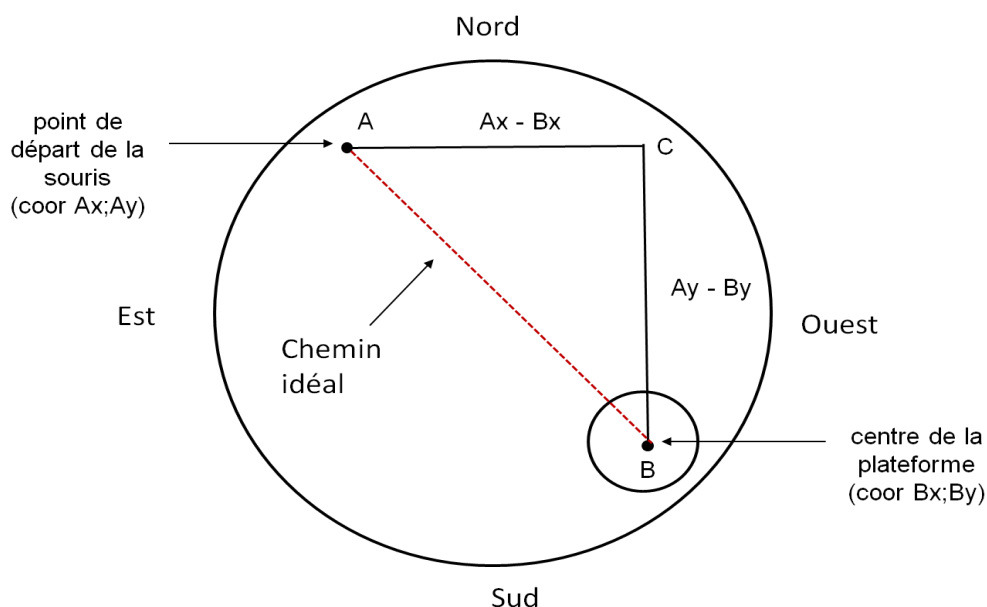


Figure 24: Méthode de calcul pour le chemin idéal

L'animal part du point A, de coordonnées  $Ax$  et  $Ay$ , et souhaite arriver au point B de coordonnées  $Bx$  et  $By$ . Le triangle ABC étant rectangle en C, le chemin le plus court pour la souris pour arriver à la plateforme est alors donné par application du théorème de Pythagore : RACINE CARREE  $((Ax-Bx)^2 + (Ay-By)^2)$



### II-6-6 La proximité cumulée du chemin idéal (colonne 11)

En utilisant la vitesse moyenne des souris pour chaque échantillon (colonne 5), et connaissant le chemin idéal, le logiciel a calculé, toutes les 0.2 secondes, la distance entre la souris et le centre de la plateforme, si cette dernière suivait le chemin idéal. Cette distance correspond à une donnée similaire à la distance cumulée, mais en suivant le plus court chemin possible. La figure 25, présentée ci-dessous, illustre le calcul de cette distance. La flèche représente le chemin idéal, et les segments des échantillons de calculs (ici seuls trois échantillons ont été représentés). Pour plus de clarté dans l'illustration, il a été laissé sous-entendu que la distance représentée par chaque lettre (a', b', c'), correspond au chemin entre le début de chaque segment et le centre de la plateforme. A partir de cet exemple, la distance cumulée corrigée correspond ainsi à la somme cumulée de a', b' et c'.

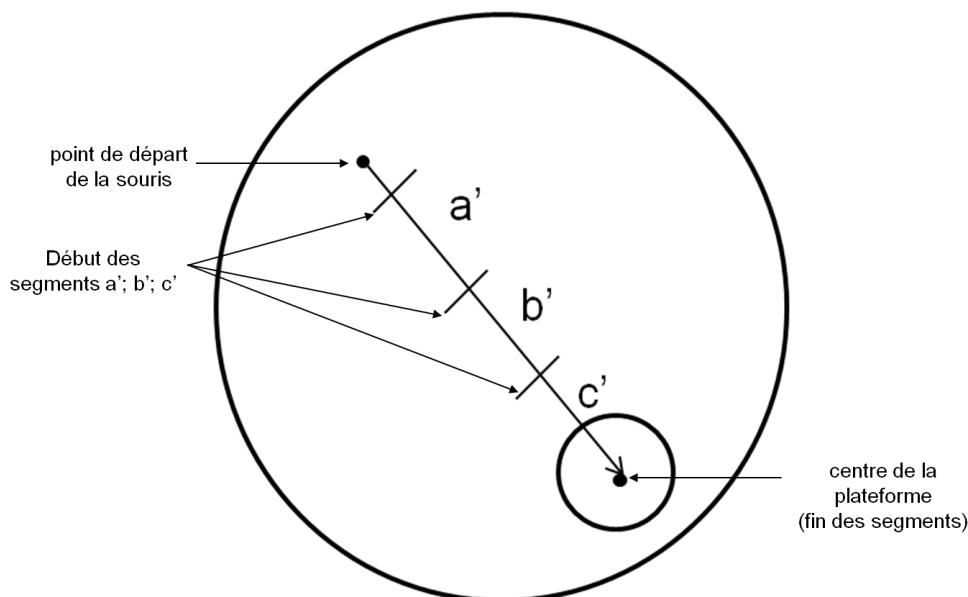


Figure 25: Illustration du calcul de la distance cumulée du chemin idéal

A partir du chemin idéal et la vitesse de déplacement de la souris, l'ordinateur calcule chaque 0.2 seconde la distance – théorique – entre l'animal et le centre de la plateforme (segments a' ; b' ; c'). La distance cumulée du chemin idéal correspond à l'addition de toutes ces distances (ici : a' + b' +c').

### II-6-7 La proximité cumulée corrigée (colonne 12)

Elle est calculée en soustrayant la distance cumulée à la distance cumulée du chemin idéal. Elle est le reflet indirect de la distance supplémentaire parcourue en plus par la souris, par rapport au chemin idéal. Cette donnée est utilisée pour l'analyse statistique. Elle correspond à celle présentée dans les graphiques de résultats.

#### II-6-8 Les échantillons du chemin idéal (colonne 13)

Ceci correspond au nombre d'échantillons pour la distance cumulée du chemin idéal.

#### II-6-9 Les échantillons corrigés (colonne 14)

Cette donnée a été obtenue en prenant le nombre d'échantillons dans les essais (colonne 6) et en soustrayant le nombre d'échantillons dans le chemin idéal (colonne 14). Ceci corrige le nombre d'échantillons total pour les échantillons du chemin idéal.

#### II-6-10 La proximité moyenne corrigée (colonne 15)

Elle correspond à la seconde donnée utilisée pour l'analyse statistique. Elle représente la distance moyenne entre la souris et le centre de la plateforme durant l'essai, corrigé par le chemin idéal. Tout comme la distance moyenne, elle correspond au ratio entre la distance cumulée corrigée (colonne 12) et le nombre d'échantillons corrigés (colonne 14).

### **III- Résultats**

Les données ont été analysées par une Analyse de Variance (ANOVA) à 2 facteurs (âge et traitement) réalisée avec le logiciel Statview. Les trois couleurs utilisées dans les graphiques correspondent aux trois groupes présentés précédemment : véhicule (noir), vecteur contrôle (bleu) et vecteur GluN2B (orange).

#### **III-1 La tâche de mémoire à long terme**

Les graphiques représentés par la figures 26, page suivante, montrent les performances des souris âgées d'une part (26-A), et jeunes d'autre part (26-B). L'axe des abscisses représente les 6 séries de quatre essais tests réalisés les jours 1, 2 et 3 (deux séries de quatre essais tests par jour). Chaque point correspond ainsi à la moyenne de quatre essais.

Les performances du groupe vecteur GluN2B des animaux âgés ont été meilleures le premier jour (26-A) de 20%. Ensuite, leurs performances ont stagné lors du deuxième et du troisième groupe d'essais. Les souris vecteur GluN2B ont finalement obtenu des performances moins bonnes de 30% que les animaux témoins (groupes véhicule et vecteur contrôle) lors du second jour d'essais (bloc 4).

Concernant les animaux jeunes, la figure montre que le groupe véhicule a obtenu des performances significativement moins bonnes que les animaux des autres groupes lors du cinquième bloc d'essais (26-B).

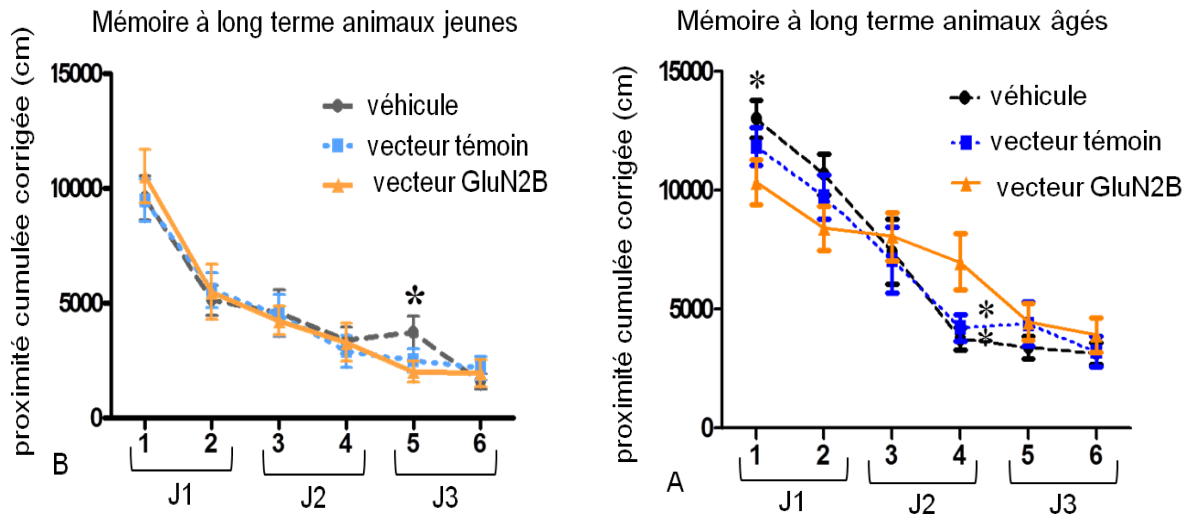


Figure 26 : Proximité cumulée pour les animaux âgés (A) et jeunes (B)

Les 6 points de l'axe des ordonnées représentent, dans l'ordre chronologique, les 6 séries de 4 essais tests réalisées les jours 1 (J1), 2 (J2) et 3 (J3). Chaque point correspond ainsi à la moyenne des performances de tous les animaux d'un même groupe pour les quatre essais tests. L'axe des ordonnées représente la proximité cumulée (en cm) des animaux pour chaque série de quatre blocs d'essais. Plus petite est cette valeur, meilleure est la performance. Le groupe vecteur GluN2B des animaux âgés a réalisé de meilleures performances que les deux groupes témoins seulement le premier jour (26-A). Le groupe véhicule des animaux jeunes a réalisé de moins bonnes performances que les deux autres groupes de troisième jour d'essais (26-B).

### III-2 Les essais pilote et enquêtes

Une tendance pour le groupe véhicule des animaux âgés à réaliser de meilleures performances que les deux groupes d'animaux témoins (véhicule et vecteur-contrôle) a pu être observée, mais les résultats n'ont pas été significatifs (27-A). Aucune différence n'a été observée pour les animaux jeunes (27-B).

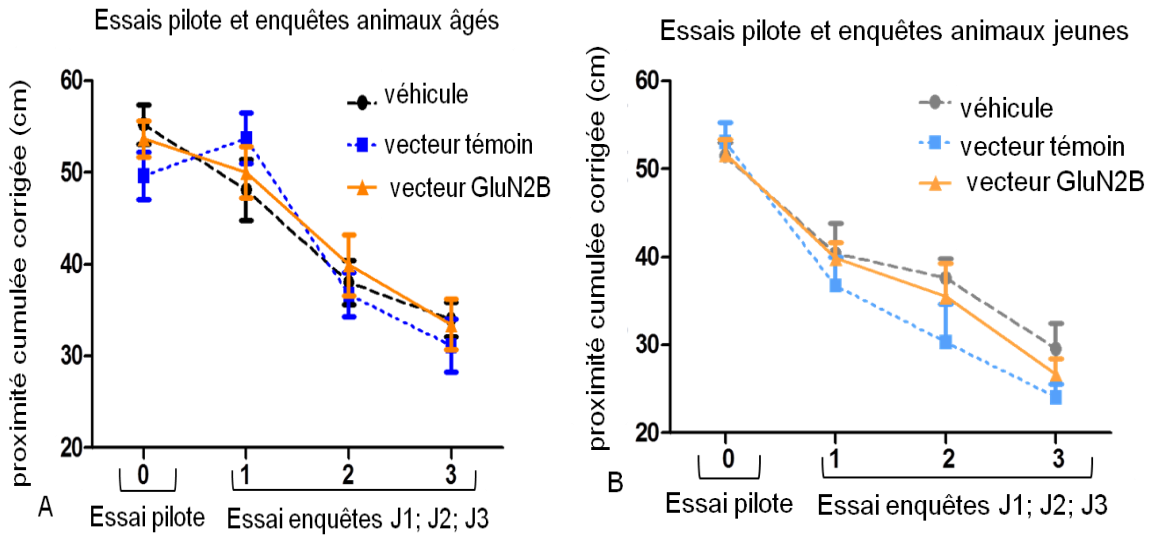


Figure 27 : Essais pilote et enquêtes pour les animaux âgés (A) et jeunes (B)

Les 4 points de l'axe des abscisses correspondent, dans l'ordre chronologique, à l'essai pilote (0) et aux 3 essais enquêtes (1 à 3) réalisés à la fin de chaque journée d'essais tests. L'axe des ordonnées représente la proximité moyenne (en cm) des animaux pour chaque essai. Plus petite est cette valeur, et meilleure est la performance.

### III-3 Les essais inversés

Aucun effet significatif du traitement ne peut être observé : le traitement n'a permis de mettre en évidence des performances ni meilleures ni moins bonnes dans chaque catégorie d'âge (28-A et 28-B).

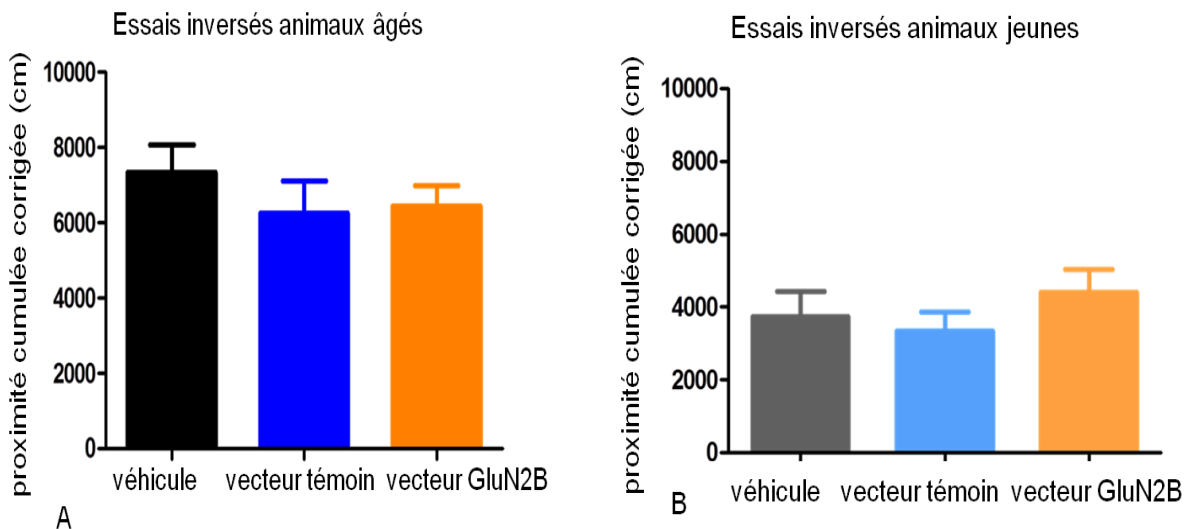


Figure 28 : Essais inversés pour les animaux âgés (A) et jeunes (B)

Les performances pour chaque groupe d'animaux correspondent à la moyenne des quatre essais inversés réalisés le jour 4. La variable mesurée est la proximité cumulée (en cm). Plus petite est cette valeur, et meilleure est cette performance.

### III-4 Les essais témoins

Aucune différence significative entre les groupes n'a pu être observée (figures 29-A et 29-B).

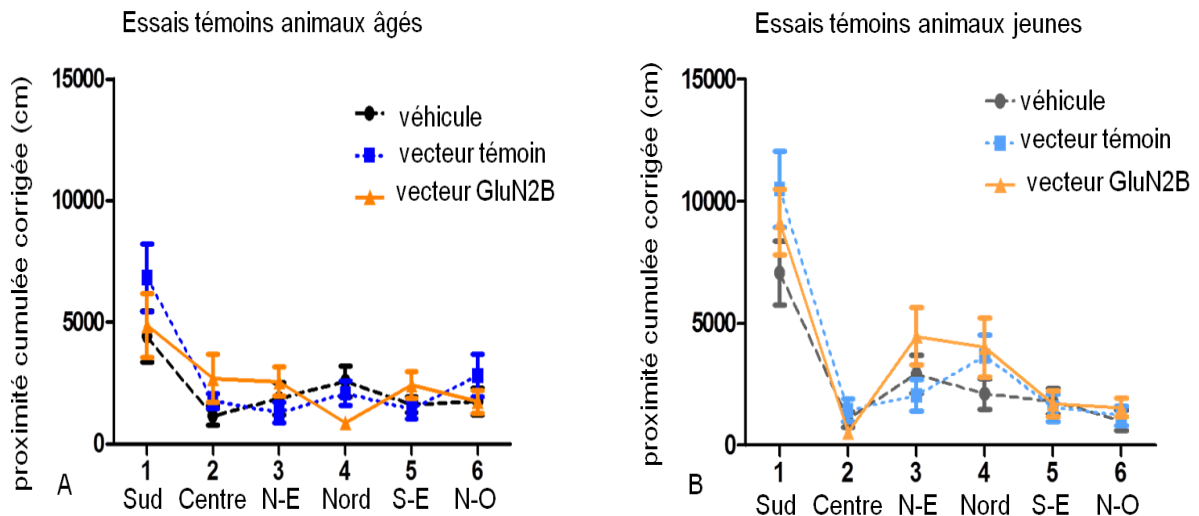


Figure 29 : Essais témoins pour les animaux âgés (A) et jeunes (B)

Les essais se déroulent le quatrième jour. Tous les animaux de chaque groupe sont testés sur une même position de plateforme, avant que celle-ci soit changée pour la position suivante. Six positions de plateforme ont été testées, dans l'ordre : Sud ; Centre ; Nord-Est (N-E) ; Nord ; Sud-Est (S-E) ; Nord-Ouest (N-O).

## IV- Discussion

Les résultats de cette étude sont en faveur d'un effet bénéfique de la sur-régulation de la sous-unité GluN2B dans l'hippocampe chez les individus âgés sur la mémorisation et l'apprentissage. Le premier jour des tests, le traitement a permis une amélioration d'environ 20% des performances de mémorisation et d'apprentissage des individus âgés. Le deuxième jour, la sur-régulation a entraîné une dégradation des performances d'environ 30%. Ces résultats ont été par la suite confirmés par les travaux de Brenna Brim (Brim *et al.*, 2013), qui a en effet comparé les performances des souris âgées par rapport à celles des souris jeunes. Ceci permet d'évaluer le taux d'amélioration des individus âgés, par rapport à des animaux dont les performances de mémorisation ne devraient pas être altérées. Le premier jour, les résultats publiés indiquent que les animaux âgés injectés avec le vecteur GluN2B ont réalisé des performances de mémorisation spatiale à long terme similaires à celles

des animaux jeunes témoins, et meilleures que les animaux âgés non traités. Les jours 2 et 3, les animaux âgés traités ont réalisé des performances inférieures à celles des animaux jeunes témoins, et une tendance à une diminution des performances par rapport à celles des animaux âgés non traités.

Des études ont montré que le cortex frontal joue également un rôle important dans la mémorisation et l'apprentissage, notamment dans les tâches de mémorisation spatiale à long terme (Brim *et al.*, 2013). Les effets d'une sur-régulation de la sous-unité GluN2B du récepteur au NMDA dans le cortex frontal sur les performances de mémorisation et d'apprentissage ont également été étudiés. Les animaux âgés injectés avec le vecteur GluN2B ont montré le jour 2 de meilleures performances que les animaux âgés témoins, et des performances comparables à celles des animaux jeunes non traités.

Les animaux injectés avec le vecteur GluN2B ont donc montré une amélioration des performances de mémorisation et d'apprentissage à des instants différents selon que la protéine GluN2B soit surexprimée dans l'hippocampe (amélioration le jour 1) ou dans le cortex frontal (amélioration le jour 2). A la lumière de ces résultats, les auteurs concluent que les récepteurs au NMDA présents dans les neurones de l'hippocampe améliorent l'apprentissage rapide (acquisition de la mémoire) et dans les neurones du lobe frontal l'apprentissage tardif (consolidation de la mémoire).

Tout comme les travaux de Brenna Brim publiés par la suite (Brim *et al.*, 2013), aucune différence significative n'a pu être mise en évidence dans les tâches de flexibilité, ni aucune tâche impliquant les animaux jeunes. Les résultats préliminaires présentés montrent certes une baisse des performances des animaux jeunes véhicule lors du jour 3 dans les tests de mémorisation spatiale, mais aucune justification ni résultat ultérieur n'a permis de fournir une explication à cette observation. Ces résultats sont surprenants : l'hippocampe, le récepteur au NMDA ainsi que la sous-unité GluN2B sont importants pour la flexibilité, et augmenter l'expression de la sous-unité GluN2B dans le cerveau participe à améliorer la mémoire spatiale à court terme (Brim *et al.*, 2013). Nous pouvons suggérer que la surexpression la sous-unité GluN2B n'était pas suffisamment importante pour

améliorer les performances de mémorisation spatiale chez les animaux jeunes d'une part, et celles de flexibilité chez les animaux âgés d'autre part.

Pour des études ultérieures, il serait intéressant d'explorer les effets d'une sur-régulation de la sous-unité GluN2B sur les performances de mémorisation et d'apprentissage à la fois dans les régions de l'hippocampe et du cortex frontal. A la vue des résultats publiés, nous pourrions attendre une amélioration des performances sur l'ensemble de la durée des tests : les apprentissages rapide et tardif seraient alors sollicités chez les mêmes individus. De plus, la non significativité des tâches de flexibilité reste surprenante : il serait intéressant d'augmenter d'avantage la surexpression de la sous-unité GluN2B dans les régions cérébrales concernées, puisque l'expression insuffisante de cette protéine chez les souris traitées constitue une piste pour expliquer ces résultats.

Les études montrent que les effets délétères du vieillissement sur la mémorisation et l'apprentissage peuvent être inversés par une surrégulation de la sous-unité GluN2B au niveau de régions cérébrales ciblées (Tang *et al.*, 1999 ; Cao *et al.*, 2007 ; Brim *et al.*, 2013) De tels résultats ouvrent de grandes perspectives thérapeutiques des maladies neurodégénératives pour les années à venir. Il restera par la suite à déterminer les effets potentiellement néfastes d'une telle potentialisation des performances de mémorisation et d'apprentissage chez les individus âgés.

L'intérêt du récepteur au NMDA dans la mémorisation et l'apprentissage au sein de nombreuses régions cérébrales, notamment l'hippocampe et le cortex frontal a largement été démontré. Mais la baisse d'expression de ce récepteur ne constitue pas la seule hypothèse possible pour expliquer les déclin cognitifs liés à l'âge: les récepteurs au NMDA chez les animaux âgés ne possèderaient pas la même efficacité de fonctionnement que ceux présents chez les animaux jeunes (Magnusson, 2010). Une question importante est de déterminer les rôles exacts joués par les différentes sous-unités du récepteur au NMDA dans les déclin cognitifs. En particulier, de récentes études révèlent que des souris KO pour la sous-unité GluN3A montrent des performances de mémorisation et d'apprentissage augmentées à l'âge adulte (Mohamad *et al.*, 2013). Le rôle de l'environnement

(stress, environnement social) dans la baisse de synthèse et de fonctionnalité du récepteur au NMDA chez les individus âgés reste également à déterminer.

Les sous-unités du récepteur au NMDA ont constitué une cible essentielle de recherche pour des thérapies des troubles de la mémorisation et de l'apprentissage chez les individus âgés. D'autres pistes plus récentes restent également à exploiter : il est en effet plus récemment apparu que des changements épigénétiques tels que la baisse de la méthylation de l'ADN et de l'acétylation des histones interviennent également dans la baisse des performances de mémorisation et d'apprentissage (Adwan and Zawia, 2013). De tels changements semblent impliqués dans l'apparition des troubles associés à la maladie d'Alzheimer. Les inhibiteurs des histones déacéthylases, enzymes responsables de la baisse d'acétylation des histones, améliorent la mémoire spatiale chez la souris (Rudenko and Tsai, 2013), constituant ainsi des pistes thérapeutiques intéressantes.

L'exposition d'individus à des facteurs extérieurs lors de phases critiques du développement cérébral constitue également une piste de compréhension de la physiopathologie des maladies neurodégénératives. Il a ainsi été montré que le stress chronique chez de jeunes rats induit des changements durables dans l'architecture de l'hippocampe, associés à des baisses de performances à l'âge adulte dans la Piscine de Morris (Eiland and Romeo, 2012). Certains polluants cibleraient particulièrement les cellules en cours de remaniement épigénétique (Barouki, 2013): les cellules neuronales fœtales et celles de la petite enfance seraient alors particulièrement vulnérables à ces polluants « épigénotoxiques », capables d'induire des changements visibles uniquement à l'âge adulte.





## Conclusion

Les troubles liés à la mémorisation et l'apprentissage apparaissent parmi les premiers signes cognitifs chez les individus âgés. La compréhension des mécanismes physiologiques de la mémoire, ainsi que la recherche de thérapeutiques capables d'inverser les effets délétères des troubles cognitifs liés à l'âge constituent des axes de recherche d'intérêt dans les pays occidentaux. Les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer constituent en effet des problèmes de santé publique majeurs dans ces régions du globe.

Ce travail préliminaire s'est attaché à étudier les effets d'une sur-régulation de la sous-unité GluN2B dans l'hippocampe de souris sur la mémorisation et l'apprentissage. Les résultats obtenus, confirmés par une étude publiée ultérieurement, sont en faveur d'un effet bénéfique d'une telle sur-régulation sur la mémorisation à long terme des souris séniles. Cette étude ouvre des perspectives thérapeutiques pour les personnes atteintes de troubles neurodégénératifs.

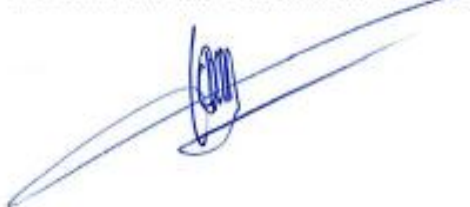
Ces trente dernières années, des avancées majeures ont permis une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires expliquant le stockage de l'information à long terme. Ces avancées ont été suivies de découvertes prometteuses offrant des perspectives thérapeutiques aux individus atteints de troubles neurodégénératifs. L'apparition récente de l'épigénétique a ouvert la voie à de nouvelles pistes de recherche, qui demeurent encore à explorer. La compréhension de l'altération du microenvironnement chromosomique à la suite d'expositions uniques ou répétées de facteurs extérieurs durant les stades précoces du développement de l'individu permettra de mieux comprendre encore la physiopathologie de ces démences pour proposer de nouveaux traitements.

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

**En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire**

Je soussignée, Martine **KOLF-CLAUW**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **LAFaix Olivier** intitulée « implication du récepteur au NMDA dans le vieillissement, l'apprentissage et la mémorisation : Approche expérimentale par sur-régulation de la sous-unité GluN2B du récepteur du NMDA dans l'hippocampe de souris » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 27 mai 2013  
Professeure Martine **KOLF-CLAUW**  
Enseignant chercheur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

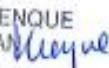


Vu :  
Le Directeur de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
Professeur Alain **MILON**



Vu :  
Le Président du jury :  
Professeur Christian **VIRENQUE**

**SAMU 31**  
Professeur Ch. **VIRENQUE**  
Hôpital PURPAN  
TSA 40031  
31059 TOULOUSE CEDEX 9



Vu et autorisation de l'impression :  
Le Président de l'Université  
Paul Sabatier  
Professeur Bertrand **MONTHUBERT**  
Par délégation, le Vice Président du CEVU  
Arnaud **LE PADELLEC**



Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.

# Annexe 1: Feuille utilisée pour l'anesthésie des souris en vue de la procédure de chirurgie stéréotaxique

## Stereotaxic Surgical Data Sheet

1

Date: 6/28/2010

Animal ID: \_\_\_\_\_

Study: **vglun2b ro drug prefrontal grp4**

Purpose: glun2b anatagonist study

Pump contents or injection solution (circle one):

Anesthesia:	<u>Isoflurane</u>	Isoflurane	Oxygen
Isoflurane induction chamber	4 %	1	L / minute
Isoflurane nose cone	1.5-2.25 %	1	L / minute
Isoflurane in stereotaxic apparatus	1.5-2.25 %	1	L / minute

Induction time: \_\_\_\_\_

Gas off time: \_\_\_\_\_

Total time gas was used: \_\_\_\_\_

### Stereotaxic Coordinates

	Suture and Skull Measurements	Designated Alterations Suture/Skull Measurements	Mouse Coordinates
left	Ventral Orbital - bilateral injections		
AP	Bregma _____	-.17	_____
ML	Longitudinal _____	+.1	_____
DV	Skull or Dura _____	-.25	_____
	Volume injected <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">3uL</span>		
right			
AP	Bregma _____	-.17	_____
ML	Longitudinal _____	-.1	_____
DV	Skull or Dura _____	-.25	_____
	Volume injected <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">3uL</span>		

### Temperature Measurements (every 10 minutes)

Initial Temp _____	Time: _____	Temp: _____	Time: _____
Temp: _____	Time: _____	Temp: _____	Time: _____
Temp: _____	Time: _____	Temp: _____	Time: _____
Temp: _____	Time: _____	Temp: _____	Time: _____

Post Check : (time and behavior) \_\_\_\_\_

Post Check : (time and behavior) \_\_\_\_\_

Mice given acetaminophen 24 hours pre-surgery (240 mg in 200 ml water)

Mice given acetaminophen plus codeine phosphate (10 ml stock + 190 ml water) oral solution post-

Mice given acetaminophen (240 mg in 200 ml water) given for remainder of study

Notes:

# Annexe 2: Feuille utilisée pour les tests comportementaux

SHORT TERM WATER MAZE - 1ST PLACE DAY

DATE 8-10-10

SHORT-TERM DAY 1

Threshold 74

Room temp 70.5

Erosion 2

water temp 18°C

Drive c:\program files\Panlab\SMART/

Experiment Folder MAZE710

PLATFORM POSITION SE  
MAZE FILE: se.zon  
MAZE FOLDER: \_\_\_\_\_

Unmarked trials are 60 seconds long  
Intertrial intervals are 2 minutes long except where noted

PLACE TRIALS

Mouse # 1	Probe trial 0 File # latency	Place Trial 1 File # latency	Place Trial 2 File # latency	Place Trial 3 File # latency	Place Trial 4 File # latency	Predicted Start time for 5th trial add 1 hour
422CM 1BLUE	NE-PROBE0 1 30 sec.	NW 60 sec 14 60	SW 60 16 60	NW 60 18 60	NE 60 20 60	9:48
	Actual Start Time	Place trial 5	Place Trial 6	Place Trial 7	Place Trial 8	Predicted Start time Actual for probe Start add 1 hour Time
	9:53	SW 61 60	NE 63 60	NW 65 52	SW 67 60	11:05 11:08 110
						Probe Trial 1 File # latency
						NE-PROBE1 30 sec.
						**Change Max time back to 60 seconds
Mouse # 2	Probe trial 0 File # latency	Place Trial 1 File # latency	Place Trial 2 File # latency	Place Trial 3 File # latency	Place Trial 4 File # latency	Predicted Start time for 5th trial add 1 hour
425CR 2BLUE	NE-PROBE0 2 30 sec.	NW 60 sec 15 60	SW 60 17 60	NW 60 19 60	NE 60 21 60	9:59
	Actual Start Time	Place trial 5	Place Trial 6	Place Trial 7	Place Trial 8	Predicted Start time Actual for probe Start add 1 hour Time
	9:55	SW 62 60	NE 64 51	NW 66 60	SW 68 60	11:07 11:09 111
						Probe Trial 1 File # latency
						NE-PROBE1 30 sec.
						**Change Max time back to 60 seconds
Mouse # 3	Probe trial 0 File # latency	Place Trial 1 File # latency	Place Trial 2 File # latency	Place Trial 3 File # latency	Place Trial 4 File # latency	Predicted Start time for 5th trial add 1 hour
428SM 3BLUE	NE-PROBE0 3 30 sec.	NW 60 sec 22 9	SW 53 24 53	NW 13 26 13	NE 20 28 20	9:59
	Actual Start Time	Place trial 5	Place Trial 6	Place Trial 7	Place Trial 8	Predicted Start time Actual for probe Start add 1 hour Time
	10:08	SW 69 16	NE 71 11	NW 73 17	SW 75 60	11:16 11:16 112
						Probe Trial 1 File # latency
						NE-PROBE1 30 sec.
						**Change Max time back to 60 seconds
Mouse # 4	Probe trial 0 File # latency	Place Trial 1 File # latency	Place Trial 2 File # latency	Place Trial 3 File # latency	Place Trial 4 File # latency	Predicted Start time for 5th trial add 1 hour
432SR 4BLUE	NE-PROBE0 4 30 sec.	NW 60 sec 23 36	SW 59 25 59	NW 15 27 15	NE 20 29 20	10:59
	Actual Start Time	Place trial 5	Place Trial 6	Place Trial 7	Place Trial 8	Predicted Start time Actual for probe Start add 1 hour Time
	10:09	SW 70 14	NE 72 60	NW 74 29	SW 76 29	11:18 11:18 113
						Probe Trial 1 File # latency
						NE-PROBE1 30 sec.
						**Change Max time back to 60 seconds
Mouse # 5	Probe trial 0 File # latency	Place Trial 1 File # latency	Place Trial 2 File # latency	Place Trial 3 File # latency	Place Trial 4 File # latency	Predicted Start time for 5th trial add 1 hour
426CR 1GREEN	NE-PROBE0 5 30 sec.	NW 60 sec 30 19	SW 60 32 60	NW 26 34 26	NE 20 36 20	10:09
	Actual Start Time	Place trial 5	Place Trial 6	Place Trial 7	Place Trial 8	Predicted Start time Actual for probe Start add 1 hour Time
	10:19	SW 77 22	NE 79 59	NW 81 60	SW 83 60	11:29 11:31 114
						Probe Trial 1 File # latency
						NE-PROBE1 30 sec.
						**Change Max time back to 60 seconds
Mouse # 6	Probe trial 0 File # latency	Place Trial 1 File # latency	Place Trial 2 File # latency	Place Trial 3 File # latency	Place Trial 4 File # latency	Predicted Start time for 5th trial add 1 hour
429SM 2GREEN	NE-PROBE0 6 30 sec.	NW 60 sec 31 60	SW 19 33 19	NW 25 35 25	NE 60 37 60	10:11
	Actual Start Time	Place trial 5	Place Trial 6	Place Trial 7	Place Trial 8	Predicted Start time Actual for probe Start add 1 hour Time
	10:20	SW 78 60	NE 80 60	NW 82 16	SW 84 60	11:31 11:33 115
						Probe Trial 1 File # latency
						NE-PROBE1 30 sec.
						**Change Max time back to 60 seconds

## Bibliographie

- Adwan, L., Zawia, N.H., 2013. Epigenetics: A novel therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacol. Ther.*
- ANSES, 2013. Evaluation des risques du bisphenol A (BPA) pour la santé humaine.
- Barouki, R., 2013. La toxicité par programmation, une priorité de santé publique. *Env. Risque Sante* 12, 4–6.
- Bliss, T.V.P., Lømo, T., 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232, 331–356.
- Bouhsira, E., 2007. Interaction Zinc-Glutamate dans l'hippocampe dorsal de la souris [WWW Document]. URL <http://oatao.univ-toulouse.fr/1805/> (accessed 11.18.12).
- Brim, B.L., Haskell, R., Awedikian, R., Ellinwood, N.M., Jin, L., Kumar, A., Foster, T.C., Magnusson, K.R., 2013. Memory in aged mice is rescued by enhanced expression of the GluN2B subunit of the NMDA receptor. *Behav. Brain Res.* 238, 211–226.
- Cao, X., Cui, Z., Feng, R., Tang, Y.-P., Qin, Z., Mei, B., Tsien, J.Z., 2007. Maintenance of superior learning and memory function in NR2B transgenic mice during ageing. *Eur. J. Neurosci.* 25, 1815–1822.
- Chance, P., 1999. Thorndike's Puzzle Boxes And The Origins Of The Experimental Analysis Of Behavior. *J. Exp. Anal. Behav.* 72, 433.
- Chapouthier, G., 2006. *Biologie de la mémoire*. Odile Jacob.
- Collingridge, G.L., Olsen, R.W., Peters, J., Spedding, M., 2009. A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* 56, 2–5.
- Cooke, S.F., 2006. Plasticity in the human central nervous system. *Brain* 129, 1659–1673.
- Cull-Candy, S., Brickley, S., Farrant, M., 2001. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 327–335.
- D'Hooge, R., De Deyn, P.P., 2001. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev.* 36, 60–90.
- Dahl, C.D., Logothetis, N.K., Hoffman, K.L., 2007. Individuation and holistic processing of faces in rhesus monkeys. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 274, 2069–2076.
- Dudchenko, P.A., 2004. An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 699–709.
- Eiland, L., Romeo, R.D., 2012. Stress and the developing adolescent brain. *Neuroscience*.

- Ekstrom, A.D., Kahana, M.J., Caplan, J.B., Fields, T.A., Isham, E.A., Newman, E.L., Fried, I., 2003. Cellular networks underlying human spatial navigation. *Nature* 425, 184–188.
- Gallagher, M., Burwell, R., Burchinal, M., 1993. Severity of spatial learning impairment in aging: development of a learning index for performance in the Morris Water Maze. *Behav. Neurosci.* 107, 618–626.
- Hebb, D. O. *Organization of behavior*. New York: Wiley, 1949, pp. 335, \$4.00, 1950. . *J. Clin. Psychol.* 6, 307–307.
- Hodges, H., 1996. Maze procedures: the radial-arm and water maze compared. *Cogn. Brain Res.* 3, 167–181.
- Ito, R., Canselier, M., 2010. Amphetamine exposure selectively enhances hippocampus-dependent spatial learning and attenuates amygdala-dependent cue learning. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 35, 1440–1452.
- Kandel, E., Schwartz, J., Jessell, T., 2000. *Principles of Neural Science*, Fourth Edition. McGraw-Hill Companies, Incorporated.
- Kennard, J.A., Woodruff-Pak, D.S., 2011. Age Sensitivity of Behavioral Tests and Brain Substrates of Normal Aging in Mice. *Front. Aging Neurosci.* 3.
- Laval, J., Sautet, J., Degryse, A., Mogicato, G., 2012. *Formation de neuro-anatomie, neuro-histologie et neuro-chirurgie des animaux de laboratoire; applications à la neurobiologie expérimentale*
- Lundbeck Institute, n.d. NMDA receptor showing different subtypes [WWW Document]. [CNS Forum. URL http://www.cnsforum.com/imagebank/item/hrl\\_rcpt\\_sys\\_NMDA/default.aspx](http://www.cnsforum.com/imagebank/item/hrl_rcpt_sys_NMDA/default.aspx) (accessed 1.28.13).
- Lynch, M.A., 2004. Long-Term Potentiation and Memory. *Physiol. Rev.* 84, 87–136.
- Magnusson, 2010. Selective vulnerabilities of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors during brain aging. *Front. Aging Neurosci.*
- Magnusson, K.R., 2000. Declines in mRNA Expression of Different Subunits May Account for Differential Effects of Aging on Agonist and Antagonist Binding to the NMDA Receptor. *J. Neurosci.* 20, 1666–1674.
- Mauriès, J.-P., n.d. *Comportement des animax de compagnie* [WWW Document]. *Comport. Animaux Comagnie*. URL <http://www.vetopsy.fr/> (accessed 1.28.13).
- Meunier, J.-M., Shvaloff, A., 1996. *Techniques en neurosciences*. Masson.
- Mohamad, O., Song, M., Wei, L., Yu, S.P., 2013. Regulatory roles of the NMDA receptor GluN3A subunit in locomotion, pain perception and cognitive functions in adult mice. *J. Physiol.* 591, 149–168.
- Morris, R., 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11, 47–60.

- O'Keefe, J., Dostrovsky, J., 1971. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* 34, 171–175.
- O'Keefe, J., Nadel, L., 1978. *The Hippocampus as a cognitive map*, Oxford University Press. ed. Oxford.
- Olton, D.S., Samuelson, R.J., 1976. Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process.* 2, 97–116.
- Patil, S.S., Sunyer, B., Höger, H., Lubec, G., 2009. Evaluation of spatial memory of C57BL/6J and CD1 mice in the Barnes maze, the Multiple T-maze and in the Morris water maze. *Behav. Brain Res.* 198, 58–68.
- Paul, C.-M., Magda, G., Abel, S., 2009. Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behav. Brain Res.* 203, 151–164.
- Pavlov, I.P., Anrep, G.V., 1927. *Conditioned Reflexes*. Courier Dover Publications.
- Paxinos, G., Watson, C., 2007. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press.
- Richelle, M., 1977. *B. F. Skinner: ou, Le péril behavioriste*. Editions Mardaga.
- Rosen, G., Williams, A., Capra, J., Connolly, M., Cruz, B., Lu, L., Airey, D., Kulkarni, K., Williams, R., 2000. *The Mouse Brain Library* [WWW Document]. Mouse Brain Libr. URL <http://www.mbl.org>
- Rosenzweig, E.S., Barnes, C.A., 2003. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog. Neurobiol.* 69, 143–179.
- Rudenko, A., Tsai, L.-H., 2013. Epigenetic regulation in memory and cognitive disorders. *Neuroscience*.
- Sautet, J., 2012. *Anatomie du système nerveux - Encéphale*.
- Sharma, S., Rakoczy, S., Brown-Borg, H., 2010. Assessment of spatial memory in mice. *Life Sci.* 87, 521–536.
- Skinner, B.F., 1938. *The behavior of organisms: an experimental analysis*. D. Appleton-Century Company, incorporated.
- Squire, L.R., Kandel, E.R., 2002. *La mémoire: De l'esprit aux molécules*. De Boeck Supérieur.
- Tang, Y.P., Shimizu, E., Dube, G.R., Rampon, C., Kerchner, G.A., Zhuo, M., Liu, G., Tsien, J.Z., 1999. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 401, 63–69.
- Thorndike, E.L. (Edward L., Bruce, D., 1911. *Animal Intelligence: Experimental Studies*. Transaction Publishers.
- Tolman, E.C., Honzic, C.H., 1930. "Insight" in rats. *Univ. Calif. Publ. Psychol.* 4, 215–232.



- Xu, X., Tian, D., Hong, X., Chen, L., Xie, L., 2011. Sex-specific influence of exposure to bisphenol-A between adolescence and young adulthood on mouse behaviors. *Neuropharmacology* 61, 565–573.
- Xu, X., Zhang, J., Wang, Y., Ye, Y., Luo, Q., 2010. Perinatal exposure to bisphenol-A impairs learning-memory by concomitant down-regulation of N-methyl-D-aspartate receptors of hippocampus in male offspring mice. *Horm. Behav.* 58, 326–333.
- Xu, X.-H., Wang, Y.-M., Zhang, J., Luo, Q.-Q., Ye, Y.-P., Ruan, Q., 2010. Perinatal exposure to bisphenol-A changes N-methyl-D-aspartate receptor expression in the hippocampus of male rat offspring. *Environ. Toxicol. Chem. SETAC* 29, 176–181.
- Zhao, X., Rosenke, R., Kronemann, D., Brim, B., Das, S.R., Dunah, A.W., Magnusson, K.R., 2009. The Effects of Aging on NMDA Receptor Subunits in the Synaptic Membrane and Relationships to Long-term Spatial Memory. *Neuroscience* 162, 933–945.
- Zheng, J.-F., Patil, S.S., Chen, W.-Q., An, W., He, J.-Q., Höger, H., Lubec, G., 2009. Hippocampal Protein Levels Related to Spatial Memory Are Different in the Barnes Maze and in the Multiple T-Maze. *J. Proteome Res.* 8, 4479–4486.

Toulouse, 2013

**NOM**: LAFAIX

**PRENOM**: OLIVIER

**TITRE**: Implication du récepteur au NMDA dans le vieillissement, l'apprentissage et la mémorisation : approche expérimentale par sur-régulation de la sous-unité GluN2B du récepteur au NMDA dans l'hippocampe de souris

**RESUME** : Chez l'Homme, la mémoire est l'une des premières fonctions cognitives à être affectée par le vieillissement, induisant l'apparition de troubles neurodégénératifs. L'identification des causes de déclin des performances de mémorisation est nécessaire pour la recherche de thérapies. La première partie rappelle les diverses formes de mémoires, leur classification, les bases anatomiques et cellulaires du stockage mnésique, les méthodes d'exploration de la mémoire chez les rongeurs et la neurobiologie du récepteur au NMDA. L'étude expérimentale compare les effets d'une sur-régulation de la sous-unité GluN2B du récepteur au NMDA sur la mémorisation et l'apprentissage de souris jeunes (3 mois) et âgées (21-26 mois) à l'aide de la Piscine de Morris : chez les animaux jeunes, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les animaux traités et les animaux témoins. Chez les animaux âgés, la sur-régulation a entraîné le premier jour une amélioration des performances d'environ 20%, et le deuxième jour une dégradation de celles-ci d'environ 30%. Cette étude suggère un effet bénéfique d'une augmentation de la sous-unité GluN2B sur les performances de mémorisation et d'apprentissage chez les souris séniles.

**MOTS CLEFS** : Apprentissage – Mémorisation – Hippocampe – Récepteur au NMDA – Rongeurs – Labyrinthes – Piscine de Morris

---

**ENGLISH TITLE**: Role of NMDA receptor in ageing, learning and memory: an experimental study of an up-regulation of NMDA receptor GluN2B subunit in rodent hippocampus neurons

**ABSTRACT**: In humans, memory is one of the first cognitive functions to be impaired by ageing, inducing neurodegenerative deficits. Identification of age-related memory decline causes is necessary for therapeutic research. In the first part of the study, the different forms of memory, their classification, the cellular and anatomical basis of memory storage, the methods of memory exploration in rodents and the neurobiology of NMDA receptor are reported. The experimental study compares the effects of an up-regulation of GluN2B NMDA receptor on learning and memory in young (3-months) and aged (21-26 months) mice in the Morris Water Maze: young control and treated animals showed no significant difference. Aged up-regulated animals showed improved performances by 20% the first day, and reduced by 30% the second day. This study suggests a beneficial effect of an up-regulation of GluN2B subunit on learning and memory performances in aged mice.

**KEY WORDS**: Learning – Memory – Hippocampus – NMDA receptor – Rodents – Mazes – Morris Water Maze