

Université de Montréal

Mécanismes traductionnels impliqués dans la potentialisation à long-terme de la transmission synaptique des cellules pyramidales de l'hippocampe chez le rongeur.

Par
Delphine Gobert

Département de Physiologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures
En vue de l'obtention du grade *philosophiae doctor*
en Sciences Neurologiques

Mars, 2009

© Delphine Gobert, 2009

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Cette thèse intitulée :

Mécanismes traductionnels impliqués dans la potentialisation à long-terme de la transmission synaptique des cellules pyramidales de l'hippocampe chez le rongeur.

Présentée par :
Delphine Gobert

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Richard Robitaille, président-rapporteur
Dr. Jean-Claude Lacaille, directeur de recherche
Dr. Wayne Sossin, co-directeur de recherche
Dr. Jannic Boehm, membre du jury
Dr. Anne McKinney, examinateur externe
Dr. Vincent Castellucci, représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS EN FRANÇAIS

La mémoire et l'apprentissage sont des phénomènes complexes dont on ne comprend pas encore bien l'origine au niveau cellulaire et moléculaire. Cependant, il est largement admis que des changements plus simples au niveau synaptique, tels que la potentialisation à long-terme (long-term potentiation ou LTP) pourraient constituer la base cellulaire de la formation des nouveaux souvenirs. Ces mécanismes sont couramment étudiés au niveau de l'hippocampe, une région du lobe temporal reconnue comme étant nécessaire à la formation de la mémoire explicite chez les mammifères. La LTP est classiquement définie comme un renforcement durable de l'efficacité de connexions synaptiques ayant été stimulées de façon répétée et soutenue. De plus, on peut distinguer deux formes de LTP: une LTP précoce, qui repose sur la modification de protéines déjà formées, et une LTP tardive, qui requiert, elle, la synthèse de nouvelles protéines. Cependant, bien que de nombreuses études se soient intéressées au rôle de la traduction pour la maintenance de la LTP, les mécanismes couplant l'activité synaptique à la machinerie de synthèse protéique, de même que l'identité des protéines requises sont encore peu connus.

Dans cette optique, cette thèse de doctorat s'est intéressée aux interactions entre l'activité synaptique et la régulation de la traduction. Il est par ailleurs reconnu que la régulation de la traduction des ARNm eukaryotiques se fait principalement au niveau de l'initiation. Nous avons donc étudié la modulation de deux voies majeures pour la régulation de la traduction au cours de la LTP : la voie GCN2/eIF2 α et la voie mTOR.

Ainsi, nos travaux ont tout d'abord démontré que la régulation de la voie GCN2/eIF2 α et de la formation du complexe ternaire sont nécessaires à la maintenance de la plasticité synaptique et de la mémoire à long-terme. En effet, l'activité synaptique régule la phosphorylation de GCN2 et d'eIF2 α , ce qui permet de moduler les niveaux du facteur de transcription ATF4. Celui-ci régule à son tour la transcription CREB-dépendante et permet ainsi de contrôler les niveaux d'expression génique et la synthèse de protéines nécessaires pour la stabilisation à long-terme des modifications synaptiques.

De plus, la régulation de la voie mTOR et de la traduction spécifique des ARNm 5'TOP semble également jouer un rôle important pour la plasticité synaptique à long-terme. La modulation de cette cascade par l'activité synaptique augmente en effet spécifiquement la capacité de traduction des synapses activées, ce qui leur permet de traduire et d'incorporer les protéines nécessaires au renforcement durable des synapses.

De telles recherches permettront sans doute de mieux comprendre la régulation des mécanismes traductionnels par l'activité synaptique, ainsi que leur importance pour la maintenance de la potentialisation à long-terme et de la mémoire à long-terme.

MOTS-CLÉS : hippocampe, plasticité synaptique, potentialisation à long-terme (LTP), traduction, GCN2, eIF2 α , mTOR, ARNm 5'TOP.

RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS EN ANGLAIS

Learning and memory are complex processes that are not yet fully understood at the cellular and molecular levels. It is however widely accepted that persistent modifications of synaptic connections, like long-term potentiation (LTP), could be responsible for the encoding of new memories. These changes are frequently studied in the hippocampus, a temporal lobe structure that has been shown to be necessary for explicit memory in mammals. Long-term potentiation is classically defined as a persistent and stable modification of synaptic connections that have been repeatedly stimulated. Moreover, there are two different phases of LTP: an early-LTP, that only requires the modification of pre-existing proteins, and a late-LTP, that requires the synthesis of new proteins. Numerous studies have evaluated the role of new protein synthesis for the persistence of LTP, however, the mechanisms coupling synaptic activity and the translational machinery, as well as the identity of the necessary proteins are not yet fully understood.

From this perspective, this Ph.D. thesis has evaluated the interactions between synaptic activity and the regulation of translation. As it is widely accepted that the regulation of translation is primarily at the initiation level, we therefore investigated the modulation of two major pathways for the regulation of translation during LTP: the GCN2/eIF2 α pathway and the mTOR pathway.

First, our studies have shown that the regulation of the GCN2/eIF2 α pathway and of the ternary complex formation are necessary for the long-term maintenance of synaptic plasticity and memory. Indeed, synaptic activity regulates GCN2 and eIF2 α phosphorylation, which modulates the transcription factor ATF4 levels. ATF4 in turn regulates CREB-dependent transcription, and therefore controls the levels of genetic expression and the synthesis of new proteins necessary for the long-term stabilization of synaptic modifications.

Moreover, the regulation of the mTOR pathway and of the specific translation of 5'TOP mRNAs likely also play an important role for long-term synaptic plasticity. Modulation of this cascade by synaptic activity specifically increases the translational capacity of

activated synapses, allowing them to translate and incorporate the necessary proteins for the lasting reinforcement of synapses.

These studies will undoubtedly help to understand the regulation of translational mechanisms by synaptic activity and their significance for the maintenance of long-term potentiation and long-term memory.

KEY WORDS: hippocampus, synaptic plasticity, long-term potentiation (LTP), translation, GCN2, eIF2 α , mTOR, ARNm 5'TOP.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS EN FRANÇAIS	I
RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS EN ANGLAIS.....	III
TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES FIGURES.....	XII
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	XV
REMERCIEMENTS.....	XX
AVANT-PROPOS.....	1
CHAPITRE I. INTRODUCTION	3
1.1. L'APPRENTISSAGE ET LA MÉMOIRE	3
1.1.1. La mémoire explicite ou déclarative.....	4
1.1.2. La mémoire implicite ou non-déclarative.....	5
1.1.3. La mémoire : une fonction globale ou localisée?.....	6
1.1.3.1. L'importance du lobe temporal médian pour la mémoire explicite et le cas du patient H.M.....	8
1.1.3.2. L'importance d'autres structures pour la mémoire implicite.....	9
1.1.4. L'importance particulière de l'hippocampe	10
1.1.4.1. Le cas du patient R.B.	10
1.1.4.2. Les modèles expérimentaux	11
1.1.5. L'importance relative de l'hippocampe à travers le temps.....	11
1.2. L'ARCHITECTURE ET L'ORGANISATION FONCTIONNELLE DE L'HIPPOCAMPE.....	12
1.2.1. L'organisation anatomique.....	13
1.2.2. L'organisation cellulaire	14
1.2.2.1. Le gyrus dentelé	14
1.2.2.1.1. Les cellules granulaires du gyrus dentelé	14
1.2.2.1.2. Les autres cellules du gyrus dentelé.....	15
1.2.2.2. La corne d'Ammon.....	15
1.2.2.2.1. Les cellules pyramidales de la région CA3	17
1.2.2.2.2. Les cellules pyramidales de la région CA1	18
1.2.2.2.3. Les autres cellules de la corne d'Ammon.....	18

1.2.3. Les circuits de base : le réseau trisynaptique excitateur.....	18
1.2.3.1. La voie perforante : du cortex entorhinal au gyrus dentelé	19
1.2.3.2. La voie des fibres moussues : du gyrus dentelé au CA3	20
1.2.3.3. La voie des collatérales de Schaffer : du CA3 au CA1	21
1.2.3.4. Les projections de la région CA1 : du CA1 au subiculum et au cortex entorhinal.....	21
1.2.4. L'importance particulière de la région CA1.....	22
1.3. LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE À LONG-TERME.....	23
1.3.1. La synapse comme point de communication entre les neurones	23
1.3.2. La potentialisation à long-terme	26
1.3.2.1. Les propriétés de base de la potentialisation à long-terme	26
1.3.2.2. L'induction de la LTP et l'importance des récepteurs NMDA et de l'influx calcique.....	28
1.3.2.3. Les mécanismes de la phase précoce de la potentialisation à long-terme....	30
1.3.2.3.1. La génération d'AMPC et la phosphorylation de PKA	30
1.3.2.3.2. La phosphorylation de CaMKII	31
1.3.2.3.3. La phosphorylation de PKC	33
1.3.2.3.4. L'augmentation de la libération de neurotransmetteurs.....	34
1.3.2.3.5. La phosphorylation des récepteurs AMPA.....	35
1.3.2.3.6. L'insertion de nouveaux récepteurs AMPA	36
1.3.2.4. Les mécanismes de la phase tardive de la potentialisation à long-terme.....	37
1.3.2.4.1. L'activation soutenue et la translocation au noyau de PKA, MAPK et CaMKIV.....	38
1.3.2.4.2. L'activation de la transcription.....	39
1.3.2.4.3. La traduction de nouvelles protéines	41
1.3.2.4.4. Le renforcement spécifique des synapses.....	42
1.3.2.4.4.1. <i>Le marquage synaptique</i>	<i>44</i>
1.3.2.4.4.2. <i>La traduction locale dans les dendrites</i>	<i>45</i>
1.3.2.4.4.3. <i>Le transport des ARNm aux dendrites.....</i>	<i>46</i>
1.3.2.4.5. Le remodelage des épines	48
1.3.3. Les autres formes de plasticité synaptique.....	49
1.3.3.1. La dépression à long-terme	49
1.3.3.1.1. La dépression NMDA-dépendante.....	50
1.3.3.1.2. La dépression mGluR-dépendante	50
1.3.3.1.3. La traduction de nouvelles protéines, un mécanisme commun.....	50
1.3.3.2. La dépotentialisation	51
1.4. LES MÉCANISMES TRADUCTIONNELS DE LA POTENTIALISATION À LONG-TERME	52
1.4.1. L'initiation de la traduction comme facteur limitant.....	52
1.4.2. La voie eIF2α	54
1.4.2.1. La kinase GCN2	55

1.4.2.2. Les autres kinases d'eIF2 α et GADD34.....	58
1.4.3. La voie mTOR.....	58
1.4.3.1. Les protéines 4E-BP	60
1.4.3.2. Les kinases S6K et la protéine ribosomale S6	60
1.4.3.3. Les ARNm 5'TOP.....	61
CHAPITRE II. BUT DE LA THÈSE	63
2.1. PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIF GÉNÉRAL.....	63
2.2. OBJECTIFS SPÉCIFIQUES.....	63
CHAPITRE III. PREMIÈRE SECTION DE RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX 66	
3.1. PRÉAMBULE ET RÉSUMÉ.....	66
3.2. ABSTRACT.....	67
3.3. INTRODUCTION	68
3.4. RESULTS.....	69
3.5. DISCUSSION.....	72
3.6. METHODS.....	74
3.6.1. Generation of transgenic mice by GCN2.KO4 targeting	74
3.6.2. In situ hybridization histochemistry	74
3.6.3. Immunoprecipitation, immunohistochemistry and western blotting	74
3.6.4. Electrophysiology	74
3.6.5. Fear conditioning.....	75
3.6.6. Morris water maze task.....	75
3.6.7. Polysome profile analysis and RT-PCR.....	76
3.6.8. Quantitative RT-PCR	76
3.7. ACKNOWLEDGEMENTS	76
3.8. REFERENCES	77
3.9. FIGURES AND LEGENDS.....	81
3.10. SUPPLEMENTARY INFORMATION	85
3.10.1. Results	85
3.10.2. Discussion	86
3.10.3. Methods.....	88
3.10.4. Supplementary figures and legends.....	90

3.10.5. Supplementary References.	96
--	----

CHAPITRE IV. DEUXIÈME SECTION DE RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX 98

4.1. PRÉAMBULE ET RÉSUMÉ.....	98
4.2. ABSTRACT.....	99
4.3. INTRODUCTION	100
4.4. RESULTS.....	101
4.4.1 Brain Morphology Is Not Altered in eIF2 α ^{+/S51A} Mice.....	101
4.4.2. Inhibition of eIF2 α Phosphorylation Leads to Enhancement of Synaptic Plasticity and Memory	102
4.4.3. Spatial Learning and Memory Are Enhanced in eIF2 α ^{+/S51A} Mice.....	103
4.4.4. Contextual and Auditory Fear Conditioning Are Enhanced in eIF2 α ^{+/S51A} Mice	103
4.4.5. Long-Term Taste Memory and Extinction Are Enhanced in eIF2 α ^{+/S51A} Mice	104
4.4.6. Increased eIF2 α Phosphorylation Leads to Impairment of Synaptic Plasticity and Memory.....	105
4.5. DISCUSSION.....	108
4.5.1. eIF2 α Phosphorylation Regulates Gene Expression-Dependent Synaptic Plasticity and Memory	108
4.5.2. eIF2 α Phosphorylation: A Molecular Switch for L-LTP and Memory Consolidation	109
4.5.3. Differences between <i>GCN2</i> ^{-/-} and eIF2 α ^{+/S51A} Mice.....	110
4.6. EXPERIMENTAL PROCEDURES	111
4.6.1. eIF2 α ^{+/S51A} Mice.....	111
4.6.2. Cell Culture and Sal003 Treatment.....	112
4.6.3. Immunohistochemistry and Western Blotting.....	112
4.6.4. Electrophysiology	112
4.6.5. Contextual and Auditory Fear Conditioning.....	113
4.6.6. Morris Water Maze.....	113
4.6.7. Conditioned Taste Aversion and Latent Inhibition	114
4.6.8. Cannulation and Sal003 Infusion.....	115
4.6.9. Polysome Profile Analysis and RT-PCR.....	116
4.7. ACKNOWLEDGMENTS	116

4.8. REFERENCES	116
4.9. FIGURES AND LEGENDS	122
4.10. SUPPLEMENTAL DATA	129

CHAPITRE V. TROISIÈME SECTION DE RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

.....	135
5.1. PRÉAMBULE ET RÉSUMÉ	135
5.2. ABSTRACT	136
5.3. INTRODUCTION	136
5.4. MATERIAL AND METHODS	138
5.4.1. Electrophysiology	138
5.4.2. Organotypic slice culture	138
5.4.3. Western Blotting	139
5.4.4. Constructs	140
5.4.5. HEK293 cells experiments	140
5.4.6. Transfection of hippocampal slice cultures	140
5.4.7. Confocal microscopy	141
5.4.8. Statistical analysis	141
5.5. RESULTS	141
5.5.1. Forskolin induces late-LTP in organotypic hippocampal slices	141
5.5.2. Forskolin increases the activity of several components of the mTOR pathway	142
5.5.3. Forskolin selectively activates a 5'TOP reporter via mTOR in HEK cells	143
5.5.4. Forskolin increases somatic 5'TOP mRNAs translation via mTOR in slice cultures	144
5.5.5. Forskolin increases dendritic 5'TOP mRNAs translation via mTOR, ERK and PI3K in slice cultures	145
5.5.6. Forskolin activates the mTOR pathway in an ERK and PI3K-dependent manner in slice cultures	147
5.6. DISCUSSION	148
5.6.1. Induction of late-LTP in hippocampal slice cultures	148
5.6.2. Interactions between cAMP, ERK, PI3K and mTOR pathways during late-LTP	148
5.6.3. Late-LTP is associated with the activation of downstream targets of mTOR ..	151

5.6.4. Late-LTP is associated with an increase in 5'TOP mRNAs translation	152
5.6.5. Up-regulation of the translational machinery during late-LTP	154
5.7. ACKNOWLEDGMENTS	155
5.8. REFERENCES	155
5.9. FIGURES AND LEGENDS	163
CHAPITRE VI. DISCUSSION	170
6.1. RAPPEL DE L'ÉTAT DE LA QUESTION ET DE L'OBJECTIF GÉNÉRAL	170
6.2. L'IMPORTANCE DE LA VOIE eIF2α ET DE LA FORMATION DU COMPLEXE TERNAIRE POUR LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE ET LA MÉMOIRE À LONG-TERME.....	171
6.2.1. L'activité synaptique module l'activation de la cascade GCN2/eIF2 α	171
6.2.2. L'activation de la cascade GCN2/eIF2 α est nécessaire à la maintenance de la phase tardive de la LTP et de la LTM.....	172
6.2.2.1. Implication dans la LTP	173
6.2.2.2. Implication dans la LTM.....	174
6.2.3. La modulation de la cascade GCN2/eIF2 α influence la traduction spécifique du facteur de transcription ATF4.....	175
6.2.4. La modulation de la traduction d'ATF4, via la cascade GCN2/eIF2 α , est nécessaire à la maintenance de la phase tardive de la LTP et de la LTM.....	177
6.2.5. La voie eIF2 α , un rôle atypique pour un facteur de traduction.....	178
6.2.6. Le chaînon manquant entre l'activité synaptique et la voie GCN2/eIF2 α	179
6.2.7. La dissociation de la LTP et de la LTD chez les souris GCN2 ^{-/-} , une piste de réflexion pour les protéines spécifiquement induites par la plasticité.....	180
6.2.8. L'existence d'un double seuil pour l'activation de la transcription et de la traduction.....	181
6.2.9. Les autres kinases d'eIF2 α et leurs rôles dans les neurones	185
6.3. L'IMPORTANCE DE LA VOIE mTOR ET DE LA TRADUCTION DES ARNm 5'TOP POUR LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE.....	187
6.3.1. L'activité synaptique module la voie mTOR et la traduction des ARNm 5'TOP	187
6.3.2. La modulation de la traduction des ARNm 5'TOP via la voie mTOR est spécifique.....	188
6.3.3. La modulation de la traduction des ARNm 5'TOP via la voie mTOR survient dans le compartiment dendritique	189

6.3.4. Le chaînon manquant entre l'activation de mTOR et la traduction des ARNm 5'TOP.....	190
6.3.5. La régulation de la traduction des ARNm 5'TOP durant la LTD	192
6.3.6. La participation des ARNm 5'TOP au marquage synaptique?.....	193
6.4. L'IMPORTANCE DE LA TRANSCRIPTION ET DE LA TRADUCTION POUR LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE : UN MODÈLE INTÉGRÉ	196
6.4.1. Le rôle absolu et relatif de la synthèse protéique pour le maintien de la plasticité synaptique à long-terme.....	199
6.4.2. La véritable identité des protéines requises pour le maintien de la plasticité synaptique à long-terme.....	200
6.5. LES LEÇONS DES ÉTUDES SUR LA POTENTIALISATION ET LA MÉMOIRE À LONG-TERME : CE QU'IL NE FAUT PAS OUBLIER	202
CHAPITRE VII. CONCLUSION	204
RÉFÉRENCES.....	205

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I. INTRODUCTION	3
Figure 1 : Les différents systèmes mémoriels.....	4
Figure 2 : L'organisation anatomique de l'hippocampe chez le rongeur.....	13
Figure 3 : L'organisation cellulaire du gyrus dentelé et de la corne d'Ammon	17
Figure 4 : La synapse chimique et les différents types de récepteurs au glutamate	25
Figure 5 : L'activation de PKA	31
Figure 6 : L'activation de CaMKII.....	32
Figure 7 : Les mécanismes de la phase précoce de la LTP.....	34
Figure 8 : Les mécanismes de la phase tardive de la LTP.....	39
Figure 9 : Le renforcement spécifique des synapses; 3 hypothèses	43
Figure 10 : Les 3 grandes étapes de l'initiation de la traduction	53
Figure 11 : La régulation d'eIF2 et la formation du complexe ternaire	55
Figure 12 : La ré-initiation de la traduction.....	57
Figure 13 : La voie mTOR et ses différents substrats.....	59
CHAPITRE III. PREMIÈRE SECTION DE RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX	66
Figure 1. Unusual properties of LTP induced in slices from <i>GCN2^{-/-}</i> mice.....	81
Figure 2. ATF4 mRNA translation is downregulated in <i>GCN2^{-/-}</i> mice	82
Figure 3. <i>GCN2^{-/-}</i> mice are impaired in contextual but not auditory fear conditioning	83
Figure 4. Long-term spatial memory of <i>GCN2^{-/-}</i> mice is enhanced after weak training but impaired after more intense training (in the Morris water maze).....	84
Figure S1. Generation and Characterization of the <i>GCN2^{-/-}</i> mice	90
Figure S2. Expression of GCN2 in adult brain	91
Figure S3. Lack of gross structural abnormalities in <i>GCN2^{-/-}</i> mice	92
Figure S4. Normal basal synaptic transmission in <i>GCN2^{-/-}</i> mice	93
Figure S5. Properties of LTP induced in slices from <i>GCN2^{-/-}</i> mice	94
Figure S6. LTD is normal in <i>GCN2^{-/-}</i> slices.....	95
Figure S7. L-LTP but not E-LTP-inducing protocols regulate GCN2 activity	96

CHAPITRE IV. DEUXIÈME SECTION DE RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX 98

Figure 1. Late-LTP Is Induced by Single or Multiple Tetanic Trains in Hippocampal Slices from eIF2 α ^{+S51A} Mice.....	122
Figure 2. Spatial Learning Is Enhanced in eIF2 α ^{+S51A} Mice.....	123
Figure 3. Enhanced Contextual and Auditory Fear Conditioning in eIF2 α ^{+S51A} Mice	124
Figure 4. Long-Term Taste Memory and Extinction Are Enhanced in eIF2 α ^{+S51A} Mice	125
Figure 5. An Inhibitor of eIF2 α Dephosphorylation, Sal003, Prevents the Induction of Hippocampal L-LTP in Slice from WT Mice but Not in Slices from <i>ATF4</i> ^{-/-} Mice..	126
Figure 6. Intrahippocampal Injection of Sal003 Impairs Contextual Memory.....	127
Figure 7. A model for Control of Long-Term Synaptic Plasticity and Memory by eIF2 α Phosphorylation	128
Figure S1. Brain structure is not altered but phosphorylation of eIF2 α is reduced in eIF2 α ^{+S51A} mice	129
Figure S2. Normal basal synaptic transmission in eIF2 α ^{+S51A} slices.....	130
Figure S3. Normal forskolin-induced L-LTP in eIF2 α ^{+S51A} slices.....	130
Figure S4. Short term memory is not altered in eIF2 α ^{+S51A} mice	131
Figure S5. eIF2 α ^{+S51A} mice react normally to sweet and bitter tastes	131
Figure S6. In WT slices, Sal003 did not affect basal transmission, E-LTP and the... maintenance of L-LTP	132
Figure S7. Schematic representation of the dorsal hippocampus at five different ... rostrocaudal planes.....	133
Figure S8. Sal003 impairs spatial long-term memory consolidation.....	134

CHAPITRE V. TROISIÈME SECTION DE RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

.....	135
Figure 1. Forskolin induces late-LTP in organotypic hippocampal slices.....	163
Figure 2. Forskolin increases the activity of several components of the mTOR pathway in hippocampal slices	164
Figure 3. Forskolin selectively activates a 5'TOP reporter via mTOR in HEK cells	165
Figure 4. Forskolin increases somatic 5'TOP mRNAs translation via mTOR in slice cultures	166

Figure 5. Forskolin increases dendritic 5'TOP mRNAs translation via mTOR, PI3K and ERK in slice cultures	166
Figure 6. Forskolin activates the mTOR pathway in PI3K- and ERK-dependent manner in slice cultures	167
Figure 7. A model for the up-regulation of 5'TOP mRNAs translation during late-LTP.....	168
CHAPITRE VI. DISCUSSION	170
Figure 14 : Effet du rolipram sur la potentialisation à long-terme	184
Figure 15 : Un modèle intégré.....	198

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

4E-BP	protéine de liaison au facteur eIF4E (<i>eIF4E binding protein</i>)
5'UTR	région non-codante de la partie 5' de l'ARNm (<i>5' untranslated region</i>)
5-HT	sérotonine
5'TOP	séquence 5' oligopyrimidine terminale (<i>5' terminal oligopyrimidine tract</i>)
AC	adénylate cyclase
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
AMPA	acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-1-4-isoxazole propionique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARNt	acide ribonucléique de transfert
ATF4	facteur activateur de la transcription 4 (<i>activating transcription factor 4</i>)
ATP	adénosine triphosphate
CA1	corne d'Ammon 1
CA3	corne d'Ammon 3
CaM	calmoduline
CaMKII	protéine kinase dépendante du calcium et de la calmoduline II (<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase II</i>)
CaMKIV	protéine kinase dépendante du calcium et de la calmoduline IV (<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV</i>)
CBP	protéine liant CREB (<i>CREB binding protein</i>)
CRE	élément de réponse à l'AMPc (<i>cAMP responsive element</i>)
CREB	protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc (<i>cAMP responsive element binding protein</i>)
DAG	diacylglycérol
EGTA	acide éthyl bis(oxyethylene-trinitrilo) tétraacétique
eIF2 α	facteur eukaryotique d'initiation 2 α (<i>eukaryotic initiation factor 2α</i>)
eIF4A	facteur eukaryotique d'initiation 4A (<i>eukaryotic initiation factor 4A</i>)
eIF4E	facteur eukaryotique d'initiation 4E (<i>eukaryotic initiation factor 4E</i>)
eIF4G	facteur eukaryotique d'initiation (<i>eukaryotic initiation factor 4G</i>)
GABA	acide γ -aminobutyrique
GADD34	phosphatase d'eIF2 α (<i>growth arrest and DNA damage-inducible protein 34</i>)

GCN2	kinase d'eIF2 α activée par la privation en acides aminés (<i>general control non-derepressible 2</i>)
GDP	guanosine diphosphate
Glu	glutamate
Gly	glycine
GTP	guanosine triphosphate
HRI	kinase d'eIF2 α activée par la déplétion de l'hème (<i>haem-regulated initiation factor 2α kinase</i>)
IP3	inositol triphosphate
L/M	<i>lacunosum/moleculare</i>
LTD	dépression à long-terme (<i>long-term depression</i>)
LTF	facilitation à long-terme (<i>long-term facilitation</i>)
LTM	mémoire à long-terme (<i>long-term memory</i>)
LTP	potentialisation à long-terme (<i>long-term potentiation</i>)
MAPK	protéine kinase activée par les mitogènes (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
mGluR	récepteur métabotrope au glutamate
mTOR	protéine kinase cible de la rapamycine (<i>mammalian target of rapamycin</i>)
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
O/A	<i>oriens/alveus</i>
ORF	cadre de lecture (<i>open reading frame</i>)
PERK	kinase d'eIF2 α activée par le stress du réticulum endoplasmique (<i>eIF2α kinase 3</i>)
PI3K	protéine kinase dépendante de l'inositol triphosphate (<i>phosphatidyl inositol-3-phosphate kinase</i>)
PKA	protéine kinase A (dépendante de l'AMPc)
PKC	protéine kinase C (dépendante du calcium et des phospholipides)
PKM ζ	protéine kinase M ζ
PKR	kinase d'eIF2 α activée par l'infection virale (<i>protein kinase-RNA regulated</i>)
PLC	phospholipase C
PP1	protéine phosphatase 1
PP2A	protéine phosphatase 2A
PP2B	protéine phosphatase 2B (calcineurine)

PS	synthèse protéique
S6	protéine ribosomale S6
S6K	protéine kinase S6K
Ser	résidu sérine
Thr	résidu thréonine
TORC	facteur transducteur de la régulation de l'activité de CREB (<i>transducer of regulated CREB activity</i>)
uORF	cadre de lecture supplémentaire (<i>upstream open reading frame</i>)

À Maeva...
... Où que tu sois.

*Entre
Ce que je pense,
Ce que je veux dire,
Ce que je crois dire,
Ce que je dis,
Ce que vous avez envie d'entendre,
Ce que vous entendez,
Ce que vous avez envie de comprendre,
Ce que vous comprenez
Il y a dix possibilités qu'on ait des difficultés à communiquer.
Mais essayons quand même...*

Bernard Werber, l'Encyclopédie du Savoir Relatif et Absolu, 1993.

The problem of neurology is to understand man himself

Wilder Penfield, 1965.

REMERCIEMENTS

Une liste de remerciements est sans doute bien peu de choses, surtout lorsqu'il s'agit de reconnaître le rôle des nombreuses personnes qui nous ont épaulé tout au long de ce travail fastidieux et de longue haleine qu'est la thèse de doctorat. Néanmoins, cette liste, qui sera je l'espère la plus exhaustive possible, est encore le meilleur moyen que j'ai trouvé pour vous exprimer à tous ma gratitude...

Je tiens donc tout d'abord à remercier tous les membres de mon jury, les Dr Richard Robitaille, Dr Jannic Boehm et Dr Vincent Castellucci de l'Université de Montréal, ainsi que le Dr Anne McKinney de l'Université McGill, pour avoir accepté de lire et d'examiner cette thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Dr Jean-Claude Lacaille, de l'Université de Montréal, et le Dr Wayne Sossin, de l'Université McGill, mes directeurs de recherche, pour m'avoir enseigné et guidé tout au long de mes études de doctorat en Sciences Neurologiques. De même, je tiens à remercier les Dr Luc DesGroseillers et Dr Vincent Castellucci de l'Université de Montréal, pour m'avoir parrainé au cours de mes études, ainsi que le département de Physiologie et le Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Central de l'Université de Montréal pour m'avoir accueilli et supporté tout au long de ma formation.

Je tiens également à remercier les Dr Mauro Costa-Mattioli et Dr Nahum Sonenberg, de l'Université McGill, pour m'avoir donné l'opportunité de participer à une collaboration interdisciplinaire des plus enrichissantes et des plus fructueuses.

Je tiens ensuite à remercier les Dr Patrice Congar, Dr France Morin, Dr Mounia Azzi, Dr Dominique Nouel, Dr Lisa Topolnik et Dr Isabel Laplante pour m'avoir initié et formé dans le laboratoire avec patience, ainsi que tous mes collègues de laboratoire pour leur support et leur aide à divers stades de ma formation. Je tiens tout particulièrement à remercier Julie Pepin et Catherine Bourgeois, du laboratoire du Dr Jean-Claude Lacaille, ainsi que Linda Huang et Frédérique Badeaux, du laboratoire du Dr Luc DesGroseillers, pour leur précieux soutien technique.

Merci à Alexandre Serrano et à Mathieu Bourdeau, pour le soutien informatique, et à Geneviève Lebeau, pour le soutien émotionnel et pour avoir rêvé avec moi à d'autres mondes pendant les interminables expériences de LTP. Merci également à Aude Panatier, pour avoir accepté de relire ma thèse et conseillé tout au long de son écriture. Merci à Baptiste Lacoste, pour avoir partagé avec moi les affres successives des examens de maîtrise et de doctorat, du prédoc et de la thèse.

Finalement, sur une note plus personnelle, je tiens à remercier du fond du cœur mes parents, Monique Beaufort et Charles Gobert, pour m'avoir donné l'envie de tout comprendre et inculqué la curiosité dite scientifique, ainsi que pour m'avoir encouragé à toujours me dépasser. Et enfin, merci à Kevin, pour me rappeler qu'il faut parfois prendre du recul pour contempler une œuvre dans son ensemble.

AVANT-PROPOS

Le 5 Décembre 2008, dans une grande ville nord-américaine près de chez vous.

Ce matin est un matin comme tous les autres. Un de ces matins où l'on se presse et se bouscule à son devoir. Un de ces matins où l'on part placidement vaquer à ses occupations pendant que le monde continue de tourner. Cependant, ce matin n'est pas vraiment un matin comme tous les autres. En effet, ce matin, en ouvrant le *New-York Times*, Monsieur et Madame Toulemonde peuvent lire en première page le titre suivant « *H. M., an Unforgettable Amnesiac, Dies at 82* ». Les temps auraient-ils changé au point qu'un simple fait divers pourrait désormais faire les manchettes dans une société toujours en quête de plus de sensationnalisme journalistique? Non, bien sûr. Et puis, là n'est pas le point...

Non, Henry Gustav Molaison n'est définitivement pas n'importe qui. D'ailleurs, si Monsieur et Madame Toulemonde se donnent la peine de lire le début de l'article, ils pourront lire ceci : « *On Tuesday evening [Dec. 2] at 5:05, Henry Gustav Molaison — known worldwide only as H. M., to protect his privacy — died of respiratory failure at a nursing home in Windsor Locks, Conn [...]. Henry Gustav Molaison, born on Feb. 26, 1926, left no survivors. He left a legacy in science that cannot be erased* ».

Henry Gustav Molaison, plus connu donc sous le nom du patient H.M., souffrait d'une amnésie sévère suite à une intervention chirurgicale destinée à enrayer les crises épileptiques dont il était victime depuis l'enfance. Depuis l'opération, il était devenu incapable d'emmagasiner de nouveaux souvenirs. Ironie du sort, H.M. allait, sans en avoir conscience ni souvenir, grandement influencer le domaine des sciences neurologiques et plus particulièrement l'étude de la mémoire. Effectivement, suite à la description de ce cas si particulier, tous les yeux se tournèrent brusquement vers une région cérébrale du lobe temporal médian, qui avait été en grande partie détruite lors de la chirurgie pratiquée sur H.M. : l'hippocampe. Depuis lors, la communauté scientifique n'a eu de cesse d'élucider le fonctionnement de cette région et son interaction avec le reste du cerveau.

Rapidement, il est apparu que la formation des traces mnésiques engendrait des changements durables de la force des connexions entre les neurones au sein de l'hippocampe, un phénomène bien connu aujourd'hui sous le nom de potentialisation à long-terme (LTP). Puis, une longue liste de facteurs nécessaires à la génération de la LTP a commencé à se bâtir, parmi lesquels la synthèse de nouvelles protéines semble jouer un rôle prépondérant.

Ainsi, cette thèse espère aujourd'hui s'inscrire dans cette longue lignée d'études sur les facteurs influençant la mémoire et la potentialisation à long-terme, en s'intéressant plus particulièrement aux liens et aux cascades moléculaires couplant l'activité neuronale et la synthèse protéique.

Cependant, avant de décrire en détail nos résultats expérimentaux, il convient de replacer notre sujet dans un cadre plus large. À cette fin, l'introduction traite tout d'abord de l'apprentissage et des différentes formes de mémoire. Cette première section démontre notamment l'importance de l'hippocampe pour la mémoire et appuie donc le choix de cette structure comme modèle expérimental pour nos travaux. La deuxième section est consacrée à la description de l'organisation et de la composition cellulaire de l'hippocampe. Il est en effet important d'appréhender convenablement la connectivité de ce circuit et ses diverses interactions cellulaires avant de pouvoir comprendre comment l'activité peut modifier un tel réseau. La troisième section s'attarde ensuite à la description de la plasticité de l'hippocampe et plus particulièrement de la potentialisation à long-terme. Elle décrit également plusieurs changements qui surviennent au niveau cellulaire lors de ce phénomène. Enfin, la dernière section traite plus précisément de la synthèse protéique et de son rôle dans la potentialisation à long-terme.

CHAPITRE I. INTRODUCTION

1.1. L'APPRENTISSAGE ET LA MÉMOIRE

L'apprentissage, processus par lequel le cerveau acquiert des connaissances sur notre environnement, représente sans conteste l'une des fonctions cognitives les plus importantes du cerveau. En effet, on peut facilement imaginer combien il serait difficile d'évoluer dans un milieu dont il faudrait sans cesse ré-appivoiser les diverses caractéristiques : comment ferions-nous s'il fallait chaque jour retenir à nouveau toutes les particularités de notre environnement, du nom des objets qui nous entourent aux concepts les plus abstraits? Et comment nous y prendrions-nous s'il fallait quotidiennement réapprendre le langage ou des habiletés motrices aussi implicites que la marche? L'apprentissage est donc un processus essentiel, qui nous permet non seulement d'enregistrer diverses notions relatives à notre espace, mais qui nous donne également les moyens d'y évoluer et de s'y adapter.

Ce mécanisme est d'autre part indissociable de la mémoire, terme qui réfère quant à lui au processus par lequel ces mêmes informations sont encodées et stockées dans les structures cérébrales appropriées, pour être par la suite, rappelées au besoin (Kandel, Schwartz et Jessel, 2000). La mémoire est sans aucun doute une faculté complexe, qui nécessite l'interaction de plusieurs sous-systèmes. L'idée que la mémoire n'est pas un processus unitaire avait d'ailleurs été largement développée par les philosophes, avant d'être scientifiquement prouvée par les neuropsychologues : en 1913, le philosophe français Henri Bergson est le premier à faire la distinction entre la mémoire consciente et les habitudes, puis en 1949, le philosophe britannique Gilbert Ryle propose une distinction entre le « savoir quoi » et le « savoir comment ». Cette distinction est de nos jours, largement acceptée et a mené à la définition de deux grands systèmes de mémoire : la mémoire explicite et la mémoire implicite (Figure 1) (Kandel et Pittenger, 1999; Kandel, Schwartz et Jessel, 2000; Milner, Squire et Kandel, 1998; Squire et Zola, 1996).

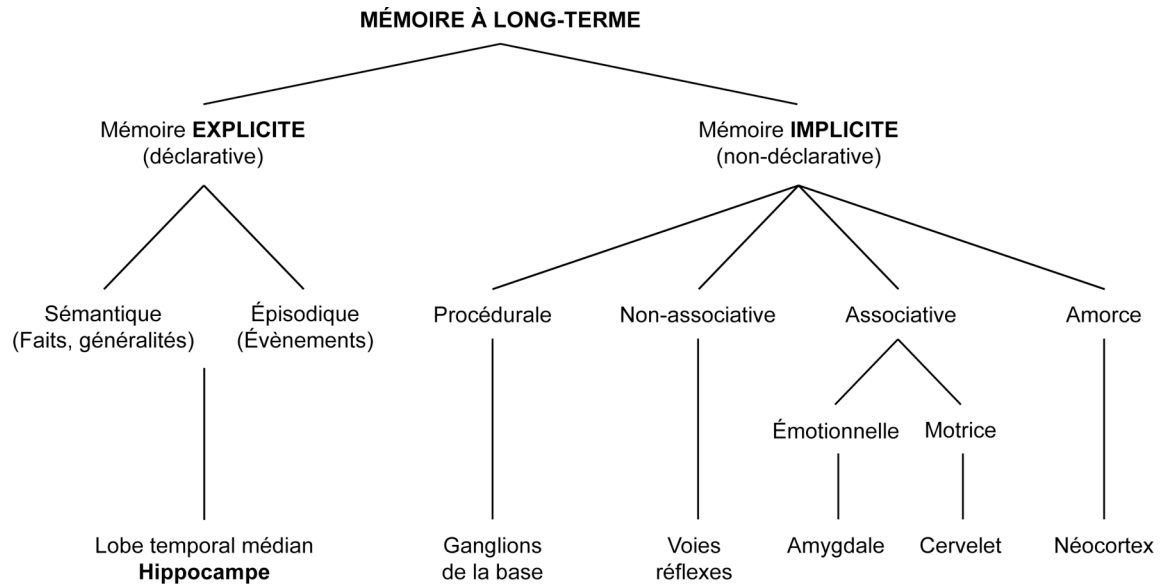


Figure 1 : Les différents systèmes mémoriels

La mémoire à long-terme peut être classifiée comme étant explicite ou implicite, selon le type d'information qui est encodée puis stockée. Chaque forme de mémoire utilise des structures et des réseaux neuronaux distincts (Adapté de Kandel, Schwartz et Jessel, 2000).

1.1.1. La mémoire explicite ou déclarative

La mémoire explicite, ou mémoire déclarative, réfère à la mémoire des faits et des événements. Elle nécessite un effort conscient et délibéré pour accéder ou se remémorer ces connaissances. La mémoire explicite est en outre hautement flexible et implique généralement l'association de plusieurs fragments d'information, par opposition à la mémoire implicite qui est, elle, beaucoup plus rigide (Kandel, Schwartz et Jessel, 2000). En 1972, Endel Tulving, neuropsychologue canadien, propose pour la première fois une subdivision de la mémoire explicite en mémoires sémantique et épisodique. La mémoire sémantique réfère à la mémoire des faits (ex : *en 1969, Neil Armstrong a été le premier homme à marcher sur la Lune*) et aux connaissances générales (ex : *l'eau bout à 100°C*), alors que mémoire épisodique réfère plutôt à la mémoire autobiographique, celle qui nous permet de nous souvenir d'événements et d'expériences personnels (ex : *j'ai quitté mon pays lorsque j'avais 16 ans*) (Kandel et Pittenger, 1999; Kandel, Schwartz et Jessel, 2000; Milner, Squire et Kandel, 1998; Squire et Zola, 1996).

1.1.2. La mémoire implicite ou non-déclarative

La mémoire implicite est quant à elle aussi appelée non-déclarative car elle ne s'exprime pas avec des mots mais plutôt en termes de performances et d'habiletés. Par opposition à la mémoire explicite, la mémoire implicite est très peu flexible et nécessite habituellement que les conditions d'encodage et de rappel soient semblables (Kandel, Schwartz et Jessel, 2000). Ce terme assez vaste regroupe plusieurs sous-types de mémoire, parmi lesquels on peut citer : la mémoire procédurale, la mémoire non-associative et associative, ainsi que la mémoire d'amorce. Ces différents types de mémoire possèdent cependant une caractéristique commune : aucune ne nécessite un rappel conscient des informations (Kandel et Pittenger, 1999; Kandel, Schwartz et Jessel, 2000; Milner, Squire et Kandel, 1998; Squire et Zola, 1996).

La mémoire procédurale est la mémoire des habiletés motrices. Il est en effet bien connu que la répétition des tâches motrices améliore la performance, sans que le sujet ait forcément conscience de sa progression à chaque essai. L'exemple le plus couramment utilisé pour illustrer ce type de mémoire est sans doute la capacité d'un individu à pratiquer le cyclisme longtemps après avoir acquis cette habileté et ce, même sans en avoir fait l'expérience depuis longtemps (Kandel, Schwartz et Jessel, 2000; Knowlton, Mangels, et Squire, 1996; Packard, Hirsh et White, 1989).

Les réactions réflexes à certains stimuli peuvent également être modifiées par l'exposition répétée et représentent de bons exemples de mémoire non-associative. Ainsi, si un individu est exposé de façon répétée à un stimulus agréable ou bénin, la réponse à la présentation du signal sera progressivement diminuée selon un mécanisme d'habituation. À l'inverse, si l'individu est exposé à répétition à un stimulus désagréable ou nocif, sa réponse au signal sera progressivement augmentée par un mécanisme de sensibilisation (Kandel, Schwartz et Jessel, 2000; Milner, Squire et Kandel, 1998).

D'autre part, alors que la mémoire non-associative permet de retenir les propriétés d'un stimulus unique et d'y réagir de façon appropriée, la mémoire associative permet quant à elle de conditionner la relation entre un stimulus et sa conséquence. On peut de plus distinguer deux formes de conditionnement : le conditionnement classique (relation

entre deux stimuli) tel que décrit initialement par Ivan Pavlov, physiologiste russe (Pavlov, 1927; Thompson, 2005; Thompson *et al.*, 1998) et le conditionnement opérant (relation entre un stimulus et un comportement) tel que décrit par Edward Thorndike et Walter Skinner, psychologues américains (Kandel, Schwartz et Jessel, 2000; Milner, Squire et Kandel, 1998). D'autre part, le conditionnement peut également impliquer une composante émotionnelle, et la forme la plus couramment étudiée de ce conditionnement est le conditionnement par la peur (*fear conditioning*) (LeDoux, 1995; Phelps et LeDoux, 2005).

Finalement, la mémoire d'amorce est caractérisée par une modification de l'habileté à reconnaître ou à identifier des stimulus (objets, dessins, mots, etc.), résultant de la présentation récente de ces mêmes signaux (Kandel, Schwartz et Jessel, 2000; Milner, Squire et Kandel, 1998; Tulving et Schacter, 1990).

1.1.3. La mémoire : une fonction globale ou localisée?

L'idée que la mémoire est un processus localisé dans une région particulière du cerveau est largement acceptée de nos jours. Cependant, la question de la localisation spécifique de tout processus mental a longtemps été au centre d'un débat passionné entre philosophes, psychologues et scientifiques (Kandel et Pittenger, 1999; Kandel, Schwartz et Jessel, 2000; Milner, Squire et Kandel, 1998). Franz Joseph Gall, neuroanatomiste allemand, fut sans doute le premier à suggérer, au début du dix-neuvième siècle, que le cortex cérébral est subdivisé en régions, chacune étant le siège d'une fonction cognitive particulière (Gall et Spurzheim, 1810; Simpson, 2005). Quelques années plus tard, Pierre Flourens, neurologue français, décida de soumettre l'idée de Gall à l'expérimentation scientifique : en retirant progressivement différentes parties du cortex de lapins, il espère ainsi identifier des zones responsables de comportements particuliers, mais sans succès. Il en conclut alors que chaque partie du cerveau participe et est en mesure d'accomplir indépendamment toutes les fonctions de l'hémisphère cérébral. La lésion d'une aire spécifique devrait ainsi affecter également toutes les fonctions supérieures (Kandel et Pittenger, 1999; Milner, Squire et Kandel, 1998).

À la fin du dix-neuvième siècle, l'idée de la spécialisation du cortex cérébral est reprise par Pierre-Paul Broca, neurologue français, puis par Carl Wernicke, neurologue allemand, démontrant tous deux clairement l'importance de zones spécifiques de l'hémisphère gauche pour l'expression du langage (désormais connues sous le nom d'aire de Broca et aire de Wernicke, respectivement). Wernicke va même plus loin et propose que tous les comportements complexes nécessitent l'activité non pas d'une zone spécifique, mais plutôt l'interaction de plusieurs zones spécialisées (Kandel et Pittenger, 1999; Kandel, Schwartz et Jessel, 2000; Milner, Squire et Kandel, 1998). Ces découvertes relancèrent le débat sur la spécialisation du cortex et renouvelèrent l'intérêt de la communauté scientifique pour l'identification de régions spécialisées dans d'autres fonctions cognitives, et plus particulièrement la mémoire.

Les recherches de Broca et Wernicke ont d'autre part ouvert la voie à toute une génération d'études : les études sur des sujets possédant des lésions cérébrales spécifiques. En effet, les patients souffrant du trouble de langage (ou aphasie) décrit par Broca, présentaient tous une lésion d'une région postérieure du cortex frontal. De même, l'autopsie de patients souffrant de l'aphasie de Wernicke, avait révélé des lésions de la partie postérieure du cortex temporal. Au début du vingtième siècle, espérant découvrir à son tour une aire spécialisée pour la mémoire, Karl Lashley, neuropsychologue américain, se lança dans une série d'expériences chez le rat, qui n'est pas sans ressemblances avec celle de Flourens (Lashley, 1929). En retirant successivement différentes parties du cortex et en soumettant ensuite les animaux à différents tests de rappel, il ne parvint pas à identifier une région responsable des fonctions mnésiques, ce qui l'amena à formuler sa loi de l'action de masse. Cette dernière stipulait que le déficit mnésique dépendait de l'étendue de la lésion corticale, et non pas de sa localisation spécifique. Cependant, quelques années plus tard, la description du cas clinique du patient H.M., et par la suite, de plusieurs cas similaires, allait révolutionner l'étude de la mémoire.

1.1.3.1. L'importance du lobe temporal médian pour la mémoire explicite et le cas du patient H.M.

Ainsi, en 1938, lors de chirurgies visant à éliminer des foyers épileptiques, Wilder Penfield, neurochirurgien canadien d'origine américaine, note pour la première fois que la stimulation électrique de certaines parties du cortex temporal évoque chez des patients éveillés des souvenirs d'une netteté et d'un réalisme surprenants. Quelques années plus tard, William Scoville, neurochirurgien américain, et Brenda Milner, neuropsychologue canadienne d'origine britannique, rapportent le cas du désormais célèbre patient H.M. et démontrent ainsi l'importance de l'intégrité des structures du lobe temporal pour la mémoire explicite (Scoville et Milner, 1957). Le patient H.M., qui avait subi un traumatisme crânien à l'âge de 9 ans après avoir été heurté par une bicyclette, souffrait depuis de crises épileptiques fortement débilitantes et intraitables. Il fut donc décidé, en dernier recours, de procéder à la résection du foyer épileptique, situé dans le lobe temporal médian. L'intervention chirurgicale pratiquée par Scoville nécessita l'ablation bilatérale de la portion intra-ventriculaire de la formation hippocampique (gyrus dentelé, hippocampe et subiculum) (voir section 1.2.1.), de la majeure partie du cortex entorhinal et de l'amygdale (Corkin *et al.*, 1997). Bien que l'opération permît d'enrayer effectivement les crises épileptiques, elle laissa H.M. avec un déficit de mémoire très marqué : en effet, H.M. souffrait désormais d'une profonde amnésie antérograde, qui l'empêchait de retenir toute nouvelle information plus de quelques minutes, ainsi que d'une certaine amnésie rétrograde, touchant principalement les événements survenus juste avant son opération. Cependant, H.M. était tout de même capable de retenir de nombreuses informations à court-terme : par exemple, il pouvait retenir sans problème un numéro de téléphone, mais l'oubliait aussitôt qu'il était distrait dans sa répétition sub-vocale par un autre sujet de conversation ou une autre tâche à accomplir. De plus, H.M. pouvait également acquérir certaines formes de mémoire à long-terme, comme les habiletés motrices : après plusieurs sessions d'entraînement, H.M. était capable de tracer les contours d'une figure complexe telle qu'une étoile en suivant le trajet de sa main dans un miroir, bien qu'il n'ait aucun souvenir conscient d'avoir effectué cette tâche auparavant. D'autre part, même si le cas du patient H.M. est sans aucun doute le plus célèbre et le plus complet, il n'est pas unique. En effet, Milner et Penfield avaient déjà rapporté, au début des années 50, les cas de plusieurs patients souffrant d'amnésie

antérograde suite à la résection d'une partie du lobe temporal gauche (Milner, Squire et Kandel, 1998).

Ensemble, ces études, et tout particulièrement le cas remarquable du patient H.M., ont non seulement permis de démontrer l'importance des structures du lobe temporal médian et tout particulièrement de l'hippocampe pour la formation de la mémoire explicite, mais aussi de tirer plusieurs conclusions essentielles à la localisation et à la compréhension de ce processus cognitif complexe. Globalement, ces travaux confirment que la mémoire n'est pas un processus unitaire mais plutôt multiple. Il semblerait en effet que la mémoire à court-terme et la mémoire à long-terme sont deux mécanismes séparés, utilisant des réseaux neuronaux distincts. D'autre part, la mémoire des faits et des événements est sans doute indépendante de la mémoire des habiletés et des habitudes. Les études de Milner et de ses collègues ont donc mené à la description systématique de plusieurs systèmes de mémoire interagissant entre eux (voir sections 1.1.1. et 1.1.2.), que l'on peut néanmoins distinguer sur une base anatomique, ainsi que selon le niveau de conscience impliqué.

1.1.3.2. L'importance d'autres structures pour la mémoire implicite

Par la suite, des travaux ont démontré l'importance de différentes structures pour les autres formes de mémoire (Kandel et Pittenger, 1999; Kandel, Schwartz et Jessel, 2000; Milner, Squire et Kandel, 1998; Squire et Zola, 1996). Tout d'abord, la mémoire procédurale nécessite l'intégrité des ganglions de la base (Knowlton, Mangels, et Squire, 1996; Packard, Hirsh et White, 1989). En revanche, la mémoire non-associative dépend plutôt des circuits moteurs réflexes, alors que la mémoire associative implique le cervelet, si le conditionnement implique une réponse purement motrice (Thompson, 2005; Thompson *et al.*, 1998), ou l'amygdale, si le conditionnement possède une composante émotionnelle (LeDoux, 1995; Phelps et LeDoux, 2005). Finalement, la mémoire d'amorce requiert plutôt l'activité du néocortex et plus particulièrement du lobe frontal (Tulving et Schacter, 1990).

1.1.4. L'importance particulière de l'hippocampe

Tel que le décrivent les travaux de Scoville et Milner, l'hippocampe semble donc jouer un rôle prépondérant dans la formation de la mémoire explicite (Scoville et Milner, 1957; Milner, Squire et Kandel, 1998). Cependant, cette conclusion s'appuie surtout sur des déductions : tout d'abord, il est intéressant de noter qu'une lésion restreinte à l'amygdale ou à l'uncus n'a aucun effet sur la mémoire explicite, tel qu'observé chez le patient I.S. (Scoville et Milner, 1957). Ensuite, on peut remarquer que les symptômes de l'amnésie antérograde ne surviennent que lorsque la chirurgie englobe la région de l'hippocampe. C'est notamment le cas du patient P.B., qui avait subi une lobectomie en deux étapes et chez qui les symptômes de perte de mémoire n'apparurent qu'après la lésion de la région hippocampique (Milner, Squire et Kandel, 1998; Penfield et Mathieson, 1974). D'autre part, il est important de noter qu'aucun de ces patients n'avait subi de résection ciblée de l'hippocampe, mais plutôt une ablation étendue des structures du lobe temporal médian (Corkin *et al.*, 1997). Il était donc impossible de déterminer, sur la seule base de ces études, que l'hippocampe était la seule structure impliquée dans la formation de la mémoire explicite.

1.1.4.1. Le cas du patient R.B.

Un autre cas important a permis de confirmer que des dommages limités à l'hippocampe étaient suffisants pour affecter la mémoire explicite : le patient R.B., qui avait subi un épisode ischémique durant un pontage cardiaque, développa une amnésie antérograde marquée suite à l'opération, et ce sans autre signe de dommages cognitifs (Zola-Morgan, Squire et Amaral, 1986). À son décès, une analyse histologique approfondie révéla que la seule lésion visible et suffisante pour expliquer les déficits mnésiques était restreinte à la couche pyramidale de la région CA1 de l'hippocampe. Ainsi, même si les déficits observés chez R.B. étaient sensiblement moins prononcés que ceux de H.M., ces travaux ont néanmoins mis l'accent sur le rôle prépondérant de l'hippocampe dans la mémoire explicite, sans pour autant exclure l'implication d'autres structures du lobe temporal médian. Quelques années plus tard, une étude rapportant les cas de trois patients différents ayant subi des dommages restreints à l'hippocampe, corrobora les résultats de Zola-Morgan et de ses collègues, tout en suggérant que l'étendue des dommages était proportionnelle au déficit mnésique observé (Rempel-Clower *et al.*, 1996).

1.1.4.2. Les modèles expérimentaux

Dans l'ensemble, les études neuropsychologiques de patients ayant subi des ablations ou des lésions localisées du lobe temporal médian ou d'autres régions ont fourni de nombreux indices quant à la localisation des structures impliquées dans l'établissement de la mémoire et à l'interaction entre les divers systèmes de mémoire. Cette approche présente en effet l'avantage de permettre l'évaluation psychologique directe des conséquences de tels dommages sur les différents systèmes de mémoire.

Toutefois, l'approche neuropsychologique possède aussi ses limitations. En effet, la plupart de ces patients présentent des dommages s'étendant à plusieurs régions cérébrales, et ne permettent donc pas de différencier les structures qui sont strictement nécessaires de celles qui joueraient plutôt un rôle modulateur. Ces restrictions ont donc favorisé le développement des études expérimentales chez des modèles animaux, afin d'étudier de façon plus systématique l'effet d'une lésion définie et contrôlée sur un système de mémoire particulier (Squire et Zola-Morgan, 1991). Des travaux réalisés chez le singe ont ainsi confirmé que des lésions limitées à l'hippocampe étaient suffisantes pour induire des déficits de mémoire significatifs lors de l'exécution d'une batterie de tests de discrimination visuelle. De plus, les structures adjacentes à l'hippocampe lui-même, telles que le cortex entorhinal et parahippocampique, semblent également jouer un rôle prépondérant, puisque les lésions conjointes de ces régions aggravent le déficit observé (Zola-Morgan *et al.*, 1992; Alvarez, Zola-Morgan et Squire, 1995). D'autre part, des expériences réalisées chez le rat ont démontré l'importance particulière de l'hippocampe dorsal pour la mémoire spatiale (Moser *et al.*, 1993, 1995).

1.1.5. L'importance relative de l'hippocampe à travers le temps

L'hippocampe est donc sans conteste une structure importante pour les processus mnésiques. Cependant, on peut se demander s'il s'agit également du site d'entreposage permanent des souvenirs. Effectivement, de nombreux patients souffrant d'amnésie suite à une résection de l'hippocampe peuvent néanmoins se remémorer des événements survenus dans leur enfance ou de nombreuses années auparavant (Kandel, Schwartz et Jessel, 2000; Scoville et Milner, 1957). Ces observations ont donc mené à l'élaboration

du modèle « classique » de la consolidation de la mémoire. Selon ce modèle, l'information transite par l'hippocampe lors de l'acquisition et de la consolidation, avant d'être transférée définitivement vers les structures néocorticales appropriées, en fonction de la modalité encodée. L'hippocampe ne serait donc pas le site d'entreposage permanent des informations (Squire et Alvarez, 1995). Ce modèle s'oppose au modèle des « traces mnésiques multiples » qui stipule que l'hippocampe est continuellement requis pour un rappel exhaustif de l'information stockée (Nadel *et al.*, 2000). Ce dernier s'appuie notamment sur des études d'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle qui montrent une activation égale de l'hippocampe lors du rappel d'un souvenir très ancien ou récent. Dans ce second modèle, l'hippocampe aurait donc un rôle permanent dans le stockage de l'information.

La première section a décrit en détail l'importance de l'hippocampe pour la mémoire et plus précisément la mémoire explicite. On peut dès lors concevoir que cette structure représente un candidat de premier ordre pour toute étude sur la mémoire et justifie ainsi le choix de cette région cérébrale en tant que modèle expérimental pour notre étude. La deuxième section va maintenant s'intéresser à l'organisation et à la composition cellulaire de l'hippocampe. Il est en effet important de comprendre l'architecture et la connectivité de ce circuit, avant de pouvoir comprendre comment l'activité peut le modifier.

1.2. L'ARCHITECTURE ET L'ORGANISATION FONCTIONNELLE DE L'HIPPOCAMPE

Ainsi, de par son implication dans les processus mnésiques, l'hippocampe est sans doute l'une des structures cérébrales les plus étudiées à nos jours. Cependant, sa forme caractéristique et sa remarquable organisation stratifiée ont aussi grandement contribué à son étude. La formation hippocampique doit son nom à sa ressemblance avec l'animal du même nom, aussi appelé cheval de mer (du grec *hippo*, qui signifie cheval et *kampos*, qui signifie monstre marin).

1.2.1. L'organisation anatomique

Tel que mentionné plus haut, l'hippocampe est une structure du lobe temporal qui fait partie d'un ensemble nommé formation hippocampique et qui comprend, outre l'hippocampe lui-même, le cortex entorhinal, le gyrus dentelé et le complexe subiculaire (lui-même composé du présubiculum, du subiculum et du parasubiculum). L'hippocampe à proprement parler est parfois également appelé corne d'Ammon, en référence au dieu égyptien dont l'emblème est une corne de bélier (Johnston et Amaral, 1998). Ces initiales ont d'autre part été reprises par la nomenclature de Rafael Lorente de Nó, anatomiste et physiologiste espagnol (Lorente de Nó, 1934), pour désigner les différentes régions de l'hippocampe (CA1 à CA4; voir section 1.2.2.2.). Très souvent cependant, le terme hippocampe réfère à la fois à la corne d'Ammon et au gyrus dentelé. Cette convention est d'ailleurs employée tout au long de cette thèse et le terme hippocampe désigne donc l'ensemble formé de la corne d'Ammon et du gyrus dentelé. Chez les rongeurs, l'hippocampe apparaît comme une structure allongée qui s'étend comme un C incurvé du noyau septal au cortex temporal. De ce fait, l'axe longitudinal de l'hippocampe est souvent désigné comme axe septo-temporal et l'axe orthogonal est appelé axe transverse (Figure 2) (Amaral et Witter, 1989; Johnston et Amaral, 1998).

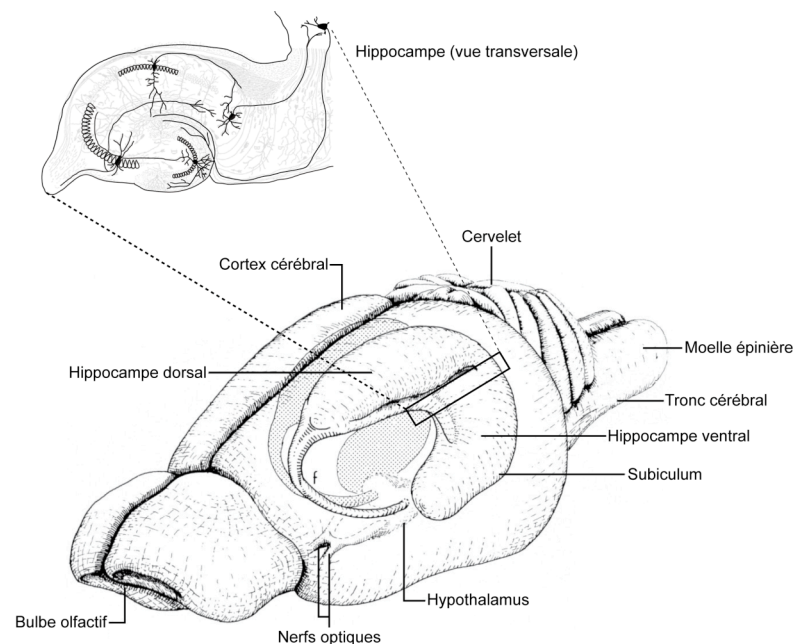


Figure 2 : L'organisation anatomique de l'hippocampe chez le rongeur

L'hippocampe est une structure du lobe temporal. L'insert montre l'apparence d'une section d'hippocampe selon l'axe orthogonal ou transverse (Adapté de Amaral et Witter, 1989).

1.2.2. L'organisation cellulaire

1.2.2.1. Le gyrus dentelé

Le gyrus dentelé se compose de trois couches cellulaires : la couche moléculaire (ou dendritique), la couche granulaire (ou principale) et la couche polymorphique (ou la région du hile). Les principaux neurones du gyrus dentelé sont les cellules granulaires, qui forment la couche cellulaire du même nom. La couche granulaire est facilement identifiable grâce à sa forme caractéristique en V ou en U, selon le niveau septo-temporal. La portion supérieure de ce V, c'est-à-dire la partie proche de la fissure hippocampique, est communément appelée branche suprapyramidale, alors que la partie inférieure est appelée branche infrapyramidale. La section qui relie ces deux branches porte quant à elle le nom de crête (Figure 3) (Amaral et Witter, 1989; Johnston et Amaral, 1998).

1.2.2.1.1. Les cellules granulaires du gyrus dentelé

Les cellules principales du gyrus dentelé se nomment donc cellules granulaires, et c'est l'empilement de leurs corps cellulaires (de 4 à 8 corps cellulaires) en une strate compacte qui forme la couche du même nom. Ces cellules constituent le premier relais du réseau trisynaptique et reçoivent principalement des afférences du cortex entorhinal. Les cellules granulaires sont relativement petites (8-12 μm de diamètre) et possèdent deux dendrites principales se ramifiant en de nombreuses branches fines et couvertes d'épines dans la couche moléculaire sus-jacente, qui est principalement acellulaire. Pour leur part, les axones des cellules granulaires, aussi appelés fibres moussues en raison de l'apparence caractéristique de leurs terminaisons, projettent vers la couche polymorphique où ils donnent naissance à de nombreuses collatérales qui restent pour la plupart dans cette région. Certaines de ces collatérales forment plutôt des connexions récurrentes vers les cellules en panier de la couche granulaire. Les axones principaux des cellules granulaires se regroupent quant à eux pour former un faisceau qui quitte la couche polymorphique et la région du hile pour pénétrer dans la couche *lucidum* du CA3, où il forme des synapses en passant sur les dendrites proximales des cellules pyramidales de la région CA3 (Amaral et Witter, 1989; Freund et Buzsáki, 1996; Johnston et Amaral, 1998).

1.2.2.1.2. Les autres cellules du gyrus dentelé

Alors que la couche granulaire est principalement formée des cellules granulaires et que la couche moléculaire est essentiellement acellulaire, la couche polymorphique possède, pour sa part, plusieurs types de cellules. Parmi celles-ci, on peut citer les cellules moussues, qui reçoivent des contacts des fibres moussues, et les cellules polymorphiques, qui sont, comme leur nom l'indique, de plusieurs types mais qui ont pour point commun leur projection vers d'autres régions du gyrus dentelé (Amaral et Witter, 1989; Johnston et Amaral, 1998). Le gyrus dentelé contient aussi plusieurs types d'interneurones inhibiteurs, cellules classiquement définies comme locales (dont l'axone ne projette pas distalement à d'autres régions), dépourvues d'épines et utilisant le GABA comme neurotransmetteur (Ramón y Cajal, 1911; Lorente de Nó, 1934). La classe des interneurones étant extrêmement vaste et diversifiée, nous nous contenterons ici de mentionner les principaux interneurones du gyrus dentelé (pour une revue complète : Freund et Buzsáki, 1996) : les cellules pyramidales en panier, dont le corps cellulaire est situé à la frontière entre les couches granulaire et polymorphique et innervant les cellules granulaires (Johnston et Amaral, 1998).

1.2.2.2. La corne d'Ammon

La corne d'Ammon peut clairement être subdivisée en deux régions : une région composée de larges cellules, proche du gyrus dentelé, et une région constituée de plus petites cellules et située plus distalement, à la jonction avec le subiculum. Ces deux régions correspondent aux *regio inferior* et *regio superior* décrites par Santiago Ramón y Cajal, histologiste espagnol (Ramón y Cajal, 1911). Lorente de Nó avait quant à lui divisé l'hippocampe en 4 champs, de CA1 à CA4 (Lorente de Nó, 1934). La dénomination de CA4 réfère en fait à la couche polymorphique du gyrus dentelé et cette appellation n'est donc plus couramment utilisée. D'autre part, l'existence de la région du CA2 est encore sujette à controverse : en effet, bien qu'elle possède quelques caractéristiques distinctives par rapport à la région CA3 comme son innervation et sa certaine résistance à l'activité épileptique, cette région est néanmoins très fréquemment assimilée à la région CA3. Nous nous contenterons donc ici de diviser la corne d'Ammon en deux régions : CA3 ou la région adjacente au gyrus dentelé et CA1 ou la

région juxtaposée au subiculum. Le CA3 peut à son tour être subdivisé en 3 sous-régions : le CA3a étant le segment adjacent à la région CA2, le CA3c étant la portion voisine de la région du hile et le CA3b étant la section comprise entre CA3a et CA3c.

Au niveau de la corne d'Ammon, on peut facilement identifier la couche pyramidale, formée des cellules du même nom. Les dendrites des cellules pyramidales sont recouvertes d'épines et s'étendent du pôle apical et du pôle basal; ces cellules sont donc considérées comme des neurones multipolaires. La corne d'Ammon possède cependant 7 strates distinctes (Lopes da Silva *et al.*, 1990) :

(1) La couche *moleculare*, qui est directement adjacente à la fissure hippocampique et qui contient surtout des fibres et des terminaisons dendritiques.

(2) La couche *lacunosum*, qui est principalement constituée de faisceaux de fibres parallèles provenant des collatérales des cellules pyramidales ou de fibres extrinsèques à l'hippocampe. Les couches *moleculare* et *lacunosum* sont fréquemment combinées ensemble en une seule et même couche portant le nom de *lacunosum-moleculare* ou L/M.

(3) La couche *radiatum*, qui possède relativement peu de corps cellulaires mais de nombreux systèmes de fibres, le plus important étant formé des collatérales de Schaffer, c'est-à-dire les collatérales des cellules pyramidales de CA3 et qui forment des synapses sur les dendrites apicales des cellules pyramidales de CA1.

(4) La couche *pyramidale*, qui contient les corps cellulaires des cellules pyramidales, regroupés en une rangée compacte de 3 à 6 cellules de large.

(5) La couche *oriens* qui regroupe les dendrites basales des cellules pyramidales, les corps cellulaires de plusieurs types de cellules, ainsi que d'autres collatérales des cellules de CA3, parallèles aux collatérales de Schaffer de la couche *radiatum*.

(6) La couche *alveus* qui regroupe les axones des cellules pyramidales et quelques corps cellulaires qui semblent avoir été déplacés de la couche *oriens*. Les couches *alveus* et *oriens* sont souvent regroupées en une seule et même couche portant le nom de *oriens-alveus* ou O/A.

(7) La couche épithéliale qui délimite l'hippocampe et la surface du ventricule.

Au niveau du CA3, une autre couche appelée couche *lucidum* a également été décrite. Tel que mentionné ci-dessus (voir section 1.2.2.1.1.), cette couche regroupe les axones des cellules granulaires du gyrus dentelé (Figure 3) (Johnston et Amaral, 1998).

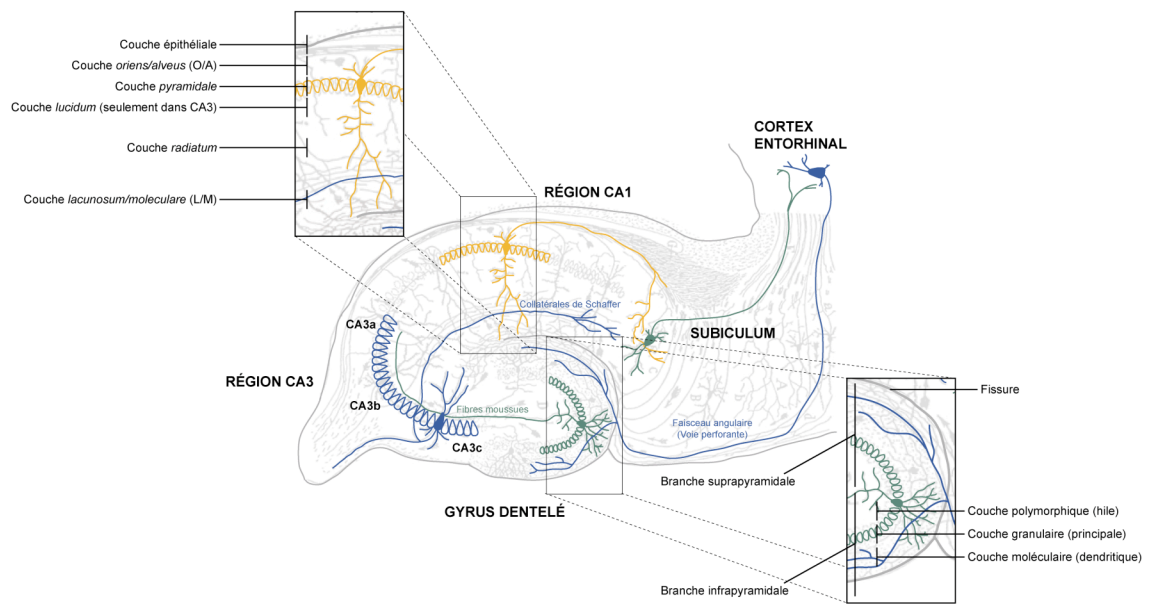


Figure 3 : L'organisation cellulaire du gyrus dentelé et de la corne d'Ammon

Une coupe transversale d'hippocampe révèle les différentes couches cellulaires du gyrus dentelé et de la corne d'Ammon, indiquées ici dans les deux inserts. Le schéma indique également les principaux types de cellules et les voies du circuit trisynaptique : (1) les cellules du cortex entorhinal et la voie perforante (en bleu à droite); (2) les cellules granulaires du gyrus dentelé et la voie des fibres moussues (en vert au centre); (3) les cellules pyramidales du CA3 et la voie des collatérales de Schaffer (en bleu à gauche); (4) les cellules pyramidales du CA1 et les projections vers le subiculum (en orange); (5) les cellules pyramidales du subiculum et les projections vers le cortex entorhinal (en vert à droite) (Adapté de Ramón y Cajal, 1911).

1.2.2.2.1. Les cellules pyramidales de la région CA3

Les cellules pyramidales de la région CA3 sont de larges cellules, qui représentent la cible principale des axones des cellules granulaires ou fibres moussues. Il convient d'ailleurs de noter que l'innervation est un critère important pour différencier les cellules pyramidales du CA3 et celles du CA1. Un autre critère est la taille des cellules ainsi que la largeur de la couche pyramidale : cette dernière atteint de 60 à 120 μm dans le CA3 alors qu'elle n'est que de 50 à 100 μm dans le CA1. Les cellules pyramidales de CA3 possèdent une à deux dendrites apicales qui s'étendent dans les couches *radiatum* et *lacunosum-moleculaire* jusqu'au hile, ainsi que de nombreuses dendrites basales qui se ramifient dans la couche *oriens*. L'ensemble de l'arbre dendritique est recouvert de petites épines, et seule la portion proximale des dendrites est recouverte d'épines plus larges et plus complexes portant le nom d'excroissances épineuses (*thorny excressences*). Les axones des cellules pyramidales de la région CA3, aussi nommés

collatérales de Schaffer, émergent du pôle basal et donnent naissance à une arborisation étendue dans le CA3 et le CA1 (Freund et Buzsáki, 1996; Amaral et Witter, 1989).

1.2.2.2. Les cellules pyramidales de la région CA1

Les cellules pyramidales de la région CA1 reçoivent leurs afférences des collatérales de Schaffer et se distinguent de celles de la région CA3 de par leur petite taille. D'autre part, les cellules pyramidales du CA1 possèdent une seule dendrite apicale qui se ramifie dans la couche *radiatum* et atteint la couche *lacunosum-moleculare*, ainsi que de nombreuses dendrites basales qui s'étendent dans la couche *oriens*, parfois même jusqu'à l'*alveus*. Ces dendrites sont toutes couvertes d'épines, mais ne possèdent cependant pas d'excroissances épineuses, que l'on retrouve uniquement dans la région CA3. L'axone de ces cellules émerge du soma au niveau de la dendrite apicale, ou encore, mais plus rarement, d'une dendrite basale avant de pénétrer dans l'*alveus*. Les axones émettent peu de collatérales dans la région CA1 et projettent principalement au subiculum et au cortex entorhinal (Freund et Buzsáki, 1996; Amaral et Witter, 1998).

1.2.2.3. Les autres cellules de la corne d'Ammon

Tel qu'observé au niveau du gyrus dentelé, la corne d'Ammon possède également de nombreux types d'interneurones, dont la description détaillée dépasse le cadre de cette thèse (pour une revue complète : Freund et Buzsáki, 1996; Somogyi et Klausberger, 2005). On peut cependant regrouper les interneurones sur la base de leur innervation et ainsi définir trois types principaux : les cellules axo-axoniques, les cellules en panier et les cellules bistratifiées (Johnston et Amaral, 1998; Freund et Buzsáki, 1996).

1.2.3. Les circuits de base : le réseau trisynaptique excitateur

Tel que décrit ci-dessus, l'hippocampe est une structure hautement stratifiée, ce qui facilite grandement son étude. Les circuits de base de l'hippocampe ont d'ailleurs été décrits dès le début du dix-neuvième siècle par Ramón y Cajal (Ramón y Cajal, 1911). Per Andersen et ses collègues sont cependant les premiers à avoir mis l'accent sur la connexion unidirectionnelle des voies excitatrices qui relient chacune des régions de l'hippocampe et à définir l'hippocampe comme un circuit trisynaptique (Andersen, Bliss et Skrede, 1971; Amaral et Witter, 1989; Johnston et Amaral, 1998). Selon ce modèle,

l'information en provenance des aires d'association multimodales est relayée par le cortex entorhinal et circule successivement dans le gyrus dentelé, le CA3 puis le CA1, avant de retourner au cortex entorhinal. De plus, cette théorie suggère que le flot de l'information est restreint à des tranches ou lamelles d'hippocampe, ce qui contribue à diviser l'hippocampe en unités fonctionnelles indépendantes. Par la suite, d'autres études ont démontré que le flot de l'information au sein de l'hippocampe suivait en fait un trajet plus complexe, et que peu de connexions pouvaient être considérées comme unidirectionnelles et restreintes à une seule lamelle fonctionnelle. En effet, la plupart des connexions sont divergentes et contactent non seulement des régions adjacentes, mais aussi plusieurs régions éloignées de l'hippocampe ipsilatéral ou controlatéral (Amaral et Witter, 1989; Lopes da Silva, 1990).

1.2.3.1. La voie perforante : du cortex entorhinal au gyrus dentelé

La première étape du circuit trisynaptique relie le cortex entorhinal au gyrus dentelé par la voie dite perforante. Le cortex entorhinal établit de nombreuses connexions réciproques avec plusieurs aires uni- ou multimodales et constitue ainsi la principale porte d'entrée de l'information dans l'hippocampe via ses importantes projections au gyrus dentelé, mais aussi dans une moindre mesure, au CA3, au CA1 et au subiculum. La majorité des afférences de la voie perforante provient de la couche II du cortex entorhinal, avec une petite contribution des couches plus profondes. Les axones des neurones du cortex entorhinal se regroupent et forment le faisceau angulaire, qui donne à son tour naissance à la voie dite perforante. Celle-ci projette à travers (ou perfore) le subiculum, avant de se distribuer de façon lamellaire dans les deux-tiers externes de la couche moléculaire gyrus dentelé : les fibres provenant du cortex entorhinal latéral se terminent dans le tiers externe de la couche moléculaire, alors que celles issues du cortex entorhinal médian se terminent plutôt dans le tiers médian de cette même couche. Ces axones forment également la voie temporo-ammonique et se terminent, dans une moindre mesure, dans la couche *lacunosum-moleculare* du CA3 (Lopes da Silva, 1990; Johnston et Amaral, 1998).

D'autre part, la voie temporo-ammonique comprend aussi les axones de la couche III du cortex entorhinal qui projettent à la couche *lacunosum-moleculare* de la région CA1 et au subiculum, selon une organisation topographique. De ce fait, les fibres provenant du

cortex entorhinal latéral se terminent dans la portion de la couche L/M qui borde le subiculum, alors que celles issues du cortex entorhinal médian se terminent plutôt dans la portion voisine du CA3, ainsi que dans la couche moléculaire du subiculum (Lopes da Silva, 1990; Johnston et Amaral, 1998).

1.2.3.2. La voie des fibres moussues : du gyrus dentelé au CA3

La deuxième étape du circuit trisynaptique relie le gyrus dentelé à la région CA3 par la voie dite des fibres moussues. Cette connexion est la seule à être exclusivement lamellaire, puisque les cellules du gyrus dentelé ne contactent aucune autre région cérébrale (Amaral et Witter, 1989; Johnston et Amaral, 1998). Tel que mentionné plus haut, les axones des cellules granulaires du gyrus dentelé, aussi nommés fibres moussues en raison de leurs terminaisons synaptiques particulières, contactent les cellules pyramidales de la région CA3 selon une organisation topographique. Ainsi, les axones des cellules de la branche suprapyramidale se terminent dans la région CA3 la plus distale, proche de la jonction avec la région CA1, alors que les axones des cellules de la branche infrapyramidale se terminent dans la région CA3 qui borde le hile (Lopes da Silva, 1990).

D'autre part, les fibres moussues forment aussi des collatérales récurrentes qui se ramifient dans la couche polymorphique du gyrus dentelé et innervent les cellules moussues, qui sont des cellules de projection excitatrices, ainsi que les cellules en panier de la couche granulaire, qui sont considérées comme des interneurons inhibiteurs. Les axones des cellules moussues innervent à leur tour le tiers interne de la couche moléculaire du gyrus dentelé et contactent les cellules granulaires de l'hippocampe ipsilatéral par la voie associationnelle, ou celles de l'hippocampe controlatéral par la voie commissurale. Les fibres moussues contactent aussi parfois les cellules granulaires de la couche moléculaire du gyrus dentelé ventral, mais le rôle physiologique de cette connexion est probablement négligeable (Freund et Buzsáki, 1996; Johnston et Amaral, 1998).

1.2.3.3. La voie des collatérales de Schaffer : du CA3 au CA1

La troisième et dernière étape du circuit trisynaptique relie la région CA3 à la région CA1 par la voie dite des collatérales de Schaffer. Les axones des cellules pyramidales de CA3 ou collatérales de Schaffer se distribuent principalement dans la couche *radiatum*, mais également dans la couche *oriens* de la région CA1 (Freund et Buzsáki, 1996; Johnston et Amaral, 1998). Ces projections sont organisées de façon colonnaire : les axones en provenance du CA3c se terminent dans la couche *radiatum* de la région distale du CA1, c'est-à-dire proche du subiculum, alors que les axones en provenance du CA3b se terminent dans la couche *radiatum* et dans une moindre mesure dans la couche *oriens* de la région médiane du CA1, et finalement les axones en provenance du CA3a se terminent à la fois dans les couches *radiatum* et *oriens* de la région proximale du CA1, c'est-à-dire celle qui jouxte le CA3 (Amaral et Witter, 1989; Lopes da Silva, 1990; Freund et Buzsáki, 1996; Johnston et Amaral, 1998).

D'autre part, la région CA3 projette à toutes les régions de la corne d'Ammon des côtés ipsi- et controlatéral, mais aussi au gyrus dentelé. Par exemple, les cellules pyramidales de la région CA3 donnent également naissance à de nombreuses collatérales qui forment des connexions rétroactives au niveau des couches *radiatum* et *oriens* de la région CA3. Ces projections se ramifient à la fois dans l'hippocampe ipsilatéral et dans l'hippocampe controlatéral et portent alors le nom respectivement de projections associationnelles et commissurales (Lopes da Silva, 1990; Freund et Buzsáki, 1996; Johnston et Amaral, 1998). L'abondance de ces connexions récurrentes contribue d'ailleurs à l'hyperexcitabilité et à l'instabilité de la région du CA3, ainsi qu'à sa propension à développer une activité épileptiforme (Johnston et Amaral, 1998).

1.2.3.4. Les projections de la région CA1 : du CA1 au subiculum et au cortex entorhinal

Les cellules pyramidales de la région CA1 donnent naissance à deux projections au sein de l'hippocampe, l'une au subiculum et l'autre au cortex entorhinal. Ces cellules sont les premières du circuit à émettre des fibres qui retournent au cortex entorhinal et ferment ainsi le circuit trisynaptique exciteur, tout en constituant une importante porte de sortie de l'information de l'hippocampe. Les axones des cellules pyramidales du CA1

projetent à travers la couche *oriens* du CA1 et retournent dans la couche pyramidale au niveau du subiculum, où ils se ramifient dans cette même couche ainsi que dans la couche moléculaire sous-jacente. Ces projections sont également organisées de façon colonnaire : les axones provenant de la région CA1 proximale projetent au tiers distal du subiculum, alors que ceux provenant de la région distale projetent au tiers proximal, et finalement, ceux provenant de la région médiane projetent au tiers médian (Lopes da Silva, 1990; Johnston et Amaral, 1998). Les cellules pyramidales du subiculum projetent à leur tour aux couches profondes du cortex entorhinal (Johnston et Amaral, 1998). De plus, les axones des cellules pyramidales du CA1 projetent aussi directement au niveau du cortex entorhinal, principalement aux cellules de la couche V du cortex entorhinal médian.

D'autre part, les cellules pyramidales du CA1 donnent également naissance à quelques collatérales locales au niveau de la couche *oriens* ou de la couche *pyramidale* de la région CA1, mais contrairement aux collatérales de la région CA3, celles-ci sont très peu nombreuses et par conséquent, les interactions excitatrices entre les cellules pyramidales du CA1 sont relativement faibles (Freund et Buzsáki, 1996; Johnston et Amaral, 1998).

1.2.4. L'importance particulière de la région CA1

Tel que décrit ci-dessus, la région CA1 constitue le dernier relais du réseau trisynaptique excitateur de l'hippocampe et représente donc la principale porte de sortie de l'information, avant que celle-ci ne regagne le subiculum et le cortex entorhinal puis les différentes aires corticales (Lopes da Silva, 1990; Johnston et Amaral, 1998). D'autre part, une lésion restreinte à la région CA1 de l'hippocampe est suffisante pour engendrer des déficits mnésiques significatifs (Zola-Morgan, Squire et Amaral, 1986; Rempel-Clower *et al.*, 1996). D'ailleurs, l'interférence avec la plasticité synaptique de la voie des collatérales de Schaffer est suffisante pour affecter la mémoire, alors que l'interférence avec la plasticité de la voie des fibres moussues n'a pas d'effet (Milner, Squire et Kandel, 1998). Toutes ces raisons font donc du CA1 une zone particulièrement importante pour le traitement de l'information et la formation des traces mnésiques, et justifient ainsi le choix de cette région pour notre étude.

1.3. LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE À LONG-TERME

Après avoir établi que l'hippocampe était une région nécessaire à la formation de la mémoire explicite, de nombreuses études se sont intéressées aux mécanismes cellulaires à la base de la formation des nouveaux souvenirs. Santiago Ramón y Cajal a sans doute été le premier à postuler qu'un renforcement des connexions synaptiques actives pourrait être à la base du stockage de l'information dans le système nerveux central (Ramón y Cajal, 1911). En 1949, Donald O. Hebb, neuropsychologue canadien, reprend cette idée et propose que lorsque deux neurones, de part et d'autre d'une synapse, sont actifs de façon synchrone et répétée, il s'ensuit un renforcement de cette connexion synaptique (Hebb, 1949). Avant de décrire plus en détail la plasticité synaptique que l'on peut observer au sein de l'hippocampe, il convient d'abord d'introduire brièvement le concept de synapse.

1.3.1. La synapse comme point de communication entre les neurones

Les neurones, cellules spécialisées du système nerveux, communiquent entre eux à l'aide de signaux électriques qui se propagent à travers le réseau neuronal grâce aux synapses. La synapse est ainsi classiquement définie comme le point de contact fonctionnel et de communication entre deux neurones, et permettant d'assurer un transfert fidèle et efficace de l'information. On appelle neurone présynaptique celui qui transmet l'information et postsynaptique celui qui la reçoit (Kandel, Schwartz et Jessel, 2000; Purves *et al.*, 1999).

Il existe deux types de synapses au sein du système nerveux : la synapse électrique et la synapse chimique. La synapse électrique permet le passage direct et passif du courant électrique entre les neurones via des canaux spécialisés aussi appelés jonctions communicantes (*gap junctions*). Dans ce cas particulier, les neurones pré- et postsynaptiques sont en contact direct l'un avec l'autre. Cependant, ce n'est pas toujours le cas : en effet, au niveau d'une synapse chimique, les éléments pré- et postsynaptiques sont physiquement séparés par la fente synaptique, ce qui requiert une conversion de l'information électrique. Pour ce faire, les synapses chimiques ont recours à la sécrétion

de molécules spécialisées, les neurotransmetteurs, qui sont stockées dans des vésicules au niveau présynaptique (Kandel, Schwartz et Jessel, 2000; Purves *et al.*, 1999).

La transmission chimique est par ailleurs grandement majoritaire au sein du système nerveux, bien que, par opposition à la transmission électrique, elle requiert une succession complexe d'évènements que nous décrivons ici brièvement : tout d'abord, l'arrivée d'un signal électrique (ou potentiel d'action) dans la terminaison présynaptique génère une dépolarisation membranaire, qui entraîne à son tour l'ouverture de canaux calciques sensibles au voltage. L'entrée de calcium active par la suite la machinerie de fusion des vésicules synaptiques, ce qui déclenche la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Ceux-ci peuvent alors se lier aux récepteurs postsynaptiques et activer les canaux ioniques ou les seconds messagers qui leur sont associés. Finalement, le mouvement des ions au niveau postsynaptique génère un nouveau potentiel postsynaptique qui modifie l'excitabilité membranaire, ce qui convertit à nouveau l'information en signal électrique (Figure 4A) (Kandel, Schwartz et Jessel, 2000; Purves *et al.*, 1999).

Il existe plus d'une centaine de neurotransmetteurs, que l'on peut diviser en deux grandes catégories selon leur action au niveau postsynaptique : les neurotransmetteurs excitateurs, comme le glutamate, et les neurotransmetteurs inhibiteurs, comme le GABA. Les récepteurs au glutamate peuvent à leur tour se subdiviser en trois types majeurs (Figure 4B) (Kandel, Schwartz et Jessel, 2000; Purves *et al.*, 1999) :

- (1) Les récepteurs non-NMDA, comme les récepteurs AMPA et kaïnate, qui sont, pour la plupart, des canaux ioniques perméables au sodium (Na^+) et au potassium (K^+).
- (2) Les récepteurs NMDA, qui sont des canaux ioniques perméables au Na^+ , au K^+ et au calcium (Ca^{2+}). Contrairement aux récepteurs non-NMDA, les récepteurs NMDA requièrent à la fois la liaison du glutamate et d'un co-agoniste, la glycine. Les récepteurs NMDA possèdent également une autre particularité : ils sont bloqués par le magnésium extracellulaire (Mg^{2+}) tant que le neurone n'est pas dépolarisé (voir aussi section 1.3.2.2.)
- (3) Les récepteurs métabotropes du glutamate (mGluR), qui sont des récepteurs couplés aux protéines G, et donc à diverses cascades de signalisation (Kandel, Schwartz et

Jessel, 2000). Les récepteurs couplés aux protéines G sont donc couplés indirectement aux canaux ioniques.

Pour leur part, les récepteurs au GABA peuvent être subdivisés en deux grandes catégories :

- (1) Les récepteurs GABA_A, qui sont des canaux ioniques, perméables au chlore (Cl⁻).
- (2) Les récepteurs GABA_B, qui sont des récepteurs couplés aux protéines G.

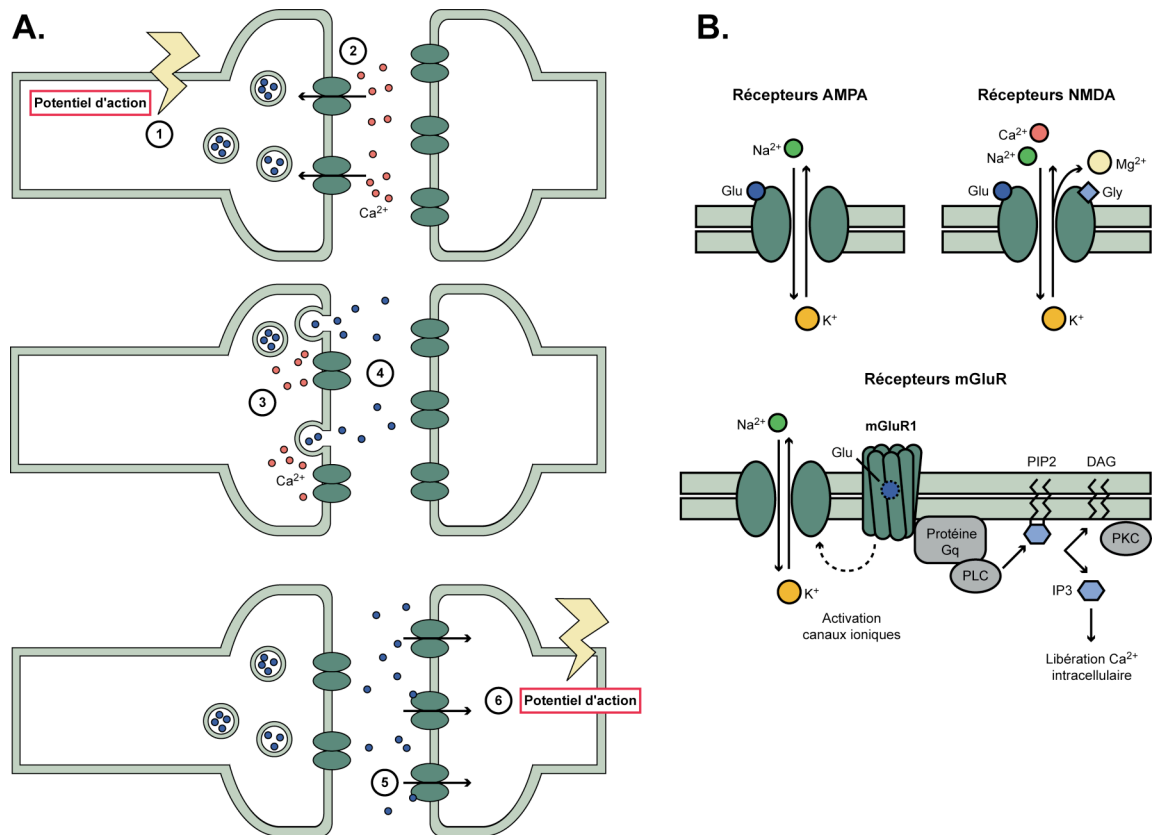


Figure 4 : La synapse chimique et les différents types de récepteurs au glutamate

A. Au niveau de la synapse chimique, la transmission synaptique se fait en plusieurs étapes successives : (1) l'arrivée du potentiel d'action dans le neurone présynaptique dépoliarise la terminaison; (2) ce qui provoque l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants et l'entrée de calcium dans la terminaison présynaptique. (3) L'entrée de calcium active la machinerie de fusion des vésicules synaptiques, (4) ce qui déclenche la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique. (5) Ces neurotransmetteurs peuvent alors diffuser librement et se lier aux récepteurs postsynaptiques et activer les canaux ioniques ou les seconds messagers associés, (6) ce qui provoque une dépoliarisation de la terminaison postsynaptique et la genèse d'un nouveau potentiel d'action. **B.** Il existe trois grandes classes de récepteurs au glutamate : les récepteurs AMPA, NMDA et mGluR. Les deux premiers sont des canaux ioniques alors que les récepteurs mGluR sont couplés aux protéines G (Adapté de Kandel, Schwartz et Jessel, 2000).

Bien entendu, il existe de nombreux autres neurotransmetteurs et récepteurs (Kandel, Schwartz et Jessel, 2000; Purves *et al.*, 1999). Cependant, leur description détaillée dépasse le cadre de cette thèse. Après avoir vu comment les neurones pouvaient communiquer entre eux, la section suivante décrit maintenant comment l'activité peut modifier une telle communication. Tel que mentionné plus haut, il a été suggéré dès le début du vingtième siècle que la plasticité synaptique, ou la capacité de changement du système nerveux, pourrait être à la base du stockage de l'information dans le système nerveux.

1.3.2. La potentialisation à long-terme

En 1973, Tim Bliss et Terje Lømo publient la première description complète d'un phénomène de renforcement d'une connexion synaptique qu'ils nomment alors la potentialisation à long-terme (*long-term potentiation* ou LTP) (Bliss et Lømo, 1973). Par la suite, plusieurs formes de plasticité synaptique ont tour à tour été décrites et définies, certaines visant à renforcer les connexions synaptiques et d'autres visant plutôt à les affaiblir, telles que la dépression à long-terme (*long-term depression* ou LTD) et la dépotentialisation. De ce fait, il apparaît maintenant clair que la plasticité synaptique ne contribue pas uniquement au renforcement des synapses mais sert plutôt à nuancer la force d'une connexion synaptique particulière. Cependant, la potentialisation à long-terme demeure sans conteste le modèle de prédilection pour expliquer, au niveau cellulaire, les mécanismes qui pourraient sous-tendre les phénomènes complexes de la mémoire et de l'apprentissage (Bliss et Collingridge, 1993 ; Kandel, Schwartz et Jessel, 2000; Lynch, 2004; Malenka et Nicoll, 1999). En effet, de nombreuses études ont à ce jour démontré que des variables affectant la LTP pouvaient également altérer certains types et certaines caractéristiques de la mémoire. Pour cette raison, nous nous attarderons tout particulièrement à sa description, avant de discuter brièvement de certaines autres formes de plasticité, plus précisément, la dépression à long-terme et la dépotentialisation.

1.3.2.1. Les propriétés de base de la potentialisation à long-terme

La potentialisation à long-terme est classiquement définie comme un renforcement durable de l'efficacité de la transmission synaptique faisant suite à certains types de

stimulation répétée. Les expériences de Bliss et Lømo ont été les premières à démontrer que la téτανisation, ou l'application de trains de stimuli à haute fréquence, au niveau de la voie des collatérales de Schaffer pouvait augmenter l'amplitude des réponses postsynaptiques enregistrées, et donc faciliter la transmission synaptique (Bliss et Lømo, 1973). Ces travaux ont ainsi ouvert la voie à une série d'études, cherchant toutes à déterminer les paramètres minimaux pour l'induction de la LTP et ont permis de reconnaître qu'il existe plusieurs façons d'induire expérimentalement la LTP.

La LTP est donc couramment induite par des trains de stimulation de forte intensité à haute fréquence (typiquement, un ou plusieurs trains de 50-100 stimuli à une fréquence supérieure ou égale à 100 Hz). Cependant, la LTP peut aussi être induite par des stimuli plus modestes, notamment des bouffées de stimuli mimant l'activité thêta intrinsèque de l'hippocampe (typiquement, des bouffées de 4 stimuli à 100 Hz délivrés toutes les 200 ms; Bliss et Lømo, 1973). D'autre part, la LTP peut aussi être induite chimiquement, par des agents qui activent directement les cascades moléculaires nécessaires à son développement (Bliss et Lømo, 1973; Kandel, Schwartz et Jessel, 2000).

Parmi les principales caractéristiques de la LTP, on peut notamment citer la coopérativité, l'associativité, la spécificité et la durabilité des changements synaptiques. Tout d'abord, la coopérativité prédit que la LTP peut être induite lorsque l'activité synaptique dépasse un certain seuil, soit lors d'une seule stimulation de forte intensité, soit lors de la coopération de plusieurs stimuli de moindre intensité. Ensuite, l'associativité prévoit que l'activation soutenue ou répétée d'un groupe de synapses peut faciliter la LTP à un autre groupe indépendant de synapses du même neurone, à condition que ces deux groupes soient activés à l'intérieur d'une fenêtre temporelle finie. Enfin, la spécificité implique que les modifications et les renforcements subséquents soient restreints aux synapses activées (Bliss et Collingridge, 1993 ; Lynch, 2004; Malenka et Nicoll, 1999).

D'autre part, on peut distinguer deux phases dans la LTP. La première, dite phase précoce (ou *early-LTP*) et durant de 1 à 3 heures, est classiquement induite par un seul train de stimulation à haute fréquence et repose principalement sur la phosphorylation de protéines déjà présentes aux synapses. La deuxième, dite phase tardive (ou *late-LTP*),

requiert elle, plusieurs trains de stimulation à haute fréquence et est associée à la formation de nouvelles synapses, via l'expression génique et la synthèse de nouvelles protéines (Bliss et Collingridge, 1993; Frey *et al.*, 1988, 1996; Kelleher, Govindarajan et Tonegawa, 2004; Krug, Lössner, et Ott, 1984; Nguyen, Abel et Kandel, 1994).

Une autre question d'intérêt, et qui a amplement été débattue par les chercheurs, concerne le lieu d'expression du renforcement synaptique suite à l'induction de la LTP : alors que certains travaux soutiennent l'hypothèse d'un renforcement purement présynaptique, d'autres démontrent que ces changements pourraient être limités au domaine postsynaptique. D'autres encore ont suggéré que la phase précoce impliquerait des modifications au niveau présynaptique, et que la phase tardive impliquerait plutôt des modifications au niveau postsynaptique. Cependant, tel que décrit ci-dessous (voir sections 1.3.2.3. et 1.3.2.4), il est plausible que ces mécanismes ne soient pas mutuellement exclusifs et que l'expression de la LTP requière plutôt une combinaison de ces différents phénomènes (Bliss et Collingridge, 1993).

1.3.2.2. L'induction de la LTP et l'importance des récepteurs NMDA et de l'influx calcique

Tel que mentionné plus haut, le postulat de Hebb implique que le renforcement d'une connexion synaptique particulière ne peut survenir que lorsque l'activité présynaptique coïncide avec l'activité postsynaptique (Hebb, 1949). Or, plusieurs propriétés des récepteurs NMDA, notamment leur dépendance au voltage (due au blocage du canal par le Mg^{2+}) et leur perméabilité au Ca^{2+} en font de bons candidats pour remplir le rôle de détecteurs d'activité coïncidente entre les éléments pré- et postsynaptiques (Bliss et Collingridge, 1993). En effet, les récepteurs NMDA ne sont pleinement actifs que lorsque : (1) il y a libération de glutamate par les terminaisons présynaptiques et (2) lorsque la dépolarisation postsynaptique est suffisante pour permettre de lever le blocage du canal par le magnésium (Kandel, Schwartz et Jessel, 2000).

En 1986, Richard Morris, et son équipe établissent pour la première fois que l'application d'un antagoniste sélectif des récepteurs NMDA, l'acide aminophosphonovalérique (ou AP5), peut bloquer l'induction de la LTP et causer des

déficits d'apprentissage spatial (Morris *et al.*, 1986; Morris, 1989), suggérant ainsi l'importance des récepteurs NMDA pour l'induction de la LTP.

Parallèlement, en 1983, Gary Lynch et son équipe découvrent que l'injection intracellulaire d'EGTA, un chélateur du calcium, bloque également l'induction de la LTP (Lynch *et al.*, 1983). Puis en 1988, Roger Nicoll, Robert Malenka et leurs collaborateurs démontrent que l'injection postsynaptique de nitr-5, un composé photolabile libérant du calcium lorsque stimulé par des rayons U.V., potentialise les réponses synaptiques des cellules pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe (Malenka *et al.*, 1988). Ainsi, ces résultats démontrent que l'élévation postsynaptique de la concentration de calcium intracellulaire est à la fois nécessaire et suffisante pour l'induction de la LTP. Or, il a également été prouvé que les récepteurs NMDA étaient perméables au calcium (MacDermott *et al.*, 1986). On peut dès lors concevoir un modèle dans lequel l'activité synaptique soutenue et répétée active les récepteurs NMDA qui, à leur tour, permettent l'entrée de calcium et le déclenchement des cascades moléculaires nécessaires à l'induction de la LTP.

Cependant, il est important de noter que, même si l'entrée de calcium est nécessaire et suffisante à l'induction de la LTP, l'activation des récepteurs NMDA, elle, n'est pas toujours requise. Certaines formes de LTP ont effectivement été décrites comme étant dépendantes de l'activation de récepteurs calciques sensibles au voltage, et indépendantes de l'activation de récepteurs NMDA. C'est notamment le cas de la LTP dite non-associative que l'on peut observer au niveau des synapses entre les fibres moussues et les cellules pyramidales de la région CA3 dans l'hippocampe (Grover et Teyler, 1990; Milner, Squire et Kandel, 1998). Néanmoins, la LTP à laquelle cette thèse s'intéresse, c'est-à-dire la LTP qu'on peut observer aux synapses entre les collatérales de Schaffer et les cellules pyramidales de CA1, est dépendante des récepteurs NMDA (Kandel, Schwartz et Jessel, 2000; Morris *et al.*, 1986; Morris, 1989). Les prochaines sections s'attardent donc maintenant à la description des différentes étapes nécessaires à l'expression de la LTP à ces mêmes synapses.

1.3.2.3. Les mécanismes de la phase précoce de la potentialisation à long-terme

Tel que mentionné ci-dessus (voir section 1.3.2.1.), la potentialisation à long-terme peut être divisée en deux phases majeures : une phase dite précoce qui requiert la phosphorylation de protéines déjà existantes, et une phase dite tardive qui nécessite la synthèse de nouvelles protéines. Cette distinction repose en grande partie sur les études entreprises sur le mollusque marin *Aplysia Californica*, plus communément appelé aplysie. En effet, la relative simplicité du système nerveux central de cet invertébré a permis l'analyse détaillée des circuits neuronaux impliqués dans des formes simples d'apprentissage, telles que l'habituation ou la sensibilisation du réflexe de retrait de la branchie (Castellucci *et al.*, 1970, 1976, 1978; Kandel, 2001; Kandel, Schwartz et Jessel, 2000). Ce système plus simple a également facilité l'identification des cascades moléculaires nécessaires au développement de la LTP chez les invertébrés, cascades qui possèdent de plus de nombreuses similitudes avec celles requises lors de l'induction de la LTP chez les vertébrés. Dans les prochaines sections, nous décrivons brièvement quelques mécanismes de la phase précoce de la potentialisation à long-terme.

1.3.2.3.1. La génération d'AMPC et la phosphorylation de PKA

Chez l'aplysie, la sensibilisation à court-terme du réflexe de retrait de la branchie active les récepteurs de la sérotonine (5-HT) des afférences sensorielles du siphon. Ces récepteurs 5-HT sont couplés aux protéines G_s, qui, via l'activation de l'adénylate cyclase, favorisent la conversion de l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine monophosphate cyclique (AMPC) (Bernier *et al.*, 1982; Brunelli, Castellucci et Kandel, 1976; Cedar et Schwartz, 1972; Kandel, Schwartz et Jessel, 2000). L'AMPC ainsi produit active à son tour la protéine kinase dépendante de l'AMPC (PKA) (Figure 5A) et celle-ci peut alors phosphoryler divers substrats et initier le renforcement synaptique, tel que décrit ci-dessous (voir sections 1.3.2.3.4. et 1.3.2.3.5.) (Castellucci *et al.*, 1980, 1982; Kandel, Schwartz et Jessel, 2000).

Chez les vertébrés, l'augmentation des niveaux d'AMPC au cours de la phase précoce de la LTP est aussi une étape essentielle au développement du renforcement synaptique (Otmakhova *et al.*, 2000); cependant ce n'est pas l'activation des récepteurs 5-HT qui

active l'adénylate cyclase et la production d'AMPc mais plutôt l'entrée de calcium via les récepteurs NMDA. En effet, l'élévation calcique au niveau postsynaptique active la calmoduline, qui augmente à son tour l'activité de l'adénylate cyclase de type 1 (AC1), ainsi que la production d'AMPc et l'activité de PKA (Figure 5B) (Chetkovich *et al.*, 1991; Chetkovich et Sweatt, 1993; Kandel, Schwartz et Jessel, 2000; Slack et Pockett, 1991; Xia et Storm, 2005). Une fois activée, la protéine kinase A peut alors non seulement phosphoryler directement plusieurs substrats importants pour la LTP (voir sections 1.3.2.3.4. et 1.3.2.3.5.), mais aussi contribuer à l'activation d'autres kinases, telles que la protéine kinase dépendante du calcium et de la calmoduline II (CaMKII; voir section suivante).

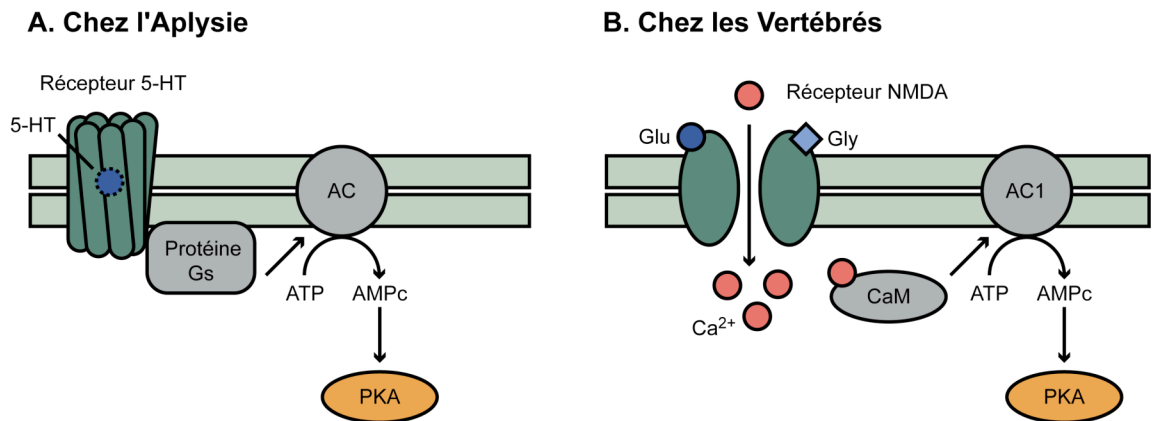


Figure 5 : L'activation de PKA

Schéma illustrant la cascade d'activation de l'adénylate cyclase (AC), de la production d'AMP cyclique (AMPc) et finalement de la protéine kinase A (PKA) **A.** chez un invertébré comme l'aplysie et **B.** chez les vertébrés (Adapté de Kandel, Schwartz et Jessel, 2000).

1.3.2.3.2. La phosphorylation de CaMKII

Chez les vertébrés, l'élévation des niveaux de calcium stimule la dissociation de la neurogranine et de la calmoduline, une protéine liant le calcium, ce qui augmente l'activité de cette dernière (Xia et Storm, 2005). Une fois libérée, la calmoduline peut lier divers substrats, parmi lesquels on peut citer la protéine kinase dépendante du calcium et de la calmoduline II (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase II* ou CaMKII) (Figure 6A). La CaMKII est une kinase particulière, formée de douze sous-unités arrangées en deux anneaux hexamériques et qui peut être activée à divers degrés selon le niveau de calcium et sa liaison à d'autres protéines. La liaison de la calmoduline au domaine auto-inhibiteur de CaMKII a une importance particulière, puisque c'est

celle-ci qui permet d'activer la kinase et qui favorise son auto-phosphorylation (Lisman, Schulman et Cline, 2002; Xia et Storm, 2005). Lorsque l'élévation calcique est faible, la calmoduline se dissocie de CaMKII rapidement et par conséquent, l'activation de la CaMKII ne perdure que momentanément. En revanche, lorsque l'élévation calcique est élevée, la calmoduline demeure associée plus longtemps aux sous-unités et induit un changement conformationnel de ces dernières, favorisant leur auto-phosphorylation par les sous-unités voisines. Une fois que toutes les sous-unités de CaMKII sont phosphorylées au niveau des résidus Thr286, CaMKII devient constitutivement active et son activité est alors indépendante des niveaux de calcium (Figure 6B).

Plusieurs études ont démontré que la CaMKII était activée par l'entrée de calcium via les récepteurs NMDA lors de l'induction de la LTP dans la région CA1, et que cette activation pouvait persister au moins une heure (Fukunaga *et al.*, 1993; Lisman, Schulman et Cline, 2002). Par la suite, de nombreux travaux ont démontré que l'activation de CaMKII est non seulement nécessaire (Giese *et al.*, 1998; Hinds, Tonegawa et Malinow, 1998; Lisman, Schulman et Cline, 2002; Silva *et al.*, 1992) mais aussi suffisante à l'induction de la LTP (Lisman, Schulman et Cline, 2002; Lledo *et al.*, 1995; Pettit, Perlman et Malinow, 1994).

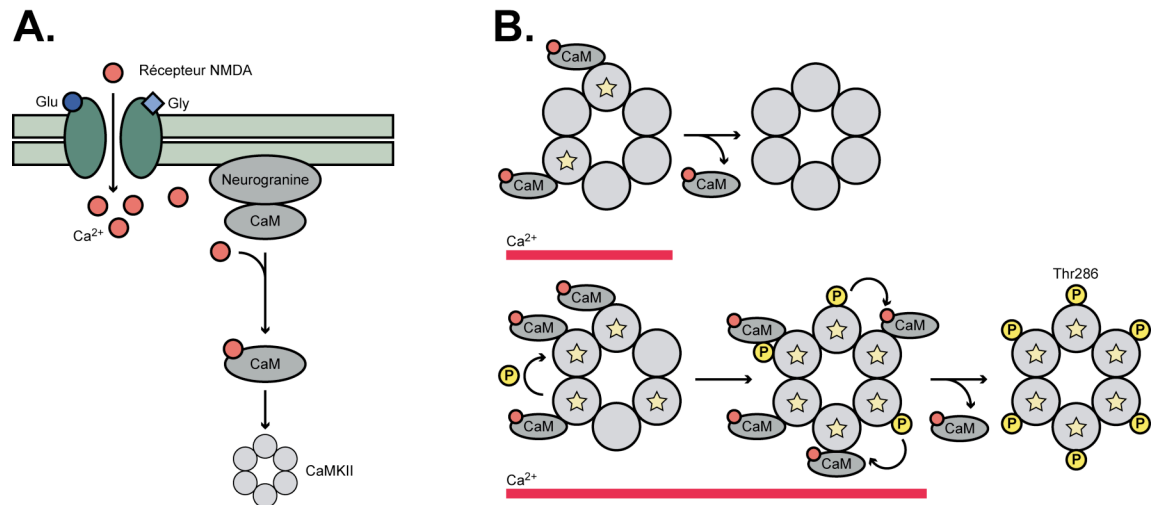


Figure 6 : L'activation de CaMKII

A. Schéma illustrant la cascade d'activation de la calmoduline (CaM) et de la protéine kinase dépendante du calcium et de la calmoduline II (CaMKII) chez les vertébrés (Adapté de Xia et Storm, 2005). **B.** Schéma illustrant l'activation de CaMKII en fonction des niveaux de calcium. Lorsque les niveaux de calcium sont faibles, la calmoduline se dissocie rapidement de la CaMKII, et l'activation de cette dernière (symbole de l'étoile) n'est que temporaire. En revanche, lorsque les niveaux de calcium sont élevés pour une durée prolongée, la calmoduline

reste associée plus longtemps à la CaMKII. Ceci provoque un changement conformationnel des sous-unités de CaMKII et favorise leur auto-phosphorylation sur le résidu Thr286 par les sous-unités voisines (Adapté de Lisman, Schulman et Cline, 2002).

1.3.2.3.3. La phosphorylation de PKC

Chez l'aplysie, l'activation des récepteurs 5-HT peut également activer un autre type de protéines G, les protéines G_o qui sont couplées à la phospholipase C (PLC). Une fois activée, cette dernière favorise l'hydrolyse des phospholipides membranaires et la production du diacylglycérol (DAG), qui à l'instar de l'AMPc peut activer une protéine kinase : la protéine kinase dépendante du calcium et des phospholipides (PKC) (Kandel, Schwartz et Jessel, 2000). Plusieurs études ont par ailleurs montré que l'activation de la PKC joue un rôle important dans la sensibilisation et la facilitation présynaptique (Braha *et al.*, 1990; Sacktor, Kruger et Schwartz, 1988; Sacktor et Schwartz, 1990; Sossin, Sacktor et Schwartz, 1994).

Chez les vertébrés, la PKC semble également jouer un rôle important pour le renforcement synaptique et la LTP. En effet, l'application d'agonistes de la PKC potentialise la transmission synaptique et occlut l'induction subséquente de la LTP à ces mêmes synapses (Akers *et al.*, 1986; Bliss et Collingridge, 1993; Hu *et al.*, 1987; Malenka, Madison et Nicoll, 1986), alors que l'application d'inhibiteurs de PKC réduit fortement la phase initiale de la LTP (Lovinger *et al.*, 1987; Reymann *et al.*, 1988).

Tel que décrit ci-dessus, l'entrée de calcium via les récepteurs NMDA joue un rôle primordial pour l'induction de la LTP. Nous pouvons maintenant ajouter que l'activation de plusieurs kinases clés sensibles au calcium, parmi lesquelles, CaMKII, PKA et PKC jouent elles aussi un rôle central. En effet, l'activation de ces cascades de signalisation permet à son tour d'initier différents mécanismes d'expression de la LTP. Les prochaines sections s'attardent maintenant à la description de ces modifications (Figure 7).

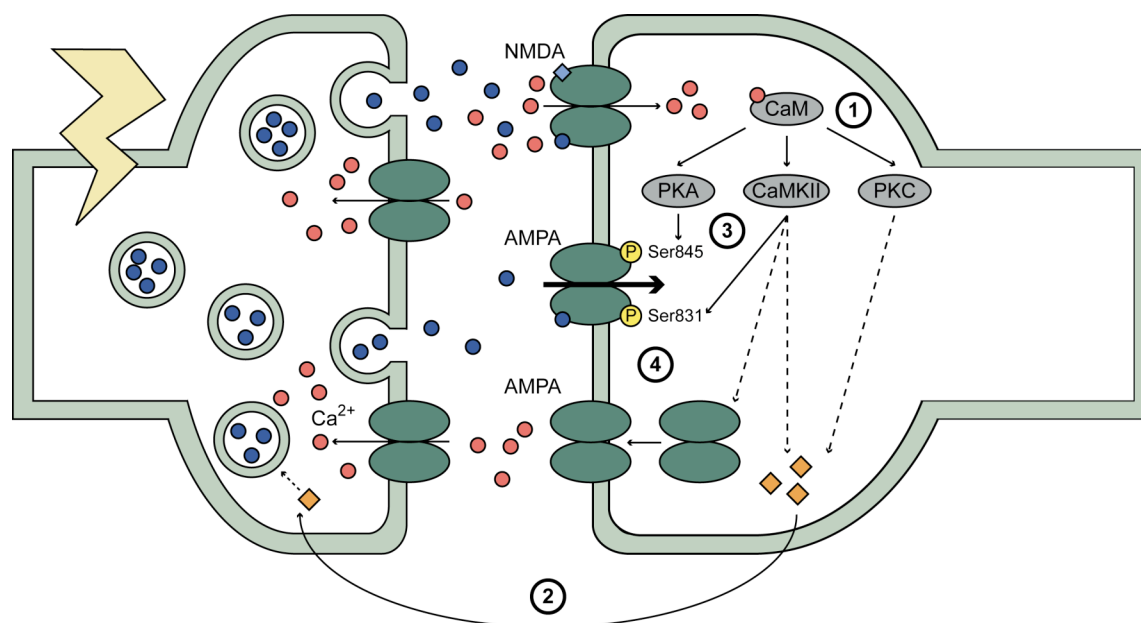


Figure 7 : Les mécanismes de la phase précoce de la LTP

La première phase de la LTP, ou phase précoce, est classiquement déclenchée par un unique train de stimulation à haute fréquence (1x100Hz). L'activité téτανique dépolarise la cellule postsynaptique et permet l'entrée de calcium via les récepteurs NMDA. Cette élévation calcique déclenche à son tour différents mécanismes qui contribuent au renforcement synaptique transitoire associé à la phase précoce de la LTP. Parmi ceux-ci on peut notamment citer : (1) l'activation de PKA, CaMKII et PKC; (2) l'augmentation de la libération de neurotransmetteurs au niveau présynaptique via la synthèse d'un messager rétrograde (losanges orange) qui peut diffuser et activer la machinerie de libération vésiculaire; (3) la phosphorylation des récepteurs AMPA déjà présents aux synapses par PKA et CaMKII, ce qui augmente leur conductance unitaire; et (4) l'insertion de nouveaux récepteurs AMPA (Adapté de Kandel, Schwartz et Jessel, 2000).

1.3.2.3.4. L'augmentation de la libération de neurotransmetteurs

Tel que mentionné plus haut (voir section 1.3.2.1.), la LTP est définie comme un renforcement durable de l'efficacité de la transmission synaptique, couramment mesuré comme une augmentation de la réponse postsynaptique. Or cette hausse pourrait être due à : (1) des modifications présynaptiques, générant une augmentation de la libération de neurotransmetteurs, (2) des modifications postsynaptiques, résultant en une hausse du nombre de récepteurs fonctionnels et/ou de leurs caractéristiques.

Un premier mécanisme qui pourrait donc expliquer la facilitation de la transmission synaptique est l'augmentation de la libération de neurotransmetteurs, au niveau présynaptique (Figure 7). Chez l'aplysie, il a effectivement été démontré que la stimulation répétée des afférences sensorielles du siphon augmente la libération de

neurotransmetteurs au niveau des synapses entre les neurones sensoriels du siphon et les neurones moteurs de la branchie. Ce processus est favorisé de plusieurs façons par l'activité conjointe de PKA et de PKC : directement, via l'action sur la machinerie de relâche des vésicules, et indirectement, via l'ouverture des canaux calciques de type L (Castellucci *et al.*, 1980; Kandel, Schwartz et Jessel, 2000; Klein et Kandel, 1978, 1980; Shapiro, Castellucci et Kandel, 1980). La PKA contribue également à l'augmentation de l'excitabilité postsynaptique via la fermeture de canaux potassiques (Castellucci *et al.*, 1980; Kandel, Schwartz et Jessel, 2000; Shapiro, Castellucci et Kandel, 1980; Siegelbaum, Camardo et Kandel, 1982).

Chez les vertébrés, plusieurs études ont souligné l'augmentation de la concentration extracellulaire de glutamate après l'induction de la LTP au niveau de l'hippocampe, une mesure qui suggère une hausse de la libération de neurotransmetteurs par les neurones présynaptiques (Aniksztejn *et al.*, 1989; Bliss et Collingridge, 1993; Dolphin, Errington et Bliss, 1982; Skrede et Malthé-Sørensen, 1981). En revanche, contrairement à ce qui est observé chez l'aplysie, ce mécanisme nécessite la génération d'un messenger rétrograde, capable de diffuser de la cellule postsynaptique vers la cellule présynaptique, y activant ainsi les cascades requises. Parmi les potentiels candidats à un tel rôle, on peut notamment citer l'acide arachidonique et l'oxyde nitrique (Bliss et Collingridge, 1993).

1.3.2.3.5. La phosphorylation des récepteurs AMPA

Un autre mécanisme qui pourrait expliquer l'augmentation de la transmission synaptique à court-terme est la phosphorylation des récepteurs AMPA postsynaptiques déjà présents à la synapse (Figure 7). Il est en effet reconnu que la phosphorylation peut augmenter la conductance unitaire de ces récepteurs (Derkach, Barria et Soderling, 1999) et qu'une augmentation des courants associés aux récepteurs AMPA pourrait être à la base du renforcement synaptique observé lors de la phase précoce de la LTP (Benke *et al.*, 1998; Kauer, Malenka et Nicoll, 1988; Muller et Lynch, 1988).

Après avoir démontré que la CaMKII était responsable de la phosphorylation des récepteurs AMPA durant la LTP (Barria *et al.*, 1997), d'autres travaux ont établi que cette phosphorylation se produisait au niveau de la Ser831 de la sous-unité GluR1

(Barria, Derkach et Soderling, 1997; Lee *et al.*, 2000; Mammen *et al.*, 1997). Parallèlement, d'autres études ont montré que la PKA pouvait également phosphoryler la sous-unité GluR1 des récepteurs AMPA au niveau d'un autre résidu, la Ser845 (Mammen *et al.*, 1997; Roche *et al.*, 1996), et que la phosphorylation de ce résidu pouvait aussi augmenter l'activité des récepteurs AMPA lors de la LTP.

De plus, il a été démontré que des souris mutantes pour ces deux sites de phosphorylation présentent à la fois une LTP et une mémoire spatiale réduites (Lee *et al.*, 2003), soulignant ainsi le rôle de l'augmentation de la conductance des récepteurs AMPA pour le renforcement synaptique.

1.3.2.3.6. L'insertion de nouveaux récepteurs AMPA

Enfin, tel que décrit plus haut, une augmentation de la transmission synaptique pourrait également s'expliquer par l'addition ou l'augmentation du nombre de récepteurs AMPA au niveau postsynaptique (Figure 7). Il a effectivement été démontré que certaines synapses, dites silencieuses, sont totalement dépourvues de récepteurs AMPA dans des conditions basales, et que c'est l'induction de la LTP qui favorise l'insertion des récepteurs AMPA à ces synapses (Hayashi *et al.*, 2000; Isaac, Nicoll et Malenka, 1995; Liao, Hessler et Malinow, 1995). L'addition de récepteurs AMPA à ces synapses contenant au départ uniquement des récepteurs NMDA, et donc inactives à des potentiels de repos, contribue à son tour à l'augmentation de la fréquence des réponses synaptiques minimales et à la diminution des échecs synaptiques (*synaptic failures*), un indice fréquemment associé à la phase précoce de la LTP (Bliss et Collingridge, 1993; Lisman et Harris, 1993).

Il a en effet été montré que l'induction de la LTP, et plus spécifiquement l'activation des récepteurs NMDA, déclenche une redistribution des récepteurs AMPA du compartiment intracellulaire à la membrane dendritique (Shi *et al.*, 1999), et que cette redistribution dépend de l'identité des sous-unités GluR des récepteurs AMPA. En effet, les récepteurs composés des sous-unités GluR1 et GluR2 sont préférentiellement ajoutés aux synapses suite à l'induction de la LTP, alors que ceux composés des sous-unités GluR2 et GluR3 ne font que renouveler de façon constitutive les récepteurs déjà présents à la membrane

(Collingridge, Isaac et Wang, 2003; Esteban, 2008; Hayashi *et al.*, 2000; Malinow et Malenka, 2002; Shi *et al.*, 2001).

Parallèlement, d'autres travaux ont démontré que la fusion membranaire des vésicules présentes au niveau postsynaptique est importante pour la phase précoce de la LTP (Lledo *et al.*, 1998). L'insertion des récepteurs AMPA se fait vraisemblablement selon deux mécanismes distincts mais néanmoins complémentaires: l'exocytose de vésicules et le recrutement de récepteurs AMPA extrasynaptiques (Collingridge, Isaac et Wang, 2003; Esteban, 2008; Lisman, Schulman et Cline, 2002; Malinow et Malenka, 2002). Selon ce modèle, les récepteurs AMPA sont d'abord insérés à la membrane extrasynaptique grâce à l'exocytose de vésicules, puis recrutés au niveau des synapses activées par diffusion latérale (Adesnik, Nicoll et England, 2005; Esteban, 2008; Passafaro, Piëch et Sheng, 2001).

Par ailleurs, il a récemment été démontré que l'élévation calcique peut favoriser le recrutement de CaMKII à la densité postsynaptique, ainsi que sa liaison aux récepteurs NMDA (Dosemeci *et al.*, 2001; Shen et Meyer, 1999). La CaMKII peut également se lier à l'actine de type F et ainsi recruter de façon indirecte les protéines associées aux récepteurs AMPA. Ainsi, l'activation de CaMKII suite à l'induction de la LTP pourrait jouer un rôle important durant la phase précoce de la potentialisation à long-terme, grâce au recrutement et à l'ancrage de nouveaux récepteurs AMPA aux synapses activées (Esteban, 2008; Lisman, Schulman et Cline, 2002; Lisman et Zhabotinsky, 2001).

1.3.2.4. Les mécanismes de la phase tardive de la potentialisation à long-terme

Tel que décrit précédemment (voir section 1.3.2.1.), la phase tardive de la LTP requiert la synthèse de nouvelles protéines, qui permettent de stabiliser et de renforcer durablement les changements synaptiques initiés lors de la phase précoce de la LTP. En effet, le modèle classique de la potentialisation à long-terme prédit que l'activation soutenue des cascades recrutées lors de la phase initiale de la LTP, et plus particulièrement l'activation de PKA, génère un signal rétrograde capable d'activer la transcription au niveau du noyau ainsi que la traduction somatique de nouvelles

protéines. Ces protéines sont ensuite transportées jusqu'aux dendrites, où elles sont utilisées pour le renforcement des synapses qui sont en cours de modification par l'activité synaptique (Figure 8) (Kandel, 2001; Kandel, Schwartz et Jessel, 2000). Cependant, nous verrons dans les sections suivantes que de nombreux indices suggèrent en fait plusieurs exceptions à cette règle : en effet, certaines formes de LTP indépendantes de la transcription ont désormais été décrites, ainsi que certaines formes dépendant uniquement de la traduction locale dans les dendrites.

1.3.2.4.1. L'activation soutenue et la translocation au noyau de PKA, MAPK et CaMKIV

Chez l'aplysie, la stimulation répétée des récepteurs 5-HT induit une activation persistante de la PKA, qui peut alors à son tour recruter la protéine kinase activée par les facteurs mitogènes (*mitogen-activated protein kinase* ou MAPK). Ces deux kinases sont alors relocalisées ensemble au niveau du noyau, là où la PKA peut phosphoryler la protéine liant l'élément de réponse à l'AMPC (*cAMP-response element binding protein* ou CREB), un facteur de transcription responsable de l'activation de nombreux gènes requis pour la stabilisation durable de la LTP (Figure 8) (Bacskai *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 1997a).

Chez les vertébrés, plusieurs études ont également souligné que la PKA est activée de façon persistante durant la phase tardive de la LTP et que celle-ci est nécessaire pour le recrutement de la transcription CREB-dépendante (Abel *et al.*, 1997; Frey, Huang et Kandel, 1993; Huang et Kandel, 1994; Nguyen et Woo, 2003), même si les mécanismes couplant l'activité synaptique et l'activation génique sont encore peu connus. Il a cependant été suggéré que, tout comme chez l'aplysie, la translocation de PKA et de MAPK au niveau du noyau joue un rôle important pour la phosphorylation et l'activation de CREB (Davis *et al.*, 2000; Matsushita *et al.*, 2001; Nguyen et Woo, 2003; Patterson *et al.*, 2000; Shaywitz et Greenberg, 1999). De plus, il a aussi été démontré que la protéine kinase dépendante du calcium et de la calmoduline IV (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV* ou CaMKIV) est relocalisée au niveau du noyau au cours de la phase tardive de la LTP et qu'elle joue un rôle important pour la phosphorylation et l'activation de CREB (Ho *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2001; Shaywitz et

Greenberg, 1999). Plus récemment, il a également été proposé que la translocation du facteur transducteur de la régulation de l'activité de CREB 1 (*transducer of regulated CREB activity 1* ou TORC1) serait nécessaire à l'activation de CREB et au renforcement de la LTP (Kovács *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2006); par ailleurs, l'activité de TORC1 reflèterait plus fidèlement l'activation de CREB que le niveau de phosphorylation de cette dernière au niveau de la sérine 133 (Ser133).

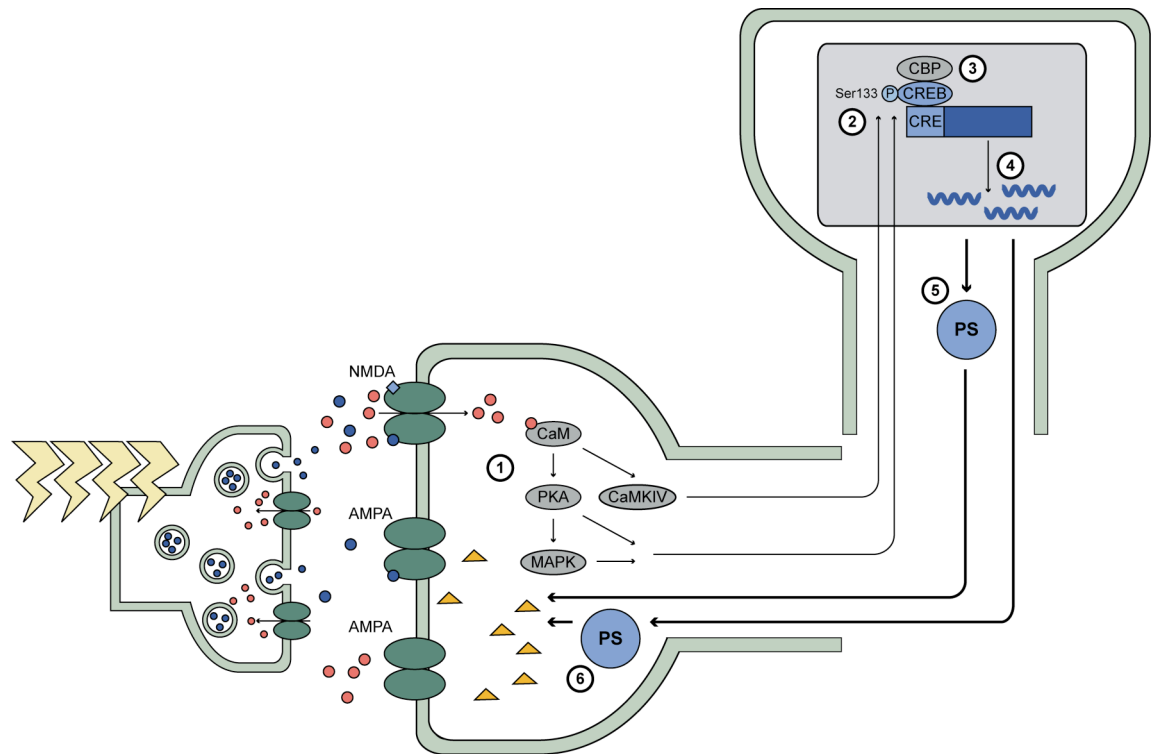


Figure 8 : Les mécanismes de la phase tardive de la LTP

La deuxième phase de la LTP, ou phase tardive, est classiquement déclenchée par plusieurs trains de stimulation à haute fréquence (4x100Hz). L'activité téτανique soutenue permet une entrée de calcium massive via les récepteurs NMDA. Cette élévation calcique prolongée déclenche à son tour différents mécanismes qui contribuent au renforcement synaptique persistant associé à la phase tardive de la LTP. Parmi ceux-ci on peut notamment citer : (1) l'activation et la translocation au noyau de PKA, MAPK et CaMKIV; (2) la phosphorylation du facteur de transcription CREB sur le résidu Ser133; (3) l'association de CREB et de CBP et l'activation de la transcription; (4) la synthèse de nouveaux ARNm qui peuvent être traduits (PS) soit au niveau du corps cellulaire (5), soit localement dans les dendrites (6). Les protéines nouvellement synthétisées (triangles orange) contribuent ensuite au renforcement synaptique des terminaisons activées (Adapté de Kandel, Schwartz et Jessel, 2000).

1.3.2.4.2. L'activation de la transcription

La protéine CREB est un facteur de transcription appartenant à la superfamille des facteurs bZIP et qui régule l'expression de gènes contenant dans leur promoteur une séquence CRE (*cAMP response element*). L'activation de CREB nécessite la

phosphorylation d'un résidu sérine (Ser133); une fois phosphorylée à ce niveau, CREB peut alors s'associer à la protéine liant CREB (*CREB binding protein* ou CBP) et c'est l'interaction de ces deux facteurs qui déclenche l'induction de la transcription (Figure 8). Tel que décrit ci-dessus, plusieurs kinases qui ont été impliquées dans la phase tardive de la LTP régulent la phosphorylation de CREB, notamment PKA, MAPK et CaMKIV (Lonze et Ginty, 2002; Nguyen et Woo, 2003). Cependant, la phosphorylation de CREB n'est pas le seul élément capable de réguler son activité. En effet, de nombreuses protéines peuvent se lier à CREB et ainsi réguler son état, parmi lesquelles le facteur activateur de la transcription (*activating transcription factor 4* ou ATF4), qui inhibe la transcription CREB-dépendante.

Chez l'aplysie, la stimulation répétée des neurones sensoriels du siphon active la transcription des gènes régulés par CREB, tel que mentionné ci-dessus (Kaang, Kandel et Grant, 1993; Lee *et al.*, 2008). D'autre part, il a été démontré que l'expression de ces gènes est nécessaire pour le renforcement durable du réflexe de retrait de la branchie (Bailey *et al.*, 1992; Bartsch *et al.*, 1995; Castellucci *et al.*, 1986; Dash *et al.*, 1990).

De même, chez les vertébrés, l'expression de gènes CREB-dépendants est augmentée par des stimuli capables d'induire la phase tardive de la LTP (Impey *et al.*, 1996) et par des sessions d'entraînement pour des tâches hippocampo-dépendantes (Impey *et al.*, 1998). L'expression de ces gènes est par ailleurs plus qu'une simple conséquence de l'activité synaptique. Plusieurs travaux ont en effet démontré que la transcription CREB-dépendante est nécessaire à la maintenance de la phase tardive de la LTP ainsi qu'à la consolidation de la mémoire à long-terme : alors que le blocage de CREB inhibe la LTP et la consolidation de la mémoire spatiale et des conditionnements émotionnels (*fear conditioning*) (Bourtchuladze *et al.*, 1994; Guzowski et McGaugh, 1997), à l'inverse, l'expression constitutive de cette même protéine facilite la LTP et la consolidation de la mémoire (Barco *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003; Pittenger *et al.*, 2002).

D'autre part, plusieurs travaux ont montré que le blocage ou la mutation des inhibiteurs de CREB, et plus particulièrement d'ATF4, facilitait l'induction de la plasticité synaptique et de la mémoire à long-terme chez l'aplysie (Bartsch *et al.*, 1995) et chez les mammifères (Chen *et al.*, 2003).

La transcription de gènes CREB-dépendants n'est cependant pas l'étape ultime de la stabilisation à long-terme de la LTP. En effet, les ARNm nouvellement synthétisés doivent ensuite être traduits et/ou renvoyés dans les synapses, afin de soutenir concrètement le renforcement synaptique.

1.3.2.4.3. La traduction de nouvelles protéines

Ainsi, une fois que les signaux en provenance des synapses activées sont acheminés au niveau du noyau et qu'ils ont déclenché la transcription CREB-dépendante et la synthèse de nouveaux ARNm, l'étape suivante consiste à traduire ces derniers en protéines qui pourront s'intégrer directement au niveau des synapses (Figure 8). Bien qu'il ait été suggéré que la régulation de la transcription représenterait le point de contrôle majeur pour la consolidation de la plasticité synaptique et que la synthèse de nouvelles protéines jouerait plutôt un rôle permissif ou secondaire dans ce processus, plusieurs travaux ont également souligné le rôle spécifique et crucial de la régulation de la traduction des ARNm nouvellement synthétisés lors de la plasticité synaptique à long-terme.

Chez l'aplysie, plusieurs travaux ont montré que la facilitation à long-terme de la transmission synaptique entre les neurones sensoriels du siphon et les neurones moteurs de la branchie nécessite la synthèse protéique (Bailey *et al.*, 1992; Castellucci *et al.*, 1986; Dale, Kandel et Schacher, 1987; Montarolo *et al.*, 1986). De même, la mémoire à long-terme du réflexe de retrait de la branchie requiert elle aussi la traduction de nouvelles protéines (Castellucci *et al.*, 1989; Goelet *et al.*, 1986).

Chez les vertébrés, il est également connu depuis plusieurs années que la synthèse protéique est nécessaire pour le maintien de la mémoire à long-terme (Davis et Squire, 1984; Flexner, Flexner et Stellar, 1963; Kelleher, Govindarajan et Tonegawa, 2004). De même, divers agents pharmacologiques capables d'inhiber la traduction sont également en mesure de bloquer la phase tardive de la LTP (Frey *et al.*, 1988; Kelleher, Govindarajan et Tonegawa, 2004; Krug, Lössner, et Ott, 1984; Stanton et Sarvey, 1984).

Tout comme pour la transcription, ces études pharmacologiques ont donc permis de délimiter les deux grandes phases de la LTP en fonction de leur dépendance à la synthèse de macromolécules. Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs pour de telles études comporte également certains inconvénients : il n'est en effet pas toujours possible de s'assurer de la spécificité absolue de ces drogues. Ces limitations ont donc favorisé le développement d'approches alternatives, parmi lesquelles les études génétiques et l'utilisation d'animaux transgéniques ont été particulièrement fructueuses (voir section 1.4.3.).

1.3.2.4.4. Le renforcement spécifique des synapses

Ainsi, la synthèse protéique est requise pour la consolidation des changements synaptiques et de la mémoire à long-terme. Cependant, cette nécessité soulève un certain nombre de questions connexes : tout d'abord, comment un événement survenant dans le corps cellulaire peut-il contribuer à renforcer des synapses particulières? Tel que décrit plus haut (voir section 1.3.2.1.), la spécificité, ou la restriction des changements aux synapses activées, fait formellement partie des propriétés de base de la LTP. Il doit donc exister un mécanisme permettant l'adressage sélectif des protéines nouvellement synthétisées aux synapses distantes subissant les modifications associées à la LTP. D'autre part, il a été démontré que toutes les formes de plasticité à long-terme, que ce soit la potentialisation à long-terme (LTP) ou la dépression à long-terme (LTD) nécessitent la traduction de nouvelles protéines (voir sections 1.3.2.1. et 1.3.3.1.3.). Or ces deux formes de plasticité régulent la transmission synaptique de façon opposée : alors que la première contribue à l'augmentation des réponses synaptiques, la seconde tend au contraire à les diminuer. Il est donc raisonnable de se demander si ces deux formes de plasticité induisent la synthèse d'un réservoir protéique commun qui est utilisé différemment selon les besoins des synapses, ou si au contraire, elles déclenchent la production d'un ensemble plus restreint de protéines.

Afin de tenter de répondre à ces questions, plusieurs hypothèses ont été avancées (Figure 9), parmi lesquelles on peut notamment citer :

- (1) L'hypothèse de l'adressage sélectif, qui prédit que seules les protéines nécessaires sont synthétisées au niveau du corps cellulaire puis spécifiquement acheminées aux synapses concernées.
- (2) L'hypothèse du marquage synaptique (ou *synaptic tagging*), qui prédit que les synapses activées sont spécifiquement « tagguées » ou marquées par la stimulation et que ce marquage permet la « capture » des protéines nécessaires parmi un large réservoir librement diffusé dans tout l'arbre dendritique.
- (3) L'hypothèse de la synthèse locale, qui prévoit que les ARNm nouvellement produits sont expédiés dans les dendrites sans distinction, puis traduits uniquement aux synapses activées; dans ce cas-ci, ce serait l'activité synaptique soutenue qui permettrait le recrutement de la machinerie traductionnelle aux synapses activées.

À ce jour, plusieurs travaux ont corroboré l'existence des deux derniers mécanismes, tel que nous le décrivons dans les deux sections suivantes. Il est par ailleurs plausible que ces deux processus ne soient pas mutuellement exclusifs et que la plasticité à long-terme utilise en fait plutôt une combinaison de ces deux mécanismes (Barco, Lopez de Armentia et Alarcon, 2008; Frey et Morris, 1998b).

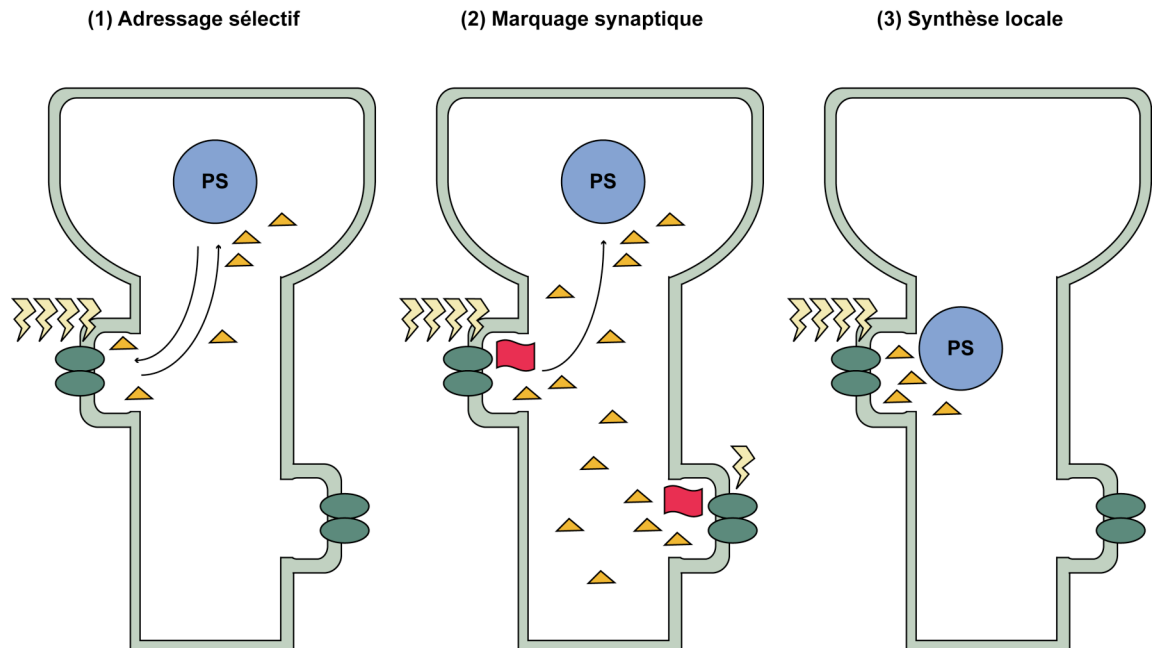


Figure 9 : Le renforcement spécifique des synapses; 3 hypothèses

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer comment les protéines nouvellement synthétisées pouvaient participer au renforcement spécifique des synapses activées. (1) Le modèle de l'adressage sélectif prédit que la synthèse protéique (PS) survient au niveau du corps cellulaire et que les protéines (triangles orange) sont ensuite sélectivement acheminées aux

synapses activées. (2) Le modèle du marquage synaptique de Frey et Morris prédit également que la traduction survient au niveau du corps cellulaire, mais que celles-ci peuvent être « capturées » par toutes les synapses ayant été préalablement « marquées » (drapeau rouge) par l'activité synaptique. (3) Finalement, le modèle de la synthèse locale prédit que les ARNm sont traduits uniquement aux synapses activées (Adapté de Frey et Morris, 1998b).

1.3.2.4.4.1. Le marquage synaptique

Uwe Frey et Richard Morris ont sans aucun doute été les pionniers de la théorie du marquage synaptique. En effet, lors d'une série d'expériences réalisées chez le rat, Frey et Morris ont effectué une série d'observations cruciales qui leur a permis par la suite de formuler leur hypothèse du marquage synaptique. L'originalité de ces travaux est principalement due à l'utilisation d'une préparation présentant deux inputs séparés, ou deux groupes de synapses indépendantes. En utilisant ce modèle, Frey et Morris ont confirmé qu'un seul train de stimulation à haute fréquence génère uniquement la phase précoce de la LTP, tel que précédemment décrit par plusieurs groupes. Cependant, si ce stimulus au premier input est précédé ou suivi d'un stimulus suffisant pour déclencher la phase tardive de la LTP à un deuxième input indépendant, il s'ensuit un renforcement durable tel qu'observé durant la phase tardive de la LTP au premier input (Frey et Morris, 1997; Frey et Morris, 1998a). Ces résultats suggèrent donc qu'un seul train de stimulation à haute fréquence est suffisant pour engendrer un marquage local et temporaire des synapses, indépendamment de la synthèse de nouvelles protéines. En revanche, plusieurs trains de stimulation à haute fréquence sont requis pour la création d'un signal rétrograde capable d'activer la synthèse de nouveaux ARNm et leur traduction au niveau du noyau, tel que décrit précédemment. Ces protéines sont alors librement distribuées dans les dendrites, mais ne peuvent être utilisées ou « capturées » que par les synapses qui ont été préalablement marquées (Figure 9) (Barco, Lopez de Armentia et Alarcon, 2008; Frey et Morris, 1998a, 1998b; Martin et Kosik, 2002).

Parallèlement, d'autres expériences réalisées par Eric Kandel et ses collaborateurs ont démontré que la capture des protéines nécessaires à la consolidation par les synapses préalablement marquées survenait aussi chez l'aplysie, suggérant une fois de plus la conservation des mécanismes plastiques à travers l'évolution (Casadio *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 1997b).

Par la suite, diverses hypothèses ont été émises quant à la nature du marqueur synaptique, parmi lesquelles on peut citer : l'activation constitutive d'une ou plusieurs kinases, une augmentation de la capacité de traduction locale ou encore une modification du diamètre des épines associée à un remodelage du réseau d'actine (Barco, Lopez de Armentia et Alarcon, 2008; Martin et Kosik, 2002). Cependant, à ce jour aucune de ces hypothèses n'a pu confirmer sans équivoque l'identité du marqueur synaptique.

1.3.2.4.4.2. La traduction locale dans les dendrites

Parallèlement, plusieurs travaux ont établi que les dendrites contiennent toute la machinerie nécessaire à la synthèse de nouvelles protéines. Notamment, des analyses réalisées par microscopie électronique ont démontré que de nombreux ribosomes, les unités fonctionnelles de synthèse protéique, sont présents dans les dendrites, et que la plupart de ceux-ci sont associés à des sites synaptiques, le plus souvent à la base des épines dendritiques (Steward et Levy, 1982; Steward et Schuman, 2001). De plus, approximativement la moitié de ces ribosomes sont également associés à des organelles tubulaires qui rappellent la configuration du réticulum endoplasmique rugueux, une structure nécessaire à l'adressage cellulaire des protéines (Steward et Reeves, 1988; Torre et Steward, 1996). D'autre part, les dendrites semblent également contenir des éléments de Golgi, plusieurs facteurs d'initiation et d'élongation ainsi que la machinerie nécessaire aux modifications post-traductionnelles et à l'insertion membranaire des protéines nouvellement synthétisées (Kacharina *et al.*, 2000; Pierce, Van Leyen et McCarthy, 2000; Tiedge et Brosius, 1996; Torre et Steward, 1996).

La possibilité de traduire localement des ARNm en protéines comporte par ailleurs de nombreux avantages dans un contexte de plasticité synaptique. En effet, alors que la production d'un signal rétrograde activant la traduction au niveau du corps cellulaire puis l'acheminement de ces nouveaux produits protéiques jusqu'aux dendrites demande un temps certain, la traduction locale à partir d'une réserve d'ARNm déjà présents dans les dendrites ne nécessite que peu de temps et permet ainsi une réponse beaucoup plus rapide aux événements synaptiques (Gingras, Raught et Sonenberg, 2001; Kelleher, Govindarajan et Tonegawa, 2004; Sutton et Schuman, 2005, 2006).

De nombreuses études ont à ce jour illustré que la synthèse de nouvelles protéines pouvait survenir rapidement suite à l'activité synaptique, suggérant ainsi que cette synthèse se produit plutôt localement qu'au niveau du corps cellulaire (Figure 9) (Aakalu *et al.*, 2001; Feig et Lipton, 1993; Ouyang *et al.*, 1999; Sutton et Schuman, 2005, 2006). Initialement, quelques études ont néanmoins avancé que la traduction locale dans les dendrites isolées ne serait pas suffisante pour assurer le maintien de la phase tardive de la LTP et que la transcription et la traduction au niveau du corps cellulaire sont absolument nécessaires à ce processus (Frey *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 2003). Cependant, des travaux plus récents ont au contraire montré que la LTP pouvait perdurer pendant plusieurs heures dans des dendrites sectionnées, et donc, isolés du corps cellulaire (Cracco *et al.*, 2005; Vickers, Dickson et Wyllie, 2005). Il n'est cependant pas impossible que ces mécanismes soient également complémentaires et que la synthèse locale permette la consolidation initiale de la plasticité synaptique, alors que la synthèse au niveau du corps cellulaire serait nécessaire pour la consolidation à plus long terme des changements synaptiques (Liu *et al.*, 2003). Ceci ne serait pas sans rappeler les mécanismes qui sous-tendent la plasticité synaptique chez l'aplysie et qui se déroulent, eux, en trois phases distinctes : la phase précoce, décrite précédemment, la phase intermédiaire, qui requiert la synthèse protéique locale, et la phase tardive, qui nécessite la transcription, la synthèse et l'importation de nouvelles protéines (Ghirardi, Montarolo et Kandel, 1995; Raymond, 2007).

1.3.2.4.4.3. Le transport des ARNm aux dendrites

D'autre part, si les ARNm sont spécifiquement traduits au niveau des synapses, cela implique qu'il doit exister un mécanisme permettant d'expédier spécifiquement les ARNm du corps cellulaire aux dendrites. Bien que la description détaillée de ce mécanisme dépasse le cadre de cette thèse, nous résumons ici quelques-unes des principales caractéristiques de l'adressage sélectif des ARNm aux dendrites.

Tout d'abord, il a été démontré que les ARNm qui sont dirigés vers la périphérie possèdent tous, dans leur région 3' non traduite, des séquences permettant l'adressage dendritique (Kiebler et DesGroseillers, 2000; Martin et Ephrussi, 2009). Ces séquences dites séquences cis (*cis-acting factors*) permettent l'association à différentes protéines

liant l'ARNm, aussi appelés facteurs trans (*trans-acting factors*). L'association des ARNm avec les protéines liant l'ARN permet ainsi la formation de structures nommées ribonucléoprotéines (Kiebler et DesGroseillers, 2000; Martin et Ephrussi, 2009).

Par la suite, l'association de plusieurs ARNm avec un ensemble de protéines liant l'ARNm forme des structures granulaires possédant la capacité de se déplacer le long des microtubules (Knowles *et al.*, 1996). Les granules forment une population hétérogène, dont la composition en ARNm et en protéines peut varier. Ces granules contiennent également des protéines ribosomales ainsi que divers répresseurs de la traduction, qui assurent que les ARNm ne sont pas traduits avant d'être arrivés à destination (Besse et Ephrussi, 2008; Kiebler et DesGroseillers, 2000; Martin et Ephrussi, 2009). D'autre part, il a été démontré que ces granules se lient aux éléments du cytosquelette par l'intermédiaire de protéines motrices appartenant notamment à la famille des kynésines (Hirokawa, 2006; Martin et Ephrussi, 2009)

En somme, l'acheminement des ARN messagers est un processus complexe, que l'on peut subdiviser en plusieurs étapes : (1) l'exportation des ARNm du noyau vers le cytosol; (2) la formation des granules d'ARNm; (3) le transport de ces granules le long des microtubules et des filaments d'actine; (4) l'ancrage et la traduction des ARNm au niveau des dendrites et plus particulièrement des synapses (Kiebler et DesGroseillers, 2000; Martin et Ephrussi, 2009; Martin et Zukin, 2006; Sánchez-Carbente et Desgroseillers, 2008).

Dans un autre ordre d'idées, plusieurs travaux ont démontré que l'activité synaptique, l'application de neurotrophines ou encore d'analogues de l'AMPC pouvaient moduler le transport des ARNm et des granules (Kiebler et DesGroseillers, 2000; Krichevsky et Kosik, 2001 ; Sossin et DesGroseillers, 2006), ce qui suggère que le transport des ARNm vers les dendrites pourrait être un mécanisme activement impliqué dans la plasticité synaptique. De récents travaux ont d'ailleurs apporté quelques indices en faveur de cette hypothèse, en démontrant que la mutation de protéines impliquées dans le transport de l'ARNm et la formation des granules altère la plasticité synaptique à long-terme (Lebeau *et al.*, 2008).

Ainsi, le transport des ARNm vers les dendrites pourrait être un mécanisme permettant de répondre rapidement aux besoins des synapses activées, et de coupler ainsi efficacement l'activité transcriptionnelle au noyau à la machinerie de traduction locale.

1.3.2.4.5. Le remodelage des épines

Finalement, la phase tardive de la LTP a également été associée à des changements structuraux au niveau des épines et à la formation de nouvelles synapses. Chez l'aplysie, plusieurs travaux ont montré que la facilitation à long-terme est associée à la croissance de nouvelles protubérances dendritiques au niveau des neurones sensoriels (Bailey et Kandel, 1993, 2008). De même, chez les vertébrés, la phase tardive de la LTP a été associée à une expansion de la densité postsynaptique et une croissance des épines, ainsi qu'à un remodelage du squelette d'actine (Bramham, 2008; De Roo *et al.*, 2008). Il a de plus été suggéré que c'est la synthèse d'Arc, un ARNm dont la traduction est augmentée lors de la LTP, qui est responsable de l'activation de la polymérisation de l'actine et du remodelage dendritique. Il se pourrait donc qu'une partie des protéines nouvellement synthétisées serve directement aux changements structuraux associés à la LTP.

Par ailleurs, plusieurs travaux ont démontré que la potentialisation à long-terme est non seulement associée à la croissance des épines, mais aussi à la formation de nouvelles synapses, dans les trente minutes qui suivent l'induction de la potentialisation à long-terme (Engert et Bonhoeffer, 1999; Maletic-Savatic, Malinow et Svoboda, 1999). Bien que ce laps de temps soit probablement trop court pour permettre à la synaptogenèse de participer aux mécanismes de la phase précoce de la LTP, la formation de nouvelles synapses pourrait néanmoins jouer un rôle dans la phase tardive de la LTP. Dans cette optique, d'autres études ont établi que la synaptogenèse est un processus rapide, mais que l'établissement de synapses fonctionnelles nécessite quant à elle plusieurs heures. Ces données renforcent donc l'idée selon laquelle la formation de nouvelles synapses aurait un rôle à jouer dans le maintien plutôt que dans l'établissement de la potentialisation à long-terme (De Roo *et al.*, 2008; Knott *et al.*, 2006; Nägerl *et al.*, 2007).

En somme, l'expression de la LTP nécessite une suite complexe d'évènements cellulaires. Ces derniers peuvent survenir à la fois dans le compartiment présynaptique et dans le compartiment postsynaptique. De plus, alors que certains changements sont probablement restreints aux synapses activées (comme l'insertion de nouveaux récepteurs AMPA), d'autres sont généralisés à l'ensemble de la cellule (comme la transcription CREB-dépendante). Il est par ailleurs important de souligner que l'expression de la LTP à une synapse donnée est grandement influencée par l'activité antérieure à cette même synapse, un phénomène appelé métaplasticité (Abraham et Bear, 1996; Abraham et Tate, 1997).

1.3.3. Les autres formes de plasticité synaptique

Ainsi, même si la potentialisation à long-terme (LTP) est l'une des formes de plasticité les plus fréquemment étudiées, il existe également d'autres formes de plasticité au niveau de l'hippocampe, telles que la dépression à long-terme (LTD) et la dépotentialisation. De par leur contribution à l'affaiblissement de certaines connexions et à la réinitialisation des marqueurs synaptiques, ces formes de plasticité pourraient empêcher la saturation de l'activité synaptique et garantir ainsi l'existence d'une gamme dynamique de modifications synaptiques (Zhou et Poo, 2004). Les prochaines sections s'attardent donc à la description de la LTD et de la dépotentialisation.

1.3.3.1. La dépression à long-terme

La dépression à long-terme (LTD) peut se définir comme étant un affaiblissement durable de l'efficacité de la transmission synaptique faisant suite à certains types de stimulation à basse fréquence. En conséquence, elle peut donc être considérée comme le pendant de la LTP, permettant de réguler la force des connexions synaptiques de façon bidirectionnelle. La LTD peut couramment être induite par une stimulation à basse fréquence prolongée (habituellement, 900 stimuli délivrés à une fréquence variant entre 0.5 et 3 Hz) et peut perdurer pendant plusieurs heures (Dudek et Bear, 1992, 1993; Malenka et Bear, 2004). Il semble cependant que ce type de stimulation peut induire plusieurs formes de dépression, dont les mécanismes d'induction et possiblement de maintien de la plasticité diffèrent (Oliet, Malenka et Nicoll, 1997).

1.3.3.1.1. La dépression NMDA-dépendante

La première forme de dépression synaptique à avoir été décrite nécessite l'activation des récepteurs NMDA et l'entrée de calcium au niveau postsynaptique (Dudek et Bear, 1992; Malenka et Bear, 2004; Mulkey et Malenka, 1992). Cette LTD NMDA-dépendante requiert l'activité de phosphatases telles que PP1/PP2A et PP2B, ou calcineurine (Mulkey, Herron et Malenka, 1993; Mulkey *et al.*, 1994). L'activation de ces phosphatases contribuerait d'une part à la déphosphorylation de kinases clés telles que PKA et PKC (Hrabetova et Sacktor, 2001; Kameyama *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998; van Dam *et al.*, 2001), et d'autre part, à la déphosphorylation des récepteurs AMPA (Kameyama *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998, 2000) et à leur internalisation (Beattie *et al.*, 2000; Carroll *et al.*, 1999; Man *et al.*, 2000). On peut donc noter que l'expression de la LTD génère des changements opposés à ceux induits par la LTP.

1.3.3.1.2. La dépression mGluR-dépendante

D'autre part, une autre forme de dépression, qui peut être mimée par l'application de (RS)-3,5-dihydrophénylglycine (DHPG), un agoniste sélectif des récepteurs mGluR de groupe 1, a également été rapportée (Malenka et Bear, 2004; Oliet, Malenka et Nicoll, 1997). Cette forme de dépression, initialement décrite au niveau du cortex cérébelleux aux synapses entre les fibres parallèles et les cellules de Purkinje (Linden *et al.*, 1991; Ito, Sakurai et Tongroach, 1982) a par la suite été rapportée au niveau de l'hippocampe (Oliet, Malenka et Nicoll, 1997). Il apparaît de plus que cette seconde forme de LTD nécessite également l'internalisation des récepteurs AMPA (Snyder *et al.*, 2001; Xiao, Zhou et Nicoll, 2001).

1.3.3.1.3. La traduction de nouvelles protéines, un mécanisme commun

Par ailleurs, il convient de noter que la LTD, à l'instar de la LTP (voir section 1.3.2.1.), requiert la synthèse de nouvelles protéines pour la stabilité de son expression à long-terme (Huber, Kayser et Bear, 2000; Kauderer et Kandel, 2000; Manahan-Vaughan, Kulla et Frey, 2000; Sajikumar et Frey, 2003). Cette redondance dans les mécanismes d'expression de deux formes de plasticité opposées soulève donc plusieurs interrogations, tel que mentionné précédemment (voir section 1.3.2.4.4.). En effet, on

peut se demander si ces événements déclenchent la synthèse d'un réservoir commun de protéines, ou si au contraire, elles génèrent des ensembles de protéines restreints et adaptés aux modifications synaptiques requises. Récemment, la description d'un cas particulier de capture synaptique a fourni quelques indices à ce sujet : il semble en effet, qu'il existe non seulement une interaction entre les formes précoce et tardive de la LTP (voir section 1.3.2.4.4.1.), mais aussi entre les formes précoce et tardive de la LTP et de la LTD (un phénomène nommé marquage croisé ou « *cross-tagging* » par les auteurs). Ces résultats corroborent donc l'hypothèse de la synthèse d'un réservoir de protéines commun, ainsi que l'existence de marqueurs spécifiques permettant la capture des protéines nécessaires selon les besoins de la synapse (Barco, Lopez de Armentia et Alarcon, 2008; Sajikumar et Frey, 2004a).

1.3.3.2. La dépotentialisation

La dépotentialisation a été décrite pour la première fois par Gary Hesse et Timothy Teyler (Hesse et Teyler, 1976). Ceux-ci avaient remarqué que la LTP était suivie d'une courte période pendant laquelle l'activité synaptique subséquente pouvait contrecarrer les changements plastiques en cours. On peut donc définir la dépotentialisation comme étant un renversement de la potentialisation, induit notamment par une stimulation à basse fréquence de ces mêmes synapses (Barrionuevo, Schottler et Lynch, 1980; Fujii *et al.*, 1991; Larson, Xiao et Lynch, 1993; Staubli et Lynch, 1990; Zhou et Poo, 2004).

Récemment, il a été suggéré que la dépotentialisation pouvait interférer avec les marqueurs synaptiques (Sajikumar et Frey, 2004b). En effet, si un train de stimulation tétanique est suivi d'une période de stimulation à basse fréquence (5 Hz), on observe une diminution significative de l'amplitude et de la durée de la forme transitoire de la LTP. De plus, cette même stimulation empêche la conversion de la LTP précoce en LTP soutenue lors d'un protocole de capture. De même, une autre étude a démontré que si la stimulation à basse fréquence précède des trains de stimulation tétanique, elle peut interférer de façon spécifique avec le marquage synaptique, sans aucun effet notable sur la production du signal rétrograde permettant d'activer la transcription (Young et Nguyen, 2005). Selon les auteurs, cet effet de la stimulation à basse fréquence pourrait être exercé par des phosphatases, telles que PP1/PP2A et PP2B (aussi connue sous le

nom de calcineurine). Il a en effet été démontré que la stimulation à basse fréquence activait ces phosphatases (Morishita *et al.*, 2001), que la dépotentialisation nécessitait l'activité de ces phosphatases (Huang, Liang et Hsu, 2001; Jouvenceau *et al.*, 2003; Kang-Park *et al.*, 2003; Zhuo *et al.*, 1999), et que celles-ci pouvaient contrecarrer l'effet des kinases nécessaires à l'induction de la LTP, telles que PKA et CaMKII (Huang Liang et Hsu, 2001; Zhou et Poo, 2004).

1.4. LES MÉCANISMES TRADUCTIONNELS DE LA POTENTIALISATION À LONG-TERME

Ainsi, tel que nous venons de le décrire, la synthèse de nouvelles protéines joue un rôle crucial pour les formes tardives de la LTP et de la LTD. Cependant, les mécanismes générant la plasticité synaptique et surtout, leurs liens avec la traduction demeurent des phénomènes complexes dont on ne comprend pas encore pleinement l'origine au niveau moléculaire. En effet, bien qu'on sache depuis plusieurs années que la synthèse protéique est nécessaire à la maintenance des formes tardives de plasticité, l'identité des protéines requises, de même que les voies de signalisation couplant l'activité synaptique et les changements traductionnels au niveau du corps cellulaire et/ou des dendrites demeurent peu compris. La régulation de la traduction est d'autant plus importante qu'elle possède certains avantages sur la régulation de la transcription, notamment parce qu'elle permet de moduler rapidement le contenu des synapses et qu'elle leur permet ainsi de répondre promptement à l'activité synaptique (Gebauer et Hentze, 2004; Kelleher, Govindarajan et Tonegawa, 2004; Klann et Dever, 2004).

1.4.1. L'initiation de la traduction comme facteur limitant

La synthèse de nouvelles protéines est un processus très énergivore et par conséquent hautement régulé, à la fois par de nombreux facteurs internes, dits facteurs de traduction, mais aussi par des facteurs considérés comme externes, tels que les neurotransmetteurs et les facteurs de croissance. La traduction peut d'autre part se subdiviser en trois grandes étapes finement régulées : (1) l'initiation, ou l'assemblage d'un ribosome compétent; (2) l'élongation, ou l'assemblage de la chaîne polypeptidique; et (3) la terminaison, ou la libération de la chaîne polypeptidique par le ribosome (Sonenberg et

Dever, 2003; Sonenberg, Hershey et Matthews, 2000). Il est cependant largement admis que la régulation de la traduction des ARNm eukaryotiques se fait principalement au niveau de l'initiation et par conséquent, cette étape est considérée comme limitante pour la synthèse protéique (Figure 10) (Sonenberg, Hershey et Matthews, 2000).

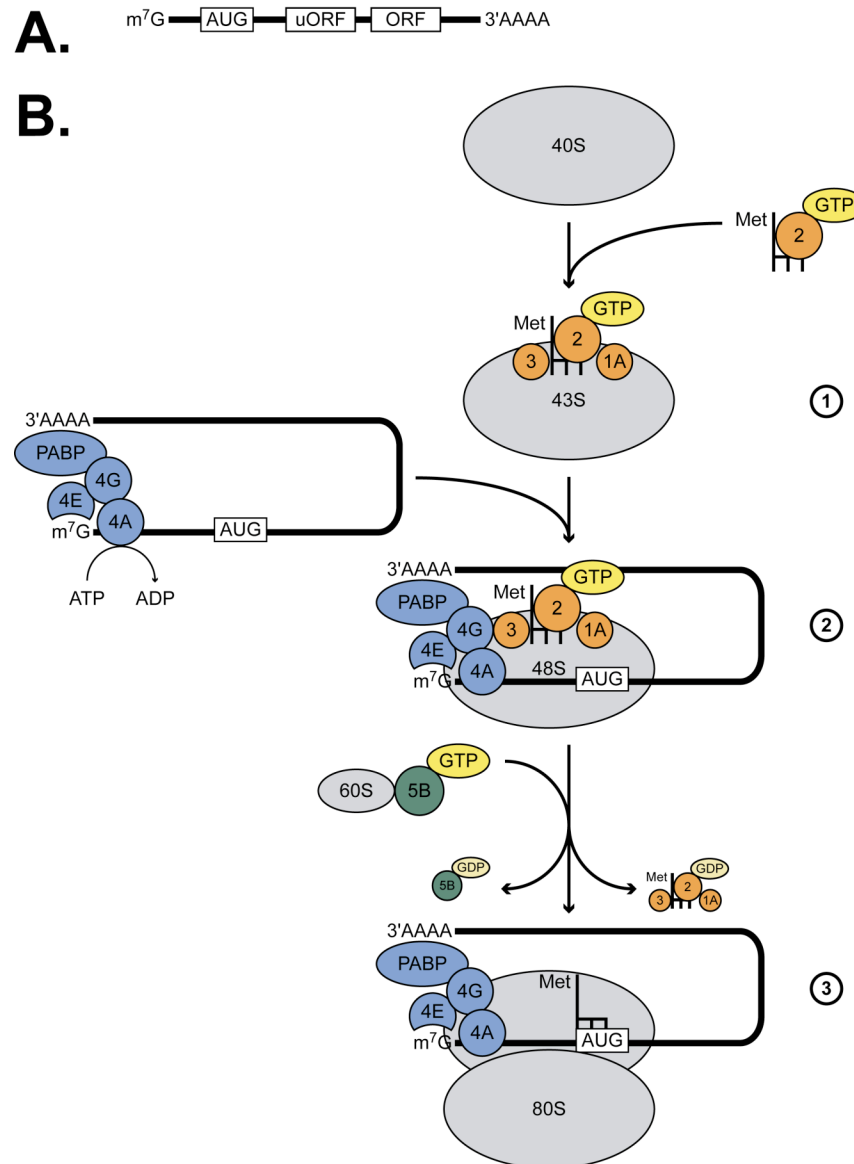


Figure 10 : Les 3 grandes étapes de l'initiation de la traduction

A. Structure classique d'un ARNm eukaryotique contenant : la coiffe 7-méthylguanosine, le codon d'initiation de la traduction (AUG), le ou les cadres de lecture supplémentaires (uORF pour *upstream open reading frame*), le cadre de lecture principal contenant la partie codante de l'ARNm (ORF) et la queue poly-A (Adapté de Gebauer et Hentze, 2004). **B.** Schéma illustrant les trois grandes étapes de l'initiation de la traduction, qui permettent l'assemblage d'un ribosome compétent au codon d'initiation AUG. (1) La première étape nécessite la liaison du complexe ternaire, composé du facteur d'initiation eIF2 (en orange), d'une molécule de GTP (en orange) et de l'ARNt initiateur (Met) à la petite sous-unité ribosomale 40S, ce qui forme le complexe pré-initiateur 43S. (2) La deuxième étape requiert la liaison de ce complexe pré-initiateur au codon d'initiation et la formation du complexe 48S. Ce complexe comprend également les protéines

qui sont associées à la coiffe 7-méthylguanosine, comme eIF4E, eIF4G et eIF4A (en bleu). (3) Finalement, la troisième étape nécessite l'hydrolyse du GTP en GDP par eIF2, ce qui catalyse la dissociation des facteurs du complexe 48S et le recrutement de la grande sous-unité ribosomale 60S via eIF5B (en vert). Il y a alors formation d'un ribosome compétent et prêt à procéder à l'élongation de la chaîne polypeptidique (Adapté de Klann et Dever, 2004).

L'initiation de la traduction peut elle-même être subdivisée en trois étapes clés : (1) la liaison du complexe ternaire à la petite sous-unité ribosomale; (2) la liaison de ce complexe pré-initiateur, aussi appelé 43S, au codon d'initiation et la formation du complexe 48S; et (3) la liaison de la grande sous-unité ribosomale et l'assemblage de ces deux sous-unités, générant ainsi un ribosome compétent (Figure 10) (Gebauer et Hentze, 2004; Klann et Dever, 2004; Sonenberg et Dever, 2003; Sonenberg, Hershey et Matthews, 2000). Étant donné le rôle primordial de la régulation de la traduction pour le contrôle de la synthèse de nouvelles protéines, plusieurs groupes se sont intéressés, au cours des dernières années, à la relation entre la LTP et la LTD et la régulation de l'initiation de la traduction. Les prochaines sections décrivent donc certains mécanismes clés de l'initiation de la traduction, ainsi que quelques études qui ont mis en relation ces processus et les mécanismes de la plasticité synaptique.

1.4.2. La voie eIF2 α

La première étape de la traduction nécessite donc la formation du complexe ternaire et la liaison de ce dernier à la petite sous-unité ribosomale 40S. Le complexe ternaire est formé du facteur d'initiation eIF2, d'une molécule de GTP et de l'ARNt initiateur (Met-tRNA_i^{Met}). Afin de pouvoir entamer le cycle d'initiation, la forme inactive du facteur eIF2, liée au GDP, doit absolument être convertie par la kinase eIF2B en sa forme active, liée au GTP. Cependant, eIF2, kinase composée de 3 sous-unités (α , β et γ), est également assujettie à régulation : en effet, la phosphorylation de la sous-unité α au niveau du résidu Ser51 convertit eIF2 de substrat à inhibiteur compétitif d'eIF2B et empêche donc son recyclage et son association à une nouvelle molécule de GTP (Figure 11) (Hinnebusch, 2000 *in* Sonenberg, Hershey et Matthews, 2000; Klann et Dever, 2004; Proud, 2005; Sonenberg et Dever, 2003). La phosphorylation d'eIF2 α au niveau de Ser51 survient en réponse à différentes situations de stress et fait suite à l'activation d'une des 4 kinases suivantes : GCN2 (*general control non-derepressible 2*), HRI

(*haem-regulated initiation factor 2 α kinase*), PERK (*eIF2 α kinase 3*) et PKR (*protein kinase-RNA regulated*).

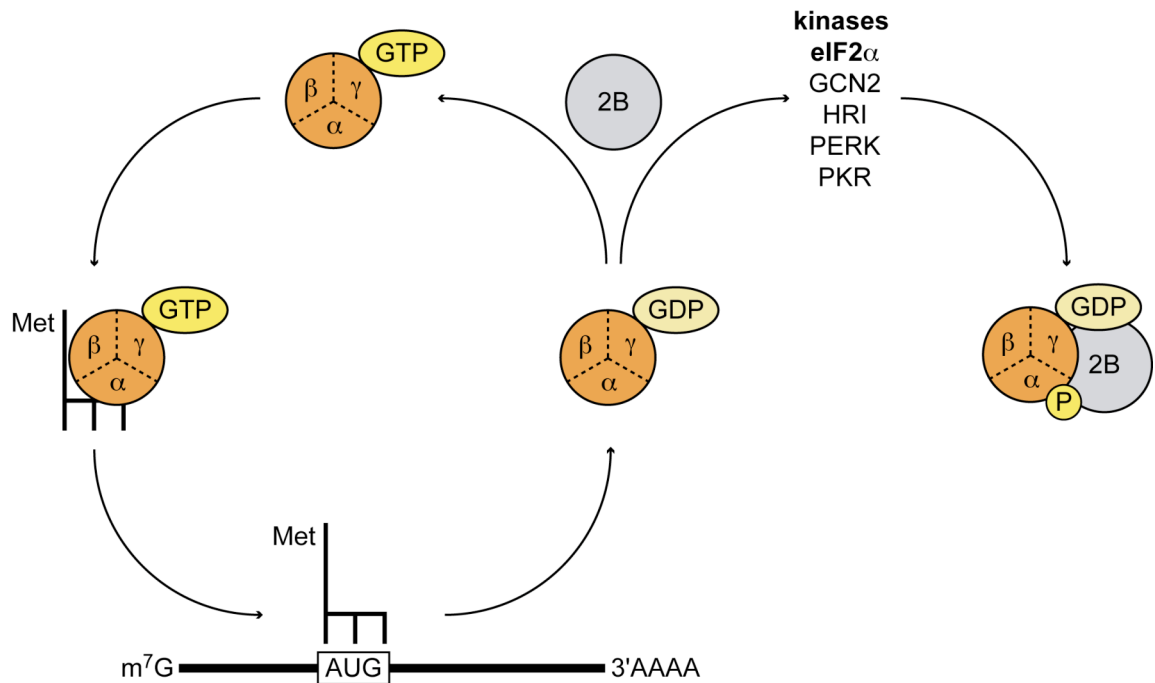


Figure 11 : La régulation d'eIF2 et la formation du complexe ternaire

La formation du complexe ternaire, comprenant le facteur d'initiation eIF2 (en orange), une molécule de GTP (eIF2-GTP) et l'ARNt initiateur (Met) est un processus finement régulé. Après la liaison du complexe ternaire au codon d'initiation (AUG), le GTP est hydrolysé par le facteur eIF2, ce qui catalyse la dissociation du complexe eIF2-GDP de l'ARNm. Afin de pouvoir commencer un nouveau cycle, ce complexe doit ensuite être recyclé par le facteur eIF2B, qui catalyse l'échange du GDP contre le GTP. Cette étape peut être inhibée par la phosphorylation sur le résidu Ser51 de la sous-unité α du facteur eIF2 par l'une des 4 kinases d'eIF2 α . La phosphorylation d'eIF2 α convertit eIF2 en un inhibiteur compétitif d'eIF2B et séquestre ce dernier, ce qui diminue l'échange du GDP contre le GTP et conséquemment les niveaux de traduction générale (Adapté de Klann et Dever, 2004).

Paradoxalement, alors que la phosphorylation d'eIF2 α inhibe la traduction générale, elle peut également stimuler la traduction de certains ARNm spécifiques, comme GCN4 (Figure 12) (Gebauer et Hentze, 2004; Hinnebusch, 2000 *in* Sonenberg, Hershey et Matthews, 2000; Klann et Dever, 2004; Proud, 2005).

1.4.2.1. La kinase GCN2

Parmi les 4 kinases d'eIF2 α connues à ce jour, GCN2 possède la particularité d'être la seule kinase présente dans tous les eucaryotes, de la levure à l'humain, ce qui fait de GCN2 la kinase d'eIF2 α la plus conservée (Berlanga, Santoyo et DeHaro, 1999).

D'autre part, bien que les 4 kinases d'eIF2 α soient toutes présentes au niveau du cerveau, il a été démontré que seule GCN2 y est spécifiquement enrichie (Berlanga, Santoyo et de Haro, 1999; Sood *et al.*, 2000). GCN2 est également enrichie au niveau du foie (Berlanga, Santoyo et de Haro, 1999), alors que les autres kinases d'eIF2 α sont enrichies dans d'autres tissus (voir section 1.4.2.2.). Ces données suggèrent donc que GCN2 pourrait jouer un rôle préférentiel dans la régulation de la phosphorylation d'eIF2 α et de la traduction au niveau du système nerveux.

GCN2 est activée par la privation du milieu en acides aminés, et la phosphorylation d'eIF2 α qui s'ensuit contribue à diminuer la traduction globale dans des conditions peu favorables à la croissance de la cellule. Chez la levure, il a également été établi que dans ces conditions, la traduction de certains ARNm était néanmoins augmentée, notamment la traduction de *GCN4*, un activateur de la transcription spécifique aux protéines impliquées dans la biosynthèse des acides aminés (Gebauer et Hentze, 2004; Klann et Dever, 2004; Proud, 2005).

Ce paradoxe peut s'expliquer par un processus appelé la ré-initiation de la traduction, soit la reprise de la traduction sur le même ARNm grâce au rechargement du ribosome en cours de scanning par un nouveau complexe ternaire (Figure 12). L'ARNm de *GCN4* contient en effet 4 cadres de lecture supplémentaires (*upstream open reading frames* ou uORFs), en amont du codon initiateur principal, au niveau desquels l'initiation de la traduction peut avoir lieu. Dans des conditions normales, la ré-initiation a fréquemment lieu après chaque cadre de lecture, et la traduction du quatrième cadre de lecture (uORF4) inhibe la traduction du cadre de lecture principal, de par la présence d'une séquence riche en G-C qui entoure le codon stop de l'uORF4 et qui favorise la dissociation et la libération du ribosome. Cependant, lorsqu'eIF2 α est phosphorylée, la concentration des complexes ternaires disponibles pour un nouveau cycle d'initiation est fortement diminuée. De ce fait, les ribosomes glissent plus longtemps sur l'ARNm avant de recevoir un complexe ternaire et de pouvoir initier la traduction. Les probabilités que la petite sous-unité ribosomale atteigne le cadre de lecture principal sont donc décuplées, ce qui explique l'augmentation de la traduction de *GCN4* (Figure 12) (Gebauer et

Hentze, 2004; Hinnebusch, 1997; Hinnebusch, 2000 *in* Sonenberg, Hershey et Matthews, 2000).

D'autre part, il semble que ce mécanisme ait été conservé au cours de l'évolution, puisqu'un phénomène semblable se produit chez les mammifères : la traduction d'*ATF4*, à la fois un activateur de la transcription et un répresseur majeur de la transcription CREB-dépendante, est paradoxalement favorisée par la phosphorylation d'eIF2 α , elle-même étant catalysée par divers signaux de stress cellulaire dont le manque en acides aminés. De plus, on peut noter que ce mécanisme s'explique également par la présence d'uORFs dans la partie 5'UTR de l'ARNm (Harding *et al.*, 2000; Lu, Harding et Ron, 2004; Vattem et Wek, 2004).

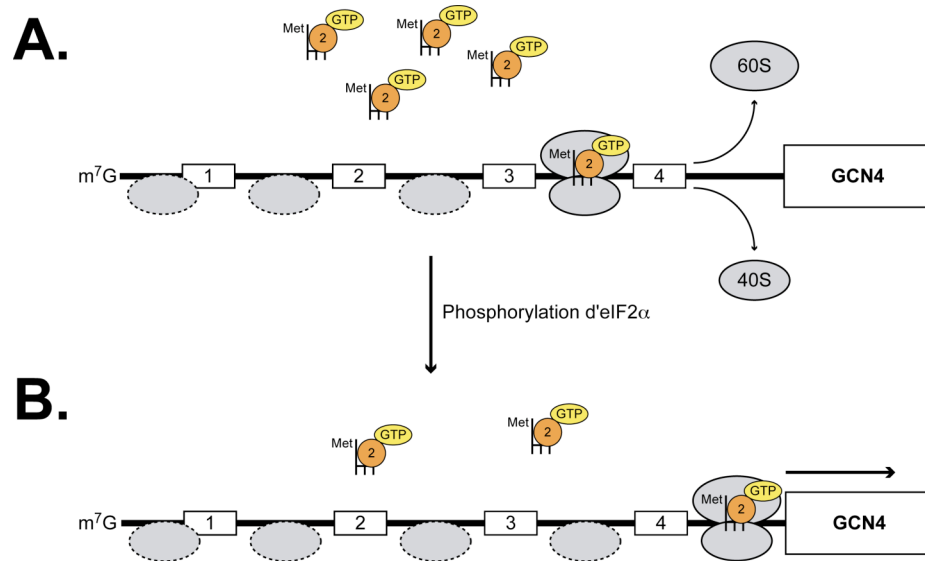


Figure 12 : La ré-initiation de la traduction

A. Dans des conditions normales, les niveaux de complexes ternaires sont élevés. Par conséquent, les ribosomes qui glissent sur l'ARNm (ovale gris) sont fréquemment rechargés par de nouveaux complexes ternaires après chaque cadre de lecture supplémentaire, et la probabilité que la séquence codante supplémentaire 4 soit traduite est élevée (uORF4). Or la séquence de cette dernière est riche en G-C, ce qui favorise la dissociation et le relâchement des sous-unités ribosomales après la traduction de la séquence codante supplémentaire 4. Dans ces conditions, la probabilité que les ribosomes atteignent la séquence codante de GCN4 est donc faible.

B. Dans des conditions de privation en acides aminés, eIF2 α est phosphorylée et les niveaux de complexes ternaires disponibles sont fortement diminués. Par conséquent, les ribosomes glissent plus longtemps sur l'ARNm avant d'être rechargés par de nouveaux complexes ternaires. Dans ces conditions, la probabilité que les ribosomes glissent sur l'ARNm jusqu'à la séquence codante de GCN4 est donc plus élevée. Ce mécanisme explique ainsi comment la traduction de certains ARNm peut être augmentée alors que la traduction globale est inhibée (Adapté de Gebauer et Hentze, 2004).

1.4.2.2. Les autres kinases d'eIF2 α et GADD34

D'autre part, il a été démontré que les 4 kinases d'eIF2 α sont toutes activées par des stimuli précis, et permettent ainsi la phosphorylation d'eIF2 α en réponse à une variété de stimuli et de stress cellulaires, un mécanisme aussi nommé « réponse de stress intégrée » (*integrated stress response* ou ISR). Alors que GCN2 est activée par la privation du milieu en acides aminés, HRI, répond à la déplétion de l'hème, PERK, au stress du réticulum endoplasmique et finalement, PKR, est activée en réponse à une infection virale (Gebauer et Hentze, 2004; Klann et Dever, 2004; Proud, 2005). Par ailleurs, les autres kinases d'eIF2 α présentent toutes une distribution cellulaire bien particulière : ainsi HRI est enrichie au niveau des réticulocytes (Chen et London, 1995), du foie, du rein et des testicules (Berlanga, Herrero et de Haro, 1998), alors que PERK est enrichie au niveau du pancréas (Shi *et al.*, 1999). En comparaison, les niveaux de ces deux kinases sont relativement faibles (environ 10 fois moindres que dans les structures où la kinase est enrichie) au niveau du cerveau (Berlanga, Herrero et de Haro, 1998; Shi *et al.*, 1999). Quant à PKR, elle est présente à de très faibles niveaux dans des conditions normales dans la plupart des cellules, mais son expression peut être fortement augmentée en réponse aux interférons qui sont produits lors d'une infection virale (de Haro, Méndez et Santoyo, 1996).

Il convient également de noter l'existence d'une phosphatase d'eIF2 α , contribuant à la reprise de la synthèse protéique après un stress cellulaire. Cette phosphatase, nommée GADD34 (*growth arrest and DNA damage-inducible protein 34*), se lie à la sous-unité catalytique de PP1 et favorise la déphosphorylation d'eIF2 α (Brush, Weiser et Shenolikar, 2003; Kojima *et al.*, 2003; Novoa *et al.*, 2001; Proud, 2005).

1.4.3. La voie mTOR

La deuxième étape de la traduction se compose de la liaison de ce complexe pré-initiateur, aussi appelé 43S, au codon d'initiation et la formation du complexe 48S. Cette étape est par ailleurs considérée comme limitante dans la plupart des conditions. La formation du complexe 48S nécessite la liaison de nombreux facteurs d'initiation, parmi lesquels eIF4E joue un rôle prépondérant. En effet, eIF4E est le facteur qui reconnaît spécifiquement la coiffe de l'ARNm et, de par son interaction avec eIF4G, permet le

recrutement du complexe pré-initiateur 43S. L'association d'eIF4E à eIF4G et la formation du complexe trimérique eIF4F, qui comprend aussi l'hélicase eIF4A, est pour sa part principalement régulée par la dissociation des protéines 4E-BP d'eIF4E (Gebauer et Hentze, 2004; Gingras, Raught et Sonenberg, 1999; Kelleher, Govindarajan et Tonegawa, 2004; Klann et Dever, 2004; Sonenberg, Hershey et Matthews, 2000). Tel que nous le décrivons dans les sections suivantes, la kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) joue un rôle crucial dans la régulation de ce mécanisme. De plus, mTOR régule aussi plusieurs autres facteurs d'initiation, tels que eIF4B, eIF4G et les kinases S6K, ainsi que la traduction des ARNm 5'TOP, ce qui fait de mTOR un régulateur central de l'initiation de la traduction (Figure 13A).

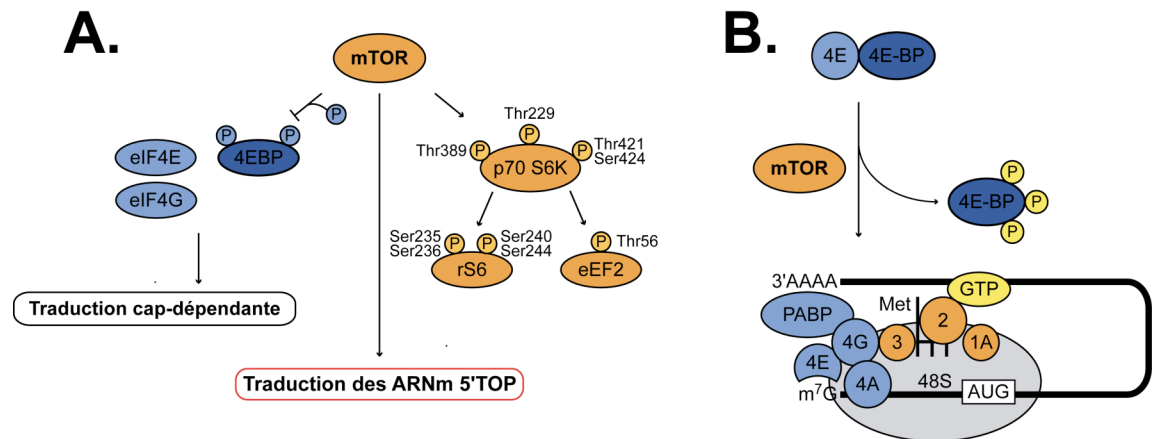


Figure 13 : La voie mTOR et ses différents substrats

A. La protéine kinase mTOR régule à la fois la phosphorylation des protéines 4E-BP, la phosphorylation des protéines kinases S6K et la traduction spécifique des ARNm 5'TOP (Adapté de Gobert *et al.*, 2008). **B.** Dans des conditions normales, les protéines 4E-BP sont liées au facteur d'initiation eIF4E et les empêchent ainsi d'interagir avec eIF4G. Lorsque mTOR est activée, les protéines 4E-BP sont alors phosphorylées, ce qui favorise leur dissociation du facteur eIF4E. Ce dernier est alors libre de s'associer au facteur eIF4G et de former le complexe eIF4F, nécessaire à l'initiation de la traduction (Adapté de Gebauer et Hentze, 2004).

mTOR est une protéine kinase Ser/Thr qui a été impliquée dans la régulation de nombreux processus cellulaires : outre (1) la régulation de l'initiation et de l'élongation, mTOR régule également (2) la biosynthèse des ribosomes, (3) l'importation des acides aminés, (4) la transcription de divers enzymes impliqués dans diverses voies métaboliques et (5) l'autophagie. Par ailleurs, mTOR est sélectivement inhibée par la rapamycine, une drogue immunosuppressive (Gingras, Raught et Sonenberg, 2001; Hay et Sonenberg, 2004; Raught, Gingras et Sonenberg, 2001). Plus récemment, il a également été proposé que mTOR pourrait jouer un rôle dans la régulation de la

plasticité synaptique, sachant que la rapamycine inhibe spécifiquement ces mécanismes chez l'aplysie (Casadio *et al.*, 1999) et chez les vertébrés (Cammalleri *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2002).

1.4.3.1. Les protéines 4E-BP

Les protéines 4E-BP (*4E-binding proteins*) constitue une famille de 3 petits polypeptides qui sont en compétition avec eIF4G pour la liaison à un site commun sur eIF4E, ce qui fait donc de cette liaison un processus mutuellement exclusif. La liaison des 4E-BP à eIF4E est régulée par la phosphorylation des 4E-BP: alors que l'hypophosphorylation favorise la liaison à eIF4E, l'hyperphosphorylation inhibe cette association. Plusieurs kinases peuvent phosphoryler les 4E-BP, dont PI3K et mTOR, et donc réguler l'initiation de la traduction (Figure 13B) (Gingras, Raught et Sonenberg, 2001; Hay et Sonenberg, 2004; Lin *et al.*, 1994; Pause *et al.*, 1994; Raught, Gingras et Sonenberg, 2001). La phosphorylation des 4E-BP s'effectue sur plusieurs résidus selon une hiérarchie bien particulière, parmi lesquels Thr37 et Thr46 semblent jouer un rôle important (Gingras *et al.*, 2001; Mothe-Satney *et al.*, 2000).

Récemment, plusieurs études se sont intéressées au rôle que pourrait jouer les 4E-BP dans la plasticité synaptique et la mémoire. Il a ainsi été établi que la phosphorylation des 4E-BP est corrélée à la phase tardive de la LTP et de la mémoire (Kelleher *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2002). Parallèlement, d'autres travaux ont démontré que la phosphorylation de 4E-BP2, l'isoforme le plus abondant au niveau du cerveau, est nécessaire pour l'établissement de la phase tardive de la LTP et pour la mémoire spatiale: en effet, chez des souris mutantes *4E-BP2^{-/-}*, un protocole de stimulation générant seulement la phase précoce de la LTP ou de la mémoire permet d'établir directement la phase tardive de ces dernières (Banko *et al.*, 2005). De plus, 4E-BP2 semble également jouer un rôle dans la phase tardive de la LTD (Banko *et al.*, 2006).

1.4.3.2. Les kinases S6K et la protéine ribosomale S6

En plus de réguler les protéines 4E-BP et la phosphorylation d'eIF4E, mTOR régule également la phosphorylation des kinases S6K, dont les principaux isoformes sont S6K1 et S6K2. Il a d'autre part été démontré que PI3K régule aussi la phosphorylation des

kinases S6K (Klann et Dever, 2004; Raught, Gingras et Sonenberg, 2001). Les kinases S6K régulent pour leur part la phosphorylation de la protéine ribosomale S6, qui est un composant essentiel de la petite sous-unité ribosomale 40S, et le facteur d'initiation eIF4B, un stimulateur de l'hélicase eIF4A (Hay et Sonenberg, 2004; Raught, Gingras et Sonenberg, 2001; Raught *et al.*, 2004).

La phosphorylation des S6K et de la protéine ribosomale S6 a par ailleurs été observée suite à des protocoles de stimulation pouvant induire la LTF chez l'Aplysie (Khan, Pepio et Sossin, 2001), ou la phase tardive de la LTP et de la mémoire chez les mammifères (Cammalleri *et al.*, 2003; Kelleher *et al.*, 2004). De plus, la phosphorylation des S6K et de S6 est également augmentée par des protocoles induisant la phase tardive de la LTD (Antion *et al.*, 2008b). Cependant, des travaux subséquents menés sur des souris mutantes *S6K^{-/-}* ont abouti à des résultats mixtes concernant le rôle des S6K pour la LTP, la LTD et la mémoire (Antion *et al.*, 2008a, 2008b). Il est donc impossible de conclure que la phosphorylation de S6K1 et/ou S6K2 est nécessaire pour ces processus.

1.4.3.3. Les ARNm 5'TOP

La famille des ARNm 5'TOP (*5'terminal oligopyrimidine tract*) constitue une sous-classe d'un intérêt particulier. Ces ARNm codent en effet la plupart des protéines ribosomales ainsi que plusieurs facteurs d'élongation requis lors de la synthèse protéique et sont spécifiquement régulés selon le statut de la cellule : alors que leur traduction est augmentée par des facteurs de croissance ou des agents mitogènes, elle est spécifiquement réprimée par l'arrêt de la croissance (Jefferies *et al.*, 1994; Terada *et al.*, 1994). Initialement, il avait été rapporté que l'activation de mTOR augmentait la phosphorylation de S6K et de S6, et que ceci était corrélé de façon positive avec une augmentation des niveaux de traduction des ARNm 5'TOP (Meyuhas, 2000; Meyuhas et Hornstein *in* Sonenberg, Hershey, Matthews, 2000). Cependant, des travaux plus récents ont remis en question ce modèle : en effet, chez des souris mutantes ne possédant aucun des 2 isoformes de S6K, ou chez des souris sur lesquelles tous les sites de phosphorylation de S6 ont été mutés, la régulation des ARNm 5'TOP est néanmoins maintenue en réponse à des agents mitogènes (Pende *et al.*, 2004; Ruvinsky *et al.*, 2005).

Ces résultats suggèrent donc l'existence d'une autre voie, reliant l'activation de mTOR et la traduction des ARNm 5'TOP.

À ce jour, plusieurs études ont observé une augmentation de la traduction de certains ARNm 5'TOP suite à l'induction de la LTP (Liao *et al.*, 2007; Tsokas *et al.*, 2005, 2007) ou de la LTD (Antion *et al.*, 2008b; Huang, Chotiner et Steward, 2005). Cependant, la nécessité de cette augmentation de la traduction pour le maintien de la phase tardive de la LTP et/ou de la mémoire n'a pour l'instant pas été démontrée.

CHAPITRE II. BUT DE LA THÈSE

2.1. PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIF GÉNÉRAL

Ainsi, la mémoire et l'apprentissage sont des phénomènes complexes dont on ne comprend pas encore bien l'origine au niveau cellulaire et moléculaire. Néanmoins, de nombreux travaux ont permis d'identifier les structures du lobe temporal et tout particulièrement l'hippocampe comme étant des structures essentielles à la formation de la mémoire explicite chez les mammifères (Scoville et Milner, 1957; Milner, Squire et Kandel, 1998). D'autre part, il est désormais admis que des changements plus simples au niveau synaptique comme la potentialisation à long-terme (*long-term potentiation* ou LTP) pourraient constituer la base cellulaire de la formation des nouveaux souvenirs (Bliss et Collingridge, 1993 ; Kandel, Schwartz et Jessel, 2000; Lynch, 2004; Malenka et Nicoll, 1999). La LTP est classiquement définie comme un renforcement durable de l'efficacité de connexions synaptiques spécifiques. De plus, on peut distinguer deux phases majeures de la LTP : une phase précoce, qui repose sur la phosphorylation et la modification de protéines déjà formées, et une phase tardive, qui requiert, elle, la synthèse de nouvelles protéines (Costa-Mattioli *et al.*, 2009; Davis et Squire, 1984; Flexner, Flexner et Stellar, 1963; Kelleher, Govindarajan et Tonegawa, 2004). Cependant, bien qu'on sache depuis plusieurs années que la traduction de nouvelles protéines est nécessaire à la maintenance de la LTP, l'identité des protéines requises, de même que les voies de signalisation couplant l'activité synaptique et la synthèse protéique sont encore peu connus. Dans cette optique, l'objectif général de cette thèse est donc de mieux comprendre les interactions entre l'activité synaptique et la régulation de la traduction.

2.2. OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

Il est largement admis que la régulation de la traduction se fait principalement au niveau de l'initiation (Sonenberg, Hershey et Matthews, 2000). De ce fait, il est fort plausible que ce mécanisme soit spécifiquement ciblé et régulé par l'activité synaptique. Or

L'initiation de la traduction est à son tour un processus hautement régulé par une pléthore de facteurs. Plusieurs étapes de ce processus peuvent donc potentiellement être ciblées et influencées par l'activité synaptique. Dans cette optique, cette thèse s'intéresse plus spécifiquement à deux voies jouant un rôle clé dans l'initiation : la voie eIF2 α , qui régule la formation du complexe ternaire, et la voie mTOR, qui régule la production de la machinerie protéique via la synthèse des ARNm 5'TOP. Ainsi, les objectifs spécifiques de cette thèse peuvent s'énoncer comme suit :

- (1) Déterminer l'importance de la régulation de la voie eIF2 α et de la formation du complexe ternaire pour la plasticité synaptique et la mémoire à long-terme.
 - i. Établir si l'activité synaptique peut moduler l'activation de la cascade GCN2/eIF2 α .
 - ii. Déterminer si cette activation est nécessaire à la maintenance de la phase tardive de la LTP et de la mémoire à long-terme.
 - iii. Établir si, dans ces conditions, cette cascade module également la traduction spécifique du facteur de transcription ATF4, un inhibiteur reconnu de la transcription CREB-dépendante.
 - iv. Déterminer si la modulation de la traduction d'ATF4, via la cascade GCN2/eIF2 α est nécessaire à la maintenance de la phase tardive de la LTP et de la mémoire à long-terme.

- (2) Déterminer l'importance de la régulation de la voie mTOR et de la traduction des ARNm 5'TOP pour la plasticité synaptique.
 - i. Établir si l'activité synaptique peut moduler la cascade mTOR et plus particulièrement, la traduction des ARNm 5'TOP, et donc la production de la machinerie de synthèse protéique.
 - ii. Déterminer si cette modulation est nécessaire à la maintenance de la phase tardive de la LTP.
 - iii. Établir si cette variation de la production de la machinerie de synthèse protéique est généralisée ou restreinte à un compartiment cellulaire particulier.

Afin de répondre aux objectifs, nous avons eu recours à diverses techniques; plus particulièrement, nous avons effectué des expériences d'électrophysiologie, de transfert par immunobuvardage et de microscopie confocale. Les travaux portant sur la voie GCN2/eIF2 α ont été réalisés en collaboration avec le Dr Mauro Costa-Mattioli, du laboratoire du Dr Nahum Sonenberg de l'Université McGill. Cette collaboration nous a notamment permis d'avoir recours à d'autres méthodes expérimentales complémentaires, telles que l'utilisation d'animaux transgéniques, les tests comportementaux et le profil polysomique. Cette approche pluridisciplinaire nous a donc permis d'aborder notre problématique sous différents angles et d'avoir ainsi une vision plus globale. L'ensemble de nos expériences a été réalisé dans un modèle animal de type mammifère, plus précisément la souris ou le rat.

Cette thèse comporte trois grandes sections de résultats expérimentaux:

- (1) La première section examine le rôle de la cascade GCN2/eIF2 α dans la plasticité synaptique et la mémoire à long-terme. Cette section comprend l'article intitulé : *Translational control of hippocampal synaptic plasticity and memory by the eIF2 α kinase GCN2* publié dans *Nature*, 436(7054):1166-1173, en Août 2005.
- (2) La deuxième section approfondit les résultats de la première section, en traitant plus spécifiquement de la modulation d'un site de phosphorylation crucial pour l'activité d'eIF2 α et de son importance pour la plasticité synaptique et la mémoire à long-terme. Cette section comporte l'article suivant : *eIF2 α phosphorylation bidirectionally regulates the switch from short- to long-term synaptic plasticity and memory* publié dans *Cell*, 129(1):195-206, en Avril 2007.
- (3) La troisième section étudie le rôle que joue la régulation de la voie mTOR et de la traduction des ARNm 5'TOP durant la phase tardive de la LTP. Cette section comprend l'article intitulé : *Forskolin induction of late-LTP and up-regulation of 5'TOP mRNAs translation via mTOR, ERK and PI3K in hippocampal pyramidal cells* publié dans *The Journal of Neurochemistry*, 106(3):1160-74, en Août 2008 (Epub Mai 2008).

Les trois prochains chapitres décrivent donc en détail les résultats de ces études.

CHAPITRE III. PREMIÈRE SECTION DE RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

3.1. PRÉAMBULE ET RÉSUMÉ

Ce chapitre comporte la publication suivante :

Mauro Costa-Mattioli, Delphine Gobert, Heather Harding, Barbara Herdy, Mounia Azzi, Martin Bruno, Michael Bidinosti, Cyrinne Ben Mamou, Edwige Marcinkiewicz, Madoka Yoshida, Hiroaki Imataka, A. Claudio Cuello, Nabil Seidah, Wayne Sossin, Jean-Claude Lacaille⁵, David Ron⁶, Karim Nader³ and Nahum Sonenberg. ***Translational control of hippocampal synaptic plasticity and memory by the eIF2 α kinase GCN2.*** Nature, 436(7054):1166-1173; 25 Août 2005.

Pour cette première publication, j'ai réalisé l'ensemble des expériences d'électrophysiologie visant à caractériser la plasticité synaptique chez les souris *GCN2*^{-/-} (voir Figure 1, ainsi que Figures S4, S5 et S6). De plus, j'ai effectué la préparation de tous les échantillons d'hippocampe nécessaires au profil polysomique et à la RT-PCR (voir Figure 2), ainsi que tous les traitements pharmacologiques des tranches d'hippocampe destinées au transfert par immunobuvardage (ou *Western Blot*, voir Figure 2 et Figure S7). Cette contribution majeure m'a ainsi valu d'être deuxième auteur sur cet article réalisé en collaboration avec le Dr Mauro Costa-Mattioli, du laboratoire du Dr Nahum Sonenberg de l'Université McGill, ainsi qu'avec plusieurs autres laboratoires. Le Dr Mauro Costa-Mattioli a pour sa part coordonné le projet et contribué à l'ensemble des études comportementales (Figures 3 et 4). Il a également effectué les expériences de transfert par immunobuvardage (Figure 2 et Figure S7) et d'hybridation *in situ* (Figure S2).

De nombreuses études ont démontré l'importance de la traduction de nouveaux ARNm pour la persistance de la plasticité synaptique, l'apprentissage et la mémoire. Tout comme pour la mémoire, on peut distinguer deux phases de plasticité synaptique: l'une

dite précoce qui repose sur la modification de protéines existantes, et une seconde dite tardive qui requiert, elle, la transcription et la synthèse de nouvelles protéines (Kandel, 2001; McGaugh, 2000). Lors de la phase tardive, l'activation soutenue des cibles postsynaptiques déclenche la transcription des gènes liés à la plasticité. Les ARNm nouvellement synthétisés sont ensuite soit directement traduits au niveau du corps cellulaire, soit transportés aux synapses avant d'être traduits. D'autre part, GCN2 est une kinase clé qui régule l'initiation de la traduction. Dans cette étude, nous décrivons certaines des caractéristiques propres aux souris mutantes *GCN2^{-/-}* : dans la région CA1, un unique train de stimulation à haute fréquence (100Hz) est suffisant pour induire une potentialisation à long-terme (LTP) soutenue qui est dépendante de la transcription et de la traduction. En revanche, une stimulation plus soutenue, qui élicite normalement une LTP tardive chez des souris sauvages, comme quatre trains de stimulation à haute fréquence ou l'application de forskoline, n'induit pas de LTP tardive chez les souris mutantes *GCN2^{-/-}*. Ce phénotype est reflété par le comportement des souris mutantes *GCN2^{-/-}* dans le labyrinthe aquatique de Morris : la mémoire spatiale des souris mutantes est effectivement améliorée après un entraînement de faible intensité, mais diminuée après un entraînement de plus forte intensité. L'activation de GCN2 stimule la traduction de l'ARNm d'ATF4, un antagoniste de la protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc (*cyclic AMP response element binding protein* – CREB). Ainsi, chez les souris mutantes *GCN2^{-/-}*, l'expression d'ATF4 est réduite et l'activité de CREB est conséquemment augmentée au niveau de l'hippocampe. Notre étude procure donc des indices sur le plan génétique, physiologique, comportemental et moléculaire que GCN2 régule la plasticité synaptique, ainsi que l'apprentissage et la mémoire, via la modulation de la voie ATF4/CREB.

3.2. ABSTRACT

Studies on various forms of synaptic plasticity have shown a link between messenger RNA translation, learning and memory. Like memory, synaptic plasticity includes an early phase that depends on modification of pre-existing proteins, and a late phase that requires transcription and synthesis of new proteins (Kandel, 2001; McGaugh, 2000). Activation of postsynaptic targets seems to trigger the transcription of plasticity-related

genes. The new mRNAs are either translated in the soma or transported to synapses before translation. GCN2, a key protein kinase, regulates the initiation of translation. Here we report a unique feature of hippocampal slices from *GCN2*^{-/-} mice: in CA1, a single 100-Hz train induces a strong and sustained long-term potentiation (late LTP or L-LTP), which is dependent on transcription and translation. In contrast, stimulation that elicits L-LTP in wild-type slices, such as four 100-Hz trains or forskolin, fails to evoke L-LTP in *GCN2*^{-/-} slices. This aberrant synaptic plasticity is mirrored in the behaviour of *GCN2*^{-/-} mice in the Morris water maze: after weak training, their spatial memory is enhanced, but it is impaired after more intense training. Activated GCN2 stimulates mRNA translation of ATF4, an antagonist of cyclic-AMP-response-element-binding protein (CREB). Thus, in the hippocampus of *GCN2*^{-/-} mice, the expression of ATF4 is reduced and CREB activity is increased. Our study provides genetic, physiological, behavioural and molecular evidence that GCN2 regulates synaptic plasticity, as well as learning and memory, through modulation of the ATF4/CREB pathway.

3.3. INTRODUCTION

Translation of eukaryotic mRNAs is regulated primarily at the level of initiation (Mathews, Sonenberg and Hershey, 2000). Binding of the initiator tRNA, Met-tRNA_i^{Met}, to the 40S subunit is facilitated by the initiation factor 2 (eIF2) which forms a ternary complex with GTP and Met-tRNA_i^{Met}. Although phosphorylation of the α subunit of eIF2 can inhibit general translation (Hinnebusch, 2000; Sonenberg and Dever, 2003), it stimulates the mRNA translation of the transcriptional modulator ATF4 (Harding *et al.*, 2000), which inhibits synaptic plasticity and behavioural learning in various phyla (Yin *et al.*, 1994; Bartsch *et al.*, 1995; Abel *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2003). In view of the need for translation for the modulation of synaptic activity and strong evidence that phosphorylation of eIF2 α controls translation of ATF4 mRNA (Harding *et al.*, 2000; Vattam and Wek, 2004; Scheuner *et al.*, 2001), eIF2 α kinase(s) may regulate synaptic plasticity. Because GCN2 is the most evolutionarily conserved eIF2 α kinase and GCN2 mRNA is enriched in the brain of flies¹³ and mammals (as well as in liver) (Berlanga, Santoyo and de Haro, 1997; Sood *et al.*, 2000) (see Supplementary Fig. 1), we explored the role of GCN2 in synaptic plasticity and behavioural learning.

3.4. RESULTS

The GCN2 gene was inactivated by homologous recombination in embryonic stem cells (Supplementary Fig. 1A and Supplementary Information). Hippocampal immunohistochemistry and *in situ* histo hybridization show that GCN2, normally expressed mainly in CA1 and CA3 and also in dentate gyrus, is undetectable in brain slices from *GCN2*^{-/-} mice (Supplementary Figs 1 and 2).

There were no gross morphological changes in the hippocampus or other regions of the brain of *GCN2*^{-/-} mice (Supplementary Fig. 3), and basal synaptic transmission in CA1 was unaltered as indicated by the following: first, the relation of fEPSPs to stimulus intensity; second, the size of the fibre volley; third, paired-pulse facilitation (PPF); and fourth, peak response to tetanic stimulation (Supplementary Fig. 4 and Supplementary Information). Normally, a single high-frequency tetanus (100 Hz for 1 s) elicits in the Schaffer collateral/commissural pathway a transient form of long-term potentiation known as early LTP (E-LTP), which decays in 2–3 h and does not require RNA or protein synthesis (Kandel, 2001). In slices from *GCN2*^{-/-} mice, a single tetanus induces a robust and sustained L-LTP (Fig. 1a; at 180 min, $P < 0.001$) and the initial potentiation is greater than in slices from wild-type (WT) mice (Fig. 1a; at 15 min, $P < 0.05$). This increase was synapse-specific because a control input that received only test stimulation remained stable for the entire experimental session (Supplementary Fig. 5A). GCN2 therefore affects the duration of LTP and its initial amplitude.

Like the L-LTP normally elicited by four tetanic trains, the L-LTP induced by a single tetanus in slices from *GCN2*^{-/-} mice depends on cAMP-dependent protein kinase (PKA) (Fig. 1b; at 180 min, $P < 0.01$), new mRNA (Fig. 1b; at 180 min, $P < 0.01$) and protein synthesis (Fig. 1b; at 180 min, $P < 0.001$) and is resistant to depotentiation (Supplementary Fig. 5C). As expected, E-LTP elicited in slices from WT mice by a single tetanus was not affected by inhibiting these pathways and could be depotentiated (Supplementary Fig. 5B, C). Anisomycin (a translation inhibitor) and actinomycin D (a transcription inhibitor) not only prevented the persistence of LTP in slices from *GCN2*^{-/-} mice, but also caused an immediate decrease in the early phase of LTP (Fig. 1b).

Similarly to our results, the effects of anisomycin on L-LTP in the Schaffer collateral pathway often show an immediate decrement in the magnitude of potentiation, indicating that protein-synthesis-dependent processes are required early after L-LTP induction (Frey and Morris, 1997; Kelleher *et al.*, 2004). The early effect of actinomycin D indicates that the increased amplitude of initial potentiation might be due to the translation of immediate-early genes whose mRNAs are quickly turned over. Indeed, when actinomycin D is applied 15 min (instead of 30 min) before the onset of tetanization to minimize the effects of steady-state levels of rapidly turning-over mRNAs, the drug did not have an immediate effect (Fig. 1c; at 60 min, $P > 0.05$). Instead there was a delayed decrease in LTP, which was consistent with the lack of induction of new mRNAs necessary for the maintenance of LTP (Fig. 1c; at 180 min, $P < 0.01$).

According to these observations, deletion of GCN2 leads to an enhanced response to a single tetanus, resulting in L-LTP instead of E-LTP. Does GCN2 deletion also affect the L-LTP normally induced by repeated tetani? To address this question we examined L-LTP induced in CA1 by two different protocols: tetanic stimulation with four trains at 100 Hz, and forskolin, an activator of PKA (Huang and Kandel, 1995). As expected, in slices from WT mice, four trains elicited L-LTP that persisted for at least 4 h. By contrast, in slices from *GCN2*^{-/-} mice, the LTP decayed to baseline within 3 h (Fig. 1d; at 240 min, $P < 0.01$). In slices from WT mice, forskolin elicited the usual L-LTP whereas in *GCN2*^{-/-} slices the L-LTP was not sustained (Supplementary Fig. 5D). The GCN2 deletion specifically affected LTP because long-term depression (LTD), which is induced by low-frequency stimulation or by incubation with an agonist of group I mGluRs, 3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG) (Palmer *et al.*, 1997), was unaltered in *GCN2*^{-/-} slices (Supplementary Fig. 6 and Supplementary Information).

Activation of GCN2 can inhibit the initiation of translation by eIF2 α phosphorylation but, paradoxically, it stimulates the translation of ATF4 mRNA (Harding *et al.*, 2000). We therefore measured eIF2 α phosphorylation in hippocampal extracts from WT and *GCN2*^{-/-} mice and found that it was lower ($50 \pm 19\%$) in *GCN2*^{-/-} mice (Fig. 2a). Consistent with this finding was the observation that ATF4 mRNA was shifted to the lighter polysome fractions of hippocampal extracts from *GCN2*^{-/-} mice (Fig. 2b, c). In

agreement with a weak basal translation of ATF4 mRNA, ATF4 protein was correspondingly lower ($49 \pm 11\%$; Fig. 2e). By contrast, β -actin mRNA sedimented predominantly in the heavy polysome fractions, as would be expected for an efficiently translated mRNA (Fig. 2b, d). Thus, GCN2 deletion leads to a decrease in translation of ATF4 mRNA in the hippocampus. In accordance with the inhibition of CREB by ATF4, decreased translation of ATF4 mRNA in *GCN2*^{-/-} mice was associated with enhanced CREB function: expression of immediate-early genes regulated by CREB (BDNF, c-fos, Egr-1) was 25–35% greater in *GCN2*^{-/-} hippocampal extracts (Fig. 2f).

To further investigate how synaptic plasticity affects GCN2, we examined the effects of forskolin or four trains at 100 Hz (both induce L-LTP and stimulate CRE-mediated gene expression) (Impey *et al.*, 1996) on GCN2 and eIF2 α phosphorylation. Both protocols decreased GCN2 and eIF2 α phosphorylation in WT but not in *GCN2*^{-/-} slices (Fig. 2g and Supplementary Fig. 7A). However, E-LTP elicited by a single train was not associated with a decrease in GCN2 and eIF2 α phosphorylation (Supplementary Fig. 7B). GCN2 activity is therefore regulated by two forms of strong stimulation that elicit L-LTP, but not by a weaker stimulation that induces only E-LTP.

The effects of GCN2 deletion on long-term learning and memory were first studied in a fear conditioning paradigm. Fear conditioning by two tone–shock pairings has two components. One is contextual fear conditioning, which associates the training context and the footshock and requires both the hippocampus and the amygdala. The second, which associates the tone and the footshock, requires the amygdala but not the hippocampus (LeDoux, 2000). When tested 1 and 10 days after training, *GCN2*^{-/-} mice showed a deficit in contextual fear conditioning (Fig. 3a, $P < 0.05$, and Supplementary Information). By contrast, auditory fear conditioning (tested in a different chamber) was intact (Fig. 3b, $P > 0.05$, and Supplementary Information).

Next, hippocampus-dependent spatial memory was tested in the Morris water maze (Morris *et al.*, 1982). In the course of training (three times a day, at 30-min intervals) the performance of both groups improved (Fig. 4a, $P < 0.001$), but WT mice learned faster than *GCN2*^{-/-} mice (Fig. 4a; at 5 days, $P < 0.01$). In probe tests performed after the end of

training, the platform was removed and the mice were allowed to search for 60 s (Fig. 4b). Unlike WT mice (Fig. 4b, $P < 0.001$), *GCN2*^{-/-} mice showed no preference for the training quadrant (Fig. 4b, $P > 0.05$) and fewer platform crossings (Fig. 4c, $P < 0.001$). Vision and locomotor functions were equally efficient in WT and *GCN2*^{-/-} mice, as judged by swimming speed ($P > 0.05$) and latency of escape to a visible platform ($P > 0.05$). Thus, GCN2 deletion is associated with a specific impairment of hippocampus-dependent learning and memory.

Because a single tetanus elicits L-LTP in slices from *GCN2*^{-/-} mice (Fig. 1a), we reasoned that mnemonic processes might be enhanced during weaker conditioning. Indeed, when mice were trained only once (compared with three times) a day, Tukey's test showed that escape latencies on day 5 were shorter for *GCN2*^{-/-} than WT mice (Fig. 4d; at 5 days, $P < 0.02$). Enhanced spatial learning by *GCN2*^{-/-} mice was also evident in the probe tests that were conducted 3 days after the end of training (Fig. 4e). According to repeated-measures analysis of variance (ANOVA), the *GCN2*^{-/-} mice spent significantly more time in the target quadrant ('trained' in Fig. 4e) than WT mice did ($P < 0.001$). Thus, in agreement with the findings on LTP, memory is enhanced after weak training.

3.5. DISCUSSION

The major finding of this study is that a decrease in threshold for L-LTP in CA1 (in slices) is associated with an improved spatial memory of weak conditioning in *GCN2*^{-/-} mice. A switch from short-term to long-term plasticity (Bartsch *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2003; Barco *et al.*, 2002; Malleret *et al.*, 2001) is generally associated with enhanced gene expression. Indeed, CREB-dependent gene expression is increased in *GCN2*^{-/-} mice. Thus, GCN2 could effect long-lasting changes in plasticity by modulating CREB activity. The dependence of the early phase of LTP in *GCN2*^{-/-} mice on transcription and translation may be due to translation of mRNAs coding for CRE-dependent immediate-early genes (which are upregulated at the basal state). Because they turn over rapidly (Chen et Shyu, 1994; Shyu *et al.*, 1989), these mRNAs are likely to be downregulated during the 30 min of preincubation with actinomycin D, whereas in WT slices they are

scarce in the basal state but are induced by repeated tetani. L-LTP in WT slices therefore requires a stronger stimulation and is inhibited only at later times. Thus, two mechanisms underlie L-LTP in *GCN2*^{-/-} slices: first, translation of pre-existing transcripts immediately increases LTP, and second, increased transcription of specific mRNAs generates persistent L-LTP.

How does GCN2 affect synaptic plasticity and learning? One possible model is based on the translational regulation of ATF4 mRNA through the GCN2-mediated phosphorylation of eIF2 α . A pivotal point is that ATF4 represses neuronal CREB activity (Kandel, 2001; Yin *et al.*, 1994; Bartsch *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2003). Thus, under basal conditions, when GCN2 and eIF2 α are phosphorylated and ATF4 levels are high, CREB-dependent transcription, synaptic plasticity and learning are repressed. By decreasing the phosphorylation of GCN2 and eIF2 α , LTP-inducing stimulation would remove this inhibition of synaptic plasticity and memory formation. In this manner, GCN2 regulates the switch from short-term to long-term memory.

We documented a correlation between L-LTP and spatial memory. In accordance with the low threshold for L-LTP and its suppression after strong stimulation, the spatial memory of *GCN2*^{-/-} mice depended on the intensity of training: it was impaired by strong training and enhanced by weaker training. A likely explanation is that strong stimulation (behavioural or by four trains in slices) potentiates an inhibitory pathway that is facilitated in *GCN2*^{-/-} mice. The nature of this mechanism will be an important target of future studies and may involve changes in regulation of gene expression and/or synaptic translation. Our results indicate that neurons might have not only a threshold for activation of gene expression but also a second threshold at which too much gene expression blocks synaptic plasticity. Shutting off plasticity could be important under conditions of excessive activity such as seizures. Our results provide genetic evidence that translational control by GCN2 is critical for synaptic plasticity, learning and memory. In addition, they raise the prospect that memory formation is regulated through the translational control of transcription.

3.6. METHODS

3.6.1. Generation of transgenic mice by GCN2.KO4 targeting

GCN2 was deleted by a targeting vector constructed from polymerase chain reaction (PCR) fragments amplified from cloned 129SvEv genomic DNA (see Supplementary Methods). Chimaeric mice derived from *GCN2.KO4ex/ +* embryonic stem cells were prepared by blastocyst injection and the mutant allele was transmitted through the germline to isogenic 129SvEv mice, which were bred to homozygosity. *GCN2^{-/-}* mice were phenotypically normal in comparison with their wild-type littermates and were obtained in a mendelian ratio.

3.6.2. In situ hybridization histochemistry

Mouse sense and antisense cRNA probes coding for exon 12 of *GCN2* were labelled with [³⁵S]UTP and [³⁵S]CTP (1,250 Ci mmol⁻¹; Amersham), and *in situ* hybridization histochemistry was performed as reported previously (Seidah *et al.*, 2003).

3.6.3. Immunoprecipitation, immunohistochemistry and western blotting

Antibodies against the carboxy-terminal portion (kinase domain) of mouse *GCN2* kinase (C-term) and ATF4 have been described (Harding *et al.*, 2000). The antibody against the amino-terminal portion (amino acid residues 1–363; N-term) of human *GCN2* was produced as a glutathione S-transferase fusion protein in BL-21, and purified on glutathione–Sepharose (APB). Immunoblotting and immunohistochemistry were as reported (Harding *et al.*, 2000; Lapointe *et al.*, 2004). Antibodies against phospho-eIF2 α total eIF2 α and β -actin were purchased from Cell Signalling and Technology Laboratories.

3.6.4. Electrophysiology

After decapitation of WT (*GCN2^{+/+}*) or transgenic (*GCN2^{-/-}*) age-matched littermates (6–12 weeks old), hippocampal slices 400 μ m thick were cut with a vibratome and kept submerged at 27–28 °C. Slices were perfused (at 1–2 ml min⁻¹) with oxygenated (95%

O₂, 5% CO₂) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing 124 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 1.3 mM MgSO₄, 2.5 mM CaCl₂, 26 mM NaHCO₃ and 10 mM glucose. Bipolar tungsten electrodes were placed in CA1 stratum radiatum to stimulate Schaffer collateral and commissural fibres, and extracellular field EPSPs (fEPSPs) were recorded from stratum radiatum with a glass microelectrode (2–3 MΩ, filled with 2 M NaCl). Stimulus (0.1-ms duration) was adjusted to evoke 35–40% maximal fEPSPs at 0.033 Hz. LTP was induced with one or four trains (1 s) at 100 Hz delivered 5 min apart. For LTD experiments, 1 Hz stimulation was applied for 15 min. Forskolin (50 μM; Sigma) or DHPG (50 μM; Tocris) was added to the bath after at least 30 min of stable recording. Anisomycin (40 μM; Calbiochem), actinomycin D (40 μM; Calbiochem) or KT5720 (1 μM; Biomol) was applied for 30 min, or as indicated otherwise, before tetanic stimulation. Statistical analysis used t-tests and two-way ANOVA. All data are presented as means ± s.e.m.; n indicates the number of slices. The experimenter was blind to the mouse genotype.

3.6.5. Fear conditioning

The experimenter (blind to mouse genotype) compared *GCN2*^{-/-} and WT littermates (males, 2–4 months old). Training consisted of two pairings of a tone (2,800 Hz, 85 dB, 30 s) with a co-terminating footshock (0.7 mA, 2 s). The first tone started 120 s after animals had been placed in the conditioning chamber, where they remained for a further 1 min after the second pairing, and were then returned to their home cage. Mice were tested 1 and 10 days later for freezing in response to training context in a counterbalanced manner (Supplementary Information).

3.6.6. Morris water maze task

The pool was 100 cm in diameter and the water was rendered opaque by the addition of white tempera. Water temperature was kept at 20 °C. The platform was 4.5 cm in diameter. Mice were trained three times a day at intervals of 30 min, or once a day over five consecutive days. In each trial the mouse swam until it found the platform, or after 120 s it was guided to the platform; the mouse was then placed on the platform for 10 s before being picked up. At the end of the testing period, a probe trial (60 s) was

performed. Statistical analysis was based on univariate and multivariate ANOVA, and between-group comparisons were made by Tukey's test.

3.6.7. Polysome profile analysis and RT-PCR

Hippocampal slices were washed twice with cold PBS containing 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cycloheximide, suspended in lysis buffer, homogenized with 15 strokes (7-ml Wheaton Dounce) on ice, and then centrifuged for 2 min at 14,000g. Gradients were prepared and analysed as described (Chan *et al.*, 2004). For detection of ATF4 and β -actin mRNAs, RNA from individual fractions was amplified in one-tube RT-PCR reactions, which were optimized to detect the exponential phase on the amplification curve.

3.6.8. Quantitative RT-PCR

The one-step RT-PCR LightCycler RNA Master SYBR Green kit (Roche) was used to quantify CRE-dependent gene expression, as recommended by the manufacturer. Primers, RT-PCR conditions and normalization procedures were as described (Saura *et al.*, 2004).

3.7. ACKNOWLEDGEMENTS

We thank E. Kandel, K. Krnjevic, K. Rosenblum, E. Landau, R. Blitzer, C. Alberini, Y. Mamane and T. Lubell for comments on the manuscript; Y. Zhang, R. Jungreis and A. Sylvestre for assisting in the production and maintenance of the *GCN2^{-/-}* mice; and Colin Lister for assistance. This work was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research (CIHR) and the Howard Hughes Medical Institute (HHMI) to N.S, a CIHR Group Grant to J.-C.L and W.S; a CIHR grant to N. Seidah; an NIH grant to D.R.; CIHR, Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), Volkswagen Foundation and EJLB Foundation grants to K.N.; and a CIHR grant to A.C.C. N.S. is a CIHR Distinguished Scientist and a HHMI International scholar. M.C.-M. is supported by a CIHR postdoctoral fellowship.

3.8. REFERENCES

Kandel ER (2001) The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*. 294:1030–1038.

McGaugh JL (2000) Memory – a century of consolidation. *Science*. 287: 248–251.

Mathews MB, Sonenberg N, Hershey JWB (2000) Translational Control of Gene Expression. Sonenberg N, Hershey JWB, Merrick WC, editors. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, New York: pp. 1–33.

Hinnebusch, AG (2000) Translational Control of Gene Expression. Sonenberg N, Hershey JWB, Merrick WC, editors. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, New York: pp. 185–244.

Sonenberg N, Dever TE (2003) Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Curr Opin Struct Biol*. 13:56–63.

Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D (2000) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell*. 6:1099–1108.

Yin JC, Wallach JS, Del Vecchio M, Wilder EL, Zhou H, Quinn WG, Tully T (1994) Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. *Cell*. 79:49–58.

Bartsch D, Ghirardi M, Skehel PA, Karl KA, Herder SP, Chen M, Bailey CH, Kandel ER (1995) *Aplysia* CREB2 represses long-term facilitation: relief of repression converts transient facilitation into long-term functional and structural change. *Cell*. 83:979–992.

Abel T, Martin KC, Bartsch D, Kandel ER (1998) Memory suppressor genes: inhibitory constraints on the storage of long-term memory. *Science*. 279:338–341.

Chen A, Muzzio IA, Malleret G, Bartsch D, Verbitsky M, Pavlidis P, Yonan AL, Vronskaya S, Grody MB, Cepeda I, Gilliam TC, Kandel ER (2003) Inducible enhancement of memory storage and synaptic plasticity in transgenic mice expressing an inhibitor of ATF4 (CREB-2) and C/EBP proteins. *Neuron*. 39:655–669.

Vattem KM, Wek RC (2004) Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:11269-11274.

Scheuner D, Song B, McEwen E, Liu C, Laybutt R, Gillespie P, Saunders T, Bonner-Weir S, Kaufman RJ (2001) Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell*. 7:1165–1176.

Santoyo J, Alcalde J, Mendez R, Pulido D, de Haro C (1997) Cloning and characterization of a cDNA encoding a protein synthesis initiation factor-2 α (eIF-2 α) kinase from *Drosophila melanogaster*. Homology To yeast GCN2 protein kinase. *J Biol Chem*. 272:12544–12550.

Berlanga JJ, Santoyo J, de Haro C (1999) Characterization of a mammalian homolog of the GCN2 eukaryotic initiation factor 2 α kinase. *Eur J Biochem*. 265:754–762.

Sood R, Porter AC, Olsen DA, Cavener DR, Wek RC (2000) A mammalian homologue of GCN2 protein kinase important for translational control by phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2 α . *Genetics*. 154:787–801.

Frey U, Morris RG (1997) Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature* 385:533–536.

Kelleher RJ 3rd, Govindarajan A, Jung HY, Kang H, Tonegawa S (2004) Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell*. 116:467–479.

Huang YY, Kandel ER (1995) D1/D5 receptor agonists induce a protein synthesis-dependent late potentiation in the CA1 region of the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:2446–2450.

Palmer MJ, Irving AJ, Seabrook GR, Jane DE, Collingridge GL (1997) The group I mGlu receptor agonist DHPG induces a novel form of LTD in the CA1 region of the hippocampus. *Neuropharmacology*. 36:1517–1532.

Impey S, Mark M, Villacres EC, Poser S, Chavkin C, Storm DR (1996) Induction of CRE-mediated gene expression by stimuli that generate long-lasting LTP in area CA1 of the hippocampus. *Neuron*. 16:973–982.

LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci*. 23:155–184.

Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*. 297:681–683.

Barco A, Alarcon JM, Kandel ER (2002) Expression of constitutively active CREB protein facilitates the late phase of long-term potentiation by enhancing synaptic capture. *Cell*. 108:689–703.

Malleret G, Haditsch U, Genoux D, Jones MW, Bliss TV, Vanhoose AM, Weitlauf C, Kandel ER, Winder DG, Mansuy IM (2001) Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin. *Cell*. 104:675–686.

Chen CY, Shyu AB (1994) Selective degradation of early-response-gene mRNAs: functional analyses of sequence features of the AU-rich elements. *Mol Cell Biol*. 14:8471–8482.

Shyu AB, Greenberg ME, Belasco JG (1989) The c-fos transcript is targeted for rapid decay by two distinct mRNA degradation pathways. *Genes Dev*. 3:60–72.

Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, Stifani S, Basak A, Prat A, Chretien M (2003) The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:928–933.

Lapointe V, Morin F, Ratté S, Croce A, Conquet F, Lacaille JC (2004) Synapse-specific mGluR1-dependent long-term potentiation in interneurons regulates mouse hippocampal inhibition. *J Physiol.* 555:125–135.

Chan J, Khan SN, Harvey I, Merrick W, Pelletier J (2004) Eukaryotic protein synthesis inhibitors identified by comparison of cytotoxicity profiles. *Rna.* 10:528–543.

Saura CA, Choi SY, Beglopoulos V, Malkani S, Zhang D, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S, Kelleher RJ 3rd, Kandel ER, Duff K, Kirkwood A, Shen J (2004) Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. *Neuron.* 42:23–36.

3.9. FIGURES AND LEGENDS

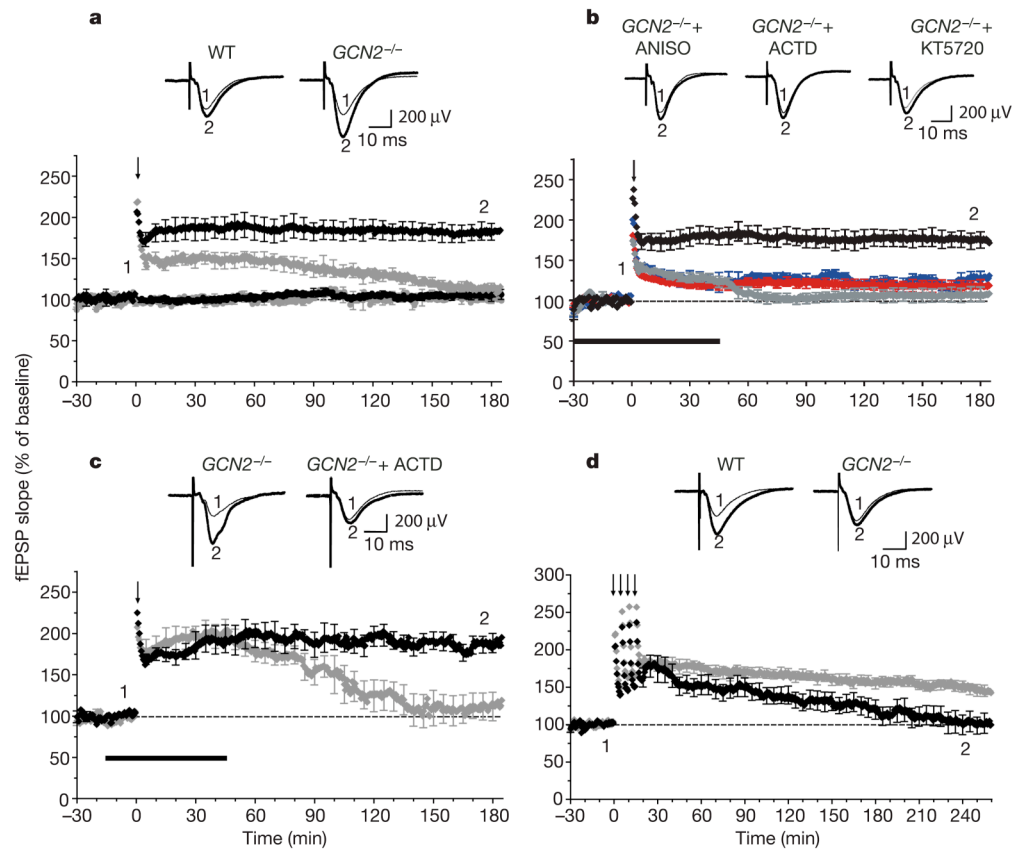


Figure 1. Unusual properties of LTP induced in slices from *GCN2*^{-/-} mice

a, One train (100 Hz for 1 s; vertical arrow) of high-frequency stimulation (HFS) elicited E-LTP in WT slices but produced a robust L-LTP in *GCN2*^{-/-} slices. Black diamonds, *GCN2*^{-/-} (n = 7; six mice); grey diamonds, WT (n = 5; four mice); black circles, *GCN2*^{-/-} without tetanic stimulation (n = 5; four mice); grey circles, WT without tetanic stimulation (n = 6; four mice). **b**, Sustained LTP in *GCN2*^{-/-} slices is decreased by anisomycin (ANISO, 40 μ M), actinomycin D (ACTD, 40 μ M) or the PKA inhibitor KT5720 (1 μ M), added for the duration of the horizontal bar. Black diamonds, *GCN2*^{-/-} plus vehicle (n = 9; eight mice); red, *GCN2*^{-/-} plus ANISO (n = 8; six mice); grey, *GCN2*^{-/-} plus ACTD (n = 10; six mice); blue, *GCN2*^{-/-} plus KT5720 (n = 7; five mice). **c**, The enhanced LTP in *GCN2*^{-/-} slices is reduced at later time points (> 90 min) by 40 μ M ACTD (horizontal bar), when applied 15 min before and 45 min after tetanus. Black diamonds, *GCN2*^{-/-} (n = 6; four mice); grey diamonds, *GCN2*^{-/-} plus ACTD (n = 7; five mice). **d**, L-LTP induced by four 100 Hz trains at 5 min intervals (vertical arrows) is stable in WT slices (grey diamonds; n = 10; six mice) but not in *GCN2*^{-/-} slices (black diamonds; n = 9; seven mice). All results show mean \pm s.e.m.

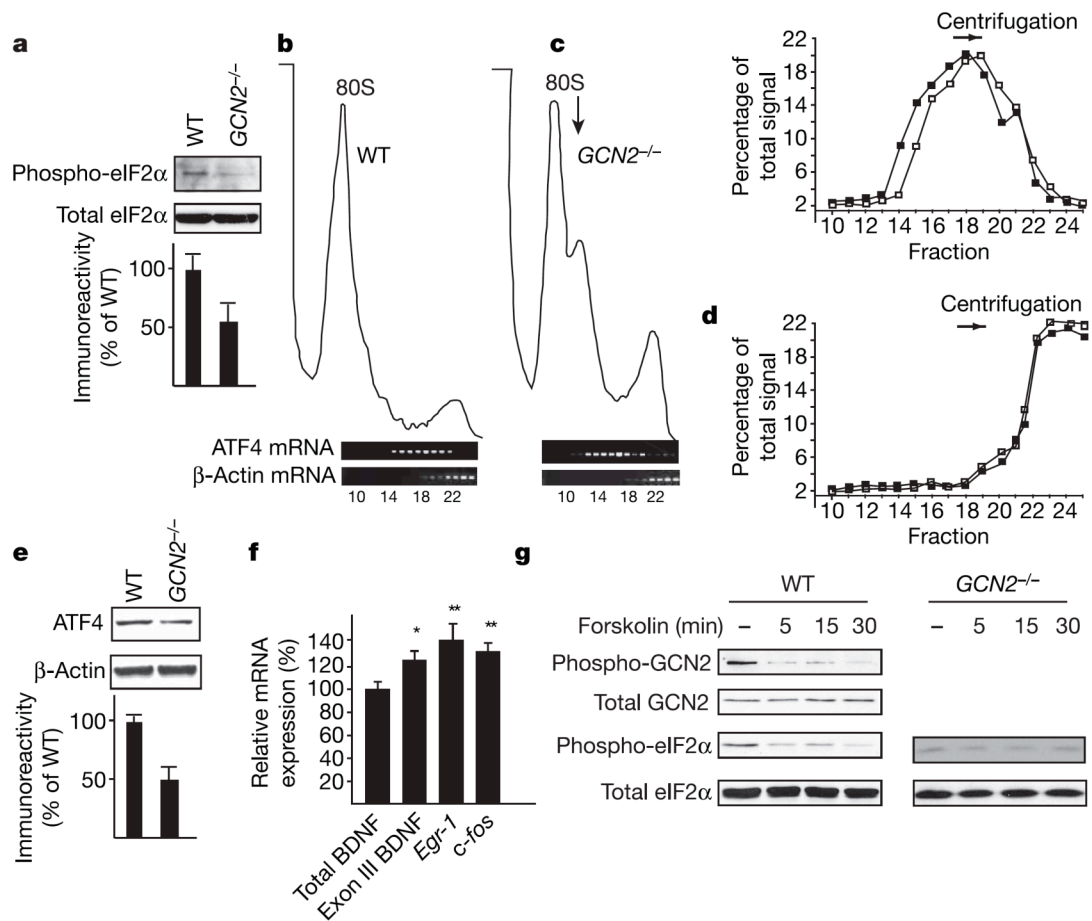


Figure 2. ATF4 mRNA translation is downregulated in *GCN2*^{-/-} mice

a, Western blots performed on hippocampal extracts show that eIF2 α phosphorylation is decreased in *GCN2*^{-/-} mice (n = 3) compared with WT mice (n = 3). **b**, In polysome profiles from hippocampal extracts, ATF4 mRNA is in lighter fractions in *GCN2*^{-/-} (right) than in WT controls (left), as determined by RT-PCR analysis. **c**, Quantification of the band intensities in each fraction from ATF4 mRNA in **b**. Open squares, WT; filled squares, *GCN2*^{-/-}. **d**, For data in **b**, band intensities are quantified for each fraction of β -actin mRNA. Open squares, WT; filled squares, *GCN2*^{-/-}. **e**, In pooled hippocampal extracts, expression of ATF4 is decreased in *GCN2*^{-/-} mice. **f**, Real-time RT-PCR analysis reveals increased expression of CREB-dependent genes in hippocampal extracts from *GCN2*^{-/-} compared with that in WT mice (for both, n = 5); mRNA expression is given as percentage of controls. Asterisk, P < 0.05; two asterisks, P < 0.01. Error bars are s.e.m. **g**, Forskolin decreases GCN2 and eIF2 α phosphorylation. In immunoblots of homogenates of CA1 region (from slices frozen immediately after stimulation), phosphorylated GCN2 and eIF2 α are decreased 5 min after application of forskolin.

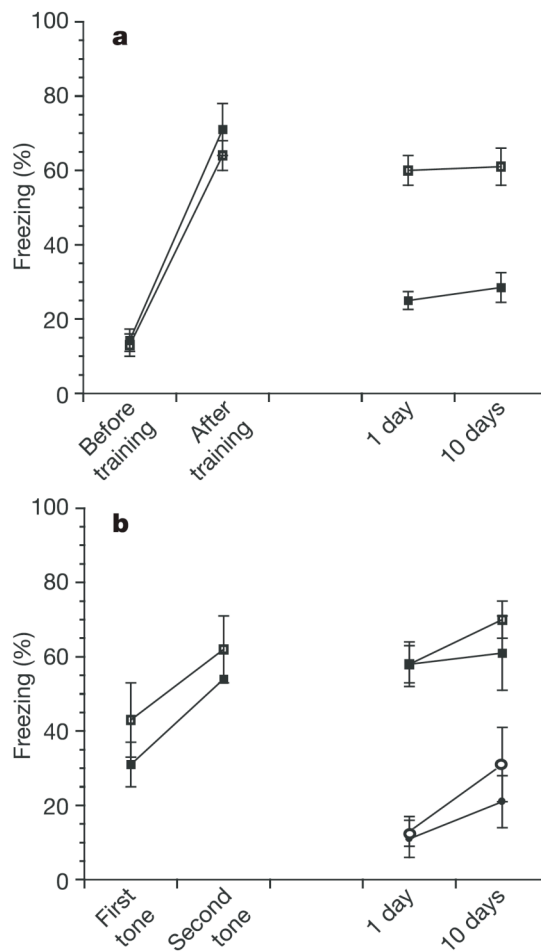


Figure 3. *GCN2*^{-/-} mice are impaired in contextual but not auditory fear conditioning

a, Acquisition of contextual freezing that compares the 2-min period before the first shock (before training) and 1-min period after the last shock (after training) is similar in *GCN2*^{-/-} (filled squares, n = 10) and WT (open squares, n = 12) mice. However, *GCN2*^{-/-} mice are impaired 1 and 10 days after acquisition. **b**, *GCN2*^{-/-} mice (filled symbols) show normal acquisition and retention of auditory fear conditioning (WT, open symbols). Labels indicate whether freezing was to tone (squares) or during the 2 min before tone (circles). All results are means ± s.e.m.

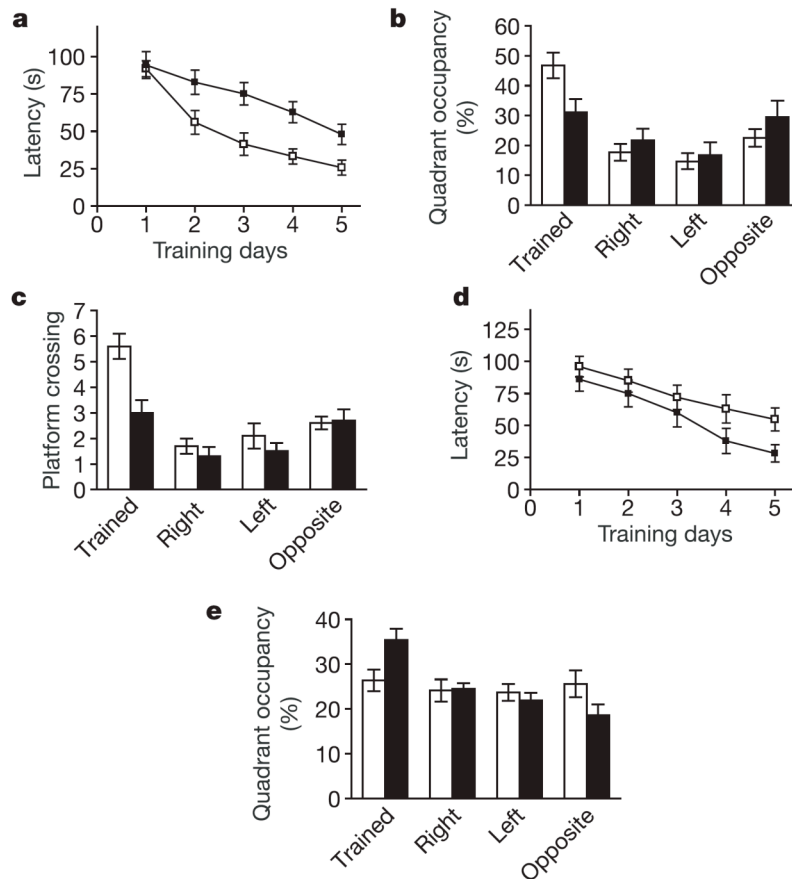


Figure 4. Long-term spatial memory of *GCN2*^{-/-} mice is enhanced after weak training but impaired after more intense training (in the Morris water maze)

a, Escape latencies in hidden-platform tests (three trials a day), plotted as a function of training days (open squares, WT, $n = 16$; filled squares, *GCN2*^{-/-}, $n = 15$), are shorter for WT than *GCN2*^{-/-} mice. **b**, After completion of training, WT mice (open bars) showed preferential quadrant occupancy in comparison with *GCN2*^{-/-} mice (filled bars). **c**, WT mice (open bars) crossed the previous site where the platform was located more times than *GCN2*^{-/-} mice (filled bars; $P < 0.001$). **d**, When locating the hidden platform (one trial a day), escape latencies were consistently shorter for *GCN2*^{-/-} mice (filled squares) than for WT mice (open squares) ($n = 15$ for both). **e**, In the occupancy test, *GCN2*^{-/-} mice (filled bars) spent more time in the trained quadrant than WT mice (open bars). All results are means \pm s.s.e.m.

3.10. SUPPLEMENTARY INFORMATION

3.10.1. Results

Basal synaptic transmission is unaltered in slices from *GCN2*^{-/-} mice. Synaptic transmission was studied at synapses made by Schaffer collateral and commissural fibers on apical dendrites of hippocampal pyramids in the CA1 stratum radiatum. Field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were obtained by stimulating and recording in the stratum radiatum. Basal synaptic transmission did not differ between slices from WT and mutant mice (supplementary Fig. 4). In particular, there was no significant difference in the input-output relation of fEPSPs as a function of stimulus intensity (supplementary Figs. 4A and B). In addition, neither paired-pulse facilitation (PPF) (supplementary Fig. 4C) – a presynaptically mediated short-term enhancement of transmission – nor the presynaptic fiber volley amplitude (supplementary Fig. 4D) were altered in slices from *GCN2*^{-/-}, as compared to WT slices. In addition, the peak amplitude in field potentials in response to the tetanus (supplementary Fig. 4E) was normal in *GCN2*^{-/-} as compared to WT slices. Taken together, these data indicate that both presynaptic and postsynaptic functions are intact in *GCN2*^{-/-} mice.

LTD. To determine whether other forms of synaptic plasticity are altered in *GCN2*^{-/-} mice, we studied long-term depression (LTD) induced by a low-frequency stimulation protocol (LFS) (O'Dell and Kandel, 1994). Stimulation at 1 Hz for 15 min induced a similar depression in brain slices from WT and *GCN2*^{-/-} mice (supplementary Fig. 6A; at 60 min, $71.3 \pm 5.9\%$ for WT slices vs. $75.9 \pm 4.8\%$ for *GCN2*^{-/-} slices, $p > 0.05$). Synaptic depression induced by DHPG, an agonist of group I mGluRs, was also examined (Palmer *et al.*, 1997). Perfusion with 50 μ M DHPG produced a similar LTD in both brain slices from WT and *GCN2*^{-/-} mice (supplementary Fig. 6B; $80.0 \pm 10.8\%$ for WT slices vs. $79.9 \pm 6.6\%$ for *GCN2*^{-/-} slices, $p > 0.05$). These results demonstrate that slices from *GCN2*^{-/-} mice exhibit normal LTD. This supports the notion that the GCN2 deletion engenders a characteristic deficit in a specific form of synaptic plasticity.

Contextual fear conditioning. The order of tone and context presentations for each memory test was counterbalanced within groups. As there were no differences in counterbalancing (p 's > 0.05), the data were merged across the appropriate conditions. For example, the data for auditory fear conditioning from animals that had the auditory

test before and after the contextual freezing test were combined. The ANOVA comparing freezing scores during the two min period prior to the first shock (pre-shocks) and the one min period following the last shock (post-shocks) between WT vs. *GCN2*^{-/-} mice revealed no significant interaction ($F < 1$). Furthermore, although there was no main effect of Group ($F(1, 12) = 1, p > 0.05$), there was a significant main effect of freezing during the pre- vs. post-shocks periods ($F(1,12) = 133, p < 0.05$). These analyses demonstrate that there were no differences between the groups and that both acquired contextual fear conditioning. In contrast, *GCN2*^{-/-} mice showed a deficit 1 and 10 days after training (Fig. 3A). A repeated measure ANOVA on the performance of WT and *GCN2*^{-/-} mice on the 1 and 10 day test revealed no significant interaction ($F < 1$), nor any significant main effect of Test ($F < 1$). Importantly, there was a significant group effect ($F(1,12) = 90, p < 0.05$).

Auditory fear conditioning. *GCN2*^{-/-} mice show an intact auditory fear conditioning (Fig. 3B). A repeated measures ANOVA on the freezing scores of the 1 or 10 day test between WT and *GCN2*^{-/-} revealed no significant interaction ($F < 1$), no main effect of Group ($F < 1$), nor a main effect of Test ($F < 1$). Moreover, performance on auditory fear conditioning was not compromised by differential levels of baseline freezing to the context during the tests as there were no differences between WT and mutant mice on pre-CS freezing (p 's > 0.05). Furthermore, there was no main effect of group ($F(1,12) = 1.4, p > 0.05$) demonstrating that the groups behaved comparably over the training session. Both groups acquired auditory fear conditioning as there was a significant main effect of training tones ($F(1,12) = 7, p < 0.05$).

3.10.2. Discussion

We show for the first time that a well-established translational regulator, GCN2, plays a critical role in synaptic plasticity, learning and memory. Although a global knockout mouse was used in this study, several lines of evidence rule out non-specific changes. First, there is no evidence of hippocampal degeneration in *GCN2*^{-/-} mice. Second, the changes in synaptic plasticity are highly specific based on several criteria: slices from *GCN2*^{-/-} mice exhibit a sustained LTP induced with a single tetanic train, impaired L-LTP elicited with 4 tetanic trains and forskolin, but normal basal transmission, paired pulse plasticity and LTD. Therefore, this novel phenotype represents a dissociation of

the three processes: E-LTP, L-LTP and LTD. Third, *GCN2*^{-/-} mice exhibit impaired behavior in two hippocampus-dependent tasks, the Morris water maze (3T/d) and contextual fear conditioning when acquired with two trials. In sharp contrast, they display normal performance on non-hippocampus-dependent tasks such as the visible platform version of the water maze and auditory fear conditioning. The ability to acquire fear auditory conditioning suggests that GCN2 is not necessary for plasticity in the amygdala, the putative site of fear learning and memory (Huber *et al.*, 2000). Moreover, *GCN2*^{-/-} mice show an enhanced spatial memory on the Morris water maze task when a weak training protocol (1 T/d) is administered. These data underscore the specificity of the behavioral impairment with multiple training protocols. Thus, the behavioral phenotypes are in accordance with the LTP effects observed with 1 and 4 tetanic trains. Furthermore, the specificity of the phenotype extends to certain other forms of plasticity and memory processes that are dependent on translation. For instance, *GCN2*^{-/-} mice show normal mGluR induced LTD and enhanced spatial memory induced with 1 T/d, both of which depend on translation (Huber *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2003).

We propose that GCN2 regulates the switch from short-term to long-term memory. Our model is consistent with the report that inhibition of an ATF4 homologue, the ApCREB-2 repressor, is associated with enhanced synaptic facilitation in *Aplysia* (Bartsch *et al.*, 1995). Mice expressing an inducible inhibitor of ATF4 and C/EBP proteins, EGFP-AZIP, are similar to *GCN2*^{-/-} mice in that a single tetanic train elicits L-LTP in hippocampal slices (Chen *et al.*, 2003). A further similarity is that for both EGFP-AZIP and *GCN2*^{-/-} mice, a weak training protocol is sufficient for the acquisition of long-term memory. However, in the EGFP-AZIP (unlike *GCN2*^{-/-}) mice, there was no impairment of either L-LTP or spatial learning induced with strong training protocols. One possible explanation for this difference is that EGFP-AZIP targets ATF4 as well as C/EBP proteins (Chen *et al.*, 2003). It is also possible that in the absence of GCN2, the expression of additional inhibitory factors, other than ATF4, is induced in response to strong stimulation.

3.10.3. Methods

Generation of Transgenic Mice by GCN2.KO4 targeting. The 5' homology arm was a 6329 base pair genomic Xba1-EcoR1 fragment terminating 147 base pairs upstream of exon 12. It was ligated into a pBS plasmid containing a thymidine kinase (TK) negative selection cassette. A double-stranded oligonucleotide with EcoR1 linkers containing a loxP site was introduced into the EcoR1 site. This 5' loxP site thus flanks exon 12 on its 5'. The 3' homology arm was recovered as a PCR fragment whose 5' end is the aforementioned genomic EcoR1 site and whose 3' end is in the 17th codon of exon 14 at a Kpn1 site introduced by the oligonucleotide used in the PCR. This 4023 base pair fragment was inserted at the EcoR1-Kpn1 sites of the aforementioned pBS plasmid. The loxP-flanked NeoR selection cassette was inserted into the intronic Nhe1 site 530 base pairs 3' of exon 12. W4 ES (Taconic, Germantown, NY) cells were transfected with the targeting vector, linearized at the Kpn1 site and homologous recombination was confirmed by PCR and Southern blotting. The targeted ES cells were transfected transiently with Cre-recombinase expression plasmids and derivative clones that had recombined across the 2 loxP sites flanking the NeoR selection cassette (GCN2.KO4c). In addition, clones that had recombined across all three loxP sites (GCN2.K04ex) were isolated. Thus, the neomycin resistance marker was excised by recombination at the flanking lox P sites. This eliminates potential gain-of-function features due to the presence of the active PGK promoter embedded in the GCN2 gene. In addition to deletion of the essential exon 12, splicing of exon 11 to exon 13 is predicted to disrupt the reading frame of the mRNA and to introduce multiple stop codons that would destabilize the mRNA. GCN2.K04ex allele was used where an 1101 base pair fragment that encompasses exon 12 was deleted. The mutant and corresponding WT alleles are detected by a three-primer PCR assay in which mGCN2.15S (5'-TCTCCCAGCGGAATCCGCACATCG-3') and mGCN2.4AS (5'-ATCCAGGCGTTGTAGTAGCGCACA-3') give a WT band of 374 bases and mGCN2.15S and mGCN2.18AS (T GCC ACT GTC AGA ATC TGA AGC AGG) give a 603 base-pair fragment from the deleted allele. The 1665 base pair fragment derived from the WT allele by amplification between mGCN2.15S and mGCN2.18AS is occasionally also detected in this assay.

Fear Conditioning. Mice were handled for 3-4 days before the start of the experiment. They were then habituated to two distinct contexts for 20 min for 3 days. The habituation sessions within a day were separated by at least 4 hours. Training consisted of two pairings of a tone (2800 Hz, 85 db, 30 s) with a co-terminating foot-shock (0.7 mA, 2 s). The first tone onset was applied 120 s after animals were placed in the conditioning chamber. Mice remained in the conditioning context for an additional minute after the end of the second pairing, at which point they were returned to their home cage. All mice were tested 1 and 10 days later for freezing to the tone (using a chamber they had not been conditioned in) and to the training context in a counterbalanced manner. For auditory fear conditioning, 2 min after being placed in the chamber (pre-CS period), the tone was played for 3 min. Mice were returned to their cages 30 s after the end of the tone. Assaying contextual fear conditioning entailed placing the animals in the conditioning context for 5 min. For all tests, at 5 s intervals, each mouse was judged as either freezing (immobility with the exception of respiration) or not freezing. Indices of memory are expressed as the percent of 5 sec intervals in which freezing was observed.

3.10.4. Supplementary figures and legends

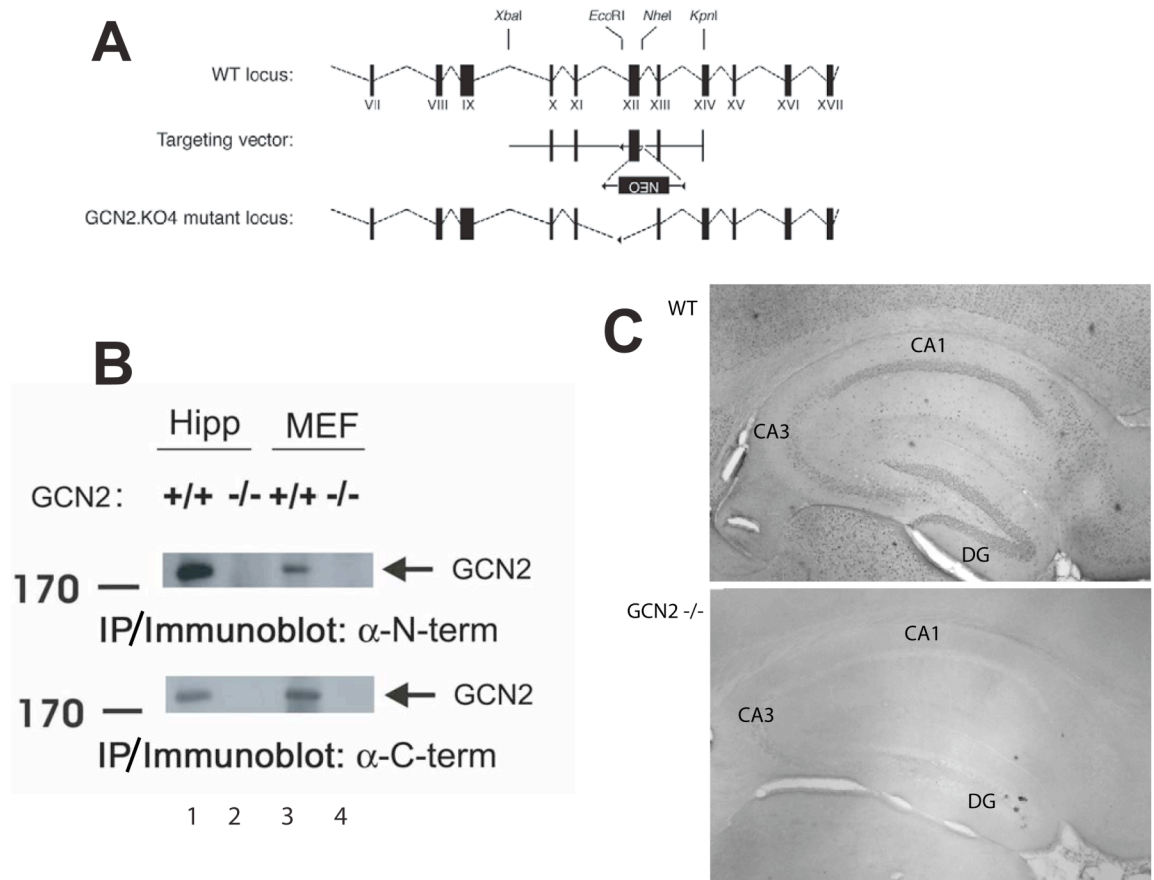


Figure S1. Generation and Characterization of the *GCN2*^{-/-} mice

A) Scheme of the region encompassing exon VII-XVII of the mouse *GCN2* locus (*EIF2AK4*). The loxP recombination sites in the targeting vector are depicted by triangles and the NEO resistance cassette, transcribed in an orientation opposite to *GCN2*, is depicted by the black rectangle. In the mutant locus (*GCN2.KO4*), recombination between the 5' and 3' loxP sites results in deletion of exon 12, which encodes residues critical for ATP binding in the kinase domain. Splicing of exon 11 to exon 13 is predicted to disrupt the reading frame of the mRNA and introduce multiple stop codons which are expected to destabilize the mRNA. B) Characterization of *GCN2* protein expression. WT and *GCN2*^{-/-} hippocampal (lanes 1 and 2) and MEF (lanes 3 and 4) extracts were immunoprecipitated with α-N-term and α-C-term *GCN2* antibodies. After SDS 15%- PAGE, blots were probed with affinity-purified-N-term and C-term antibodies as previously described (11). C) Distribution of *GCN2* as visualized by immunohistochemistry in the forebrain section of WT (upper panel) and *GCN2*^{-/-} (lower

panel) mice. GCN2 is expressed predominantly in the hippocampal CA1 region and the dentate gyrus, and to a lesser degree in CA3 (Fig. S1C, upper panel). No signal was detected in the brain of *GCN2*^{-/-} mice (Fig. 1C, lower panel).

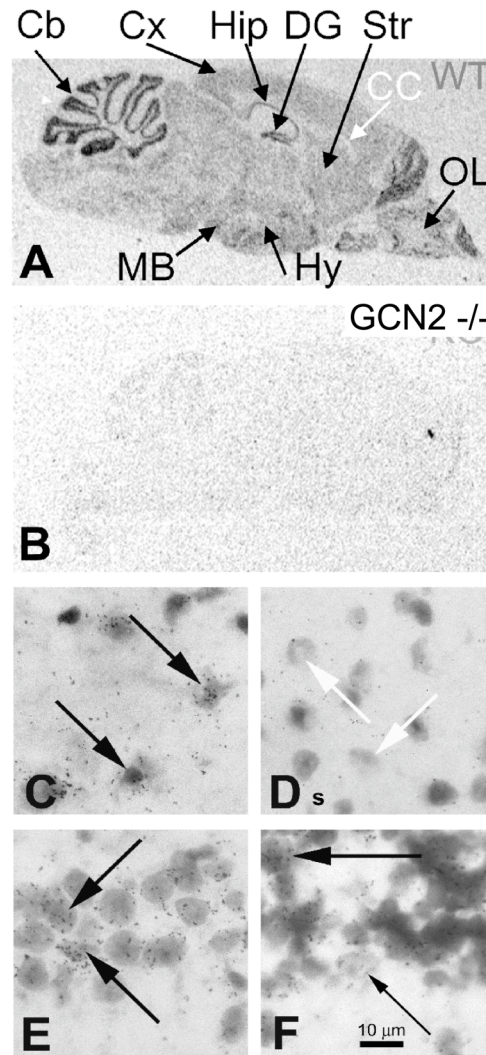


Figure S2. Expression of GCN2 in adult brain

In situ hybridization using an antisense riboprobe (all panels except for D where the cortex was probed with a sense probe) against exon 12 of mouse GCN2 was performed on dry films (A, WT and B, *GCN2*^{-/-}) and on emulsions of neuronal structures from cortex (C), hippocampus (E) and cerebellum (F, thick and thin arrows indicate granular layer and Purkinje cell neurons respectively; D, white arrows indicate neuronal position). GCN2 is expressed predominantly in the hippocampal CA1 and CA3 regions and the dentate gyrus (Fig. S2A). As expected, no GCN2 mRNA expression is detected in *GCN2*^{-/-} mice (Fig. S2B).

Abbreviations: Cb, cerebellum; CC, corpus callosum; Cx, cerebral cortex; DG, dentate gyrus; Hip, hippocampus; Hy, hypothalamus; MB, mammillary bodies; OL, olfactory lobe; Str, striatum. Magnifications: x 4.4 (in A,B) and x 1260 (in C-F). Bar (in F) = 10 μ m.

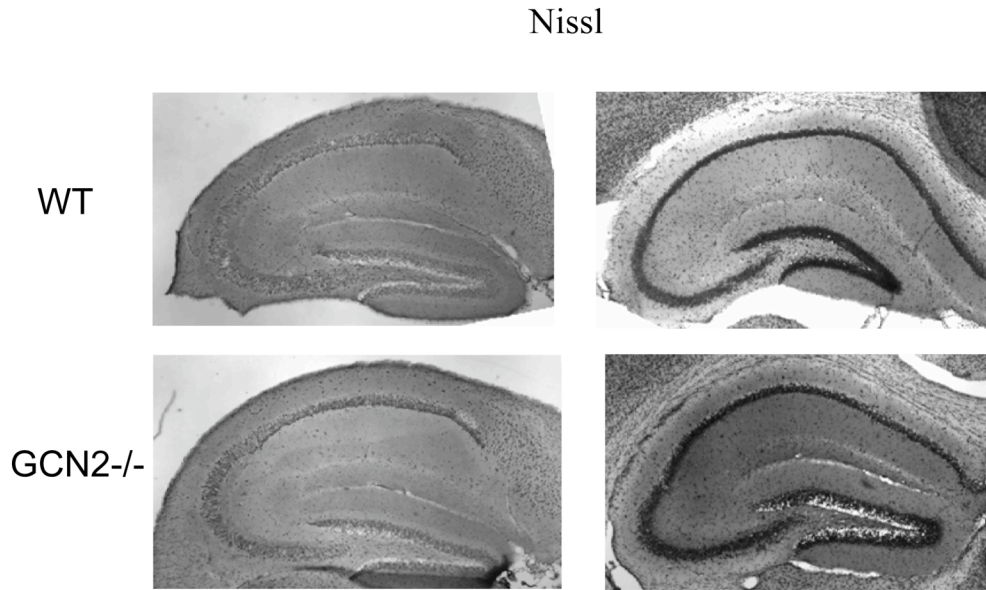


Figure S3. Lack of gross structural abnormalities in *GCN2*^{-/-} mice

Left and right panels represent sections from two different Nissl stained mouse brains.

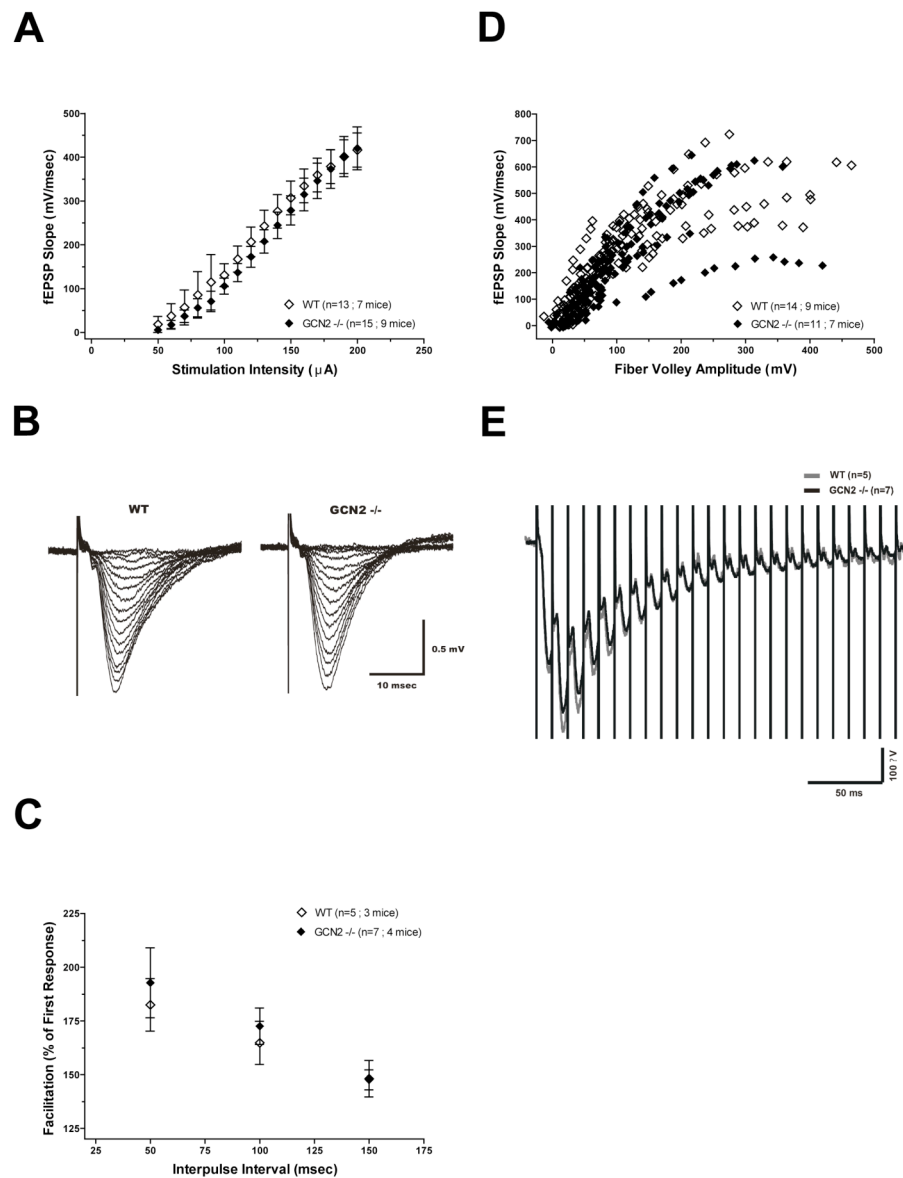


Figure S4. Normal basal synaptic transmission in *GCN2*^{-/-} mice

A) Input-output curves show similar field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) slopes over a range of stimulus intensities for both *GCN2*^{-/-} and control (WT) littermates. B) Representative traces of fEPSPs are similar for *GCN2*^{-/-} and WT mice. C) Comparison of paired-pulse facilitation (PPF) in *GCN2*^{-/-} and WT slices. Data are presented as the mean (\pm SEM) facilitation of the second response relative to the first response. D) Input-output relation of fEPSPs as a function of pre-synaptic fiber volley size was similar for WT and *GCN2*^{-/-} slices. E) Superimposed mean fEPSPs during tetanization (100 Hz, 1s) show no significant difference between *GCN2*^{-/-} and WT slices ($p > 0.05$).

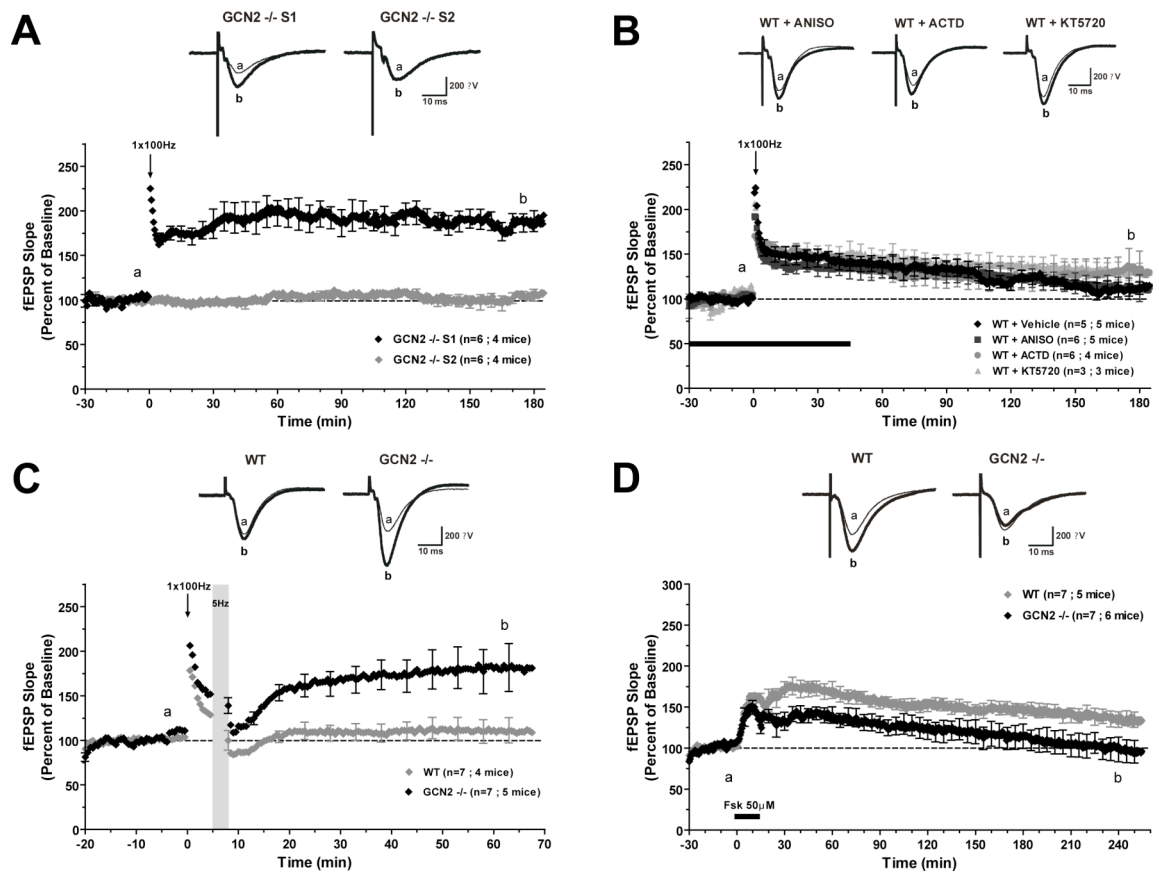


Figure S5. Properties of LTP induced in slices from *GCN2*^{-/-} mice

A) Two independent inputs S1 and S2 to the same neuronal population were alternatively stimulated. One train of high frequency stimulation (100 Hz for 1s) in S1 elicited a robust and sustained LTP, whereas test stimulation (0.033 Hz) in S2 revealed stable recording during the entire experiment session in the same slice. Gray diamonds represent a control stimulated synaptic input, S2, that remained stable at baseline level for the entire experimental session. B) E-LTP elicited in WT slices is not affected by translation, transcription or PKA inhibitors. E-LTP produced in WT slices is not affected by anisomycin (ANISO, 40 μ M; at 180 min, LTP was $110.4 \pm 7.2\%$ for control slices and $112.8 \pm 5.6\%$ for treated slices, $p > 0.05$), actinomycin D (ACTD, 40 μ M; at 180 min, LTP was $110.4 \pm 7.2\%$ for control slices and $119.9 \pm 15.1\%$ for treated slices, $p > 0.05$) or the PKA inhibitor KT5720 (1 μ M; at 180 min, $110.4 \pm 7.2\%$ for controls vs. $130.0 \pm 9.1\%$ for treated slices, $p > 0.05$). C) Forskolin-induced L-LTP (50 μ M) was impaired in *GCN2*^{-/-} slices (at 240 min $136.6 \pm 9.4\%$ for WT vs. $100.9 \pm 12.9\%$ for *GCN2*^{-/-} slices, $p < 0.05$). D) Five minutes after a single train of 100 Hz, stimulation at 5 Hz depotentiated LTP elicited in WT slices, whereas the sustained LTP induced in

GCN2^{-/-} slices was resistant to depotentiation (at 60 min, 111.1 ± 12.5% for WT slices vs. 179.8 ± 24.1% for *GCN2*^{-/-} slices, *p* < 0.05). Representative fEPSP recordings from time points (a) and (b) are shown for each condition.

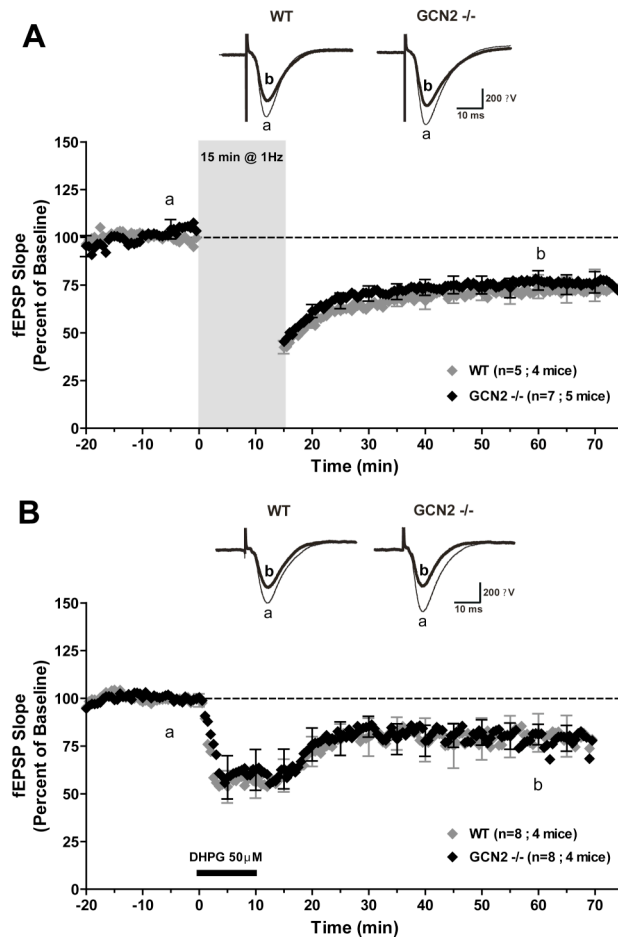


Figure S6. LTD is normal in *GCN2*^{-/-} slices

A) WT and *GCN2*^{-/-} slices showed no significant difference in LTD induced by 1 Hz stimulation. B) LTD induced by 50 μM DHPG was normal in both WT and *GCN2*^{-/-} slices.

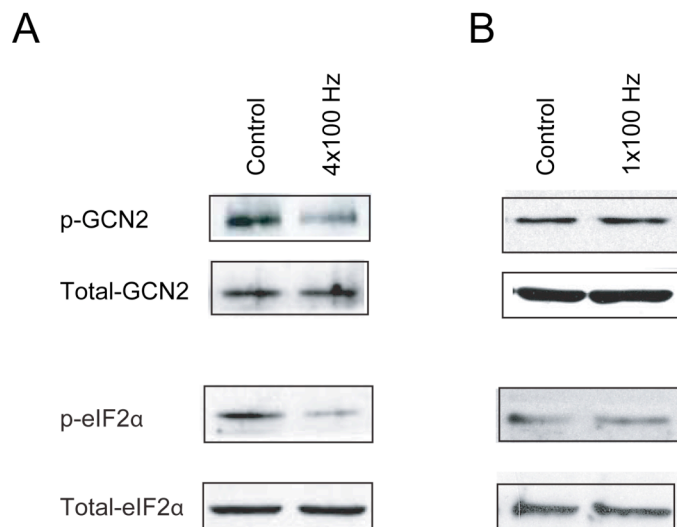


Figure S7. L-LTP but not E-LTP-inducing protocols regulate GCN2 activity

Hippocampal slices were either test stimulated (0.033 Hz) or stimulated with 1 or 4 trains of HFS (n =4). Extracts were prepared from CA1 region from slices that had been frozen 15 minutes after either control stimulation or 4 trains of 100 Hz stimulation. Western Blotting shows that unlike 1 train (B), 4 trains (A) of HFS decreases GCN2 and eIF2α phosphorylation.

3.10.5. Supplementary References.

O'Dell TJ, Kandel ER (1994) Low-frequency stimulation erases LTP through an NMDA receptor-mediated activation of protein phosphatases. *Learn Mem.* 1:129-139.

Palmer MJ, Irving AJ, Seabrook GR, Jane DE, Collingridge GL (1997) The group I mGlu receptor agonist DHPG induces a novel form of LTD in the CA1 region of the hippocampus. *Neuropharmacology.* 36:1517-1532.

LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci.* 23:155-84.

Huber KM, Kayser MS, Bear MF (2000) Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR-dependent long-term depression. *Science.* 288:1254-1257.

Chen A, Muzzio IA, Malleret G, Bartsch D, Verbitsky M, Pavlidis P, Yonan AL, Vronskaya S, Grody MB, Cepeda I, Gilliam TC, Kandel ER (2003) Inducible enhancement of memory storage and synaptic plasticity in transgenic mice expressing an inhibitor of ATF4 (CREB-2) and C/EBP proteins. *Neuron*. 39:655-669.

Bartsch D, Ghirardi M, Skehel PA, Karl KA, Herder SP, Chen M, Bailey CH, Kandel ER (1995) Aplysia CREB2 represses long-term facilitation: relief of repression converts transient facilitation into long-term functional and structural change. *Cell*. 83:979-992.

CHAPITRE IV. DEUXIÈME SECTION DE RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

4.1. PRÉAMBULE ET RÉSUMÉ

Ce chapitre comporte la publication suivante :

Mauro Costa-Mattioli, Delphine Gobert, Elad Stern, Karine Gamache, Rodney Colina, Claudio Cuello, Wayne Sossin, Randal Kaufman, Jerry Pelletier, Kobi Rosenblum, Krešimir Krnjević, Jean-Claude Lacaille, Karim Nader, and Nahum Sonenberg. *eIF2 α phosphorylation bidirectionally regulates the switch from short- to long-term synaptic plasticity and memory*. Cell, 129(1):195-206; 6 Avril 2007.

Pour cette deuxième publication, j'ai à nouveau effectué l'ensemble des expériences d'électrophysiologie (voir Figures 1 et 5, ainsi que Figures S2, S3 et S6). D'autre part, j'ai procédé à la préparation de tous les échantillons d'hippocampe nécessaires au profil polysomique et à la RT-PCR (voir Figure 5), ainsi que tous les traitements pharmacologiques des tranches d'hippocampe destinées au transfert par immunobuvardage (ou *Western Blot*, voir Figure 5 et Figure S1). Cette importante contribution m'a permis d'être à nouveau deuxième auteur sur cet article réalisé en collaboration avec le Dr Mauro Costa-Mattioli, du laboratoire du Dr Nahum Sonenberg de l'Université McGill, ainsi qu'avec plusieurs autres laboratoires. Le Dr Mauro Costa-Mattioli a pour sa part coordonné le projet et contribué à l'ensemble des études comportementales (voir Figures 2, 3, 4 et 6, ainsi que Figures S4, S5 et S8). Il a de plus réalisé les expériences de transfert par immunobuvardage (Figure 5 et 6, ainsi que Figure S1).

La phase tardive de la potentialisation à long-terme (LTP) ainsi que la mémoire à long-terme requièrent toutes deux l'expression de nouveaux gènes; cependant les mécanismes moléculaires qui sous-tendent ces phénomènes demeurent peu compris. La phosphorylation d'eIF2 α inhibe la traduction générale, mais stimule aussi sélectivement

la traduction d'ATF4, un répresseur de la phase tardive de la LTP et de la mémoire à long-terme dépendant de CREB. Dans cette étude, nous avons utilisé une approche pharmacogénétique bidirectionnelle afin d'examiner le rôle de la phosphorylation d'eIF2 α dans la plasticité synaptique et l'apprentissage comportemental. Ainsi, chez des souris mutantes eIF2 α ^{+S51A}, chez lesquelles la phosphorylation d'eIF2 α est réduite, le seuil pour induire la phase tardive de la LTP dans des tranches d'hippocampe est réduit et la mémoire à long-terme est facilitée. En revanche, lorsque la phosphorylation d'eIF2 α est augmentée par l'injection au niveau de l'hippocampe d'une petite molécule qui prévient la déphosphorylation d'eIF2 α , Sal003, seule la phase précoce de la LTP est induite suite à une stimulation tétanique répétée et la mémoire à long-terme est inhibée. Ces résultats soulignent donc l'importance de la régulation d'un unique site de phosphorylation d'eIF2 α , pour l'induction de la phase tardive de la potentialisation à long-terme et de la mémoire à long-terme.

4.2. ABSTRACT

The late phase of long-term potentiation (LTP) and memory (LTM) requires new gene expression, but the molecular mechanisms that underlie these processes are not fully understood. Phosphorylation of eIF2 α inhibits general translation but selectively stimulates translation of ATF4, a repressor of CREB-mediated late-LTP (L-LTP) and LTM. We used a pharmacogenetic bidirectional approach to examine the role of eIF2 α phosphorylation in synaptic plasticity and behavioral learning. We show that in eIF2 α ^{+S51A} mice, in which eIF2 α phosphorylation is reduced, the threshold for eliciting L-LTP in hippocampal slices is lowered, and memory is enhanced. In contrast, only early-LTP is evoked by repeated tetanic stimulation and LTM is impaired, when eIF2 α phosphorylation is increased by injecting into the hippocampus a small molecule, Sal003, which prevents the dephosphorylation of eIF2 α . These findings highlight the importance of a single phosphorylation site in eIF2 α as a key regulator of L-LTP and LTM formation.

4.3. INTRODUCTION

Repeated synaptic activation results in sustained potentiation of synaptic transmission (LTP), a putative cellular model of learning and memory (Bliss and Collingridge, 1993; Chen and Tonegawa, 1997; Malenka and Nicoll, 1999; Pittenger and Kandel, 2003; Dudai, 2004). Both memory and synaptic plasticity have two components. One, evoked by weak training protocols or a single-tetanic train, yields only transient phenomena, short-term memory (STM, lasting minutes to hours), and the early phase of LTP (E-LTP, lasting 1–3 hr). The second component, which follows strong training or repeated-tetanic trains, activates mechanisms that stabilize the memory and synaptic changes and results in long-term memory (LTM, lasting days, weeks or years) and the late phase of LTP (L-LTP, lasting many hours), respectively. Quite different molecular machineries, widely conserved from sea slugs to rodents (Kandel, 2001), are thought to underlie these two components: modifications of pre-existing proteins are sufficient for the transient changes, whereas new gene expression (transcription and translation) is required for those that are sustained (Silva *et al.*, 1998; Kandel, 2001; Dudai, 2004; Kelleher *et al.*, 2004; Klann and Dever, 2004; Sutton and Schuman, 2006). For instance, LTM and L-LTP are suppressed by agents that block mRNA and protein synthesis and, conversely, both are induced more readily in transgenic mice in which gene expression is facilitated (Malleret *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004). Although we still do not fully understand the molecular mechanism by which gene expression is turned on, there is good reason to believe that the removal of constraints on gene expression is a critical step (Kandel, 2001; Genoux *et al.*, 2002).

In diverse phyla, the transcription factor ATF4 is a repressor of cAMP responsive element binding protein (CREB)-mediated gene expression, which is required for L-LTP and LTM (Bartsch *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2003). The expression of ATF4 is regulated at the level of translation (Harding *et al.*, 2000). Phosphorylation of the α subunit of the translation initiation factor eIF2 suppresses general translation (Hinnebusch, 2000), but selectively stimulates the translation of ATF4 mRNA (Lu *et al.*, 2004; Vattam and Wek, 2004). Neuronal activity-dependent modulation of eIF2 α phosphorylation is likely to be important for sustained changes in synaptic transmission as induction of L-LTP in

hippocampal slices, by either tetanic stimulation or treatment with forskolin or BDNF, is correlated with decreased eIF2 α phosphorylation (Takei *et al.*, 2001; Costa-Mattioli *et al.*, 2005). In mice lacking the eIF2 α kinase, GCN2, the reduction in phosphorylated eIF2 α is associated with altered synaptic plasticity and memory (Costa-Mattioli *et al.*, 2005). To investigate the role of eIF2 α phosphorylation in long-term plasticity and behavioral memory, we used eIF2 α heterozygous mice (eIF2 α ^{+S51A}) in which the phosphorylation site is mutated. We report here that in eIF2 α ^{+S51A} mice L-LTP and LTM formation are facilitated, as determined by several behavioral tasks. Moreover, a small molecule inhibitor of eIF2 α dephosphorylation, Sal003, blocks L-LTP and memory storage, thus further demonstrating that eIF2 α phosphorylation is a critical step in L-LTP and memory formation.

4.4. RESULTS

4.4.1 Brain Morphology Is Not Altered in eIF2 α ^{+S51A} Mice

Newborn homozygous mutants (Ser to Ala at the phosphorylation site Ser51) are phenotypically indistinguishable from their wild-type (WT) littermates. However, they die shortly after birth, owing to hypoglycemia (Scheuner *et al.*, 2001). eIF2 α heterozygous mutants (eIF2 α ^{+S51A}) are viable, fertile, of normal size and weight, and they develop normally (Scheuner *et al.*, 2001; Scheuner *et al.*, 2005). There were no detectable differences in the overall morphology of the brain or hippocampus between eIF2 α ^{+S51A} and WT mice, as determined by Nissl staining of coronal sections (Figures S1A and S1B in the Supplemental Data available with this article), or with two immunohistochemical markers: (1) GAP-43, a neural-specific growth-associated protein and marker of axonal growth and presynaptic terminals that stains particularly the perforant pathway to dentate gyrus and the CA3 and CA1 regions (Figure S1C), and (2) synaptophysin, a major synaptic vesicle protein that is a marker of presynaptic terminals, including those of the mossy fiber and Schaffer collateral projections (Figure S1D; Small *et al.*, 2000).

Hippocampal eIF2 α phosphorylation is reduced by $\sim 50\%$ in eIF2 $\alpha^{+/S51A}$ mice relative to WT mice, as determined by immunohistochemistry and Western blotting (Figures S1E and S1F). The level of ATF4 is also reduced ($\sim 40\%$) in the hippocampus of eIF2 $\alpha^{+/S51A}$ mice, as compared to WT mice (Figure S1G).

4.4.2. Inhibition of eIF2 α Phosphorylation Leads to Enhancement of Synaptic Plasticity and Memory

Late-LTP Is Facilitated in Slices from eIF2 $\alpha^{+/S51A}$ Mice. Previous studies showed an association between decreased eIF2 α phosphorylation and a lowered threshold for eliciting L-LTP (Takei *et al.*, 2001; Costa-Mattioli *et al.*, 2005). Thus, we predicted that reduced eIF2 α phosphorylation should facilitate L-LTP. To test this hypothesis, we compared LTP in CA1 of hippocampal slices from eIF2 $\alpha^{+/S51A}$ mice and WT littermates. In WT slices, a single train of high-frequency stimulation of Schaffer collateral/commissural fibers (100 Hz for 1 s) elicited the expected short-lasting LTP (early-LTP; E-LTP) (Figure 1A), which in contrast to L-LTP, does not require RNA or protein synthesis (Kandel, 2001 and Kelleher *et al.*, 2004). However, in slices from eIF2 $\alpha^{+/S51A}$ mice, such stimulation elicited a sustained L-LTP (Figure 1A), which was blocked by anisomycin (Figure 1B) or actinomycin-D (Figure 1C). Thus, the sustained L-LTP elicited by a single tetanic train in eIF2 $\alpha^{+/S51A}$ slices depended on translation and transcription. The input-output relation of field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs), plotted as a function of stimulus intensity, and paired-pulse facilitation (PPF) indicated no difference in basal transmission between slices from eIF2 $\alpha^{+/S51A}$ and WT mice (Figure S2). Therefore, a nonspecific change in synaptic transmission cannot account for the facilitation of L-LTP observed in eIF2 $\alpha^{+/S51A}$ slices. These data demonstrate that a reduction in eIF2 α phosphorylation in eIF2 $\alpha^{+/S51A}$ slices leads to the conversion of a transient E-LTP into a sustained L-LTP.

In further experiments, we investigated the effect of eIF2 α phosphorylation on L-LTP. In hippocampal slices stimulated with four trains at 100 Hz, which normally induce L-LTP in WT slices (Kandel, 2001 and Kelleher *et al.*, 2004), a similar L-LTP was observed in eIF2 $\alpha^{+/S51A}$ and WT mice (Figure 1D). Forskolin, an activator of adenylate cyclase (Seamon *et al.*, 1981), elicited a virtually identical L-LTP in slices from

eIF2 α ^{+S51A} and WT mice (Figure S3). These data indicate that decreased eIF2 α phosphorylation does not interfere with the induction of L-LTP.

4.4.3. Spatial Learning and Memory Are Enhanced in eIF2 α ^{+S51A} Mice

Hippocampus-dependent spatial learning and memory were first studied in the Morris water maze (Morris *et al.*, 1982). Because weak stimulation was sufficient to induce L-LTP in eIF2 α ^{+S51A} slices, mice were first trained only once per day, for 6 days, in a weaker training protocol than the standard three/four trials per day protocol (Chen *et al.*, 2003; Costa-Mattioli *et al.*, 2005). The time required for the mice to find the hidden platform (“escape latencies”) did not differ until day 6, when eIF2 α ^{+S51A} mice reached the platform significantly faster than did WT littermates (Figure 2A). Another indication of enhanced spatial learning by eIF2 α ^{+S51A} mice was their significantly greater preference for the target quadrant, during the probe test conducted at the end of the sessions (Figure 2B). Next, mice were trained three times per day (strong protocol) for 6 days. The escape latencies of eIF2 α ^{+S51A} mice were already significantly shorter on training days 2 and 3, as compared to control mice (Figure 2C). During the first probe test (PT1) after 3 days of training, eIF2 α ^{+S51A} mice, unlike their WT littermates, spent significantly more time in the target quadrant, thus confirming their superior ability in spatial learning (Figure 2D). At the end of training on day 6, however, escape latencies (Figure 2C) or the preference for the target quadrant in the second probe test (PT2 in Figure 2E) were similar for eIF2 α ^{+S51A} and WT mice. We conclude that, relative to WT mice, eIF2 α ^{+S51A} mice show enhanced hippocampus-dependent spatial learning and memory.

4.4.4. Contextual and Auditory Fear Conditioning Are Enhanced in eIF2 α ^{+S51A} Mice

Pairing tone presentation with a foot shock in a particular environmental context leads to both auditory and contextual fear conditioning. In the latter, the context is represented in the hippocampus and acts as the conditioned stimulus (CS), which is associated with the foot shock, the unconditioned stimulus (US). Auditory fear conditioning, which associates the tone (CS) and the foot shock (US), depends on the amygdala but not the hippocampus (Fanselow and LeDoux, 1999; LeDoux, 2000). Both types of fear

conditioning require new protein synthesis (Bourtchouladze *et al.*, 1998; Schafe *et al.*, 1999).

Naïve WT and eIF2 α ^{+S51A} mice showed similar freezing responses prior to training and before the delivery of the foot shock. However, eIF2 α ^{+S51A} mice froze nearly twice as often as did WT mice 24 hr after a weak training protocol (a single pairing of a tone with a 0.35 mA foot shock) (Figure 3A). A similar result was obtained when mice were tested for auditory fear conditioning (Figure 3B). The auditory tests were performed in a chamber that differed from the training chamber to minimize the influence of contextual memory.

WT and eIF2 α ^{+S51A} mice exhibited equivalent levels of freezing to cued and fear conditioning when tested 1 hr after a strong training protocol (two pairings of a tone with a 0.7 mA foot shock) (Figure S4). However, after a delay of 24 hr, both contextual and auditory fear conditioning were enhanced in eIF2 α ^{+S51A} mice (Figures 3C and 3D). The finding that in eIF2 α ^{+S51A} mice, short-term contextual and auditory memory are normal (Figure S4) argues against nonspecific responses to fear. In addition, the normal incidence of freezing in control tests (Figure 3) and in the elevated plus maze (data not shown) indicates a physiological level of anxiety in eIF2 α ^{+S51A} mice. Taken together, these data suggest that long-term memory is selectively enhanced in eIF2 α ^{+S51A} mice, as compared to WT littermates, in both contextual and auditory fear learning.

4.4.5. Long-Term Taste Memory and Extinction Are Enhanced in eIF2 α ^{+S51A} Mice

Mice were subjected to two additional learning tasks: conditioned taste aversion (CTA) and latent inhibition (LI) of CTA. In CTA, a novel taste (CS) is followed by an unpleasant experience (US). A salient feature of this type of conditioning is that the CS and US can be separated by many hours. Like other long-term memories, CTA depends on protein synthesis, in this instance within the gustatory insular cortex (Rosenblum *et al.*, 1993). Latent inhibition (LI), the weakening of CTA produced by pre-exposure to the same CS, is also a form of learning that is dependent on new protein synthesis (Rosenblum *et al.*, 1993).

WT and eIF2 α ^{+S51A} mice did not differ in their natural preference for saccharin (Figure S5A) and aversion to quinine (Figure S5B), thus showing no indication of any nonspecific impairment that would compromise their ability to perform this task. For CTA, after 3 days of water restriction, the naïve mice were offered saccharin followed by a malaise-inducing injection of LiCl. Two days after this aversive conditioning to saccharin, the aversion index did not significantly differ between control and eIF2 α ^{+S51A} mice (Figure 4A). The lack of difference between WT and eIF2 α ^{+S51A} mice in CTA may be explained by a ceiling effect of the very high aversion index or by enhanced negative aversion to the naturally preferred saccharine. In contrast, learning of a novel taste using a milder protocol, in the LI paradigm, was significantly enhanced in eIF2 α ^{+S51A} mice as shown by the lower aversion index in comparison to the WT mice (Figure 4A).

Repeated application of a CS without reinforcement by the US leads to a progressive extinction of the conditioned reflex (Pavlov, 1927). The rate of extinction of CTA, indicated by the gradual drop in aversion index on subsequent days, was similar for control and eIF2 α ^{+S51A} mice (Figures 4B and 4C). However, there was a sharp difference between WT and eIF2 α ^{+S51A} mice with regard to the effect of LI, which was induced by pre-exposure to saccharin for 2 days preceding the CTA protocol. Throughout the period of testing, CTA of control mice was not significantly reduced by LI (Figure 4B), whereas the decay of the aversion index in eIF2 α ^{+S51A} mice was remarkably accelerated, the aversion being already abolished by day 1 and replaced by a strong preference for saccharin by day 2 (Figure 4C). These data suggest that the much more rapid extinction of CTA in eIF2 α ^{+S51A} mice reflects accelerated learning (reinforcement) of the new taste (saccharin) (Sheffield and Roby, 1950).

4.4.6. Increased eIF2 α Phosphorylation Leads to Impairment of Synaptic Plasticity and Memory

The Small Molecule Sal003 Promotes eIF2 α Phosphorylation. Our hypothesis predicts that preventing eIF2 α dephosphorylation should block L-LTP and LTM. To test this prediction, we used a potent derivative of salubrinal, Sal003 (Robert *et al.*, 2006), which prevents dephosphorylation of eIF2 α by blocking eIF2 α phosphatases

(Boyce *et al.*, 2005). As expected, Sal003 sharply increased eIF2 α phosphorylation in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) (Figure 5A). As noted above, phosphorylation of eIF2 α should decrease general translation but stimulate that of ATF4 mRNA (Harding *et al.*, 2000). In Sal003-treated cells, polysomes dissociated (Figure 5B, right panel), and consistent with this, β -actin mRNA shifted to lighter fractions (Figure 5D), reflecting the inhibition of general translation. In contrast, ATF4 mRNA shifted to heavier polysomal fractions (Figure 5C), indicating the selective translation de-repression of this mRNA.

Sal003 Impairs L-LTP in WT Slices but Not in Slices from ATF4 Knockout Mice.

In accordance with our prediction, L-LTP induced by four trains in hippocampal slices from WT mice was prevented by Sal003 (Figure 5E), whereas E-LTP was unaffected (Figure S6A). The effect of Sal003 was specific to the potentiated synapses, as basal synaptic transmission was not altered (Figure S6B). An important finding was that when Sal003 was applied 45 min after the high-frequency tetani (when LTP was fully established), L-LTP was not suppressed (Figure S6C). Thus, enhanced eIF2 α phosphorylation interferes with the induction but not the maintenance of L-LTP. These results demonstrate that increased eIF2 α phosphorylation blocks the conversion of E-LTP to L-LTP.

To what extent does the impairment of L-LTP caused by Sal003 depend on ATF4? We addressed this question by examining the effect of Sal003 in hippocampal slices from *ATF4*^{-/-} mice (Masuoka and Townes, 2002). Comparable L-LTP was elicited by four trains of 100 Hz stimulation in slices from *ATF4*^{-/-} and WT mice (data not shown). However, in sharp contrast to WT slices, L-LTP induction was not prevented by Sal003 in slices from *ATF4*^{-/-} mice (Figure 5F). It is noteworthy that Sal003 inhibited translation to the same extent (~ 20%) in WT and *ATF4*^{-/-} hippocampal slices, as determined by 35S-methionine incorporation followed by TCA precipitation (data not shown). This indicates that the effect of Sal003 on L-LTP is not due to disparate inhibition of translation in WT and *ATF4*^{-/-} slices. These data constitute compelling evidence that Sal003 blocks L-LTP by specifically increasing the translation of ATF4 mRNA, a mechanism that cannot occur in *ATF4*^{-/-} mice.

Sal003 Impairs Long-Term Memory. Given that L-LTP-inducing stimulation results in decreased eIF2 α phosphorylation (Takei *et al.*, 2001; Costa-Mattioli *et al.*, 2005), we investigated whether eIF2 α phosphorylation is altered during LTM formation in the hippocampus. At different times after a contextual fear conditioning, rats were euthanized, the hippocampi isolated, and the level of eIF2 α phosphorylation was determined by Western blotting. Already by 30 min after training, eIF2 α phosphorylation was reduced approximately by half (Figures 6A and 6B).

To examine the effect of eIF2 α phosphorylation on the consolidation of fear memories, Sal003 was bilaterally infused into the dorsal hippocampus (Figure S7), immediately after training. The dorsal hippocampus was removed 30 min later (Figure 6C), and the levels of eIF2 α phosphorylation were determined. Strikingly, Sal003 infusion blocked the decrease in eIF2 α phosphorylation normally observed after training (Figures 6D and 6E). In analogous experiments (Figure 6F), Sal003-infused rats showed a significant reduction (~ 50%) in freezing response when tested for contextual fear conditioning 24 hr after training (Figure 6G). These data are consistent with previous reports that inhibitors of gene expression administered immediately after fear conditioning disrupt long-term memory (Bourtchouladze *et al.*, 1998). In contrast, Sal003 did not affect fear memory associated with a tone (Figure 6H), as expected, since the drug was injected only into the hippocampus, and auditory fear conditioning is independent of the hippocampus. The normal auditory fear conditioning shows that the suppression of contextual freezing by Sal003 was not caused by nonspecific impairment of the animals' ability to perform the task.

To examine whether Sal003 treatment of WT rats is a reciprocal model for the eIF2 α ^{+S51A} mutation, experiments were performed in the Morris water maze. The rats were trained by the standard training protocol (three trials per day, for 6 days). Sal003 or vehicle was bilaterally infused into the hippocampus within 5 min of the end of each day's training (Morris *et al.*, 2006) over sessions 1–6 (Figure S8). The significant increase in escape latency (Figure S8A) and the reduced quadrant occupancy (Figure S8B) clearly indicate that Sal003 impaired spatial long-term memory formation. These findings demonstrate that a local increase in eIF2 α phosphorylation counteracts the

physiological post-training decrease in eIF2 α phosphorylation and impairs hippocampus-dependent long-term contextual memory.

4.5. DISCUSSION

4.5.1. eIF2 α Phosphorylation Regulates Gene Expression-Dependent Synaptic Plasticity and Memory

De novo gene expression (via translational and transcriptional mechanisms) is required for long-lasting synaptic plasticity and memory (Silva *et al.*, 1998, Kandel, 2001; Dudai, 2004; Kelleher *et al.*, 2004; Klann and Dever, 2004; Sutton and Schuman, 2006). Our results provide new insight into the mechanism of mnemonic processes by showing that changes at a single phosphorylation site of a key translation initiation factor bidirectionally modulate synaptic plasticity and memory storage. Specifically, we found that reduced phosphorylation of eIF2 α in eIF2 α ^{+S51A} mice is associated with enhanced synaptic plasticity (Figure 1), learning, and memory (Figure 2, Figure 3 and Figure 4). Conversely, when dephosphorylation of eIF2 α is blocked by Sal003, both L-LTP induction (but not maintenance) and long-term memory are impaired (Figure 5 and Figure 6 and S8). Thus, our study provides genetic, chemical, physiological, behavioural, and molecular evidence that eIF2 α dephosphorylation is essential for the induction of L-LTP and LTM.

Other lines of evidence support the hypothesis that dephosphorylation of eIF2 α is critical for the induction of gene expression leading to L-LTP and LTM. First, eIF2 α phosphorylation promotes the translation of ATF4 mRNA, which encodes an inhibitor of CREB-driven gene expression, long-term synaptic and memory storage in different phyla (Bartsch *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2003). Second, eIF2 α phosphorylation regulates protein synthesis, which is required for long-lasting synaptic plasticity and memory consolidation (Kelleher *et al.*, 2004, Klann and Dever, 2004; Sutton and Schuman, 2006). Third, eIF2 α phosphorylation is decreased by procedures that induce L-LTP (Takei *et al.*, 2001; Costa-Mattioli *et al.*, 2005) and memory formation. Fourth, both L-

LTP and LTM are more readily induced in mice lacking GCN2, the major kinase responsible for the phosphorylation of eIF2 α in the brain (Costa-Mattioli *et al.*, 2005).

4.5.2. eIF2 α Phosphorylation: A Molecular Switch for L-LTP and Memory Consolidation

How does eIF2 α phosphorylation mediate the switch from short-term to long-term synaptic changes and memory? Our model is based on the regulation of gene expression by eIF2 α phosphorylation (Figure 7). Under basal conditions, when eIF2 α is partly phosphorylated by GCN2, ATF4 acts as a brake on the expression of CREB-dependent genes and protein synthesis is diminished. By reducing eIF2 α phosphorylation, repeated training or tetanic stimulation lowers the level of ATF4 and removes the inhibitory constraint and also increases protein synthesis. Both mechanisms lead to the expression of genes required for long-term synaptic plasticity and memory. As a result of these changes in gene expression, the threshold for eliciting L-LTP and LTM is lowered. For instance, in eIF2 α ^{+S51A} and GCN2^{-/-} mice, in which both eIF2 α phosphorylation and ATF4 levels are reduced, the threshold for eliciting L-LTP and LTM is lowered (Costa-Mattioli *et al.*, 2005 and Figure 1, Figure 2, Figure 3 and Figure 4). This model is supported by the increase in ATF4 expression upon treatment with Sal003 (Figure 5C), which leads to an impairment of L-LTP and LTM (Figure 5 and Figure 6, and S8). The critical role of ATF4 in these processes is emphasized by the preservation of L-LTP in Sal003-treated ATF4^{-/-} slices (Figure 5F). Thus, these data provide direct genetic evidence that the impairment of L-LTP caused by Sal003 is dependent on ATF4's repressor action.

Additional evidence that ATF4 regulates L-LTP and LTM comes from the study of Chen *et al.*, (2003). They reported that in a transgenic mouse expressing a dominant-negative inhibitor (EGFP-AZIP) that targets both C/EBP proteins and ATF4, long-term synaptic plasticity and memory were facilitated under weak training protocols (Chen *et al.*, 2003). This scheme is also consistent with previous studies on the ATF4 homolog in Aplysia (ApCREB2). After injection of anti-ApCREB2 antibodies into Aplysia sensory neurons, a single pulse of serotonin (5-HT), which normally induces short-term facilitation, evoked a gene expression-dependent facilitation that lasted more than one

day (Bartsch *et al.*, 1995). Thus, activation of gene expression is critical for long-term synaptic plasticity and memory formation.

Dephosphorylation of eIF2 α could also lead to an increase in general protein synthesis. Since an increase in translation could facilitate LTP, it might in principle contribute to the enhancement of LTP and LTM in eIF2 α ^{+S51A} mice. However, the lack of effect of Sal003 in slices from *ATF4*^{-/-} mice demonstrates that eIF2 α phosphorylation acts primarily through regulation of ATF4 levels. It is likely that treatment with Sal003 for short times affects ATF4 mRNA translation to a greater extent than general translation. Indeed, in yeast it is known that levels of eIF2 α phosphorylation that do not inhibit general translation, are sufficient for the enhanced translation of the *GCN4* mRNA, which encodes a transcription factor of the same b-ZIP family, which contains ATF4 (Hinnebusch, 2000; Hinnebusch, 2005). Though a significant block in general translation initiation was observed when Sal003 was applied for a long period (~ 8 hr; Figure 5B), there was only a modest decrease in general translation when slices were incubated in the presence of Sal003 for 1 hr (Figures 5E and 5F). Taken together, these data strongly suggest that eIF2 α acts as a switch for both LTP and LTM through modulation of ATF4 mRNA translation.

4.5.3. Differences between *GCN2*^{-/-} and eIF2 α ^{+S51A} Mice

Hippocampal ATF4 levels are regulated through GCN2-mediated phosphorylation of eIF2 α (Costa-Mattioli *et al.*, 2005). Accordingly, L-LTP and LTM are enhanced in eIF2 α ^{+S51A} mice following weak tetanic stimulation or weak training in various behavioral tasks. However, in contrast to *GCN2*^{-/-} mice, in which L-LTP and LTM are impaired in response to repeated tetani or strong behavioral training, L-LTP and LTM are enhanced in eIF2 α ^{+S51A} mice. A possible explanation for this difference is that strong training or tetanic stimulation cause GCN2 to phosphorylate other targets in the brain (in addition to eIF2 α) which interfere with L-LTP and LTM formation. Clearly, there must be limits to the extent to which the threshold for LTP induction can be manipulated. Therefore, it is conceivable that a mild induction of translation would facilitate L-LTP and LTM. However, too much translation may interfere with the optimal pattern of synaptic weight changes and may even induce an excess of proteins

that antagonize L-LTP and LTM (such as depotentiation-related proteins). Another difference between $GCN2^{-/-}$ and $eIF2\alpha^{+/S51A}$ mice is that auditory fear conditioning is normal in $GCN2^{-/-}$ mice, whereas it is enhanced in $eIF2\alpha^{+/S51A}$ mice, after both weak and strong training protocols. Thus, in the amygdala, decreased $eIF2\alpha$ phosphorylation enhances memory formation, but this may occur in a $GCN2$ -independent manner. Thus, either $GCN2$ is not the major $eIF2\alpha$ kinase in the amygdala, or the pathway that turns off $GCN2$ activity is not activated by auditory fear conditioning.

In conclusion, we have shown that the induction of L-LTP and LTM is facilitated by decreased $eIF2\alpha$ phosphorylation and impaired by increased $eIF2\alpha$ phosphorylation. Taken together, these data strongly support the notion that under physiological conditions, a decrease in $eIF2\alpha$ phosphorylation constitutes a critical step for the activation of gene expression that leads to the long-term synaptic changes required for memory formation. Our data suggest that $ATF4$ is an important regulator of these processes. These findings also raise the interesting possibility that regulators of translation could serve as therapeutic targets for the improvement of memory, for instance in human disorders associated with memory loss.

4.6. EXPERIMENTAL PROCEDURES

4.6.1. $eIF2\alpha^{+/S51A}$ Mice

$eIF2\alpha^{+/S51A}$ mice were backcrossed for 15 generations to C57Bl/6J mice. They were weaned at the fifth postnatal week and their genotypes determined (Scheuner *et al.*, 2001; Scheuner *et al.*, 2005). $ATF4^{-/-}$ mice were kindly provided by Dr. Tim Townes (Masuoka and Townes, 2002). All experiments were done with 2- to 4-month-old males. Mice were kept on a 12 hr light/dark cycle, and the behavioral experiments were always done during the light phase of the cycle. Mice had access to food and water ad libitum except during tests. All the procedures followed the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and were approved by the McGill Facility Animal Care Committee.

4.6.2. Cell Culture and Sal003 Treatment

Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (BioWhittaker), 100 units/ml penicillin, 10% fetal bovine serum, and 100 µg/ml streptomycin. MEFs were treated with 10 µM Sal003 for the indicated time periods, washed twice with ice-cold phosphate-buffered solution, and lysed as previously described (Costa-Mattioli *et al.*, 2005).

4.6.3. Immunohistochemistry and Western Blotting

Hippocampal cell lysates and Western blots, using total and p-eIF2α antibodies, were performed as described (Costa-Mattioli *et al.*, 2005). Immunohistochemistry was performed as described (Côté *et al.*, 1993). Digital photos were taken using the Axiovision 4 Imaging program (Zeiss).

4.6.4. Electrophysiology

Transverse hippocampal slices (400 µm) were cut from brains of WT or eIF2α^{+S51A} age-matched littermates (6–12 weeks old) as described earlier (Costa-Mattioli *et al.*, 2005). Briefly, slices were kept submerged at 27°C–28°C and superfused (1–2 ml/min) with oxygenated (95% O₂, 5% CO₂) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing: 124 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 1.3 mM MgSO₄, 2.5 mM CaCl₂, 26 mM NaHCO₃ and 10 mM glucose. Bipolar tungsten stimulating electrodes were placed in the CA1 stratum radiatum to stimulate the Schaffer collateral and commissural fibers, and extracellular field EPSPs (fEPSPs) were recorded with a glass microelectrode (2–3 MΩ, filled with 2 M NaCl) positioned in the stratum radiatum. Baseline stimulation frequency was 2 min⁻¹ and the intensity of the 0.1 ms pulses was adjusted to evoke 35%–40% maximal fEPSPs.

Tetanic LTP was induced by high-frequency stimulation in brief trains (100 Hz, 1 s), applied either as a single train or four trains separated by 5 min intervals. When indicated, ACSF contained anisomycin (40 µM, Calbiochem), actinomycin-D (40 µM, Calbiochem), or Sal003 (10 µM) for 30 min before the onset of tetanic stimulation. To reduce day-to-day variability, simultaneous recordings were obtained from two slices. On a given day, data were recorded from WT, eIF2α^{+S51A} slices, and slices treated with

drugs or vehicle. The experimenter was blind to the mouse genotype. Statistical analyses were done by t tests and two-way ANOVA. All electrophysiological data are presented as means \pm SEM and “n” indicates the number of slices.

4.6.5. Contextual and Auditory Fear Conditioning

Tests were performed on 2- to 4-month-old male eIF2 α ^{+S51A} and WT littermates by an experimenter blind to mouse genotype. Mice were handled for 3–4 days before the start of the experiment. They were habituated to two distinct contexts (here named A and B) for 20 min for 3 days. Within a single day, the habituation sessions were separated by at least 4 hr. After 3 days of habituation, mice were trained in chamber A. Training consisted of a 2 min period of acclimatizing to the context, followed by one pairing of a tone (2800 Hz, 85 dB, 30 s) with a coterminating foot shock (0.35 mA, 1 s) for the weak training protocol, or two pairings of a tone (2800 Hz, 85 dB, 30 s) with a coterminating foot shock (0.7 mA, 2 s) for the strong training protocol. The mice remained in the chamber for an additional 1 min after the end of the last pairing, after which they were returned to their home cages. Contextual fear conditioning was assayed 1 hr and 24 hr after training by replacing the animals in the conditioning context (chamber A) for a 5 min period, during which the incidence of freezing (immobile except for respiration) was recorded. The tests of auditory fear conditioning consisted of a 2 min acclimatizing period to the context (chamber B; pre-CS period), followed by a 3 min presentation of the same tone (2800 Hz, 85 dB, 30 s) (CS). Mice were returned to their cages 30 s after the end of the tone. For all tests, each mouse was judged at 5 s intervals as either freezing or not freezing. Data are expressed as the percent of 5 s intervals in which freezing was observed. Tests of responses to the training context (chamber A) and to the tone (chamber B) were done in a counterbalanced manner. Statistical analysis was based on repeated measures ANOVA and between-group comparisons by Tukey's Test.

4.6.6. Morris Water Maze

The task was performed as described (Morris *et al.*, 1982; Costa-Mattioli *et al.*, 2005). Mice were trained in one trial per day (1T/d) or three trials per day (3T/d), with 30 min intertrial intervals, over 6 consecutive days. Learning was evaluated by monitoring escape latencies to a hidden (submerged) platform with an automated video tracking

system (HVS Image, Buckingham, UK). For probe trials, the platform was removed from the maze and the animals were allowed to search for 60 s. The percentage of time spent in each quadrant of the maze (quadrant occupancy) was recorded. Swimming speed was similar in WT and control and mutant animals (data not shown). The experimenter was blind to the genotype for all behavioral tests and trials were performed at the same time of day (± 1 hr) during the animal's light phase. Statistical analysis was based on repeated measures ANOVA. In-between-group comparisons were performed by Tukey's Test. A level of 5% was considered significant. The p value is reported.

4.6.7. Conditioned Taste Aversion and Latent Inhibition

Conditioned taste aversion (CTA) was studied as described by (Rosenblum *et al.*, 1993), with a few modifications. Saccharin (0.5% w/v) was the unfamiliar taste (conditioned stimulus [CS]), and 0.14 M LiCl i.p. (volume 2% of body weight) the malaise-inducing agent (unconditioned stimulus [US]). Mice were trained for 3 days to get their daily water ration (once only, for 20 min) from two pipettes, each containing 5 ml of water ("water restriction"). On the fourth day, the conditioning day, mice were given the saccharin solution instead of water (for 20 min), and 60 min later, received the LiCl injection. Two days after training, in a multiple choice test (one pipette with 5 ml of saccharin solution and one with 5 ml of water), the conditioned mice preferred water to saccharin, whereas nonconditioned mice preferred saccharin to water. The results are presented as the aversion index, which is defined as the volume of water consumed as a fraction of total fluid intake [ml water/(ml water + ml saccharin solution)]: an index of 0.5 indicates no preference; the higher the index, the greater the preference for water instead of the negatively conditioned taste.

In the LI experiments, 2 days before CTA training, the mice were exposed on 2 consecutive days to saccharin for 20 min (experimental) or tap water (control). The taste aversion index was determined for 5 consecutive days.

Tests of the natural reactions to bitter quinine and sweet saccharin were done on mice habituated to drinking from pipettes (conditioning was not needed). In three consecutive drinking sessions, mice had access to two pipettes simultaneously, one containing 5 ml

of either 0.04% quinine or 0.5% saccharin and the other 5 ml of water. The aversion index was defined as in the CTA tests.

4.6.8. Cannulation and Sal003 Infusion

Rats (300–325g body weight) were cannulated as described previously (Debiec *et al.*, 2002). Briefly, rats were anesthetized with a 1 ml/kg of body weight i.p. injection of a mixture of ketamine (55.5 mg/ml), xylazine (3.33 mg/ml), and medetomidine hydrochloride (0.27 mg/ml). Anesthetized rats were mounted in a stereotaxic frame and guide cannulae (22 gauge) were bilaterally implanted into the dorsal hippocampus, angled at 10° away from the midline. The tips of the cannulae were located 3.6 mm posterior to bregma, 3.1 mm lateral to the midline, and 2.4 mm ventral from the skull surface (Paxinos and Watson, 1986) Three jewelry screws were inserted into the skull and acrylic cement was applied to stabilize the cannulae. A 28 gauge probe was inserted into the guide to prevent clogging. Rats were housed individually and allowed a week to recover from the surgery before the experiments. During the recovery period, animals were handled daily. Sal003 was dissolved in DMSO and further diluted in 0.9% NaCl (saline) to a final DMSO concentration of 0.1%. Two µl of 20 µM Sal003 or vehicle (0.1% DMSO in saline) were infused bilaterally into the cannulae through a 28 gauge injection needle (injectors) immediately after behavioral training. The infusions were driven by a motorized syringe pump (kdScientific) at a rate of 0.25 µl/min. Following 8 min of infusion, the injector remained in the guide cannula for an additional minute, to ensure adequate diffusion of the solutes from the tip of the injector. With only minor modifications, the contextual fear conditioning protocol was as described above for mice. Briefly, the training consisted of two pairings of a tone (2800 Hz, 85 dB, 30 s) with a stronger coterminating foot shock (1.5 mA, 2 s), and freezing was recorded over the whole 5 min period of interest (not at 5 s intervals).

After completion of the behavioral experiments, animals were anesthetized with urethane (0.5 g/ml i.p.) and decapitated. The brains were then fixed in a 10% formalin-saline, 20% sucrose solution. Brain sections (50 µm thick) were stained with formal-thionin to identify the placements of the cannulae. Statistical analysis was based on repeated measures ANOVA and between-group comparisons by Tukey's Test.

4.6.9. Polysome Profile Analysis and RT-PCR

Polysome profiles were obtained as previously described (Costa-Mattioli *et al.*, 2005). MEFs were treated with Sal003 for 8 hr and washed twice with cold PBS + 100 µg/ml cycloheximide, suspended in lysis buffer, homogenized with 15 strokes (7 ml Wheaton Dounce) on ice, and then centrifuged for 2 min at 14,000g. The supernatant was loaded onto a 10%–50% sucrose gradient prepared in 20 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 100 mM KCl, and 5 mM MgCl₂ and was centrifuged in an SW40 rotor at 35,000 rpm for 2 hr. Gradients were analyzed by piercing the tube with a Brandel tube piercer, passing 60% sucrose through the bottom of the tube, and monitoring the absorbance of the eluting material with an ISCO UA-6 UV detector. Total RNA from individual fractions was isolated with Trizol (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. ATF4 and β-actin mRNAs were amplified in one-tube RT-PCR reactions which were optimized to detect the exponential phase on the amplification curve (3).

4.7. ACKNOWLEDGMENTS

We thank R. Darnell, A. Fine, R. Blitzer, R. Kelleher, A. Koromilas, C. Alberini, Y. Dudai, and M. Fabian for comments on the manuscript; A. Rosenfeld, M. Bidinosti, and R. Dowling for proofreading; T. Townes for providing the ATF4^{-/-} mice; A. LaFrance for assisting in the maintenance of the eIF2α^{+S51A} mice; T. Lawson, N. Taheri, and C. Lister for excellent assistance. This work was supported by a Team grant from the Canadian Institute of Health Research (CIHR) to N.S., K.N., J.P., J.-C.L., and M.C.-M, a Howard Hughes Medical Institute (HHMI) grant to N.S., an NIH grant to R.K., a CIHR and an EJLB Foundation grant to K.N., and an ISF for K.R. N.S. is an HHMI International scholar. M.C.-M. was supported by a CIHR postdoctoral fellowship.

4.8. REFERENCES

Bartsch D, Ghirardi M, Skehel PA, Karl KA, Herder SP, Chen M, Bailey CH, and Kandel ER (1995). Aplysia CREB2 represses long-term facilitation: relief of repression

converts transient facilitation into long-term functional and structural change. *Cell* 83, 979–992.

Bliss TV, and Collingridge GL (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31–39.

Bourtchouladze R, Abel T, Berman N, Gordon R, Lapidus K, and Kandel ER (1998). Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learn. Mem.* 5, 365–374.

Boyce M, Bryant KF, Jousse C, Long K, Harding HP, Scheuner D, Kaufman RJ, Ma D, Coen DM, Ron D, *et al.* (2005). A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* 307, 935–939.

Chen A, Muzzio IA, Malleret G, Bartsch D, Verbitsky M, Pavlidis P, Yona AL, Vronskaya S, Grody MB, Cepeda I, *et al.* (2003). Inducible enhancement of memory storage and synaptic plasticity in transgenic mice expressing an inhibitor of ATF4 (CREB-2) and C/EBP proteins. *Neuron* 39, 655–669.

Chen C, and Tonegawa S (1997). Molecular genetic analysis of synaptic plasticity, activity-dependent neural development, learning, and memory in the mammalian brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 20, 157–184.

Costa-Mattioli M, Gobert D, Harding H, Herdy B, Azzi M, Bruno M, Bidinosti M, Ben Mamou C, Marcinkiewicz E, Yoshida M, *et al.* (2005). Translational control of hippocampal synaptic plasticity and memory by the eIF2alpha kinase GCN2. *Nature* 436, 1166–1173.

Côté SL, Ribeiro-da-Silva A, and Cuello AC (1993). Current protocols for light microscopy. immunocytochemistry. In *Immunohistochemistry II*, A.C. Cuello, ed. (West Sussex: Wiley).

Debiec J, LeDoux JE, and Nader K (2002). Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron* 36, 527–538.

Dudai Y (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu. Rev. Psychol.* 55, 51–86.

Fanselow MS, and LeDoux JE (1999). Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. *Neuron* 23, 229–232.

Genoux D, Haditsch U, Knobloch M, Michalon A, Storm D, and Mansuy IM (2002). Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. *Nature* 418, 970–975.

Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, and Ron D (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell* 6, 1099–1108.

Hinnebusch AG (2000). Mechanism and regulation of initiator methionyl-tRNA binding to ribosomes. In *Translational Control of Gene Expression*, N. Sonenberg, J.W. Hershey, and M.B. Mathews, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 185–244.

Hinnebusch AG (2005). Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 407–450.

Kandel ER (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294, 1030–1038.

Kelleher RJ 3rd, Govindarajan A, and Tonegawa S (2004). Translational regulatory mechanisms in persistent forms of synaptic plasticity. *Neuron* 44, 59–73.

Klann E, and Dever TE (2004). Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 931–942.

LeDoux JE (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 155–184.

Lu PD, Harding HP, and Ron D (2004). Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J. Cell Biol.* 167, 27–33.

Malenka RC, and Nicoll RA (1999). Long-term potentiation—a decade of progress? *Science* 285, 1870–1874.

Malleret G, Haditsch U, Genoux D, Jones MW, Bliss TV, Vanhoose AM, Weitlauf C., Kandel ER, Winder DG, and Mansuy, IM (2001). Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin. *Cell* 104, 675–686.

Masuoka HC, and Townes TM (2002). Targeted disruption of the activating transcription factor 4 gene results in severe fetal anemia in mice. *Blood* 99, 736–745.

Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, and O’Keefe J (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681–683.

Morris RG, Inglis J, Ainge JA, Olverman HJ, Tulloch J, Dudai Y, and Kelly PA (2006). Memory reconsolidation: sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval. *Neuron* 50, 479–489.

Pavlov I (1927). *Conditioned Reflexes*, 1960 edition (NY: Dover Publications).

Paxinos G, and Watson C (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (Sydney: Academic Press).

Pittenger C, and Kandel ER (2003). In search of general mechanisms for long-lasting plasticity: Aplysia and the hippocampus. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 358, 757–763.

Robert F, Kapp LD, Khan SN, Acker MG, Kolitz S, Kazemi S, Kaufman RJ, Merrick WC, Koromilas AE, Lorsch JR, *et al.* (2006). Initiation of Protein Synthesis by Hepatitis C Virus Is Refractory to Reduced eIF2 {middle dot} GTP {middle dot} Met-tRNA^{iMet} Ternary Complex Availability. *Mol. Biol. Cell* 17, 4632–4644.

Rosenblum K, Meiri N, and Dudai Y (1993). Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behav. Neural Biol.* 59, 49–56.

Schafe GE, Nadel NV, Sullivan GM, Harris A, and LeDoux JE (1999). Memory consolidation for contextual and auditory fear conditioning is dependent on protein synthesis, PKA, and MAP kinase. *Learn. Mem.* 6, 97–110.

Scheuner D, Mierde DV, Song B, Flamez D, Creemers JW, Tsukamoto K., Ribick M, Schuit FC, and Kaufman RJ (2005). Control of mRNA translation preserves endoplasmic reticulum function in beta cells and maintains glucose homeostasis. *Nat. Med.* 11, 757–764.

Scheuner D, Song B, McEwen E, Liu C, Laybutt R, Gillespie P, Saunders T, Bonner-Weir S, and Kaufman RJ (2001). Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol. Cell* 7, 1165–1176.

Seamon KB, Padgett W, and Daly JW (1981). Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3363–3367.

Sheffield FD, and Roby TB (1950). Reward value of a non-nutritive sweet-taste. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 43, 471–481.

Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, and Kida S (1998). CREB and memory. *Annu. Rev. Neurosci.* 21, 127–148.

Small SA, Wu EX, Bartsch D, Perera GM, Lacefield CO, DeLaPaz R, Mayeux R, Stern Y, and Kandel ER (2000). Imaging physiologic dysfunction of individual hippocampal subregions in humans and genetically modified mice. *Neuron* 28, 653–664.

Sutton MA, and Schuman EM (2006). Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory. *Cell* 127, 49–58.

Takei N, Kawamura M, Hara K, Yonezawa K, and Nawa H (2001). Brain-derived neurotrophic factor enhances neuronal translation by activating multiple initiation processes: comparison with the effects of insulin. *J. Biol. Chem.* 276, 42818–42825.

Vattem KM, and Wek RC (2004). Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101, 11269–11274.

Wang H, Ferguson GD, Pineda VV, Cundiff PE, and Storm DR (2004). Overexpression of type-1 adenylyl cyclase in mouse forebrain enhances recognition memory and LTP. *Nat. Neurosci.* 7, 635–642.

4.9. FIGURES AND LEGENDS

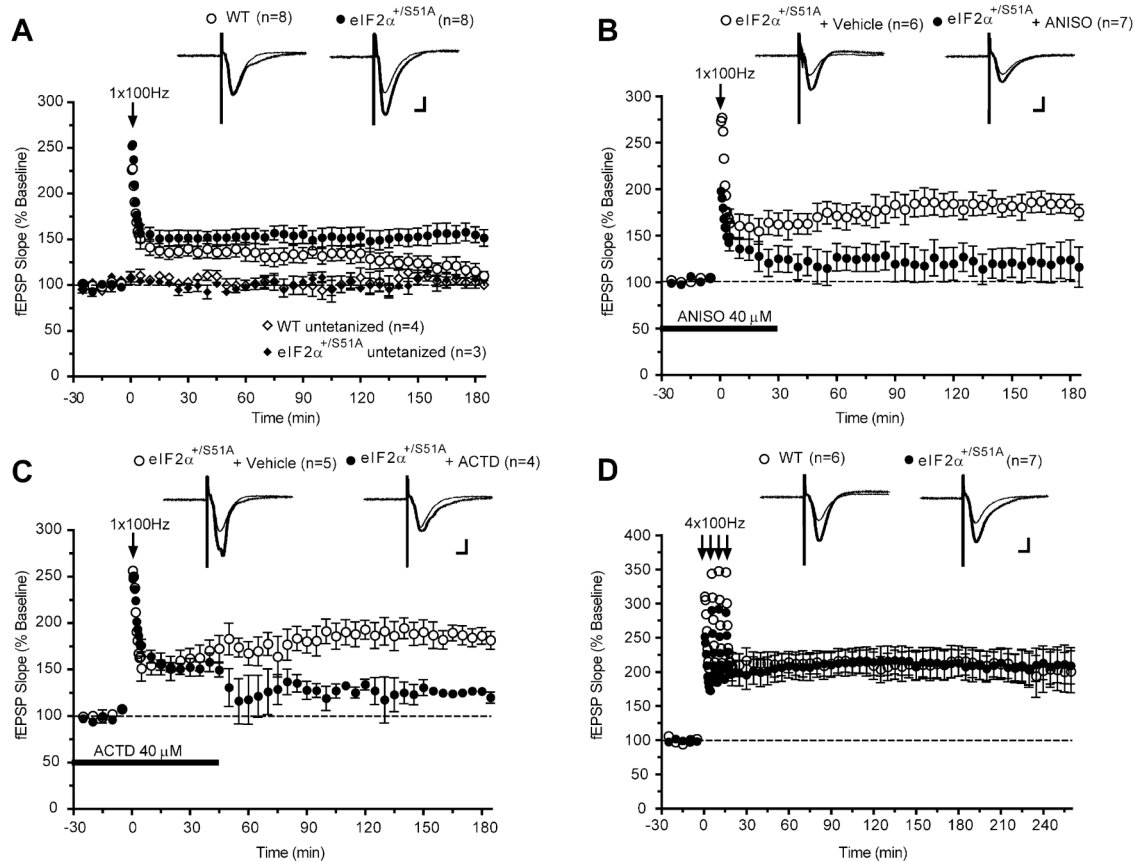


Figure 1. Late-LTP Is Induced by Single or Multiple Tetanic Trains in Hippocampal Slices from eIF2 α ^{+/S51A} Mice

(A) A single 100 Hz train of stimulation elicits only E-LTP in control slices (open circles), whereas LTP is sustained in eIF2 α ^{+/S51A} slices (closed circles; at 180 min, $p < 0.01$). The sustained L-LTP elicited in eIF2 α ^{+/S51A} slices is suppressed by (B) anisomycin (ANISO, closed circles; at 180 min $p < 0.05$) or (C) actinomycin-D (ACTD, closed circles; at 180 min $p < 0.01$). Horizontal bars indicate the period of incubation with anisomycin and actinomycin-D. (D) Similar L-LTP is induced by four tetanic trains in slices from WT and eIF2 α ^{+/S51A} mice (at 240 min $p > 0.05$). Data are means \pm SEM; numbers of tests are indicated. Scale bar represents 5 ms, 100 μ V.

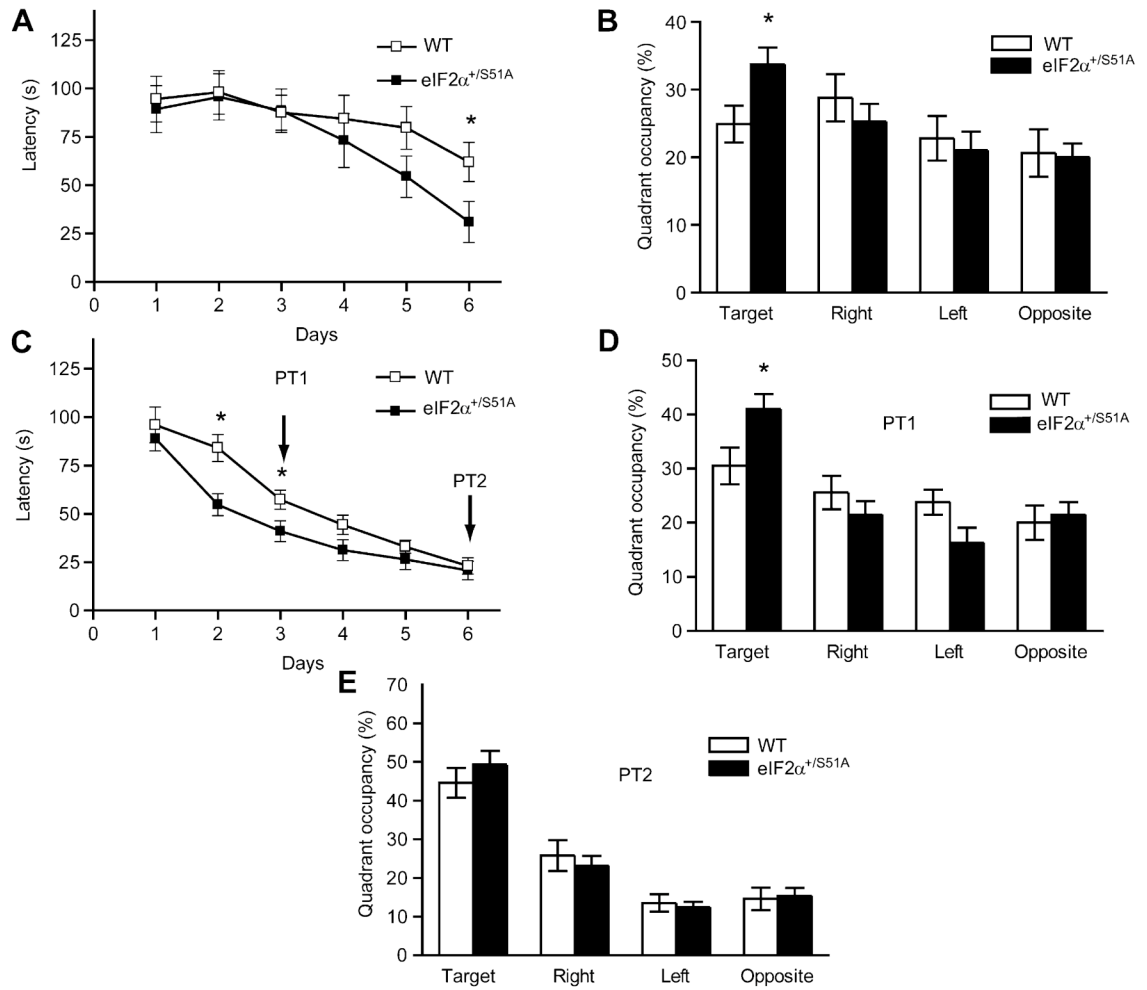


Figure 2. Spatial Learning Is Enhanced in eIF2 $\alpha^{+/S51A}$ Mice

Data (means \pm SEM.) were obtained either (A and B) in a weak version of the Morris water maze (1 trial per day) or (C and D) in the more intensive, standard version (three trials per day). **(A)** On day 6, escape latencies, plotted as function of training days, were significantly shorter for eIF2 $\alpha^{+/S51A}$ (closed squares, $n = 13$) as compared to WT mice (open squares, $n = 14$; $p < 0.05$). **(B)** In the probe test performed after the completion of training, unlike WT mice (open columns, $p > 0.05$), eIF2 $\alpha^{+/S51A}$ mutants (closed columns) showed significant preference for the target quadrant ($p < 0.01$). **(C)** Escape latencies on day 2 and 3 after a strong training protocol (three trials per day) show that eIF2 $\alpha^{+/S51A}$ mice ($n = 13$) learned significantly faster than control littermates ($n = 13$) ($p < 0.05$). **(D)** In the first probe test (PT1) performed after 3 training days, only eIF2 $\alpha^{+/S51A}$ mice spent significantly more time in the target quadrant ($p < 0.01$). **(E)** In

the second probe test (PT2), after 6 days of training, both groups showed a similar preference for the target quadrant ($p > 0.05$).

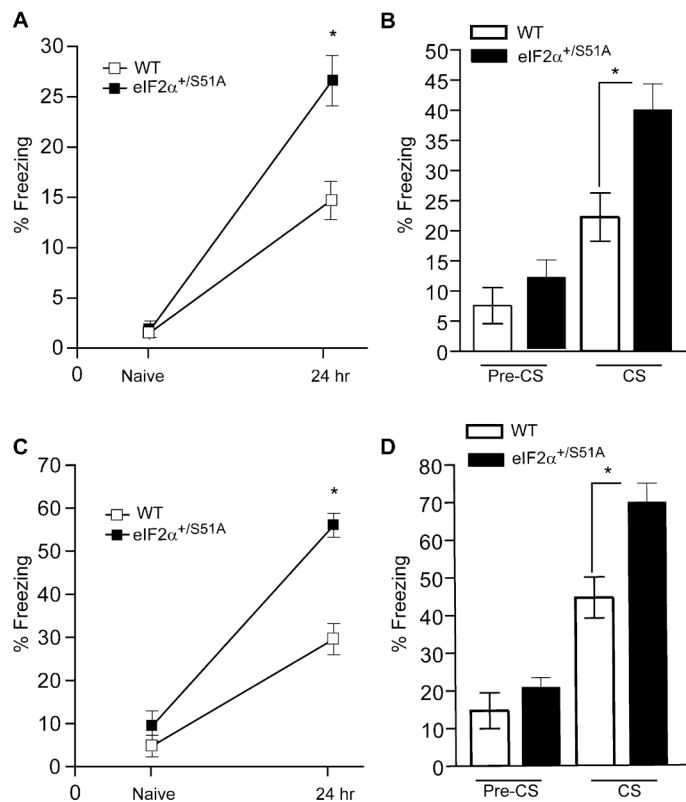


Figure 3. Enhanced Contextual and Auditory Fear Conditioning in eIF2 α ^{+/S51A} Mice

For contextual fear conditioning (**A and C**), freezing was first assessed during a 2 min control period in the training context prior to the conditioning (Naïve) and then during a 5 min period 24 hr after training. Freezing in response to the tone (**B and D**) was assessed 24 hr after training during a 2 min period before the tone (pre-CS) and during the tone (CS) presentation. Data (means \pm SEM) were obtained after either a weak protocol (single training with weak foot shock; $n = 12$ for each group; [A and B]) or a strong protocol (two trainings with stronger foot shock; $n = 13$ for each group; [C and D]). When tested 24 hr after training, eIF2 α ^{+/S51A} mice froze more than the WT controls in response to the context after a weak ([A]; $p < 0.001$) or a strong ([C]; $p < 0.0001$) training protocol. They also had an enhanced freezing in response to the tone in both weak ([B]; $p < 0.05$) and strong ([D]; $p < 0.01$) protocols.

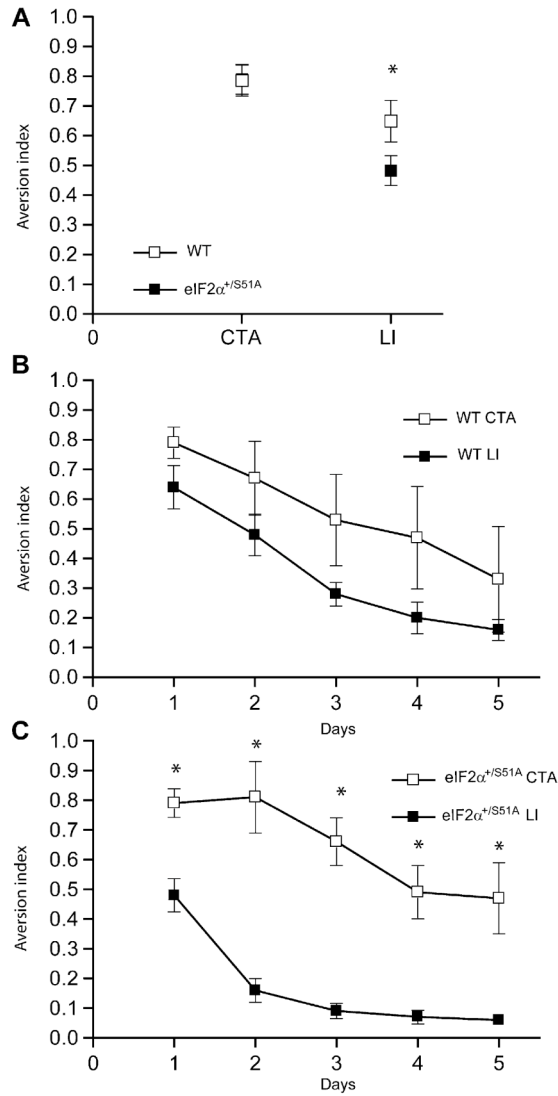


Figure 4. Long-Term Taste Memory and Extinction Are Enhanced in eIF2 $\alpha^{+/S51A}$ Mice

(A) CTA induced by linking taste of saccharin to LiCl-induced malaise was similar in eIF2 $\alpha^{+/S51A}$ (n = 5) and WT (n = 4) mice (p > 0.05). An index > 0.5 means an aversion to, and a score < 0.5 means a preference for, that flavor. However, pre-exposure to saccharin caused a greater fall in aversion index (latent inhibition [LI]) in eIF2 $\alpha^{+/S51A}$ mice (p < 0.01; eIF2 $\alpha^{+/S51A}$ CTA: n = 5, eIF2 $\alpha^{+/S51A}$ LI: n = 7) as compared to WT mice. Further measurements over 5 days showed a similar decay of CTA with and without LI for WT mice (for all days, p > 0.05; WT CTA: n = 4, WT LI: n = 6) (B) and a much accelerated drop after LI in mutants (for all days, p < 0.01; eIF2 $\alpha^{+/S51A}$ CTA: n = 5, eIF2 $\alpha^{+/S51A}$ LI: n = 7) (C). All results are means \pm SEM.

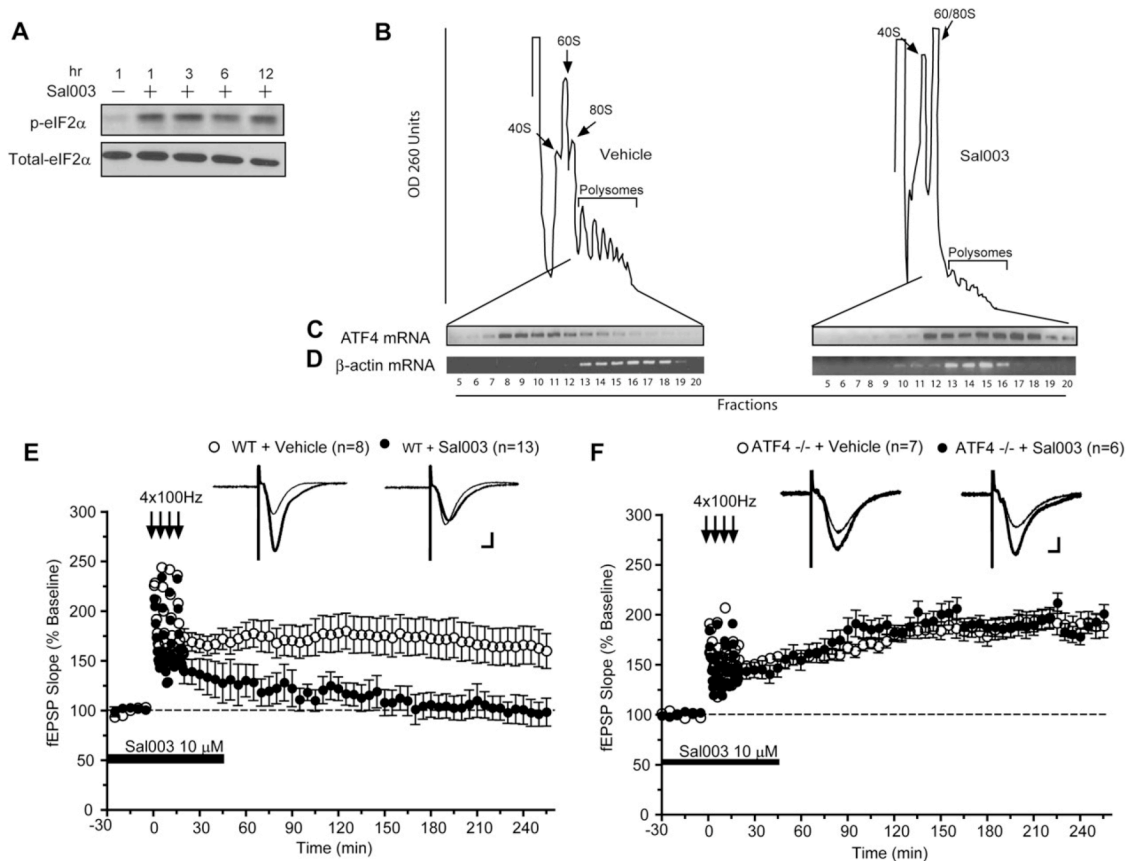


Figure 5. An Inhibitor of eIF2 α Dephosphorylation, Sal003, Prevents the Induction of Hippocampal L-LTP in Slice from WT Mice but Not in Slices from *ATF4*^{-/-} Mice

(A) Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were treated with Sal003 (10 μ M) or vehicle (DMSO) and incubated for the indicated periods of time. The phosphorylation state of eIF2 α (at serine 51) was determined in cell lysates with a specific polyclonal antibody. (B) MEFs were incubated with vehicle or Sal003 (10 μ M) for 8 hr, and lysates were layered on a 10 ml continuous sucrose gradient (10% to 50%). Polysomes were analyzed as described in Experimental Procedures. Left, vehicle-treated; right, Sal003-treated cells. The positions of the polysomes and ribosomes are indicated. (C and D) RT-PCR of ATF4 and β -actin mRNAs from separate fractions of sucrose gradients. Sal003 (10 μ M) prevents the induction of L-LTP by four trains of tetanic stimulation in slices from WT mice ([E]; at 240 min, $p < 0.05$) but not in hippocampal slices from *ATF4*^{-/-} mice ([F]; at 240 min, $p > 0.05$). Open circles are means (\pm SEM) from slices treated with vehicle alone, and closed circles are those from slices treated with Sal003 at the times indicated by horizontal bars. Scales represent 5 ms and 100 μ V.

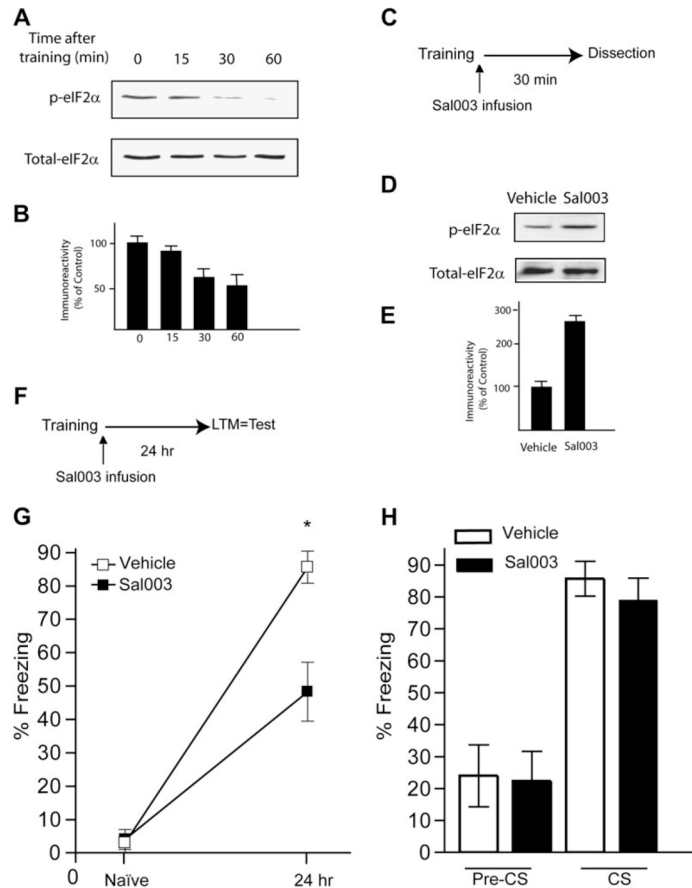


Figure 6. Intrahippocampal Injection of Sal003 Impairs Contextual Memory

(A) Western blots from hippocampal tissue show decreased phosphorylation of eIF2 α after contextual fear conditioning. Dorsal hippocampi of rats were removed at different times after training. (B) Quantification of normalized p-eIF2 α following training (n = 4 per time point). (C) Diagram of the experimental protocol. Sal003 (40 μ M) or Vehicle was infused into the hippocampus immediately after the strong training protocol, and dorsal hippocampi were dissected 30 min after training. (D) A representative Western blot showing phosphorylation of hippocampal eIF2 α after infusion of Sal003. (E) Quantification of normalized p-eIF2 α using total eIF2 α as a loading control (n = 4 for vehicle and Sal003 group). (F) Diagram of the experimental protocol. Bilateral infusion of Sal003 into the hippocampus immediately after training reduced long-term contextual fear conditioning ([G], $p < 0.05$) but did not affect auditory fear conditioning ([H], $p > 0.05$), both assessed 24 hr after training. Data (means \pm SEM) from vehicle (n = 7) and Sal003-injected rats (n = 9) are represented by open and closed columns or symbols, respectively.

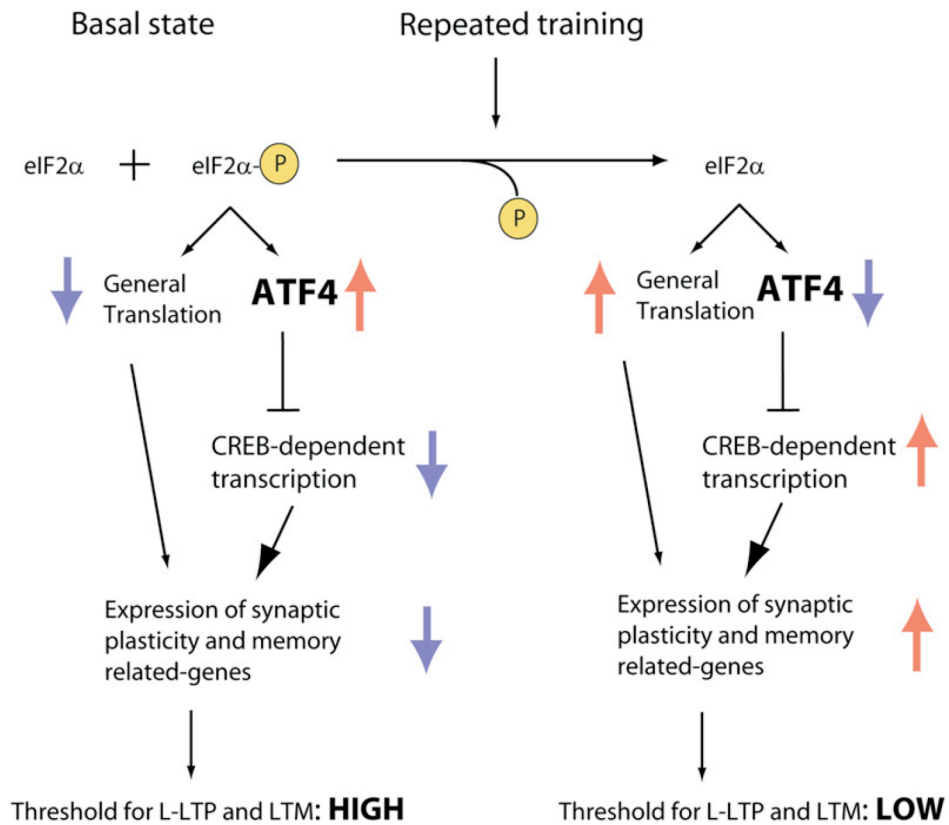


Figure 7. A model for Control of Long-Term Synaptic Plasticity and Memory by eIF2α Phosphorylation

Under basal conditions, general translation is reduced, and ATF4 mRNA translation is augmented, due to partial phosphorylation of eIF2α. As a consequence, expression of synaptic plasticity and memory-related genes is depressed, late-LTP has a high threshold, and mnemonic function is poor. Decreased eIF2α phosphorylation reduces ATF4 mRNA translation and enhances general mRNA translation, thus facilitating the induction of gene expression, which leads to L-LTP and long-term-memory (LTM) consolidation.

4.10. SUPPLEMENTAL DATA

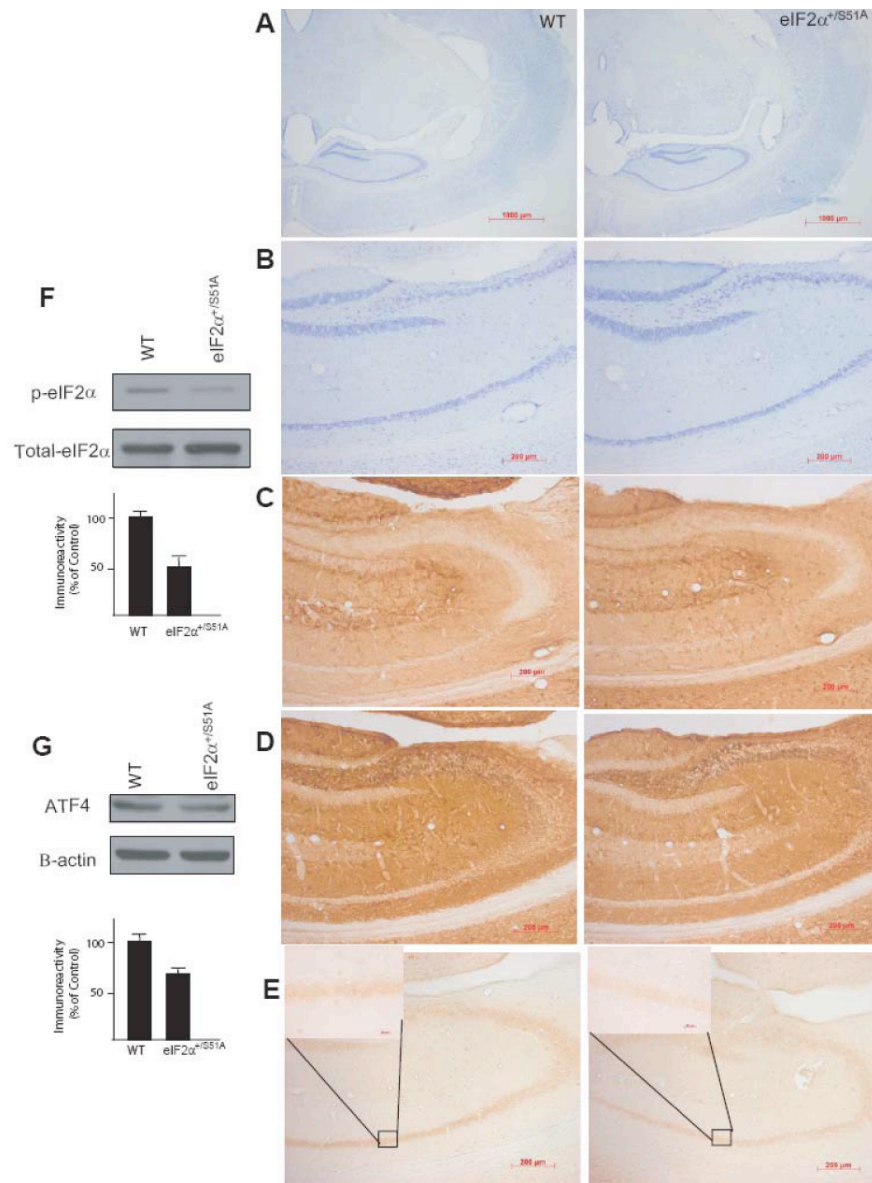


Figure S1. Brain structure is not altered but phosphorylation of eIF2 α is reduced in eIF2 α ^{+S51A} mice

Immunohistochemical analysis of the hippocampus of WT and eIF2 α ^{+S51A} mice. Coronal brain sections were stained with Nissl stain (A, B), and with antibodies against GAP43 (C), synaptophysin (D) and p-eIF2 α (E). There was no visible difference in hippocampal cytoarchitecture between eIF2 α ^{+S51A} and WT littermates. Immunohistochemistry (E) and Western blots (F) show that eIF2 α phosphorylation was reduced in the hippocampus from eIF2 α ^{+S51A} mice as compared to WT mice. In hippocampal extracts, expression of ATF4 (G) is reduced in eIF2 α ^{+S51A} mice.

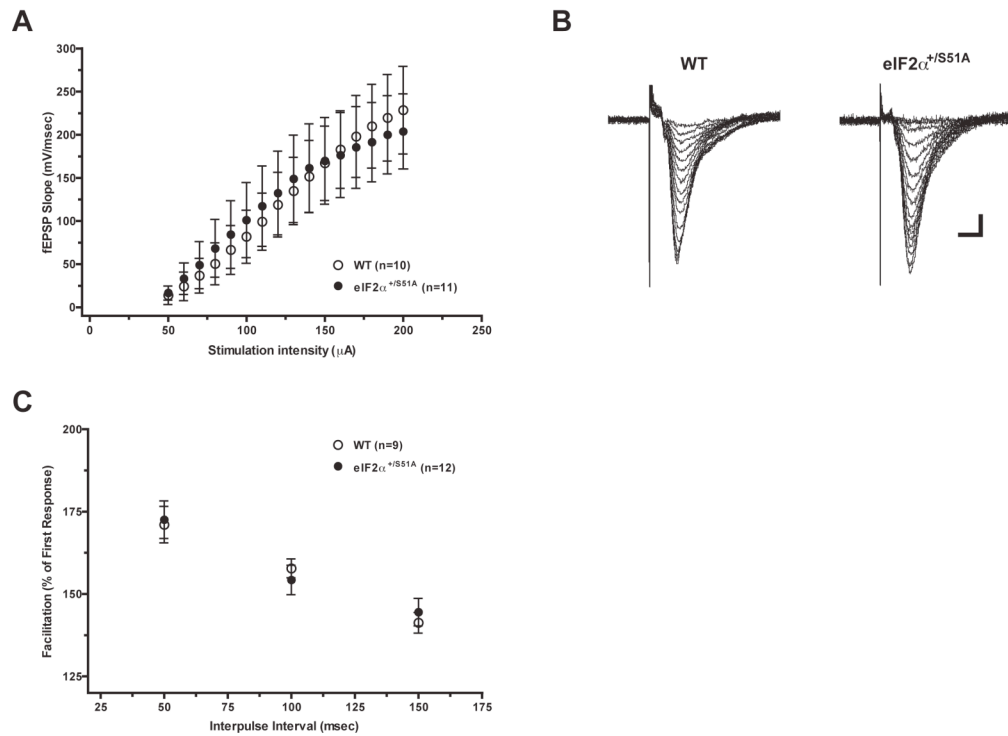


Figure S2. Normal basal synaptic transmission in eIF2 α ^{+S51A} slices

A,B) Input-output data show similar field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) over a wide range of stimulus intensities for both eIF2 α ^{+S51A} and control (WT) littermates. C) Paired pulse facilitation also did not differ between eIF2 α ^{+S51A} and WT slices; normalized data are means (\pm SEM) of second fEPSP as % of first fEPSP, for various intervals of paired stimulation.

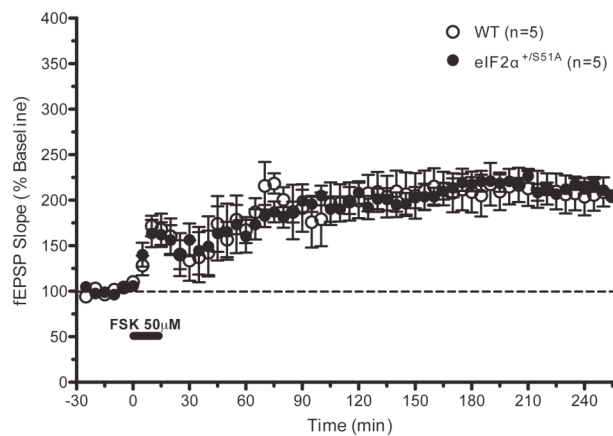


Figure S3. Normal forskolin-induced L-LTP in eIF2 α ^{+S51A} slices

Means (\pm SEM) show similar amplitude and time course of L-LTP induced by 50 μ M forskolin (FSK) in slices from eIF2 α ^{+S51A} and WT mice (at 240 min, $p < 0.05$).

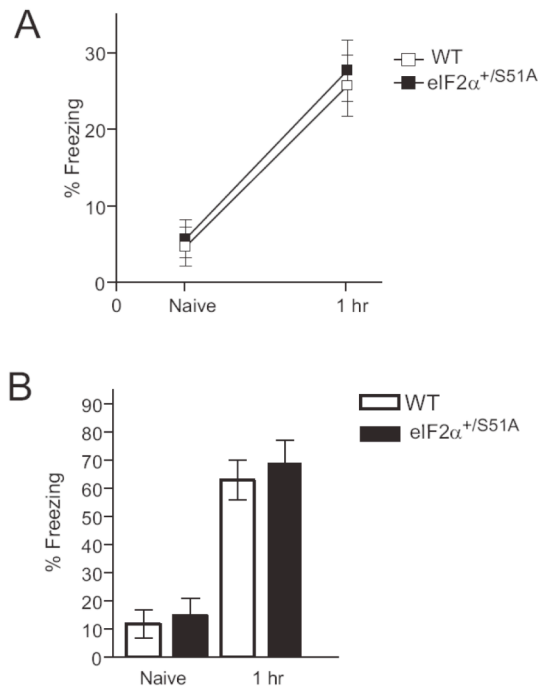


Figure S4. Short term memory is not altered in eIF2 α ^{+/S51A} mice

Mice were subjected to contextual (A) and auditory (B) fear conditioning and tested one hour after training.

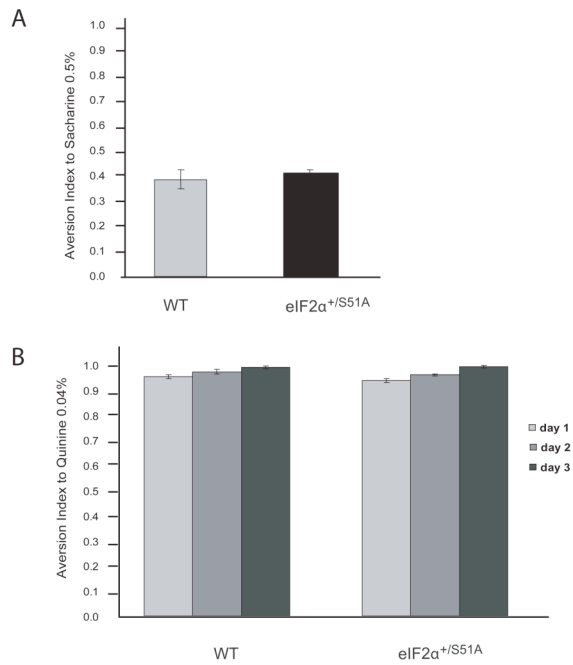


Figure S5. eIF2 α ^{+/S51A} mice react normally to sweet and bitter tastes

A) The preference for saccharin (aversion index < 0.5) did not differ between WT and $eIF2\alpha^{+/S51A}$ mice (WT=4, $eIF2\alpha^{+/S51A}$ mice=4; $p > 0.05$). B) On three consecutive days the strong natural aversion to quinine did not differ between WT and $eIF2\alpha^{+/S51A}$ mice (WT: n=4, $eIF2\alpha^{+/S51A}$: n=4; $p > 0.05$). All data are means \pm SEM.

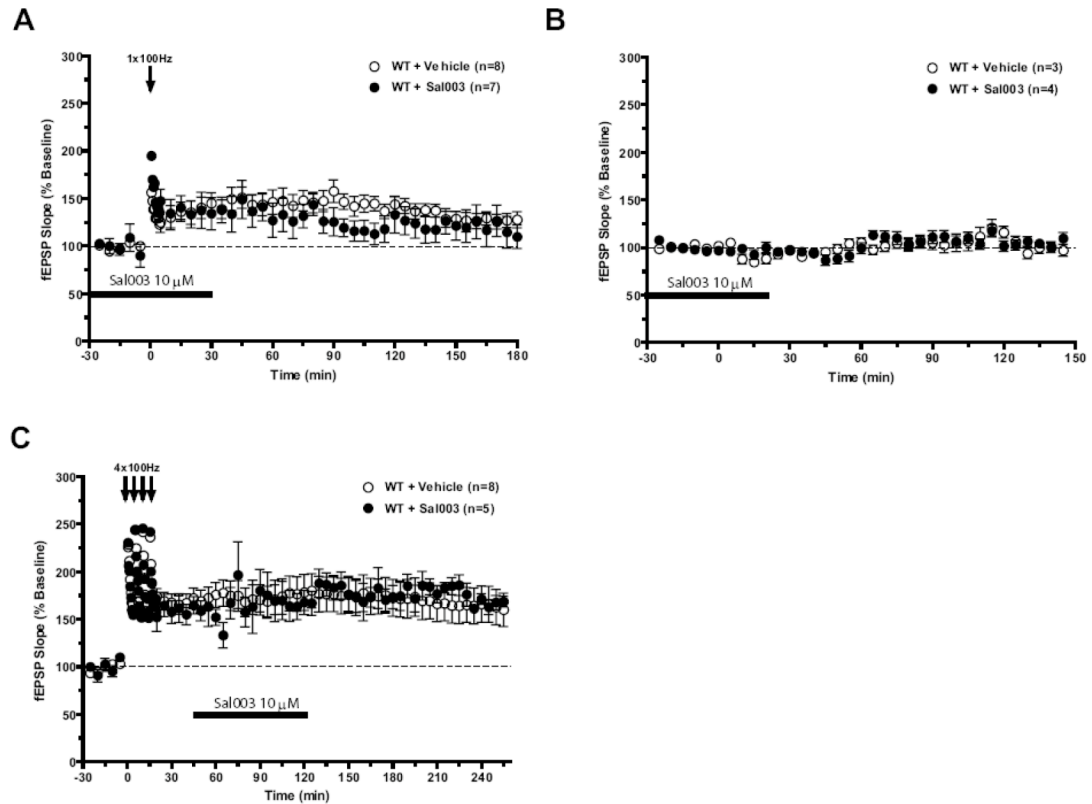


Figure S6. In WT slices, Sal003 did not affect basal transmission, E-LTP and the maintenance of L-LTP

A) LTP elicited by a single 100 Hz train (1 s) is not altered by Sal003 (at 180 min, $p > 0.05$). B) Application of Sal003 did not affect baseline transmission during 2.5 h of recording ($p > 0.05$). C) Sal003 is ineffective if applied 30 min after the end of stimulation, when L-LTP is already established (at 240 min, $p > 0.05$). All data are means \pm SEM.

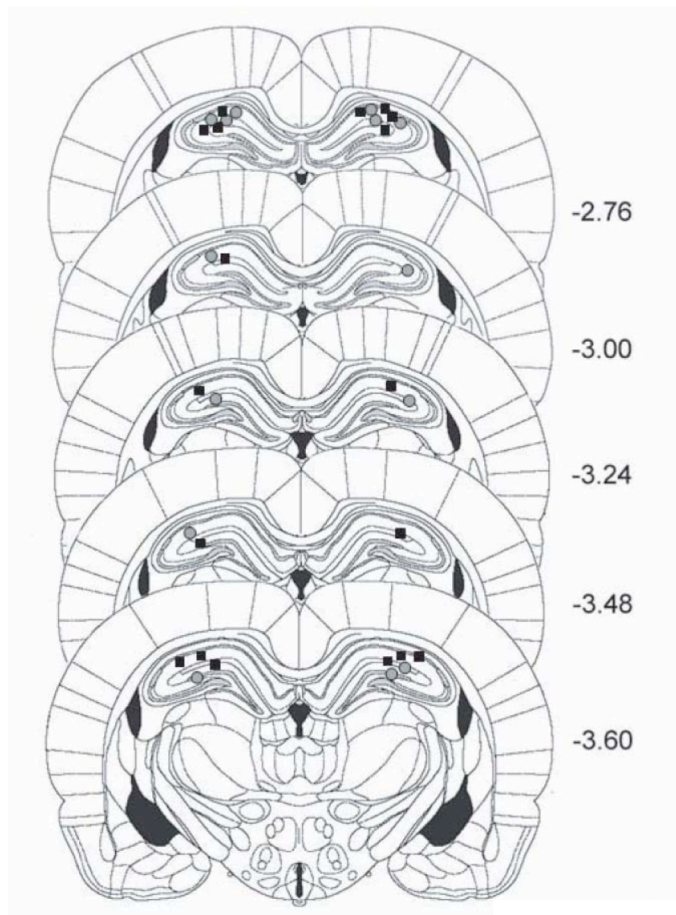


Figure S7. Schematic representation of the dorsal hippocampus at five different rostrocaudal planes

Numbers are posterior coordinates (mm) from bregma. Cannula tip placements in rats infused with Sal003 (filled squares) and vehicle (filled circles).

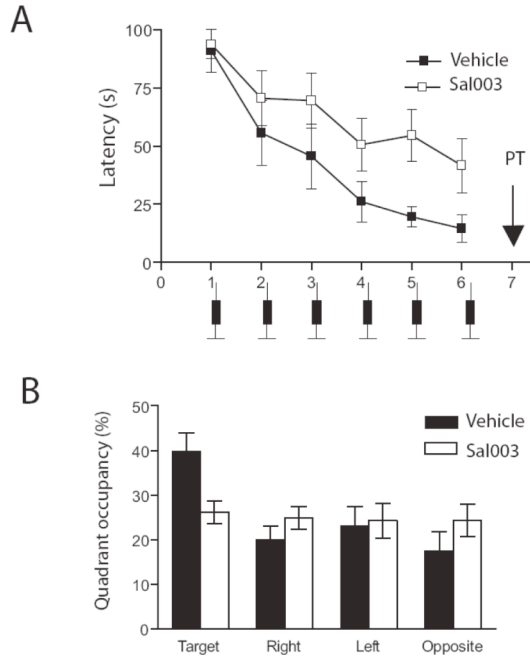


Figure S8. Sal003 impairs spatial long-term memory consolidation

Data (means \pm S.E.M.) were obtained in the conventional version of the Morris water maze (3 trials per day). A) Escape latency during the first trial of each training session is plotted for six successive days. Sal003 and Vehicle were infused bilaterally into hippocampus immediately after each training session. Note that Sal003-treated rats failed to show overnight memory of the location of the platform. B) In the probe test performed after the completion of training, unlike vehicle-treated rats (closed columns, $p < 0.001$) Sal-infused rats (open columns) showed no preference for the target quadrant ($p > 0.05$). Dark syringes refer to either Vehicle or Sal003 infusions across groups.

CHAPITRE V. TROISIÈME SECTION DE RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

5.1. PRÉAMBULE ET RÉSUMÉ

Ce chapitre comporte la publication suivante :

Delphine Gobert, Lisa Topolnik, Mounia Azzi, Linda Huang, Frédérique Badeaux, Luc DesGroseillers, Wayne S. Sossin and Jean-Claude Lacaille. *Forskolin induction of late-LTP and up-regulation of 5'TOP mRNAs translation via mTOR, ERK and PI3K in hippocampal pyramidal cells*. The Journal of Neurochemistry, 2008;106(3):1160-74. Epub 2008 May 9.

La phase tardive de la potentialisation à long-terme (LTP) requiert l'activation de la voie mTOR (*mammalian target of rapamycin*) et la synthèse de nouvelles protéines. La kinase mTOR régule la synthèse protéique via la phosphorylation des protéines liant le facteur 4E (*4E-binding proteins* – 4E-BPs) et S6K, ainsi que via la traduction sélective des ARNm 5'TOP, qui codent pour des composants de la machinerie traductionnelle. Dans cette étude, nous avons exploré la régulation des ARNm 5'TOP durant la phase tardive de la LTP (*late-LTP* ou L-LTP). Nous avons ainsi étudié la plasticité synaptique aux synapses entre les collatérales de Schaffer et les cellules pyramidales de la région CA1 dans des tranches organotypiques d'hippocampe de rat. Dans ce modèle, la forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase, induit la phase tardive de la LTP et cet effet est dépendant de l'activation de mTOR. Afin de déterminer si les ARNm 5'TOP sont spécifiquement régulés à la hausse durant la phase tardive de la LTP, nous avons construit des rapporteurs fluorescents 5'TOP-myr-dYFP, qui nous ont permis de suivre la traduction 5'TOP-dépendante. Ainsi, lors d'expériences de microscopie confocale dans des tranches d'hippocampe en culture, nous avons noté une augmentation de la fluorescence somatique et dendritique après l'application de forskoline. De plus, cette régulation à la hausse dépend à la fois de l'intégrité de la structure 5'TOP et de l'activation des voies mTOR, ERK et PI3K. Nos résultats montrent donc que la

forskoline induit la phase tardive de la LTP dans les neurones hippocampiques, et qu'elle augmente la traduction des ARNm 5'TOP via la voie mTOR, suggérant que la régulation à la hausse de la machinerie traductionnelle est un mécanisme plausible pour la stabilisation de la LTP.

5.2. ABSTRACT

The late phase of long-term potentiation (late-LTP) requires activation of the mTOR pathway and synthesis of new proteins. mTOR regulates protein synthesis via phosphorylation of 4E-binding proteins (4E-BPs) and S6K, and via selective up-regulation of 5'TOP mRNAs that encode components of the translational machinery. In this study, we explored the regulation of 5'TOP mRNAs during late-LTP. Synaptic plasticity was studied at Schaffer collateral – CA1 pyramidal cell synapses in rat organotypic hippocampal slices. Forskolin, an adenylate cyclase activator, induced late-LTP in organotypic slices that was mTOR dependent. To determine if 5'TOP mRNAs are specifically up-regulated during late-LTP we generated a 5'TOP-myr-dYFP reporter to selectively monitor 5'TOP translation. Confocal imaging experiments in cultured slices revealed an increase in somatic and dendritic fluorescence after forskolin treatment. This up-regulation was dependent on an intact TOP sequence and was mTOR, extracellular signal-regulated kinase (ERK) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) dependent. Our findings indicate that forskolin induces late-LTP in hippocampal neurons and up-regulates 5'TOP mRNAs translation via mTOR, suggesting that up-regulation of the translational machinery is a candidate mechanism for the stabilization of LTP.

5.3. INTRODUCTION

Long-term potentiation (LTP), a candidate for the cellular basis of memory, requires a complex cascade of molecular and cellular events. Classically, LTP can be divided into two stages: an early stage, that depends on phosphorylation and modification of pre-existing proteins (early-LTP or E-LTP, lasting minutes to hours) and a late stage, that requires transcription and translation of new proteins (late-LTP or L-LTP, lasting several

hours). While protein synthesis can take place both in the cell body and the dendrites of hippocampal neurons, local protein synthesis is thought to play an important role for the reinforcement of specific synaptic connections during late-phase LTP (Kelleher *et al.*, 2004b; Sutton and Schuman, 2006). In the hippocampus, cAMP and mTOR pathways have both been shown to be required for the late-form of LTP (Wong *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2002; Cammalleri *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004) but it is still unclear whether these two pathways interact with each other or represent independent inputs.

Mammalian target of rapamycin activation regulates protein synthesis via phosphorylation of 4E-BPs and S6K, and via selective translation of 5'TOP mRNAs, a subset of mRNAs encoding components of the translational machinery (Gingras *et al.*, 2001; Hay and Sonenberg, 2003). The 5'TOP mRNA family is characterized by the presence of a 5'Terminal OligoPyrimidine tract (5'TOP) and comprises all the ribosomal proteins and several elongation factors (Meyuhas *et al.*, 2000; Meyuhas and Hornstein, 2000). Translation of 5'TOP mRNAs are regulated by the status of the cell: they are selectively stimulated during cell growth and specifically repressed upon growth arrest (Meyuhas *et al.*, 2000; Meyuhas and Hornstein, 2000).

Recently, it has been suggested that regulating the synthesis of the translational machinery via mTOR in dendrites might play an important role for the maintenance of late-LTP and the reinforcement of specific synaptic connections (Tsokas *et al.*, 2005; Poon *et al.*, 2006; Liao *et al.*, 2007; Tsokas *et al.*, 2007). However, while the levels of several 5'TOP mRNAs including elongation factor 1A (eEF1 α), S6, eEF2 and poly-A binding protein (PABP) have been shown to be up-regulated during LTP in an mTOR dependent-manner (Tsokas *et al.*, 2005; Tsokas *et al.*, 2007), it is still unknown if this is because of their TOP sequence or other translational regulatory pathways.

In the present study, we investigated the relationships between cAMP and mTOR pathways in the regulation of 5'TOP mRNAs and in late-LTP induced by forskolin, an adenylate cyclase activator. Using fluorescent reporters designed to specifically monitor 5'TOP mRNAs translation, we found that forskolin specifically up-regulates 5'TOP mRNAs translation in dendrites via activation of the mTOR pathway in a TOP-dependent manner. This suggests that increasing the translational capacity of synapses,

via the selective synthesis of 5'TOP mRNAs, could play an important role for the maintenance of late-LTP.

5.4. MATERIAL AND METHODS

5.4.1. Electrophysiology

Transverse hippocampal slices (400 μm thick) were obtained from male Sprague-Dawley rats (4-6 weeks old) using a vibratome (Leica VT1000S, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) as described previously (Costa-Mattioli *et al.*, 2005). Slices were kept submerged at 26-27°C and superfused (1-2 ml/min) with oxygenated (95% O₂, 5% CO₂) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing: 124 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 1.3 mM MgSO₄, 2.5 mM CaCl₂, 26 mM NaHCO₃ and 10 mM glucose. A bipolar tungsten stimulating electrode was placed in the CA1 *stratum radiatum* to stimulate the Schaffer collateral and commissural fibers, and extracellular field EPSPs (fEPSPs) were recorded with a glass microelectrode (2-3 M Ω , filled with 2 M NaCl) positioned in the *stratum radiatum*. LTP was induced either electrically, using repetitive high frequency stimulation (4 trains at 100 Hz, delivered 5 minutes apart) or chemically, using forskolin (50 μM , Calbiochem, La Jolla, CA), an adenylate cyclase activator. Whenever indicated, ACSF was supplemented with rapamycin (200 nM, Sigma, St. Louis, MO) or anisomycin (40 μM , Calbiochem) at least 30 minutes prior to LTP induction.

5.4.2. Organotypic slice culture

Hippocampal slice cultures were obtained from P7 Sprague-Dawley rats as described previously (Stoppini *et al.*, 1991; Bourdeau *et al.*, 2007). In brief, the brain was removed and dissected in Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (Invitrogen Canada, Burlington, ON) based medium. Cortico-hippocampal slices (400 μm thick) were then obtained using a McIlwain tissue chopper (The Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd, Gomshall, UK). After dissection, slices were placed on Millicell culture plate inserts (Millipore, Billerica, MA) and allowed to recover in OptiMEM (Invitrogen) kept at 37°C in a humidified atmosphere (95% air, 5% CO₂) for 48h. They were then maintained in a Neurobasal medium (Invitrogen) supplemented with B27 and Glutamax I (Invitrogen)

for 7-10 days. Usually, slices were transfected and processed for experiments after one week in culture.

5.4.3. Western Blotting

Organotypic slice cultures were prepared as described above and acute transverse hippocampal slices (400 μm thick) were obtained from male Sprague-Dawley rats (4-6 weeks old) using a McIlwain tissue chopper. Slices were allowed to recover for 1h in slice holding chambers containing heated ACSF (32°C) before receiving the indicated treatment. Slices were then processed for blotting as described previously (Topolnik *et al.*, 2006). Briefly, hippocampal extracts were homogenized in ice-cold radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer containing: 10 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.0001% chymostatin, lepeptin, antipain, pepstatin (CLAP) protease inhibitors, 200 μM Na_3VO_4 , 200 μM NaF, and 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. Lysates were centrifuged at 14000 g for 20 min at 4°C to remove debris and protein concentration was determined by the bicinchoninic acid method (Pierce, Rockford, IL) using bovine serum albumin (BSA) as a standard. Next, equal sample amounts (50 $\mu\text{g}/\text{lane}$) were separated by 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto a nitrocellulose membrane. The membrane was blocked in 5% non-fat milk, 0.25% BSA dissolved in tris buffered saline-Tween 20 (TBST) buffer for 1 h at room temperature (23°C). After blocking, the membrane was probed with primary antibodies (phospho-S6K Thr389, phospho-S6K Thr421/Ser424, phospho-S6 Ser235/236 and phospho-Akt Ser473, 1/1000, Cell Signaling, Beverly, MA, and phospho-ERK Thr202/Tyr204, 1/5000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) overnight at 4°C. The membrane was then incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) for 1 h at room temperature (23°C). Immunoreactive bands were detected by enhanced chemiluminescence (Perkin Elmer, Waltham, MA). The membrane was then stripped with a buffer containing 0.1 M glycine pH 2.2, 1% sodium dodecyl sulfate and reprobed with antibodies detecting levels of total S6K, S6, Akt and ERK (Cell Signaling). All immunoreactive bands were scanned with a desktop scanner and quantified with Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, CA).

5.4.4. Constructs

Plasmids encoding pL32 and pL32C-A coupled to green fluorescent protein were a kind gift of Dr Oded Meyuhas (Tang *et al.*, 2001). Destabilized myristoylated versions of enhanced yellow fluorescent protein were inserted into the pL32 and pL32C-A plasmids replacing enhanced green fluorescent protein, which gave the 5'TOP reporter (5'pL32-myr-dYFP) and the mutated 5'TOP reporter (5'pL32C-A-myr-dYFP) respectively. The sufficient and essential 640 bp (Blichenberg *et al.*, 1999) of the dendritic targeting element (DTE) of the 3' untranslated region (3'UTR) of microtubule-associated protein (MAP2) from *Rattus norvegicus* was inserted in the 5'TOP reporter and the mutated 5'TOP reporter, which gave the 5'TOP-MAP2 3'UTR reporter (5'pL32-myr-dYFP-MAP2 3'UTR) and the mutated 5'TOP-MAP2 3'UTR reporter (5'pL32C-A-myr-dYFP-MAP2 3'UTR), respectively.

5.4.5. HEK293 cells experiments

Human embryonic kidney cells (HEK 293) were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin/streptomycin and L-glutamine (Wisent Canada, QC) at 37°C in a humidified atmosphere (95% air, 5% CO₂). One day prior to transfection, HEK293 cells were plated onto glass coverslips and placed in 35 mm culture dishes. HEK293 cells were transfected by calcium phosphate-DNA precipitation with either the 5'TOP reporter (5'pL32-myr-dYFP) or the mutated 5'TOP reporter (5'pL32C-A-myr-dYFP). After 24h, cells were starved overnight before receiving serum and/or 20 nM rapamycin for 4h. After this point, cells were quickly washed with phosphate-buffered saline, fixed in 4% paraformaldehyde and processed for fluorescence imaging.

5.4.6. Transfection of hippocampal slice cultures

Gold beads (1.6 µm, Bio-Rad) were coated with 50 µg cDNA of either 5'TOP reporter (5'pL32-myr-dYFP), mutated 5'TOP reporter (5'pL32C-A-myr-dYFP), 5'TOP-MAP2 3'UTR reporter (5'pL32-myr-dYFP-MAP2 3'UTR), or mutated 5'TOP-MAP2 3'UTR reporter (5'pL32C-A-myr-dYFP-MAP2 3'UTR). After one week in culture, organotypic slices were transfected using a Helios GeneGun (Bio-Rad) according to the

manufacturer's instructions (150 psi at a distance of 1.5 cm). Slices were then returned to the incubator for 48h before being treated, fixed and processed for fluorescence imaging.

5.4.7. Confocal microscopy

After treatment, transfected hippocampal slices were fixed overnight in 4% paraformaldehyde. Slices were then quickly washed with phosphate-buffered saline and mounted in Prolong Antifade kit (Molecular Probes, Invitrogen Canada). Images were acquired in 0.4-0.5 μ m sections using a confocal laser scanning microscope LSM 510 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Yellow fluorescent protein was excited at 514 nm and emitted light was collected using a long-pass filter (cut-off 530 nm). Acquisition parameters and settings were kept constant for all conditions on a given experimental day. Images were analyzed using either LSM 510 (Carl Zeiss) or ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA). Analysis of mean fluorescence levels was conducted on z-compressed stacks that contained the entire neuron or dendrite of interest.

5.4.8. Statistical analysis

All data are presented as means \pm SEM and "n" indicates the number of cells or slices. Statistical significance was determined using two-tailed Student's t-tests or one-way ANOVAs. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

5.5. RESULTS

5.5.1. Forskolin induces late-LTP in organotypic hippocampal slices

In acute hippocampal slices, high-frequency stimulation (4 trains at 100Hz delivered 5 min apart) of Schaffer collateral/commissural fibers generates a sustained potentiation of fEPSP responses (Fig. 1 A and B; at 240 min, $146.2 \pm 17.5\%$ of baseline for vehicle-treated slices, $n=7$). As previously reported (Tang *et al.*, 2002; Cammalleri *et al.*, 2003), rapamycin, an inhibitor of the mammalian Target Of Rapamycin (mTOR), selectively inhibited the late-phase of LTP in acute hippocampal slices (at 240 min, $96.4 \pm 9.6\%$ of baseline for rapamycin-treated slices, $n=6$; $p < 0.05$). However, induction protocols such as four trains of high-frequency stimulation or theta-burst stimulation did not

reproducibly induce late-LTP of field responses in hippocampal slice cultures (data not shown; Otmakhov *et al.*, 2004; Kopec *et al.*, 2006). This may be due to heavy reorganization of Schaffer collaterals in cultured slices leading to difficulty in achieving sufficient postsynaptic depolarization in a large number of cells to trigger the molecular cascades that induce LTP of field responses, or due to the loss of modulatory inputs (such as dopaminergic fibers) that may be required to induce late-LTP (Frey *et al.*, 1991; Matthies *et al.*, 1997). On the other hand, forskolin, an adenylate cyclase activator, could induce a robust and sustained potentiation of fEPSPs responses recorded in CA1 *stratum radiatum* in slice cultures (Fig. 1 C and D; at 240 min, $141.9 \pm 9.8\%$ of baseline for forskolin-treated slices, n=6) (Otmakhov *et al.*, 2004; Kopec *et al.*, 2006). Moreover, forskolin-induced late-LTP was blocked by both anisomycin and rapamycin (at 240 min, $78.6 \pm 9.6\%$ of baseline for anisomycin-treated slices, n=3, $p < 0.01$; $86.4 \pm 9.9\%$ of baseline for rapamycin-treated slices, n=7, $p < 0.01$). Therefore, forskolin-induced late-LTP shares similar properties with late-LTP induced by high-frequency stimulation, such as dependency on the synthesis of new proteins and activation of the mTOR pathway.

5.5.2. Forskolin increases the activity of several components of the mTOR pathway

Next, we verified if adenylate cyclase stimulation could indeed activate components of the mTOR pathway in acute slices. Signaling to mTOR pathway is commonly achieved via phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) and Akt/protein kinase B (PKB) (Gingras *et al.*, 2001; Hay and Sonenberg, 2003) but it is not known if cAMP can also activate this pathway. Using Western Blot analysis, we assessed phosphorylation levels of S6K (Thr389) and S6 (Ser235/236) after forskolin treatment as markers of mTOR activation. Application of forskolin to hippocampal slices markedly increased the phosphorylation of S6K and S6 (Fig. 2 A and B; for phospho-S6K: $168.3 \pm 15.2\%$, n=5, $p < 0.01$; for phospho-S6: $162.2 \pm 25.1\%$, n=12, $p < 0.05$). This increase was blocked by pre-treatment with rapamycin (for phospho-S6K: $96.5 \pm 17.9\%$, n=5, $p > 0.05$; for phospho-S6: $93.3 \pm 17.8\%$, n=12, $p > 0.05$). In contrast, forskolin treatment induced phosphorylation of Akt (Ser473) and ERK (Tyr204) (Fig. 2 C and D; for phospho-Akt: $151.3 \pm 33.8\%$, n=6, $p < 0.001$; for phospho-ERK: $157.2 \pm 20.8\%$, n=4, $p < 0.001$), but

these augmentations were not prevented by the addition of rapamycin (for phospho-Akt: $148.6 \pm 27.8\%$, $n=6$, $p < 0.001$; for phospho-ERK: $155.8 \pm 16.5\%$, $n=5$, $p < 0.001$). Both Akt and ERK are upstream of mTOR, thus confirming the specificity of rapamycin. These results demonstrate that forskolin stimulates phosphorylation of S6K and S6 via activation of the mTOR pathway in hippocampal slices.

5.5.3. Forskolin selectively activates a 5'TOP reporter via mTOR in HEK cells

While regulation of 5'TOP mRNAs is usually regulated by mTOR, there are also counterexamples to this paradigm (Tang *et al.*, 2001). Moreover, specific regulation by TOPs has not been investigated in neurons previously, and regulatory pathways in neurons are often specialized. To specifically determine if there is regulation of translation of TOP-containing mRNAs during LTP, we generated two different fluorescent reporters based on previous work examining regulation of 5'TOP mRNAs (Avni *et al.*, 1994). All 5'TOP mRNAs have a cap structure followed by a C residue and an uninterrupted stretch of 4-14 pyrimidine residues (Meyuhas, 2000; Meyuhas and Hornstein, 2000). Mutation of the first C residue to an A residue is sufficient to convert a 5'TOP transcript into a non-TOP regulated transcript (Avni *et al.*, 1994). We thus took advantage of this singularity to test the role of the TOP in regulating translation in hippocampal slices. The first construct contains the L32 promoter (required to ensure correct transcriptional initiation at the TOP), the L32 TOP sequence followed by a sequence encoding a destabilized, myristoylated derivative of YFP (5'TOP reporter: 5'pL32-myr-dYFP). The second construct is identical, but the first nucleotide of the TOP was converted from a C to an A, removing regulation through the TOP (mutated 5'TOP reporter: 5'pL32C-A-myr-dYFP).

We first verified the biological activity of our constructs in HEK293 cells. It has previously been shown that growth arrest or serum deprivation (starving) selectively represses translation of 5'TOP mRNAs. In contrast, mitogenic stimuli or serum addition preferentially shifts 5'TOP mRNAs to the polyribosomal fraction and leads to active translation (Meyuhas, 2000). Thus, we took advantage of this paradigm to test the activity of our fluorescent reporters.

HEK293 cells were transfected with either the 5'TOP reporter or the mutated 5'TOP reporter. After an overnight starving, serum replenishment to cultures increased the fluorescence levels of the 5'TOP reporter in HEK293 cells, but there was no change in the level of the mutated 5'TOP reporter (Fig. 3, for the 5'TOP reporter, n=33 cells, $p < 0.001$; for the mutated 5'TOP reporter, n=33 cells, $p > 0.05$). Pre-treatment with rapamycin completely blocked the increase in the level of the 5'TOP reporter (n=28 cells, $p > 0.05$) demonstrating that this was due to mTOR-dependent up-regulation of its translation. Surprisingly, rapamycin pre-treatment revealed an increase in the level of the mutated 5'TOP reporter by serum replenishment (n=28 cells, $p < 0.01$). This may be due to serum activation of other pathways (including possible non-translational pathways), which were suppressed when mTOR was also activated. Nonetheless, the observed rapamycin-sensitive increase in fluorescence levels of the 5'TOP reporter (TOP-specific) after serum stimulation confirmed that this reporter could effectively monitor TOP-regulated translation.

5.5.4. Forskolin increases somatic 5'TOP mRNAs translation via mTOR in slice cultures

We next investigated the effect of cAMP activation on 5'TOP mRNAs translation using these two constructs in organotypic hippocampal slices. Neurons in cultured slices were transfected with either the 5'TOP reporter or the mutated 5'TOP reporter and fluorescence levels were measured in the cell body of transfected CA1 pyramidal cells. Application of forskolin activated both 5'TOP and mutated 5'TOP reporters in slice cultures (Fig. 4 A and B; 4 hours after forskolin application: for 5'TOP reporter, $150.4 \pm 10.9\%$, n=14 cells, $p < 0.01$; for mutated 5'TOP reporter, $128.5 \pm 11.9\%$, n=11 cells, $p < 0.05$). However, pre-treatment with rapamycin selectively prevented increases in 5'TOP-reporter fluorescence levels (Fig. 4 C and D; for 5'TOP reporter, $115.7 \pm 8.4\%$, n=8 cells, $p > 0.05$; for mutated 5'TOP reporter, $137.5 \pm 6.5\%$, n=6 cells, $p < 0.01$). This suggests that adenylate cyclase activation can up-regulate somatic 5'TOP mRNAs translation in an mTOR dependent manner. Although cAMP stimulation also stimulates general translation in the cell body (i.e. other translational mechanisms that are not governed by the presence of the TOP in the 5'UTR), these are not mTOR dependent.

5.5.5. Forskolin increases dendritic 5'TOP mRNAs translation via mTOR, ERK and PI3K in slice cultures

To this point, we have shown that cAMP activation up-regulates 5'TOP mRNAs in the cell bodies of CA1 pyramidal cells and that this requires mTOR activation. However, recent reports have suggested the role of dendritic translation for the reinforcement of specific synaptic connections (Kelleher *et al.*, 2004b; Sutton and Schuman, 2006). Therefore, we next examined whether up-regulation of 5'TOP mRNAs could also be observed in dendrites. In order to detect fluorescence in dendrites, we added the MAP2 3'UTR region to our constructs. It has previously been shown that this sequence contains signals that direct the MAP2 mRNA to dendritic regions (Blichenberg *et al.*, 1999). When cultured slices were transfected with the 5'TOP-MAP2 3'UTR reporter, fluorescence levels in CA1 pyramidal cell dendrites were markedly increased by forskolin treatment (Fig. 5 A-C). This augmentation was significant throughout the dendritic length examined, from the most proximal region (Fig. 5 B and C; at 10 μm from the soma: $209.28 \pm 23.87\%$, $n=13$ cells for forskolin-treated slices, as compared to $100.0 \pm 9.1\%$, $n=15$ cells for control slices, $p < 0.001$; normalized to the fluorescence in the first 10 μm in untreated slices) to the most distal part (at 100 μm from the soma: $112.8 \pm 21.6\%$, $n=10$ cells for forskolin-treated slices, as compared to $55.5 \pm 6.6\%$, $n=10$ cells for control slices, $p < 0.05$). The forskolin-induced increase in fluorescence was prevented by pre-treatment with rapamycin, but only in the most distal region of the dendrite (for rapamycin-treated slices: at 10 μm from the soma, $163.7 \pm 23.5\%$, $n=14$ cells, $p < 0.05$; at 100 μm from the soma, $62.3 \pm 9.2\%$, $n=13$ cells, $p > 0.05$). In contrast, when neurons were transfected with the mutated 5'TOP-MAP2 3'UTR reporter, no significant difference was observed in pyramidal neurons for vehicle-treated, forskolin-treated or forskolin + rapamycin-treated slices, neither in the proximal dendritic compartment (Fig. 5 D-F; at 10 μm from the soma: $100.0 \pm 8.0\%$, $n=26$ cells for control slices, $107.3 \pm 16.7\%$, $n=21$ cells for forskolin-treated slices, $109.6 \pm 21.3\%$, $n=12$ cells, for forskolin + rapamycin treated slices, $p > 0.05$) nor in the distal dendritic compartment (at 100 μm from the soma: $49.7 \pm 5.3\%$, $n=23$ cells for control slices, $41.4 \pm 6.0\%$, $n=18$ cells for forskolin-treated slices, $39.9 \pm 8.5\%$, $n=9$ cells for forskolin + rapamycin-treated slices, $p > 0.05$). These data indicate that cAMP stimulation

specifically up-regulates 5'TOP mRNAs translation through mTOR in dendrites of hippocampal pyramidal cells.

Nonetheless, differences in the regulation of 5'TOP mRNAs seem to exist between proximal and more distal dendrites of cultured hippocampal pyramidal cells. As described above, we observed that fluorescence in proximal dendrites could not be blocked by a low dose of rapamycin, although the same dose completely prevented the increase in fluorescence in more distal dendrites (Fig. 5 A-C). There are several possibilities for this discrepancy, including increased mTOR activity and/or presence of additional regulatory pathways in proximal dendrites. To differentiate between these two possibilities, we performed additional confocal imaging experiments with the 5'TOP-MAP2 3'UTR reporter using a higher dose of rapamycin as well as mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)/ERK and PI3K inhibitors (Fig. 5 G-I). Under these conditions, fluorescence levels were again markedly increased by forskolin treatment from the most proximal dendritic regions (Fig. 5 H and I; at 10 μ m from the soma: $149.4 \pm 10.4\%$, n=14 cells for forskolin-treated slices, as compared to $100.0 \pm 3.2\%$, n=24 cells for control slices, $p < 0.001$; normalized to the fluorescence in the first 10 μ m in untreated slices) to the most distal dendritic regions (at 100 μ m from the soma: $83.2 \pm 7.2\%$, n=13 cells for forskolin-treated slices, as compared to $60.3 \pm 3.2\%$, n= 23 cells for control slices, $p < 0.05$). This increase in fluorescence was prevented by the addition of either a high dose of rapamycin (1 μ M), an inhibitor of MEK/ERK (PD98059) or an inhibitor of PI3K (LY294002) in both proximal dendrites (at 10 μ m from the soma: $107.2 \pm 6.8\%$, n=19 cells for forskolin + rapamycin-treated slices, $104.5 \pm 9.8\%$, n=15 cells for forskolin + PD980059-treated slices, $101.1 \pm 10.4\%$, n=16 cells for forskolin + LY294002-treated slices, $p > 0.05$) and distal dendrites (at 100 μ m from the soma: $62.5 \pm 5.2\%$, n=19 cells for forskolin + rapamycin-treated slices, $63.1 \pm 7.0\%$, n=14 cells for forskolin + PD980059-treated slices, $61.4 \pm 5.8\%$, n=16 cells for forskolin + LY294002-treated slices, $p > 0.05$). These data contrast with those obtained previously using a lower dose of rapamycin (Fig. 5 A-C), in which proximal fluorescence could not be blocked by the addition of the mTOR inhibitor. Moreover, they indicate that throughout the dendritic length, MEK/ERK and PI3K pathways are required for the forskolin-induced increase in 5'TOP mRNA translation.

5.5.6. Forskolin activates the mTOR pathway in an ERK and PI3K-dependent manner in slice cultures

To date, we have shown that mTOR, MEK/ERK and PI3K pathways are required for forskolin-induced 5'TOP mRNAs translation. However, it is still unclear if these pathways regulate 5'TOP mRNAs in a parallel or linear fashion. To further investigate the mechanism by which cAMP stimulation activates the mTOR pathway, as well as the interactions between MEK/ERK, PI3K and mTOR pathways, we performed additional western blot experiments and examined the phosphorylation levels of S6K at both the mTOR-dependent site (Thr389) and the ERK-dependent site (Thr421/Ser424). Moreover, to match the experiments using the TOP reporter, we did these experiments on slice cultures as opposed to the earlier experiments on acute slices. Application of forskolin to organotypic slices strongly increased the phosphorylation of S6K at both Thr389 and Thr421/Ser424 (Fig. 6 A and B; for Thr389: $142.5 \pm 12.6\%$, $n=7$, $p < 0.05$; for Thr421/Ser424: $155.8 \pm 14.1\%$, $n=5$, $p < 0.05$), as well as phosphorylation of S6 (Fig. 6 D; $162.5 \pm 11.8\%$, $n=6$, $p < 0.01$). This increase was blocked by addition of PD98059, a specific MEK/ERK inhibitor (for S6K Thr389: $109.4 \pm 8.8\%$, $n=7$, $p > 0.05$; for S6K Thr421/Ser424: $107.5 \pm 8.6\%$, $n=5$, $p > 0.05$; for S6: $114.8 \pm 19.1\%$, $n=6$, $p > 0.05$). In contrast, rapamycin pre-treatment blocked the increase in phosphorylation of S6K at Thr389 and S6 (for S6K Thr389: $90.4 \pm 3.5\%$, $n=7$, $p > 0.05$; for S6: $111.3 \pm 9.9\%$, $n=6$, $p > 0.05$), and had no effect on the increase in phosphorylation of S6K at Thr421/Ser424 ($154.5 \pm 19.0\%$, $n=5$, $p < 0.05$). Similarly, addition of LY294002, a specific PI3K inhibitor, prevented the increases in phosphorylation of S6K at Thr389 and S6 (for S6K Thr389: $114.7 \pm 13.1\%$, $n=7$, $p > 0.05$; for S6: $117.1 \pm 12.6\%$, $n=6$, $p > 0.05$) but did not block the augmentation in phosphorylation of S6K at Thr421/Ser424 ($160.5 \pm 22.6\%$, $n=5$, $p < 0.05$). Moreover, ERK phosphorylation was increased by cAMP stimulation (Fig. 6 C; $150.8 \pm 13.6\%$, $n=6$, $p < 0.05$), which was blocked by PD98059 ($102.2 \pm 11.7\%$, $n=6$, $p > 0.05$), but not by rapamycin ($162.8 \pm 20.2\%$, $n=6$, $p < 0.05$) or LY294002 incubation ($162.9 \pm 18.6\%$, $n=6$, $p < 0.05$). Taken together, these results suggest that forskolin stimulates phosphorylation of S6K and S6 in an ERK-dependent and PI3K-dependent manner. Moreover, they indicate that mTOR activation in organotypic slices requires the conjunction of both MEK/ERK and PI3K activation.

5.6. DISCUSSION

Our results indicate that forskolin induces late-LTP and up-regulation of 5'TOP mRNAs translation in organotypic hippocampal slices via activation of the mTOR pathway (Fig. 7). First, forskolin, an adenylate cyclase activator, induces a sustained potentiation of fEPSPs that is sensitive to rapamycin treatment. In addition, cAMP activation increases the activity of S6K and S6, two components of the mTOR pathway, in an ERK and PI3K-dependent manner, which underscores the interaction between cAMP, ERK, PI3K and mTOR pathways. Second, forskolin application increases the fluorescence of a 5'TOP reporter in both the cell body and dendrites via mTOR, ERK and PI3K, indicating that cAMP activation is also coupled with an increased translation rate of 5'TOP containing mRNAs.

5.6.1. Induction of late-LTP in hippocampal slice cultures

To date, very few studies have examined late-phase LTP in organotypic hippocampal slices, even though this system is very useful for manipulation of protein expression. Indeed, organotypic slices can be maintained in culture for several days to weeks and therefore allow for the transfection and the long-term expression of fluorescent reporters (in this case, 5'TOP or mutated 5'TOP constructs). In previous reports (Muller *et al.*, 1993; Leutgeb *et al.*, 2003; Mellentin *et al.*, 2006), LTP in slice culture has been studied mostly for a short period after LTP induction (approximately 1 hour). At such time point, changes observed at synapses are mostly associated to early-phase LTP rather than to the late-phase of LTP. In our study, we were able to record fEPSP responses for up to 4 hours, which corresponds to the maintenance phase of late-LTP, by using chemical induction by forskolin. Our results suggest that this chemical induction protocol in slice culture may be a useful tool for a detailed examination of molecular pathways implicated in late-LTP.

5.6.2. Interactions between cAMP, ERK, PI3K and mTOR pathways during late-LTP

It has previously been shown that cAMP and mTOR signaling pathways are both required for late-phase LTP in the hippocampus (Wong *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2002;

Cammalleri *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004) but it is still unclear whether these two pathways interact with each other. Several studies have shown that forskolin can induce a late-LTP that shares many features of electrically-induced late-LTP (Frey *et al.*, 1993; Otmakhov *et al.*, 2004). On the other hand, various papers demonstrate that rapamycin selectively blocks the late-phase LTP in the hippocampus (Tang *et al.*, 2002; Cammalleri *et al.*, 2003). Nevertheless, it has never been shown that mTOR blockade could also interfere with the late-phase of forskolin-induced LTP. Importantly, our results now demonstrate that forskolin-induced LTP is sensitive to rapamycin pre-treatment, suggesting that adenylate cyclase stimulation is activating the mTOR pathway and that this is a necessary step in forskolin-induced late-LTP. Consistent with cAMP activation acting through mTOR, we found that cAMP activation increased the phosphorylation of S6K and S6, two downstream effectors of mTOR, in a rapamycin-sensitive manner.

Various effectors could mediate interactions between cAMP and mTOR pathways. Previous studies have identified Akt/PKB and ERK as upstream regulators of mTOR (Gingras *et al.*, 2001; Hay and Sonenberg, 2004; Kelleher *et al.*, 2004a; Lenz and Avruch, 2005). Since in our study both phosphorylation of Akt and ERK were increased by forskolin treatment, it is likely that mTOR activation is downstream of these two known activators of mTOR (Fig. 7). While forskolin is not a natural stimulus, activation of adenylate cyclase is critical for ERK activation during both LTP and memory formation (Impey *et al.*, 1998; Sindreu *et al.*, 2007) and ERK is involved in activating the mTOR pathway during LTP (Kelleher *et al.*, 2004a).

Using various biochemical approaches, several recent reports have clearly shown that there is an interaction between ERK and mTOR pathways in hippocampal slices during both LTP and long-term depression (LTD) (Kelleher *et al.*, 2004a; Banko *et al.*, 2006; Tsokas *et al.*, 2007; Antion *et al.*, 2008b). Indeed, phosphorylation of various effectors downstream of mTOR, including S6, S6K and 4EBP1, are inhibited by treatment with PD98059 or UO126, two MEK/ERK inhibitors (Kelleher *et al.* 2004a; Banko *et al.*, 2006; Antion *et al.*, 2008b). Similarly, Tsokas *et al.*, 2007 have demonstrated that HFS-induced phosphorylation of mTOR and translational proteins like eEF1A, S6, eEF2 and PABP1 is inhibited by incubation with PD98059 and UO126 (Tsokas *et al.*, 2007). In

our system, both phosphorylation of S6K at the mTOR site (Thr389) and S6 were prevented by addition of the specific MEK/ERK inhibitor PD98059, supporting the idea that forskolin activates the mTOR pathway in an ERK-dependent manner. Although our model depicts a direct interaction between ERK and mTOR pathways (Fig. 7), this might not be the case. Indeed, studies have suggested that activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK)/ERK pathway leads to phosphorylation of hamartin and tuberlin, two proteins forming the tuberous sclerosis complex (TSC) and whose role is to inhibit signaling by mTOR (Roux *et al.*, 2004). Other reports have also shown that the MAPK/ERK pathway might also act directly downstream of mTOR, on proteins such as rpS6. Indeed, studies in *S6K1^{-/-}/S6K2^{-/-}* double knock-out cells have revealed that, in addition to S6K1 and S6K2, a MAPK-dependent kinase can also phosphorylate rpS6 at Ser235/Ser236 in an mTOR-independent mechanism (Pende *et al.*, 2004). Subsequent work have identified the p90rsk as the kinases mediating the phosphorylation of rpS6 on these residues, and confirmed that Ras/ERK signaling promotes translation initiation (Roux *et al.*, 2007).

Other studies have also suggested that cAMP activation during LTP is accompanied by the extracellular release of BDNF (Patterson *et al.*, 2001). Released BDNF could in turn activate TrkB receptors and the PI3K-Akt/PKB cascade (Patterson *et al.*, 2001), and ultimately lead to the activation of the mTOR pathway (Takei *et al.*, 2004). Since phosphorylation of S6K at the mTOR site (Thr389) and S6 were also sensitive to LY294002, a specific PI3K inhibitor, our results not only suggest that S6K and S6 phosphorylation are downstream of ERK, but also of PI3K activation. Therefore, adenylate cyclase stimulation could trigger several cascades that lead to mTOR activation and translational activation (Fig. 7).

Although previous work has also suggested that ERK activation might be downstream of PI3K (Opazo *et al.*, 2003; Tsokas *et al.*, 2007), this might not be the case in our study. Indeed, we found that application of LY294002 did not affect the forskolin-induced increase in ERK phosphorylation. However, it is important to note that previous work used different LTP-inducing paradigms than cAMP stimulation (NMDA application, HFS-stimulation and theta-burst stimulation) and therefore, different cascades might be

recruited. Alternatively, cross-talk between PI3K and ERK pathways may require stronger activation, like 4 trains of high frequency stimulation (Tsokas *et al.*, 2007).

5.6.3. Late-LTP is associated with the activation of downstream targets of mTOR

Mammalian target of rapamycin effects are mediated by phosphorylation of both 4E-BPs and S6K, and by selective up-regulation of 5'TOP mRNAs. Previously, it has been shown that LTP- or LTD-inducing stimuli increase the phosphorylation of 4E-BPs, S6K, S6 and increase the levels of TOP-encoded proteins (Camalleri *et al.*, 2003; Takei *et al.*, 2004; Banko *et al.*, 2005; Tsokas *et al.*, 2005; Banko *et al.*, 2006; Tsokas *et al.*, 2007; Antion *et al.*, 2008b); however the relative role that these pathways play in LTP has not been determined. Further work has shown that genetic deletion of either 4EBP2, S6K1 or S6K2 lead to specific deficits in LTP and memory, thus confirming the importance of these downstream targets of mTOR (Banko *et al.*, 2005, Antion *et al.*, 2008a). Surprisingly however, removal of S6K1 or S6K2 did not seem to have much impact on late-LTP, suggesting that other downstream targets of mTOR, like 4EBP2 might be more crucial for the stabilization of late-LTP (Antion *et al.*, 2008a). Here, we provide evidence that LTP may also specifically involve an increase in 5'TOP mRNAs through an mTOR-mediated pathway. It would be interesting in the future to determine which downstream pathway of TOR is required for mTOR-mediated synaptic plasticity.

On the other hand, since ERK, PI3K and mTOR activation are also required for some forms of LTD (Gallagher *et al.*, 2004; Hou and Klann 2004; Banko *et al.*, 2006, Antion *et al.*, 2008b), it would be interesting to determine if different downstream pathways of TOR are important for distinct roles of mTOR-mediated translational regulation in synaptic plasticity. Recently, Sajikumar and Frey (2004) described the phenomenon of “cross-tagging”, in which proteins synthesized in response to late-LTP stimuli can be captured by synapses undergoing early-LTD or inversely. This raises the intriguing possibility that the same proteins may be synthesized in response to either late-LTP or late-LTD-inducing stimuli, and captured at synapses that have been appropriately tagged by synaptic activity.

Initially, it was reported that mTOR activation increased phosphorylation of S6K and S6 and that this was correlated with augmented translation rates of 5'TOP containing mRNAs (Meyuhas, 2000; Meyuhas and Hornstein, 2000). However, recent evidence contests this model. Knockout mice lacking both S6K1 and S6K2 showed that up-regulation of 5'TOP mRNAs in response to mitogens is maintained (Pende *et al.*, 2004) and knock-in mutants of S6, lacking all S6 phosphorylation sites, also have normal mTOR-dependent regulation of 5'TOP mRNAs (Ruvinsky *et al.*, 2005). Thus, although S6K and S6 phosphorylation levels can still be used as readouts of the activity of the mTOR pathway, these data strongly suggest the existence of another as yet uncharacterized pathway linking mTOR activation and 5'TOP mRNAs translation.

5.6.4. Late-LTP is associated with an increase in 5'TOP mRNAs translation

Recent reports have suggested that levels of some proteins that are encoded by 5'TOP containing mRNAs are up-regulated during late-LTP and LTD (Tsokas *et al.*, 2005; Poon *et al.*, 2006; Liao *et al.*, 2007; Tsokas *et al.*, 2007; Antion *et al.*, 2008b). However, although previous work has correlated LTP-inducing stimulation and increases in the translation of some 5'TOP mRNAs (for example, eEF1 α , see Tsokas *et al.*, 2005 and Tsokas *et al.*, 2007), no direct causal link has ever been reported. More precisely, it has not been shown that the augmentation observed in these studies were restricted to the 5'TOP family. Indeed, it might be possible that LTP-inducing protocols cause a general increase in translation of all dendritically targeted mRNAs, rather than a selective up-regulation of 5'TOP mRNAs. In this study, we thus specifically designed fluorescent reporters to investigate the regulation of 5'TOP containing mRNAs during late-LTP by comparing two constructs that were identical except for a single residue change that determines TOP regulation (Avni *et al.*, 1994). Interestingly, in the cell body of CA1 pyramidal cells, while levels of both reporters were increased by forskolin, only levels of the proteins encoded by the 5'TOP-containing mRNAs were sensitive to rapamycin pre-treatment. Moreover, in the dendrites of CA1 pyramidal cells, only levels of the reporter encoded by the 5'TOP-containing mRNAs were increased, again in an mTOR-dependent manner. Taken together, our results thus clearly suggest that 5'TOP mRNAs are specifically regulated after LTP induction. A better understanding of the mechanism

for TOP regulation downstream of mTOR will allow for selective blockade of this pathway and determining the importance of TOP regulation for LTP.

There are several possible explanations for the differential regulation of 5'TOP mRNAs in dendrites vs. cell bodies. First, different mechanisms for regulation of translation in the cell body and dendrites might be responsible for the more selective up-regulation of 5'TOP mRNAs observed here. For example, the rate limiting steps for translation could be distinct, and thus in dendrites, the process up-regulated by forskolin in a rapamycin-insensitive manner that acts on the non-TOP mRNAs is not present, or not rate limiting. It should also be noted that the construct used for measuring dendritic regulation had the 3'UTR of MAP2, and this may add additional translational constraints. Thus, the rapamycin-insensitive process up-regulated by forskolin in the cell body may no longer be rate limiting for the construct encoding the 3'UTR of MAP2 since additional rate-limiting steps are now present. For example, translation of this construct in dendrites may now be regulated by removal of 3'UTR-mediated repression, and since this process may not be activated by forskolin, it could explain the loss of forskolin-mediated regulation of the non-TOP construct in dendrites. Since the only difference between the TOP and non-TOP construct was the C-A conversion at the beginning of the TOP sequence, differences between the activation of these constructs by forskolin and their sensitivity to rapamycin can be directly attributed to regulation of the TOP sequence. Thus, in both cell bodies and dendrites the TOP sequence provides an additional forskolin-induced rapamycin-sensitive regulation that is likely to be important for the physiological regulation of 5'TOP containing mRNAs.

We observed a differential sensitivity of the induction by forskolin to rapamycin between proximal and distal dendrites. A larger concentration of rapamycin was required to block the forskolin-induced increase in the 5'TOP reported construct at proximal dendrites. While it is possible that the higher concentration may affect some other pathways, rapamycin has been reported to be extremely specific for mTOR even at higher concentrations (Bain *et al.*, 2007). It may be due to an increased concentration of mTOR at proximal sites. mTOR has been reported to be linked to gephyrin, a marker of inhibitory synapses that are enriched in proximal dendrites (Sabatini *et al.*, 1999).

5.6.5. Up-regulation of the translational machinery during late-LTP

As described in the literature, the 5'TOP mRNAs family is mainly composed of ribosomal proteins and elongation factors and includes most components of the translational machinery (Meyuhas *et al.*, 2000; Meyuhas and Hornstein, 2000). Ribosome biogenesis is highly energy costing and is therefore finely regulated to meet the changing requirements for the translational machinery. It has been shown that the presence of the TOP motif in the 5' untranslated region allows for the rapid up-regulation of this class of mRNAs during situations that require high rates of protein synthesis, such as cell proliferation or differentiation (Meyuhas and Hornstein, 2000). The shift of 5'TOP mRNAs from the subpolysomal fraction to the polyribosomal pool can be induced by overexpression of a TOP message, suggesting that 5'TOP mRNAs translation is regulated by an as yet unidentified repressor (Biberman *et al.*, 1999). Although modulation of 5'TOP mRNAs synthesis has been extensively associated with cell growth and related processes, recent work has suggested that this pathway might also be important for the stabilization of LTP in vertebrates (Tsokas *et al.*, 2005; Poon *et al.*, 2006; Liao *et al.*, 2007; Tsokas *et al.*, 2007) and long-term facilitation (LTF) in *Aplysia* (Khan *et al.*, 2001; Moccia *et al.*, 2003). Indeed 5'TOP containing mRNAs are a major class of mRNAs sent out in processes in both vertebrates (Poon *et al.*, 2006) and invertebrates (Moccia *et al.*, 2003; Moroz *et al.*, 2007). Moreover, ribosomal proteins were a major class of proteins translationally up-regulated in synaptoneurosome after BDNF treatment, and this effect was dependent on activation of mTOR (Liao *et al.*, 2007).

In *Aplysia*, rapamycin-sensitive local protein synthesis is important for the stabilization of long-term changes at synapses (Casadio *et al.*, 1999). While complete ribosome biogenesis presumably cannot occur in dendrites, it is possible that during transport, ribosomes lose peripheral proteins, and that local translation of these subunits at stimulated synapses is required to activate dormant ribosomes (Moccia *et al.*, 2003). Increases in the number of translationally competent ribosomes, via the selective up-regulation of 5'TOP mRNAs synthesis, would then serve to specifically boost the translational capacity of activated synapses for a prolonged period and thus mark the synapse for persistence of changes. A meta-activation of local translation may be

important to promote the translation of newly delivered mRNAs, and thus reconcile the requirement for local translation with the requirement for transcription and transport of newly synthesized mRNAs to synapses.

Taken together, our results demonstrate for the first time that 5'TOP mRNAs are differentially regulated after LTP-inducing stimulation in an mTOR-dependent manner. Although we cannot rule out the implication of others mTOR targets, our present data clearly suggest that up-regulation of the translational machinery, via the selective synthesis of 5'TOP mRNAs, might play an important role for the stabilization of late-LTP.

5.7. ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Dr Oded Meyuhas for the original pL32 and pL32C-A constructs, and Julie Pepin for excellent technical assistance. This work has been supported by CIHR group grant (to JCL, LDG and WSS), FRSQ (GRSNC) and NSERC (studentship to DG). JCL is recipient of the Canada Research Chair in Cellular and Molecular Neurophysiology.

5.8. REFERENCES

Antion MD, Merhav M, Hoeffler CA, Reis G, Kozma SC, Thomas G, Schuman EM, Rosenblum K, Klann E (2008a) Removal of S6K1 and S6K2 leads to divergent alterations in learning, memory, and synaptic plasticity. *Learn. Mem.* 15, 29-38.

Antion MD, Hou L, Wong H, Hoeffler CA, Klann E (2008b) mGluR-dependent long-term depression is associated with increased phosphorylation of S6 and synthesis of elongation factor 1A but remains expressed in S6K-deficient mice. *Mol. Cell. Biol.* 28, 2996-3007.

Avni D, Shama S, Loreni F, Meyuhas O (1994) Vertebrate mRNAs with a 5'-terminal pyrimidine tract are candidates for translational repression in quiescent cells:

characterization of the translational cis-regulatory element. *Mol. Cell. Biol.* 14, 3822-3833.

Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, Klevernic I, Arthur JS, Alessi DR, Cohen P (2007) The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J.* 408, 297-315.

Banko JL, Poulin F, Hou L, DeMaria CT, Sonenberg N, Klann E (2005) The translation repressor 4E-BP2 is critical for eIF4F complex formation, synaptic plasticity, and memory in the hippocampus. *J. Neurosci.* 25, 9581-9590.

Banko JL, Hou L, Poulin F, Sonenberg N, Klann E (2006) Regulation of eukaryotic initiation factor 4E by converging signaling pathways during metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *J. Neurosci.* 26, 2167-2173.

Biberman Y, Meyuhas O (1999) TOP mRNAs are translationally inhibited by a titratable repressor in both wheat germ extract and reticulocyte lysate. *FEBS Lett.* 456, 357-360.

Blichenberg A, Schwanke B, Rehbein M, Garner CC, Richter D, Kindler S (1999) Identification of a cis-acting dendritic targeting element in MAP2 mRNAs. *J. Neurosci.* 19, 8818-8829.

Bourdeau ML, Morin F, Laurent CE, Azzi M, Lacaille JC (2007) Kv4.3-mediated A-type K⁺ currents underlie rhythmic activity in hippocampal interneurons. *J. Neurosci.* 27, 1942-1953.

Cammalleri M, Lütjens R, Berton F, King AR, Simpson C, Francesconi W, Sanna PP (2003) Time-restricted role for dendritic activation of the mTOR-p70^{S6K} pathway in the induction of late-phase long-term potentiation in the CA1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 100, 14368-14373.

Casadio A, Martin KC, Giustetto M, Zhu H, Chen M, Bartsch D, Bailey CH, Kandel ER (1999) A transient, neuron-wide form of CREB-mediated long-term facilitation can be stabilized at specific synapses by local protein synthesis. *Cell*. 99, 221-237.

Costa-Mattioli M, Gobert D, Harding H, Herdy B, Azzi M, Bruno M, Bidinosti M, Ben Mamou C, Marcinkiewicz E, Yoshida M, Imataka H, Cuello AC, Seidah N, Sossin W, Lacaille JC, Ron D, Nader K, Sonenberg N (2005) Translational control of hippocampal synaptic plasticity and memory by the eIF2alpha kinase GCN2. *Nature*. 436, 1166-1173.

Frey U, Matthies H, Reymann KG, Matthies H (1991) The effect of dopaminergic D1 receptor blockade during tetanization on the expression of long-term potentiation in the rat CA1 region in vitro. *Neurosci. Lett*. 129, 111-114.

Frey U, Huang YY, Kandel ER (1993) Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science*. 260, 1661-1664.

Gallagher SM, Daly CA, Bear MF, Huber KM (2004) Extracellular signal-regulated protein kinase activation is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression in hippocampal area CA1. *J. Neurosci*. 24, 4859-4864.

Gingras AC, Raught B, Sonenberg N (2001) Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev*. 15, 807-826.

Hay N, Sonenberg N (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*. 18, 1926-45.

Hou L, Klann E (2004) Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *J. Neurosci*. 24, 6352-6361.

Impey S, Obrietan K, Wong ST, Poser S, Yano S, Wayman G, Deloulme JC, Chan G, Storm DR (1998) Cross talk between ERK and PKA is required for Ca²⁺ stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron*. 21, 869-883.

Kelleher RJ 3rd, Govindarajan A, Jung HY, Kang H, Tonegawa S (2004a) Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell*. 116, 467-479.

Kelleher RJ 3rd, Govindarajan A, Tonegawa S (2004b) Translational regulatory mechanisms in persistent forms of synaptic plasticity. *Neuron*. 44, 59-73.

Khan A, Pepio AM, Sossin WS (2001) Serotonin activates S6 kinase in a rapamycin-sensitive manner in *Aplysia* synaptosomes. *J. Neurosci*. 21, 382-391.

Kopec CD, Li B, Wei W, Boehm J, Malinow R. (2006) Glutamate receptor exocytosis and spine enlargement during chemically induced long-term potentiation. *J. Neurosci*. 26, 2000-2009.

Lenz G, Avruch J (2005) Glutamatergic regulation of the p70S6 kinase in primary mouse neurons. *J. Biol. Chem*. 280, 38121-38124.

Leutgeb JK, Frey JU, Behnisch T (2003) LTP in cultured hippocampal-entorhinal cortex slices from young adult (P25-30) rats, *J. Neurosci. Methods*. 130, 19-32.

Liao L, Pilotte J, Xu T, Wong CC, Edelman GM, Vanderklish P, Yates JR 3rd (2007) BDNF induces widespread changes in synaptic protein content and up-regulates components of the translation machinery: an analysis using high-throughput proteomics. *J. Proteome Res*. 6, 1059-1071.

Matthies H, Becker A, Schroeder H, Kraus J, Holtt V, Krug M (1997) Dopamine D1-deficient mutant mice do not express the late phase of hippocampal long-term potentiation. *Neuroreport*. 8, 3533-5.

Mellentin C, Moller M, Jahnsen H (2006) Properties of long-term synaptic plasticity and metaplasticity in organotypic slice cultures of rat hippocampus. *Exp. Brain Res.* 170, 522-531.

Meyuhas O (2000) Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *Eur. J. Biochem.* 267, 6321-6330.

Meyuhas O, Hornstein E, (2000) Translational control of TOP mRNAs, in: *Translational control of gene expression* (Sonenberg N, Hershey JWB, Mathews MB, eds) pp 671-694. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Moccia R, Chen D, Lyles V, Kapuya E, E Y, Kalachikov S, Spahn CM, Frank J, Kandel ER, Barad M, Martin KC (2003) An unbiased cDNA library prepared from isolated *Aplysia* sensory neuron processes is enriched for cytoskeletal and translational mRNAs. *J. Neurosci.* 23, 9409-9417.

Moroz LL, Edwards JR, Puthanveetil SV, Kohn AB, Ha T, Heyland A, Knudsen B, Sahni A, Yu F, Liu L, Jezzini S, Lovell P, Iannuccilli W, Chen M, Nguyen T, Sheng H, Shaw R, Kalachikov S, Panchin YV, Farmerie W, Russo JJ, Ju J, Kandel ER (2006) Neuronal transcriptome of *aplysia*: neuronal compartments and circuitry. *Cell.* 127, 1453-1467.

Muller D, Buchs PA, Stoppini L (1993) Time course of synaptic development in hippocampal organotypic cultures. *Dev. Brain Res.* 71, 93-100.

Opazo P, Watabe AM, Grant SG, O'Dell TJ (2003) Phosphatidylinositol 3-kinase regulates the induction of long-term potentiation through extracellular signal-related kinase-independent mechanisms. *J. Neurosci.* 23, 3679-3688.

Otmakhov N, Khibnik L, Otmakhova N, Carpenter S, Riahi S, Asrican B, Lisman J (2004) Forskolin-induced LTP in the CA1 hippocampal region is NMDA receptor dependent. *J. Neurophysiol.* 91, 1955-1962.

Patterson SL, Pittenger C, Morozov A, Martin KC, Scanlin H, Drake C, Kandel ER (2001) Some forms of cAMP-mediated long-lasting potentiation are associated with release of BDNF and nuclear translocation of phospho-MAP kinase. *Neuron*. 32, 123-140.

Pende M, Um SH, Mieulet V, Sticker M, Goss VL, Mestan J, Mueller M, Fumagalli S, Kozma SC, Thomas G (2004) S6K1(-)/S6K2(-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. *Mol. Cell. Biol.* 24, 3112-3124.

Poon MM, Choi SH, Jamieson CA, Geschwind DH, Martin KC (2006) Identification of process-localized mRNAs from cultured rodent hippocampal neurons, *J. Neurosci.* 26, 13390-13399.

Roux PP, Ballif BA, Anjum R, Gygi SP, Blenis J (2004) Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase, *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*, 101, 13489-13494.

Roux PP, Shahbazian D, Vu H, Holz MK, Cohen MS, Taunton J, Sonenberg N, Blenis J. (2007) RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation, *J. Biol. Chem.* 282, 14056-14064.

Ruvinsky I, Sharon N, Lerer T, Cohen H, Stolovich-Rain M, Nir T, Dor Y, Zisman P, Meyuhas O (2005) Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes Dev.* 19, 2199-2211.

Sabatini DM, Barrow RK, Blackshaw S, Burnett PE, Lai MM, Field ME, Bahr BA, Kirsch J, Betz H, Snyder SH (1999) Interaction of RAFT1 with gephyrin required for rapamycin-sensitive signaling. *Science*. 284, 1161-1164.

Sajikumar S, Frey JU (2004) Late-associativity, synaptic tagging, and the role of dopamine during LTP and LTD. *Neurobiol. Learn. Mem.* 82,12-25.

Sindreu CB, Scheiner ZS, Storm DR (2007) Ca^{2+} -stimulated adenylyl cyclases regulate ERK-dependent activation of MSK1 during fear conditioning. *Neuron.* 53, 79-89.

Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue, *J. Neurosci. Methods*, 37, 173-182.

Sutton MA, Schuman EM (2006) Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory. *Cell.* 127, 49-58.

Takei N, Inamura N, Kawamura M, Namba H, Hara K, Yonezawa K, Nawa H (2004) Brain-derived neurotrophic factor induces mammalian target of rapamycin-dependent local activation of translation machinery and protein synthesis in neuronal dendrites. *J. Neurosci.* 24, 9760-9769.

Tang H, Hornstein E, Stolovich M, Levy G, Livingstone M, Templeton D, Avruch J, Meyuhas O (2001) Amino acid-induced translation of TOP mRNAs is fully dependent on phosphatidylinositol 3-kinase-mediated signaling, is partially inhibited by rapamycin, and is independent of S6K1 and rpS6 phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 21, 8671-8683.

Tang SJ, Reis G, Kang H, Gingras AC, Sonenberg N, Schuman EM (2002) A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 99, 467-472.

Topolnik L, Azzi M, Morin F, Kougioumoutzakis A, Lacaille JC (2006) mGluR1/5 subtype-specific calcium signalling and induction of long-term potentiation in rat hippocampal oriens/alveus interneurons. *J. Physiol.* 575, 115-131.

Tsokas P, Grace EA, Chan P, Ma T, Sealton SC, Iyengar R, Landau EM, Blitzer RD (2005) Local protein synthesis mediates a rapid increase in dendritic elongation factor 1A after induction of late long-term potentiation. *J. Neurosci.* 25, 5833-5843.

Tsokas P, Ma T, Iyengar R, Landau EM, Blitzer RD (2007) Mitogen-activated protein kinase upregulates the dendritic translation machinery in long-term potentiation by controlling the mammalian target of rapamycin pathway. *J. Neurosci.* 27, 5885-5894.

Wang H, Ferguson GD, Pineda VV, Cundiff PE, Storm DR (2004) Overexpression of type-1 adenylyl cyclase in mouse forebrain enhances recognition memory and LTP. *Nat. Neurosci.* 7, 635-642.

Wong ST, Athos J, Figueroa XA, Pineda VV, Schaefer ML, Chavkin CC, Muglia LJ, Storm DR (1999) Calcium-stimulated adenylyl cyclase activity is critical for hippocampus-dependent long-term memory and late phase LTP. *Neuron.* 23, 787-798.

5.9. FIGURES AND LEGENDS

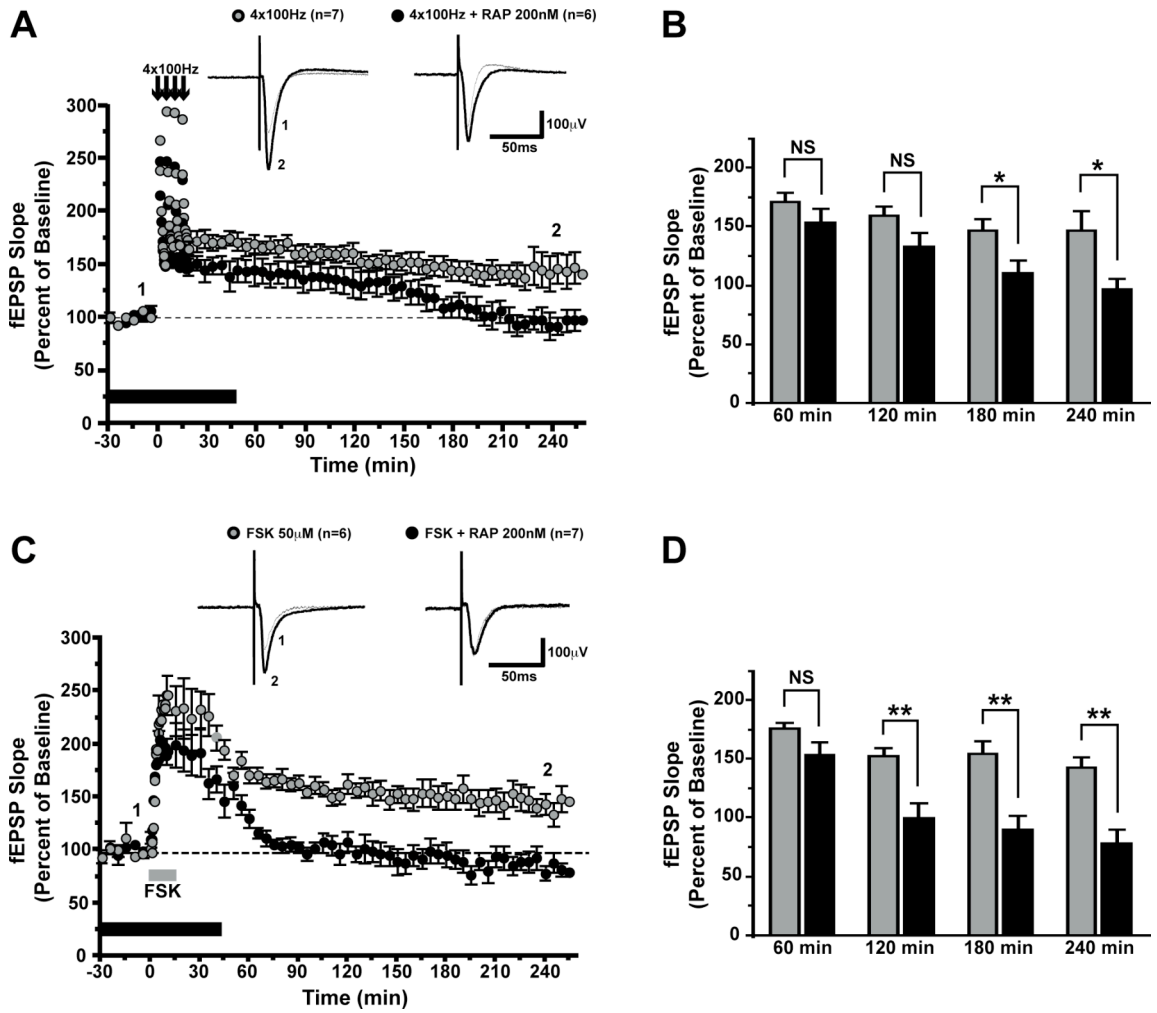


Figure 1. Forskolin induces late-LTP in organotypic hippocampal slices

A. Time plot of fEPSP responses for group data with representative recordings above, showing that 4 trains of high-frequency stimulation elicit LTP of fEPSP responses that persists for at least 4 hours (grey circles, $n = 7$) in acute slices. In the presence of 200 nM rapamycin (black bar), an inhibitor of the mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) the late phase of LTP is specifically inhibited (black circles, $n = 6$). **B.** Summary bar graph indicating that LTP in rapamycin-treated slices (black bars) is significantly reduced 180-240 min post-tetanus, as compared to vehicle-treated slices (grey bars; $p < 0.05$). **C.** Time plot of fEPSP responses showing that the application of 50 μM forskolin (grey bar) produces a robust and sustained LTP (grey circles, $n = 6$) in cultured slices. Forskolin-induced LTP was prevented by the application of 200 nM

rapamycin (black circles, $n = 7$) **D**. Summary bar graph indicating that LTP is significantly reduced 120-240 min post-forskolin ($p < 0.01$) in rapamycin-treated slices (black bars), as compared to vehicle-treated slices (grey bars). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, NS not significant.

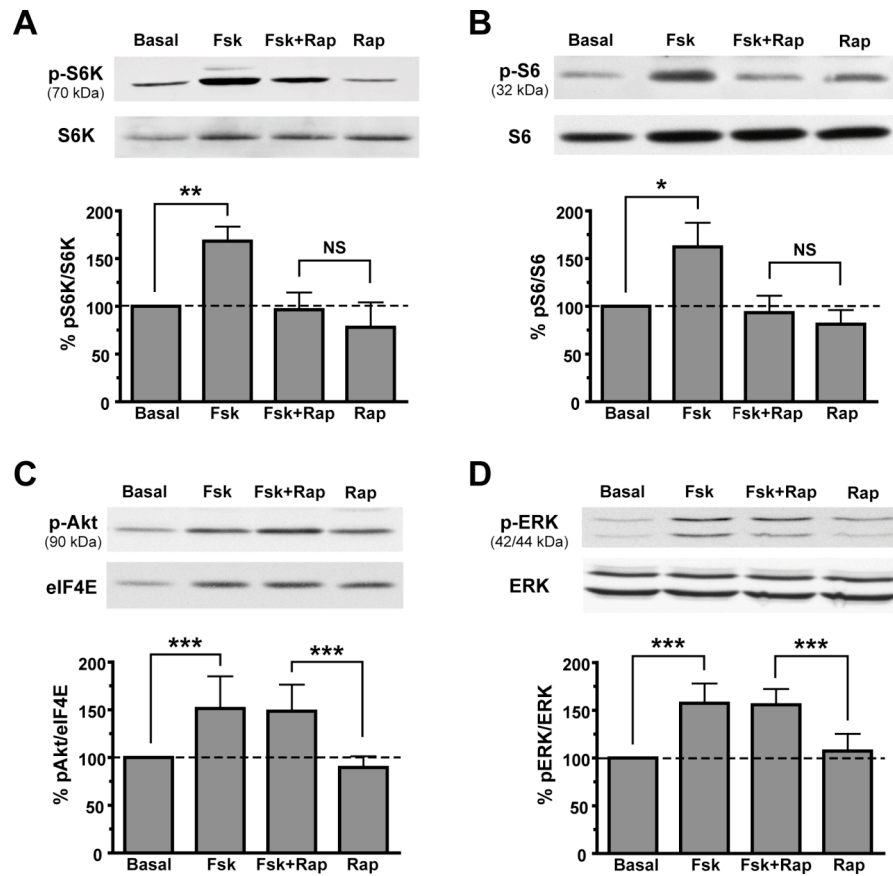


Figure 2. Forskolin increases the activity of several components of the mTOR pathway in hippocampal slices

A. Western blot analysis of hippocampal extracts reveals that S6K phosphorylation (Thr389) is significantly increased by the application of 50 μ M forskolin (Fsk; $p < 0.01$). This increase is completely blocked by pre-treatment of hippocampal slices with 200 nM rapamycin (Fsk + Rap). **B.** Forskolin also increases the phosphorylation levels of the ribosomal protein S6 (Ser235/236), a TOP-mRNA encoded protein ($p < 0.05$) which was blocked by rapamycin. **C.** Akt phosphorylation is significantly increased by 50 mM forskolin ($p < 0.001$) but this augmentation is not prevented by the addition of 200 nM rapamycin **D.** Similarly, phosphorylation of ERK (Tyr204) is increased by treatment with forskolin ($p < 0.001$) but this effect was not blocked by pre-treatment with rapamycin ($p < 0.001$) indicating that rapamycin only affected phosphorylation of

proteins downstream of mTOR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, NS not significant.

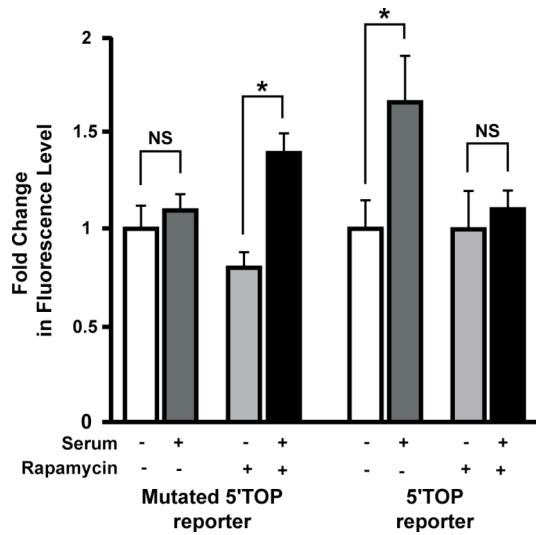


Figure 3. Forskolin selectively activates a 5'TOP reporter via mTOR in HEK cells

HEK cells transfected with fluorescent 5'TOP and mutated 5'TOP reporters were tested for serum-induced translation. Summary bar graph showing that after an overnight starving, serum addition selectively increases the fluorescence of a 5'TOP reporter ($p < 0.05$) and this is blocked by 20nM rapamycin (right bars). Mutated 5'TOP reporter is not stimulated by serum (left bars). Addition of rapamycin reveals the existence of a rapamycin-insensitive increase in the level of the mutated 5'TOP reporter ($p < 0.05$). * $p < 0.05$, NS not significant.

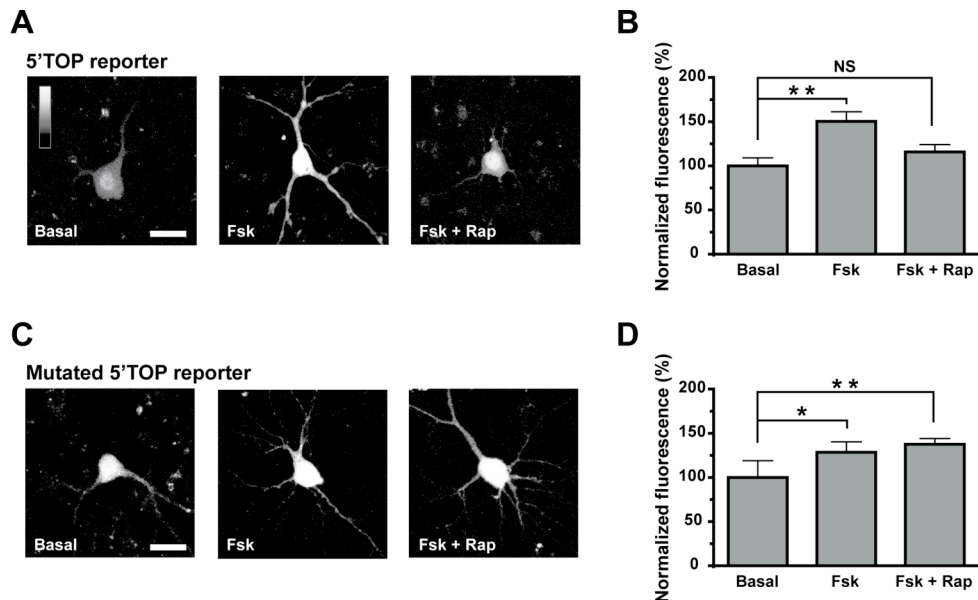


Figure 4. Forskolin increases somatic 5'TOP mRNAs translation via mTOR in slice cultures

A and B. Confocal images (A) and summary bar graph (B) from CA1 pyramidal cells transfected with the 5'TOP reporter. The fluorescence levels are significantly increased in cells from slices treated with 50 μ M forskolin, as compared to cells from vehicle-treated slices ($p < 0.01$). This increase in fluorescence is prevented by pre-treatment with 200nM rapamycin. **C and D.** Similar experiments showing that the fluorescence levels of a mutated 5'TOP reporter are significantly increased in cells from slices treated with forskolin ($p < 0.05$), but, in contrast, this augmentation is not blocked by the pre-treatment with rapamycin. Scale bar: 20 μ m. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, NS not significant.

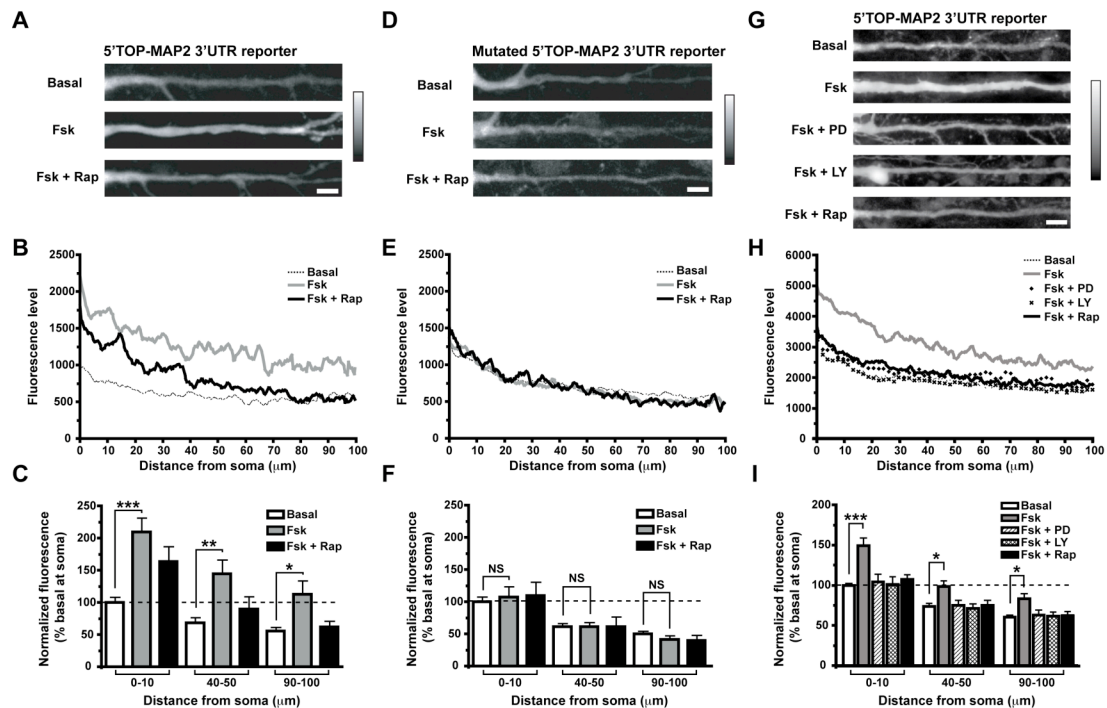


Figure 5. Forskolin increases dendritic 5'TOP mRNAs translation via mTOR, PI3K and ERK in slice cultures

A and B. Confocal images (A) and summary plot (B) showing that the fluorescence levels of a 5'TOP-MAP2 3'UTR reporter are significantly increased in dendrites of pyramidal cells by the application of 50 μ M forskolin. This augmentation is prevented by pre-treatment with 200 nM rapamycin. **C.** Summary bar graph illustrating that forskolin-induced increase is significant from proximal (at 10 μ m, $p < 0.001$) to distal regions (at 100 μ m, $p < 0.05$). **D and E.** Similar experiments indicating that, in contrast,

fluorescence levels of a mutated 5'TOP-MAP2 3'UTR reporter are not increased by forskolin with or without rapamycin pre-treatment. **F.** Summary bar graph showing that there is no significant difference in fluorescence throughout the dendritic length in all conditions. **G and H.** Confocal images (G) and summary plot (H) from separate experiments showing that the fluorescence levels of a 5'TOP-MAP2 3'UTR reporter are significantly increased in dendrites of pyramidal cells by the application of 50 μ M forskolin and that this augmentation is prevented by pre-treatment with 50 μ M PD98059, 50 μ M LY294002 or a high dose of rapamycin (1 μ M). **I.** Summary bar graph illustrating that forskolin-induced increase is significant from proximal (at 10 μ m, $p < 0.001$) to distal regions (at 100 μ m, $p < 0.05$). Scale bar: 10 μ m. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, NS not significant.

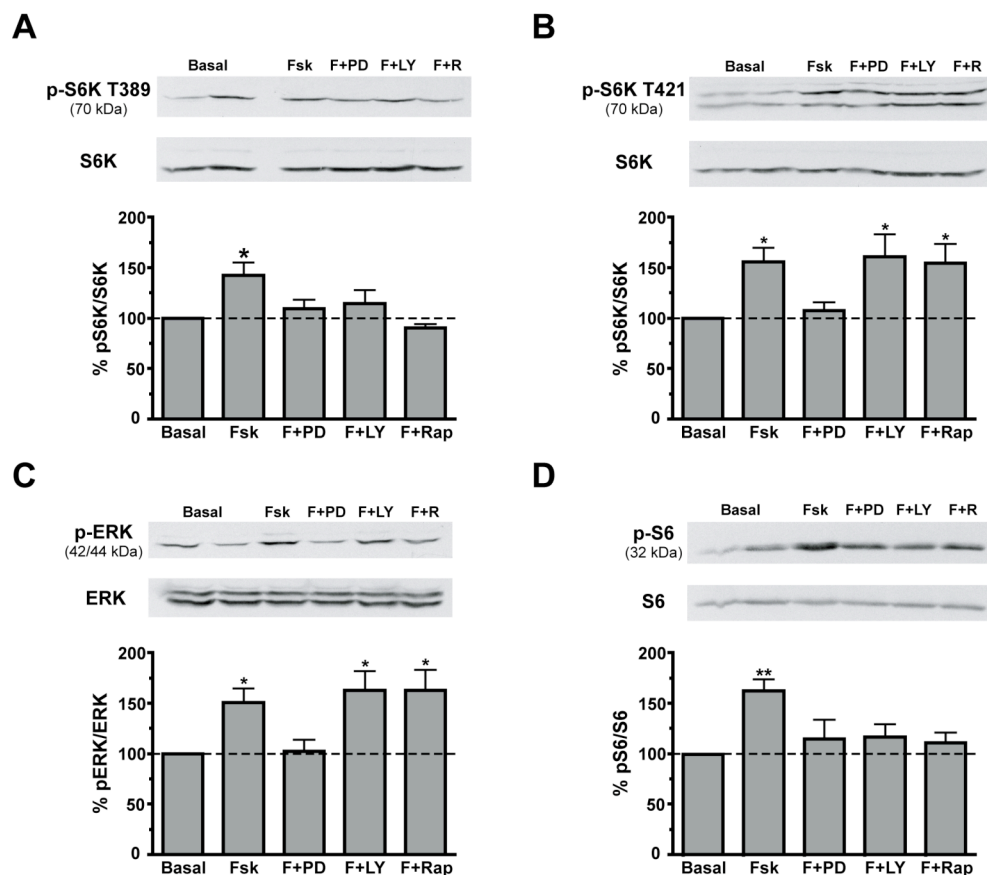


Figure 6. Forskolin activates the mTOR pathway in PI3K- and ERK-dependent manner in slice cultures

A. Western blot analysis of hippocampal extracts reveals that S6K phosphorylation at the mTOR-dependent site (Thr389) is significantly increased by the application of 50

μM forskolin (Fsk; $p < 0.05$). This increase is completely blocked by pre-treatment of hippocampal slices with $50 \mu\text{M}$ PD98059 (F+PD), $50 \mu\text{M}$ LY294002 (F+LY), and a high dose ($1 \mu\text{M}$) of rapamycin (F+R). **B.** Forskolin also significantly increases ($p < 0.05$) S6K phosphorylation at the MEK/ERK-dependent site (Thr421/Ser424). In contrast, this increase is blocked by the addition of PD98059, but not by LY294002 ($p < 0.05$) or rapamycin ($p < 0.05$). **C.** Similarly, phosphorylation of ERK (Tyr204) is increased by treatment with forskolin ($p < 0.05$) and this effect was only blocked by pre-treatment with PD98059, and not by LY294002 ($p < 0.05$) or rapamycin ($p < 0.05$). **D.** Forskolin also significantly augments ($p < 0.01$) the phosphorylation levels of the ribosomal protein S6 (Ser235/236), an effect that is prevented by the addition of PD98059, LY294002 or rapamycin. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, NS not significant.

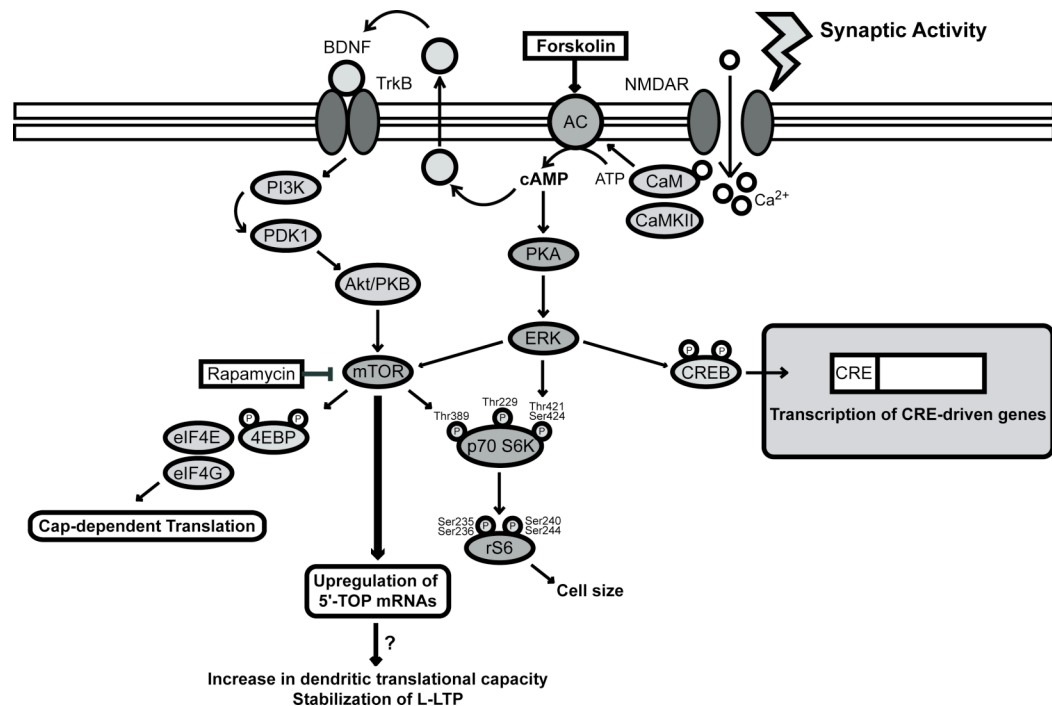


Figure 7. A model for the up-regulation of 5' TOP mRNA translation during late-LTP

During LTP-inducing stimulation, NMDA receptors are recruited by high-frequency synaptic activity and allow the entry of calcium into the postsynaptic neuron. This in turn activates adenylate cyclase and leads to the production of cyclic AMP (cAMP) and the activation of cAMP dependent protein kinase (PKA). PKA can then activate the mammalian target of rapamycin (mTOR). The precise mechanism involved remains

unclear but PKA could activate mTOR via at least two pathways. First, PKA could activate the ERK pathway. ERK has previously been shown to be required for the activation of downstream targets of mTOR such as 4E-BP and S6 (Kelleher *et al.*, 2004a). Alternatively, cAMP production could cause the release of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Released BDNF can in turn activate TrkB receptors and the PI3K/Akt-PKB pathway, which has also been shown to activate mTOR (Patterson *et al.*, 2001; Takei *et al.*, 2004). Finally, activation of mTOR pathway leads to the selective up-regulation of 5'TOP mRNAs. Our results suggest that a selective increase in 5'TOP mRNAs translation may be crucial for late-LTP stabilization. CaM, calmodulin, CREB, cAMP-responsive element binding protein, CRE, cAMP-responsive element.

CHAPITRE VI. DISCUSSION

6.1. RAPPEL DE L'ÉTAT DE LA QUESTION ET DE L'OBJECTIF GÉNÉRAL

Ainsi, tel que décrit dans l'introduction, la potentialisation à long-terme (LTP) représente à ce jour le modèle de prédilection pour l'étude des mécanismes cellulaires qui seraient à la base de la formation des souvenirs au sein de l'hippocampe. Depuis la description initiale de ce phénomène par Bliss et Lømo au niveau de la voie perforante (voir Introduction, section 1.3.2.) (Bliss et Lømo, 1973), de nombreux travaux se sont intéressés aux différents facteurs qui peuvent influencer et/ou réguler la stabilisation et la maintenance de la plasticité synaptique à long-terme. Parmi ceux-ci, la synthèse de nouvelles protéines semble jouer un rôle particulièrement important (Costa-Mattioli *et al.*, 2009; Davis et Squire, 1984; Flexner, Flexner et Stellar, 1963; Kelleher, Govindarajan et Tonegawa, 2004). En effet, la traduction de nouvelles protéines permet de fournir plusieurs éléments essentiels à la stabilisation de la LTP. Cependant, bien qu'on sache depuis plusieurs années que la traduction est nécessaire au maintien à long-terme de la LTP, les mécanismes couplant l'activité synaptique et la machinerie traductionnelle sont encore peu compris. Dans cette optique, l'objectif général de cette thèse était donc de mieux comprendre les interactions entre l'activité synaptique et la régulation de la traduction. Plus spécifiquement cette thèse s'est intéressée au rôle de deux voies clés pour l'initiation de la traduction : la voie eIF2 α , qui régule la formation du complexe ternaire (voir Introduction, section 1.4.2.), et la voie mTOR, qui régule la production de la machinerie protéique via la synthèse des ARNm 5'TOP (voir Introduction, section 1.4.3.).

Tel que décrit dans les trois sections de résultats expérimentaux (voir Résultats, chapitres III à V), nos travaux ont clairement démontré l'importance de ces deux voies pour la régulation de la traduction au cours de la phase tardive de la potentialisation à long-terme. Les prochaines sections mettent maintenant l'emphase sur les résultats clés de nos études et tentent de les remettre dans un contexte plus général tout en discutant

des points qui n'ont pas encore été adressés par ces travaux mais qui pourraient constituer la base de futures études.

6.2. L'IMPORTANCE DE LA VOIE eIF2 α ET DE LA FORMATION DU COMPLEXE TERNAIRE POUR LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE ET LA MÉMOIRE À LONG-TERME

Ainsi, nos études se sont d'abord concentrées sur la première étape de l'initiation de la traduction et sur la voie eIF2 α . Tel que décrit dans l'introduction, cette voie est responsable de la formation du complexe ternaire et de la liaison de ce dernier à la petite sous-unité ribosomale 40S (voir Introduction, section 1.4.2.). La phosphorylation d'eIF2 α , elle-même régulée par plusieurs kinases dont GCN2, est une étape limitante : en effet, la phosphorylation de la sous-unité α d'eIF2 provoque la liaison d'eIF2 au facteur eIF2B, séquestrant ce dernier et l'empêchant ainsi d'accomplir son rôle d'échange du GDP contre le GTP, une étape essentielle à la formation du complexe ternaire (voir Figure 12 et Introduction, section 1.4.2.). La phosphorylation d'eIF2 α contribue donc à diminuer les niveaux de traduction globale, mais paradoxalement, elle stimule également la traduction du facteur de transcription ATF4, un inhibiteur reconnu de CREB (voir Figure 13 et Introduction, section 1.4.2.). Cependant, bien que plusieurs études aient démontré que divers stress cellulaires peuvent altérer l'état de phosphorylation d'eIF2 α , aucune étude ne s'était encore intéressée à la régulation de ce facteur dans des conditions de plasticité synaptique. Les prochaines sections reviennent donc sur les principaux résultats de nos études (Costa-Mattioli *et al.*, 2005, 2007) et suggèrent quelques pistes qu'il pourrait être intéressant d'explorer dans un futur proche.

6.2.1. L'activité synaptique module l'activation de la cascade GCN2/eIF2 α

Ainsi, nos résultats ont tout d'abord démontré que l'activité synaptique module effectivement l'activation et la phosphorylation de GCN2 et d'eIF2 α , soulignant pour la première fois un lien entre l'activité aux synapses et l'activation d'un facteur d'initiation de la voie eIF2 α . Cependant, cette stimulation synaptique doit dépasser un certain seuil

afin de pouvoir diminuer la phosphorylation de GCN2 ou d'eIF2 α . En effet, un seul train de stimulation à haute fréquence, un protocole reconnu pour induire la phase initiale de la LTP, n'affecte pas les niveaux de phosphorylation de ces deux facteurs. En revanche, l'application de plusieurs trains de stimulation à haute fréquence au niveau des collatérales de Schaffer, un protocole utilisé classiquement pour induire la phase tardive de la LTP, ou l'application de forskoline, un activateur de la production d'AMPC, permet de diminuer la phosphorylation de GCN2 et d'eIF2 α (Figure 2 et S7, Costa-Mattioli *et al.*, 2005). Parallèlement, nous avons observé qu'un entraînement répété pour une tâche de conditionnement par la peur permet également de diminuer la phosphorylation d'eIF2 α (Figure 6, Costa-Mattioli *et al.*, 2007). Ainsi, l'induction de la LTP et de la mémoire à long-terme (LTM) permettent toutes deux de moduler la phosphorylation de la cascade GCN2/eIF2 α .

Dans un autre ordre d'idées, il est intéressant de noter que ces résultats corroborent les études démontrant que la traduction de nouvelles protéines est requise uniquement pour la maintenance de la potentialisation à long-terme ou de la mémoire (voir Introduction, section 1.3.2.), puisque la phosphorylation de GCN2 et d'eIF2 α n'est modifiée que par des protocoles générant la phase tardive de la LTP ou de la LTM. En d'autres termes, l'activation de la synthèse de nouvelles protéines nécessite que l'activité synaptique dépasse un certain seuil.

6.2.2. L'activation de la cascade GCN2/eIF2 α est nécessaire à la maintenance de la phase tardive de la LTP et de la LTM

Après avoir déterminé que l'activité synaptique peut effectivement influencer la phosphorylation de GCN2 et d'eIF2 α , nos études ont établi que cette modulation n'est pas simplement une conséquence de l'activité aux synapses, mais plutôt une étape nécessaire à la genèse de la phase tardive de la LTP et de la LTM. Ainsi, tel que résumé brièvement dans les deux prochaines sections, il apparaît clairement que la diminution de la phosphorylation de GCN2, puis d'eIF2 α , sont requises pour permettre l'établissement de la phase tardive de la LTP et de la LTM.

6.2.2.1. Implication dans la LTP

Tout d'abord, nos travaux se sont intéressés à la plasticité synaptique chez des souris mutantes $GCN2^{-/-}$, chez lesquelles l'expression du gène codant pour GCN2 a été inactivé par recombinaison homologue (Information supplémentaire, Costa-Mattioli *et al.*, 2005). Chez ces souris, la protéine GCN2, la principale kinase d'eIF2 α au niveau du cerveau, est donc absente et les niveaux de phosphorylation d'eIF2 α sont diminués dans des conditions basales (Figure 2, Costa-Mattioli *et al.*, 2005). Nous avons ainsi montré que chez les souris $GCN2^{-/-}$, un seul train de stimulation à haute fréquence induit une augmentation marquée et soutenue des potentiels de champs extracellulaires (fEPSPs) enregistrés. Or, l'application de ce même protocole chez des souris sauvages n'induit qu'une augmentation transitoire des réponses extracellulaires, selon un patron classiquement associé à la phase précoce de la LTP (Bliss et Collingridge, 1993; Kandel, Schwartz et Jessel, 2000; Kelleher, Govindarajan et Tonegawa, 2004). Il apparaît donc que chez les souris $GCN2^{-/-}$, le seuil d'induction de la phase tardive de la LTP est diminué et qu'un seul train de stimulation à haute fréquence est suffisant pour induire une réponse synaptique qui possède plusieurs caractéristiques de la phase tardive de la LTP dont la dépendance à la PKA, à la transcription et à la traduction de nouvelles protéines (Figure 2, Costa-Mattioli *et al.*, 2005).

Dans notre étude subséquente, nous nous sommes intéressés à la plasticité synaptique chez des souris $eIF2\alpha^{+/S51A}$, chez lesquelles 50% des sites de phosphorylation d'eIF2 α sont mutés et donc non-phosphorylables (Figure S1, Costa-Mattioli *et al.*, 2007). À l'instar de ce que l'on peut observer chez les souris $GCN2^{-/-}$, le seuil pour l'induction de la phase tardive est également diminué chez les souris $eIF2\alpha^{+/S51A}$, de sorte qu'un unique train de stimulation à haute fréquence génère une réponse synaptique semblable à celle qu'on peut observer lors de la phase tardive de la LTP. Cette réponse est par ailleurs dépendante de la transcription et de la synthèse de nouvelles protéines (Figure 1, Costa-Mattioli *et al.*, 2007). À l'inverse, l'application de Sal003, un composé permettant d'augmenter la phosphorylation d'eIF2 α , empêche l'induction de la phase tardive de la LTP, et ce même après l'application de plusieurs trains de stimulation à haute fréquence (Figure 5, Costa-Mattioli *et al.*, 2007).

6.2.2.2. Implication dans la LTM

Parallèlement aux expériences de plasticité synaptique, nous avons également entrepris diverses études comportementales afin d'évaluer l'influence de la cascade GCN2/eIF2 α sur la mémoire à long-terme. Ainsi, nous avons pu établir un parallèle intéressant entre le phénotype observé pour la plasticité synaptique et celui pour la mémoire. En effet, lors d'une tâche d'apprentissage spatial qui nécessite la mémorisation d'indices spatiaux pour pouvoir localiser une plateforme submergée (le labyrinthe aquatique de Morris), les souris *GCN2*^{-/-} performant mieux que les souris sauvages suite à un entraînement de faible intensité (Figure 4, Costa-Mattioli *et al.*, 2005). Ainsi, les souris mettent significativement moins de temps à retrouver la plateforme submergée, ce qui suggère que l'apprentissage d'une telle tâche est facilité chez les souris *GCN2*^{-/-}. De plus, les souris *eIF2 α* ^{+S51A} performant également mieux lors de ce test que les souris sauvages, suite à un entraînement de faible intensité (Figure 2, Costa-Mattioli *et al.*, 2007). À l'inverse, l'application de Sal003, un composé permettant d'augmenter la phosphorylation d'eIF2 α , empêche l'acquisition de la mémoire à long-terme pour une tâche de conditionnement par la peur (Figure 6, Costa-Mattioli *et al.*, 2007).

Il est intéressant de noter que les études qui se sont intéressées à la diminution du seuil d'induction de la plasticité synaptique par la mutation de divers facteurs associés à la transcription CREB-dépendante, et plus particulièrement l'étude sur les souris EGFP-AZIP (Chen *et al.*, 2003) avait également noté un phénotype similaire à ceux des souris *GCN2*^{-/-} et des souris *eIF2 α* ^{+S51A} pour un entraînement de faible intensité.

On peut par ailleurs noter que ces phénotypes sont similaires à ceux qu'on observe chez des souris mutantes pour différents facteurs de traduction, notamment des composants de la voie mTOR comme 4E-BP2 (Banko *et al.*, 2005) ou les protéines kinases S6K 1 et 2 (Antion *et al.*, 2008a), ou de transcription, tels que CREB (Barco *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003). Ainsi, la facilitation de la traduction par le retrait de divers freins à l'initiation de la traduction, que ce soit au niveau de la voie eIF2 α (Costa-Mattioli *et al.*, 2005, 2007) ou de la voie mTOR (Antion *et al.*, 2008a; Banko *et al.*, 2005), ou encore, plus en amont, la facilitation de l'expression génique par l'activation constitutive de CREB (Barco *et al.*, 2002) ou l'inactivation de ses inhibiteurs, C/EBP et ATF4 (Chen *et al.*,

2003) ont toutes le même effet : diminuer le seuil d'induction de la phase tardive de la LTP et de la LTM. Inversement, des souris mutantes chez qui l'expression génique CREB-dépendante est inhibée présentent un phénotype similaire à celui des souris qui ont reçu des injections de Sal003 : elles ne présentent pas la phase tardive de la LTP et sont incapables d'acquiescer une mémoire à long-terme dans le labyrinthe aquatique de Morris ou lors d'une tâche de conditionnement par la peur (Bourtchuladze *et al.*, 1994). Ces études ont ainsi souligné le rôle central que joue la transcription CREB-dépendante et la traduction de nouvelles protéines, en démontrant que la facilitation de la transcription ou de la traduction permet de réguler le seuil d'induction de la LTP et de la LTM.

6.2.3. La modulation de la cascade GCN2/eIF2 α influence la traduction spécifique du facteur de transcription ATF4

Tel que mentionné ci-dessus (voir section 6.2.2.), la diminution des niveaux de phosphorylation de GCN2 ou d'eIF2 α a pour conséquence un abaissement significatif du seuil d'induction de la phase tardive de la potentialisation à long-terme et de la mémoire à long-terme. Or, il est bien connu que la cascade GCN2/eIF2 α régule directement les niveaux d'expression du facteur ATF4, un inhibiteur reconnu de la transcription CREB-dépendante (voir Introduction, section 1.4.2.). Dans cette optique, nos travaux ont ensuite examiné l'état d'ATF4 chez nos deux modèles de souris mutantes.

Ainsi, chez les souris *GCN2*^{-/-}, l'expression de l'ARNm et de la protéine ATF4 sont significativement diminués et conséquemment, l'expression de plusieurs gènes CREB-dépendants est augmentée dans des conditions basales (Figure 2, Costa-Mattioli *et al.*, 2005). Chez les souris eIF2 α ^{+S51A}, l'expression d'ATF4 est également significativement réduite dans des conditions basales (Figure S1, Costa-Mattioli *et al.*, 2007). Ceci n'est pas sans rappeler le phénotype des souris VP16-CREB (présentant une forme de CREB constitutivement active; Barco *et al.*, 2002) ou des souris EGFP-AZIP (présentant une diminution des niveaux de C/EBP et d'ATF4; Chen *et al.*, 2003), chez qui l'expression génique CREB-dépendante est facilitée. Tel que décrit plus haut (voir section 6.2.2.), ces

souris ont en effet un point commun : il est plus facile d'induire la phase tardive de la LTP et de la mémoire chez ces souris mutantes que chez des souris sauvages.

À l'inverse, l'application de Sal003, un composé qui permet d'augmenter la phosphorylation d'eIF2 α , augmente également l'expression de l'ARNm d'ATF4 (Figure 5, Costa-Mattioli *et al.*, 2007). Ces résultats obtenus chez les souris mutantes et suite à l'application de Sal003 soulignent donc une fois de plus la relation paradoxale entre la phosphorylation d'eIF2 α et la traduction : alors que la phosphorylation de ce facteur tend à diminuer la synthèse protéique générale, elle augmente en parallèle, la synthèse du facteur de transcription ATF4 (Harding *et al.*, 2000; Lu, Harding et Ron, 2004; Vattam et Wek, 2004).

Cependant, bien que ces résultats nous démontrent que l'expression d'ATF4 est altérée par des modifications au niveau de la cascade GCN2/eIF2 α , ils ne nous permettent pas en eux-mêmes d'affirmer que dans ce modèle, la modulation du facteur ATF4 via la cascade GCN2/eIF2 α est cruciale à l'établissement de la phase tardive de la LTP et de la LTM. Tel que décrit plus haut, nous avons démontré au préalable que l'activation de la cascade GCN2/eIF2 α est nécessaire à la maintenance de la phase tardive de la LTP et de la LTM (voir section 6.2.2.). Néanmoins, l'influence de la cascade GCN2/eIF2 α sur la plasticité synaptique et la mémoire pourrait se traduire à la fois par une modulation de la synthèse protéique générale et/ou par une régulation de la transcription. Il restait donc à évaluer l'impact direct de la modulation de la transcription et du facteur ATF4 sur la phase tardive de la LTP et de la LTM. Même s'il est probable que l'application aigue de Sal003, c'est-à-dire pour des durées de l'ordre de l'heure (ici une heure pour les expériences de plasticité synaptique; voir Figure 5, Costa-Mattioli *et al.*, 2007), affecte largement la traduction du facteur ATF4 avant d'affecter la traduction générale (Hinnebusch, 2000, 2005), cette dernière possibilité ne pouvait être exclue à prime abord. La prochaine section récapitule les expériences clés qui ont permis de déterminer que la régulation d'ATF4 était une variable critique pour l'établissement de la phase tardive de la LTP et de la LTM.

6.2.4. La modulation de la traduction d'ATF4, via la cascade GCN2/eIF2 α , est nécessaire à la maintenance de la phase tardive de la LTP et de la LTM

Nous avons souligné plus haut que l'application de Sal003, un composé permettant d'augmenter de façon significative les niveaux de phosphorylation d'eIF2 α empêche l'induction de la phase tardive de la LTP (section 6.2.2., et Figure 5, Costa-Mattioli *et al.*, 2007). De même, l'application de Sal003 empêche l'induction de la mémoire à long-terme lors d'une tâche de conditionnement par la peur (Figure 6, Costa-Mattioli *et al.*, 2007).

Afin de déterminer si les effets de Sal003 sur la LTP et la mémoire nécessitent la modulation du facteur ATF4, nous avons tiré avantage d'une autre lignée de souris mutantes, chez qui le facteur ATF4 est complètement absent (Souris *ATF4*^{-/-}, Masuoka et Townes, 2002). Ainsi, et contrairement à ce que nous avons précédemment décrit pour les souris sauvages, nous avons pu observer que chez les souris *ATF4*^{-/-}, l'application de Sal003 n'empêche pas l'induction de la phase tardive de la LTP après plusieurs trains de stimulation à haute fréquence. Il est donc fort plausible que les effets de Sal003 et de l'augmentation de la phosphorylation d'eIF2 α sur la LTP sont médiés majoritairement par l'augmentation de la traduction du facteur ATF4, un mécanisme qui est complètement absent chez les souris *ATF4*^{-/-}.

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent donc fortement que la modulation de la traduction d'ATF4, via la cascade GCN2/eIF2 α est nécessaire à la maintenance de la phase tardive de la LTP et de la LTM. D'autre part, ces résultats soulignent un rôle atypique pour un facteur d'initiation de la traduction. En effet, alors que le dogme habituel veut que l'activité des facteurs de transcription régule l'expression génique ainsi que la production d'ARNm, et conséquemment la traduction de nouvelles protéines, on constate que dans ce cas particulier, c'est un facteur de traduction qui régule la transcription. Plus précisément, c'est la phosphorylation et donc l'activité des facteurs de traduction GCN2 et eIF2 α qui permettent de moduler la traduction du facteur de transcription ATF4 (voir section 6.2.5.).

Ainsi, les résultats de nos deux études supportent clairement un rôle crucial pour la voie GCN2/eIF2 α et la formation du complexe ternaire pour la plasticité synaptique et la mémoire à long-terme (Costa-Mattioli *et al.*, 2005, 2007). Ce rôle est de type permissif et est médié par la régulation du facteur de transcription ATF4, tel que résumé dans notre modèle (Figure 7, Costa-Mattioli *et al.*, 2007). Brièvement, ce modèle peut se résumer ainsi : lorsque l'activité synaptique est de faible intensité, GCN2 et eIF2 α sont fortement phosphorylées et en conséquence, les niveaux d'ATF4 sont élevés et la transcription CREB-dépendante est inhibée. Le seuil d'induction de la phase tardive de la potentialisation à long-terme ou de la mémoire à long-terme est donc élevé. En revanche, lorsque l'activité synaptique est plus soutenue, comme lors de stimulations tétaniques ou de sessions d'entraînements répétés, la phosphorylation de GCN2 et d'eIF2 α est significativement diminuée. Conséquemment, les niveaux d'ATF4 chutent et la transcription CREB-dépendante est activée. Ces conditions favorisent à leur tour l'induction et le maintien de la phase tardive de la potentialisation à long-terme ou de la mémoire à long-terme.

La régulation de la phosphorylation du facteur d'initiation eIF2 α joue de ce fait un rôle clé dans la régulation de l'expression des gènes requis pour la stabilisation de la plasticité synaptique et de la mémoire à long-terme. Cependant, bien que nos études aient permis de bâtir un modèle cohérent intégrant à la fois la régulation de la traduction via eIF2 α et de la transcription via ATF4, elles ont également laissé plusieurs questions sans réponse. Les prochaines sections abordent maintenant certaines de ces interrogations et proposent quelques pistes qui pourraient être explorées dans le futur.

6.2.5. La voie eIF2 α , un rôle atypique pour un facteur de traduction

Tout d'abord, nos études ont souligné un rôle atypique pour le facteur de traduction eIF2 α . Le dogme classique veut en effet que ce soit la régulation de la transcription qui module les niveaux de traduction, et non l'inverse. Or, nos travaux ont clairement montré que l'activité synaptique régule la phosphorylation d'eIF2 α et que c'est cette modulation qui régule la traduction du facteur de transcription ATF4 (Costa-Mattioli *et al.*, 2005, 2007). Bien que cette cascade ait amplement été décrite dans d'autres

systèmes (voir Introduction, section 1.4.2.1.), nos études sont les premières à décrire une telle régulation dans un contexte de plasticité synaptique.

Parallèlement, il est intéressant de noter que plusieurs travaux récents ont décrit la présence de facteurs de transcription, et notamment la présence d'ATF4 dans les dendrites (Lai *et al.*, 2008; Vernon *et al.*, 2001). Il serait donc intéressant dans le futur d'explorer plus en détail la localisation du facteur ATF4 dans notre système, et de déterminer ainsi si la régulation de ce facteur via la voie GCN2/eIF2 α survient localement dans les dendrites, ou plus classiquement, au niveau du corps cellulaire.

6.2.6. Le chaînon manquant entre l'activité synaptique et la voie GCN2/eIF2 α

Tel que décrit plus haut (voir section 6.2.1. et 6.2.3.), la régulation de la phosphorylation de GCN2 est un événement crucial qui permet de réguler successivement la phosphorylation d'eIF2 α , la formation du complexe ternaire et les niveaux de traduction du facteur ATF4. Cependant, bien que nos travaux aient permis de démontrer que l'activité synaptique peut effectivement réguler la phosphorylation de GCN2 et la cascade susmentionnée, nous n'avons à ce jour que peu d'indices sur ce mécanisme et sur le lien qui existe entre ces deux événements (Costa-Mattioli *et al.*, 2009).

Une des possibilités serait que les changements synaptiques engendrés par l'activité, en d'autres termes, l'induction de la plasticité synaptique, provoque une augmentation de l'importation des acides aminés dans les neurones. Il convient de rappeler que GCN2 est classiquement phosphorylée par une privation en acides aminés du milieu et l'augmentation des niveaux d'ARNt non-chargés (voir Introduction, section 1.4.2.1.). On peut donc imaginer un modèle dans lequel l'importation des acides aminés au sein des neurones pourrait survenir en réponse à une augmentation de la synthèse protéique, elle-même activée en réponse aux besoins accrus des synapses lors d'une activité synaptique intense et soutenue. Ce déplacement d'acides aminés pourrait alors contribuer à inactiver et à déphosphoryler GCN2 au niveau synaptique, ce qui pourrait participer par la suite à la déphosphorylation d'eIF2 α et à la diminution des niveaux d'ATF4.

Alternativement, il est possible que l'activité synaptique augmente l'activité d'un inhibiteur de GCN2, comme la protéine IMPACT, qui est reconnue pour être enrichie au niveau du cerveau (Bittencourt *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2005), ou encore, d'une phosphatase d'eIF2 α , comme GADD34 (Brush, Weiser et Shenolikar, 2003; Proud *et al.*, 2005). Puisque l'activité synaptique et plus particulièrement l'entrée de calcium peut réguler l'activité de phosphatases telles que PP1/PP2A ou PP2B (aussi connue sous le nom de calcineurine) (Abraham et Tate, 1997), il n'est donc pas improbable que l'activité synaptique puisse aussi directement réguler GADD34. Il serait d'autre part assez facile de tester ces hypothèses à l'aide d'expériences de biochimie, et qui mesureraient par exemple les niveaux de phosphorylation d'IMPACT ou de GADD34 suite à un ou plusieurs trains de stimulation à haute fréquence, ou suite à l'application de forskoline.

6.2.7. La dissociation de la LTP et de la LTD chez les souris GCN2^{-/-}, une piste de réflexion pour les protéines spécifiquement induites par la plasticité

Une autre question qui a souvent été posée par les études sur la plasticité synaptique concerne l'identité des protéines requises pour le maintien des diverses formes de plasticité synaptique. Tel que décrit dans l'introduction (voir Introduction, sections 1.3.2.4.4. et 1.3.3.1.3.), la potentialisation à long-terme (LTP) et la dépression à long-terme (LTD) sont deux formes de plasticité synaptique régulant de façon opposée la force des connexions synaptiques. Cependant, ces deux formes nécessitent toutes deux la traduction de nouvelles protéines. Ainsi, il est raisonnable de se demander si la LTP et la LTD déclenchent la synthèse d'un réservoir commun de protéines ou si elles génèrent plutôt des ensembles de protéines restreints et distincts (voir Introduction, sections 1.3.2.4.4. et 1.3.3.1.3.). Il est en fait probable que ces deux formes de plasticité synaptique utilisent plutôt une combinaison de ces deux mécanismes : elles nécessiteraient donc la synthèse d'un réservoir protéique commun, mais auraient également besoin de protéines particulières pour répondre à leurs besoins spécifiques. Parmi les protéines ayant été proposées comme spécifiques à la LTP on peut notamment citer CaMKII et PKM ζ (Costa-Mattioli *et al.*, 2009; Osten *et al.*, 1996; Ouyang *et al.*,

1999). Pour leur part, MAP1B et Arc/Arg3.1. sont des protéines dont l'augmentation a été spécifiquement associée à la LTD (Costa-Mattioli *et al.*, 2009; Davidkova et Carroll, 2007; Rial Verde *et al.*, 2006). Cependant, aucune étude à ce jour n'a pu dresser de liste exhaustive des protéines nécessaires et suffisantes pour le maintien de la LTP et/ou de la LTD.

Or, les souris *GCN2*^{-/-} présentent un phénotype bien particulier : l'altération de la cascade GCN2/eIF2 α a en effet des conséquences spécifiques sur la LTP (Figure 1, Costa-Mattioli *et al.*, 2005, et Discussion, section 6.2.2.), tout en laissant la LTD complètement intacte (Figure S6, Costa-Mattioli *et al.*, 2005). Il est également intéressant de noter que bien que d'autres souches de souris, telles que les souris *4E-BP2*^{-/-}, présentent un phénotype similaire à celui des souris *GCN2*^{-/-} pour la LTP, les souris *GCN2*^{-/-} sont, à ce jour, les seules à présenter cette dissociation LTP/LTD (Banko *et al.*, 2006). Il est donc envisageable que la cascade GCN2/eIF2 α régule d'autres facteurs de transcription et/ou la synthèse de protéines particulières et spécifiquement requises pour les modifications synaptiques associées à la LTP. Il pourrait donc être intéressant de comparer les profils d'expression génétique des souris *GCN2*^{-/-} à ceux de souris sauvages, en effectuant par exemple une caractérisation génétique à large spectre à l'aide de puces à ADN (*micro-arrays*).

6.2.8. L'existence d'un double seuil pour l'activation de la transcription et de la traduction

D'autre part, il convient de mentionner que les souris *GCN2*^{-/-} présentent une autre particularité intrigante. Nous avons préalablement discuté de la facilitation de l'induction de la phase tardive de la LTP chez les souris *GCN2*^{-/-} (voir section 6.2.2.). En effet, l'application d'un unique train de stimulation à haute fréquence, un protocole qui génère classiquement une LTP temporaire (phase précoce de la LTP) chez des souris sauvages, permet chez les souris *GCN2*^{-/-} d'induire directement une LTP soutenue (phase tardive de la LTP) (Figure 1, Costa-Mattioli *et al.*, 2005). Cependant, l'application de plusieurs trains de stimulation à haute fréquence, un protocole qui génère pour sa part une LTP soutenue chez des souris sauvages, induit chez les souris *GCN2*^{-/-} une LTP qui n'est que temporaire (Figure 1, Costa-Mattioli *et al.*, 2005).

Ce phénotype est d'autre part reflété par ce que l'on peut observer au niveau du comportement des souris *GCN2^{-/-}* lors d'une tâche d'apprentissage moteur (Figure 4, Costa-Mattioli *et al.*, 2005), de sorte qu'un entraînement de faible intensité permet d'établir une mémoire plus durable de la tâche chez les souris *GCN2^{-/-}* que chez les souris sauvages. En revanche, un entraînement de plus forte intensité ne permet d'établir qu'une mémoire transitoire de la tâche chez les souris *GCN2^{-/-}*.

Dans cette optique, il convient de rappeler que plusieurs travaux, incluant les nôtres, ont documenté l'existence d'un seuil pour l'activation de l'expression génique par l'activité synaptique. Ainsi, selon ce modèle, l'activité aux synapses doit atteindre un certain seuil, en d'autres termes, être suffisamment intense et soutenue, pour pouvoir activer la transcription et déclencher toutes les cascades qui mèneront ultimement à la synthèse de nouvelles protéines requises pour le renforcement des synapses (Barco *et al.*, 2002; Costa-Mattioli *et al.*, 2005). Ce modèle propose également que des altérations de l'expression génique peuvent influencer, à la hausse ou à la baisse, le seuil d'induction de la plasticité. Par exemple, chez les souris VP16-CREB, chez lesquelles la transcription CREB-dépendante est constitutivement activée, (Barco *et al.*, 2002), le seuil pour l'activation de l'expression génique est diminué et, par conséquent, une activité synaptique modérée (un train unique de stimulation à haute fréquence) est suffisante pour induire la phase tardive de la LTP (voir sections 6.2.2. et 6.2.3.). À l'inverse, chez des souris présentant des mutations pour deux isoformes majeurs de CREB, les niveaux de transcription CREB-dépendante sont considérablement réduits et, par conséquent, même une activité soutenue (plusieurs trains de stimulation à haute fréquence) n'induit que la phase précoce de la LTP (Bourtchuladze *et al.*, 1994).

Cependant, nos travaux suggèrent également l'existence d'un second seuil, au-delà duquel l'activation de l'expression génique est non plus facilitée, mais plutôt inhibée par l'activité synaptique. Ainsi, chez les souris *GCN2^{-/-}*, chez lesquelles l'expression génique est facilitée par la diminution des niveaux d'ATF4 (Figure 2, Costa-Mattioli *et al.*, 2005), une activité synaptique intense (plusieurs trains de stimulation à haute fréquence) ne permet plus d'induire la phase tardive de la LTP et ne génère qu'une LTP transitoire (Figure 1, Costa-Mattioli *et al.*, 2005). En conséquence, il y aurait donc deux

seuils ou paliers, entre lesquels l'activité synaptique est optimale pour activer et permettre l'expression de protéines nécessaires à la plasticité. À l'extérieur de ces limites, l'activité synaptique est soit insuffisante, soit excessive, et ne permet donc pas l'activation de la transcription. Hormis les situations d'apprentissage ou d'exploration qui sont associées à une forte activité synaptique, on peut également imaginer certaines conditions pathologiques, comme les crises épileptiques, où une telle régulation serait avantageuse.

Néanmoins, il convient de rappeler que ces expériences ont été réalisées chez des souris mutantes, et que ces modèles expérimentaux peuvent être assujettis à plusieurs limitations. En effet, la mutation permanente d'un facteur aussi important que GCN2 pourrait mener à des compensations cellulaires au cours du développement, comme la régulation à la hausse d'une autre kinase d'eIF2 α . Bien que nous n'ayons pas observé de telles compensations (Costa-Mattioli *et al.*, données non publiées), nous avons tout de même développé un autre modèle, afin de déterminer si ce second seuil de régulation de l'expression génique pourrait être observé dans des conditions plus physiologiques, en ayant notamment recours à des agents pharmacologiques.

Pour ce faire, nous avons utilisé le rolipram, une drogue permettant d'inhiber spécifiquement la phosphodiesterase PD4E. Cette dernière agit en bloquant la conversion de l'AMPc en AMP et prolonge ainsi les effets de l'AMPc et de la PKA. Fait intéressant, il avait déjà été démontré que l'application de rolipram permettait de faciliter l'induction de la phase tardive de la LTP, de façon comparable à ce que nous pouvons observer chez les souris *GCN2*^{-/-} (Barad *et al.*, 1998; Navakkode, Sajikumar et Frey, 2004). Cependant, aucune de ces études ne s'était attardée aux effets conjoints du rolipram et d'une activité synaptique plus intense, comme plusieurs trains de stimulation à haute fréquence (un protocole qui est, rappelons-le, reconnu pour induire la phase tardive de la LTP dans des conditions dites normales).

Nos résultats ont ainsi complété ces études et confirmé que l'application d'un unique train de stimulation à haute fréquence en présence de rolipram pouvait induire une potentialisation stable et durable, qui ressemble à la phase tardive de la LTP. De plus, nos expériences ont montré que l'application de plusieurs trains de stimulation à haute

fréquence en présence de rolipram n'induisait qu'une potentialisation transitoire, qui ressemble à la phase précoce de la LTP (Figure 14 et Gobert et Lacaille, données non-publiées). Ces résultats reflètent donc de façon intéressante ce que nous avons pu observer chez les souris *GCN2*^{-/-} (Figure 1, Costa-Mattioli *et al.*, 2005). Il serait également intéressant de compléter ces expériences d'électrophysiologie par des expériences de biochimie, afin d'évaluer les niveaux de phosphorylation de CREB et/ou d'ATF4 suite à un ou plusieurs trains de stimulation à haute fréquence, en présence ou non de rolipram. Ces données pourraient nous donner plus d'indices sur le deuxième seuil de régulation de l'expression génique, et constituer de plus une voie de recherche intéressante.

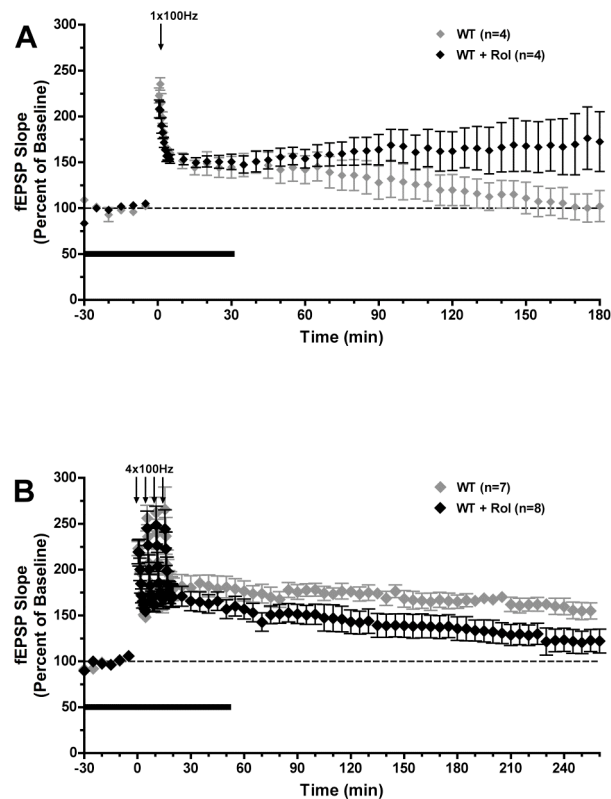


Figure 14 : Effet du rolipram sur la potentialisation à long-terme

(A) L'application d'un unique train de stimulation à haute fréquence (1x100Hz) induit classiquement la phase précoce de la LTP (WT). En revanche, l'application d'un train de stimulation en présence de rolipram (WT + Rol) permet d'établir directement une LTP qui ressemble à la phase tardive de la LTP. (B) L'application de plusieurs trains de stimulation à haute fréquence induit classiquement la phase tardive de la LTP (WT). Cependant, l'application conjointe de plusieurs trains de stimulation et de rolipram génère une LTP transitoire, qui ressemble à la phase précoce de la LTP (WT + Rol).

6.2.9. Les autres kinases d'eIF2 α et leurs rôles dans les neurones

En fin de compte, il convient de discuter brièvement des autres kinases d'eIF2 α et de leurs rôles éventuels dans le système nerveux central. Tel que décrit dans l'introduction, eIF2 α peut être phosphorylée par 4 kinases différentes : GCN2, HRI, PERK et PKR (voir Introduction, section 1.4.2.2.). Alors que GCN2 est spécifiquement enrichie au niveau du cerveau et tout particulièrement de l'hippocampe (Berlanga, Santoyo et de Haro, 1999; Costa-Mattioli *et al.*, 2005; Sood *et al.*, 2000), les autres kinases d'eIF2 α ne sont présentes qu'à de faibles niveaux dans les neurones (Berlanga, Herrero et de Haro, 1998; Chen et London, 1995; de Haro, Méndez et Santoyo, 1996; Shi *et al.*, 1999). Néanmoins, et bien que nos études soient les seules à suggérer un rôle physiologique pour la phosphorylation d'eIF2 α dans les neurones, plusieurs rôles ont été décrits pour PKR et PERK dans les cellules nerveuses dans des conditions pathologiques.

Ainsi, dans des conditions d'ischémie/reperfusion, PERK est la seule kinase d'eIF2 α à être activée (DeGracia *et al.*, 1999; DeGracia et Montie, 2004; Kumar *et al.*, 2001; Paschen, 2003). Dans ce cas particulier, il a été proposé que l'ischémie, et plus particulièrement le faible apport en énergie aux cellules, cause un stress du réticulum endoplasmique (*ER stress*), ce qui génère une accumulation dans cette structure de protéines mal repliées (ou protéines adoptant une structure tridimensionnelle erronée). Cette accumulation de protéines est à son tour responsable de l'activation de PERK, et de la phosphorylation d'eIF2 α , événements favorisant tous deux une inhibition globale de la synthèse protéique. Il semble que cet arrêt de la traduction puisse non seulement prévenir l'accumulation de protéines mal repliées et pouvant causer l'accumulation de dépôts toxiques dans des neurones, mais aussi empêcher la synthèse de protéines pro-apoptotiques qui mèneraient à l'autodestruction de la cellule nerveuse. Ces travaux ont donc suggéré que PERK pourrait jouer un rôle protecteur pour les neurones dans des conditions ischémiques. Cependant, la récupération d'une telle situation nécessite également l'activation de la transcription et la synthèse de protéines permettant aux cellules de survivre au stress du réticulum endoplasmique. Ainsi, il est probable que l'inhibition de la synthèse protéique observée suite à une ischémie transitoire ne soit pas le seul événement permettant de déterminer le sort de la cellule, que ce soit la survie ou l'apoptose (Kumar *et al.*, 2001; Paschen, 2003).

D'autre part, plusieurs études récentes ont impliqué la modulation de PKR dans plusieurs maladies neurodégénératives, notamment la sclérose amyotrophique latérale et la maladie d'Alzheimer (Peel, 2004). En effet, les patients souffrant de la sclérose amyotrophique latérale présentent des niveaux très élevés de PKR au niveau de la moelle épinière (Hu *et al.*, 2003; Peel, 2004). De même, il a également été démontré que chez des patients souffrant de la maladie d'Alzheimer, les niveaux de phosphorylation de PKR et d'eIF2 α sont grandement augmentés au niveau du cerveau (Chang *et al.*, 2002a, 2002b; Peel, 2004). Par la suite, d'autres travaux ont suggéré que l'accumulation du peptide amyloïde β , un des composants essentiels des plaques séniles, active la voie des caspases et plus particulièrement les caspases 3 et 8. L'activation des caspases peut à son tour phosphoryler PKR et eIF2 α , ce qui induit une inhibition globale de la traduction (Suen *et al.*, 2003; Peel, 2004). Le rôle d'un tel blocage de la synthèse protéique dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer reste cependant à déterminer.

Ainsi, ces divers travaux ont suggéré plusieurs rôles pour les autres kinases d'eIF2 α au niveau du système nerveux. Cependant, aucune étude à ce jour ne s'est intéressée au rôle de PERK ou de PKR dans les mécanismes de la plasticité synaptique et de la mémoire. Il serait toutefois possible que GCN2 soit la seule kinase d'eIF2 α activée lors de la plasticité synaptique, à l'instar de PERK qui est la seule kinase d'eIF2 α activée lors de l'ischémie (DeGracia *et al.*, 1999; DeGracia et Montie, 2004; Kumar *et al.*, 2001; Paschen, 2003). Néanmoins, tel que mentionné ci-dessus, la kinase PKR joue probablement un rôle important dans le développement de la maladie d'Alzheimer. Or, il convient de rappeler que l'une des premières caractéristiques de cette maladie neurodégénérative est une perte de mémoire marquée. Ceci suggère donc un autre lien entre l'activation d'une kinase d'eIF2 α et un processus mnésique. Par conséquent, il serait probablement intéressant d'étudier la régulation de PKR au cours de l'induction de la plasticité synaptique et de la mémoire. De telles études permettraient sans doute de mieux comprendre les relations entre la phosphorylation d'eIF2 α , la plasticité synaptique, la mémoire et la maladie d'Alzheimer.

6.3. L'IMPORTANCE DE LA VOIE mTOR ET DE LA TRADUCTION DES ARNm 5'TOP POUR LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE

Nos études se sont ensuite tournées vers la deuxième étape clé de l'initiation de la traduction, et plus précisément, vers la voie mTOR. Alors que la voie eIF2 α est responsable de la formation du complexe ternaire, la voie mTOR, elle, est responsable de la régulation de la liaison du complexe pré-initiateur 43S au codon d'initiation et de la formation du complexe 48S, un complexe nécessitant la liaison de plusieurs facteurs d'initiation dont eIF4E et eIF4G (voir Introduction, section 1.4.3.). Plus particulièrement, mTOR est responsable de la phosphorylation des protéines 4E-BP, des kinases S6K et de la traduction spécifique des ARNm 5'TOP. D'autre part, il a été démontré que la phase tardive de la LTP est sélectivement bloquée par la rapamycine, un inhibiteur de la kinase mTOR (Cammalleri *et al.*, 2003; Casadio *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2002). Cependant, tel que décrit ci-dessus, mTOR possédant plusieurs cibles, il est difficile d'attribuer un rôle prépondérant à l'une de ces cibles pour la maintenance de la phase tardive de la LTP. Récemment, quelques travaux se sont intéressés au rôle particulier des protéines 4E-BP2 (Banko *et al.*, 2005) ou des kinases S6K (Antion *et al.*, 2008a) durant la phase tardive de la LTP. Cependant, à ce jour, très peu d'études se sont concentrées sur la régulation particulière des ARNm 5'TOP au cours de la LTP. Les prochaines sections reviennent donc sur les principaux résultats de notre étude (Gobert *et al.*, 2008) et suggèrent quelques pistes qu'il pourrait être intéressant d'explorer dans un futur proche.

6.3.1. L'activité synaptique module la voie mTOR et la traduction des ARNm 5'TOP

Les ARNm 5'TOP constituent une famille d'ARN messagers particuliers, puisqu'ils codent pour plusieurs facteurs d'élongation et la plupart des protéines ribosomales. Leur traduction spécifique permet ainsi de réguler précisément la capacité de synthèse protéique en fonction de l'état de la cellule. À ce jour, plusieurs travaux ont noté que l'induction de la phase tardive de la LTP pouvait moduler l'activation de la voie mTOR (Cammalleri *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2002) et augmenter la traduction de certains ARNm 5'TOP tels qu'eEF1 α , eEF2, S6 et PABP (Liao *et al.*, 2007; Tsokas *et al.*, 2005,

2007). Cependant, aucune étude à ce jour n'a montré que cette hausse était spécifique à la famille des ARNm 5'TOP. Il se pourrait en effet que l'induction de la phase tardive de la LTP engendre une augmentation globale de la synthèse protéique plutôt qu'une hausse sélective de la traduction de certaines protéines.

Afin de répondre à cette question, nous avons donc construit des rapporteurs fluorescents qui nous ont permis de mesurer spécifiquement la traduction des ARNm 5'TOP et celle des ARNm non-5'TOP (Figures 3, 4 et 5, Gobert *et al.*, 2008). Dans notre système, nous nous sommes servi de la forskoline, un activateur spécifique de la production d'AMPC et de la PKA (voir Introduction, section 1.3.2.3.1.) pour mimer l'activité synaptique. Dans ces conditions, nous avons pu observer une augmentation de la phosphorylation de plusieurs composants de la voie mTOR tels que S6K et S6, une augmentation qui est de plus sensible à l'application de rapamycine (Figures 2 et 6, Gobert *et al.*, 2008). D'autre part, l'activation de la voie PKA augmente également la traduction des ARNm 5'TOP dans notre système, tel que le démontre l'augmentation de la fluorescence du rapporteur 5'TOP suite à l'application de forskoline (Figures 4 et 5, Gobert *et al.*, 2008). Ainsi, ces résultats corroborent non seulement ce qui avait été observé précédemment (Liao *et al.*, 2007; Tsokas *et al.*, 2005, 2007) mais soulignent également l'interaction entre la voie PKA et la voie mTOR. En d'autres termes, ces résultats sont les premiers à démontrer un lien entre l'activité synaptique, l'activation de la voie PKA, l'activation de la voie mTOR et la traduction des ARNm 5'TOP.

6.3.2. La modulation de la traduction des ARNm 5'TOP via la voie mTOR est spécifique

Tel que nous venons de le mentionner, l'activation de la voie PKA augmente la fluorescence du rapporteur 5'TOP et donc la traduction des ARNm 5'TOP. Il convient cependant de préciser que cet effet est également observable pour le rapporteur 5'non-TOP. Il apparaît donc que l'activation de la voie PKA augmente à la fois la fluorescence des rapporteurs 5'TOP et 5'non-TOP, ce qui suggère une augmentation globale de la traduction au niveau du corps cellulaire (Figure 4, Gobert *et al.*, 2008). Néanmoins, il est important de souligner que l'application de rapamycine inhibe sélectivement la traduction du rapporteur possédant la séquence 5'TOP, ce qui suggère que la modulation

de la traduction via la voie mTOR est spécifique à la classe des ARN messagers possédant la séquence 5'TOP. En d'autres termes, bien que l'activation de la voie PKA puisse influencer la traduction en général, la modulation de la voie mTOR semble, elle, influencer spécifiquement la traduction des ARNm 5'TOP. Il convient de rappeler que de par son effet sur les protéines 4E-BP, et indirectement, sur l'association du facteur eIF4E avec eIF4G (voir Introduction, section 1.4.3.) la kinase mTOR est également une kinase clé pour la régulation de la traduction globale.

6.3.3. La modulation de la traduction des ARNm 5'TOP via la voie mTOR survient dans le compartiment dendritique

Par la suite, nous avons examiné la traduction des ARNm 5'TOP dans les dendrites, en ajoutant à nos rapporteurs une séquence de localisation dendritique. Ainsi, nous avons établi que l'activation de la voie PKA augmente également la fluorescence du rapporteur 5'TOP, et donc la traduction des ARNm 5'TOP, via la voie mTOR au niveau des dendrites (Figure 5, Gobert *et al.*, 2008). D'autre part, et contrairement à ce que l'on peut observer au niveau du corps cellulaire, l'activation de la voie PKA n'augmente pas la fluorescence du rapporteur 5'non-TOP dans les dendrites. Ces résultats suggèrent donc que l'augmentation de la traduction dans les dendrites est spécifique à la classe des ARN messagers possédant la séquence 5'TOP. En d'autres termes, les protéines codant pour la machinerie traductionnelle (facteurs d'élongation et protéines ribosomales) sont spécifiquement régulées à la hausse par l'activité synaptique et l'activation de la voie PKA dans les dendrites.

Il convient de mentionner que d'autres études ont aussi récemment souligné l'augmentation des ARNm 5'TOP au niveau dendritique suite à l'application de divers stimuli pouvant mimer l'induction de la LTP (Liao *et al.*, 2007; Tsokas *et al.*, 2005, 2007) et le rôle probable que pourrait avoir une telle hausse. Notre étude est néanmoins la première à démontrer que cette augmentation (1) survient dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe, (2) est spécifique aux ARNm 5'TOP et (3) est médiée par la voie mTOR. Cependant, bien que plusieurs travaux aient suggéré que l'augmentation de la capacité de traduction aux synapses pourrait être importante pour le maintien de la phase tardive de la LTP, aucune étude n'a pu à ce jour démontrer que cette augmentation

de la traduction était nécessaire, ni le rôle précis que pourrait jouer la traduction spécifique des ARNm 5'TOP. Dans cette optique, les prochaines sections expliquent quelques-unes des raisons qui ont freiné la réponse à ces questions et proposent également quelques pistes qui pourraient être explorées dans le futur.

6.3.4. Le chaînon manquant entre l'activation de mTOR et la traduction des ARNm 5'TOP

Tout d'abord, il convient de noter que la démonstration de ce lien de cause à effet est grandement freinée par le peu d'informations que nous possédons à ce jour sur la régulation de la traduction des ARNm 5'TOP. Plusieurs études se sont intéressées aux liens existant entre l'activité synaptique et l'activation de mTOR et ont ainsi permis de décrire une cascade liant la production de BDNF, l'activation de ERK et d'Akt/PKB, et ultimement, l'activation de mTOR (Kelleher *et al.*, 2004; Liao *et al.*, 2007; Schratt *et al.*, 2004; Tsokas *et al.*, 2007). Notre étude vient compléter ce schéma en ajoutant un lien entre la production d'AMPc et l'activation de ERK, ainsi qu'un second lien entre la production d'AMPc et la production de BDNF et l'activation d'Akt/PKB (Figure 7, Gobert *et al.*, 2008).

Toutefois, peu d'études à ce jour se sont penchées sur la cascade reliant mTOR à la synthèse des ARNm 5'TOP. Initialement, plusieurs travaux avaient rapporté que l'activation de mTOR augmentait la phosphorylation de S6K et de S6 et que ceci était corrélé de façon positive avec une augmentation de la traduction des ARNm 5'TOP (Meyuhas, 2000; Meyuhas et Hornstein, 2000). Par la suite cependant, d'autres études ont suggéré l'existence d'une autre voie, reliant directement l'activation de mTOR et la traduction des ARNm 5'TOP, et indépendamment de la phosphorylation de S6K et de S6 (voir Introduction, section 1.4.3.3.; Pende *et al.*, 2004; Ruvinsky *et al.*, 2005). Parallèlement, d'autres travaux ont montré que la kinase mTOR peut former deux complexes distincts. Le premier, nommé mTORC1, résulte de l'association de mTOR avec la protéine adaptatrice Raptor, est sensible à la rapamycine et régule la phosphorylation des protéines 4E-BP et S6K, ainsi que la traduction des ARNm 5'TOP (Costa-Mattioli *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2002). Le second, nommé mTORC2, résulte de l'association de mTOR avec la protéine adaptatrice Rictor, est insensible à la

rapamycine et régule plutôt la phosphorylation d'Akt/PKB et de plusieurs isoformes de PKC (Costa-Mattioli *et al.*, 2009; Sarbassov *et al.*, 2004). Selon ce modèle, le complexe mTORC1 ainsi que la protéine adaptatrice Raptor joueraient donc un rôle prépondérant dans la régulation de la traduction des ARNm 5'TOP. Cependant, ce modèle a récemment été remis en question par une nouvelle étude qui a démontré que l'élimination génétique de Raptor ou de Rictor n'affectait pas la capacité de mTOR à réguler la traduction des ARNm 5'TOP (Costa-Mattioli *et al.*, 2009; Patursky-Polischuk *et al.*, 2009). Ces résultats suggèrent donc fortement l'existence d'un autre complexe mTOR et/ou d'une autre voie en aval de mTOR pouvant réguler la traduction des ARNm 5'TOP (Costa-Mattioli *et al.*, 2009). Ces résultats soulignent également la nécessité de mieux comprendre la signalisation couplant mTOR à la traduction des ARNm 5'TOP, afin de pouvoir spécifiquement moduler ce mécanisme et en inférer son importance pour le maintien de la phase tardive de la LTP.

Dans un même ordre d'idée, il a été suggéré que la traduction des ARNm 5'TOP dépendrait de la présence d'un répresseur spécifique à cette famille d'ARN messagers (Biberman et Meyuhas, 1999; Loreni et Amaldi, 1997). Cependant, aucune étude à ce jour n'a été en mesure d'identifier un répresseur capable de moduler la traduction de cette famille d'ARN messagers en fonction du statut de la cellule. Plus récemment, il a été suggéré que l'augmentation de la traduction des ARNm 5'TOP dépendrait plutôt de la présence d'un activateur, le microARN-10a (Ørom, Nielsen et Lund, 2008). Selon cette étude, la présence du microARN-10a augmente la traduction des ARNm 5'TOP et cet effet est de plus sensible à la rapamycine, ce qui suggère une régulation via mTOR. Il se pourrait donc que le microARN-10a compétitionne avec un répresseur pour la liaison à la séquence 5'TOP, et qu'une hausse du niveau du microARN-10a favorise ainsi la traduction des ARNm 5'TOP. Parallèlement, il a également été montré que le niveau de micros ARN au niveau de l'hippocampe pouvaient varier avec l'induction de la plasticité, que ce soit la LTP ou la LTD (Park et Tang, 2008). On peut dès lors imaginer un modèle dans lequel l'activité synaptique module la cascade mTOR et le niveau d'un ou plusieurs micros ARN, qui pourraient par la suite influencer à leur tour la traduction des ARNm 5'TOP et donc la synthèse de la machinerie traductionnelle. Ceci reste cependant à démontrer, mais constituerait sans aucun doute une voie de recherche intéressante pour l'implication et la régulation des ARNm 5'TOP durant la LTP. On

peut donc dès lors imaginer toute une série d'expériences visant à analyser les variations du microARN-10a au niveau de l'hippocampe suite à différents protocoles pouvant mimer la LTP, ou encore, d'autres expériences permettant de déterminer si la présence du microARN-10a permet ou non de moduler la synthèse des rapporteurs fluorescents dont nous nous sommes servis auparavant.

6.3.5. La régulation de la traduction des ARNm 5'TOP durant la LTD

D'autre part, il serait également intéressant d'étudier plus en détails la régulation de la traduction des ARNm 5'TOP au cours de la phase tardive de la LTD. En effet, bien que certains travaux aient déjà décrit l'implication de la voie mTOR dans la LTD (Hou et Klann, 2004) ainsi que des corrélations positives entre la phase tardive de la LTD et l'augmentation de la phosphorylation et/ou de la traduction de certains ARNm 5'TOP (par exemple, S6 et eEF1 α , Antion *et al.*, 2008b; Huang, Chotiner et Steward, 2005), aucune étude d'envergure n'a été entreprise pour le moment. À ce jour, on ne sait donc toujours pas si cette augmentation de la traduction durant la LTD est générale ou spécifique aux ARNm 5'TOP, ni si elle survient globalement ou plus localement dans les dendrites. On pourrait donc envisager une autre série d'expériences qui tirerait avantage des rapporteurs fluorescents que nous avons construit (Gobert *et al.*, 2008) et examiner ainsi la régulation des ARNm 5'TOP au cours de la LTD.

De plus, il convient de rappeler que la LTP et la LTD nécessitent toutes deux la synthèse de nouvelles protéines pour leur maintien à long-terme. Cependant, nous en savons très peu sur l'identité et sur la spécificité des protéines requises (voir Introduction, sections 1.3.2.4.4. et 1.3.3.1.3.). Il semblerait que ces deux formes de plasticité requièrent à la fois la synthèse de protéines communes, telles que l'on suggéré les expériences de marquage synaptique croisé (*cross-tagging*, Sajikumar et Frey, 2004a), et de protéines spécifiques à la LTP et/ou la LTD (voir Introduction, sections 1.3.2.4.4. et 1.3.3.1.3.). Il serait donc intéressant de déterminer si l'augmentation de la traduction des ARNm 5'TOP représente un mécanisme propre à la LTP ou commun à la LTP et à la LTD. Alternativement, il se pourrait que la synthèse des ARNm 5'TOP ait plutôt un rôle à jouer pour le marquage des synapses activées. Il a en effet été proposé que l'augmentation de la capacité de synthèse locale pourrait remplir le rôle du marqueur

synaptique (Barco, Lopez de Armentia et Alarcon, 2008). La prochaine section traite donc maintenant plus en détail du marquage synaptique et de la possible implication de la traduction des ARNm 5'TOP dans ce mécanisme.

6.3.6. La participation des ARNm 5'TOP au marquage synaptique?

Tel que décrit dans l'introduction, le marquage synaptique est un processus qui permettrait à toutes les synapses activées de « capturer » les ARNm ou les protéines nouvellement synthétisées et nécessaires au maintien à long-terme des changements synaptiques (voir Introduction, section 1.3.2.4.4.1.). Cependant, bien que de nombreuses études sur le marquage synaptique aient été effectuées à ce jour, l'identité du ou des possibles marqueurs synaptiques demeure encore inconnue. La plupart des auteurs s'entendent néanmoins sur les caractéristiques que doit avoir un tel marqueur : (1) il doit être local, et idéalement, restreint à une seule synapse; (2) il doit être transitoire; (3) il doit pouvoir interagir avec les ARNm ou les protéines nouvellement synthétisés (Barco, Lopez de Armentia et Alarcon, 2008; Martin et Kosik, 2002).

Suite aux travaux initiaux de Frey et Morris (Frey et Morris, 1997, 1998a), plusieurs études se sont intéressées aux phénomènes du marquage et de la capture synaptiques chez l'aplysie, et ont mené au développement d'un système de culture particulier, comprenant un unique neurone sensoriel bifurqué et deux neurones moteurs, ce qui a permis d'étudier le marquage synaptique dans une forme simplifiée. Ces travaux ont ainsi établi que le marqueur synaptique possède probablement plusieurs composantes (Casadio *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 1997b; Martin, 2002) :

- (1) Une composante PKA-dépendante, nécessaire pour la capture initiale et la croissance de nouvelles connexions synaptiques.
- (2) Une composante sensible à la rapamycine et dépendant de la synthèse locale de nouvelles protéines, requise pour la stabilisation à long-terme des nouvelles connexions synaptiques.

En d'autres termes, ce modèle reconnaît que l'activité synaptique peut avoir plusieurs effets :

- (1) L'activité synaptique de faible intensité, telle qu'une seule application de sérotonine ou 5-HT (l'équivalent d'un unique train de stimulation à haute fréquence chez les vertébrés), induit une facilitation transitoire des réponses enregistrées, mais permet également de marquer les synapses activées à l'aide d'un marqueur dépendant de l'activité de PKA (Casadio *et al.*, 1999).
- (2) L'activité synaptique de forte intensité, telle que 5 applications répétées de 5-HT (l'équivalent de 4 trains de stimulation à haute fréquence chez les vertébrés), induit une facilitation prolongée des réponses enregistrées. À l'instar de l'activité de faible intensité, l'activité soutenue permet le marquage des synapses activées, mais elle permet surtout la création d'un signal rétrograde capable d'activer la transcription CREB-dépendante au niveau du noyau. Il semble de plus que la genèse de ce signal rétrograde nécessite la synthèse locale de nouvelles protéines (Martin *et al.*, 1997b).
- (3) De plus, l'activité synaptique, qu'elle soit de faible ou de forte intensité, génère également un second marqueur sensible à la rapamycine, et qui favorise la capture et la stabilisation à long-terme des changements structuraux (Casadio *et al.*, 1999). Bien que la capture synaptique ait initialement été décrite comme étant indépendante de la synthèse de nouvelles protéines (Frey et Morris, 1997; Martin *et al.*, 1997b), il a par la suite été démontré que la capture à plus long terme (dans ce cas-ci, 72h vs. 24h dans l'étude initiale de Martin *et al.*, 1997) nécessitait quant à elle la traduction locale dépendant de mTOR (Casadio *et al.*, 1999).

Par la suite, différents groupes se sont penchés sur la nature du marqueur synaptique et de nombreuses hypothèses ont été émises. Les candidats à ce rôle de marqueur synaptique qui ont reçu le plus d'attention au cours des dernières années sont sans doute les protéines kinases et plus particulièrement PKA (Barco, Alarcon et Kandel, 2002; Casadio *et al.*, 1999; Navakkode, Sajikumar et Frey, 2004; Young *et al.*, 2006), CaMKII (Sajikumar, Navakkode et Frey, 2007) et PKM ζ (Sajikumar *et al.*, 2005) pour la LTP, ainsi que MAPK (Sajikumar, Navakkode et Frey, 2007) pour la LTD. Il est intéressant de souligner que les voies PKA et mTOR ont toutes deux été largement impliquées dans le mécanisme du marquage synaptique (Casadio *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 1997b).

Néanmoins, il semble que le phénomène de marquage synaptique implique plusieurs composantes, et de plus, les protéines kinases ne sont pas les seules à respecter les trois

critères d'un marqueur synaptique. En effet, il se pourrait qu'un événement en aval de l'activation de la voie PKA et de la voie mTOR remplisse le rôle du marqueur synaptique. Plus précisément, il se pourrait que l'augmentation locale de la capacité de traduction, via la synthèse des ARNm 5'TOP puisse tenir lieu de second marqueur synaptique, celui permettant de stabiliser les changements structuraux à plus long terme (Barco, Lopez de Armentia et Alarcon, 2008; Casadio *et al.*, 1999; Costa-Mattioli *et al.*, 2009). En effet, l'augmentation de la capacité à synthétiser des protéines localement répond aux trois critères du marquage synaptique, en plus de permettre une réconciliation entre l'activation de la transcription, la synthèse de nouveaux ARNm au niveau du corps cellulaire et la modification spécifique des synapses activées.

Il convient de rappeler que plusieurs expériences ont montré que la traduction pouvait survenir très localement dans les dendrites durant la LTP (Aakalu *et al.*, 2001; Feig et Lipton, 1993; Ostroff *et al.*, 2002; Sutton et Schuman, 2005, 2006). Par ailleurs, certains travaux ont également prouvé qu'une activité de faible intensité et n'induisant qu'une facilitation transitoire était néanmoins suffisante pour augmenter la traduction locale dans les dendrites (Casadio *et al.*, 1999; Si *et al.*, 2003). Il se pourrait donc que l'augmentation de la synthèse des ARNm 5'TOP et conséquemment, de la capacité traductionnelle, puisse jouer un rôle dans le second marquage synaptique, celui qui permet de stabiliser durablement les changements structuraux.

Ainsi, l'étude de la possible implication des ARNm 5'TOP dans le marquage synaptique serait sans doute des plus enrichissantes. En effet, même si plusieurs expériences, et tout particulièrement la nôtre, ont suggéré que la régulation des ARNm 5'TOP pouvait survenir localement dans les dendrites et dépendait de l'activation de la voie mTOR (Gobert *et al.*, 2008; Liao *et al.*, 2007; Tsokas *et al.*, 2005, 2007), aucune étude à ce jour n'a démontré l'implication des ARNm 5'TOP dans le marquage synaptique. Une telle démonstration nécessitera cependant une meilleure compréhension des liens entre mTOR et la traduction spécifique des ARNm 5'TOP, tel que décrit précédemment (voir Discussion, section 6.3.4.). Il a néanmoins été récemment suggéré que la voie mTOR jouerait un rôle dans le marquage synaptique chez les vertébrés, tel qu'observé précédemment chez l'aplysie (Tsokas *et al.*, données non-publiées).

6.4. L'IMPORTANCE DE LA TRANSCRIPTION ET DE LA TRADUCTION POUR LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE : UN MODÈLE INTÉGRÉ

Dans l'ensemble, nos études ont donc permis d'explorer plus en détail deux voies majeures pour la régulation de la traduction lors de la plasticité synaptique à long-terme au niveau de l'hippocampe. Nos travaux ont notamment souligné l'importance de la voie GCN2/eIF2 α pour la régulation de la transcription et notamment le facteur ATF4 (Costa-Mattioli *et al.*, 2005, 2007), ainsi que l'importance de la voie mTOR pour la modulation de la traduction des ARNm 5'TOP et la synthèse de la machinerie traductionnelle (Gobert *et al.*, 2008). Il est cependant important de souligner que la régulation de ces deux voies n'est probablement pas mutuellement exclusive mais plutôt complémentaire, et qu'il est donc fort probable que la régulation de chacune de ces deux voies n'ait pas la même finalité et/ou ne soit pas requise pour les mêmes phases de la LTP. On peut donc dès lors envisager un modèle selon lequel l'activité synaptique pourrait influencer simultanément la traduction à différents niveaux, via différentes voies de signalisation, à des fins particulières. D'autre part, les expériences sur le marquage et la capture synaptiques ont fortement suggéré que la traduction pourrait jouer divers rôles, que ce soit pour la synthèse locale du signal rétrograde permettant d'activer la transcription ou que ce soit pour la synthèse locale des protéines permettant de renforcer durablement les synapses activées (Casadio *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 1997b).

Dans cette optique, nous proposons ici un modèle intégré, selon lequel l'activité synaptique pourrait réguler la traduction à différents niveaux via des voies distinctes (Figure 15). Selon ce modèle, nous pouvons énoncer les règles suivantes :

- (1) La cascade GCN2/eIF2 α est importante pour l'activation de la transcription au niveau du noyau. Tel que nous l'avons démontré auparavant, l'activation de cette cascade nécessite une activité de forte intensité, comme plusieurs trains de stimulation à haute fréquence, ce qui assure probablement que la transcription est activée uniquement lorsque l'activité synaptique dépasse un certain seuil. L'activité

soutenue permet ainsi d'induire une déphosphorylation de GCN2 et d'eIF2 α , ce qui inhibe la traduction du facteur de transcription ATF4. Ceci a pour effet de favoriser la transcription CREB-dépendante et permet la synthèse des ARNm et/ou des protéines requises pour la consolidation synaptique à long-terme (Costa-Mattioli *et al.*, 2005, 2007).

- (2) La cascade mTOR est importante pour la régulation locale des ARNm 5'TOP et la capacité traductionnelle au niveau des synapses activées. Une fois activée, mTOR permet une augmentation de la traduction spécifique des ARNm 5'TOP, ce qui augmente la capacité traductionnelle des synapses activées. Ceci pourrait ainsi favoriser le marquage à long-terme de ces mêmes synapses et permettre la capture et la traduction des ARNm nouvellement synthétisés uniquement au niveau des synapses activées (Gobert *et al.*, 2008).

D'autre part, selon le rôle suggéré des ARNm 5'TOP pour le marquage synaptique et bien que ceci reste à démontrer, nous proposons que l'activité synaptique de faible intensité, comme un unique train de stimulation à haute fréquence, est suffisante pour activer cette cascade et la traduction locale des ARNm 5'TOP, à l'instar de ce que l'on peut observer chez l'aplysie (Casadio *et al.*, 1999; Si *et al.*, 2003). Nous possédons de plus quelques indices qui nous permettent de penser que ce serait effectivement le cas. Tout d'abord, il a précédemment été démontré qu'un seul train de stimulation à haute fréquence était suffisant pour activer la cascade mTOR et plus particulièrement la phosphorylation de 4E-BP2, une protéine en aval de mTOR (Banko *et al.*, 2005). D'autre part, il a été rapporté que la synthèse de plusieurs ARNm 5'TOP pouvait survenir rapidement, après l'induction de la LTP et que ces changements pouvaient être détectés dès 5 minutes (Tsokas *et al.*, 2005). Même si cette même étude n'avait pas noté de changements après un seul train de stimulation et avait suggéré que plusieurs trains étaient requis pour la traduction spécifique des ARNm 5'TOP, il se pourrait que ces variations aient été présentes mais subtiles, et donc en dessous du seuil de détection de la méthode employée (le transfert par immunobuvardage ou *Western Blot*). Dans tous les cas, il serait probablement intéressant d'explorer plus en détails la régulation de la traduction des ARNm 5'TOP lors de différents patrons d'activité synaptique.

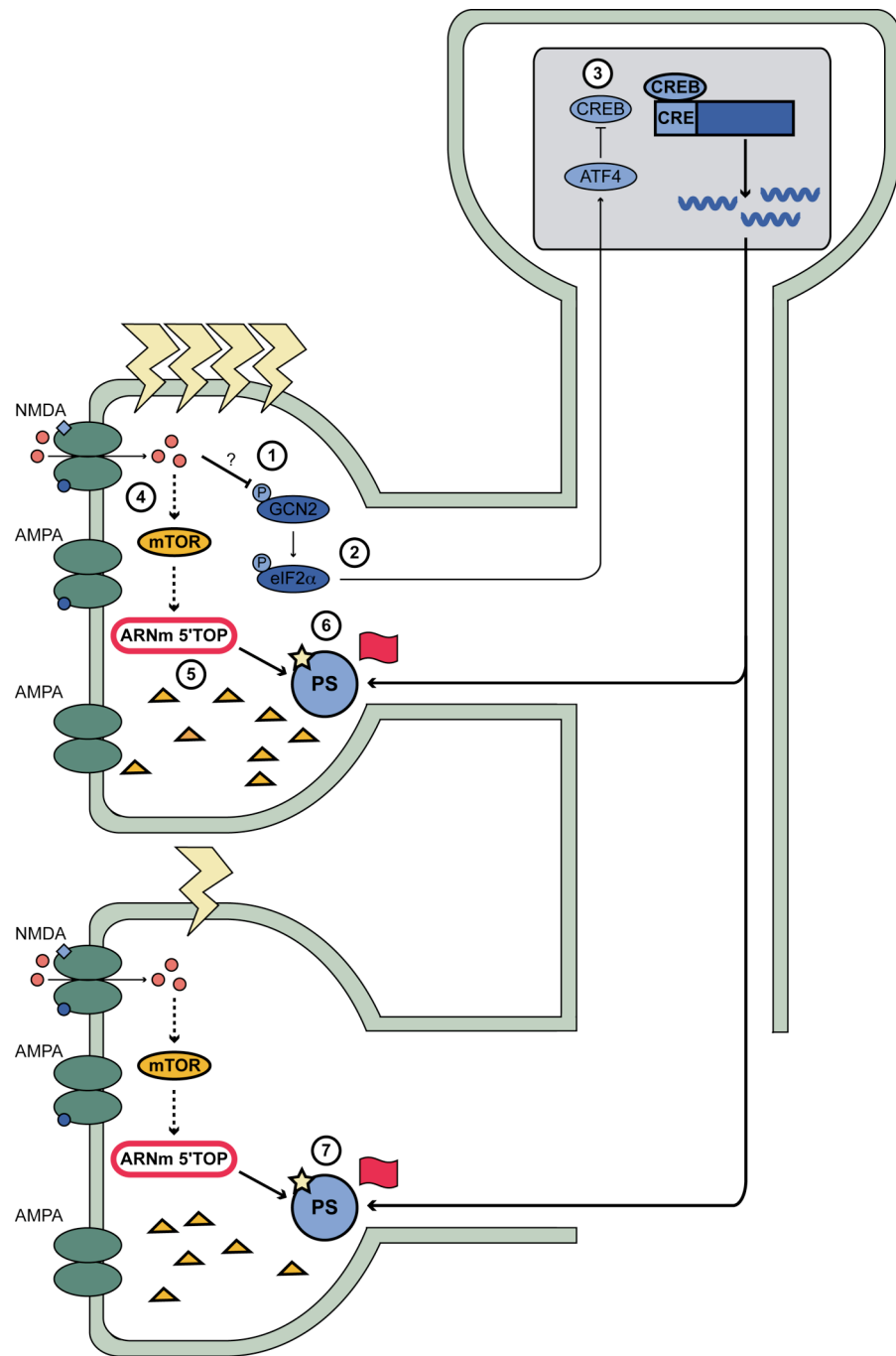


Figure 15 : Un modèle intégré

Modèle intégrant les résultats de nos travaux et proposant plusieurs rôles pour la traduction au cours de la LTP via différentes voies. Selon ce modèle : (1) l'application de plusieurs trains de stimulation à haute fréquence permet de déphosphoryler GCN2 et eIF2 α , ce qui tend à diminuer les niveaux d'ATF4 (2). En conséquence, la transcription CREB-dépendante est augmentée (3). Parallèlement, l'activité synaptique soutenue peut également activer la voie mTOR (4) et permet ainsi l'augmentation de la synthèse de ARNm 5'TOP (5) ce qui augmente la capacité de traduction locale (6) et permet la synthèse des ARNm nouvellement synthétisés. L'activation de la voie mTOR peut également survenir lorsque l'activité synaptique est de plus faible intensité, ce qui permet le marquage des synapses activées via l'augmentation de la capacité traductionnelle (7).

Dans un autre ordre d'idées, il convient également de revenir sur certaines différences qui ont été rapportées entre les expériences de marquage et de capture synaptiques chez l'aplysie et chez les vertébrés. En effet, Frey et Morris avaient initialement rapporté que la capture synaptique était indépendante de la synthèse de nouvelles protéines chez les vertébrés (Frey et Morris, 1997), ce qui avait été corroboré peu de temps après par les études chez l'aplysie (Martin *et al.*, 1997b). Cependant, une étude subséquente chez l'aplysie a clairement montré que la capture pouvait survenir en deux phases : une première, à 24h, indépendante de la traduction et une seconde, à 72h, dépendant de la synthèse protéique et sensible à la rapamycine (Casadio *et al.*, 1999). Il se pourrait donc que les protocoles utilisés jusqu'à maintenant chez les vertébrés ne nous permettent pas d'observer, ni de différencier ces deux phases de stabilisation qui ont été fréquemment observées chez l'aplysie, mais qu'elles existent néanmoins dans ce système.

Nous pouvons cependant dès maintenant affirmer que les voies GCN2/eIF2 α et mTOR ont des rôles parallèles et complémentaires, et que c'est leur activité conjointe qui permet le renforcement et la stabilisation des changements synaptiques à long-terme.

6.4.1. Le rôle absolu et relatif de la synthèse protéique pour le maintien de la plasticité synaptique à long-terme

Dans un autre ordre d'idées, il est également intéressant de souligner que de récentes recherches ont montré que, contrairement à ce qui a été classiquement décrit, la LTP pouvait être maintenue en l'absence de synthèse de nouvelles protéines. Bien que ceci ait été observé dans des conditions particulières, ces travaux soulèvent d'importantes questions quant au rôle absolu de la traduction pour le maintien de la plasticité synaptique à long-terme (Abraham et Williams, 2008).

Tout d'abord il a été montré que l'application de BDNF pouvait permettre le maintien de la LTP pendant plusieurs heures, et ce, même lorsque la synthèse protéique était inhibée (Pang *et al.*, 2004). Ces résultats laissent donc entrevoir l'étonnante possibilité que le BDNF serait la seule protéine requise pour le maintien de la LTP. D'autre part, il a été montré que l'interruption de la stimulation synaptique rend la LTP insensible à l'application d'inhibiteurs de la traduction comme l'anisomycine (Fonseca, Nagerl et

Bonhoeffer, 2006). De même, l'inhibition du protéasome, et donc de la dégradation protéique, rend la LTP insensible à l'application d'anisomycine (Fonseca *et al.*, 2006). Ces résultats suggèrent que l'activité synaptique induit probablement un turnover de protéines aux synapses, et il se pourrait donc que le rôle de la traduction soit uniquement de remplacer les protéines déplétées par l'activité synaptique. Cependant, ces études n'expliqueraient pas pourquoi la LTP est sensible à l'application d'inhibiteurs de la traduction uniquement lorsque ceux-ci sont appliqués pendant la phase d'induction, et non après. Ainsi, d'autres études seront probablement nécessaires afin de déterminer si la synthèse de nouvelles protéines joue finalement un rôle absolu ou plutôt relatif pour le maintien de la plasticité synaptique à long-terme.

6.4.2. La véritable identité des protéines requises pour le maintien de la plasticité synaptique à long-terme

En fin compte, bien que de nombreuses études se soient penchées sur le rôle de la synthèse protéique pour le maintien de la plasticité synaptique à long-terme, nous en savons à ce jour très peu sur l'identité des protéines qui permettraient de soutenir les changements plastiques à long-terme, que ce soit la potentialisation ou la dépression à long-terme. Récemment, quelques travaux se sont néanmoins intéressés à ce sujet, et ont entrepris des études de caractérisation protéomique systématique. Ainsi, il a récemment été clairement démontré que la population d'ARNm présents dans les dendrites est abondante et comprend des ARNm codant autant pour des récepteurs et des protéines associées à la membrane que des facteurs de traduction (Poon *et al.*, 2006; Zhong, Zhang et Bloch, 2006). Ces ARNm constituent donc des candidats idéaux pour le remplacement et l'ajout rapide de composants synaptiques. Parallèlement, il a également été démontré que la traduction d'une fraction significative des ARNm présents dans les dendrites, et tout particulièrement la traduction des ARNm 5'TOP pouvait être augmentée par l'application de BDNF (Liao *et al.*, 2007).

Cependant, bien que ces résultats soient en accord avec nos propres travaux, il est raisonnable de penser que les ARNm 5'TOP et les facteurs de traduction ne sont pas les seuls à être synthétisés en réponse à l'activité synaptique. En effet, tel que mentionné précédemment (voir Discussion, section 6.3.3.), la synthèse de ces derniers contribue

probablement à l'augmentation de la capacité traductionnelle des synapses, mais ne fournit pas les composants permettant de soutenir les changements synaptiques à proprement parler.

Parmi les protéines ayant reçu le plus d'attention au cours des dernières années, on peut notamment citer la protéine kinase C atypique, PKM ζ . PKM ζ a initialement été décrite comme la première kinase nécessaire et suffisante au maintien de la phase tardive de la LTP (Ling *et al.*, 2002; Pastalkova *et al.*, 2006; Serrano, Yao et Sacktor, 2005), en comparaison aux autres kinases telles que PKA ou CaMKII dont l'activité est requise uniquement pour la phase initiale de la LTP. Parallèlement, plusieurs travaux ont montré que PKM ζ est également nécessaire au maintien de la mémoire à long-terme (Pastalkova *et al.*, 2006; Serrano *et al.*, 2008; Shema, Sacktor et Dudai, 2007).

De plus, d'autres travaux ont démontré que PKM ζ est non seulement phosphorylée, mais aussi traduite dans les dendrites en réponse à l'activité synaptique soutenue (Osten *et al.*, 1996; Sacktor *et al.*, 1993) et que cette synthèse protéique nécessite l'activité de PKA et de mTOR (Kelly, Crary et Sacktor, 2007). Une fois synthétisée, PKM ζ contribue à l'augmentation du nombre de récepteurs AMPA postsynaptiques (Ling, Benardo et Sacktor, 2006), probablement via le recrutement des récepteurs extrasynaptiques (Yao *et al.*, 2008).

Ainsi, ces résultats laissent entrevoir la possibilité que la synthèse de PKM ζ serait nécessaire et suffisante au maintien de la phase tardive de la potentialisation à long-terme. Ceci n'est pas sans rappeler les études sur le BDNF, qui ont récemment suggéré un rôle similaire pour ce facteur de croissance (voir Discussion, section 6.4.1.). Selon cette étude, la LTP peut être maintenue en présence d'inhibiteurs de la synthèse protéique, à condition d'appliquer simultanément du BDNF. Ces résultats suggèrent donc que le BDNF pourrait être la seule protéine nécessaire pour le maintien de la phase tardive de la LTP (Pang *et al.*, 2004). Cependant, ces travaux n'ont pas démontré que l'application conjointe de ces composés inhibait complètement la synthèse protéique. Ainsi, il est impossible de conclure que le BDNF est la seule protéine nécessaire au

maintien de la LTP et il est donc raisonnable de penser que plus d'une protéine est en fait requise pour la persistance de la phase tardive de la LTP.

D'autre part, une autre étude a récemment démontré que plusieurs centaines de protéines sont traduites dans les dendrites en réponse à l'application de BDNF (Liao *et al.*, 2007). Parmi ces protéines, on peut notamment citer des protéines nécessaires au maintien de la structure synaptique, des facteurs de traduction et des protéines ribosomales, ce qui renforce l'idée que l'activité synaptique pourrait modifier la capacité traductionnelle des synapses. De même, la première caractérisation à large spectre (technique des *micro-arrays*) des gènes régulés à la hausse par l'activité téτανique induisant la LTP vient d'être complétée (Park *et al.*, 2006), ce qui nous permettra sans aucun doute d'en savoir plus sur les ARNm et les protéines nécessaires au maintien de la phase tardive de la potentialisation à long-terme. Dans l'ensemble ces travaux supportent donc l'hypothèse que plus d'une protéine serait nécessaire au maintien de la potentialisation à long-terme.

Cependant, bien que ces études soulignent à nouveau le rôle de la traduction dans les dendrites, elles ne nous permettent pas encore de déterminer avec précision l'ensemble des protéines qui sont requises pour maintenir les changements plastiques à long-terme. Ainsi, il sera important dans le futur de les caractériser plus en détail, afin de pouvoir comprendre pleinement le rôle de la traduction pour la plasticité synaptique à long-terme.

6.5. LES LEÇONS DES ÉTUDES SUR LA POTENTIALISATION ET LA MÉMOIRE À LONG-TERME : CE QU'IL NE FAUT PAS OUBLIER

Parallèlement, de nombreux travaux se sont intéressés au cours des dernières années aux gènes qui sont spécifiquement régulés à la hausse durant la formation de la potentialisation et de la mémoire à long-terme (Scott *et al.*, 2002; Tully *et al.*, 2003). Suite à la découverte initiale que l'expression constitutive du facteur de transcription CREB pouvait faciliter l'induction de la LTP et l'acquisition de la mémoire (Barco *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003), plusieurs compagnies pharmaceutiques ont entrevu la possibilité de générer des drogues permettant d'améliorer les fonctions mnésiques, et

peut-être même de traiter différents troubles mentaux associés à une perte de mémoire, comme par exemple la maladie d'Alzheimer (Scott *et al.*, 2002; Tully *et al.*, 2003). En effet, il semblait possible de diminuer le seuil de la formation des souvenirs, en facilitant l'activation de gènes nécessaires au maintien à long-terme de la plasticité synaptique et de la mémoire. Cependant, il convient probablement d'émettre quelques réserves à cet enthousiasme.

Tout d'abord, certains exemples dans la littérature soulignent les possibles effets délétères d'une modification durable de la voie CREB sur la mémoire. En effet, des travaux récents réalisés chez les souris VP-16 (chez lesquelles, rappelons-le, la transcription CREB-dépendante est activée de façon constitutive; Barco *et al.*, 2002) ont proposé que l'activation continue de la voie CREB empêchait le rappel de l'information spatiale récemment acquise (Viosca *et al.*, 2009). Ceci est en opposition avec les études chez les souris EGFP-AZIP (chez lesquelles la transcription CREB-dépendante est également facilitée par l'inhibition d'ATF4), qui avaient suggéré que le seuil pour la formation de la mémoire était réduit dans de telles conditions (Chen *et al.*, 2003). Par conséquent, ces travaux suggèrent donc plutôt l'existence d'un double seuil pour une formation optimale de la mémoire à long-terme.

De même, nos propres études mettent également l'emphase sur de tels effets. En effet, chez les souris *GCN2*^{-/-} (chez lesquelles l'expression d'ATF4 est réduite dans des conditions basales), la mémoire est facilitée suite à un entraînement de faible intensité, alors qu'elle est diminuée suite à un entraînement de plus forte intensité (Costa-Mattioli *et al.*, 2005). Ainsi, il serait probablement plus juste d'affirmer que la formation de la plasticité synaptique et de la mémoire à long-terme ne nécessite pas une activation constitutive de la transcription mais plutôt une activation dans une fenêtre bien précise. De ce fait, la quête de nouvelles drogues permettant d'améliorer les fonctions mnésiques ne devrait pas négliger ces données, et ne pas forcément raisonner en termes de « plus, c'est mieux ».

CHAPITRE VII. CONCLUSION

En conclusion, les travaux de cette thèse ont démontré une étroite association entre la plasticité synaptique au niveau de l'hippocampe et la mémoire et l'apprentissage. Plus spécifiquement, ils ont permis d'explorer plus en détail le rôle de la synthèse protéique dans ces phénomènes. Les travaux de cette thèse ont notamment permis d'approfondir les connaissances actuelles sur les liens existant entre l'activité synaptique et l'activation de deux voies majeures nécessaires à la régulation de la traduction, la voie eIF2 α et la voie mTOR, dans un contexte de plasticité synaptique. Cependant, il ne faut pas oublier que la régulation de la traduction est un processus complexe, nécessitant l'intégration de plusieurs étapes finement régulées. Il est donc indéniable qu'il reste encore beaucoup à apprendre sur ce processus, ainsi que sur le rôle exact de la synthèse protéique pour le maintien de la plasticité synaptique à long-terme et, parallèlement, de la mémoire à long-terme.

RÉFÉRENCES

Ørom UA, Nielsen FC, Lund AH. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell*. 2008;30(4):460-471.

Aakalu G, Smith WB, Nguyen N, Jiang C, Schuman EM. Dynamic visualization of local protein synthesis in hippocampal neurons. *Neuron*. 2001;30(2):489-502.

Abel T, Martin KC, Bartsch D, Kandel ER. Memory suppressor genes: inhibitory constraints on the storage of long-term memory. *Science*. 1998;279(5349):338-341. Review.

Abel T, Nguyen PV, Barad M, Deuel TA, Kandel ER, Bourtchouladze R. Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell*. 1997;88(5):615-626.

Abraham WC, Bear MF. Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity. *Trends Neurosci*. 1996;19(4):126-130. Review.

Abraham WC, Tate WP. Metaplasticity: a new vista across the field of synaptic plasticity. *Prog Neurobiol*. 1997;52(4):303-323. Review.

Abraham WC, Williams JM. LTP maintenance and its protein synthesis-dependence. *Neurobiol Learn Mem*. 2008 Mar;89(3):260-268. Review.

Adesnik H, Nicoll RA, England PM. Photoinactivation of native AMPA receptors reveals their real-time trafficking. *Neuron*. 2005;48(6):977-985.

Akers RF, Lovinger DM, Colley PA, Linden DJ, Routtenberg A. Translocation of protein kinase C activity may mediate hippocampal long-term potentiation. *Science*. 1986; 231(4738):587-589.

Alvarez P, Zola-Morgan S, Squire LR. Damage limited to the hippocampal region produces long-lasting memory impairment in monkeys. *J Neurosci.* 1995;15(5 Pt 2):3796-3807.

Amaral DG, Witter MP. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience.* 1989;31(3):571-591. Review.

Andersen P, Bliss TV, Skrede KK. Lamellar organization of hippocampal pathways. *Exp Brain Res.* 1971;13(2):222-238.

Aniksztejn L, Roisin MP, Amsellem R, Ben-Ari Y. Long-term potentiation in the hippocampus of the anaesthetized rat is not associated with a sustained enhanced release of endogenous excitatory amino acids. *Neuroscience.* 1989;28(2):387-392.

Antion MD, Hou L, Wong H, Hoeffler CA, Klann E. mGluR-dependent long-term depression is associated with increased phosphorylation of S6 and synthesis of elongation factor 1A but remains expressed in S6K-deficient mice. *Mol Cell Biol.* 2008b;28(9):2996-3007.

Antion MD, Merhav M, Hoeffler CA, Reis G, Kozma SC, Thomas G, Schuman EM, Rosenblum K, Klann E. Removal of S6K1 and S6K2 leads to divergent alterations in learning, memory, and synaptic plasticity. *Learn Mem.* 2008a;15(1):29-38.

Avni D, Shama S, Loreni F, Meyuhas O. Vertebrate mRNAs with a 5'-terminal pyrimidine tract are candidates for translational repression in quiescent cells: characterization of the translational cis-regulatory element. *Mol. Cell. Biol.* 1994;14(6):3822-3833.

Bacskai BJ, Hochner B, Mahaut-Smith M, Adams SR, Kaang BK, Kandel ER, Tsien RY. Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in *Aplysia* sensory neurons. *Science.* 1993;260(5105):222-226.

Bailey CH, Kandel ER. Structural changes accompanying memory storage. *Annu Rev Physiol.* 1993;55:397-426. Review.

Bailey CH, Kandel ER. Synaptic remodeling, synaptic growth and the storage of long-term memory in *Aplysia*. *Prog Brain Res.* 2008;169:179-198. Review.

Bailey CH, Montarolo P, Chen M, Kandel ER, Schacher S. Inhibitors of protein and RNA synthesis block structural changes that accompany long-term heterosynaptic plasticity in *Aplysia*. *Neuron.* 1992;9(4):749-758.

Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, Klevernic I, Arthur JS, Alessi DR, Cohen P. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J.* 2007;408(3):297-315.

Banko JL, Hou L, Poulin F, Sonenberg N, Klann E. Regulation of eukaryotic initiation factor 4E by converging signaling pathways during metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *J Neurosci.* 2006;26(8):2167-2173.

Banko JL, Poulin F, Hou L, DeMaria CT, Sonenberg N, Klann E. The translation repressor 4E-BP2 is critical for eIF4F complex formation, synaptic plasticity, and memory in the hippocampus. *J Neurosci.* 2005;25(42):9581-9590.

Barad M, Bourtchouladze R, Winder DG, Golan H, Kandel E. Rolipram, a type IV-specific phosphodiesterase inhibitor, facilitates the establishment of long-lasting long-term potentiation and improves memory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(25):15020-15025.

Barco A, Alarcon JM, Kandel ER. Expression of constitutively active CREB protein facilitates the late phase of long-term potentiation by enhancing synaptic capture. *Cell.* 2002;108(5):689-703.

Barco A, Lopez de Armentia M, Alarcon JM. Synapse-specific stabilization of plasticity processes: the synaptic tagging and capture hypothesis revisited 10 years later. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008;32(4):831-851. Review.

Barria A, Derkach V, Soderling T. Identification of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in the alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate-type glutamate receptor. *J Biol Chem.* 1997;272(52):32727-32730.

Barria A, Muller D, Derkach V, Griffith LC, Soderling TR. Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science.* 1997;276(5321):2042-2045.

Barrionuevo G, Schottler F, Lynch G. The effects of repetitive low frequency stimulation on control and "potentiated" synaptic responses in the hippocampus. *Life Sci.* 1980;27(24):2385-2391.

Bartsch D, Ghirardi M, Skehel PA, Karl KA, Herder SP, Chen M, Bailey CH, Kandel ER. Aplysia CREB2 represses long-term facilitation: relief of repression converts transient facilitation into long-term functional and structural change. *Cell.* 1995;83(6):979-992.

Beattie EC, Carroll RC, Yu X, Morishita W, Yasuda H, von Zastrow M, Malenka RC. Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. *Nat Neurosci.* 2000;3(12):1291-1300.

Benke TA, Lüthi A, Isaac JT, Collingridge GL. Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature.* 1998;393(6687):793-797.

Berlanga JJ, Herrero S, de Haro C. Characterization of the hemin-sensitive eukaryotic initiation factor 2alpha kinase from mouse nonerythroid cells. *J Biol Chem.* 1998;273(48):32340-6.

Berlanga JJ, Santoyo J, de Haro C. Characterization of a mammalian homolog of the GCN2 eukaryotic initiation factor 2alpha kinase. *Eur J Biochem.* 1999;265(2):754-762.

Bernier L, Castellucci VF, Kandel ER, Schwartz JH. Facilitatory transmitter causes a selective and prolonged increase in adenosine 3':5'-monophosphate in sensory neurons mediating the gill and siphon withdrawal reflex in *Aplysia*. *J Neurosci.* 1982; 2(12):1682-1691.

Besse F, Ephrussi A. Translational control of localized mRNAs: restricting protein synthesis in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(12):971-80. Review.

Biberman Y, Meyuhas O. TOP mRNAs are translationally inhibited by a titratable repressor in both wheat germ extract and reticulocyte lysate. *FEBS Lett.* 1999;456(3):357-360.

Bittencourt S, Pereira CM, Avedissian M, Delamano A, Mello LE, Castilho BA. Distribution of the protein IMPACT, an inhibitor of GCN2, in the mouse, rat, and marmoset brain. *J Comp Neurol.* 2008;507(5):1811-1830.

Blichenberg A, Schwanke B, Rehbein M, Garner CC, Richter D, Kindler S. Identification of a cis-acting dendritic targeting element in MAP2 mRNAs. *J. Neurosci.* 1999;19(20):8818-8829.

Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol.* 1973;232(2):331-356.

Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 1993 Jan 7;361(6407):31-39. Review.

Bourdeau ML, Morin F, Laurent CE, Azzi M, Lacaille JC. Kv4.3-mediated A-type K⁺ currents underlie rhythmic activity in hippocampal interneurons. *J. Neurosci.* 2007;27(8):1942-1953.

Bourtchouladze R, Abel T, Berman N, Gordon R, Lapidus K, Kandel ER. Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learn. Mem.* 1998;5(4-5), 365-374.

Bourtchouladze R, Frenguelli B, Blendy J, Cioffi D, Schutz G, Silva AJ. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell.* 1994;79(1):59-68.

Boyce M, Bryant KF, Jousse C, Long K, Harding HP, Scheuner D, Kaufman RJ, Ma D, Coen DM, Ron D, Yuan J. A selective inhibitor of eIF2 α dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science.* 2005;307(5711):935-939.

Braha O, Dale N, Hochner B, Klein M, Abrams TW, Kandel ER. Second messengers involved in the two processes of presynaptic facilitation that contribute to sensitization and dishabituation in *Aplysia* sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87(5):2040-2044.

Bramham CR. Local protein synthesis, actin dynamics, and LTP consolidation. *Curr Opin Neurobiol.* 2008 Oct;18(5):524-531. Review.

Brunelli M, Castellucci V, Kandel ER. Synaptic facilitation and behavioral sensitization in *Aplysia*: possible role of serotonin and cyclic AMP. *Science.* 1976;194(4270):1178-1181.

Brush MH, Weiser DC, Shenolikar S. Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 α to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol.* 2003;23(4):1292-1303.

Cammalleri M, Lütjens R, Berton F, King AR, Simpson C, Francesconi W, Sanna PP. Time-restricted role for dendritic activation of the mTOR-p70S6K pathway in the

induction of late-phase long-term potentiation in the CA1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(24):14368-14373.

Carroll RC, Lissin DV, von Zastrow M, Nicoll RA, Malenka RC. Rapid redistribution of glutamate receptors contributes to long-term depression in hippocampal cultures. *Nat Neurosci*. 1999;2(5):454-460.

Casadio A, Martin KC, Giustetto M, Zhu H, Chen M, Bartsch D, Bailey CH, Kandel ER. A transient, neuron-wide form of CREB-mediated long-term facilitation can be stabilized at specific synapses by local protein synthesis. *Cell*. 1999;99(2):221-237.

Castellucci V, Pinsker H, Kupfermann I, Kandel ER. Neuronal mechanisms of habituation and dishabituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science*. 1970;167(926):1745-1748.

Castellucci V, Kandel ER. Presynaptic facilitation as a mechanism for behavioral sensitization in *Aplysia*. *Science*. 1976;194(4270):1176-1178.

Castellucci VF, Carew TJ, Kandel ER. Cellular analysis of long-term habituation of the gill-withdrawal reflex of *Aplysia californica*. *Science*. 1978 ;202(4374):1306-1308.

Castellucci VF, Blumenfeld H, Goelet P, Kandel ER. Inhibitor of protein synthesis blocks long-term behavioral sensitization in the isolated gill-withdrawal reflex of *Aplysia*. *J Neurobiol*. 1989;20(1):1-9.

Castellucci VF, Frost WN, Goelet P, Montarolo PG, Schacher S, Morgan JA, Blumenfeld H, Kandel ER. Cell and molecular analysis of long-term sensitization in *Aplysia*. *J Physiol (Paris)*. 1986;81(4):349-357.

Castellucci VF, Kandel ER, Schwartz JH, Wilson FD, Nairn AC, Greengard P. Intracellular injection of the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase simulates facilitation of transmitter release underlying behavioral sensitization in *Aplysia*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980;77(12):7492-7496.

Castellucci VF, Nairn A, Greengard P, Schwartz JH, Kandel ER. Inhibitor of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase blocks presynaptic facilitation in *Aplysia*. *J Neurosci*. 1982;2(12):1673-1681.

Cedar H, Schwartz JH. Cyclic Adenosine Monophosphate in the Nervous System of *Aplysia californica*. II. Effect of serotonin and dopamine. *J Gen Physiol*. 1972; 60(5): 570–587.

Chan J, Khan SN, Harvey I, Merrick W, Pelletier J. Eukaryotic protein synthesis inhibitors identified by comparison of cytotoxicity profiles. *RNA*. 2004;10(3):528–543.

Chang RC, Suen KC, Ma CH, Elyaman W, Ng HK, Hugon J. Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase and phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha in neuronal degeneration. *J Neurochem*. 2002a;83(5):1215-25.

Chang RC, Wong AK, Ng HK, Hugon J. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha (eIF2alpha) is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuroreport*. 2002b;13(18):2429-32.

Chen JJ, London IM. Regulation of protein synthesis by heme-regulated eIF-2 alpha kinase. *Trends Biochem Sci*. 1995;20(3):105-8. Review.

Chen A, Muzzio IA, Malleret G, Bartsch D, Verbitsky M, Pavlidis P, Yonan AL, Vronskaya S, Grody MB, Cepeda I, Gilliam TC, Kandel ER. Inducible enhancement of memory storage and synaptic plasticity in transgenic mice expressing an inhibitor of ATF4 (CREB-2) and C/EBP proteins. *Neuron*. 2003;39(4):655-669.

Chen CY, Shyu AB. Selective degradation of early-response-gene mRNAs: functional analyses of sequence features of the AU-rich elements. *Mol Cell Biol*. 1994;14(12):8471–8482.

Chen C, Tonegawa S. Molecular genetic analysis of synaptic plasticity, activity-dependent neural development, learning, and memory in the mammalian brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 1997;20:157–184. Review.

Chetkovich DM, Gray R, Johnston D, Sweatt JD. N-methyl-D-aspartate receptor activation increases cAMP levels and voltage-gated Ca²⁺ channel activity in area CA1 of hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88(15):6467-6471.

Chetkovich DM, Sweatt JD. NMDA receptor activation increases cyclic AMP in area CA1 of the hippocampus via calcium/calmodulin stimulation of adenylyl cyclase. *J Neurochem.* 1993;61(5):1933-1942.

Collingridge GL, Isaac JT, Wang YT. Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci.* 2004;5(12):952-962. Review.

Corkin S, Amaral DG, González RG, Johnson KA, Hyman BT. H. M.'s medial temporal lobe lesion: findings from magnetic resonance imaging. *J Neurosci.* 1997;17(10):3964-3979.

Costa-Mattioli M, Gobert D, Harding H, Herdy B, Azzi M, Bruno M, Bidinosti M, Ben Mamou C, Marcinkiewicz E, Yoshida M, Imataka H, Cuello AC, Seidah N, Sossin W, Lacaille JC, Ron D, Nader K, Sonenberg N. Translational control of hippocampal synaptic plasticity and memory by the eIF2alpha kinase GCN2. *Nature.* 2005;436(7054):1166-1173.

Costa-Mattioli M, Gobert D, Stern E, Gamache K, Colina R, Cuello C, Sossin W, Kaufman R, Pelletier J, Rosenblum K, Krnjević K, Lacaille JC, Nader K, Sonenberg N. eIF2alpha phosphorylation bidirectionally regulates the switch from short- to long-term synaptic plasticity and memory. *Cell.* 2007;129(1):195-206.

Costa-Mattioli M, Sossin WS, Klann E, Sonenberg N. Translational control of long-lasting synaptic plasticity and memory. *Neuron.* 2009;61(1):10-26. Review.

Côté SL, Ribeiro-da-Silva A, Cuello AC. Current protocols for light microscopy. Immunocytochemistry; in Immunohistochemistry II. 1993. AC Cuello, ed. West Sussex: Wiley.

Cracco JB, Serrano P, Moskowitz SI, Bergold PJ, Sacktor TC. Protein synthesis-dependent LTP in isolated dendrites of CA1 pyramidal cells. *Hippocampus*. 2005;15(5):551-556.

Dale N, Kandel ER, Schacher S. Serotonin produces long-term changes in the excitability of *Aplysia* sensory neurons in culture that depend on new protein synthesis. *J Neurosci*. 1987;7(7):2232-2238.

Davidkova G, Carroll RC. Characterization of the role of microtubule-associated protein 1B in metabotropic glutamate receptor-mediated endocytosis of AMPA receptors in hippocampus. *J Neurosci*. 2007;27(48):13273-13278.

Dash PK, Hochner B, Kandel ER. Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of *Aplysia* sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature*. 1990;345(6277):718-721.

Davis HP, Squire LR. Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull*. 1984;96(3):518-559.

Davis S, Vanhoutte P, Pages C, Caboche J, Laroche S. The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci*. 2000;20(12):4563-4572.

Debiec J, LeDoux JE, Nader K. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron*. 2002;36(3):527-538.

DeGracia DJ, Adamczyk S, Folbe AJ, Konkoly LL, Pittman JE, Neumar RW, Sullivan JM, Scheuner D, Kaufman RJ, White BC, Krause GS. Eukaryotic initiation factor 2alpha

kinase and phosphatase activity during postischemic brain reperfusion. *Exp Neurol.* 1999;155(2):221-7.

DeGracia DJ, Montie HL. Cerebral ischemia and the unfolded protein response. *J Neurochem.* 2004;91(1):1-8. Review.

De Roo M, Klauser P, Garcia PM, Poglia L, Muller D. Spine dynamics and synapse remodeling during LTP and memory processes. *Prog Brain Res.* 2008;169:199-207. Review.

Derkach V, Barria A, Soderling TR. Ca²⁺/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96(6):3269-3274.

Dolphin AC, Errington ML, Bliss TV. Long-term potentiation of the perforant path in vivo is associated with increased glutamate release. *Nature.* 1982;297(5866):496-498.

Dosemeci A, Tao-Cheng JH, Vinade L, Winters CA, Pozzo-Miller L, Reese TS. Glutamate-induced transient modification of the postsynaptic density. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(18):10428-10432.

Dudai Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol.* 2004;55:51-86. Review.

Dudek SM, Bear MF. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89(10):4363-4367.

Dudek SM, Bear MF. Bidirectional long-term modification of synaptic effectiveness in the adult and immature hippocampus. *J Neurosci.* 1993;13(7):2910-2918.

Engert F, Bonhoeffer T. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature.* 1999;399(6731):66-70.

Esteban JA. Intracellular machinery for the transport of AMPA receptors. *Br J Pharmacol.* 2008;153 Suppl 1:S35-43. Review.

Fanselow MS, LeDoux JE. Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. *Neuron.* 1999; 23(2):229-232.

Feig S, Lipton P. Pairing the cholinergic agonist carbachol with patterned Schaffer collateral stimulation initiates protein synthesis in hippocampal CA1 pyramidal cell dendrites via a muscarinic, NMDA-dependent mechanism. *J Neurosci.* 1993;13(3):1010-1021.

Flexner JB, Flexner LB, Stellar E. Memory in mice as affected by intracerebral puromycin. *Science.* 1963;141:57-59.

Fonseca R, Nägerl UV, Bonhoeffer T. Neuronal activity determines the protein synthesis dependence of long-term potentiation. *Nat Neurosci.* 2006;9(4):478-480.

Fonseca R, Vabulas RM, Hartl FU, Bonhoeffer T, Nägerl UV. A balance of protein synthesis and proteasome-dependent degradation determines the maintenance of LTP. *Neuron.* 2006;52(2):239-245.

Freund TF, Buzsáki G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus.* 1996;6(4):347-470. Review.

Frey U, Frey S, Schollmeier F, Krug M. Influence of actinomycin D, a RNA synthesis inhibitor, on long-term potentiation in rat hippocampal neurons in vivo and in vitro. *J Physiol.* 1996;490 (Pt 3):703-711.

Frey U, Huang YY, Kandel ER. Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science.* 1993;260(5114):1661-1664.

Frey U, Krug M, Brödemann R, Reymann K, Matthies H. Long-term potentiation induced in dendrites separated from rat's CA1 pyramidal somata does not establish a late phase. *Neurosci Lett.* 1989;97(1-2):135-139.

Frey U, Krug M, Reymann KG, Matthies H. Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro. *Brain Res.* 1988;452(1-2):57-65.

Frey U, Matthies H, Reymann KG, Matthies H. The effect of dopaminergic D1 receptor blockade during tetanization on the expression of long-term potentiation in the rat CA1 region in vitro. *Neurosci. Lett.* 1991;129(1):111-114.

Frey U, Morris RG. Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature.* 1997;385(6616):533-536.

Frey U, Morris RG. Weak before strong: dissociating synaptic tagging and plasticity-factor accounts of late-LTP. *Neuropharmacology.* 1998a;37(4-5):545-552.

Frey U, Morris RG. Synaptic tagging: implications for late maintenance of hippocampal long-term potentiation. *Trends Neurosci.* 1998b;21(5):181-188. Review.

Fujii S, Saito K, Miyakawa H, Ito K, Kato H. Reversal of long-term potentiation (depotentiation) induced by tetanus stimulation of the input to CA1 neurons of guinea pig hippocampal slices. *Brain Res.* 1991;555(1):112-122.

Fukunaga K, Stoppini L, Miyamoto E, Muller D. Long-term potentiation is associated with an increased activity of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem.* 1993;268(11):7863-7867.

Gall FJ, Spurzheim G. Anatomie et physiologie du système nerveux en général, et du cerveau en particulier, avec des observations sur la possibilité de reconnaître plusieurs dispositions intellectuelles et morales de l'homme et des animaux par la configuration de leurs têtes. 1810. Paris: Schoell.

Gallagher SM, Daly CA, Bear MF, Huber KM. Extracellular signal-regulated protein kinase activation is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression in hippocampal area CA1. *J. Neurosci.* 2004;24(20):4859-4864.

Gebauer F, Hentze MW. Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5(10):827-835. Review.

Genoux D, Haditsch U, Knobloch M, Michalon A, Storm D, Mansuy IM. Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. *Nature.* 2002; 418(6901):970-975.

Ghirardi M, Montarolo PG, Kandel ER. A novel intermediate stage in the transition between short- and long-term facilitation in the sensory to motor neuron synapse of aplysia. *Neuron.* 1995;14(2):413-420.

Giese KP, Fedorov NB, Filipkowski RK, Silva AJ. Autophosphorylation at Thr286 of the alpha calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. *Science.* 1998;279(5352):870-873.

Gingras AC, Gygi SP, Raught B, Polakiewicz RD, Abraham RT, Hoekstra MF, Aebersold R, Sonenberg N. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev.* 1999;13(11):1422-1437.

Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:913-963. Review.

Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev.* 2001;15(7):807-826. Review.

Goelet P, Castellucci VF, Schacher S, Kandel ER. The long and the short of long-term memory--a molecular framework. *Nature.* 1986;322(6078):419-422. Review.

Grover LM, Teyler TJ. Two components of long-term potentiation induced by different patterns of afferent activation. *Nature*. 1990;347(6292):477-479.

Guzowski JF, McGaugh JL. Antisense oligodeoxynucleotide-mediated disruption of hippocampal cAMP response element binding protein levels impairs consolidation of memory for water maze training. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(6):2693-2698.

Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell*. 2000;6(5):1099-1108.

de Haro C, Méndez R, Santoyo J. The eIF-2alpha kinases and the control of protein synthesis. *FASEB J*. 1996;10(12):1378-87. Review.

Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*. 2004;18(16):1926-1945. Review.

Hayashi Y, Shi SH, Esteban JA, Piccini A, Poncer JC, Malinow R. Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science*. 2000;287(5461):2262-2267.

Hebb DO. *The organization of behaviour*. 1949. New York : Wiley.

Hernandez AI, Blace N, Crary JF, Serrano PA, Leitges M, Libien JM, Weinstein G, Tcherapanov A, Sacktor TC. Protein kinase M zeta synthesis from a brain mRNA encoding an independent protein kinase C zeta catalytic domain. Implications for the molecular mechanism of memory. *J Biol Chem*. 2003;278(41):40305-16.

Hesse GW, Teyler TJ. Reversible loss of hippocampal long term potentiation following electronconvulsive seizures. *Nature*. 1976;264(5586):562-564.

Hinds HL, Tonegawa S, Malinow R. CA1 long-term potentiation is diminished but present in hippocampal slices from alpha-CaMKII mutant mice. *Learn Mem.* 1998;5(4-5):344-354.

Hinnebusch AG. Translational regulation of yeast GCN4. A window on factors that control initiator-trna binding to the ribosome. *J Biol Chem.* 1997;272(35):21661-21664. Review.

Hinnebusch AG. Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol.* 2005;59:407-450. Review.

Hinnebusch AG. Mechanism and regulation of initiator methionyl-tRNA binding to ribosomes, in *Translational Control of Gene Expression*. 2000. N Sonenberg, JW Hershey, and MB Mathews, eds. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 185–244.

Hirokawa N. mRNA transport in dendrites: RNA granules, motors, and tracks. *J Neurosci.* 2006;26(27):7139-42. Review.

Ho N, Liauw JA, Blaeser F, Wei F, Hanissian S, Muglia LM, Wozniak DF, Nardi A, Arvin KL, Holtzman DM, Linden DJ, Zhuo M, Muglia LJ, Chatila TA. Impaired synaptic plasticity and cAMP response element-binding protein activation in Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type IV/Gr-deficient mice. *J Neurosci.* 2000;20(17):6459-6472.

Hou L, Klann E. Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *J Neurosci.* 2004;24(28):6352-6361.

Hrabetova S, Sacktor TC. Transient translocation of conventional protein kinase C isoforms and persistent downregulation of atypical protein kinase Mzeta in long-term depression. *Brain Res Mol Brain Res.* 2001;95(1-2):146-152.

Hu GY, Hvalby O, Walaas SI, Albert KA, Skjeflo P, Andersen P, Greengard P. Protein kinase C injection into hippocampal pyramidal cells elicits features of long term potentiation. *Nature*. 1987;328(6129):426-429.

Hu JH, Zhang H, Wagey R, Krieger C, Pelech SL. Protein kinase and protein phosphatase expression in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *J Neurochem*. 2003;85(2):432-42.

Huang CC, Liang YC, Hsu KS. Characterization of the mechanism underlying the reversal of long term potentiation by low frequency stimulation at hippocampal CA1 synapses. *J Biol Chem*. 2001;276(51):48108-48117.

Huang F, Chotiner JK, Steward O. The mRNA for elongation factor 1alpha is localized in dendrites and translated in response to treatments that induce long-term depression. *J Neurosci*. 2005;25(31):7199-209.

Huang YY, Kandel ER. Recruitment of long-lasting and protein kinase A-dependent long-term potentiation in the CA1 region of hippocampus requires repeated tetanization. *Learn Mem*. 1994;1(1):74-82.

Huang YY, Kandel ER. D1/D5 receptor agonists induce a protein synthesis-dependent late potentiation in the CA1 region of the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(7):2446-2450.

Huber KM, Kayser MS, Bear MF. Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR-dependent long-term depression. *Science*. 2000;288(5469):1254-1257.

Impey S, Mark M, Villacres EC, Poser S, Chavkin C, Storm DR. Induction of CRE-mediated gene expression by stimuli that generate long-lasting LTP in area CA1 of the hippocampus. *Neuron*. 1996;16(5):973-982.

Impey S, Obrietan K, Wong ST, Poser S, Yano S, Wayman G, Deloulme JC, Chan G, Storm DR. Cross talk between ERK and PKA is required for Ca²⁺ stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron*. 1998; 21(4):869-883.

Impey S, Smith DM, Obrietan K, Donahue R, Wade C, Storm DR. Stimulation of cAMP response element (CRE)-mediated transcription during contextual learning. *Nat Neurosci*. 1998;1(7):595-601.

Isaac JT, Nicoll RA, Malenka RC. Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP. *Neuron*. 1995;15(2):427-434.

Ito M, Sakurai M, Tongroach P. Climbing fibre induced depression of both mossy fibre responsiveness and glutamate sensitivity of cerebellar Purkinje cells. *J Physiol*. 1982;324:113-134.

Jefferies HB, Reinhard C, Kozma SC, Thomas G. Rapamycin selectively represses translation of the "polypyrimidine tract" mRNA family. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91(10):4441-4445.

Johnston D, Amaral DG. The Hippocampus, in *The Synaptic Organization of the Brain* Fourth Edition. 1998. GM Shepherd ed. New-York, NY: Oxford University Press. pp. 417-458.

Jouveneau A, Billard JM, Haditsch U, Mansuy IM, Dutar P. Different phosphatase-dependent mechanisms mediate long-term depression and depotentiation of long-term potentiation in mouse hippocampal CA1 area. *Eur J Neurosci*. 2003;18(5):1279-1285.

Kaang BK, Kandel ER, Grant SG. Activation of cAMP-responsive genes by stimuli that produce long-term facilitation in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron*. 1993;10(3):427-435.

Kacharina JE, Job C, Crino P, Eberwine J. Stimulation of glutamate receptor protein synthesis and membrane insertion within isolated neuronal dendrites. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(21):11545-11550.

Kameyama K, Lee HK, Bear MF, Huganir RL. Involvement of a postsynaptic protein kinase A substrate in the expression of homosynaptic long-term depression. *Neuron*. 1998;21(5):1163-1175.

Kandel ER. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*. 2001;294(5544):1030-1038. Review.

Kandel ER, Pittenger C. The past, the future and the biology of memory storage. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1999;354(1392):2027-2052. Review.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. *Principles of Neural Science, Fourth Edition*, 2000. New-York : McGraw-Hill, Health Professions Division.

Kang H, Sun LD, Atkins CM, Soderling TR, Wilson MA, Tonegawa S. An important role of neural activity-dependent CaMKIV signaling in the consolidation of long-term memory. *Cell*. 2001;106(6):771-783.

Kang-Park MH, Sarda MA, Jones KH, Moore SD, Shenolikar S, Clark S, Wilson WA. Protein phosphatases mediate depotentiation induced by high-intensity theta-burst stimulation. *J Neurophysiol*. 2003;89(2):684-690.

Kauderer BS, Kandel ER. Capture of a protein synthesis-dependent component of long-term depression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(24):13342-13347.

Kauer JA, Malenka RC, Nicoll RA. A persistent postsynaptic modification mediates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuron*. 1988;1(10):911-917.

Kelleher RJ 3rd, Govindarajan A, Jung HY, Kang H, Tonegawa S. Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell*. 2004;116(3):467-479.

Kelleher RJ 3rd, Govindarajan A, Tonegawa S. Translational regulatory mechanisms in persistent forms of synaptic plasticity. *Neuron*. 2004;44(1):59-73. Review.

Kelly MT, Crary JF, Sacktor TC. Regulation of protein kinase Mzeta synthesis by multiple kinases in long-term potentiation. *J Neurosci*. 2007;27(13):3439-44.

Khan A, Pepio AM, Sossin WS. Serotonin activates S6 kinase in a rapamycin-sensitive manner in Aplysia synaptosomes. *J Neurosci*. 2001;21(2):382-391.

Kiebler MA, DesGroseillers L. Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system. *Neuron*. 2000;25(1):19-28. Review.

Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*. 2002;110(2):163-175.

Klann E, Dever TE. Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5(12):931-942. Review.

Klein M, Kandel ER. Presynaptic modulation of voltage-dependent Ca²⁺ current: mechanism for behavioral sensitization in *Aplysia californica*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978;75(7):3512-3516.

Klein M, Kandel ER. Mechanism of calcium current modulation underlying presynaptic facilitation and behavioral sensitization in *Aplysia*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980;77(11):6912-6916.

Knott GW, Holtmaat A, Wilbrecht L, Welker E, Svoboda K. Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo. *Nat Neurosci*. 2006;9(9):1117-24.

Knowles RB, Sabry JH, Martone ME, Deerinck TJ, Ellisman MH, Bassell GJ, Kosik KS. Translocation of RNA granules in living neurons. *J Neurosci.* 1996;16(24):7812-20.

Knowlton BJ, Mangels JA, Squire LR. A neostriatal habit learning system in humans. *Science.* 1996;273(5280):1399-1402.

Kojima E, Takeuchi A, Haneda M, Yagi A, Hasegawa T, Yamaki K, Takeda K, Akira S, Shimokata K, Isobe K. The function of GADD34 is a recovery from a shutoff of protein synthesis induced by ER stress: elucidation by GADD34-deficient mice. *FASEB J.* 2003;17(11):1573-1575.

Kopec CD, Li B, Wei W, Boehm J, Malinow R. Glutamate receptor exocytosis and spine enlargement during chemically induced long-term potentiation. *J. Neurosci.* 2006;26(7):2000-2009.

Kovács KA, Steullet P, Steinmann M, Do KQ, Magistretti PJ, Halfon O, Cardinaux JR. TORC1 is a calcium- and cAMP-sensitive coincidence detector involved in hippocampal long-term synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(11):4700-4705.

Krichevsky AM, Kosik KS. Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron.* 2001;32(4):683-96.

Krug M, Lössner B, Ott T. Anisomycin blocks the late phase of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Brain Res Bull.* 1984;13(1):39-42.

Kumar R, Azam S, Sullivan JM, Owen C, Cavener DR, Zhang P, Ron D, Harding HP, Chen JJ, Han A, White BC, Krause GS, DeGracia DJ. Brain ischemia and reperfusion activates the eukaryotic initiation factor 2 α kinase, PERK. *J Neurochem.* 2001;77(5):1418-21.

Lai KO, Zhao Y, Ch'ng TH, Martin KC. Importin-mediated retrograde transport of CREB2 from distal processes to the nucleus in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(44):17175-17180.

Lapointe V, Morin F, Ratté S, Croce A, Conquet F, Lacaille JC. Synapse-specific mGluR1-dependent long-term potentiation in interneurons regulates mouse hippocampal inhibition. *J Physiol*. 2004;555(Pt1):125-135.

Larson J, Xiao P, Lynch G. Reversal of LTP by theta frequency stimulation. *Brain Res*. 1993;600(1):97-102.

Lashley KS. *Brain mechanisms and intelligence: a quantitative study of injuries in the brain*. 1929. Chicago University Press.

Lebeau G, Maher-Laporte M, Topolnik L, Laurent CE, Sossin W, Desgroseillers L, Lacaille JC. Staufen1 regulation of protein synthesis-dependent long-term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells. *Mol Cell Biol*. 2008;28(9):2896-907,

LeDoux JE. Emotion: clues from the brain. *Annu Rev Psychol*. 1995;46:209-235. Review.

LeDoux JE. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci*. 2000;23:155-184. Review.

Lee YS, Bailey CH, Kandel ER, Kaang BK. Transcriptional regulation of long-term memory in the marine snail *Aplysia*. *Mol Brain*. 2008;1(1):3. Review.

Lee HK, Barbarosie M, Kameyama K, Bear MF, Huganir RL. Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature*. 2000;405(6789):955-959.

Lee HK, Kameyama K, Huganir RL, Bear MF. NMDA induces long-term synaptic depression and dephosphorylation of the GluR1 subunit of AMPA receptors in hippocampus. *Neuron*. 1998;21(5):1151-1162.

Lee HK, Takamiya K, Han JS, Man H, Kim CH, Rumbaugh G, Yu S, Ding L, He C, Petralia RS, Wenthold RJ, Gallagher M, Huganir RL. Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. *Cell*. 2003;112(5):631-643.

Lenz G, Avruch J. Glutamatergic regulation of the p70S6 kinase in primary mouse neurons. *J. Biol. Chem*. 2005;280(46):38121-38124.

Leutgeb JK, Frey JU, Behnisch T. LTP in cultured hippocampal-entorhinal cortex slices from young adult (P25-30) rats. *J. Neurosci. Methods*. 2003;130(1):19-32.

Liao D, Hessler NA, Malinow R. Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature*. 1995;375(6530):400-404.

Liao L, Pilotte J, Xu T, Wong CC, Edelman GM, Vanderklish P, Yates JR 3rd. BDNF induces widespread changes in synaptic protein content and up-regulates components of the translation machinery: an analysis using high-throughput proteomics. *J Proteome Res*. 2007;6(3):1059-1071.

Lin TA, Kong X, Haystead TA, Pause A, Belsham G, Sonenberg N, Lawrence JC Jr. PHAS-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation. *Science*. 1994;266(5185):653-656.

Linden DJ, Dickinson MH, Smeyne M, Connor JA. A long-term depression of AMPA currents in cultured cerebellar Purkinje neurons. *Neuron*. 1991;7(1):81-89.

Ling DS, Benardo LS, Sacktor TC. Protein kinase Mzeta enhances excitatory synaptic transmission by increasing the number of active postsynaptic AMPA receptors. *Hippocampus*. 2006;16(5):443-52.

Ling DS, Benardo LS, Serrano PA, Blace N, Kelly MT, Crary JF, Sacktor TC. Protein kinase Mzeta is necessary and sufficient for LTP maintenance. *Nat Neurosci*. 2002;5(4):295-6.

Lisman JE, Harris KM. Quantal analysis and synaptic anatomy--integrating two views of hippocampal plasticity. *Trends Neurosci*. 1993;16(4):141-147. Review.

Lisman J, Schulman H, Cline H. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci*. 2002;3(3):175-190. Review.

Lisman JE, Zhabotinsky AM. A model of synaptic memory: a CaMKII/PP1 switch that potentiates transmission by organizing an AMPA receptor anchoring assembly. *Neuron*. 2001;31(2):191-201. Review.

Liu K, Hu JY, Wang D, Schacher S. Protein synthesis at synapse versus cell body: enhanced but transient expression of long-term facilitation at isolated synapses. *J Neurobiol*. 2003;56(3):275-286.

Lledo PM, Hjelmstad GO, Mukherji S, Soderling TR, Malenka RC, Nicoll RA. Calcium/calmodulin-dependent kinase II and long-term potentiation enhance synaptic transmission by the same mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(24):11175-11179.

Lledo PM, Zhang X, Südhof TC, Malenka RC, Nicoll RA. Postsynaptic membrane fusion and long-term potentiation. *Science*. 1998;279(5349):399-403.

Lonze BE, Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*. 2002;35(4):605-623. Review.

Lopes da Silva FH, Witter MP, Boeijinga PH, Lohman AH. Anatomic organization and physiology of the limbic cortex. *Physiol Rev.* 1990;70(2):453-511. Review.

Loreni F, Amaldi F. Translational control of terminal oligopyrimidine mRNAs requires a specific regulator. *FEBS Lett.* 1997;416(3):239-242.

Lorente de Nó R. Studies of the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J. Psychol. Neurol.* 1934;46:113-177.

Lovinger DM, Wong KL, Murakami K, Routtenberg A. Protein kinase C inhibitors eliminate hippocampal long-term potentiation. *Brain Res.* 1987;436(1):177-183.

Lu PD, Harding HP, Ron D. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J Cell Biol.* 2004;167(1):27-33.

Lynch G, Larson J, Kelso S, Barrionuevo G, Schottler F. Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature.* 1983;305(5936):719-721.

Lynch MA. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev.* 2004;84(1):87-136. Review.

MacDermott AB, Mayer ML, Westbrook GL, Smith SJ, Barker JL. NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature.* 1986;321(6069):519-522.

Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron.* 2004;44(1):5-21. Review.

Malenka RC, Kauer JA, Zucker RS, Nicoll RA. Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission. *Science.* 1988;242(4875):81-84.

Malenka RC, Madison DV, Nicoll RA. Potentiation of synaptic transmission in the hippocampus by phorbol esters. *Nature*. 1986;321(6066):175-177.

Malenka RC, Nicoll RA. Long-term potentiation--a decade of progress? *Science*. 1999;285(5435):1870-1874. Review.

Maletic-Savatic M, Malinow R, Svoboda K. Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science*. 1999;283(5409):1923-7.

Malinow R, Malenka RC. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*. 2002;25:103-126. Review.

Malleret G, Haditsch U, Genoux D, Jones MW, Bliss TV, Vanhoose AM, Weitlauf C, Kandel ER, Winder DG, Mansuy IM. Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin. *Cell*. 2001;104(5):675-686.

Mammen AL, Kameyama K, Roche KW, Huganir RL. Phosphorylation of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole4-propionic acid receptor GluR1 subunit by calcium/calmodulin-dependent kinase II. *J Biol Chem*. 1997;272(51):32528-32533.

Man HY, Lin JW, Ju WH, Ahmadian G, Liu L, Becker LE, Sheng M, Wang YT. Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization. *Neuron*. 2000;25(3):649-662.

Manahan-Vaughan D, Kulla A, Frey JU. Requirement of translation but not transcription for the maintenance of long-term depression in the CA1 region of freely moving rats. *J Neurosci*. 2000;20(22):8572-8576.

Martin KC. Synaptic tagging during synapse-specific long-term facilitation of *Aplysia* sensory-motor neurons. *Neurobiol Learn Mem*. 2002;78(3):489-497.

Martin KC, Casadio A, Zhu H, Yaping E, Rose JC, Chen M, Bailey CH, Kandel ER. Synapse-specific, long-term facilitation of aplysia sensory to motor synapses: a function for local protein synthesis in memory storage. *Cell*. 1997b;91(7):927-938.

Martin KC, Ephrussi A. mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell*. 2009;136(4):719-30. Review.

Martin KC, Kosik KS. Synaptic tagging -- who's it? *Nat Rev Neurosci*. 2002;3(10):813-820. Review.

Martin KC, Michael D, Rose JC, Barad M, Casadio A, Zhu H, Kandel ER. MAP kinase translocates into the nucleus of the presynaptic cell and is required for long-term facilitation in Aplysia. *Neuron*. 1997a;18(6):899-912.

Martin KC, Zukin RS. RNA trafficking and local protein synthesis in dendrites: an overview. *J Neurosci*. 2006;26(27):7131-4. Review.

Masuoka HC, Townes TM. Targeted disruption of the activating transcription factor 4 gene results in severe fetal anemia in mice. *Blood*. 2002;99(3):736-745.

Matsushita M, Tomizawa K, Moriwaki A, Li ST, Terada H, Matsui H. A high-efficiency protein transduction system demonstrating the role of PKA in long-lasting long-term potentiation. *J Neurosci*. 2001;21(16):6000-6007.

Matthies H, Becker A, Schroeder H, Kraus J, Holtt V, Krug M. Dopamine D1-deficient mutant mice do not express the late phase of hippocampal long-term potentiation. *Neuroreport*. 1997;8(16):3533-3535.

McGaugh JL. Memory – a century of consolidation. *Science*. 2000. 287(5451):248-251.

Mellentin C, Moller M, Jahnsen H. Properties of long-term synaptic plasticity and metaplasticity in organotypic slice cultures of rat hippocampus. *Exp. Brain Res*. 2006;170(4):522-531.

Meyuhas O. Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *Eur J Biochem.* 2000;267(21):6321-6330. Review.

Meyuhas O, Hornstein E. Translational control of TOP mRNAs, in *Translational Control of Gene Expression*. 2000. N Sonenberg, JW Hershey, and MB Mathews, eds. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 671–694.

Milner B, Squire LR, Kandel ER. Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron.* 1998;20(3):445-468. Review.

Moccia R, Chen D, Lyles V, Kapuya E, E Y, Kalachikov S, Spahn CM, Frank J, Kandel ER, Barad M, Martin KC. An unbiased cDNA library prepared from isolated *Aplysia* sensory neuron processes is enriched for cytoskeletal and translational mRNAs. *J. Neurosci.* 2003;23(28):9409-9417.

Montarolo PG, Goelet P, Castellucci VF, Morgan J, Kandel ER, Schacher S. A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in *Aplysia*. *Science.* 1986;234(4781):1249-1254.

Morishita W, Connor JH, Xia H, Quinlan EM, Shenolikar S, Malenka RC. Regulation of synaptic strength by protein phosphatase 1. *Neuron.* 2001;32(6):1133-1148.

Moroz LL, Edwards JR, Puthanveettil SV, Kohn AB, Ha T, Heyland A, Knudsen B, Sahni A, Yu F, Liu L, Jezzini S, Lovell P, Iannuccilli W, Chen M, Nguyen T, Sheng H, Shaw R, Kalachikov S, Panchin YV, Farmerie W, Russo JJ, Ju J, Kandel ER. Neuronal transcriptome of *aplysia*: neuronal compartments and circuitry. *Cell.* 2006;127(7):1453-1467.

Morris RG. Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *J Neurosci.* 1989;9(9):3040-3057.

Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*. 1986;319(6056):774-776.

Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*. 1982;297(5868):681-683.

Morris RG, Inglis J, Ainge JA, Olverman HJ, Tulloch J, Dudai Y, Kelly PA. Memory reconsolidation: sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval. *Neuron*. 2006;50(3):479-489.

Moser E, Moser MB, Andersen P. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J Neurosci*. 1993;13(9):3916-3925.

Moser MB, Moser EI, Forrest E, Andersen P, Morris RG. Spatial learning with a minilab in the dorsal hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(21):9697-9701.

Mothe-Satney I, Brunn GJ, McMahon LP, Capaldo CT, Abraham RT, Lawrence JC Jr. Mammalian target of rapamycin-dependent phosphorylation of PHAS-I in four (S/T)P sites detected by phospho-specific antibodies. *J Biol Chem*. 2000;275(43):33836-33843.

Mulkey RM, Endo S, Shenolikar S, Malenka RC. Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature*. 1994;369(6480):486-488.

Mulkey RM, Herron CE, Malenka RC. An essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression. *Science*. 1993;261(5124):1051-1055.

Mulkey RM, Malenka RC. Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron*. 1992;9(5):967-975.

Muller D, Buchs PA, Stoppini L. Time course of synaptic development in hippocampal organotypic cultures. *Dev. Brain Res.* 1993;71(1):93-100.

Muller D, Lynch G. Long-term potentiation differentially affects two components of synaptic responses in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85(23):9346-9350.

Nadel L, Samsonovich A, Ryan L, Moscovitch M. Multiple trace theory of human memory: computational, neuroimaging, and neuropsychological results. *Hippocampus.* 2000;10(4):352-368. Review.

Nägerl UV, Köstinger G, Anderson JC, Martin KA, Bonhoeffer T. Protracted synaptogenesis after activity-dependent spinogenesis in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 2007;27(30):8149-56.

Navakkode S, Sajikumar S, Frey JU. The type IV-specific phosphodiesterase inhibitor rolipram and its effect on hippocampal long-term potentiation and synaptic tagging. *J Neurosci.* 2004;24(35):7740-7744.

Nguyen PV, Abel T, Kandel ER. Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science.* 1994;265(5175):1104-1107.

Nguyen PV, Woo NH. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by cyclic AMP-dependent protein kinases. *Prog Neurobiol.* 2003;71(6):401-437. Review.

Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol.* 2001;153(5):1011-1022.

O'Dell TJ, Kandel ER. Low-frequency stimulation erases LTP through an NMDA receptor-mediated activation of protein phosphatases. *Learn Mem.* 1994;1(2):129-139.

Oliet SH, Malenka RC, Nicoll RA. Two distinct forms of long-term depression coexist in CA1 hippocampal pyramidal cells. *Neuron.* 1997;18(6):969-982.

Opazo P, Watabe AM, Grant SG, O'Dell TJ. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates the induction of long-term potentiation through extracellular signal-related kinase-independent mechanisms. *J. Neurosci.* 2003;23(9):3679-3688.

Osten P, Valsamis L, Harris A, Sacktor TC. Protein synthesis-dependent formation of protein kinase Mzeta in long-term potentiation. *J Neurosci.* 1996;16(8):2444-2451.

Ostroff LE, Fiala JC, Allwardt B, Harris KM. Polyribosomes redistribute from dendritic shafts into spines with enlarged synapses during LTP in developing rat hippocampal slices. *Neuron.* 2002;35(3):535-545.

Otmakhov N, Khibnik L, Otmakhova N, Carpenter S, Riahi S, Asrican B, Lisman J. Forskolin-induced LTP in the CA1 hippocampal region is NMDA receptor dependent. *J. Neurophysiol.* 2004;91(5):1955-1962.

Otmakhova NA, Otmakhov N, Mortenson LH, Lisman JE. Inhibition of the cAMP pathway decreases early long-term potentiation at CA1 hippocampal synapses. *J Neurosci.* 2000;20(12):4446-4451.

Ouyang Y, Rosenstein A, Kreiman G, Schuman EM, Kennedy MB. Tetanic stimulation leads to increased accumulation of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II via dendritic protein synthesis in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 1999;19(18):7823-7833.

Packard MG, Hirsh R, White NM. Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze tasks: evidence for multiple memory systems. *J Neurosci.* 1989;9(5):1465-1472.

Palmer MJ, Irving AJ, Seabrook GR, Jane DE, Collingridge GL. The group I mGlu receptor agonist DHPG induces a novel form of LTD in the CA1 region of the hippocampus. *Neuropharmacology.* 1997;36(11-12):1517-1532.

Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung WH, Hempstead BL, Lu B. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science*. 2004;306(5695):487-491.

Park CS, Gong R, Stuart J, Tang SJ. Molecular network and chromosomal clustering of genes involved in synaptic plasticity in the hippocampus. *J Biol Chem*. 2006;281(40):30195-211.

Park CS, Tang SJ. Regulation of microRNA expression by induction of bidirectional synaptic plasticity. *J Mol Neurosci*. 2008 Nov 8. [Epub ahead of print].

Paschen W. Shutdown of translation: lethal or protective? Unfolded protein response versus apoptosis. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23(7):773-9. Review.

Passafaro M, Piëch V, Sheng M. Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons. *Nat Neurosci*. 2001;4(9):917-926.

Pastalkova E, Serrano P, Pinkhasova D, Wallace E, Fenton AA, Sacktor TC. Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science*. 2006;313(5790):1141-4.

Patterson SL, Pittenger C, Morozov A, Martin KC, Scanlin H, Drake C, Kandel ER. Some forms of cAMP-mediated long-lasting potentiation are associated with release of BDNF and nuclear translocation of phospho-MAP kinase. *Neuron*. 2001;32(1):123-140.

Patursky-Polischuk I, Stolovich-Rain M, Hausner-Hanochi M, Kasir J, Cybulski N, Avruch J, Rüegg MA, Hall MN, Meyuhas O. The TSC-mTOR pathway mediates translational activation of TOP mRNAs by insulin largely in a raptor- or rictor-independent manner. *Mol Cell Biol*. 2009;29(3):640-649.

Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, Donzé O, Lin TA, Lawrence JC Jr, Sonenberg N. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature*. 1994;371(6500):762-767.

Pavlov IP. Conditioned reflexes. 1927. London: Routledge and Kegan Paul. NY : Dover Publications.

Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 1986. Sydney : Academic Press.

Peel AL. PKR activation in neurodegenerative disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004;63(2):97-105. Review.

Pende M, Um SH, Mieulet V, Sticker M, Goss VL, Mestan J, Mueller M, Fumagalli S, Kozma SC, Thomas G. S6K1(-)/S6K2(-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. *Mol Cell Biol.* 2004;24(8):3112-3124.

Penfield W, Mathieson G. Memory. Autopsy findings and comments on the role of hippocampus in experiential recall. *Arch Neurol.* 1974;31(3):145-154.

Penfield W, Milner B. Memory deficit produced by bilateral lesions in the hippocampal zone. *AMA Arch Neurol Psychiatry.* 1958;79(5):475-497.

Pereira CM, Sattlegger E, Jiang HY, Longo BM, Jaqueta CB, Hinnebusch AG, Wek RC, Mello LE, Castilho BA. IMPACT, a protein preferentially expressed in the mouse brain, binds GCN1 and inhibits GCN2 activation. *J Biol Chem.* 2005;280(31):28316-28323.

Pettit DL, Perlman S, Malinow R. Potentiated transmission and prevention of further LTP by increased CaMKII activity in postsynaptic hippocampal slice neurons. *Science.* 1994;266(5192):1881-1885.

Phelps EA, LeDoux JE. Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. *Neuron.* 2005;48(2):175-187. Review.

Pierce JP, van Leyen K, McCarthy JB. Translocation machinery for synthesis of integral membrane and secretory proteins in dendritic spines. *Nat Neurosci.* 2000;3(4):311-313.

Pittenger C, Huang YY, Paletzki RF, Bourtchouladze R, Scanlin H, Vronskaya S, Kandel ER. Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus-dependent spatial memory. *Neuron.* 2002;34(3):447-62.

Pittenger C, Kandel ER. In search of general mechanisms for long-lasting plasticity: Aplysia and the hippocampus. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2003;358(1432):757-763.

Poon MM, Choi SH, Jamieson CA, Geschwind DH, Martin KC. Identification of process-localized mRNAs from cultured rodent hippocampal neurons. *J Neurosci.* 2006;26(51):13390-13399.

Proud CG. eIF2 and the control of cell physiology. *Semin Cell Dev Biol.* 2005;16(1):3-12. Review.

Ramón y Cajal S. *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*, Vols. 1 and 2. 1911. A. Maloine : Paris.

Raught B, Gingras AC, Sonenberg N. The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(13):7037-7044. Review.

Raught B, Peiretti F, Gingras AC, Livingstone M, Shahbazian D, Mayeur GL, Polakiewicz RD, Sonenberg N, Hershey JW. Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *EMBO J.* 2004;23(8):1761-1769.

Raymond CR. LTP forms 1, 2 and 3: different mechanisms for the "long" in long-term potentiation. *Trends Neurosci.* 2007;30(4):167-175. Review.

Rempel-Clower NL, Zola SM, Squire LR, Amaral DG. Three cases of enduring memory impairment after bilateral damage limited to the hippocampal formation. *J Neurosci.* 1996;16(16):5233-5255.

Reymann KG, Schulzeck K, Kase H, Matthies H. Phorbol ester-induced hippocampal long-term potentiation is counteracted by inhibitors of protein kinase C. *Exp Brain Res.* 1988;71(1):227-230.

Rial Verde EM, Lee-Osbourne J, Worley PF, Malinow R, Cline HT. Increased expression of the immediate-early gene *arc/arg3.1* reduces AMPA receptor-mediated synaptic transmission. *Neuron.* 2006;52(3):461-474.

Robert F, Kapp LD, Khan SN, Acker MG, Kolitz S, Kazemi S, Kaufman RJ, Merrick WC, Koromilas AE, Lorsch JR, Pelletier J. Initiation of protein synthesis by hepatitis C virus is refractory to reduced eIF2.GTP.Met-tRNA(i)(Met) ternary complex availability. *Mol. Biol. Cell.* 2006;17(11):4632-4644.

Roche KW, O'Brien RJ, Mammen AL, Bernhardt J, Huganir RL. Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA receptor GluR1 subunit. *Neuron.* 1996;16(6):1179-1188.

Rosenblum K, Meiri N, Dudai Y. Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behav. Neural Biol.* 1993;59(1):49-56.

Roux PP, Ballif BA, Anjum R, Gygi SP, Blenis J. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* 2004;101(37):13489-13494.

Roux PP, Shahbazian D, Vu H, Holz MK, Cohen MS, Taunton J, Sonenberg N, Blenis J. RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *J. Biol. Chem.* 2007;282(19):14056-14064.

Ruvinsky I, Sharon N, Lerer T, Cohen H, Stolovich-Rain M, Nir T, Dor Y, Zisman P, Meyuhas O. Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes Dev.* 2005;19(18):2199-2211.

Sabatini DM, Barrow RK, Blackshaw S, Burnett PE, Lai MM, Field ME, Bahr BA, Kirsch J, Betz H, Snyder SH. Interaction of RAFT1 with gephyrin required for rapamycin-sensitive signaling. *Science.* 1999;284(5417):1161-1164.

Sacktor TC, Kruger KE, Schwartz JH. Activation of protein kinase C by serotonin: biochemical evidence that it participates in the mechanisms underlying facilitation in *Aplysia*. *J Physiol (Paris).* 1988-1989;83(3):224-231.

Sacktor TC, Osten P, Valsamis H, Jiang X, Naik MU, Sublette E. Persistent activation of the zeta isoform of protein kinase C in the maintenance of long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90(18):8342-6.

Sacktor TC, Schwartz JH. Sensitizing stimuli cause translocation of protein kinase C in *Aplysia* sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(5):2036-2039.

Sajikumar S, Frey JU. Anisomycin inhibits the late maintenance of long-term depression in rat hippocampal slices in vitro. *Neurosci Lett.* 2003;338(2):147-150.

Sajikumar S, Frey JU. Late-associativity, synaptic tagging, and the role of dopamine during LTP and LTD. *Neurobiol Learn Mem.* 2004a;82(1):12-25.

Sajikumar S, Frey JU. Resetting of 'synaptic tags' is time- and activity-dependent in rat hippocampal CA1 in vitro. *Neuroscience.* 2004b;129(2):503-507.

Sajikumar S, Navakkode S, Frey JU. Identification of compartment- and process-specific molecules required for "synaptic tagging" during long-term potentiation and long-term depression in hippocampal CA1. *J Neurosci.* 2007;27(19):5068-5080.

Sajikumar S, Navakkode S, Sacktor TC, Frey JU. Synaptic tagging and cross-tagging: the role of protein kinase Mzeta in maintaining long-term potentiation but not long-term depression. *J Neurosci.* 2005;25(24):5750-5756.

Sánchez-Carbente Mdel R, Desgroseillers L. Understanding the importance of mRNA transport in memory. *Prog Brain Res.* 2008;169:41-58. Review.

Santoyo J, Alcalde J, Mendez R, Pulido D, de Haro C. Cloning and characterization of a cDNA encoding a protein synthesis initiation factor-2 α (eIF-2 α) kinase from *Drosophila melanogaster*. Homology To yeast GCN2 protein kinase. *J Biol Chem.* 1997;272(19):12544-12550.

Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol.* 2004;14(14):1296-1302.

Saura CA, Choi SY, Beglopoulos V, Malkani S, Zhang D, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S, Kelleher RJ 3rd, Kandel ER, Duff K, Kirkwood A, Shen J. Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. *Neuron.* 2004;42(1):23-36.

Schafe GE, Nadel NV, Sullivan GM, Harris A, LeDoux JE. Memory consolidation for contextual and auditory fear conditioning is dependent on protein synthesis, PKA, and MAP kinase. *Learn. Mem.* 1999;6(2):97-110.

Scheuner D, Mierde DV, Song B, Flamez D, Creemers JW, Tsukamoto K., Ribick M, Schuit FC, Kaufman RJ. Control of mRNA translation preserves endoplasmic reticulum function in beta cells and maintains glucose homeostasis. *Nat. Med.* 2005;11(7):757-764.

Scheuner D, Song B, McEwen E, Liu C, Laybutt R, Gillespie P, Saunders T, Bonner-Weir S, Kaufman RJ. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell*. 2001;7(6):1165-1176.

Schratt GM, Nigh EA, Chen WG, Hu L, Greenberg ME. BDNF regulates the translation of a select group of mRNAs by a mammalian target of rapamycin-phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway during neuronal development. *J Neurosci*. 2004;24(33):7366-7377.

Scott R, Bourtchuladze R, Gossweiler S, Dubnau J, Tully T. CREB and the discovery of cognitive enhancers. *J Mol Neurosci*. 2002;19(1-2):171-7. Review.

Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1957;20(1):11-21.

Seamon KB, Padgett W, Daly JW. Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1981; 78(6):3363-3367.

Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, Stifani S, Basak A, Prat A, Chretien M. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(3):928-933.

Serrano P, Friedman EL, Kenney J, Taubenfeld SM, Zimmerman JM, Hanna J, Alberini C, Kelley AE, Maren S, Rudy JW, Yin JC, Sacktor TC, Fenton AA. PKMzeta maintains spatial, instrumental, and classically conditioned long-term memories. *PLoS Biol*. 2008;6(12):2698-706.

Serrano P, Yao Y, Sacktor TC. Persistent phosphorylation by protein kinase Mzeta maintains late-phase long-term potentiation. *J Neurosci*. 2005;25(8):1979-84.

Shapiro E, Castellucci VF, Kandel ER. Presynaptic membrane potential affects transmitter release in an identified neuron in *Aplysia* by modulating the Ca²⁺ and K⁺ currents. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980;77(1):629-633.

Shaywitz AJ, Greenberg ME. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:821-861. Review.

Sheffield FD, Roby TB. Reward value of a non-nutritive sweet-taste. *J. Comp. Physiol. Psychol*. 1950;43(6):471-481.

Shema R, Sacktor TC, Dudai Y. Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM zeta. *Science*. 2007;317(5840):951-3.

Shen K, Meyer T. Dynamic control of CaMKII translocation and localization in hippocampal neurons by NMDA receptor stimulation. *Science*. 1999;284(5411):162-166.

Shi SH, Hayashi Y, Petralia RS, Zaman SH, Wenthold RJ, Svoboda K, Malinow R. Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. *Science*. 1999;284(5421):1811-1816.

Shi S, Hayashi Y, Esteban JA, Malinow R. Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons. *Cell*. 2001;105(3):331-343.

Shi Y, Vattam KM, Sood R, An J, Liang J, Stramm L, Wek RC. Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Mol Cell Biol*. 1998;18(12):7499-509.

Shyu AB, Greenberg ME, Belasco JG. The *c-fos* transcript is targeted for rapid decay by two distinct mRNA degradation pathways. *Genes Dev*. 1989;3(1):60-72.

Siegelbaum SA, Camardo JS, Kandel ER. Serotonin and cyclic AMP close single K⁺ channels in *Aplysia* sensory neurones. *Nature*. 1982;299(5882):413-417.

Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S. CREB and memory. *Annu. Rev. Neurosci.* 1998;21:127-148. Review.

Silva AJ, Stevens CF, Tonegawa S, Wang Y. Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science*. 1992;257(5067):201-206.

Simpson D. Phrenology and the neurosciences: contributions of F. J. Gall and J. G. Spurzheim. *ANZ J Surg*. 2005;75(6):475-482.

Sindreu CB, Scheiner ZS, Storm DR. Ca²⁺-stimulated adenylyl cyclases regulate ERK-dependent activation of MSK1 during fear conditioning. *Neuron*. 2007;53(1):79-89.

Skrede KK, Malthé-Sørensen D. Increased resting and evoked release of transmitter following repetitive electrical tetanization in hippocampus: a biochemical correlate to long-lasting synaptic potentiation. *Brain Res*. 1981;208(2):436-441.

Slack JR, Pockett S. Cyclic AMP induces long-term increase in synaptic efficacy in CA1 region of rat hippocampus. *Neurosci Lett*. 1991;130(1):69-72.

Small SA, Wu EX, Bartsch D, Perera GM, Lacefield CO, DeLaPaz R, Mayeux R, Stern Y, Kandel ER. Imaging physiologic dysfunction of individual hippocampal subregions in humans and genetically modified mice. *Neuron*. 2000;28(3):653-664.

Snyder EM, Philpot BD, Huber KM, Dong X, Fallon JR, Bear MF. Internalization of ionotropic glutamate receptors in response to mGluR activation. *Nat Neurosci*. 2001;4(11):1079-1085.

Somogyi P, Klausberger T. Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol*. 2005;562(Pt 1):9-26. Review.

Sonenberg N, Dever TE. Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Curr Opin Struct Biol.* 2003;13(1):56-63. Review.

Sonenberg N, Hershey JWB, Mathews MB. *Translational Control of Gene Expression.* 2000. N Sonenberg, JW Hershey, and MB Mathews, eds. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sood R, Porter AC, Olsen DA, Cavener DR, Wek RC. A mammalian homologue of GCN2 protein kinase important for translational control by phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2 α . *Genetics.* 2000;154(2):787-801.

Sossin WS, DesGroseillers L. Intracellular trafficking of RNA in neurons. *Traffic.* 2006;7(12):1581-9. Review.

Sossin WS, Sacktor TC, Schwartz JH. Persistent activation of protein kinase C during the development of long-term facilitation in *Aplysia*. *Learn Mem.* 1994;1(3):189-202.

Squire LR, Zola-Morgan S. The medial temporal lobe memory system. *Science.* 1991;253(5026):1380-1386. Review.

Squire LR, Zola SM. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(24):13515-13522. Review.

Stanton PK, Sarvey JM. Blockade of long-term potentiation in rat hippocampal CA1 region by inhibitors of protein synthesis. *J Neurosci.* 1984;4(12):3080-3088.

Staubli U, Lynch G. Stable depression of potentiated synaptic responses in the hippocampus with 1-5 Hz stimulation. *Brain Res.* 1990;513(1):113-118.

Steward O, Levy WB. Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *J Neurosci.* 1982;2(3):284-291.

Steward O, Reeves TM. Protein-synthetic machinery beneath postsynaptic sites on CNS neurons: association between polyribosomes and other organelles at the synaptic site. *J Neurosci.* 1988;8(1):176-184.

Steward O, Schuman EM. Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:299-325. Review.

Stoppini L, Buchs PA, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Methods.* 1991;37(2):173-182.

Suen KC, Yu MS, So KF, Chang RC, Hugon J. Upstream signaling pathways leading to the activation of double-stranded RNA-dependent serine/threonine protein kinase in beta-amyloid peptide neurotoxicity. *J Biol Chem.* 2003;278(50):49819-27.

Sutton MA, Schuman EM. Local translational control in dendrites and its role in long-term synaptic plasticity. *J Neurobiol.* 2005;64(1):116-131. Review.

Sutton MA, Schuman EM. Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory. *Cell.* 2006;127(1):49-58. Review.

Takei N, Inamura N, Kawamura M, Namba H, Hara K, Yonezawa K, Nawa H. Brain-derived neurotrophic factor induces mammalian target of rapamycin-dependent local activation of translation machinery and protein synthesis in neuronal dendrites. *J. Neurosci.* 2004;24(44):9760-9769.

Takei N, Kawamura M, Hara K, Yonezawa K, Nawa H. Brain-derived neurotrophic factor enhances neuronal translation by activating multiple initiation processes: comparison with the effects of insulin. *J. Biol. Chem.* 2001;276(46):42818-42825.

Tang H, Hornstein E, Stolovich M, Levy G, Livingstone M, Templeton D, Avruch J, Meyuhas O. Amino acid-induced translation of TOP mRNAs is fully dependent on phosphatidylinositol 3-kinase-mediated signaling, is partially inhibited by rapamycin,

and is independent of S6K1 and rpS6 phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 2001;21(24):8671-8683.

Tang SJ, Reis G, Kang H, Gingras AC, Sonenberg N, Schuman EM. A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(1):467-472.

Terada N, Patel HR, Takase K, Kohno K, Nairn AC, Gelfand EW. Rapamycin selectively inhibits translation of mRNAs encoding elongation factors and ribosomal proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(24):11477-11481.

Thompson RF. In search of memory traces. *Annu Rev Psychol.* 2005;56:1-23. Review.

Thompson RF, Thompson JK, Kim JJ, Krupa DJ, Shinkman PG. The nature of reinforcement in cerebellar learning. *Neurobiol Learn Mem.* 1998;70(1-2):150-176. Review.

Tiedge H, Brosius J. Translational machinery in dendrites of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci.* 1996;16(22):7171-7181.

Topolnik L, Azzi M, Morin F, Kougioumoutzakis A, Lacaille JC. mGluR1/5 subtype-specific calcium signalling and induction of long-term potentiation in rat hippocampal oriens/alveus interneurons. *J. Physiol.* 2006;575(Pt1):115-131.

Torre ER, Steward O. Protein synthesis within dendrites: glycosylation of newly synthesized proteins in dendrites of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci.* 1996;16(19):5967-5978.

Tsokas P, Grace EA, Chan P, Ma T, Sealton SC, Iyengar R, Landau EM, Blitzler RD. Local protein synthesis mediates a rapid increase in dendritic elongation factor 1A after induction of late long-term potentiation. *J Neurosci.* 2005;25(24):5833-5843.

Tsokas P, Ma T, Iyengar R, Landau EM, Blitzer RD. Mitogen-activated protein kinase upregulates the dendritic translation machinery in long-term potentiation by controlling the mammalian target of rapamycin pathway. *J Neurosci*. 2007;27(22):5885-5894.

Tully T, Bourtchouladze R, Scott R, Tallman J. Targeting the CREB pathway for memory enhancers. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(4):267-77. Review.

Tulving E, Schacter DL. Priming and human memory systems. *Science*. 1990;247(4940):301-306.

van Dam EJ, Ruiter B, Kamal A, Ramakers GM, Gispen WH, de Graan PN. N-methyl-D-aspartate-induced long-term depression is associated with a decrease in postsynaptic protein kinase C substrate phosphorylation in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett*. 2002;320(3):129-132.

Vattem KM, Wek RC. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(31):11269-11274.

Vernon E, Meyer G, Pickard L, Dev K, Molnar E, Collingridge GL, Henley JM. GABA(B) receptors couple directly to the transcription factor ATF4. *Mol Cell Neurosci*. 2001;17(4):637-645.

Vickers CA, Dickson KS, Wyllie DJ. Induction and maintenance of late-phase long-term potentiation in isolated dendrites of rat hippocampal CA1 pyramidal neurones. *J Physiol*. 2005;568(Pt 3):803-813.

Viosca J, Malleret G, Bourtchouladze R, Benito E, Vronskava S, Kandel ER, Barco A. Chronic enhancement of CREB activity in the hippocampus interferes with the retrieval of spatial information. *Learn Mem*. 2009;16(3):198-209.

Wang H, Ferguson GD, Pineda VV, Cundiff PE, Storm DR. Overexpression of type-1 adenylyl cyclase in mouse forebrain enhances recognition memory and LTP. *Nat. Neurosci*. 2004;7(6):635-642.

Wong ST, Athos J, Figueroa XA, Pineda VV, Schaefer ML, Chavkin CC, Muglia LJ, Storm DR. Calcium-stimulated adenylyl cyclase activity is critical for hippocampus-dependent long-term memory and late phase LTP. *Neuron*. 1999;23(4):787-798.

Xia Z, Storm DR. The role of calmodulin as a signal integrator for synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(4):267-276. Review.

Xiao MY, Zhou Q, Nicoll RA. Metabotropic glutamate receptor activation causes a rapid redistribution of AMPA receptors. *Neuropharmacology*. 2001;41(6):664-671.

Yao Y, Kelly MT, Sajikumar S, Serrano P, Tian D, Bergold PJ, Frey JU, Sacktor TC. PKM zeta maintains late long-term potentiation by N-ethylmaleimide-sensitive factor/GluR2-dependent trafficking of postsynaptic AMPA receptors. *J Neurosci*. 2008;28(31):7820-7.

Yin JC, Wallach JS, Del Vecchio M, Wilder EL, Zhou H, Quinn WG, Tully T. Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. *Cell*. 1994;79(1):49-58.

Young JZ, Isiegas C, Abel T, Nguyen PV. Metaplasticity of the late-phase of long-term potentiation: a critical role for protein kinase A in synaptic tagging. *Eur J Neurosci*. 2006;23(7):1784-1794.

Young JZ, Nguyen PV. Homosynaptic and heterosynaptic inhibition of synaptic tagging and capture of long-term potentiation by previous synaptic activity. *J Neurosci*. 2005;25(31):7221-7231.

Zhong J, Zhang T, Bloch LM. Dendritic mRNAs encode diversified functionalities in hippocampal pyramidal neurons. *BMC Neurosci*. 2006;7:17.

Zhou Q, Poo MM. Reversal and consolidation of activity-induced synaptic modifications. *Trends Neurosci*. 2004;27(7):378-383. Review.

Zhou Y, Wu H, Li S, Chen Q, Cheng XW, Zheng J, Takemori H, Xiong ZQ. Requirement of TORC1 for late-phase long-term potentiation in the hippocampus. PLoS ONE. 2006 Dec 20;1:e16.

Zhuo M, Zhang W, Son H, Mansuy I, Sobel RA, Seidman J, Kandel ER. A selective role of calcineurin α in synaptic depotentiation in hippocampus. Proc Natl Acad Sci USA. 1999;96(8):4650-4655.

Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. J Neurosci. 1986;6(10):2950-2967.

Zola-Morgan S, Squire LR, Rempel NL, Clower RP, Amaral DG. Enduring memory impairment in monkeys after ischemic damage to the hippocampus. J Neurosci. 1992;12(7):2582-2596.