

Université Bordeaux Segalen

Année 2012

Thèse n° 1921

THESE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement

le 15 juin 2012

Par Aurore THOMAZEAU

née le 14 octobre 1983 à Orléans

**Dysfonctions synaptiques glutamatergiques
dans le cortex préfrontal de modèles murins de trisomie 21
surexprimant le gène Dyrk1a et
stratégies thérapeutiques**

MEMBRES DU JURY

Daniel Voisin

Thérèse Jay

Renaud Touraine

Jean-Maurice Delabar

Olivier Manzoni

Professeur (Bordeaux)

Directeur de recherche (Paris)

Praticien hospitalier (Saint-Etienne)

Directeur de recherche (Paris)

Directeur de recherche (Marseille)

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier Olivier Manzoni de m'avoir encadrée pendant cette thèse. Je le remercie particulièrement pour la confiance qu'il m'a accordée, pour le partage de son expertise électrophysiologique, pour son soutien intellectuel aussi bien scientifique que culturel, pour ses précieux conseils, mais également pour m'avoir offert l'opportunité de voyager. Ce fut très stimulant et un réel plaisir de travailler à ses côtés.

Je souhaite exprimer ma gratitude à Thérèse Jay et Renaud Touraine d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Je remercie également Jean-Maurice Delabar, collaborateur principal de ce travail, d'en avoir été examinateur, ainsi que Daniel Voisin pour avoir accepté de présider le jury.

Je remercie la fine équipe qui a été à mes côtés tout au long de cette thèse, Pascale Chavis, pour l'écoute, les encouragements, l'aide et les conseils multiples ; mes inimitables acolytes, Olivier Lassalle, le « goldworkmate », et Jillian lafrati, le mentor souris plein de surprise, qui ont toujours su rendre l'ambiance de travail plus qu'agréable.

Mes remerciements vont également à ceux qui ont égayé et enrichi mon quotidien, les groupes Manzoni bordelais - Ambre Bertholet, François Georges, Cécilia Gonzalez, Marion Jalabert, Fernando Kasanetz, Mathieu Lafourcade, Richard Piet, Marja Sepers et Dany Verrier - et marseillais - Axel Bernabeu, Lamine Bouamrane, Henry Martin, Daniela Neuhopfer et Juliana Orejarena.

Je remercie aussi les équipes de Jean-Maurice Delabar, Benoit Delatour, Robert Dodd et Nathalie Janel pour le travail effectué pendant notre collaboration.

Un clin d'œil aux collègues du Neurocentre Magendie et de l'IMNED, pour les discussions scientifiques et non-scientifiques, les apéros interminables en terrasse à la victoire ou au soleil Thomas, Anice, Luigi, Belkacem, Bahija, Thibault, Julien, Anaïs, Elke, Robin, Audrey, David, ...

Je remercie le professeur Gean Po-Wu pour m'avoir accueillie à Taïwan dans son laboratoire, avec une pensée particulière pour Yang, Qi et Hui-Ching ainsi que pour la petite bande du programme européen National Science Council 2010.

Merci aux copains de part et d'autres de la France et du monde, Jojo l'unique, Claire-Cé, Camille, Dada, Boulette, Chaumette, Peter Wonderful, PH, Jacsou, Stef, Widad, Papaille, Nems, Slanioc, Amélie, Pascal, Isma, Julie Chob', Le Seb,... ainsi qu'aux petits et grands cousins Fumery, notamment Florence, qui m'ont suivie de loin ou de près dans cette aventure.

Un remerciement spécial à l'impérissable bande orléanaise & Co qui m'a orientée et continue à me guider sur le chemin de la recherche, Sophie slap..., Greg, Olive, le Clem, Mathieu, Anna, Scrapy, Yvan. Merci aux coloc' marseillais, Clément François dit le Clem et Romain Trachel AKA DJ Trach', pour ces deux ans de cohabitation solennels, ces soirées interminables caractérisées par des sessions culinaires hors paires, des interludes musicaux éclectiques et des discussions-délires riches et variés.

Une pensée chaleureuse aux nanas que je quitte pour mieux retrouver, Amélie Simonnet, Marion Jalabert et Mathilde Metna, et avec qui j'ai étroitement partagé depuis le master cette aventure, au travail, à la nouba, comme dans les moments de doute.

Un Merci sincère et singulier à Julien Ariztia avec qui j'ai partagé ces années à longue distance, pour m'avoir épaulée avec enthousiasme, supportée avec patience et appris à avoir moins froid aux yeux.

Enfin, merci du fond du cœur à mère et frère qui m'ont toujours soutenue sans relâche et m'ont permis, entre autres, d'en arriver là. Maman, c'est à toi que tout l'honneur doit en revenir.

RESUME

La trisomie 21 est la première cause de retard mental, phénotype majeur de la maladie. Elle est due à la présence d'un chromosome 21 supplémentaire. De nombreux gènes sont présents sur ce chromosome mais quelques-uns ont été proposés comme candidats pour les phénotypes neurocognitifs associés à la maladie, notamment le gène *Dyrk1a*. Il code pour une sérine-thréonine kinase, *DYRK1A*, à rôle majeur dans le développement cérébral et l'activité synaptique. Le cortex préfrontal sous-tend un ensemble de fonctions cognitives supérieures dont les fonctions exécutives et est impliqué dans la régulation du comportement émotionnel et de l'humeur, composantes largement affectées dans la trisomie 21. Ce travail de thèse a permis de caractériser des défauts majeurs de la transmission et la plasticité synaptique glutamatergique au sein du cortex préfrontal de deux modèles murins différents de trisomie 21: le modèle *mBACtgDyrk1a* surexprimant le gène murin *Dyrk1a* et le modèle *Ts65Dn* surexprimant 130 gènes de l'analogue murin du chromosome 21 dont *Dyrk1a*. Un autre versant de l'étude a concerné l'utilisation d'un composé inhibiteur de l'activité *DYRK1A* ou d'autres cibles cellulaires pour corriger les altérations préfrontales observées, constituant ainsi de nouvelles pistes thérapeutiques pour les phénotypes neurocognitifs associés à la trisomie 21.

ABSTRACT

Down syndrome is the major cause of mental retardation, the main phenotype of the pathology. It is due to an extra chromosome 21. Many genes have been proposed as candidates for the neurocognitive phenotypes of Down syndrome, notably *Dyrk1a*. It encodes the serine-threonine kinase *DYRK1A* which is involved in brain development and synaptic functions. The prefrontal cortex mediates higher cognitive functions, such as executive functions and emotional regulation. This study highlighted major deficits in prefrontal cortex glutamatergic transmission and plasticity of two mouse models for Down syndrome: the overexpressing *Dyrk1a* *mBACtgDyrk1a* model and the *Ts65Dn* model, overexpressing around 130 murine orthologous genes of HSAS21 chromosome. Another aspect of this study was the development of new effective therapeutic strategy for Down syndrome neurocognitive phenotypes based on *DYRK1A* or other cellular targets activity inhibition.

PUBLICATIONS
COMMUNICATIONS AFFICHEES
PRINCIPALES ABREVIATIONS

PUBLICATIONS

Green tea rescues prefrontal deficits in a mouse model of Down syndrome.

Aurore Thomazeau, Zsuzsa Penke, Olivier Lassalle, Benoit Souchet, Jillian Iafrati, Fayçal Guedj, Nathalie Janel, Pascale Chavis, Jean Delabar, Benoit Delatour, and Olivier J. Manzoni
En préparation, Molecular Psychiatry

Overexpression of Dyrk1a alters endocannabinoid-mediated retrograde synaptic long-term depression in the mouse prefrontal cortex.

Aurore Thomazeau, Olivier Lassalle, Fayçal Guedj, Jean Delabar, and Olivier J. Manzoni
En préparation, Journal of Neuroscience

The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors.

Marrs WR, Blankman JL, Horne EA, **Thomazeau A**, Lin YH, CoyJ, Bodor AL, Muccioli GG, Hu SS, Woodruff G, Fung S, Lafourcade M, Alexander JP, LongJZ, Li W, Xu C, Möller T, Mackie K, Manzoni OJ, Cravatt BF, Stella N
Nature Neuroscience. 2010 Aug;13(8):951-7. Epub 2010 Jul 25.

COMMUNICATIONS AFFICHEES

Prefrontal cortex synaptic plasticity deficits and pharmacotherapy in a new mouse model of partial Down syndrome.

Thomazeau A, Lassalle O, Guedj F, Delabar JM, Manzoni OJ.

Société des Neurosciences Américaines, Washington, Novembre 2011

Prefrontal cortex synaptic deficits and rescue in a mouse model of partial trisomy 21.

Thomazeau A, Lassalle O, Delabar JM, Manzoni OJ

Société de Neurosciences Françaises, Marseille, mai 2011

Prefrontal cortex synaptic deficits and rescue in a mouse model of partial trisomy 21.

Thomazeau A, Lassalle O, Delabar JM, Manzoni OJ

Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale Science de La Vie Santé, Arcachon, avril 2011

Alteration of prefrontal cortex synaptic plasticity in a BAC model of partial trisomy 21.

Thomazeau A, Lassalle O, Delabar JM, Manzoni OJ

Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale Science de La Vie Santé, Arcachon, avril 2010

Alteration of prefrontal cortex synaptic plasticity in a BAC model of partial trisomy 21.

Thomazeau A, Lassalle O, Delabar JM, Manzoni OJ

Journées de l'INMED, Marseille, juin 2010

PRINCIPALES ABREVIATIONS

2-AG	2-ArachidonylGlycérol
ABHD6	α - β -Hydrolase Domain 6
ABHD12	α - β -Hydrolase Domain 12
AC	Adénylate Cyclase
ACSF	(Artificial CerebroSpinal Fluid) liquide céphalorachidien artificiel
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
AM251	antagoniste des CB1Rs
AMPc	Adénosine Mono Phosphate cyclique
AMPA	Amino-3-hydroxy-5-Méthyl-4-ioxasole-Propionate Receptor
AMPA-R	récepteur AMPA
AP5	antagoniste des NMDA-R
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ATP	Adénosine TriPhosphate
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BAPTA	chélateur calcique
BLA	(Basolateral Amygdala) amygdale basolatérale
CA1-3	Corne d'Ammon région 1 à 3
CaM	Calmoduline
CaMK	(Calmoduline dependant kinase) kinase dépendante de la calmoduline
CaN	calcineurine
CB1-R	récepteur cannabinoïdes de type 1
CB2-R	récepteur cannabinoïdes de type 2
CCA	Cortex Cingulaire Antérieur
CCi	Cortex Cingulaire
CE	(Central nucleus) noyau central de l'amygdale
CNQX	antagoniste des AMPA-R
CP55, 940	agoniste cannabinoïde
CPF	Cortex Préfrontal
CPFdl	Cortex Préfrontal dorsolatéral
CPFI	Cortex Préfrontal Latéral
CPFm	Cortex Préfrontal médian
CPSE	Courant PostSynaptique Excitateur
CPSI	Courant PostSynaptique Inhibiteur
COF	Cortex OrbitoFrontal
CREB	(cAMP Responsive Element Binding Protein) facteur de transcription activé par l'AMPc
CS	(Conditionned stimulus) stimulus conditionné
DAG	DiAcylGlycérol

DAGL	DiAcylGlycérol Lipase
DA	Dopamine
DHPG	((RS)-3,5-dihydroxyphenylglycine) agoniste des mGluRs groupe I
DSCR	Down Syndrome Critical Region (ou DCR)
DSE	Depolarization-induced Suppression of Excitation
DSI	Depolarization-induced Suppression of Inhibition
DYRK1A	Dual specificity tyrosine-phosphorylated and Regulated Kinase 1A
ERK	Extracellular Regulated Kinase
EAAT	Excitatory Amino Acid transport
EGCG	gallate d'épigallocatechine
eCB	endocannabinoïdes
EGTA	chélateur calcique
FAAH	Fatty Acid Amino Hydrolase
GABA	(Gamma Amino Butyric Acid) acide gamma aminobutyrique
GABAR	récepteur au GABA
GDP	Guanosine Diphosphate
GFP	Green Fluorescent Protein
GIRK	G protein-activated Inwardly Rectifying potassium channels
GLT	transporteur du glutamate
GTP	Guanosine Triphosphate
GPCR	(G protein Coupled Receptor) récepteur couplé aux protéines G
GRIP	Glutamate Receptor Interacting Protein
HFS	High frequency stimulation
5-HT	récepteur à la sérotonine
HSA	(Homo Sapiens) chromosome humain
iGluR	récepteur ionotropique au glutamate
IL	(InFralimbic) cortex infralimbique
IP3	Inositol tri-Phosphate
IRM	Imagerie par résonance magnétique
KA-R	(Kainate Receptor) récepteur au kaïnate
LTD	(Long Term Depression) dépression à long-terme
LTP	(Long Term Potentiation) potentialisation à long-terme
LY341495	antagoniste des mGluRs
LFS	Low frequency stimulation
M1-4	segment transmembranaire 1 à 4
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MAGL	MonoAcyl Glycérol Lipase
MAGUK	(Membrane Associated GUanylate Kinase) guanylate kinase associée à la membrane

MD	noyau médiodorsal du thalamus
mEPSC	CPSE miniature
eEPSC	CPSE évoqué
sEPSC	CPSE spontané
mGluR	(metabotropic Glutamate Receptor) récepteur métabotrope au glutamate
MMU	(Mus Musculus Chromosome) chromosome murin
MNB	MiNiBrain
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NEM	N-EthylMaleimide
NSF	(N-ethylmaleimide-Sensitive Factor) facteur sensible au NEM
NMDA-R	(N-Méthyl-D-Aspartate Receptor) récepteur NMDA
nNOS	(neural Nitric Oxide Synthase) synthase d'oxyde nitrique
NAC	(Nucleus Accumbens) noyau accumbens
NArPE	N-arachidonoyl-phosphatidyl-ethanolamine
PA	Potentiel d'Action
PAC	(P1-derived <i>Artificial Chromosome</i>) <i>chromosome de phage</i>
PICK	protéine interagissant avec la kinase C
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PL	(PreLimbic) cortex prélimbique
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PP1	Protéine Phosphatase 1
PPSE	Potentiel Postsynaptique Excitateur
PPSEf	Potentiel Postsynaptique Excitateur de champ
PPR	(Paired Pulse Ratio) ratio de paire de stimulations
Pr	(Probability of Release) probabilité de libération d'une vésicule suite à un PA
PSD	(Post Synaptic Density) densité postsynaptique
PSD 95	Protéine de la densité postsynaptique 95
PTSD	(Post Traumatic Stress Disorder) syndrome de stress post-traumatique
PTR	(Pan Troglodyte chromosome) chromosome de singe
PYR	Cortex Pyriforme
QI	Quotient Intellectuel
RE	Réticulum Endoplasmique
RyR	canaux calciques sensibles à la ryanodine
RRPs	(Readily Releasable Pool) réserves rapidement mobilisables
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor
SNC	Système Nerveux Central
SNP	Système Nerveux Périphérique
SNP	(Single Polymorphism Nucleotide) <i>polymorphisme d'un seul nucléotide</i>
STDP	Spike Timing Dependant Plasticity

SNAREs	Soluble NSF Attachment Receptor
STP	Short Term Potentiation
STD	Short Term Depression
TEP	Tomographie par émission de positron
THL	Tetrahydrolipstatin, inhibiteur de DAGL
TRPV1	récepteur vanilloïde de type 1
TTX	tétradotoxine
URB602	inhibiteur de la MAGL
URB597	inhibiteur de la FAAH
US	(Unconditioned Stimulus) stimulus non-conditionné
VGLUT	(Vesicular GLUtamate Transporter) transporteur vésiculaire au glutamate
VSCC	(Voltage Sensitive Calcium Channel) canal calcique dépendant du voltage
VSSC	(Voltage Sensitive Sodium Channel) canal sodique dépendant du voltage
VTA	(Ventral Tegmental Area) aire tegmentale ventrale
WWL70	inhibiteur de l'ABHD6
YAC	(Yeast Artificial Chromosome) chromosome artificiel de levure

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
I. La trisomie 21.....	3
1. Généralités.....	3
1.1. Un peu d'histoire	3
1.1.1. Description clinique	3
1.1.2. Caractérisation génétique	3
1.2. Epidémiologie, diagnostic et étiologie de la trisomie 21.....	3
1.2.1. Quelques chiffres.....	3
1.2.2. Dépistage et diagnostic prénatal.....	4
1.2.3. Etiologie	5
1.3. Expression phénotypiques de la trisomie 21.....	6
1.3.1. Retard mental et autres atteintes neurologiques.....	6
1.3.2. Dysmorphies faciales et anomalies musculo-squelettiques	8
1.3.3. Malformations viscérales.....	8
1.3.4. Défaillance du système immunitaire.....	9
1.3.5. Désordres hormonaux	10
1.3.6. Vieillesse accélérée et maladie d'Alzheimer.....	10
2. Le chromosome 21.....	11
2.1. Cartographie du chromosome 21.....	11
2.1.1. Cartographie physique.....	11
2.1.2. Cartographie génique	12
2.2. Expression génique et protéome du HSA21.....	13
2.3. Orthologie	13
2.4. Dosage génique et notions de gènes candidats	15
3. La protéine DYRK1A	16
3.1. Généralités.....	17
3.1.1. Gène et orthologie.....	17
3.1.2. Expression et localisation cellulaire.....	17
3.2. Structure protéique	18
3.3. Activité kinase.....	19

3.3.1. Activation de la kinase DYRK1A	19
3.3.2. Substrats et fonctions biologiques	20
3.4. Inhibition de l'activité DYRK1A	21
3.4.1. Inhibiteurs d'origine naturelle	22
3.4.1. Inhibiteurs synthétiques	22
4. Les modèles d'étude de la trisomie 21.....	23
4.1. Les modèles transchromosomiques	23
4.1.1. Les souris chimères ES(#21)-10	23
4.1.2. Les souris transchromosomiques Tc1.....	24
4.2. Les modèles de trisomie totale ou partielle pour le MMU16	24
4.2.1. Les souris Ts16	24
4.2.2. Les souris Ts65Dn.....	25
4.2.3. Les souris Ts1Cje	26
4.2.4. Les souris Ms1Ts65	26
4.2.5. Les souris Ts1Rhr, Ms1Rhr et Ms1Rhr/Ts65Dn	26
4.3. Les modèles poly-transgéniques pour les gènes de la région DCR-1 humaine.....	27
4.4. Les modèles monogéniques surexprimant Dyrk1a	27
4.4.1. Les souris mcDNA-TgDyrk1a d'Estivill	28
4.4.2. Les souris hBAC-TgDyrk1a de Song.....	29
4.4.3. Les souris mcDNA-TgDyrk1a de Cratbee	29
4.4.4. Les souris mcDNA-TgDyrk1a de D'Arcangelo	29
4.4.5. Les souris mBACtgDyrk1a de Delabar.....	29
II. Le cortex préfrontal.....	31
1. Généralités	31
2. Organisation du CPF.....	32
2.1. Les différentes subdivisions.....	32
2.2. Organisation laminaire	33
2.3. Organisation en colonnes	34
3. Connectivité	36
3.1. Connectivité intrinsèque : les microcircuits	36
3.1.1. Connexions intra- et interlaminaires.....	36

3.1.2. Connectivité au sein du CPF	38
3.2. Connectivité extrinsèque	38
3.2.1. Afférences	38
3.2.2. Efférences	40
4. Fonctions physiologiques du CPF.....	41
4.1. Fonctions exécutives.....	42
4.1.1. Mémoire de travail	42
4.1.2. Processus attentionnels.....	43
4.1.3. Prise de décision	44
4.2. Régulation des composantes émotionnelles et motivationnelles	45
5. Pathologies liées du CPF.....	47
5.1. Troubles de l'apprentissage	47
5.2. Addiction aux drogues	47
5.3. Schizophrénie.....	49
5.4. Troubles de l'humeur et troubles anxieux.....	51
III. La synapse glutamatergique	53
1. Généralités sur la synapse.....	53
1.1. Un peu d'histoire	53
1.2. Les différents types.....	53
1.2.1. Les synapses chimiques	53
1.2.1.1. La synapse neuro-effectrice	54
1.2.1.2. La synapse neuro-neuronique.....	55
1.2.2. Les synapses électriques.....	55
2. Structure générale de la synapse glutamatergique	56
2.1. L'élément présynaptique : la terminaison axonale	57
2.1.1. La machinerie de synthèse	57
2.1.2. Les vésicules synaptiques	58
2.1.3. Les canaux calciques voltage-dépendant présynaptiques	59
2.2. Le compartiment postsynaptique : l'épine dendritique.....	60
2.2.1. L'épine dendritique.....	60
2.2.2. La densité postsynaptique	62

2.2.3. Les récepteurs au glutamate	64
2.2.3.1. Les récepteurs ionotropiques : iGluR.....	64
2.2.3.2. Les récepteurs métabotropiques : mGluR	66
3. La transmission synaptique glutamatergique basale.....	67
3.1. Séquence fonctionnelle	67
3.1.1. Genèse et propagation de l'influx nerveux	67
3.1.2. Mécanismes de libération du glutamate.....	69
3.1.3. Réception du message et intégration dendritique.....	70
3.2. Régulation et modulation de la transmission synaptique.....	73
3.2.1. Régulation présynaptiques : la libération de glutamate	73
3.2.2. Le glutamate dans la fente synaptique	75
3.2.3. Régulations postsynaptiques de la transmission glutamatergique.....	76
3.2.3.1. Le trafic dendritique des récepteurs glutamatergiques	76
3.2.3.2. Le cycle de phosphorylation des récepteurs.....	78
3.2.3.3. La régulation par les mGluR postsynaptiques.....	78
4. La plasticité synaptique.....	79
4.1. Plasticité synaptique à court-terme	79
4.1.1. La dépression à court-terme : STD	79
4.1.2. La potentialisation à court-terme : STP.....	80
4.2. Plasticité synaptique à long-terme	81
4.2.1. La potentialisation à long-terme : LTP.....	81
4.2.2. La dépression à long-terme : LTD	84
4.3. Bidirectionnalité, coopérativité et plasticité de la plasticité synaptique	87
4.4. Rôle physiologique de la plasticité à long terme.....	89
4.4.1. Plasticité synaptique hippocampique et apprentissage spatial	89
4.4.2. Plasticité synaptique de l'amygdale et conditionnement de peur.....	90
4.5. Pathologies liées aux plasticités synaptiques : quelques exemples.....	91
4.5.1. Plasticité synaptique mésocorticolimbique et addiction	91
4.5.2. Plasticité synaptique et dépression.....	92
IV. La trisomie 21 : une synaptopathie ?	93
1. Anomalies structurales dans la trisomie 21	93

2. Dysfonctionnements synaptiques dans les modèles murins de trisomie 21.....	95
2.1. La transmission glutamatergique	95
2.1.1. Les propriétés neuronales	95
2.1.2. La transmission synaptique basale excitatrice	95
2.2. La plasticité synaptique glutamatergique.....	97
3. Trisomie 21, synapse et cortex préfrontal.....	99
V. Problématique et objectifs	100
RESULTATS.....	103
1. Etude 1 : “Green tea rescues prefrontal deficits in a mouse model of Down syndrome”	105
1.1. Contexte de l’étude	105
1.2. But de l’étude et approches expérimentales	105
1.3. Résultats.....	106
<i>Publication</i>	
1.4. Discussion	107
2. Etude 2 : “Endocannabinoids dependant LTD impairment in a mouse model of partial Down syndrome”	111
2.1. Contexte de l’étude	111
2.2. But de l’étude et approches expérimentales	111
2.3. Résultats.....	112
<i>Publication</i>	
2.4. Discussion	115
3. Etude 3 : Profil synaptique glutamatergique dans le CPF du modèle murin de trisomie 21 Ts65Dn	117
3.1. Contexte de l’étude	117
3.2. But de l’étude et approches expérimentales	117
3.3. Résultats.....	117
3.3.1. Propriétés intrinsèques des neurones pyramidaux du CPF.....	117
3.3.2. Gamme de plasticité synaptique	118
3.4. Discussion	121

4. Collaboration : “The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors”	123
4.1. Contexte de l’étude	123
4.2. But de l’étude et approches expérimentales	123
4.3. Résultats.....	124
<i>Publication</i>	
4.4. Discussion	125
 CONCLUSION GENERALE – PERSPECTIVES	127
 Bibliographie.....	135

INTRODUCTION

I. La trisomie 21

1. Généralités

La trisomie 21, également appelée syndrome de Down dans les pays anglo-saxon, est l'anomalie chromosomique la plus fréquente et la principale cause génétique de retard mental. Sa description clinique puis génétique se déroula parallèlement aux avancées scientifiques des XIX^{ème} et XX^{ème} siècles. Ce fut la première aberration chromosomique découverte et la première maladie pour laquelle une relation entre le génotype et le phénotype a été mise en évidence.

1.1. Un peu d'histoire

1.1.1. Description clinique

Jean Etienne ESQUIROL (1722-1840), médecin aliéniste réformateur de la psychiatrie hospitalière française, publia dans son traité « *Des maladies mentales considérées sous le rapport médical, hygiénique et médico-légal* » de 1838, la première description clinique de la trisomie 21 appelée idiotie (*Esquirol 1838*).

S'en suivit en 1866 une description plus détaillée du psychiatre Edouard SEGUIN (1812-1880) dans « *Idiocy and its treatment by the physiological method* », qui l'avait préalablement nommée « idiotie furfuracée » de part l'aspect de la peau des patients permettant ainsi de la différencier du crétinisme ou hypothyroïdie congénitale (Seguin, 1866).

Cette même année, John Langdon DOWN (1828-1896) dans « *Observations on an Ethnic Classification of Idiots* » donna une définition clinique de la trisomie 21 alors appelée « idiotie mongoloïde » en raison de la ressemblance de faciès entre un groupe de patients de Down et le peuple mongole (Down, 1886).

1.1.2. Caractérisation génétique

Il faudra attendre plus d'un siècle après le traité d'Esquirol, au cours duquel furent découverts entre autres, les chromosomes, leur rôle dans l'hérédité, la mitose et le caryotype, pour que l'origine cytogénétique suspectée de la trisomie 21 soit dévoilée.

En 1959, l'équipe française composée de Raymond TURPIN, Jérôme LEJEUNE et Marthe GAUTHIER établit le caryotype de trois enfants mongoliens, les amenant à identifier l'aberration chromosomique à l'origine de la maladie : la présence d'un chromosome 21 surnuméraire (figure 1).

1.2. Epidémiologie, diagnostic et étiologie de la trisomie 21

1.2.1. Quelques chiffres

La trisomie 21 est l'aneuploïdie viable la plus fréquente.

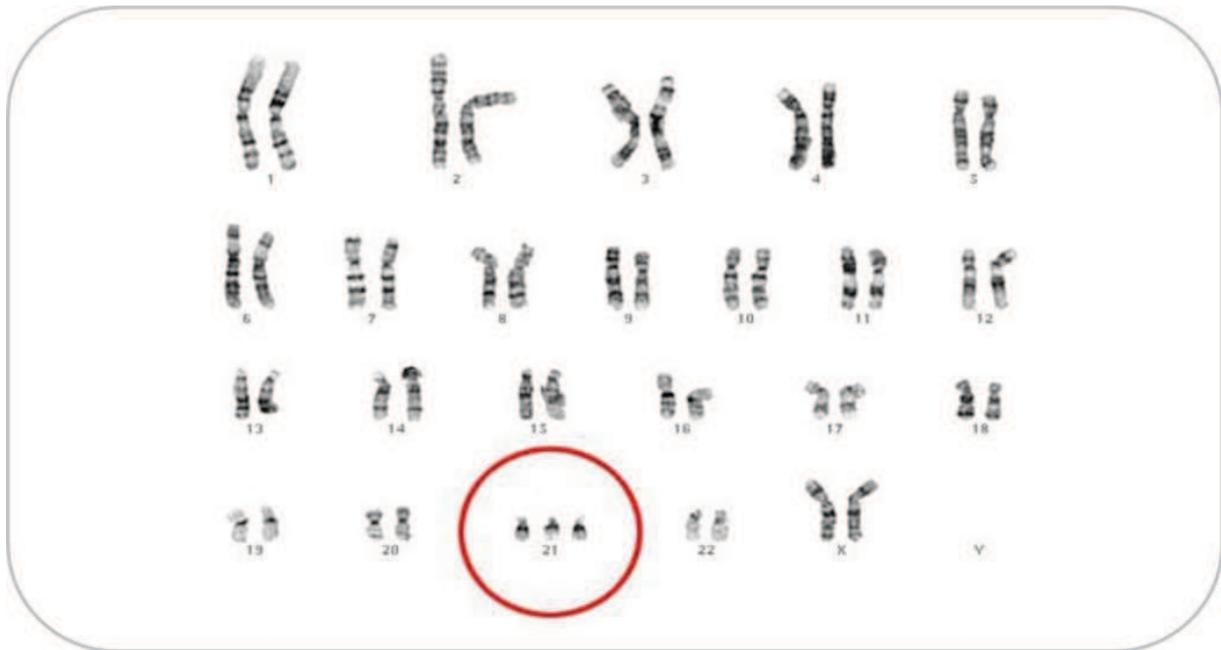


Figure 1. Caryotype d'une femme porteuse de la trisomie 21 révélant la présence d'un troisième chromosome 21 (47 XX, +21).

Dans le monde, on estime à environ 60 millions le nombre de personnes actuellement atteintes de trisomie 21, dont 50 000 en France. Dans les années 50, leur espérance de vie était d'une vingtaine d'années. Désormais, elle se rapproche de celle de la population générale grâce à une prise en charge appropriée des patients (Roizen and Patterson, 2003). La prévalence actuelle est d'environ 1/700 naissances en France soit une incidence de 1100 nouveaux cas par an. Mais le risque d'être porteuse d'un fœtus trisomique 21 augmente avec l'âge maternel (Yoon et al., 1996) (figure2).

On observe par ailleurs que la prévalence de la trisomie 21 à la naissance est bien moins importante que celle à la conception. Les pertes fœtales sont dues à la non-viabilité de certains fœtus atteints de trisomie 21 (Morris et al., 1999) et aux interruptions volontaires de grossesse suite à un test prénatal positif.

1.2.2. Dépistage et diagnostic prénatal

Bien que l'âge de la maternité augmente, l'incidence à la naissance de la trisomie 21 a diminué significativement dans plusieurs pays, après la mise en place du dépistage prénatal. Celui-ci fait appel à différentes mesures biologiques, biochimiques, échographiques et cliniques, qui conjointement avec l'âge maternel et l'âge de la grossesse, permettent un calcul de risque plus précis que celui se basant uniquement sur l'âge maternel.

La France a opté depuis juin 2009 pour un dépistage combiné par mesure des marqueurs sériques (l'hormone chorionique gonadotrope, la protéine plasmatique placentaire A et l'œstriol) et morphologique (clarté nucale et longueur crânio-caudale) au premier puis au second semestre.

Cet examen n'est pas obligatoire mais systématiquement proposé à la femme enceinte. Il permet d'orienter vers un éventuel diagnostic prénatal qui constate ou exclut de manière

certaine la présence de l'anomalie génétique, en établissant le caryotype fœtal par choriocentèse (prélèvement de cellules du futur placenta) ou amniocentèse (ponction du liquide amniotique).

Après un diagnostic prénatal positif, la femme enceinte peut demander une interruption médicale de grossesse à condition qu'une attestation médicale lui soit délivrée confirmant qu'il existe une forte probabilité que l'enfant à naître soit atteint d'une « affection d'une particulière gravité reconnue incurable au moment du diagnostic », telle la trisomie 21.

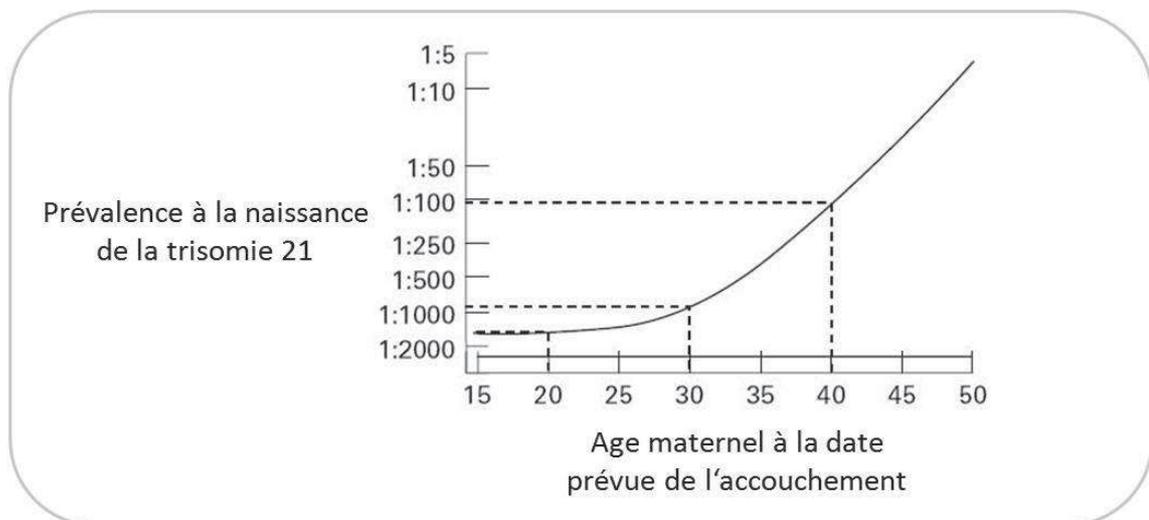


Figure 2. Prévalence à la naissance de la trisomie 21 en fonction de l'âge maternel (d'après Noble, 1998).

1.2.3. Etiologie

Dans 92% des cas, la trisomie est dite **libre et homogène**. Libre, car le chromosome 21 surnuméraire provient d'une non-disjonction méiotique lors de la formation des gamètes (généralement l'ovule) : il est donc « libre » et dans sa totalité. Homogène, car ce chromosome 21 est présent en trois copies dans toutes les cellules de l'organisme.

Une trisomie 21 **par translocation** est retrouvée dans 5% des cas : le chromosome 21 supplémentaire n'est pas libre mais « transloqué », c'est-à-dire attaché à un autre chromosome. La moitié de ces cas de trisomie est héritée, l'autre moitié survient de novo. Si la translocation n'implique qu'une portion du chromosome 21, on parle de trisomie partielle. Dans 95% des cas, la translocation est dite « robertsonienne », du nom du généticien qui l'a observée pour la première fois en 1916: il y a fusion du chromosome 21 avec un autre chromosome acrocentrique (13, 14, 15, 21, 22) au niveau des centromères ou des bras courts. Il en résulte un seul chromosome mixte, le deuxième formé des bras courts étant perdu. Ce type de translocation non-réciproque est également appelé fusion centrique. La translocation la plus souvent observée est la 14-21.

Dans 5% des cas, il s'agit d'une translocation réciproque impliquant le bras long du chromosome 21 et n'importe quel autre chromosome.

Une trisomie 21 **en mosaïque** est observée dans 3% des cas. Elle se définit par la coexistence, dans des proportions variables selon les tissus, d'au moins deux populations cellulaires : une normale et une porteuse d'une trisomie 21. Cette mosaïque provient d'un accident mitotique (non-disjonction ou perte d'un chromosome) survenu au cours des premières divisions cellulaires du zygote initial qui peut être soit normal (46,XX ou XY), soit porteur d'une trisomie 21 homogène (47,XX,+21 ou 47,XY,+21).

1.3. Expression phénotypique de la trisomie 21

Les patients porteurs de Trisomie 21 présentent un large spectre de symptômes cliniques touchant tous les systèmes, au niveau structural et fonctionnel. La prévalence et la sévérité de ces symptômes sont très variables d'un individu à un autre et d'une forme de trisomie 21 à une autre (figure 4). Le phénotype de l'enfant atteint de trisomie 21 en mosaïque est imprévisible en raison de la répartition tissulaire aléatoire des populations cellulaires normales et trisomiques.

1.3.1. Retard mental et autres atteintes neurologiques

L'Organisation mondiale de la santé (OMS), dans sa Classification internationale des maladies (CIM-10), définit le retard mental ou déficience intellectuelle comme un « arrêt du développement mental ou un développement mental incomplet, caractérisé par une insuffisance des facultés intellectuelles -notamment au niveau des fonctions cognitives, du langage, de la motricité et des performances sociales » ainsi que du comportement adaptatif, se manifestant avant l'âge adulte.

La trisomie 21 en représente environ 30% des cas modérés à sévères de retard mental, ce qui en fait la principale cause génétique. La déficience intellectuelle est *LE* phénotype prépondérant et invariable de la pathologie. C'est également l'aspect le plus handicapant d'un point de vue santé publique: tous les sujets atteints de trisomie 21 sont caractérisés par de nombreuses atteintes neurologiques et comportementales, des désordres cognitifs et un faible quotient intellectuel (QI) (Vicari et al., 2004, 2007; Dierssen et al., 2009) les rendant généralement peu autonomes. Une prise en charge adaptée, rapide et efficace permet néanmoins aux patients d'améliorer considérablement leurs performances intellectuelles (Dierssen et al., 2009).

Quotient intellectuel

Le quotient intellectuel (QI) reflète les aptitudes intellectuelles qui, tenant compte de l'âge et de la faculté d'adaptation aux situations, permet d'évaluer l'intensité de la déficience mentale. Le test de WESCHLER, nom du psychologue américain qui l'a conçu, est un standard pour l'évaluation du QI. Le QI mondial moyen est compris entre 90 et 110 ; on parle de déficience intellectuelle pour un QI<70 avec :

- 50-70 : retard moyen
- 35-50 : retard modéré
- 20-35 : retard sévère
- QI < 20 : retard profond

Tous les individus porteurs de trisomie 21 présentent un faible QI, allant de modérément (70) à sévèrement retardé (30) (Dierssen et al., 2003; Vicari et al., 2007) (figure 3).

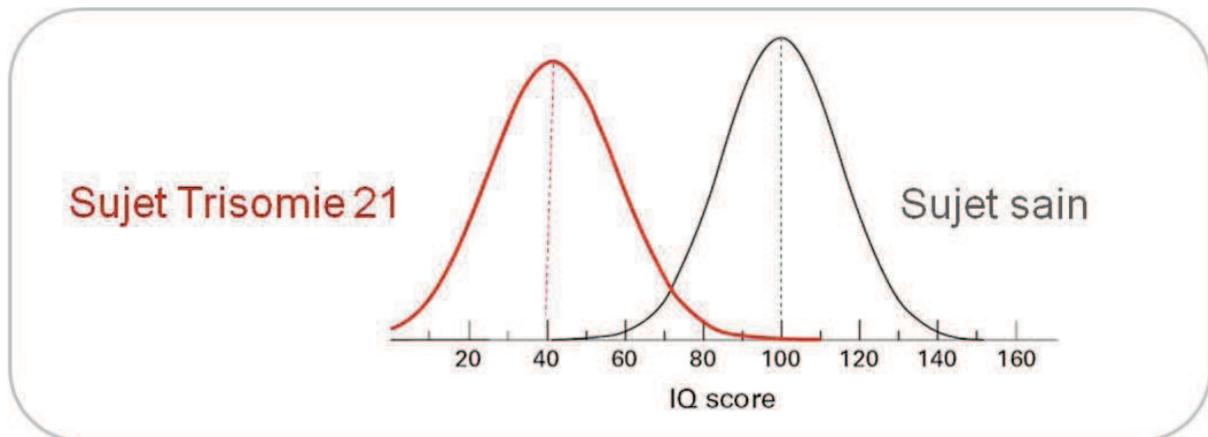


Figure 3. Distribution du QI chez des patients de 20 ans atteints ou non de trisomie 21 (d'après Noble, 1998).

Contrairement à la population générale, leur QI décroît progressivement et ce, dès les premières années de la vie. Cette décroissance ne serait pas liée à une incapacité des enfants à apprendre une nouvelle tâche mais à une difficulté à les reproduire correctement (Delabar et al., 2006). Elle pourrait être expliquée par les déficits de langage mais aussi par un vieillissement accéléré et par la démence sénile de type Alzheimer observée chez les patients trisomiques dès 40 ans de manière fréquente (Lott and Head, 2005).

Retard psychomoteur et cognitif

L'enfance précoce est caractérisée par un développement psychomoteur lent.

Les premiers stades d'apprentissage de la motricité sont retardés et ce de manière croissante au cours du développement. Ceci se reflète sur l'âge moyen de la marche qui est d'environ 2 ans pour un enfant trisomie 21 contre 1 an pour un enfant normal (Ulrich et al., 2001). Ce décalage s'expliquerait par une difficulté du maintien de la posture due à une hypotonie générale, à une hyperlaxité ligamentaire (entraînant une mobilité excessive des articulations) et à un défaut des mécanismes de contrôle de la posture.

Le retard de développement psychomoteur se manifeste de manière plus notable par de faibles capacités linguistiques (compréhension et expression). Au cours de la petite enfance, les problèmes d'articulation liés à l'hypotonie bucco-faciale et des muscles de la respiration ainsi que l'hyperlaxité ligamentaire entravent le développement pré-langagier et l'acquisition de la structure prosodique (Chapman and Hesketh, 2001). Au fur et à mesure de l'apprentissage de la parole, les défauts de syntaxe et d'intelligibilité du langage expressif se révèlent, associés à des déficits spécifiques de la mémoire verbale à court terme (Purser and Jarrold, 2005; Næss et al., 2011). Les problèmes de surdité – dus à des otites répétées - et ophtalmologiques -le plus souvent myopie ou astigmatisme- participent au défaut de maîtrise du langage.

Les patients atteints de trisomie 21 présentent des capacités normales dans l'apprentissage de tâches simples mais des difficultés majeures dans les tâches faisant appel à la mémoire

spatiale (Vicari et al., 2005) et à long terme (Carlesimo et al., 1997), et de manière générale aux fonctions exécutives (Rowe et al., 2006).

Troubles du comportement

Les patients trisomie 21 peuvent manifester des troubles comportementaux notamment adaptatifs tels que l'anxiété ou la dépression (Walker et al., 2011), des déficits attentionnels et de l'hyperactivité. Plus rarement sont constatés des désordres autistiques ou des comportements agressifs. Ils sont généralement très sociables et affectifs (Roizen and Patterson, 2003).

1.3.2. Dismorphies faciales et anomalies musculo-squelettiques

Les caractéristiques physiques associées à la trisomie 21 ont été les premières à être décrites. Dès la naissance, les individus porteurs de trisomie 21 présentent un faciès typique associé à une brachycéphalie (malformation du crâne) : le visage est rond et plat, le crâne est plus petit et l'occiput aplati. Les fentes palpébrales sont obliques en haut et en dehors (yeux bridés) et associées à un épicanthus interne (repli de peau). L'iris peut présenter des tâches de couleur appelées tâches de Brushfield. La nuque est courte, plate et large avec un excès de peau et les premières vertèbres cervicales présentent des malformations. La racine nasale est plate, le nez court et les narines antéversées. La bouche est petite et ouverte en permanence, les lèvres et la langue sont épaisses. Les oreilles sont petites et rondes avec un repli horizontal du bord supérieur du repli entourant le pavillon de l'oreille.

Les individus porteurs de trisomie 21 se caractérisent également par un corps trapu, un bassin étroit, un abdomen distendu, parfois des scoliose malformatives secondaires à l'hypotonie et à l'hyperlaxité ligamentaire générale. Des malformations des membres sont également constatées: des mains larges avec des doigts courts et ne présentant qu'une seule fissure transversale ainsi qu'une brachymésophalangie (raccourcissement de la deuxième phalange) et une clinodactylie (déviation latérale) du 5ème doigt, des pieds petits, larges et plats présentant un écartement important des deux premiers orteils (Delabar et al., 2006).

1.3.3. Malformations viscérales

Malformations cérébrales

De manière générale, une microcéphalie est observée chez les sujets adultes atteints de trisomie 21. En effet, leur cerveau serait plus petit que celui des sujets normaux. Des études anatomiques post-mortem ont mis en évidence une diminution globale du poids du cerveau chez des patients atteints de trisomie 21 (Delabar et al., 2006; Guihard-Costa et al., 2006). Des études d'imagerie ont par la suite confirmé cette observation et révélé que les lobes frontaux, l'hippocampe ou encore le cervelet étaient préférentiellement touchés (Raz et al., 1995; Pinter et al., 2001a; Krakuski et al., 2002; Teipel et al., 2003, 2004; Delabar et al., 2006; Rachidi and Lopes, 2007). A l'inverse, une augmentation de la taille de la substance grise sous-corticale, notamment du gyrus parahippocampique, a également été reportée (Raz et al., 1995; Pinter et al., 2001b). Ces altérations morphologiques sont très variables en

fonction des stades développementaux mais également des individus concernés. Elles sont associées à des modifications de la composition cellulaire, comme une diminution des densités neuronales corticale, hippocampique et cérébelleuse (Delabar et al., 2006; Rachidi and Lopes, 2007; Larsen et al., 2008). Des études ont suggéré que cette diminution de la densité neuronale était due à un déclin des unités neuronales prolifératives (Haydar et al., 1996, 2000). En effet, un arrêt de la neurogénèse (Larsen et al., 2008), ou encore des défauts de la prolifération et de la différenciation neuronale (Guidi et al., 2008, 2011) ont été reportés dans les cerveaux de sujets atteints de trisomie 21. La lamination corticale serait retardée et désorganisée au cours du développement de fœtus porteurs de trisomie 21.

La morphologie neuronale serait également modifiée. Les neurones du cortex cérébral de fœtus et d'enfants porteurs de trisomie 21 présenteraient une réduction de la longueur et du branchement de l'arborisation dendritique (Vuksić et al., 2002; Benavides-Piccione et al., 2004) ainsi que des défauts de myélinisation des axones (Rachidi and Lopes, 2007). De plus, il y aurait une diminution des épines dendritiques des neurones pyramidaux du cortex et de l'hippocampe aux alentours de la période post-natale précoce (Suetsugu and Mehraein, 1980; Ferrer and Gullotta, 1990; Kaufmann and Moser, 2000; Fiala et al., 2002) avec toutefois une perte plus importante au niveau des neurones pyramidaux des régions hippocampiques CA1 et CA2-CA3 (Ferrer and Gullotta, 1990).

Ces altérations cérébrales observées dans la trisomie 21 seraient en lien direct avec le retard mental caractéristique de la maladie.

Malformations cardiaques

Des cardiopathies sont observées chez 40% à 50% des patients porteurs de trisomie 21. Il s'agit de malformations congénitales pouvant entraîner la mort. Les anomalies les plus fréquemment observées concernent des défauts de cloisonnement entre les cavités inter-auriculaires et inter-ventriculaires pouvant aboutir à une déviation du flux sanguin, la formation d'un canal atrio-ventriculaire, la persistance du canal artériel ou bien une tétralogie de Fallot. Dans 45% des cas, il s'agit d'une anomalie du septum atrio-ventriculaire et dans 35% des cas d'une anomalie du septum ventriculaire (Freeman et al., 1998).

Troubles gastro-intestinaux

Les patients présentent une fréquence élevée d'anomalies gastro-intestinales. La maladie de Hirschsprung qui se traduit par une absence partielle ou totale de ganglions nerveux le long des intestins et notamment du colon est 50 fois plus fréquente dans la population porteuse de trisomie 21 et le risque de sténose duodénale (rétrécissement du duodénum provoquant constipation ou occlusion intestinale) 300 fois plus élevé. La trisomie 21 est également souvent associée à l'atrésie de l'œsophage, l'imperforation anale ou bien au pancréas annulaire (Antonarakis et al., 2004; Delabar et al., 2006).

1.3.4. Défaillance du système immunitaire

Les patients présentent une sensibilité accrue aux infections, particulièrement au niveau oto-rhino-laryngologique et présentent souvent des maladies de peau de type mycose.

Aucune étude n'a cependant rapporté d'immunodéficience sévère chez ces individus. La trisomie 21 a toutefois été associée à plusieurs anomalies du système immunitaire affectant la réponse humorale et la réponse à médiation cellulaire: des anomalies de la morphologie et du fonctionnement du thymus, des taux anormalement élevés de lymphocytes T et de lymphocytes « Natural Killer » dont l'activité est faible, un taux de lymphocytes B circulant faible et une diminution de l'expression de certaines cytokines. Les individus porteurs de trisomie 21 sont également plus fréquemment porteurs d'hbsAg (Hepatitis B Surface Antigen), un indicateur de l'hépatite B et développent des anticorps dirigés contre le soi. Enfin, la fréquence des leucémies notamment de type aiguës lymphoblastiques, est 20 fois supérieure à celle de la population générale (Ugazio 1990, Sérégaza 2006).

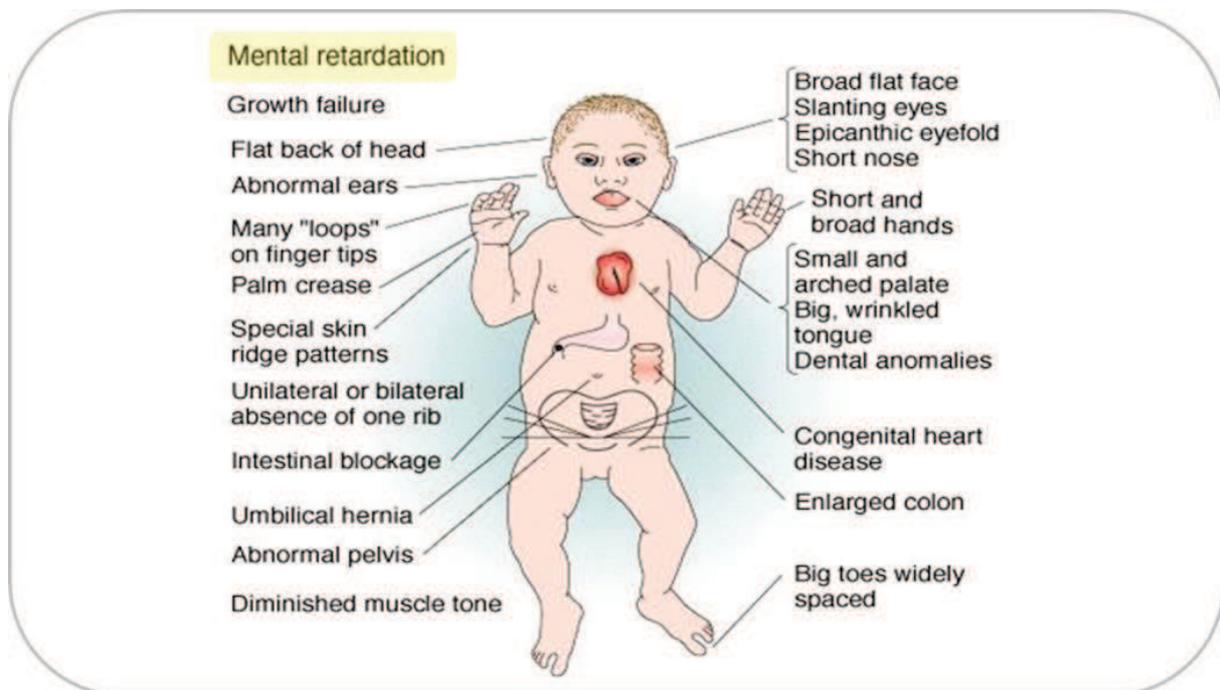


Figure 4. Schéma récapitulatif des principaux signes cliniques associés à la trisomie 21.

1.3.5. Désordres hormonaux

Dès la naissance, les individus porteurs de trisomie 21 présentent une taille inférieure aux normes. La taille finale moyenne est de 155 cm chez l'homme, 145 cm chez la femme. Aucun dysfonctionnement de la sécrétion d'hormone de croissance n'a cependant été démontré. Certains patients présentent également une hypothyroïdie ou un diabète insulino-dépendant à des fréquences 4 à 100 fois supérieures à celle de la population générale. Plus fréquemment est observée une surcharge pondérale, le plus souvent modérée. La puberté est normale mais retardée. Les femmes sont fertiles mais les hommes sont stériles.

1.3.6. Vieillesse accélérée et maladie d'Alzheimer

Grâce aux avancées médicales et à l'évolution des points de vue sur la maladie, l'âge moyen de décès dans la population de sujets atteints de trisomie 21 dépasse la cinquantaine d'années (Bittles and Glasson, 2004). L'espérance de vie d'un nouveau-né avec la pathologie

est à ce jour de plus de 60 ans. Toutefois, ces sujets manifestent un vieillissement prématuré. Il se caractérise par l'apparition précoce, en moyenne vers l'âge de 30 ans, de signes caractéristiques incluant la sécheresse cutanée, l'apparition des rides, la perte et le blanchiment des cheveux, la ménopause, l'ostéoporose, l'arthrose, l'hypogonadimse, des modifications immunologiques ou encore la cataracte sénile. Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer l'accélération du vieillissement:

- la théorie de réparation de l'ADN. Des défauts de la capacité à réparer les dommages de l'ADN causés par les rayons ultra-violets seraient associés à une diminution du taux basal et une détérioration progressive des enzymes réparatrices.
- une altération du métabolisme des radicaux-libres. La surproduction de ces composés liée à la surexpression du gène pour la super-oxyde dismutase (SOD) présent sur le chromosome 21 entraîne une oxydation des membranes cellulaires altérant la structure et la fonction des tissus concernés.

Ce vieillissement accéléré est également associé à l'apparition des signes histopathologiques de la maladie d'Alzheimer, à savoir la présence au sein du cerveau de plaques amyloïdes et de dégénérescences neurofibrillaires (Lott and Head, 2005). La formation de ces deux types de lésion est précoce chez les sujets atteints de trisomie 21 et est progressivement associée à l'apparition plus tardive de la démence caractéristique de la maladie d'Alzheimer (Lott and Head, 2001). Plusieurs gènes présents sur le chromosome 21 seraient impliqués dans ce phénomène, notamment le gène APP (Amyloid Precursor Protein) codant pour, comme son nom l'indique, une protéine à l'origine du peptide amyloïde formant les plaques séniles, ou encore le gène Dyrk1a (Lott and Head, 2001).

2. Le chromosome 21

Le chromosome 21 (HSA21 pour Homo sapiens 21) est le plus petit des 23 chromosomes humains, ce qui explique que sa triplication soit viable. La trisomie 21 étant due à la présence d'une copie surnuméraire du HSA21, son séquençage et l'analyse des gènes qu'il porte sont d'une grande importance afin de comprendre les mécanismes génétiques à l'origine du syndrome.

2.1. Cartographie du chromosome 21

2.1.1. Cartographie physique

La séquence quasi-complète du chromosome 21 a été publiée en mai 2000 (Hattori et al., 2000). Chromosome acrocentrique, il possède un bras long HSA21q, et un bras court HSA21p. La carte physique du bras long a été établie par l'alignement de séquence d'une collection de 518 clones bactériens (BAC), phagique (PAC) et de cosmides. Sa taille totale est de 48.13Mb ce qui représente environ 1% du génome humain. Enfin, 680.167 polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP), c'est-à-dire les variations d'une seule paire de base du génome entre différents individus d'une même espèce, sont à ce jour dénombrés (www.ensembl.org). La séquence du bras court (21p), estimée entre 5 et 15 Mb, n'a à ce jour

toujours pas été déchiffrée à l'exception d'une courte séquence de 281kb (Hattori et al., 2000).

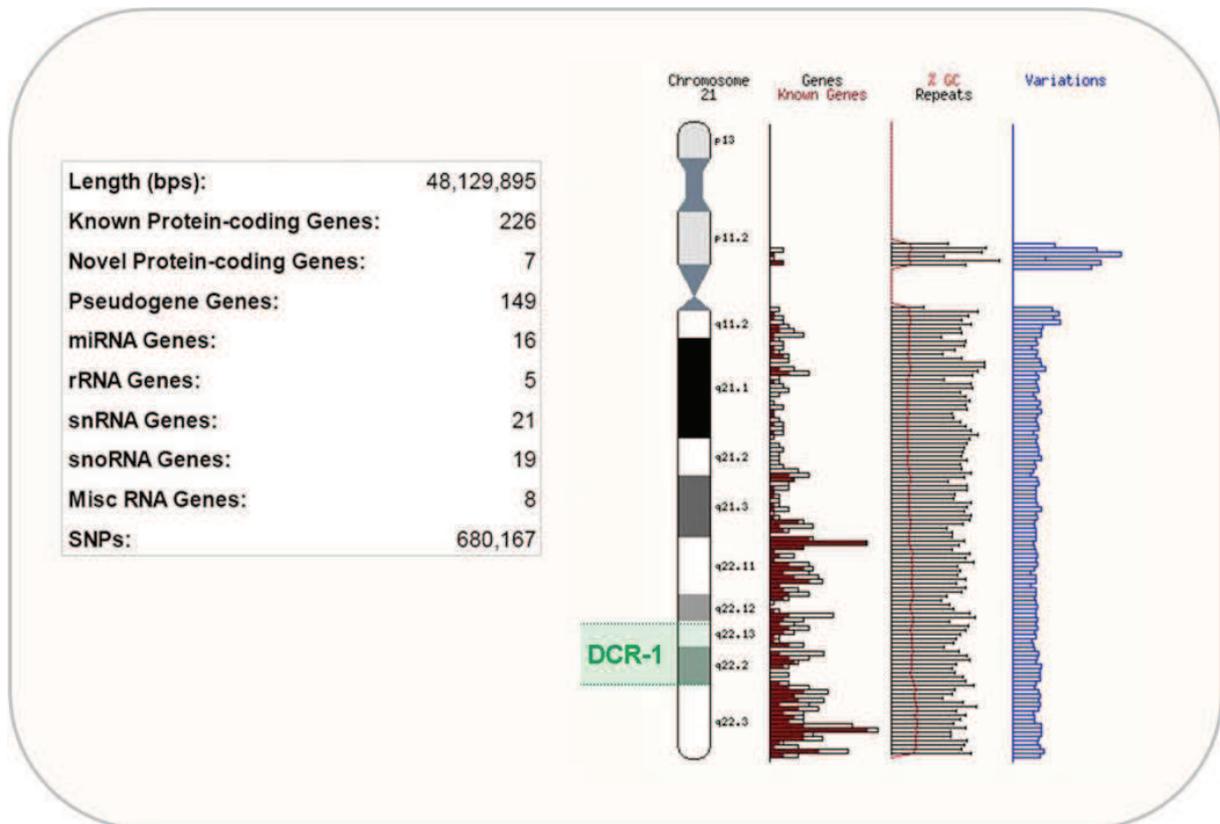


Figure 5. Cartographie du chromosome 21

(adapté de la base de données *Ensembl*, version 65 du 12/2011, http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/Chromosome?r=21).

2.1.2. Cartographie génique

L'ensemble des gènes portés par le chromosome 21 n'est pas encore précisément connu, mais environ 3% de la séquence serait codante. Selon les publications et les différentes bases de données, on estime à ce jour aux environs de 240 le nombre de gènes codant pour des protéines situés sur le bras long du chromosome 21 (Antonarakis et al., 2004). Il est cependant possible que ces prédictions, s'appuyant sur le séquençage de marqueurs de séquence exprimée (Expressed Sequence Tags, EST), des comparaisons de séquences avec des régions orthologues chez la souris et des analyses *in silico* de la séquence du chromosome 21, en aient sous-estimé le nombre car les gènes constitués d'un seul exon ainsi que les ARN non codant sont particulièrement difficiles à identifier. Il est donc prévisible que le catalogue des gènes portés par le chromosome 21 va s'enrichir au cours des prochaines années. A titre d'exemple, la figure 5 présente les chiffres retenus par la base de données *Ensembl* lors de sa dernière mise à jour.

La répartition des gènes n'est pas homogène sur le bras long du chromosome 21 : une soixantaine de gènes est localisée au niveau de la moitié proximale du 21q alors que le reste se situe sur la partie distale (Antonarakis et al., 2001).

Les rares cas de trisomies partielles du 21 ont permis d'établir des relations entre génotype et phénotype dans la trisomie 21. Ces cartes génotype/phénotype ont été plus finement établies grâce à la construction de modèles murins appropriés.

Des régions minimales capables d'engendrer les phénotypes prépondérants de la maladie ont été mises en évidence :

- la DCR-1 pour *Down syndrome Critical Region 1* ou DSCR. Elle contient 20 gènes, 2.8Mb et est localisée sur la bande 21q22.2 (Rahmani et al., 1989; Korenberg et al., 1994). Elle serait responsable des dysmorphies crânio-faciales, de la petite taille, de l'hyperlaxité des ligaments, de l'hypotonie ainsi que du retard mental.

La duplication d'une région plus grande que la DCR-1 a été identifiée comme responsable des phénotypes de la trisomie 21 au sein d'une famille. Elle contient 4.3Mb et s'étend de 21q22.13 à 21q22.2 (Ronan et al., 2007).

- la DSCHD pour *Down syndrome congenital heart disease*, de 5.4mB située entre 21q22.13 et 21q22.3. Elle serait impliquée entre autres dans les dysmorphies faciales et dans les malformations cardiaques (Korenberg et al., 1992).

2.2. Expression génique et protéome du HSA21

Toutes les fonctions des protéines codées par les gènes du HSA21 ne sont pas encore connues. L'analyse ontologique de ces gènes indique qu'ils interviennent dans au moins une centaine de fonctions biologiques différentes. Environ une quinzaine de gènes est référencée comme codant pour des facteurs de transcriptions ou des molécules de liaison à l'ADN, 11 gènes sont impliqués dans la transduction du signal, 8 codent pour des protéines d'adhésion cellulaire et 7 sont importants dans la fonction mitochondriale. En 2000, Gardiner et Davisson ont publié une liste des gènes portés par le chromosome 21 dont au moins une fonction était connue ou supposée (tableau 1) (Gardiner and Davisson, 2000). 122 gènes, dont la plupart ont une séquence d'ADNc complète ou présumée complète, ont été assignés. Cette liste non-exhaustive a été complétée depuis.

Au niveau de la DSCR, se trouve par exemple les gènes codant pour la protéine kinase DYRK1A, le facteur de transcription ERG (ETS Related Gene), la molécule d'adhésion DSCAM (Down Syndrome Cell Adhesion Molecule ou encore l'inhibiteur RCAN1 de la calcineurine (Pletcher et al., 2001; Mensah et al., 2007).

2.3. Orthologie

Une des approches générales les plus puissantes pour décrypter le génome humain est la génomique comparative. Elle permet d'identifier des séquences conservées, fonctionnelles qui seront transcrites telles que les gènes codant pour des protéines ou bien des gènes d'ARN non-codant, ou bien d'autres séquences fonctionnelles telles que des régions régulatrices.

Un point de départ efficace pour la comparaison est la souris de laboratoire, *Mus musculus*. Après décodage de la séquence génomique humaine publié en 2001, le séquençage du génome de la souris a été publié en 2002 (Lander et al., 2001; Waterston et al., 2002).

Catégorie fonctionnelle	Nombre de gènes	Affectation fonctionnelle
Facteur de transcription, régulateurs et modulateurs	17	GABPA, BACH1, RUNX1, SIM2, ERG , ETS2, ZNF294, ZNF295, Pred65, GCFC, ...
Structure de la chromatine	4	H2BFS, HMG14, CHAF1B, PCNT
Protéases et leurs inhibiteurs	6	BACE, TMPRSS2, TMPRSS3, ADAMTS1, ADAMTS5, CSTB
Voie ubiquitine	4	USP25, USP16 , UBE2G2, SMT3A
Interférons et Réponse immunitaire	9	IFNAR1, IFNAR2, IL10RB, MX1, MX2, IFNGR2 , CCT8, TIAM1, TCP10L
Kinases	8	ENK, MAKV, DYRK1A , KID2, PHK, PFKL, ...
Phosphatases	2	SYNJ1, PDE9A
Maturation ARN	5	rA4, U2AF35, RED1, PCBP3, RBM11
Molécules d'adhésion	4	NCAM2, DSCAM , ITGB2, c21orf43
Canaux	7	GRIK1 , KCNE1, KCNE2 , KNCJ6, KNCJ15, CLIC11, TRPC7
Récepteurs	5	CXADR, Claudins8,14,17, Pred12
Transporteurs	2	SLC5A3, ABCG1
Métabolisme énergétique	4	ATP5O, ATP5A, NDUFV3, CRYZL1
Structure	4	CRYA, COL18, COL6A1, COL6A2
Méthyl-transférase	3	DNMT3L , HRMTIII, Pred28
Domaine SH3	3	ITSN, SH3BGR, UBASH3A
Métabolisme monocarboné	4	GART, CBS, FTCD, SLC19A1
Métabolisme de l'oxygène	3	SOD1, CBR1 , CBR3
Divers	28	DSCR1, DSCR2 , MCM3, APP , ANA/BTG3, SCL37A1, TRPD, S100b, Pred44, Pred22, WDR9, LSS, ...

Tableau 1. Catégorie des gènes fonctionnels du HSA21.

En gras, les gènes les plus connus et étudiés (adapté de Gardiner and Davisson, 2000).

Cette même année, la première analyse comparative de chromosome a été effectuée entre le HSA21q et les régions synténiques de la souris (région chromosomique dont le contenu génique est conservé entre les deux espèces) (Dermitzakis et al., 2002). Ces régions dites orthologues (homologues, i.e. même ancêtre commun, avec divergence due à la spéciation) sont localisées chez la souris sur trois chromosomes (MMU pour *Mus Musculus*) différents (Antonarakis et al., 2004) (figure 6) :

- le MMU16 qui est synténique avec une région de 154 gènes du HSA21q.
- le MMU17 correspondant à une région de 23 gènes du HSA21q.
- le MMU10 correspondant à une région de 58 gènes du HSA21q.

Cette analyse comparative a permis de mettre en évidence une grande quantité de séquences conservées à plus de 70% d'homologie et d'identifier de nouvelles séquences fonctionnelles transcriptionnelles ou régulatrices du HSA21q.

En 1969, une étude mit en évidence un jeune chimpanzé présentant les mêmes caractéristiques cliniques, comportementales et cytogénétiques que celles décrites dans le syndrome de Down. Son caryotype révélait une triplication du HSA22 (McClure et al., 1969). En 2004, le séquençage du chromosome 22 du chimpanzé (PTR22 pour Pan Troglodytes orthologue du HSA21, a été publié. L'analyse comparative entre le HSA21q et PTR22q a mis en évidence une différence de 1.44% au niveau de leur 33 millions de nucléotides alignés et a permis d'affiner l'inventaire des séquences fonctionnelles du HSA21.

2.4. Dosage génique et notion de gènes candidats

La caractéristique des personnes porteuses de trisomie 21 étant la présence d'un chromosome 21 surnuméraire, de nombreuses recherches ont porté sur l'expression des gènes présents en trois copies chez ses personnes afin d'en caractériser d'éventuelles modifications ainsi que leurs conséquences sur l'expression de l'ensemble du génome.

L'effet dosage génique est à ce jour bien établi. Grâce au développement récent des méthodes d'analyse du transcriptome à haut débit, principalement les puces à ADN, une augmentation globale de l'expression des gènes en trois copies chez les patients porteurs de trisomie 21 a été mise en évidence (FitzPatrick et al., 2002; Mao et al., 2003, 2005). Une étude de 2007 a montré, grâce à l'analyse du transcriptome d'échantillons post-mortem chez des patients porteurs de trisomie 21, que seuls 25% des gènes en trois copies étaient surexprimés par rapport à des sujets contrôles (Lockstone et al., 2007).

Les résultats concernant les modifications de l'expression des gènes disomiques chez les individus porteurs de trisomie 21 sont plus divergents.

Depuis les années 1980, une des hypothèses proposées pour expliquer la relation entre le chromosome surnuméraire et les phénotypes de la trisomie 21 repose sur l'« effet dosage génique » : le phénotype trisomie 21 résulterait directement de la surexpression de gènes individuels et/ou groupe de gènes portés par ce chromosome. La mise en évidence de la région DSCR a été un argument en faveur de cette hypothèse et a abouti à la notion de « gènes candidats », soit les gènes dont la surexpression est associée à un phénotype particulier.

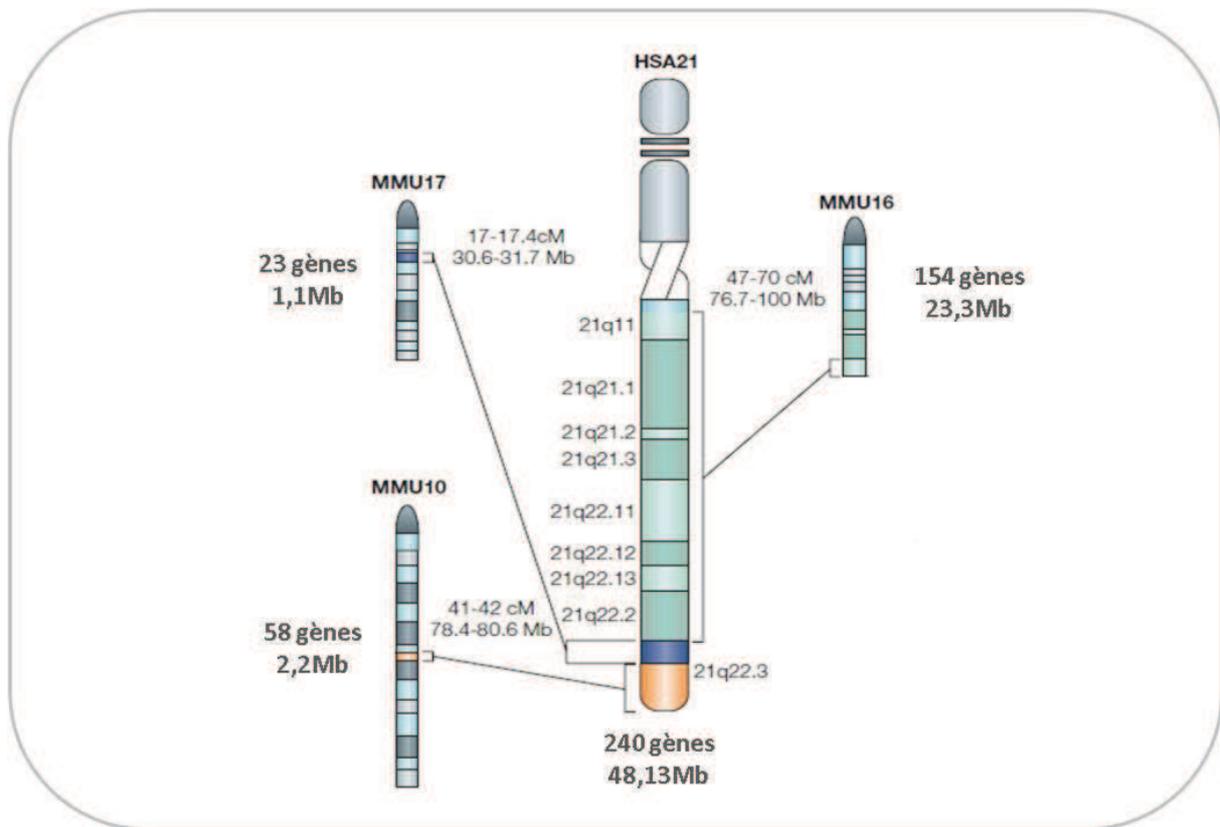


Figure 6. Régions synténiques entre le chromosome 21 humain (HSA21) et les chromosomes murins (MMU) 10, 16 et 17 (d'après Antonarakis et al., 2004).

3. La protéine DYRK1A

La protéine DYRK1A, pour « Dual specificity tyrosine (Y) -phosphorylation-Regulated Kinase 1A » appartient à une famille des DYRKs, kinases très conservées au cours de l'évolution. Parmi les cinq membres que contient cette famille, la protéine DYRK1A est la seule à être codée par un gène situé sur le HSA21. Celui-ci a été proposé comme gène candidat potentiel dans le développement des phénotypes de la trisomie 21, notamment le retard mental, car :

- le gène *Dyrk1a* est présent au niveau de la région DSCR.
- il est orthologue du gène de drosophile *Minibrain*, baptisé ainsi car les animaux mutants présentaient une réduction considérable du volume cérébral.
- l'ARNm est surexprimé dans les cerveaux de fœtus porteurs de trisomie 21 (Guimera et al., 1999).
- le taux de protéine DYRK1A est environ 1.5 fois plus élevé chez les patients trisomiques, soit dosage génique dépendant (Dowjat et al., 2007).
- l'activité de DYRK1A est constitutive. Elle est donc régulée par sa concentration cellulaire et donc également dosage génique dépendante.
- la kinase est impliquée dans de nombreux processus cellulaires, notamment l'expression génique et le fonctionnement synaptique.
- elle est importante dans le développement cérébral (Hämmerle et al., 2008).

De nombreuses études, notamment basées sur des modèles murins de surexpression, ont confirmé sa contribution dans les déficits cognitifs liés à la trisomie 21 (Smith et al., 1997; Park et al., 2009).

3.1. Généralités

3.1.1. Gène et Orthologie

Dans la deuxième moitié des années 1990, plusieurs équipes de recherche se sont intéressées à l'identification des gènes de la DSCR. Plusieurs centaines d'exons correspondant à des gènes putatifs ont été isolés, dont une dizaine présentant une forte homologie de séquence avec celles codantes du gène *minibrain* (*mnb*) de la drosophile identifié par Tejedor *et al.* en 1995 (Tejedor et al., 1995). Une cartographie plus précise a ensuite été établie: elle a permis de localiser le gène *Dyrk1a* sur le bras long (q) du HSA2, en position distale de la DSCR sur la bande chromosomique 21q22.13. Le séquençage de l'ADN codant du gène a mis en évidence une séquence nucléotidique de 185.6kB avec 17 exons dont 14 codants. Le gène *Dyrk1a* humain code cinq isoformes protéiques : la plus abondante, de masse molaire égale à 85.6kDa, comprend 763 acides aminés (Guimera et al., 1999).

L'avancement rapide du séquençage génomique de nombreuses espèces et la disponibilité des séquences nucléotidiques des gènes dans les bases de données ont facilité l'identification des orthologues du gène *Dyrk1a* humain par simple alignement de séquence et la comparaison des régions conservées. Une liste d'orthologues est disponible sur la base de données *Ensembl*. Chez la souris, le gène *Dyrk1a* est localisé au niveau de la partie distale du MMU16, en 16qC6, région synténique avec la DSCR (Song et al., 1997). Il est composé de 125kb et possède 13 exons.

3.1.2. Expression et localisation cellulaire

Le gène *Dyrk1a* est exprimé de manière ubiquitaire dans les différents tissus, dont la plupart des régions cérébrales. La distribution spatiale et temporelle de la kinase indique que le gène n'est pas seulement nécessaire au développement précoce du système nerveux (Tejedor and Hämmerle, 2010) mais également impliqué dans le maintien des fonctions du cerveau adulte (Martí et al., 2003). Il a été montré que *Dyrk1a* était exprimé dans quatre phases développementales séquentielles du cerveau murin en développement (Hämmerle et al., 2008):

- expression transitoire dans les précurseurs pré-neuronaux.
- expression régulée par le cycle cellulaire dans les précurseurs neuronaux.
- expression transitoire dans les néo-neurones.
- expression persistante dans les neurones différenciés.

Au niveau cellulaire, *DYRK1A* est retrouvée dans les précurseurs neuronaux, les neurones différenciés, les astrocytes, les épendymocytes et les cellules endothéliales (Martí et al., 2003).

La distribution subcellulaire de DYRK1A dépend du type cellulaire, et de l'état développemental ou pathologique du neurone. La protéine endogène est retrouvée dans les corps cellulaires mais également dans des compartiments nucléaires d'épissage de neurones de cerveau de poulet en développement ainsi que dans des cerveaux adultes murins et humains (Hämmerle et al., 2002; Martí et al., 2003; Wegiel et al., 2004). Elle est également retrouvée au niveau des dendrites (Hammerle et al., 2003).

Dans des expériences in vitro de surexpression du gène, la protéine DYRK1A est retrouvée majoritairement dans le nucléoplasme et les compartiments d'épissage (Song et al., 1997; Becker et al., 1998). La régulation de l'import/export de DYRK1A à travers le noyau est un point critique pour la fonction de la kinase (Moriya et al., 2001).

3.2. Structure protéique

La structure primaire de DYRK1A est très conservée. Ses domaines structuraux spécifiques semblent jouer un rôle fonctionnel important.

Comme toutes les kinases, DYRK1A contient trois régions principales :

Le domaine kinase central

Il contient toutes les régions conservées du domaine catalytique des kinases et s'étend entre les acides aminés 159 et 479. Il renferme les séquences consensus, les résidus conservés participant à la liaison de l'ATP et du substrat et à la réaction de phospho-transfert, et trois autres motifs spécifiques à la famille DYRK (Becker et al., 1998). Parmi ces derniers, le motif Tyr-Q-Tyr des acides aminés 319 à 321 est le site d'activation par auto-phosphorylation de la protéine DYRK1A. Le domaine kinase de DYRK1A contient également et de manière exclusive :

- un motif leucine zipper permettant les interactions protéiques et la liaison à l'ADN.
- une séquence de localisation nucléaire.

L'extrémité N-terminale

Elle correspond aux acides aminés 1 à 158 et comprend une séquence de localisation nucléaire (acides aminés 117 à 134).

L'extrémité C-terminale

Sa structure est unique et permet de différencier DYRK1A de toutes les kinases DYRK. Elle s'étend des acides aminés 480 à 763 et est riche en résidus sérine et thréonine (28% des acides aminés). Elle contient des sous-domaines intéressants :

- la région PEST (proline-glutamate-sérine-thréonine) intervenant dans la dégradation protéique rapide, remplacé par un domaine GAS (glycine-alanine-sérine) ou glycine dans la protéine codée par le gène minibrain de la drosophile.
- deux domaines riches en résidus sérine/thréonine, à rôle inconnu, conservés chez la drosophile, le rat et la souris.

- deux répétitions de résidus histidine permettant la localisation dans des granules dites « d'épissage » où sont rassemblés les facteurs d'épissage. Elles sont remplacées par une région riche en alanine chez la drosophile.

3.3. Activité kinase

Comme l'indique leur nom, la famille des DYRK kinases sont des protéines phosphorylantes à double spécificité :

- elles s'activent par autophosphorylation des résidus tyrosine présents au niveau de leur boucle d'activation.
- elles phosphorylent leurs substrats protéiques sur les résidus sérine et thréonine.

3.3.1. Activation de la kinase DYRK1A

La protéine DYRK1A catalyse son autophosphorylation au niveau d'un résidu tyrosine conservé situé dans la boucle d'activation du domaine catalytique (Y321). Ceci est crucial pour son activité catalytique globale. En effet, une substitution de la tyrosine 321 réduit considérablement l'activité de l'enzyme (Kentrup et al., 1996; Himpel et al., 2001). Cette autophosphorylation a lieu au cours de la synthèse protéique de DYRK1A par une réaction intramoléculaire: c'est une capacité intrinsèque du domaine catalytique indépendante des autres sous-domaines ou de co-facteurs. Les étapes sont détaillées dans la figure 7.

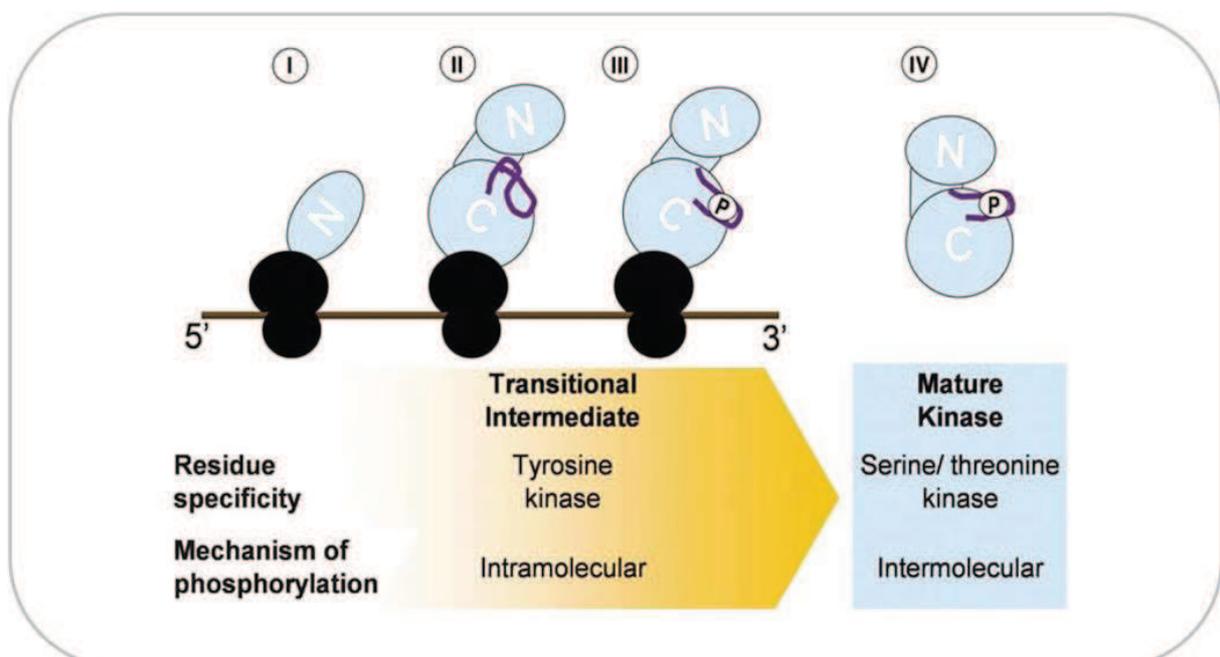


Figure 7. Mécanisme d'activation de DYRK1A par autophosphorylation. I-II. Le polypeptide N-terminal forme une structure tridimensionnelle intermédiaire au cours de la synthèse protéique. III. Ce complexe transitoire a une activité tyrosine kinase et phosphoryle le résidu tyrosine en position 321 (Y321) de la boucle d'activation. IV. La forme mature de la protéine perd l'activité tyrosine kinase au profit d'une activité sérine/thréonine kinase (adapté de Lochhead et al., 2005).

Cette kinase ne requiert pas d'autres modifications post-traductionnelles ou de sous-unités régulatrices pour être activée : elle est constitutivement active dans tous les systèmes d'expression (Kentrup et al., 1996). Ceci suggère que sa fonction cellulaire est contrôlée par la régulation de sa concentration dans la cellule. Toute altération du dosage génique a donc des conséquences sur l'activité de la kinase. L'hypothèse que la surexpression du gène *Dyrk1A* contribue aux phénotypes de la trisomie 21 est basée sur le fait que la fonction de la protéine *DYRK1A* est particulièrement sensible aux changements de niveau d'expression cellulaire (de la Luna and Estivill, 2006), et que son taux protéique est augmenté dans la trisomie 21 (Dowjat et al., 2007).

3.3.2. Substrats et fonctions biologiques

Comme beaucoup de kinase, l'activité *DYRK1A* suit un mécanisme réactionnel à deux substrats : l'ATP, donneur de phosphate, et le substrat, accepteur de phosphate. La conformation catalytique n'existe que dans le complexe ternaire formé de la kinase, l'ATP et le substrat. Elle phosphoryle de manière préférentielle sur des résidus sérine et thréonine avec une arginine position 2 ou 3 et une proline en C-terminal du site de phosphorylation.

Etant donnée la localisation subcellulaire de *DYRK1A*, ses cibles sont des protéines aussi bien cytosoliques que nucléaires. La trentaine de substrats qu'elle compte incluent (figure 8) :

- des facteurs de transcription comme CREB, NFAT ou STAT3.
- des facteurs d'épissage tels que la Cycline L2.
- des facteurs de traduction: eIF2Bε.
- des protéines impliquées dans l'endocytose telles que la dynamine, la synaptojanine ou l'amphisine (Adayev et al., 2006a; Murakami et al., 2009).
- des protéines impliquées dans la formation et la régulation de l'assemblage des filaments d'actine comme N-WASP (Liu et al., 2009; Park et al., 2009, 2012a).
- des protéines des maladies neurodégénératives telles qu'APP ou Tau.

Ceci confère à la protéine *DYRK1A* des rôles pléiotropiques dans les fonctions cellulaires telles que la transcription génique, le contrôle du cycle cellulaire, les fonctions synaptiques, la morphologie neuronale et la neurodégénérescence (figure 8). Elle est notamment essentielle pour la neurogénèse post-embryonnaire, autant au niveau de la prolifération que de la différenciation neuronale (Tejedor et al., 1995). Elle serait également impliquée dans le développement de l'arborescence dendritique (Hammerle et al., 2003) ainsi que dans la formation et le maintien des épines dendritiques, à travers la régulation du trafic vésiculaire dépendant de la dynamine et de par ses interactions avec les protéines du cytosquelette (Park et al., 2012b).

La génération de souris transgéniques pour le gène *Dyrk1a* a vérifié son importance :

- la souris invalidée pour le gène *Dyrk1a* manifeste un retard de croissance et meurt au cours de la gestation (Fotaki et al., 2002).
- la souris hétérozygote (*Dyrk1a*+/-) présente une diminution de la taille de nombreuses régions cérébrales associée à une altération de la densité neuronale (Fotaki et al., 2002;

Guedj et al., 2012), mais également une diminution de la taille des neurones corticaux, de leur complexité dendritiques et de la densité des épines (Benavides-Piccione et al., 2005). Une étude a montré que l'inhibition de l'activité de l'enzyme entraînait une diminution de la neuritogénèse (Göckler et al., 2009).

D'autre part, des études in vitro sur des cellules surexprimant Dyrk1a ont montré l'importance du dosage génique de Dyrk1a pour sa fonction. En effet, la surexpression de Dyrk1a dans le cerveau d'embryons de souris inhiberait la prolifération cellulaire et induirait une différenciation prématurée des précurseurs neuronaux au sein du cortex (Yabut et al., 2010a). De plus, des cellules surexprimant la protéine présenteraient des défauts de l'endocytose clathrine dépendante des vésicules synaptiques (Kim et al., 2010). Une étude récente a également montré que la surexpression du gène Dyrk1a diminuait la complexité de l'arborisation dendritique au niveau des couches II/III du cortex moteur (Martinez de Lagran et al., 2012).

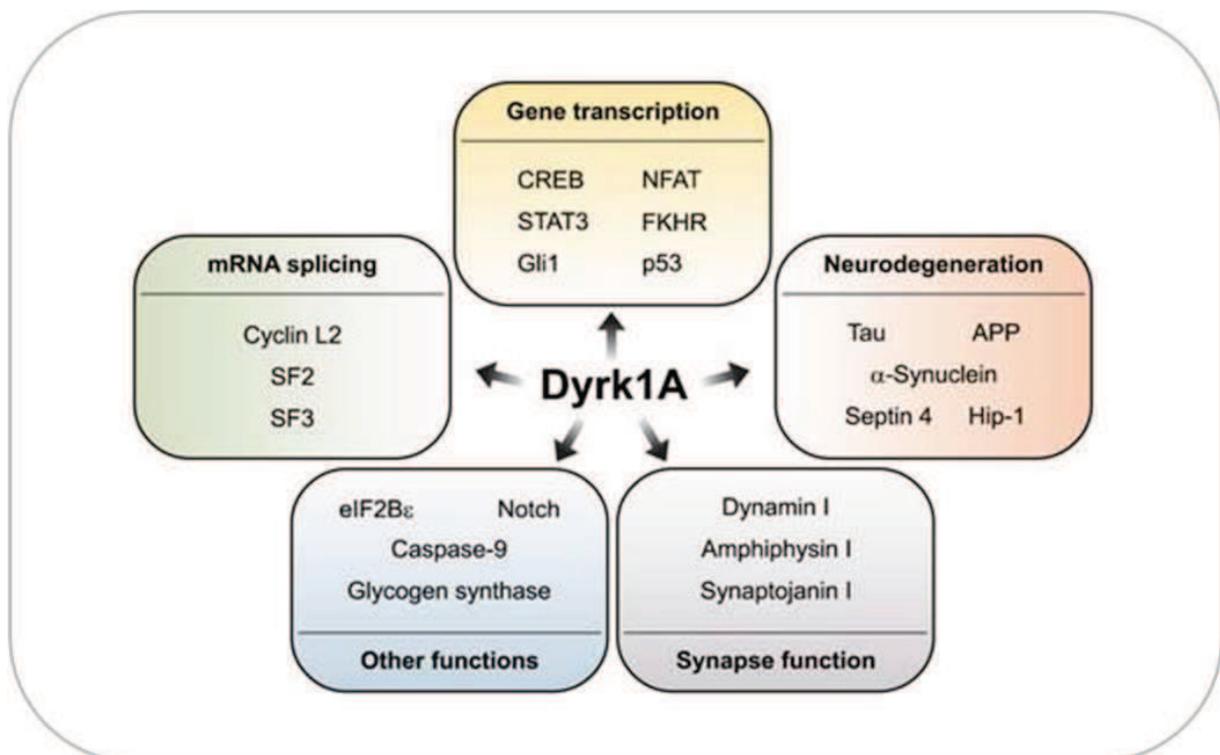


Figure 8. Les substrats et les multiples rôles potentiels de DYRK1A dans la transcription génique, l'épissage, la fonction synaptique et la neurodégénérescence (d'après Park et al., 2009).

3.4. Inhibition de l'activité DYRK1A

Au vue de son activité constitutive, le seul moyen efficace d'atténuer l'activité de l'enzyme serait l'inhibition directe de l'activité kinase. Ceci permet d'une part de comprendre l'activité de l'enzyme et d'autre part de développer des stratégies thérapeutiques dans des cas où l'enzyme est surexprimée ou suractivée.

Les techniques de génétique, comme l'interférence ARN, offre une alternative pour étudier les fonctions kinase. L'utilisation de petites molécules inhibitrices offrent toutefois un contrôle temporel plus rapide.

L'hypothèse que l'élévation de l'activité de DYRK1A due à la surexpression de son gène contribue aux déficits cognitifs de la trisomie 21 a stimulé l'intérêt d'envisager DYRK1A comme cible potentielle dans les thérapies inhibitrices.

3.4.1. Inhibiteurs d'origine naturelle

Deux composés d'origine végétale à pouvoir inhibiteur spécifiquement sur l'activité de la protéine DYRK1A ont été mis en évidence:

L'harmine

Cet alcaloïde bêta-carboline est isolé en 1841 à partir de graines d'une plante médicinale, le harmel (*Peganum harmala*). Elle est également retrouvée dans une espèce de liane tropicale amazonienne (*Banisteriopsis caapi*) appelée communément « ayahuasca » en référence au breuvage psychotrope dont elle est la base de préparation (Fortunato et al., 2010).

Un criblage in vitro de l'activité inhibitrice de 65 composés chimiques sur 80 protéines kinases a révélé le potentiel inhibiteur de l'harmine sur la famille DYRK, notamment sur DYRK1A (Bain et al., 2007).

L'harmine inhibe l'activité DYRK1A par accessibilité compétitive avec l'ATP à la poche de liaison à l'ATP.

Ce composé est également un puissant inhibiteur de la monoamine oxydase ainsi qu'un antagoniste sérotoninergique ce qui limite son utilisation in vivo d'inhibiteur de DYRK1A du fait des propriétés psychotropes hallucinogènes qu'elle possède.

Le gallate d'épigallocatechine (EGCG)

Les feuilles de thé vert (*Camellia sinensis*) contiennent un grand nombre des composés chimiques bioactifs, notamment des flavonoïdes représentant 33% du poids sec. Cette sous-classe de polyphénols est principalement composée de catéchines, dont le gallate d'épigallocatechine représente 50% de la totalité (Bode and Dong, 2009).

Une étude visant à tester l'effet in vitro de 42 composés chimiques sur l'activité kinase de 28 protéines a mis en évidence le potentiel inhibiteur spécifique de l'EGCG sur l'activité DYRK1A (Bain et al., 2003). En se fixant sur un site distinct, l'EGCG inactive l'enzyme de manière non-compétitive en empêchant le complexe « enzyme-ATP-substrat » d'achever le cycle catalytique (Adayev et al., 2006b). Toutefois, l'EGCG utilisé à forte dose perturbe de nombreuses enzymes et processus cellulaires. Par exemple, il inhibe également la protéine PARK (p38 Activated/Regulated protein Kinase), protéine cible de la voie des MAPK p38 (Mitogen-Activated Protein Kinase) impliquée dans la prolifération, la différenciation, l'inflammation et la réponse au stress (New et al., 1998; Bain et al., 2003; Sun et al., 2007).

3.4.2. Inhibiteurs synthétiques

La première approche ciblée pour développer un inhibiteur de DYRK1A a été l'identification des composés pyrazolidinedione inhibant l'autophosphorylation de l'enzyme (Koo et al., 2009). Il est nécessaire d'en caractériser leur spécificité parmi un grand nombre de kinases.

De nombreux composés originellement conçus pour cibler d'autres protéines kinases se sont révélés être des inhibiteurs efficaces de Dyrk1A. Les plus communs sont la roscovitine et la puravalanol, spécifiques des kinases dépendantes des cyclines (Bain et al., 2007; Becker and Sippl, 2010).

En 2010 est publiée une étude caractérisant un inhibiteur synthétique spécifique de DYRK1A : INDY, un dérivé benzothiazole. Son efficacité a été démontré in vitro mais également in vivo : l'injection d'un dérivé acétylé d'INDY (permettant d'améliorer ses propriétés lipophiles, proINDY) dans des embryons de Xénope surexprimant Dyrk1A permet de prévenir les malformations de la tête induite par la surexpression génique. La cristallographie aux rayons X du complexe DYRK1A-INDY a révélé qu'INDY se fixait sur la poche ATP de l'enzyme (Ogawa et al., 2010).

En résumé, le gène Dyrk1a :

- *situé sur le HA21,*
- *surexprimé dans la trisomie 21,*
- *exprimé pendant le développement,*
- *exprimé dans le cerveau,*
- *codant pour une protéine importante pour le développement cérébral,*
- *dont la fonction est dosage-dépendante, c'est-à-dire dépendante de sa concentration cellulaire,*

est un candidat majeur dans les phénotypes cognitifs associés à la trisomie 21, notamment le retard mental.

4. Les modèles d'étude de la trisomie 21

Les premières études concernant la trisomie 21 furent conduites sur du matériel humain (cellules de peau ou sanguines). La nécessité de disposer d'une plus grande diversité de tissus et de pouvoir notamment accéder au système nerveux central ainsi que le séquençage du génome murin, l'avancée de la transgénèse, la facilité d'élevage de ces animaux et la forte syntenie entre le MMU16 et le HSA21, ont fait de la souris un modèle de choix pour la modélisation de la trisomie 21. Différentes lignées génétiques ont été créées, comportant des chromosomes entiers, fragmentés voire un seul gène (figure 9). Le développement des modèles monogéniques a permis de dévoiler les gènes candidats et de préciser leur implication dans les phénotypes de la trisomie 21. Le tableau 2 recense ces modèles et les principales altérations qu'ils manifestent.

4.1. Les modèles transchromosomiques

La technologie transchromosomique (Tc) est basée sur une technique de transfert de chromosome via microcellule (MMCT) permettant d'introduire de larges portions d'un chromosome humain dans un animal.

4.1.1. Les souris chimères ES(#21)-10

Ce modèle issu du travail d'une équipe japonaise est construit en 2001 par insertion de la majeure partie du HSA21q. Le chromosome libre ajouté est perdu au cours du développement dans certains tissus, produisant des souris chimères à degré variable de mosaïcisme. La «rétention» du chromosome est toutefois plus importante dans le cerveau. Ces souris présentent des déficits d'apprentissage dans un test de conditionnement de peur, une altération de la composante émotionnelle dans un test de nage forcée, une hypoactivité, et également des anomalies tissulaires telles que des malformations cardiaques et une hypoplasie de thymus (Shinohara et al., 2001).

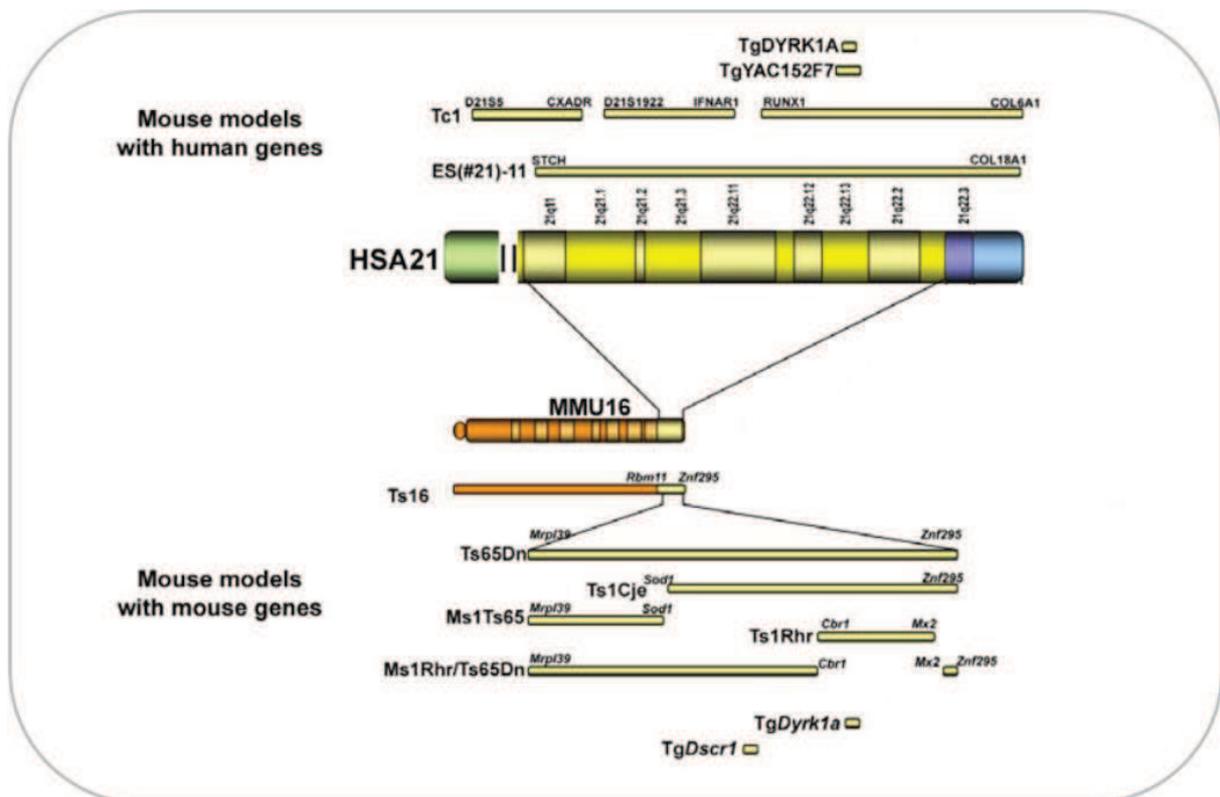


Figure 9. Les différents modèles murins de la trisomie 21 (adapté de Delabar et al., 2006).

4.1.2. Les souris transchromosomiques Tc1

Elles ont été créées par insertion d'une copie quasiment entière du HSA21 dans des cellules souches embryonnaire de souris grâce à une technique proche de la MMCT. Ces souris sont trisomiques pour 92% des gènes de HSA21, mais présentent également un haut degré de mosaïcisme. Elles sont viables, avec des malformations cardiaques pour 75% des fœtus, une diminution de la taille des mandibules, des déficits moteurs et cognitifs associés à une diminution de densité cellulaire au niveau du cervelet, et des déficits de mémoire à court terme (O'Doherty et al., 2005).

4.2. Les modèles de trisomie totale ou partielle pour le MMU16

4.2.1. Les souris Ts16

C'est le premier modèle murin à avoir été généré. Le MMU16 étant synténique pour environ 80 % des gènes du HSA21, des souris trisomiques pour la totalité de ce chromosome appaurent comme un modèle potentiel de la trisomie 21. La lignée Ts16 a été obtenue par croisement de mâles double-hétérozygotes portant deux translocations robertsoniennes spontanées impliquant le MMU16, avec des femelles diploïdes. La lignée ne fut que peu étudiée car présentait deux inconvénients majeurs :

- les nouveau-nés n'étant pas viables, l'étude se limitait aux stades embryonnaires.
- le MMU16 contient de nombreux gènes non orthologues au HSA21 surexprimés également chez ces souris (Delabar et al., 2006).

Les fœtus présentent des anomalies cardiaques et crâniofaciales, une hypoplasie du thymus, un retard de la maturation du système immunitaire, une diminution de la taille globale du cerveau et un retard du développement cortical lié à des défauts de la neurogénèse embryonnaire (Sweeney et al., 1989; Haydar et al., 1996, 2000).

4.2.2. Les souris Ts65Dn

Au début des années 1990, le *Jackson Laboratory* mit au point cette lignée trisomie 16 partielle qui est à ce jour le modèle murin le plus utilisé. Elle possède une troisième copie de la partie distale du MMU16 transloquée sur le MMU17. Baptisé Ts65Dn du nom de la translocation, la lignée est trisomique pour une centaine de gènes, tous orthologues de ceux du HSA21, notamment de la DSCR (Gardiner and Davisson, 2000).

Ces souris sont viables, mais présentent une mortalité postnatale importante due aux malformations cardiaques (Williams et al., 2008). Les mâles sont stériles et l'élevage est possible grâce aux femelles trisomiques. Ces souris développent des traits phénotypiques communs avec la trisomie 21. Initialement plus petites, elles deviennent obèses vers 4-5 mois (Kola and Hertzog, 1998). Les anomalies les plus importantes concernent plus particulièrement le cerveau et les structures crânio-faciales (Richtsmeier et al., 2002). Les dysmorphies de la tête sont comparables à celles observées chez les patients trisomiques. La taille du cortex, du cervelet et de l'hippocampe est réduite, liée à des défauts de densité et morphologie cellulaire (Baxter et al., 2000; Galdzicki and Siarey, 2003; Olson et al., 2004). En effet, des défauts de la neurogénèse ont été observés au niveau du cortex cérébral et de l'hippocampe (Belichenko et al., 2004; Chakrabarti et al., 2007). Ils induiraient une diminution de la production de neurones excitateurs, aboutissant à un déséquilibre de ratio entre neurones excitateurs et neurones inhibiteurs (Chakrabarti et al., 2010). De manière intéressante, une étude récente a révélé que l'inhibition par l'harmine de l'activité DYRK1A rétablissait une maturation normale des précurseurs neuronaux issus de Ts65Dn (Mazur-Kolecka et al., 2012).

La morphologie des neurones serait également affectée : les neurones pyramidaux du cortex présenteraient une diminution de la taille et de la complexité de leur arborisation dendritique associée à une diminution de la densité des épines dendritiques (Dierssen et al., 2003). Cette réduction du nombre d'épines est également retrouvée au niveau de

l'hippocampe (Belichenko et al., 2004). Toutefois, les épines dendritiques mais également les terminaisons axonales dans le cortex et dans l'hippocampe seraient élargies chez les souris Ts65Dn. Ces défauts de l'ultrastructure synaptique avaient précédemment été identifiés par microscopie électronique dans le cortex temporal. En effet, cette étude a révélé une diminution du nombre de synapses asymétriques (synapses glutamatergiques, cf III) ainsi que leur élargissement. Selon les auteurs, l'augmentation des points de contact synaptique induite par l'élargissement permettrait de compenser le déficit de synapses excitatrices (Kurt et al., 2000, 2004).

Ces modifications morphologiques sont associées à une hyperactivité et à des déficits des mémoires spatiale, à court- et à long-terme (Reeves et al., 1995).

4.2.3. Les souris Ts1Cje

Le premier animal de cette lignée fut obtenu par hasard en 1998 alors que l'équipe de recherche concernée tentait de générer une souris mutée pour le gène Sod1. La lignée trisomie partielle est issue d'une translocation réciproque impliquant le télomère du MMU12 et la région distale du MMU16 au niveau de Sod1. Les souris sont trisomiques pour environ 80 gènes, comprenant les orthologues des gènes portés par la DSCR. Elles sont fertiles et survivent jusqu'à l'âge adulte. Elles présentent des altérations morphologiques et comportementales similaires quoique moins sévères que celles observées dans le modèle Ts65Dn (Sago et al., 1998; Olson et al., 2004; Belichenko et al., 2007a).

4.2.4. Les souris Ms1Ts65

Ce modèle a été généré afin de comprendre l'implication de la région présente chez les Ts65Dn mais absente chez les Ts1Cje (figure 9) dans le phénotype de la trisomie 21. Il est issu d'un croisement entre ces deux lignées. Ces souris sont trisomiques pour une vingtaine de gènes. Comparativement aux Ts65Dn ou Ts1Cje, elles présentent une plus faible diminution de la densité des cellules granulaires du cervelet et de meilleures performances au test de mémoire spatiale (Sago et al., 2000).

4.2.5. Les souris Ts1Rhr, Ms1Rhr et Ms1Rhr/Ts65Dn

Les lignées Ts1Rhr et Ms1Rhr sont respectivement trisomique et monosomique pour un seul segment du MMU16 correspondant à la région DSCR (contenant 33 gènes compris entre les marqueurs Cbr1 et Mx1). La lignée Ms1Rhr/Ts65Dn, obtenue par croisement entre Ts65Dn et Ms1Rhr, est disomique pour la DSCR et trisomique pour les régions restantes Ts65Dn. Ces deux lignées ont été générées afin de s'assurer que la triplification de la DSCR était capable d'engendrer à elle seule les anomalies observées dans les modèles Ts65Dn et Ts1Cje ainsi que chez les individus porteurs de la trisomie 21. Les déficits d'apprentissage et de mémoire spatiale présents chez les souris Ts65Dn seraient :

- absents chez les Ms1Rhr/Ts65Dn, suggérant que la DCSR est nécessaire au développement de ces défauts cognitifs.

- absents chez les Ts1Rhr et des Ms1Rhr impliquant que cette région n'est pas suffisante pour leur développement: les gènes de la DSCR participent aux défauts observés mais n'agissent qu'en interaction avec d'autres gènes présents en 3 copies (Olson et al., 2007). L'analyse des caractéristiques phénotypiques des Ts1Rhr a été menée par une deuxième équipe. L'étude de Belichenko *et al.* en 2009 est en faveur d'un rôle crucial de la région DSCR dans les phénotypes trisomiques. En effet, ils ont mis en évidence, comme chez les TS65Dn, une diminution de la densité des épines dendritiques au niveau du gyrus denté de l'hippocampe, associée à une augmentation de l'aire de la tête des épines ainsi que des déficits d'apprentissage et de mémoire (Belichenko et al., 2009).

4.3. Les modèles poly-transgéniques pour les gènes de la région DCR-1 humaine

Afin d'affiner les relations génotype/phénotype et de mieux cibler les gènes candidats, une banque *in vivo* de souris transgéniques a été construite. Elles surexpriment les gènes de la DCR-1, région DSCR identifiée en 1993 par Delabar *et al.* (Smith et al., 1997).

Le modèle YAC152F7 surexprime cinq gènes de la DCR-1 dont *Dyrk1a*. Une étude de 1997 reporte des déficits d'apprentissage et de mémoire et une hypoactivité et suspecte fortement l'implication du gène *Dyrk1a* dans les déficits observés (Smith et al., 1997). Une augmentation du volume cérébral, notamment cortical a également été reportée (Sebrié et al., 2008). Des cultures primaires de neurones issus des souris 152F7 présenteraient une croissance altérée de l'arborisation dendritique (Lepagnol-Bestel et al., 2009).

En 2009 a été publiée par l'équipe du docteur Jean Delabar une étude sur ce même modèle. Elle a mis en évidence chez ces souris des altérations morphologiques du cerveau: augmentation du poids et de la taille du cerveau, modification de la densité cellulaire, ainsi que des déficits de mémoire à long terme. De manière surprenante, le traitement des souris YAC152F7 avec du thé vert riche en EGCG permet de restaurer les défauts morphologiques et d'améliorer les déficits cognitifs observés (Guedj et al., 2009). Le traitement n'ayant aucun effet sur le taux de protéine DYRK1A, il corrigerait l'effet dosage génique des souris YAC152F7 via une inhibition directe ou indirecte de l'EGCG sur l'activité de la kinase.

Ces résultats ont confirmé le rôle du gène candidat *Dyrk1a* dans le développement de troubles cognitifs et le potentiel thérapeutique d'inhiber l'activité de la kinase qu'il code.

4.4. Les modèles monogéniques surexprimant *Dyrk1a*

Ces modèles ne surexpriment qu'un seul gène présumé candidat, et permettent de vérifier son implication et de lui associer le(s) phénotype(s) caractéristique(s) de la trisomie 21. La version du gène inséré peut être soit murine soit humaine. La nature du promoteur permet une expression génique plus ou moins forte. Des modèles de surexpression des gènes *Sod1*, *DSCR1* codant pour la calcipressine qui inhibe la calcineurine, *Ets2* codant pour un facteur de transcription, *S100β* codant pour une protéine liant le calcium, ou encore APP impliqué dans la formation des plaques amyloïdes ont été développés (pour revue (Rachidi and Lopes, 2007)). La protéine DYRK1A est surexprimée dans tous les modèles murins cités ci-dessus (Ts65Dn, YAC152F7..) à l'exception des modèles Ms1Ts65 et Ms1Rhr/Ts65Dn. En

1997, Rubin et son équipe évoquaient déjà l'importance de l'orthologue humain du gène minibrain dans les phénotypes cognitifs relatifs à la trisomie 21 (Smith et al., 1997). Depuis, cinq modèles monogéniques surexprimant Dyrk1a ont été générés :

Type de trisomie	Souris	ADNc/gène/segment	Promoteur	Copie supp.	Phénotype	Référence
Segment humain	ES(#21)-11	HSA21 chimérique	gène	1	Taille anormale, hypoplasie thymique, malformations cardiaques, défauts apprentissage	Shinoara 2001
	Tc1	HSA21 chimérique	gène	1	Malformations cardiaques, \searrow densité neuronale cérébelleuse	O'Doherty 2005
	TgYAC152F7	[DSCR5-DYRK1A]	gène	1	\nearrow poids cérébral et taille neuronale, déficits apprentissage et mémoire	Branchi 2004, Guedj 2008
	TgYAC230E8	[C21ORF18-CLDN14]	gène	1	\nearrow densité neuronale corticale, déficits d'apprentissage	Smith 1997, Rachidi 2007
Segment murin	Ts16	MMU16 [<i>Rbm11-Znf295</i>] (homologie:HSA22,HSA3,HSA16)	gène	1	Fœtus: malformation cardiaque, hypoplasie thymique, cou court, \searrow poids cérébral	Gropp 1975, Seregaza 2006
	Ts65Dn	[<i>Mrp139-Znf295</i>]	gène	1	Perte périnatale, hypoplasie cervelet, dysmorphie crâniofaciale, bachycéphalie, déficits d'apprentissage et de mémoire	Davison 1990 Reeves 1995
	Ts1Cje	[<i>Sod1-Znf295</i>]	gène	1	\searrow volume cervelet, anomalies crâniofaciales déficits d'apprentissage et de mémoire	Sago 1998, Belichencko 2007
	Ms1Ts65	[<i>App-Sod1</i>]	gène	1	\searrow densité neuronale cérébelleuse	Sago 2000
	Ts1Rhr	[<i>Cbr1-Mx2</i>]	gène	1	Dysmorphie crâniofaciale légères vs Déficits apprentissage et mémoire	Olson 2007 Belichencko 2009
	Ms1Rhr/ Ts65Dn	[<i>Mrp139-Cbr1</i>]-[<i>Mx2-Znf295</i>]	gène	1	Dysmorphie crâniofaciale légères	Olson 2004
Double gène	TgDyrk1a-TgDscr1	ADNc murin	beta-actine	x2	Malformations cardiaques	Arron 2006
Simple gène	TgSOD1	gène humain	gène	10	Hypoplasie thymique, \searrow densité neuronale	Lauren 2006, Harris-Cerruti 2004
	BACDYRK1A	gène humain	gène	20	\nearrow poids cérébral, déficits apprentissage et mémoire	Ahn 2006
	TgDyrk1a	ADNc murin	Metallothionéine	2-20	Maturation crâniofaciale retardée, déficits apprentissage et mémoire, déficits moteurs	Altafaj 2001
	TgDyrk1a	ADNc murin	beta-actine	x2	Malformations cardiaques et vasculaires	Arron 2006
	TgEts2	ADNc murin	Metallothionéine	X2	dysmorphie crâniofaciale, bachycéphalie	Branchi 2004
	TgS100B	gène humain	gène	70	\nearrow densité dendritique hippocampique	Friend 1992
	TgS100b	gène murin	gène	2-12	Astrocytose, défauts développement dendritique, croissance axonale et mémoire spatiale	Reeves 1994

Tableau 2. Phénotypes des modèles murins de trisomie 21 (adapté de Delabar et al., 2006).

4.4.1. Les souris mcDNA-TgDyrk1a d'Estivill

Elles contiennent l'ADNc murin du gène Dyrk1a sous contrôle d'un promoteur exogène: celui de la métallothionéine du mouton. La particularité de ce promoteur est qu'il est constitué de plusieurs éléments fonctionnant indépendamment les uns des autres, chacun pouvant activer la transcription du gène. Quatre lignées de souris indépendantes portant 2 à 20 copies additionnelles du transgène ont été obtenues. Une d'elles comportant 2 copies supplémentaires a été caractérisée. Ces souris présentent un retard de développement moteur, une altération de la coordination ainsi que des défauts d'apprentissage et de la mémoire (Altafaj et al., 2001). Une étude récente a mis en évidence chez ces souris une

réduction de la complexité de l'arborisation dendritique, de la densité des épines dendritiques des neurones pyramidaux du cortex (Martinez de Lagran et al., 2012).

Deux points limitent l'utilisation de ce modèle pour mimer l'effet de la triplification de Dyrk1a chez les patients atteints trisomie 21 :

- l'absence du promoteur endogène du gène Dyrk1a empêche la fixation des facteurs de transcription régulant l'expression de ce gène.
- le transgène est présent en, au minimum, deux copies additionnelles, ce qui excède le dosage génique dans la trisomie 21.

4.4.2. Les souris hBAC-TgDyrk1a de Song

Dans cette lignée, le gène humain codant pour la protéine DYRK1A est inséré dans son intégralité et exprimé sous contrôle de son promoteur endogène. Elles présentent une augmentation du poids du cerveau, un retard de la prolifération des précurseurs neuronaux et d'importants déficits d'apprentissage et de mémoire (Ahn et al., 2006a; Park et al., 2010). Cependant, on ne peut pas exclure un éventuel lien entre le phénotype observé chez ces souris et l'origine humaine du transgène.

4.4.3. Les souris mcDNA-TgDyrk1a de Cratbee

Le transgène de cette lignée contient le gène entier de rat, sous contrôle d'un promoteur β -actine. Les animaux manifestent des défauts vasculaires et des malformations cardiaques. (Arron et al., 2006).

4.4.4. Les souris mcDNA-TgDyrk1a de D'Arcangelo

L'ADNc murin couplé à la protéine fluorescente Green Fluorescent Protein (GFP) sous contrôle d'un promoteur de cytomégalovirus est surexprimé dans les néocortex d'embryons de souris, grâce à la technique d'électroporation *in utero*. Les embryons présentent des altérations de la neurogénèse : une inhibition de la prolifération et une différenciation prématurée des précurseurs neuronaux (Yabut et al., 2010b).

4.4.5. Les souris mBACtgDyrk1a de Delabar

Le transgène de cette lignée, BAC189N3, contient une copie additionnelle du gène Dyrk1a murin sous contrôle de son promoteur et des séquences régulatrices endogènes, permettant ainsi de mimer l'expression endogène. Les souris présentent une viabilité réduite, une augmentation du poids du cerveau, des variations de densité cellulaire, notamment une diminution au niveau du cortex, confirmant ainsi son rôle dans le développement cérébral (Guedj et al., 2012).

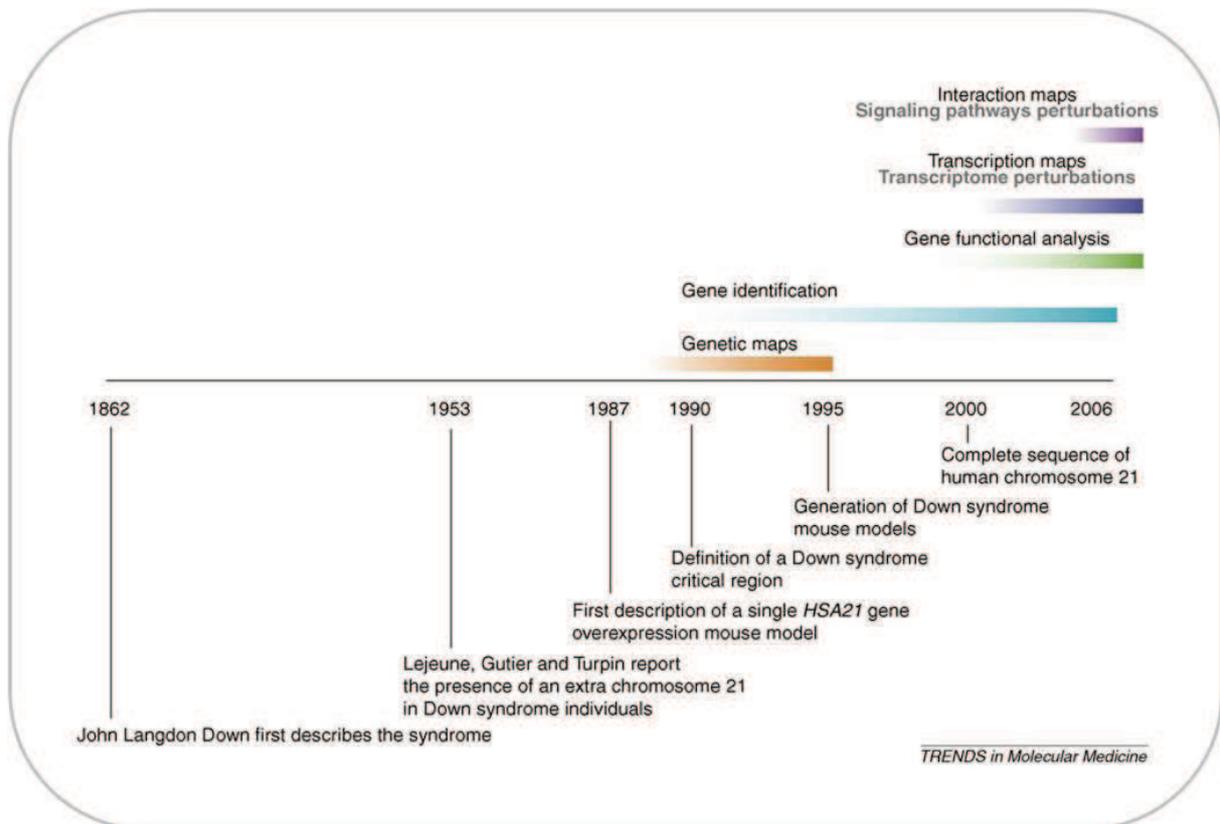


Figure 10. Perspective historique de la recherche sur la trisomie 21 (d'après de la Luna and Estivill, 2006).

En conclusion, la figure 10 retrace les étapes principales de la recherche sur la trisomie 21. La finalité de ces recherches est de parvenir à mettre au point une prévention ou un traitement améliorant, puis normalisant, les fonctions intellectuelles des malades, la déficience intellectuelle qui les touche constituant leur principal handicap.

Des expériences sont actuellement en cours avec le gallate d'épigallocatechine, inhibiteur naturel de la protéine kinase DYRK1A. Cette substance naturelle n'a aucun effet secondaire connu jusqu'à maintenant et peut être administrée par voie orale. La phase pilote d'un essai clinique a été dirigée en 2010 par l'équipe du professeur Mara Dierssen du Centre sur la régulation génomique à Barcelone avec le soutien financier de la Fondation Jérôme Lejeune. Ce premier essai thérapeutique mené auprès de 30 patients âgés de 18 à 26 ans semble prometteur et indique qu'un mois de traitement suffirait pour observer un effet positif sur la mémoire et la psychomotricité, ceci sans effet secondaire indésirable. La phase suivante de cette étude débutera d'ici peu sur une centaine de patients en Espagne également.

Ce graphe ne tient pas compte de l'avancée des recherches sur un plan synaptique, soit l'aspect « synaptopathie » qui sera détaillé dans le paragraphe IV de cette introduction.

II. Le cortex préfrontal

1. Généralités

Le cortex préfrontal (CPF) est la zone du cortex cérébral située à l'avant du lobe frontal, soit devant les régions motrices et prémotrices (figure 11). Il est impliqué dans de nombreux processus cognitifs, exécutifs ou émotionnels, assurés par des sous-régions anatomiquement distinctes. La majorité des régions corticales et sous-corticales est connectée et connecte, directement ou indirectement, le CPF lui conférant un rôle intégrateur central au sein du système nerveux.

Il se caractérise par un développement tardif sur les plans :

- ontogénétique: sa myélinisation se poursuit durant les premières années de vie et sa maturation dendritique et synaptique n'atteignent un niveau stable qu'à l'adolescence.
- phylogénétique : sa taille relative n'a cessé d'augmenter au cours de l'évolution. Le CPF représente 3,5 % du cortex du chat, 11,5 % chez le macaque, 17 % chez le chimpanzé, et atteint un maximum de 29 % chez l'humain (Fuster, 2002).

D'une espèce à une autre, le CPF présente des variations anatomiques et de connectivité. Les premières études comparatives inter-espèces furent basées sur des critères purement anatomiques. Elles conclurent à une existence controversée du CPF chez les non-primates. Grâce à des critères complémentaires (patron de connexions, propriétés fonctionnelles, systèmes de neurotransmission et développement embryologique), il a été possible de préciser l'homologie anatomique de régions corticales entre les espèces et de conclure que le CPF des rongeurs présentait des analogies avec celui des primates (Uylings et al., 2003). Aujourd'hui il est établi que l'équivalent anatomique et fonctionnel du CPF dorsolatéral primate est le cortex prélimbique (PL) des rongeurs (Heidbreder and Groenewegen, 2003; Uylings et al., 2003; Vertes and Hoover, 2008).

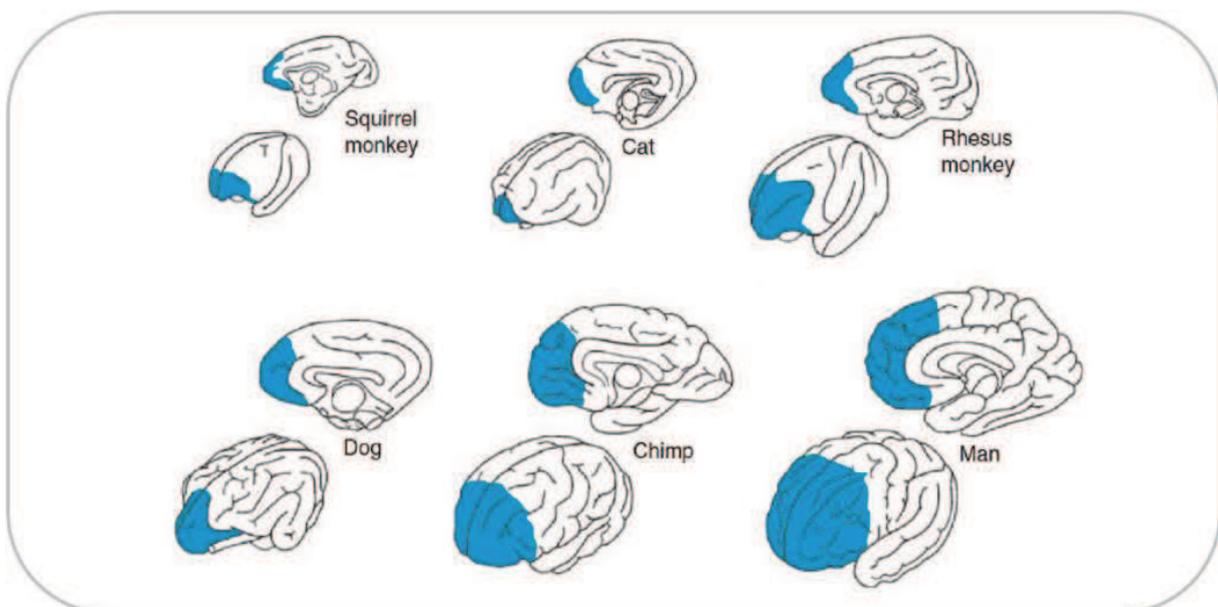


Figure 11. Localisation et taille du cortex préfrontal chez six mammifères (adapté de *The Prefrontal Cortex*, Fourth edition, Fuster 2008).

2. Organisation du CPF

2.1. Les différentes subdivisions (figure 12)

Région hétérogène, le CPF peut être subdivisé en plusieurs zones, variables selon les auteurs mais incluant, de manière non exclusive, le cortex orbitofrontal (COF), le cortex préfrontal dorsolatéral (CPFdl), le cortex cingulaire (CCi) et le cortex préfrontal médian (CPFm).

Chez les rongeurs, il est subdivisé en trois régions (Dalley et al., 2004):

- le CPF **médian**, subdivisé en :
 - une zone dorsale comprenant :
 - le cortex cingulaire antérieur
 - le cortex précentral
 - une zone ventrale comprenant :
 - le cortex prélimbique
 - le cortex infralimbique
 - le cortex orbital médian
- le CPF **latéral** comprenant :
 - le cortex insulaire ventral
 - le cortex insulaire dorsal
 - le cortex orbitolatéral
- le CPF **ventral** comprenant des aires du cortex orbitofrontal
 - le cortex orbital ventrolatéral
 - le cortex orbital ventral

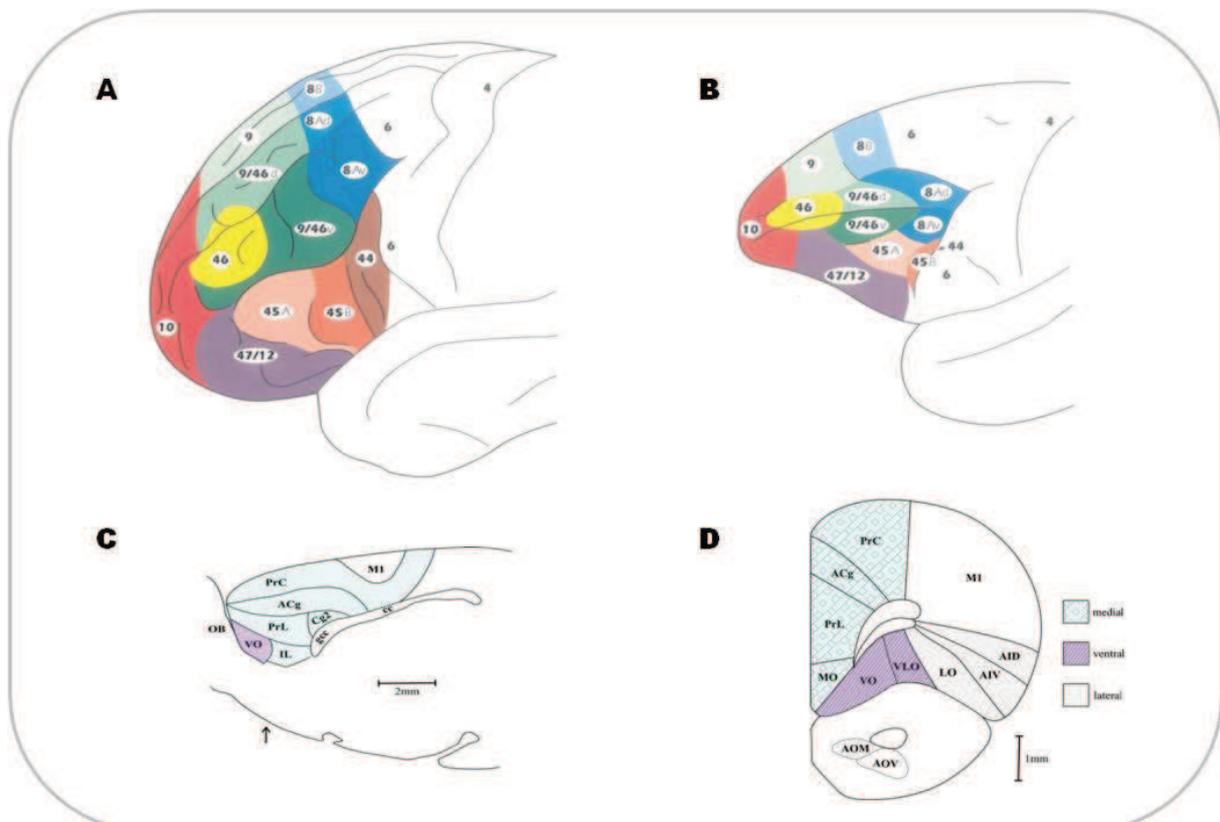


Figure 12. Carte architectonique du CPF de l'homme, du macaque et du rat. A. Surface latérale du CPF humain. B. Surface du CPF simien. Aires de Brodmann 8-9-46: CPFdl; 10: cortex antérieur; 47/12:

aires de Broca; 45-44: COF (d'après Petrides & Pandya 2009). **C.** Coupe sagittale du CPF de rat 0.9mm depuis la ligne médiane. **D.** Coupe coronale du CPF de rat à 3.5mm du bregma (flèche du C.) Les régions colorées représentent les trois subdivisions du CPF (dorsal, médial et ventral). ACg: cortex cingulaire antérieur, AID: cortex insulaire dorsal, AIV: cortex insulaire ventral, AOM: noyau olfactif médial antérieur, AOV: noyau olfactif ventral antérieur, cc: corps calleux, Cg2: cortex cingulaire aire 2, gCC: genou du corps calleux, IL: cortex infralimbique, LO: cortex orbital latéral, M1: aire motrice primaire, MO: cortex orbital médial, OB: bulbe olfactif, PrL: cortex prélimbique, PrC: cortex précentral, VLO: cortex orbital ventrolatéral, VO: cortex orbital ventral (d'après Dalley et al., 2004).

Des études anatomo-fonctionnelles ont permis de mettre entre évidence les analogies fonctionnelles de régions entre le CPF des primates et celui des rongeurs (tableau 3).

Le CPFm des rongeurs peut être considéré comme l'équivalent fonctionnel chez les primates du CPFdl ou du cortex cingulaire antérieur (CCA) (Seamans et al., 2008). Concernant la partie ventrale du CPFm des rongeurs: le cortex prélimbique (PL) est associé aux CPFdl et ventromédian des primates; le cortex infralimbique (IL) au CCA et orbitomédian (Milad and Quirk, 2002; Vertes, 2004).

Les COF seraient équivalents chez les deux espèces (Schoenbaum et al., 2003). La zone dorsale du CPFm (CCA et cortex précentral) des rongeurs correspondrait à des zones visuelles frontales chez les primates (Seamans et al., 2008).

RONGEUR		PRIMATE	Référence
CPF médian ventral	Prélimbique	CPF dorsolatéral CPF ventromédian	Vertes, 2004 ; Seamans et al., 2008
	Infralimbique	Cortex cingulaire antérieur CPF orbitomédian	
Cortex orbitofrontal		Cortex orbitofrontal	Schoenbaum et al., 2003
CPF médian dorsal		Aire de coordination oculomotrice	Seamans et al., 2008

Tableau 3. Homologies régionales du CPF entre primate et rongeur.

2.2. Organisation laminaire

Les cellules principales composant le cortex cérébral sont les neurones pyramidaux, excitateurs glutamatergiques. Ils représentent environ 80% de la population neuronale. Les 20% restant correspondent à des interneurons inhibiteurs ou excitateurs (cellules étoilées épineuses), des cellules fusiformes excitatrices et des cellules gliales (Markram et al., 2004; Silberberg et al., 2005).

Le cortex cérébral est composé de six couches distinctes, numérotées à partir de la surface piaie. Cette organisation stratifiée, visible en coupe coronale, repose sur la répartition des différents types et prolongements cellulaires ainsi que de leur projection (figure 13) :

- La couche I : couche moléculaire

Fine et généralement acellulaire, elle se compose d'axones et de prolongements dendritiques apicaux orientés horizontalement, issus de neurones corticaux et sous-corticaux.

- *La couche II : couche granulaire externe*

Elle est constituée de cellules granulaires, cellules excitatrices à courts prolongements dendritiques et axonaux impliquées dans les connexions corticocorticales. Dans le CPFm, elle est confondue avec la couche III (couche II/III).

- *La couche III: couche pyramidale externe*

Plus épaisse que les deux premières, cette couche contient principalement des neurones pyramidaux. De nombreuses projections intracorticales naissent ici.

- *La couche IV: couche granulaire interne*

Elle est formée par des neurones étoilés à arborisation dendritique très développée, qui projettent sur les cellules des couches II et V. C'est notablement la zone cible des afférences thalamiques.

- *La couche V : couche pyramidale interne*

C'est la couche de sortie du CPF. Comme la couche III, elle est composée de neurones pyramidaux dont les prolongements dendritiques apicaux remontent jusque dans les couches plus superficielles. Ces neurones forment la majorité des efférences sous-corticales. Il y a deux classes principales de cellules pyramidales dans la couche V : les cellules épaisses touffues qui projettent dans des régions sous-corticales, notamment striatales (ce sont les principales sources de sortie du néocortex) et les cellules fines qui projettent dans l'hémisphère controlatéral (Silberberg et al., 2005).

- *La couche VI : couche polymorphe*

Elle contient des neurones étoilés, pyramidaux et fusiformes, projetant vers le thalamus.

Ce profil laminaire est retrouvé dans le CPF, mais n'est toutefois pas constant d'une aire corticale à une autre. Dans le cortex moteur par exemple, la couche V est épaisse et richement peuplée en cellules pyramidales alors que la couche IV est relativement fine et ne contient que quelques fibres afférentes. Dans le CPFm, notamment les cortex PL et IL, la couche IV est absente d'où le terme de cortex agranulaire. Ces différences structurales furent la base de la classification des aires cérébrales par Brodmann (toujours utilisée à ce jour), qui estimait qu'elles correspondaient à des fonctions différentes.

2.3. Organisation en colonne

Au sein du cortex, les neurones s'organisent verticalement en unités fonctionnelles prenant la forme de colonnes perpendiculaires à la surface corticale. Chaque colonne correspond à un cylindre de taille, composition cellulaire et organisation synaptique variables, assurant une fonction précise dans le traitement de l'information. La colonne est considérée comme l'unité fonctionnelle de base du cortex cérébral (Herculano-Houzel et al., 2008; Rakic, 2008). Non-distinguable par des méthodes histologiques, cette organisation a été mise en évidence en 1957 par Mountcastle alors qu'il enregistrait des neurones du cortex somato-sensoriel du chat.

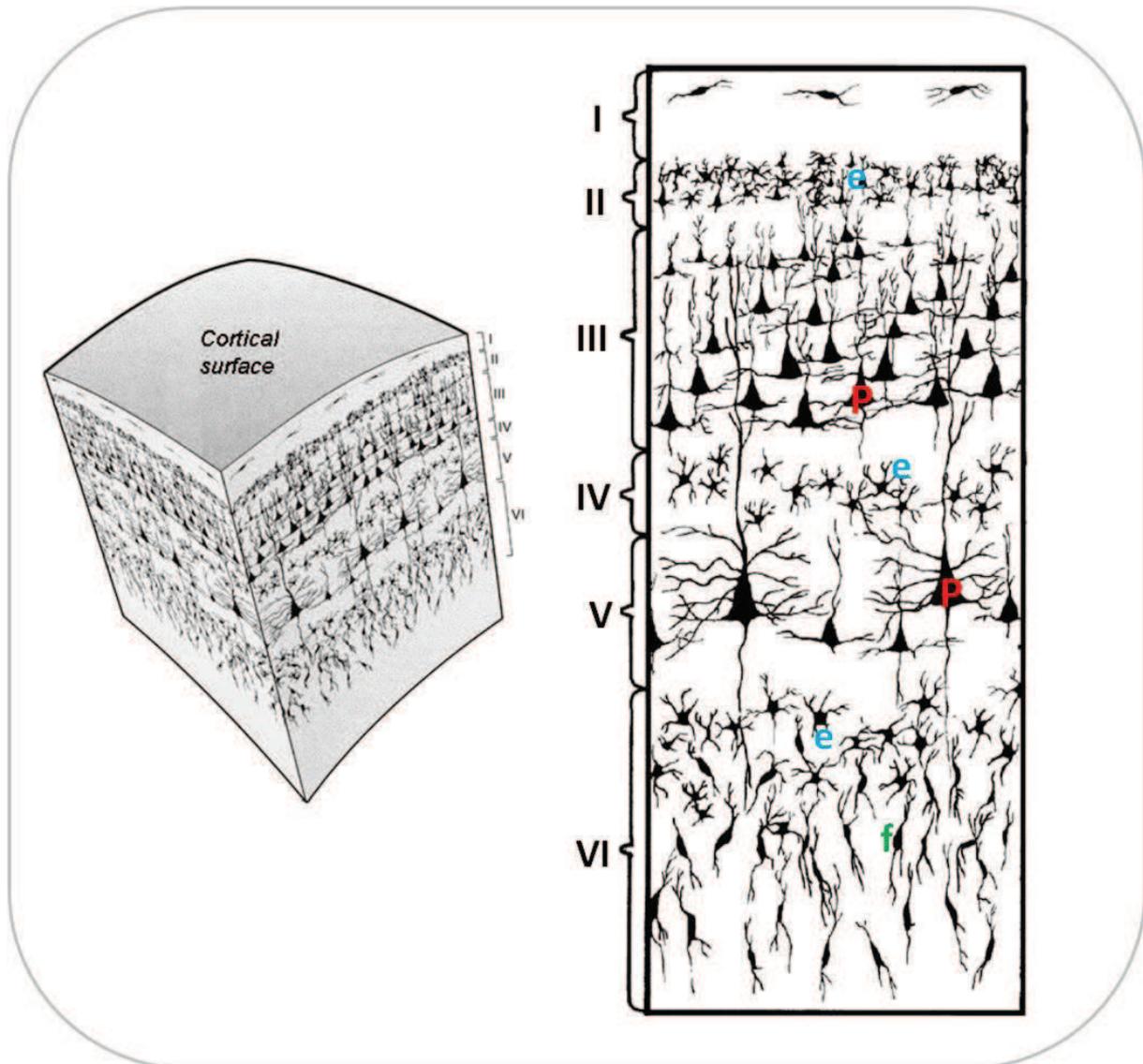


Figure 13. Représentation schématique des six couches du CPF illustrant les principaux types cellulaires et leur arrangement. e: cellule étoilée, P: neurone pyramidal, f: cellule fusiforme (d'après Ramachandran 2002).

Il constata qu'en implantant l'électrode d'enregistrement obliquement à la surface corticale, les neurones traversés réagissaient à des stimuli différents, tandis qu'en la plantant perpendiculairement, les neurones répondaient tous au même stimulus. Il proposa alors l'hypothèse d'une organisation en colonne (Mountcastle et al., 1957). Leur utilité fonctionnelle est toutefois encore débattue (Horton and Adams, 2005). Les groupes de neurones constituant chaque colonne ont des champs récepteurs communs définissant la partie de l'activité intra- ou extracorticale qu'ils reçoivent. Un champ récepteur n'est pas caractéristique d'une seule mais de plusieurs colonnes formant une « hypercolonne », au sein de laquelle chaque colonne traite différemment le signal (Mountcastle, 1978). De plus, il existe une connectivité de proximité, c'est-à-dire entre colonnes voisines, ce qui laisse supposer un traitement complexe de l'information sous la forme de réseaux neuronaux. Cette organisation fut généralisée à tout le cortex de différentes espèces. En effet, ces colonnes ont été retrouvées dans les cortex visuel du singe (Hubel and Wiesel, 1968), auditif

de la chauve-souris (Suga, 1977) ou somatosensoriel du rat (Kossut and Hand, 1984). Elles ont également été mises en évidence dans le CPF du singe par des études électrophysiologiques ou d'imagerie optique utilisant des colorants sensibles au voltage (Rao et al., 1999; Hirata and Sawaguchi, 2008), mais aussi dans le CPF des rongeurs (Jung et al. 2000).

3. Connectivité

Cette région établit d'importantes connexions réciproques avec des régions sous-corticales comme le système limbique, ainsi qu'avec de nombreuses aires corticales sensorielles associatives (principalement somatiques, auditives et visuelles) (Fuster, 2001). Les différentes aires du CPF sont également hautement interconnectées entre elles. Cette importante innervation suggère que le CPF constitue le «cortex associatif» du lobe frontal (figure 14).

L'utilisation de traceurs anatomiques rétrogrades et antérogrades a permis de mettre en évidence les projections afférentes et efférentes des différentes régions du CPF.

3.1. Connectivité intrinsèque: les microcircuits

Différents niveaux de traitement de l'information existent au sein du CPF, assurant une intégration précise et efficace du signal. Elle est possible grâce à l'existence d'une part de microcircuits au sein des six couches, et d'autre part de la connectivité entre les différentes sous-régions préfrontales intégratives.

3.1.1. Connexions intra- et interlaminaires

Il existe une organisation complexe de la circuiterie au sein même et entre les couches corticales, permettant un traitement complexe de l'information. Plusieurs types de microcircuits sont retrouvés au sein du cortex et spécifiquement du CPF: des boucles de rétrocontrôle inhibiteur et excitateur (Krimer and Goldman-Rakic, 2001; Miller and Wang, 2006; Tierney et al., 2008).

Les interneurons présents dans toutes les couches forment des synapses inhibitrices au sein du CPF et sont responsables de deux types de boucle d'inhibition:

- la « feed forward inhibition » : elle est déclenchée par un input excitateur qui active à la fois une cellule pyramidale et un interneurone inhibiteur. Cette inhibition disynaptique arrive avec un délai sur le neurone pyramidal, ce qui a pour conséquence d'écourter la durée de la réponse excitatrice et de limiter la fenêtre temporelle de sommation des réponses, affinant ainsi la précision temporelle de l'output pyramidal.
- la « feedback inhibition » : elle est déclenchée par les collatérales récurrentes des cellules pyramidales qui, une fois activées, activent les interneurons qui les inhibent à leur tour.

Les cellules excitatrices des différentes couches sont hautement interconnectées pour former des réseaux récurrents excitateurs au sein du CPF de type « feed forward » et

« feedback excitation » (Wang et al., 2006) (avec des propriétés particulières et hétérogènes permettant une activité persistante). Au sein des couches II/III, cellules pyramidales, cellules granulaires et interneurons excitateurs (cellule étoilée épineuse) forment des microcircuits récurrents. Elles projettent sur les cellules excitatrices de la couche V, notamment pyramidales interconnectées et connectées réciproquement aux cellules de la couche VI, elles-mêmes interconnectées (Douglas et al., 1995) (figure 14)

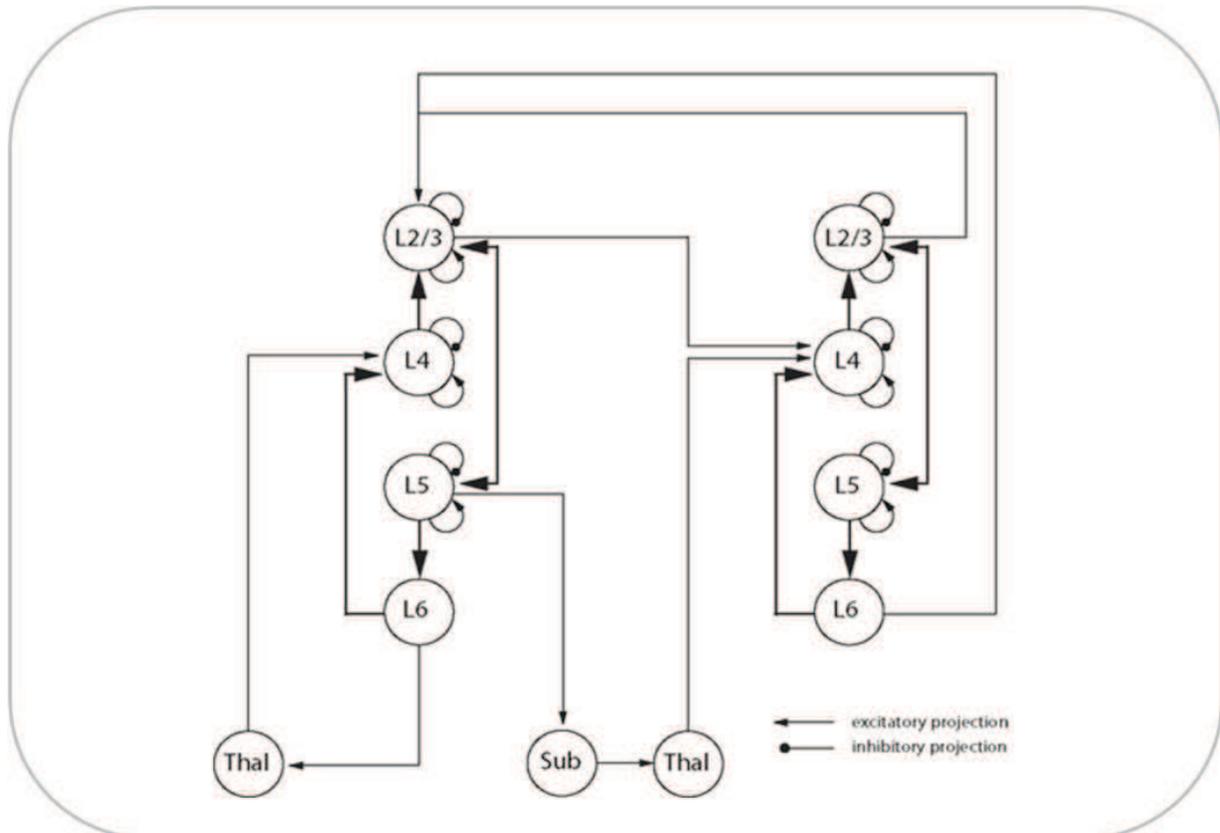


Figure 14. Représentation des principales connexions dans le microcircuit cortical canonique. Les connexions excitatrices sont représentées par des flèches et inhibitrices, par des lignes avec des terminaisons circulaires. « Lx » désigne les couches où sont localisés les corps cellulaires, représentés par des cercles. Thal: thalamus; Sub: régions sous-corticales (d'après da Costa and Martin, 2010). Pour des schémas détaillés cf. <http://www.columbia.edu/cu/biology/faculty/yuste/databases.html>

Le signal se propage des couches superficielles vers les couches profondes, rencontrant différents niveaux de traitement de l'information. Les fibres afférentes, majoritairement thalamiques, contactent les cellules excitatrices des couches II/III dans le CPF (Wang and Shyu, 2004; Rotaru et al., 2005) et les interneurons inhibiteurs des couches superficielles. L'information est directement distribuée sur les deux types de cellulaires, ce qui constitue le premier niveau de traitement. Les boucles de rétrocontrôle se mettent ainsi en place. La feed forward inhibition permet aux cellules pyramidales d'agir comme des détecteurs de coïncidence capables d'intégrer plusieurs entrées excitatrices, comme par exemple celles des cellules étoilées, à condition qu'elles arrivent dans un court délai (avant inhibition). Ceci constitue un deuxième niveau de traitement. Les projections descendantes des couches II/III vers les couches V/VI constituent le troisième niveau de traitement. Les cellules pyramidales

de la couche V projettent vers les régions sous-corticales. Elles contactent également les cellules de la couche VI (quatrième niveau de traitement), cellules de projections thalamiques (Silberberg et al., 2005).

Cette connectivité synaptique locale permet une fiabilité et une précision temporelle de l'intégration et de la propagation du signal afférent (Boucsein et al., 2011).

3.1.2. Connectivité au sein du CPF

Les différentes subdivisions du CPF sont étroitement connectées entre elles.

Il a été montré que la partie dorsale du CPF latéral (CPFL) recevait de nombreuses projections du CPFm. La partie ventrale du CPFL reçoit des afférences du COF. Chez les rongeurs, il a été mis en évidence l'existence de connexions au sein même du CPFm. Le cortex PL projette sur le cortex antérieur dorsal ; le cortex IL projette à la fois sur les cortex insulaire, PL et cingulaire antérieur dorsal (Heidbreder and Groenewegen, 2003).

3.2. Connectivité extrinsèque

Le CPF est connecté directement ou indirectement à de nombreuses régions cérébrales. La majorité de ces connexions est réciproque (figure 15).

Les études anatomiques utilisant les marqueurs antérogrades et rétrogrades ont identifié la ségrégation topographique des projections afférentes et efférentes du CPF.

3.2.1. Afférences

Thalamus

L'existence du CPF chez le rongeur fut initialement définie sur la base des projections thalamocorticales réciproques en provenance du noyau médio-dorsal (MD) du thalamus. Il apparaît aujourd'hui que le MD n'est pas la seule structure thalamique ayant des connexions avec le CPF. Il existe aussi des relations avec les noyaux de la ligne médiane et intralaminaire, le noyau médian antérieur et les parties rostrales du complexe ventral. De plus, les projections du MD atteignent également d'autres structures corticales comme les cortex pariétal, prémoteur, moteur et temporal.

Le MD projette sur les neurones pyramidaux des couches III et V du cortex prélimbique. Ces synapses sont de type axo-épineux avec des épaissements asymétriques de la membrane. Il y a toutefois plus de synapses thalamocorticales sur les dendrites apicales des neurones pyramidaux de la couche V.

Ganglions de la base

Le CPF reçoit, via un relais thalamique, des projections en provenance des ganglions de la base (striatum et pallidum). C'est la réciprocity des connexions CPF-ganglions de la base qui fait l'originalité de cette connectivité. En effet, d'autres structures corticales, telles que les cortex pariétal, temporal et occipital projettent vers le striatum mais ne reçoivent pas d'information en retour de cette structure.

Ces connexions réciproques se font selon une boucle complexe cortico-striato-pallido/nigro-thalamo-corticale. Les projections striato-pallidale/pallido-thalamiques et striato-nigrale/nigro-thalamiques sont très organisées : elles contactent des régions distinctes du CPF, généralement celles dont elles sont issues. Par exemple, le striatum ventral (noyau accumbens, NAc) projette sur le COF via un relai MD, et en retour le COF projette directement sur le NAc (Schoenbaum et al., 2003).

Cette topologie permet ainsi de définir des circuits parallèles indépendants, qui ont été identifiés aussi bien chez le primate que chez le rongeur (Groenewegen & Berendse 1994).

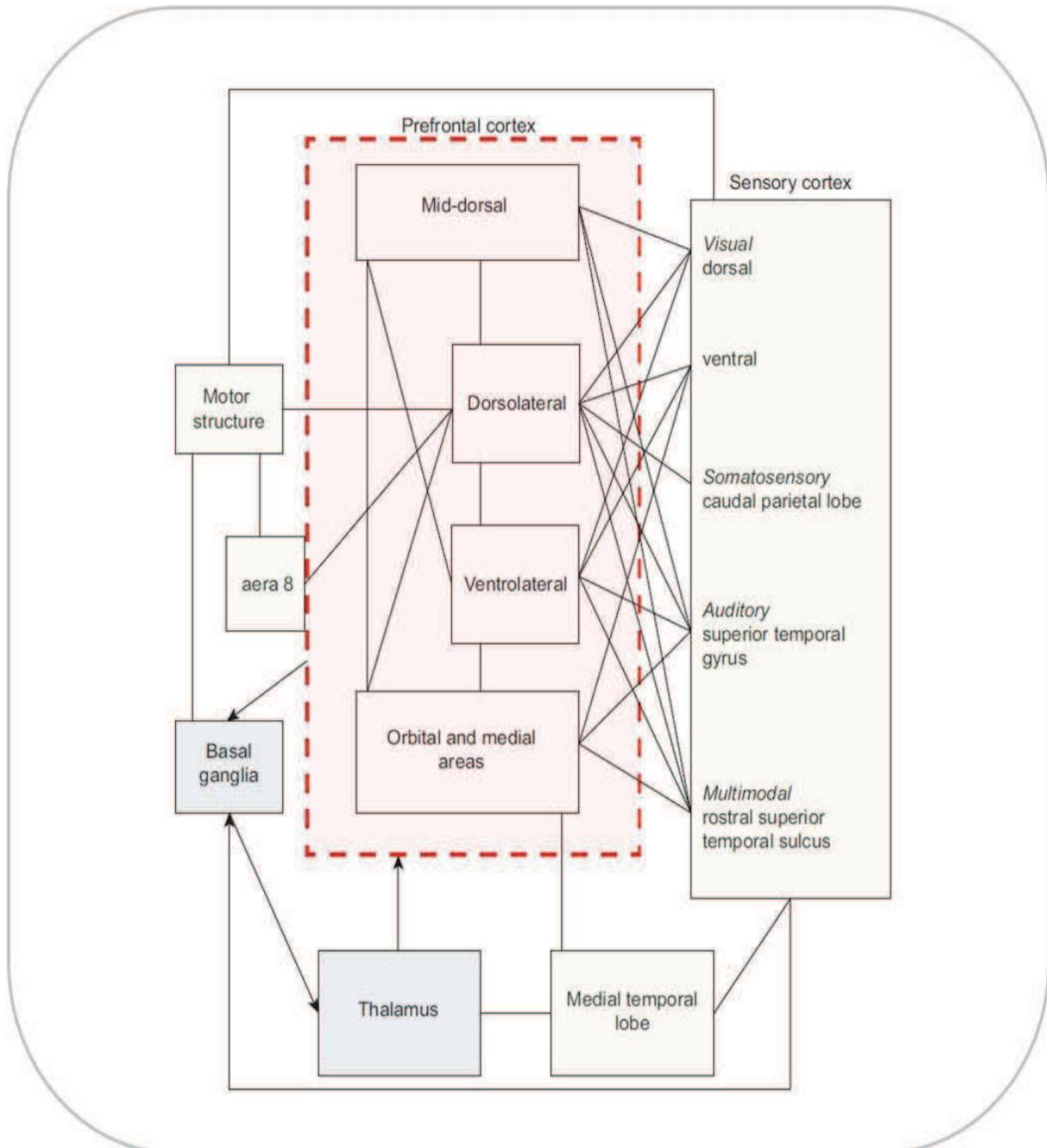


Figure 15. Les connexions intracorticales et sous-corticales du CPF. Diagramme schématisé des connexions extrinsèques et intrinsèques du CPF. La plupart des connexions est réciproque, les exceptions sont notées par des flèches (d'après Miller and Cohen, 2001).

Zones corticales et sous-corticales

Le CPF reçoit également de nombreuses afférences corticales provenant des aires associatives (cortex pariétal postérieur, cortex prémoteur) et sensorielles (cortex somatosensoriel, auditif, visuel, olfactif ou gustatif).

Il est en étroite relation avec les structures sous-corticales notamment le système limbique dont les afférences proviennent de l'amygdale et de l'hippocampe. En particulier, la région CA1 et le subiculum de l'hippocampe projettent massivement vers la partie ventrale du CPF médian soit les cortex PL et IL (Laroche et al., 2000; Heidbreder and Groenewegen, 2003). D'autres structures sous-corticales comme la substance noire, l'aire tegmentale ventrale (VTA), l'hypothalamus latéral ou des noyaux du tronc cérébral comme le noyau du raphé innervent également le CPF.

L'innervation de la VTA et de la substance noire *pars compacta* est essentiellement dopaminergique, et celle du noyau du raphé, sérotoninergique. Des études anatomiques et neurochimiques indiquent que la plus grande densité d'innervation dopaminergique est retrouvée dans le cortex PL (Van Eden et al., 1987).

3.2.2. Efférences

La plupart des connexions avec le thalamus, les ganglions de la base et les structures corticales/sous-corticales sont réciproques.

Plus précisément, on pourra mentionner les différentes projections du CPFm des rongeurs, dont la partie dorsale est impliquée dans les composantes motrices du comportement et la partie ventrale (cortex PL et cortex IL) est liée à des aspects cognitifs, émotionnels et mnésiques (Heidbreder and Groenewegen, 2003).

Le cortex IL projette vers le tronc cérébral et les aires de contrôle viscéro-moteur, l'hypothalamus et l'amygdale. La région PL projette majoritairement vers le système limbique: le Nac, l'amygdale, le thalamus, ou encore l'hypothalamus (Chiba et al., 2001; Vertes, 2004; Gabbott et al., 2005) (figure16).

Aux vues de ses projections afférentes et efférentes, le CPFm ventral est idéalement placé pour avoir un rôle direct dans les fonctions cognitives.



Figure 16. Coupes sagittales schématisques montrant les principales projections des cortex infralimbique (A) et prélimbique (B). AA: aire antérieure de l'amygdale, AHN: noyau antérieur de l'hypothalamus, AI/d/v: cortex insulaire agranulaire/dorsal/ventral, AON: noyau antérieur olfactif, BMA: noyau basomédian de l'amygdale, C: cerebellum, CLA: claustrum, COA: noyau cortical de l'amygdale, C-P: caudé/putamen ; DBh: noyau de la bande diagonale, bord horizontal, DR: noyau dorsal du raphé, EN: noyau endopiriforme, IC: colliculus inférieur, IP: noyau interpédonculé, LHy: aire hypothalamique latérale, LPO: aire latérale préoptique, LS: noyau du septum latéral, MEA: noyau médian de l'amygdale, MO: cortex orbitomédian, MPO: aire préoptique médiane, MR: noyau du raphé médian, N7: noyau facial, NT: noyaux thalamiques, OT: tubercules olfactifs, PBm/l: noyau parabrachial médian/latéral, PFC: région périfornicale de l'hypothalamus, PN: noyau du pons, PRC: cortex périrhinal, SI: substance innominée, SLN: noyau supralemniscal (B9), SUM: noyaux supramamillaires, TTD: taenia tecta partie dorsale, VLO: cortex orbital ventro-latéral, VO: cortex orbital ventral (adapté de Vertes, 2004).

4. Fonctions physiologiques du CPF

Le CPF est considéré comme *la* centrale associative du système nerveux. Il est impliqué dans de nombreuses fonctions cérébrales, notamment le contrôle exécutif (planification, raisonnement abstrait, inhibition d'une action), la mémoire ou encore le comportement émotionnel (figure 17). Il a une position centrale dans les processus « top-down » (feedback), dans lesquels les comportements sont guidés par les « états internes » ou les intentions. En général, il agit pour aiguiller le comportement cognitif en aidant à diriger le flux d'informations relatives aux inputs, aux états internes et aux outputs (Deltour and Gisquet-Verrier, 2000; Miller, 2000; Miller and Cohen, 2001). Ces fonctions sont, dans une certaine mesure, restreintes à des sous-régions spécifiques (Duncan and Owen, 2000). Par exemple, le CPFdl et son équivalent chez le rongeur, le CPFm, sont considérés comme étant les « régions exécutives » car intègrent les informations sensorielles pour aider la coordination

de la planification motrice, la mémoire de travail ou les processus attentionnels (Heidbreder and Groenewegen, 2003; Dalley et al., 2004; Tanji and Hoshi, 2008). Elles se distinguent des « régions limbiques » comme le COF impliqué dans la prise de décision, les émotions et la récompense de part ses interactions étroites avec le système limbique. Ces régions orchestrent conjointement le comportement approprié au contexte et au résultat espéré. Cette spécialisation fonctionnelle régionale au sein du CPF a été mise en évidence d'une part grâce à des modèles animaux (rat, singe) de lésion ou de manipulation pharmacologique visant à détruire une structure, d'autre part chez des patients présentant des lésions spontanées.

4.1. Fonctions exécutives

Les fonctions exécutives désignent un ensemble de processus cognitifs permettant un comportement flexible et adapté à un contexte donné (anticipation, planification, organisation, résolution de problèmes, raisonnement logique, inhibition, flexibilité mentale, attention sélective, motivation...) (Robbins, 1996; pour revue Kesner and Churchwell, 2011). Divers paradigmes expérimentaux sont utilisés chez l'homme ou chez l'animal pour mesurer des processus cognitifs impliquant le CPF. Des études lésionnelles ou par inactivation pharmacologique ont permis de révéler les implications fonctionnelles sélectives des différentes structures du CPF.

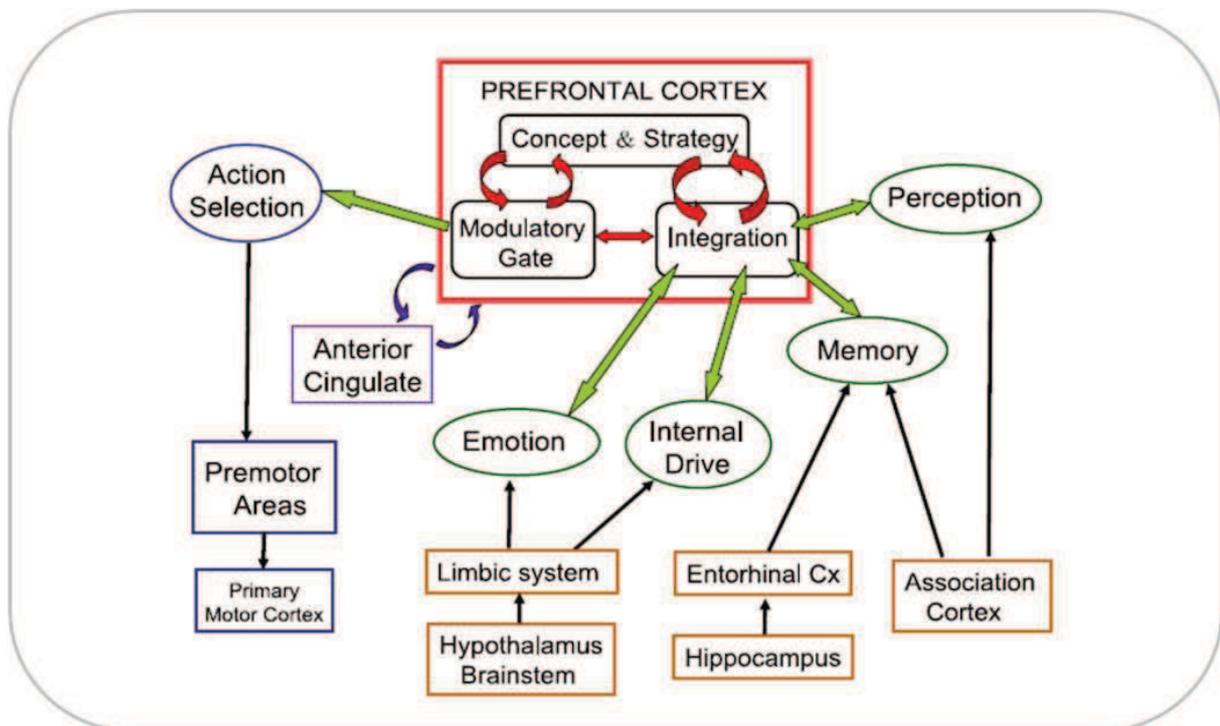


Figure 17. Schéma résumant les fonctions du CPF (d'après Tanji and Hoshi, 2008).

4.1.1. Mémoire de travail

La mémoire de travail est un système mnésique actif permettant le traitement et le maintien d'informations à court terme. Elle sous-tend le stockage et la manipulation temporaire

d'informations pour la réalisation de tâches complexes comme la compréhension du langage, l'apprentissage ou le raisonnement (Baddeley, 1990, 2003). Ceci en fait un élément fondamental des fonctions cognitives supérieures (Goldman-Rakic, 1995). Selon le modèle proposé par Baddeley au début des années 1990, la mémoire de travail serait composée: (figure 18)

- d'une boucle phonologique qui traite les données auditives et verbales
- d'un « calepin » qui traite les informations spatiales et graphiques
- d'une centrale exécutive intégrant les données provenant des deux composants précédents
- d'un « tampon » épisodique facilitant l'intégration dans la centrale exécutive des deux composants

Des études d'IRM fonctionnel couplées à des tests mnésiques chez des sujets sains (D'Esposito et al., 1995) et des patients présentant des lésions frontales (Goldman-Rakic, 1995; D'Esposito et al., 1999, 2006) ont révélé l'implication du CPF dans l'accomplissement des tâches faisant appel à la mémoire de travail. La première découverte a été faite en 1936 par Jacobsen chez des singes: des dommages du CPF rendaient les animaux moins performants à un test de réponse retardée. Le sujet est soumis à une tâche à choix multiple et ne peut réagir uniquement quand un certain délai, fixé arbitrairement, s'est écoulé depuis la disparition des stimuli signalant la réponse correcte menant à la « récompense » (delayed alternation task).

Par ablation et/ou lésion toxique spécifique, il a été montré que la sous-région du CPF impliquée dans la mémoire de travail est, chez les primates, le CPFdl (Owen et al., 1998). Ceci a été corroboré par des approches électrophysiologiques consistant à effectuer des enregistrements cellulaires du CPFdl du singe pendant une tâche avec réponse retardée. Le test commence par la présentation brève d'un stimulus dans le champ visuel, suivie d'un délai où un point de fixation est présenté à l'animal. Celui doit ensuite regarder à nouveau là où était le stimulus visuel pour obtenir une récompense. Des neurones du CPFdl déchargent quand le stimulus est présenté et mais également pendant la période de délai (intervalle de rétention). Ceci correspondrait au code neuronal de la mémoire de travail (Funahashi et al., 1989; Funahashi, 2006). Elle a été testée chez les rongeurs dans des paradigmes de réponse retardée mais aussi dans des tâches de mémoire spatiale de travail (labyrinthe en Y, labyrinthe radial à huit bras). Combinés à des lésions spécifiques, les tests comportementaux ont révélé l'implication dans la mémoire de travail du CPFm (Dudchenko, 2004; Chudasama, 2011), et plus précisément du cortex PL chez les rongeurs (Delatour and Gisquet-Verrier, 1996, 1999).

4.1.2. Processus attentionnels

En plus de son rôle dans la mémoire de travail, le CPF est impliqué dans divers processus attentionnels comme la vigilance, la flexibilité cognitive (set shifting), ou encore la sélection comportementale. La flexibilité cognitive permet au sujet de déplacer son attention d'un stimulus à un autre. Elle peut être évaluée par le test attentionnel de changement de

consigne (set shifting task) dans lequel le sujet doit retenir comme informative une seule dimension de stimuli externes complexes, qui change au cours de l'expérience.

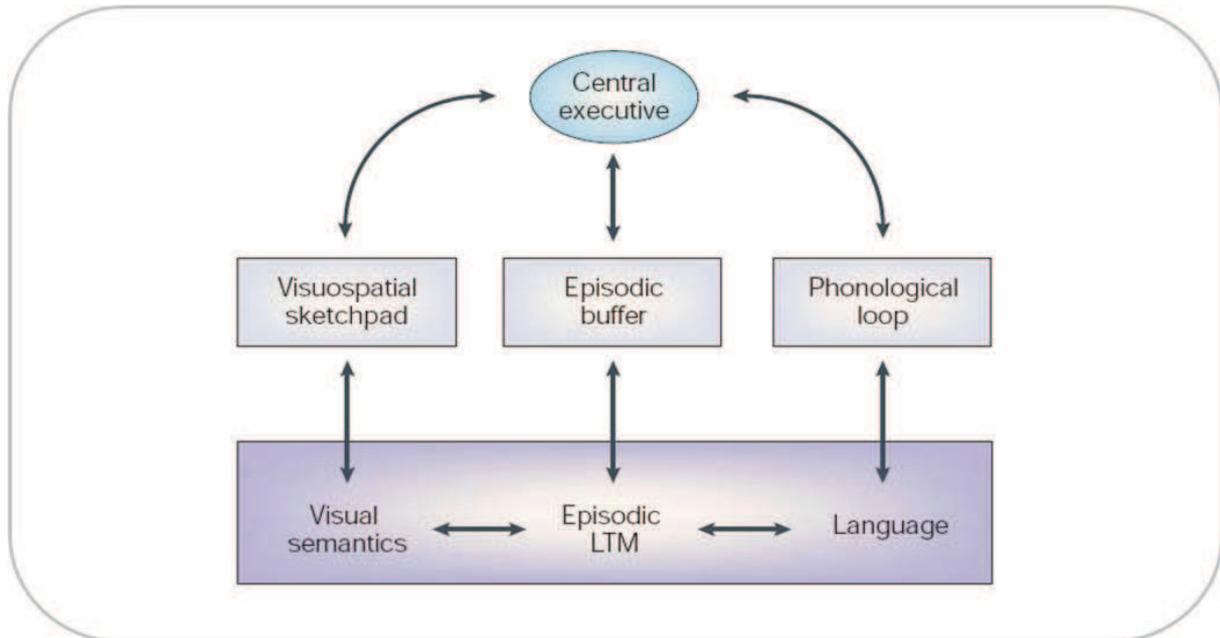


Figure 18 Un modèle multi-composant de la mémoire de travail. En violet foncé sont représentées les connaissances à long-terme et en clair les systèmes « fluides ». Le tampon épisodique est une interface entre les sous-systèmes de la mémoire de travail et la mémoire à long-terme (d'après Baddeley, 2003).

Le test de référence chez l'homme pour évaluer la flexibilité cognitive est celui de classification catégorielle de cartes du Wisconsin (Barceló et al., 1997). Il consiste à trier des cartes sur lesquelles figurent des objets multidimensionnels en fonction de règle basée sur leurs dimensions. La dimension pertinente doit être déterminée d'après les feedback de l'expérimentateur, puis est modifiée sans que le sujet soit averti. Celui-ci doit alors faire preuve de flexibilité en adaptant ses réponses. L'application chez des sujets sains et chez les patients présentant une lésion ou une dysfonction préfrontale a permis de conclure à une implication critique du CPF dans la flexibilité cognitive (Konishi et al., 1998; Barceló and Knight, 2002).

Chez le singe, le CPF gère la capacité de déplacement de l'attention entre des caractéristiques conceptuelles dans des stimuli complexes (Dias et al., 1996, 1997; Owen et al., 1998). Chez le rongeur, un test similaire a révélé la forte implication du CPF dans ces processus (Birrell and Brown, 2000; Lapid et Morilak, 2006).

Le CPF est donc impliqué dans la capacité à appréhender les changements dans des tâches de contingence et en conséquence, d'adapter la stratégie de réponse comportementale, autrement dit la flexibilité comportementale (Dalley et al., 2004).

4.1.3. Prise de décision

La prise de décision est une autre fonction exécutive étroitement associée au CPF (Kable and Glimcher, 2009; Kim and Lee, 2011; Rilling and Sanfey, 2011). Différentes sous-régions

seraient impliquées (Gold and Shadlen, 2007). Le CPFdl sous-tendrait la prise de décision dans les tâches perceptuelles (Kim and Shadlen, 1999; Barraclough et al., 2004). Le CPF ventromédian, et plus précisément le cortex orbital, serait associé aux décisions basées sur la valeur subjective (Bechara et al., 1998, 1999; Wallis, 2011). Dans une étude de Bechara 2004, trois types de tâches différentes ont été utilisées pour tester les problèmes de décision des patients présentant une lésion ventromédiane. Dans l'une d'entre elles, le *Gambling Task* (jeu de poker), les sujets ont à choisir des cartes dans quatre paquets différents. Deux paquets sont à haut risque de perte mais le gain est important (-> perte) et les deux autres sont à faible risque de perte mais le gain est faible (-> gain). Contrairement aux sujets normaux, les sujets présentant la lésion ventromédiane avaient tendance à choisir fréquemment les paquets à haut risque (Bechara, 2004).

La même structure est en jeu chez les rongeurs. Un test standard pour la prise de décision est l'apprentissage inversé (reversal learning) qui consiste à présenter deux stimuli, un positif (menant à une récompense) et un négatif, puis à inverser leur signification (Izquierdo and Belcher, 2012). Les animaux « contrôles » sont capables d'ajuster rapidement leur réponse au changement de contingence 'stimulus-récompense'. Les animaux lésés sont quant à eux inflexibles et présentent une persistance de réponse « dé-récompensée » (Kim and Ragozzino, 2005).

4.2. Régulation des composantes émotionnelles et motivationnelles

De par ses relations réciproques et étroites avec le système limbique, « siège des émotions », le CPF joue un rôle capital dans la régulation émotionnelle (Davidson, 2002; Ochsner and Gross, 2005). Les interconnexions entre les aires du système limbique, notamment l'amygdale et le CPF, sous-tendent vraisemblablement de nombreux aspects des interactions entre émotion et cognition (attention, prise de décision, récompense orientée vers un but). Le CPF, surtout les régions médianes et orbitales chez l'homme, apparaît être responsable de nombreux aspects cognitifs des réponses émotionnelles (Salzman and Fusi, 2010).

Une étude d'imagerie de 1997 sur des sujets humains a mis en évidence par tomographie par émission de positons (TEP) que les émotions plaisantes ou déplaisantes étaient associées à une augmentation de l'activité du CPFm (Lane et al., 1997).

Dans l'étude de Bechara en 2004, la conductance électrodermale est enregistrée en parallèle du test de prise de décision. Cette réponse dermique reflète une réaction émotionnelle, qui se manifeste chez les sujets sains avant, après le choix de la carte et lors de l'annonce du gain. Chez les sujets cérébrlésés au niveau du cortex ventromédian, cette manifestation émotionnelle est absente (Bechara, 2004).

Conditionnement de peur

Les travaux chez les rongeurs se sont focalisés sur la peur et la motivation. Le conditionnement de peur est un paradigme expérimental mettant en jeu le CPFm. Il consiste en l'apprentissage associatif d'un stimulus conditionné neutre (CS, un son par exemple) et d'un stimulus non-conditionné aversif (US, choc électrique délivré aux pattes de l'animal).

Cet apprentissage par renforcement négatif implique différentes sous-régions du CPF (figure 19):

- la partie dorsale (CCA, CpC), car sa lésion ou inactivation augmenterait l'acquisition de la peur conditionnée (Morgan and LeDoux, 1995).
- la zone ventrale (PL et IL): l'activité du cortex PL serait nécessaire à l'expression de la réponse de peur (Vidal-Gonzalez et al., 2006; Sotres-Bayon and Quirk, 2010)

La présentation répétée du stimulus sonore de façon isolée à la suite du conditionnement induit une diminution progressive des réponses de peur préalablement acquises. Ceci caractérise l'extinction de la peur conditionnée. Ce nouvel apprentissage « inhibiteur » qui supprime une réponse conditionnée antérieure est dépendant du CPFm (Morgan and LeDoux, 1995) et plus précisément du cortex IL (ventromedian primate). En effet, comme le montrent Millad et Quirk en 2002 dans une approche lésionnelle et électrophysiologique (enregistrements multi-unitaires de neurones du cortex IL), le cortex IL aurait un rôle dans l'inhibition de la réponse de peur (Milad and Quirk, 2002).

Motivation et récompense

Le système de récompense, également appelé système de renforcement positif, joue un rôle critique dans les fonctions exécutives comme la prise de décision, car il influence la motivation et l'apprentissage (Forbes and Dahl, 2011). De nombreuses régions cérébrales appartiennent à ce circuit. Les structures clés sont le NAc (striatum ventral) et les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (Haber and Knutson, 2010). Il a récemment été mis en évidence que l'ensemble du striatum ventral et les neurones dopaminergiques de la substance noire étaient également impliqués dans la récompense (Haber and Knutson, 2010). Le striatum ventral reçoit des afférences du CPF (orbital et dorsolatéral) et des afférences dopaminergiques de la VTA (voie mésolimbique). Il projette sur le pallidum ventral, la VTA et la substance noire qui projette à son tour sur le CPF via un relais thalamique. Ce circuit correspond à la boucle cortico-noyau de la base décrite en 3.1.2..

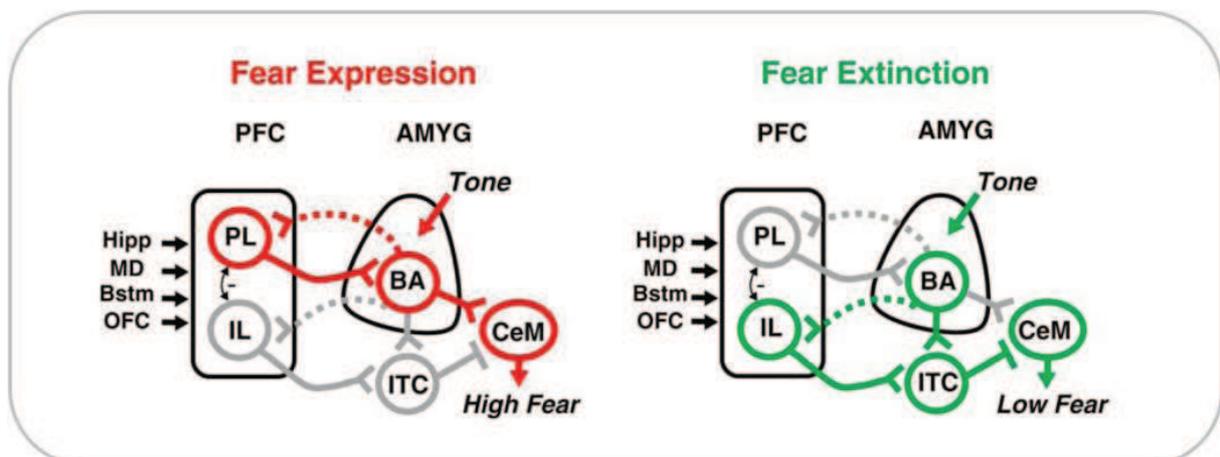


Figure 19. Contrôle préfrontal dans le conditionnement de peur. Pendant l'expression (gauche) et l'extinction (droite) de la peur, la réponse au son de l'amygdale (AMYG) est intégrée par les cortex préfrontaux infralimbique (IL) et prélimbique (PL) avec des informations convergentes provenant de diverses structures comme l'hippocampe (Hipp), le thalamus médiodorsal (MD), le tronc cérébral (Bstm) et le cortex orbitofrontal (OFC) afin de déterminer ou non une réponse de peur. L'expression

de la peur implique des projections retour du PL sur l'amygdale basale (BA), tandis que l'inhibition de peur implique des projections du IL sur les cellules intercalées de l'amygdale (ITC). En retour, la BA excite les neurones de la division médiane du noyau central de l'amygdale (CeM) pour produire une réponse de peur, alors que l'ITC inhibe les neurones de sortie de l'amygdale inhibant ainsi la réponse de peur. Ainsi, suivant les circonstances, le même stimulus conditionné signale soit un état de haute peur, soit un état de faible peur (d'après Haber and Knutson, 2010).

D'autres structures, comme l'amygdale et l'hippocampe (système limbique), certains noyaux du tronc cérébral (noyau du raphé) ou encore l'habenula sont des composants clé de la régulation du circuit. Les voies dopaminergiques mésolimbiques et mésocorticales sont les acteurs de la récompense (Haber and Knutson, 2010) (figure 20A). Les interconnexions du CPF avec l'ensemble des structures citées précédemment lui confèrent une place critique dans le circuit de la récompense. Plusieurs régions du CPF auraient des rôles distincts dans les comportements guidés par une récompense: le CPF ventromédian et le COF médian, le COF latéral, le CCA et le CPF antérieur (Schultz, 2000; Rushworth et al., 2011) (figure 20B). Des études d'imagerie par TEP et IRM fonctionnel ont mis en évidence que l'exposition à une récompense augmentait l'activité des régions corticales en particulier le COF (Haber and Knutson, 2010). Chez les rongeurs, le circuit de la récompense implique également principalement le COF (Schoenbaum et al., 2003).

5. Pathologies liées au CPF

Les dysfonctionnements des régions préfrontales donnent lieu à des troubles de contrôle cognitif et émotionnel relatifs aux fonctions citées précédemment.

Ils se manifestent notamment par des formes de persévérance, liée à l'incapacité à inhiber un comportement (Peters et al., 2009). Ceci s'illustre par exemple par une peur ou un stress exagéré conduisant à l'anxiété, aux phobies voire au syndrome de stress post-traumatique (PTSD) ou bien dans le cas de consommation de drogues, à l'addiction.

5.1. Troubles de l'apprentissage

Une dysfonction préfrontale induit des défauts de fonctions exécutives, touchant notamment la mémoire de travail. Les altérations d'apprentissage en découlant sont multiples car cette mémoire est impliquée dans toutes les bases d'apprentissage.

5.2. Addiction aux drogues

L'addiction aux drogues est une pathologie caractérisée par une consommation compulsive et pathologique de produits psychotropes, communément appelés "drogues toxicomanogènes". Les propriétés hédoniques et renforçantes de ces drogues sont liées à leur interaction avec les systèmes dopaminergiques. Toutes ont en effet la capacité à stimuler la voie mésolimbique: elles activent les neurones dopaminergiques de la VTA entraînant ainsi la libération de dopamine, principalement dans le NAc et le CPF. Cette libération de dopamine est importante pour progressivement basculer d'un usage volontaire de drogue vers un comportement de recherche difficilement contrôlable. La consommation

régulière de drogues toxicomanogènes aboutit à la mise en place d'un processus d'apprentissage pathologique. La transition d'une prise régulière mais contrôlée à une véritable addiction est caractérisée par une perte de contrôle sur la consommation. Les drogues toxicomanogènes causeraient des dysfonctions préfrontales contribuant à la transition vers l'addiction (Everitt et al., 2007).

En 2004, l'équipe de Pier Vincenzo Piazza montrait que les comportements qui définissent l'addiction chez l'homme, apparaissent également chez certains des rats s'auto-administrant de la cocaïne (Deroche-Gamonet et al., 2004).

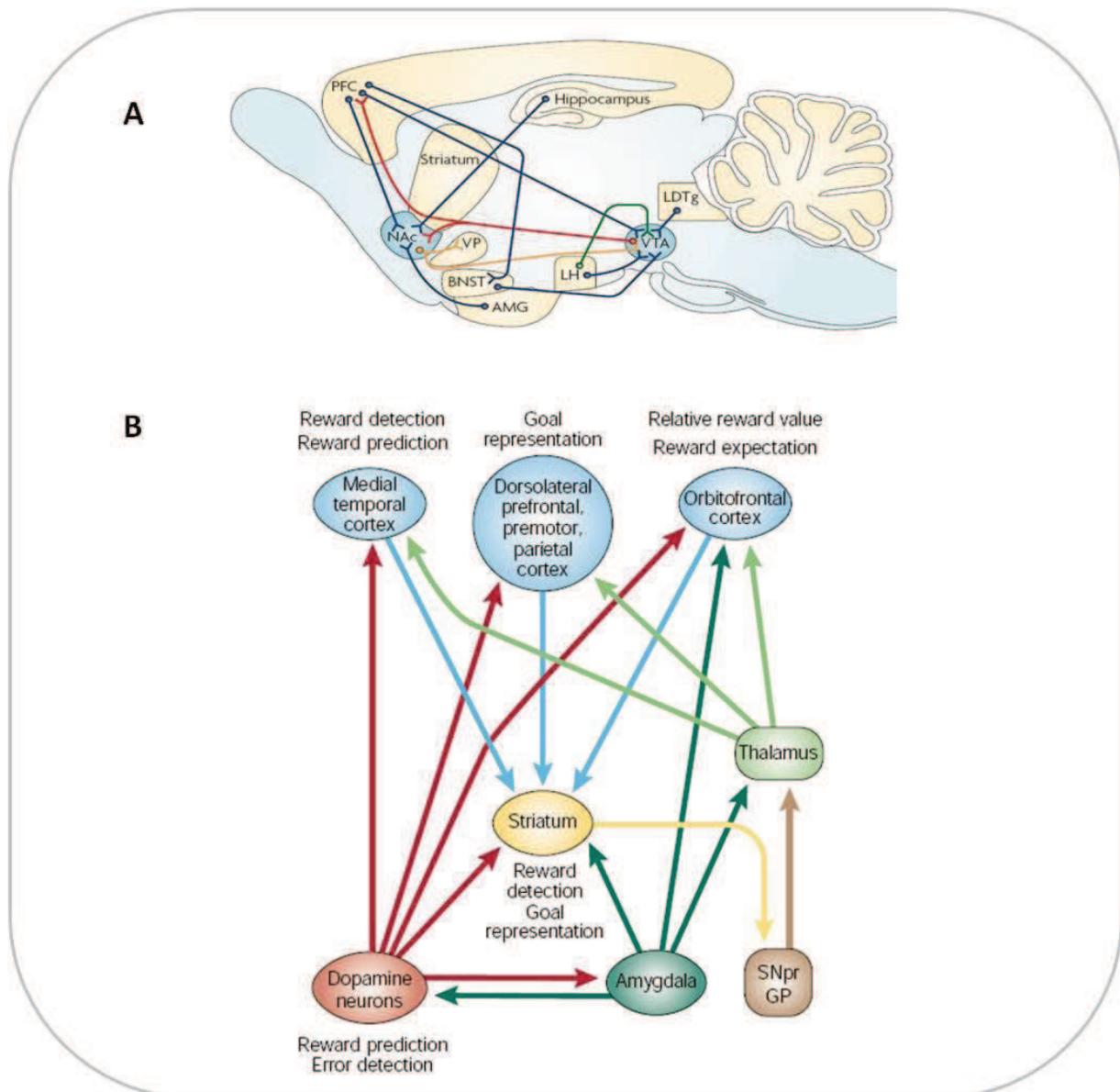


Figure 20. Organisation du système de récompense. A. Schéma simplifié du système dopaminergique mésolimbique chez les rongeurs. Les principales afférences vers le noyau accumbens (NAc) et l'aire tegmentale ventrale (VTA) sont représentées (bleu: projections glutamatergiques; rouge: projections dopaminergiques; orange: projections GABAergiques; vert: projections orexinergiques). Les synapses glutamatergiques excitent et les GABAergiques inhibent les neurones postsynaptiques. La libération de dopamine a des effets modulateurs plus complexes. La libération de dopamine des neurones de la VTA augmente en réponse à l'administration de drogues toxicomanogènes. AMG: amygdale; BNST: noyau du lit de la strie

terminale; LDTg: noyau tegmental latérodorsal; LH: lateral hypothalamus; PFC: cortex préfrontal; VP: pallidum ventral (d'après Kauer et Malenka 2007). **B.** Processus de récompense dans le cerveau. De nombreux signaux sont traités, incluant ceux responsables de la détection des récompenses passées, la prédiction et l'attente de futures récompenses, et l'utilisation d'information concernant les futures récompenses pour contrôler le comportement dirigé vers un but. SNpr: substance noire pars reticulata; GP: globus pallidus (d'après Schultz, 2000).

Beaucoup de données chez des sujets toxicomanes et dans des modèles animaux suggèrent des dysfonctions du COF (Schoenbaum et al., 2006; Everitt et al., 2007). Des études de neuroimagerie ont montré une baisse du métabolisme de base du COF chez des personnes en état de manque prolongé après avoir développé une addiction à différentes substances psychoactives (Volkow and Fowler, 2000). A l'inverse, le métabolisme du COF de ces mêmes sujets augmente significativement suite à la présentation d'"indices" liés à leur substance d'addiction par rapport à la présentation d'"indices" relatifs à une récompense ordinaire (Childress et al., 1999). Le COF de ces sujets est incapable de déclencher la recherche de récompenses naturelles et provoque un comportement compulsif et motivation exagérée pour la drogue toxicomanogène. Cette région préfrontale est au centre des mécanismes cérébraux impliqués dans la prise de décision, d'où son rôle dans les comportements compulsifs observés dans l'addiction (Goldstein and Volkow, 2011).

Une hypothèse glutamatergique liée à une perte de l'homéostasie du glutamate a été proposée en 2009 par Kalivas, impliquant des dysfonctions de la voie corticostriatale qui aboutiraient à la mise en place des comportements compulsifs (Kalivas, 2009) (figure 21).

5.3. Schizophrénie

La schizophrénie, du grec *schizein*: fractionner et *phren*: esprit, est un trouble psychotique caractérisé par des éléments délirants, des désordres motivationnels et d'adaptation, des dérégulations affectives et une altération du traitement de l'information (van Os et al., 2010). Elle est liée à une dérégulation des voies dopaminergiques mésocorticolimbiques qui pourrait être causé par une dysfonction du CPFdl lui-même. Une défaillance de la transmission glutamatergique au sein du CPF, ou hypofrontalité (Lewis and Gonzalez-burgos, 2000; Arnsten, 2011) et l'altération de la transmission au sein des efférences vers le noyau accumbens et la VTA qui en découle retentiraient sur les voies dopaminergiques mésocorticale et mésolimbique. Ceci les rendraient respectivement hypo- et hyperactive, et à l'origine des symptômes :

- négatifs (retrait social, apathie, émoussement affectif, désorganisation de la pensée et du langage) concernant la voie mésocorticale.
- positifs de la maladie (hallucination, illusion, agitation, idée délirante) concernant la voie mésolimbique.

Cette hypothèse est dite « glutamatergique », contrairement aux suppositions impliquant une dysfonction d'origine exclusivement dopaminergique.

Une étude d'imagerie de 2002 appuie cette hypothèse. Elle consista à mesurer en PET-Scan, successivement le débit sanguin cérébral (reflétant l'état d'activation) puis la capture striatale d'un précurseur de la dopamine, la DOPA, pendant que les sujets passaient le test

d'appariement des cartes de Wisconsin. Les patients schizophrènes présentaient de mauvaises performances au test de Wisconsin, un défaut d'activation du CPF dorsolatéral et un taux de capture de DOPA dans le striatum anormalement élevé pendant cette épreuve. Le point intéressant est que ces deux derniers paramètres étaient liés chez les schizophrènes : moins le CPF était activé et plus la capture striatale de DOPA était élevée. Ceci n'était pas observé chez les sujets contrôles. Cette étude appuie l'hypothèse que l'hypoactivité du CPF dorsolatéral est la cause de la dérégulation de la transmission dopaminergique sous-corticale (Meyer-Lindenberg et al., 2002).

Diverses observations -cognitives, anatomo-pathologiques, neurobiochimiques et neurophysiologiques- ont déjà fortement suggéré que la schizophrénie est également associée à un déficit des processus d'inhibition intracorticale, assurés par des neurones GABAergiques. Des études post-mortem ont reporté une densité diminuée des interneurons de la couche II au sein du CPF de patients schizophrènes (Benes, 2000; Beneyto and Lewis, 2011) et une diminution de volume des cellules pyramidales au sein des couches III et V du CPFdl. Il existerait également un défaut de connectivité fronto-temporale qui serait à l'origine des hallucinations auditives (Jardri et al., 2011).

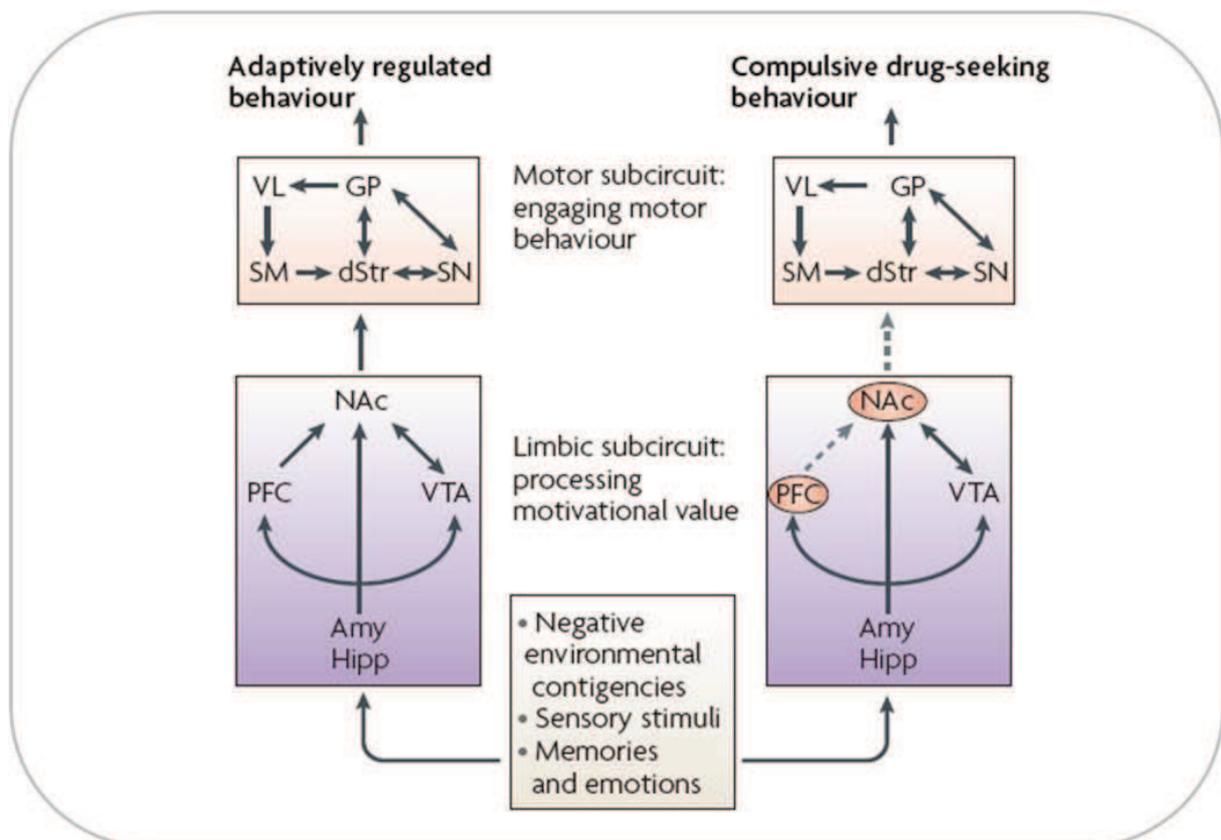


Figure 21. Schéma simplifié de circuits corticostriataux dans l'addiction. Le rôle du noyau accumbens (NAc) comme relais entre les sous-circuits limbiques, responsables de l'intégration des contingences environnementales, et les sous-circuits moteurs qui guident le comportement en cours. Dans la recherche de drogue (à droite), les changements induits par les drogues modifient les afférences préfrontales vers le NAc. Ceci qui diminue la capacité de l'information intégrée dans le circuit limbique à réguler les comportements de recherche de drogue (flèche pointillée). dStr: striatum dorsolatéral; GP: globus pallidus; hipp: hippocampe; SM: cortex sensorimoteur; SN:

substance noire; VL: ventrolateral thalamus; VP : ventral pallidum; VTA: aire tegmentale ventrale (d'après Kalivas, 2009).

5.4. Troubles de l'humeur et troubles anxieux

Troubles de l'humeur

Ces désordres regroupent les formes de dépressions majeures et les troubles bipolaires autrefois appelés psychoses maniaco-dépressives. Les dépressions se caractérisent par un état dysphorique associé à une inhibition psychomotrice et à l'anxiété. Les troubles bipolaires correspondent à des fluctuations anormales de l'humeur, oscillant entre périodes d'excitation marquée ou manie, et épisodes dépressifs.

Ces troubles impliqueraient une hypofonction des voies monoaminergiques (dopamine, sérotonine, noradrénaline) et également glutamatergique (Nestler and Carlezon, 2006; Canli and Lesch, 2007; Sanacora et al., 2008; Drago et al., 2011; Forbes and Dahl, 2011).

Le CPF étant étroitement lié aux humeurs de par ses interactions avec le système limbique, ses dysfonctions expliqueraient les symptômes dépressifs. Une des régions du CPF les plus affectées, à la fois dans la dépression et la phase maniaque, est le cortex ventromédian. Une étude d'imagerie chez des patients présentant des lésions spécifiques a permis de conclure que le CPF ventromédian conférerait la sensibilité à la dépression, contrairement au CPFdl qui serait « antidépresseur » (Koenigs et al., 2008). Chez l'animal, l'inactivation temporaire du cortex IL réduit les symptômes dépressifs chez des rats dans un test modèle de dépression, la nage forcée (Scopinho et al., 2010; Slattery et al., 2010). De plus, il a été montré chez des patients dépressifs que les CPF ventromédian et dorsolatéral étaient respectivement hyper- et hypoactif, ce, associé à une hyperactivation de l'amygdale (Myers-Schulz and Koenigs, 2011). Le CPF ventromédian inhibant l'amygdale, ceci révèle un défaut de connectivité frontolimbique.

Les états dépressifs sont fréquents chez les schizophrènes, ainsi que chez les patients atteints de trisomie 21.

Troubles anxieux

Les troubles anxieux regroupent les troubles paniques, les troubles phobiques, les troubles obsessionnels compulsifs ou encore le syndrome de stress post-traumatique.

L'anxiété dérivant de la peur et du stress, les troubles anxieux consisteraient en un dysfonctionnement des mécanismes émotionnels liés à la peur et au stress. Ils sont de ce fait également associés au système limbique et au CPF (ventromédian et orbital). De nombreuses études ont rapporté une hyperactivation de l'amygdale et une hypoactivité du CFPvm, mise en évidence par imagerie cérébrale, (PET scan ou IRMf) suite à l'exposition à des stimuli anxiogènes (Koenigs et al., 2008; Myers-Schulz and Koenigs, 2011).

Une étude chez des vétérans de la guerre du Vietnam présentant des lésions cérébrales et des symptômes traumatiques émotionnels, indique une occurrence réduite du syndrome de stress post-traumatique chez les sujets présentant des lésions ventromédianes (Koenigs et al., 2008). Le système de conditionnement de peur est régi par l'amygdale, et son extinction est un système faisant appel aux capacités régulatrices du CPF (cf 4.2). Les manifestations

anxieuses seraient donc la résultante d'un déséquilibre dans la relation entre amygdale et CPF: un échec d'inhibition de l'amygdale par le CPF ventromédian. Par exemple, le syndrome de stress post-traumatique serait une manifestation poussée de non-extinction d'un souvenir traumatisant (Peters et al., 2009). Dans cette étude, les auteurs font un parallèle intéressant entre les circuits de peur et d'addiction : le CPFm des rongeurs serait un point commun des deux circuits (figure 22). Ils soulèvent l'éventualité d'une pathologie commune, hypothèse corroborée par la comorbidité (présence simultanée) de l'anxiété et de l'addiction.

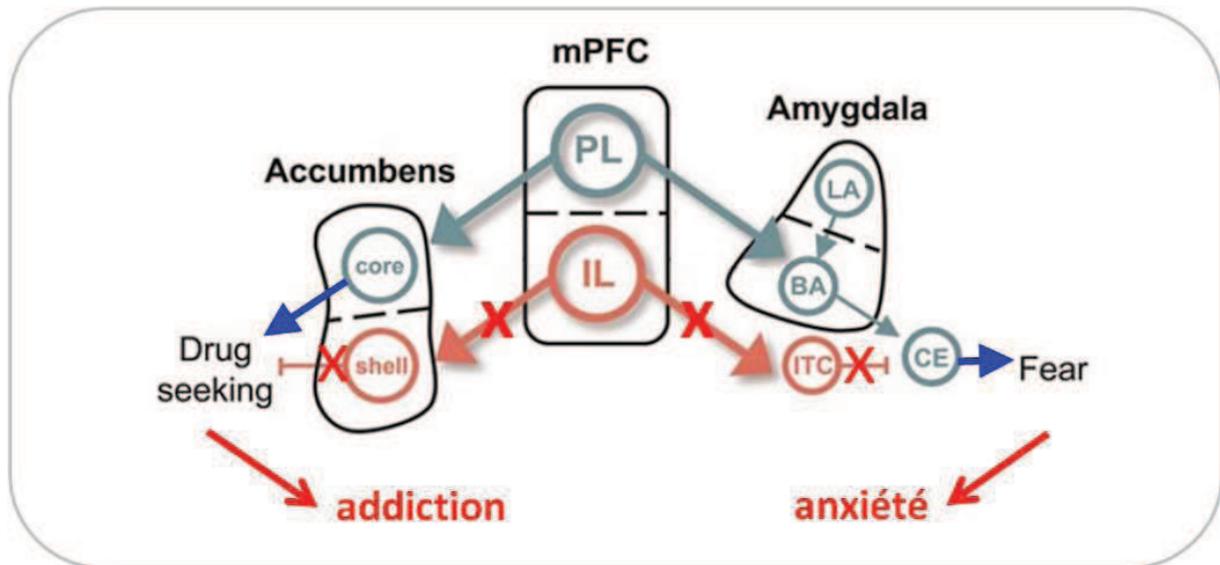


Figure 22. Schéma représentant les circuits de régulation préfrontale de la peur conditionnée et des comportements de recherche de drogue. Les subdivisions dorsale et ventrale du CPFm sont présentées au centre, avec les efférences respectives vers l'amygdale contrôlant la peur (à droite) et celles vers le noyau accumbens contrôlant la recherche de drogue (à gauche). Le cortex prélimbique (PL) projette sur le noyau basal de l'amygdale (BA), qui excite le noyau central de l'amygdale (CE), promouvant l'expression de la peur conditionnée. Le BA reçoit également des afférences de l'amygdale latérale (LA), qui induit l'expression du conditionnement peur. A l'inverse, le cortex infralimbique (IL) excite la classe des interneurons GABAergiques inhibiteurs, les masses cellulaires intercalées (ITC). Ces neurones inhibent le CE, inhibant ainsi le conditionnement de peur et promouvant l'extinction. Par comparaison, PL and IL contrôlent la recherche de drogue via leurs projections différentielles vers le noyau et la coquille du noyau accumbens. Le PL projette au noyau, ce qui induit l'expression du comportement de recherche de drogue. Le IL projette à la coquille, ce qui induit l'expression de l'extinction. Une dysfonction préfrontale au niveau du IL inhibe les processus d'extinction de peur et de recherche de peur, aboutissant à l'anxiété et l'addiction. En bleu: activation, rouge: inhibition (adapté de Peters, 2009).

En conclusion, le CPF est une structure cérébrale clé dans les fonctions cognitives dites supérieures de par sa complexité d'organisation et de relation avec les autres aires cérébrales. Il est facilement concevable que toute atteinte du CPF, touchant notamment la mémoire de travail, puisse être impliquée dans le retard mental.

III. La synapse glutamatergique

1. Généralités sur la synapse

1.1. Un peu d'histoire

Du grec *syn*: ensemble et *haptein*: toucher, la synapse définit la zone de contact fonctionnel entre un neurone et une deuxième cellule, neuronale ou non.

La première observation des neurones date de la fin du XIX^{ème} siècle par Santiago RAMON y CAJAL, histologiste et neuroscientifique espagnol. Il formula alors une théorie dite « neuroniste », proposant les neurones comme unités structurelles et fonctionnelles de base du système nerveux. Elle stipule que les neurones sont des entités fonctionnelles autonomes et des unités métaboliques distinctes comportant un corps cellulaire, un axone et des dendrites. Jusque-là il était admis que le système nerveux était constitué d'un maillage fusionné ne comptant pas de cellule isolée, théorie dite « réticulariste ». C'est en pleine controverse morpho-histologique opposant les neuronistes et les réticularistes que le terme « synapse » fut proposé pour la première fois. En effet, dans un traité de physiologie de 1897, le médecin et scientifique britannique SHERRINGTON désigne par ce terme les points de contacts, alors hypothétiques, entre les neurones.

Pour expliquer comment l'information nerveuse passe d'un neurone à un autre, les tenants de la théorie neuroniste se sont intéressés à une connexion particulière du système nerveux périphérique (SNP): la jonction neuromusculaire. En contradiction avec la notion de conduction purement électrique, les concepts de synapse, transmission chimique, neurotransmetteur prennent petit à petit forme, tout en restant fortement débattus. En 1955, Sanford PALAY, scientifique américain, observa pour la première fois une fente synaptique au microscope électronique et confirma ainsi *de visu* la théorie neuroniste (Palay, 1956) (figure 23). Avec l'affinement des techniques électrophysiologiques et biochimiques dans les années 1950, il est constaté que la majorité des synapses fonctionne à l'aide de médiateur chimique, et que très peu de synapses utilisent la conduction électrique. (*Encyclopédie historique des neurosciences: Du neurone à l'émergence de la pensée*, F. Clarac, P. Buser, JP. Ternaux, D. Wolton, 2008)

1.2. Les différents types de synapses

La dichotomie effectuée entre synapse chimique et synapse électrique est basée sur le fait qu'il y ait ou non libération de neurotransmetteur.

1.2.1. Synapses chimiques

Les synapses chimiques représentent la majorité des synapses du système nerveux. Dans ce cas-ci, la synapse est l'élément structurel de contiguïté entre un neurone et une deuxième cellule. Elle se compose de la terminaison axonale, la fente synaptique et la zone postsynaptique. D'un point de vue fonctionnel, elle assure la conversion du message

électrique en message chimique, neurotransmetteur, permettant ainsi sa transmission à un autre neurone.

Elles sont polarisées : l'information électrique suit une direction préférentielle qui va du corps cellulaire à l'axone, puis passe au niveau de la cellule voisine. Brièvement, un potentiel d'action (PA) induit la libération de neurotransmetteur au niveau de la fente synaptique. Celui-ci se fixe alors sur des récepteurs postsynaptiques induisant la dépolarisation ou l'hyperpolarisation de l'élément de postsynaptique. Suivant la nature de la cellule postsynaptique, on distingue deux catégories de synapses chimiques.

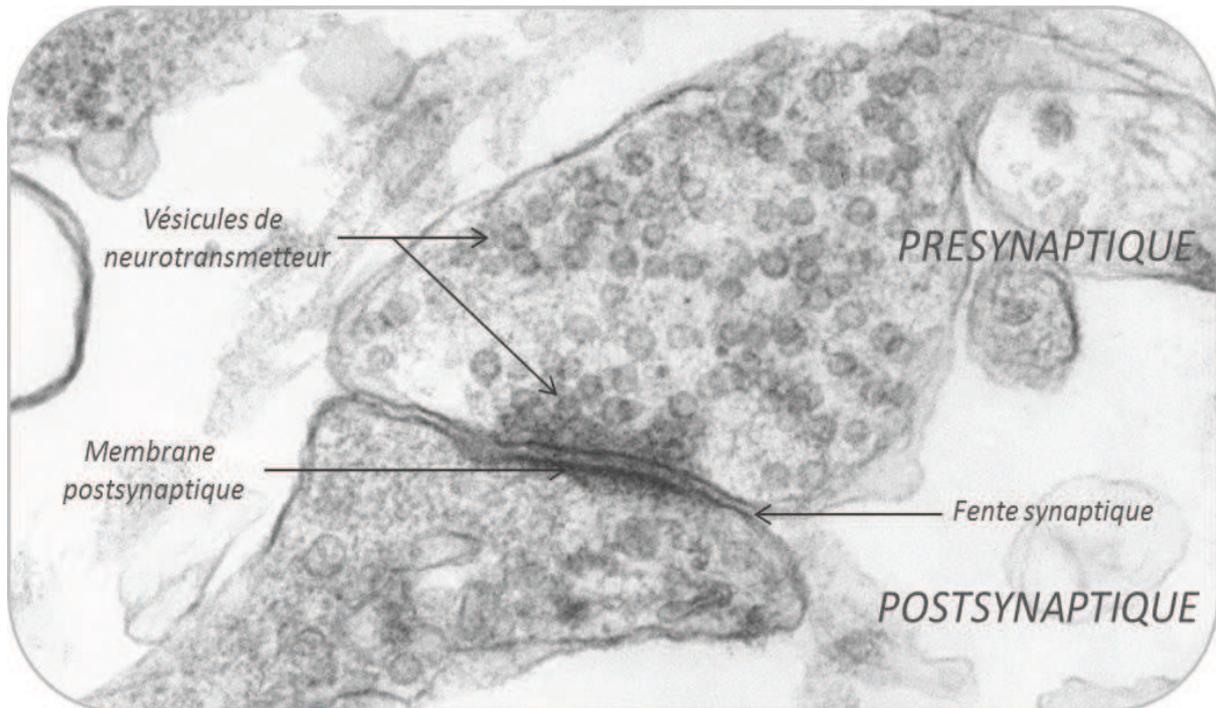


Figure 23. Microphotographie électronique d'une synapse chimique neuro-neuronique de rat (x 25000) (F. Robert, Laboratoire de Métabolisme Cérébral et Neuropathologies, Orléans).

1.2.1.1. Synapse neuro-effectrice

Elle correspond au contact entre un neurone et une cellule effectrice non-neuronale, comme une cellule musculaire (synapse neuromusculaire) ou une cellule glandulaire (synapse neuroglandulaire). Ces synapses sont observées dans le SNC et le SNP au niveau:

- de la jonction neuromusculaire ou plaque motrice, qui correspond à la synapse entre un neurone moteur et une cellule musculaire striée squelettique. Le neurotransmetteur impliqué est l'acétylcholine.
- du système hypothalamo-hypophysaire: les neurones sécrètent des neuropeptides directement dans la circulation sanguine qui vont agir sur des structures et organes cibles.
- des neurones postganglionnaires du SN autonome sympathique et parasympathique qui contactent les cellules épithéliales des glandes exo- et endocrines, ainsi que les cellules musculaires lisses et cardiaques via des afférences respectivement noradrénergiques et cholinergiques.

1.2.1.2. Synapse neuro-neuronique

C'est la principale synapse retrouvée dans le SNC. Il existe trois types d'arrangements morphologiques en fonction du point de contact au niveau du neurone postsynaptique: axo-dendritique, axo-somatique, et plus rarement axo-axonique. On distingue deux types fonctionnels de synapse neuro-neuronale.

La synapse inhibitrice

Elle implique l'acide gamma-aminobutyrique (GABA), principal neurotransmetteur inhibiteur du SNC, ou la glycine. Les synapses inhibitrices sont généralement axo-somatiques et quelques fois axo-dendritiques. GABA et glycine se fixent sur des récepteurs canaux, appelés récepteurs ionotropiques, postsynaptiques. Perméables au chlore, leur ouverture entraîne l'hyperpolarisation du neurone. Il existe aussi des récepteurs métabotropiques au GABA (GABA-B). Couplés à une cascade intracellulaire, ils induisent l'activation d'une conductance potassique (K^+) responsables d'un courant lent hyperpolarisant. Une transmission synaptique inhibitrice histaminergique a également été proposée dans l'hypothalamus (Hatton and Yang, 2001).

La synapse excitatrice

Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur majeur du SNC. 50% des synapses du SNC sont glutamatergiques. Il existe également des synapses excitatrices cholinergiques comme dans le cortex ou l'hippocampe (Abreu-Villaça et al., 2011). L'acétylcholine se fixe à son récepteur canal de type nicotinique, induisant une dépolarisation postsynaptique. Des synapses excitatrices à ATP ou sérotonine ont également été reportées. On pourra également citer les neuromodulateurs comme les catécholamines (adrénaline, noradrénaline, dopamine). Leurs récepteurs, de type métabotropiques, sont liés à des protéines G activatrices (Gs) ou inhibitrices (Gi/o). Ce couplage module, par l'intermédiaire de seconds messagers intracellulaires comme l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et le calcium (Ca^{2+}), directement ou indirectement l'activité des canaux cationiques postsynaptiques. Les catécholamines peuvent également influencer de manière présynaptique la synthèse, la dégradation ou la recapture de neurotransmetteur.

1.2.2. Synapses électriques

Dans ce type de synapse, les membranes des deux neurones sont reliées par un assemblage protéique mettant leurs cytoplasmes en continuité : la jonction communicante. Egalement appelées jonctions « gap », ces structures sont formées par l'apposition de deux connexons des cellules en contact. Chaque connexon est un hexamère de connexines, protéines transmembranaires ménageant entre elles un canal hydrophile d'environ 1 à 2nm de diamètre. Toute molécule hydrosoluble de petite taille peut y transiter, permettant ainsi un couplage métabolique et/ou électrique efficace. Les synapses électriques sont retrouvées dans plusieurs types cellulaires (astrocytes, cellules musculaires, cellules épithéliales) formant alors un « syncytium fonctionnel ».

Dans le cas d'une connexion interneuronale, elles permettent une transmission électrique et donc directe du signal. Les ions ainsi que la dépolarisation membranaire associée se transmettent d'un neurone à un autre. L'influx nerveux se propage sans intervention de neurotransmetteur, donc sans délai de transmission ni période réfractaire, et suivant une conduction dans les trois dimensions de l'espace, d'où transmission directe. Ce type de synapse joue un rôle important dans le système nerveux immature pour le développement cérébral, la morphogénèse et la formation des patrons d'activité neuronale. Elles sont également présentes au stade adulte et seraient impliquées dans la pathogénèse de nombreuses maladies comme l'épilepsie (Bennett and Zukin, 2004; Nakase and Naus, 2004; Nemani and Binder, 2005; Sun et al., 2011). Un large réseau de neurones connectés par des jonctions gap est présent au sein des populations neuronales GABAergique de la VTA et noradrénergique du Locus Coeruleus du tronc cérébral (Ishimatsu and Williams, 1996; Lassen et al., 2007). Ces couplages électriques sont plastiques et joueraient un rôle majeur dans la synchronisation des activités neuronales (Haas et al., 2011).

2. Structure générale de la synapse glutamatergique

Selon la classification établie par Gray dans les 1960, les synapses glutamatergiques sont des synapses de « type I », soit asymétriques. Elles sont constituées d'un élément présynaptique, le bouton présynaptique et d'un élément postsynaptique, une zone membranaire épaissie, espacés par une fente synaptique d'une centaine de nanomètres. Les deux éléments pré- et postsynaptiques présentent une spécialisation fonctionnelle.

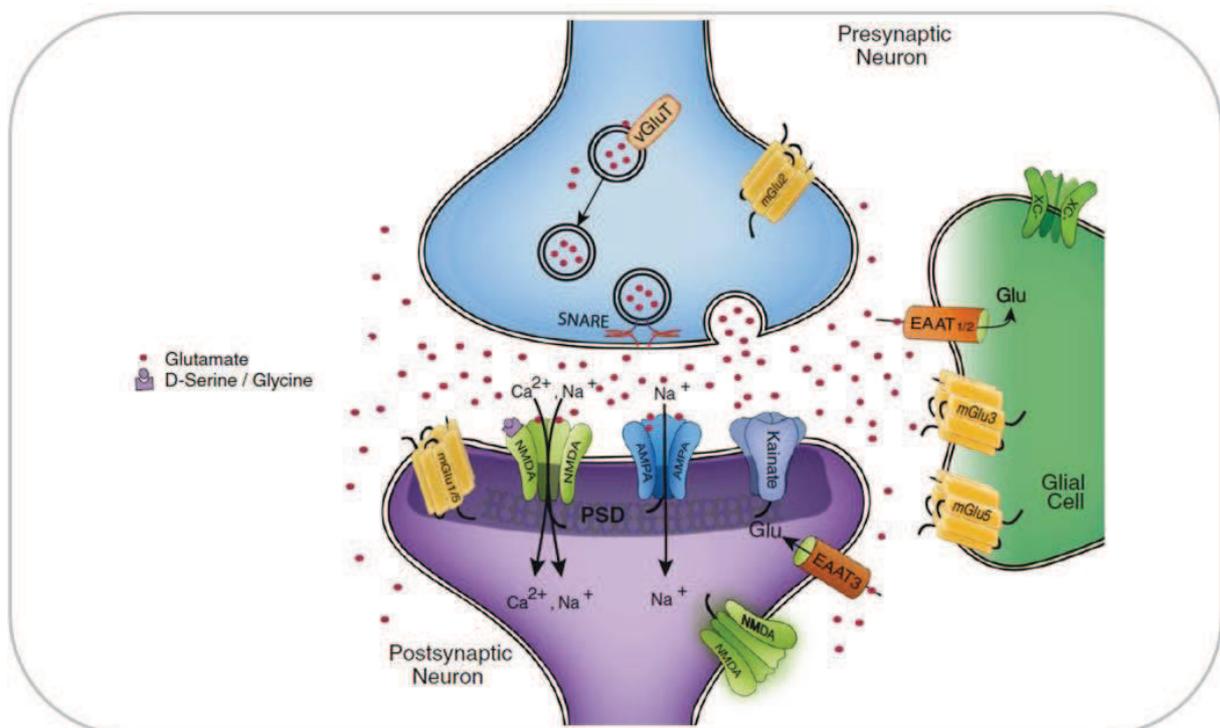


Figure 24. Les principaux composants de la synapse glutamatergique. Le glutamate, principal neurotransmetteur du cerveau, est empaqueté dans les vésicules de la terminaison axonale grâce à des transporteurs vésiculaires vGlut. Il se lie sur des récepteurs ionotropiques (AMPA, NMDA, kainate) et métabotropiques (mGluR), postsynaptiques, extrasynaptiques, et présynaptiques. Les cellules gliales,

principalement les astrocytes, jouent un rôle majeur dans la recapture de glutamate pour mettre fin au signal glutamatergique (d'après Pittenger et al., 2011).

Il est aujourd'hui largement admis qu'un troisième partenaire actif, l'astrocyte, est impliqué dans la synapse glutamatergique. On parle alors de synapse « tripartite ». En effet, les prolongements astrocytaires entourent les éléments pré- et postsynaptiques formant ainsi un espace synaptique délimité (figure 24).

2.1. L'élément présynaptique: la terminaison axonale

L'élément présynaptique renferme la machinerie nécessaire à la synthèse, au stockage, à la libération et à l'inactivation du glutamate. Il possède également sur sa membrane plasmique des récepteurs glutamatergiques ainsi qu'à divers neuro- et gliotransmetteurs permettant des régulations respectivement auto- et paracrines de la libération de glutamate.

Il se présente sous la forme d'un renflement de l'axone rempli de petites vésicules contenant le neurotransmetteur. On y discerne la zone active qui a une apparence dense en microscopie électronique (figure 23). Elle correspond au site de libération de neurotransmetteur, comprenant les vésicules de glutamate et la portion membranaire où s'effectue l'exocytose. Son aspect dense reflète la présence d'un assemblage protéique riche en actine où les vésicules synaptiques se nichent. Ce complexe protéique assure à la fois le recrutement et la libération des vésicules, permettant ainsi un relargage localisé et dynamique du glutamate.

2.1.1. Machinerie de synthèse

Au niveau du bouton axonal se trouvent de nombreux organites intracellulaires : un appareil de Golgi très développé, un réticulum endoplasmique (RE), des endosomes ainsi que de très nombreuses mitochondries. Ceci traduit une activité de synthèse protéique intense et permet entre autres la régulation de la signalisation calcique locale.

Les neurotransmetteurs sont en effet en partie synthétisés sur le lieu d'utilisation. Les neurotransmetteurs non-peptidiques, comme le glutamate, sont produits à partir de l'acide aminé précurseur dans le cytoplasme du neurone. Le glutamate est synthétisé principalement à partir la glutamine. Celle-ci est produite dans les cellules gliales adjacentes à la synapse par la glutamine synthétase à partir du glutamate recapté de la fente synaptique. La glutamine est ensuite captée par les terminaisons axonales et transformée en glutamate par la glutaminase, enzyme mitochondriale. La recapture de la glutamine est une étape limitante dans la synthèse du glutamate. De plus, l'activité de la glutaminase est contrôlée par un mécanisme de rétrocontrôle glutamatergique inhibiteur. Le glutamate peut également être synthétisé au niveau de la mitochondrie par transamination de l'alpha-cétoglutarate (Takeda et al., 2012) (figure 25). Il est ensuite activement pompé par des enzymes utilisant l'ATP (ou ATPases) dans les vésicules présynaptiques. Une étude récente a mis en évidence que les vésicules synaptiques étaient capables de synthétiser le glutamate à partir d'alpha-cétoglutarate ou d'aspartate (Takeda et al., 2012).

Ces vésicules sont issues des endosomes présents au niveau de la terminaison ou de l'endocytose d'une vésicule exocytée (pour revue: Sudhof, 2004). En effet, elles sont soumises à un cycle rapide de recyclage local, processus actif, permettant un stock permanent dans la terminaison axonale.

2.1.2. Les vésicules synaptiques

Ces vésicules sont localisées à proximité de mitochondries qui leur fournissent l'énergie nécessaire à l'accomplissement du cycle vésiculaire et également du RE (Kennedy and Ehlers, 2006; Cai and Sheng, 2009). Leurs membranes sont riches en protéines variées assurant leur transport dans la terminaison axonale et leur remplissage. En effet, l'accumulation du glutamate dans des vésicules sécrétrices est régie par des transporteurs membranaires spécifiques (VGLUT pour Vesicular GLUtamate Transporter). Quatre transporteurs vésiculaires au glutamate sont connus à ce jour: VGLUT1, VGLUT2, VGLUT3 ainsi qu'un transporteur vésiculaire pour les acides aminés excitateurs (Vesicular Excitatory Amino acid Transporter ou VEAT) qui a également pour substrat l'aspartate (pour revue : Omote et al., 2011). Dans le SNC, VGLUT1 est massivement exprimé dans le cortex, l'hippocampe et le cervelet, tandis que VGLUT2 est principalement exprimé dans le thalamus, le tronc cérébral et les noyaux cérébelleux profonds. VGLUT3 est quant à lui retrouvé dans les neurones cholinergiques du striatum dorsal et ventral ainsi que dans les neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé. Ceci implique que ces neurones co-libèrent monoamines et glutamate. L'expression d'isoformes VGLUT distinctes par différentes populations de neurones excitateurs suggère que ces transporteurs définissent des modes distincts de libération (Fremeau et al., 2001).

Le mécanisme de remplissage des vésicules dépend de l'acidité intravésiculaire. Celle-ci est due aux pompes à protons dépendantes de l'ATP présentes au niveau de la membrane des vésicules. Le gradient électrochimique de protons (H^+) généré permet l'échange d'une molécule de glutamate contre un proton intravésiculaire (antiport). Il existe aussi un système de diffusion facilitée ou uniport par lequel le glutamate, composé anionique, intègre la vésicule acide via son transporteur (figure 25).

Ces vésicules synaptiques sont organisées en trois groupes: le pool compétent pour la libération (the Readily Releasable Pool ou RRP), le pool de recyclage et le pool de réserve (revue Rizzoli and Betz, 2005). Ces trois pools sont différenciés par leur fonction et leur position vis-à-vis de la membrane présynaptique. Le RRP est amarré à la surface. C'est le premier groupe de vésicules libérées pendant une stimulation nerveuse. Il comprend un petit nombre de vésicules et est rapidement utilisé. Le pool de recyclage est proche de la membrane et tend à être recyclé pour des stimulations modérées ou physiologiques. Ainsi, les taux de formation et de libération des vésicules restent élevés, ce qui évite la déplétion des stocks. Le pool de réserve représente 80 à 90% des vésicules. Ses conditions de recrutement ne semblent pas être physiologiques: il interviendrait dans les stimulations intenses et uniquement si les autres pools sont déplétés.

2.1.3. Les canaux calciques voltage-dépendants présynaptiques

Les membranes des terminaisons synaptiques sont enrichies en canaux calciques dépendants du potentiel (Voltage Sensitive Calcium Channels ou VSCC). Ces canaux ioniques s'ouvrent pour laisser entrer du Ca^{2+} lorsque la membrane plasmique est dépolarisée. Cet influx calcique entraîne la libération des vésicules de glutamate.

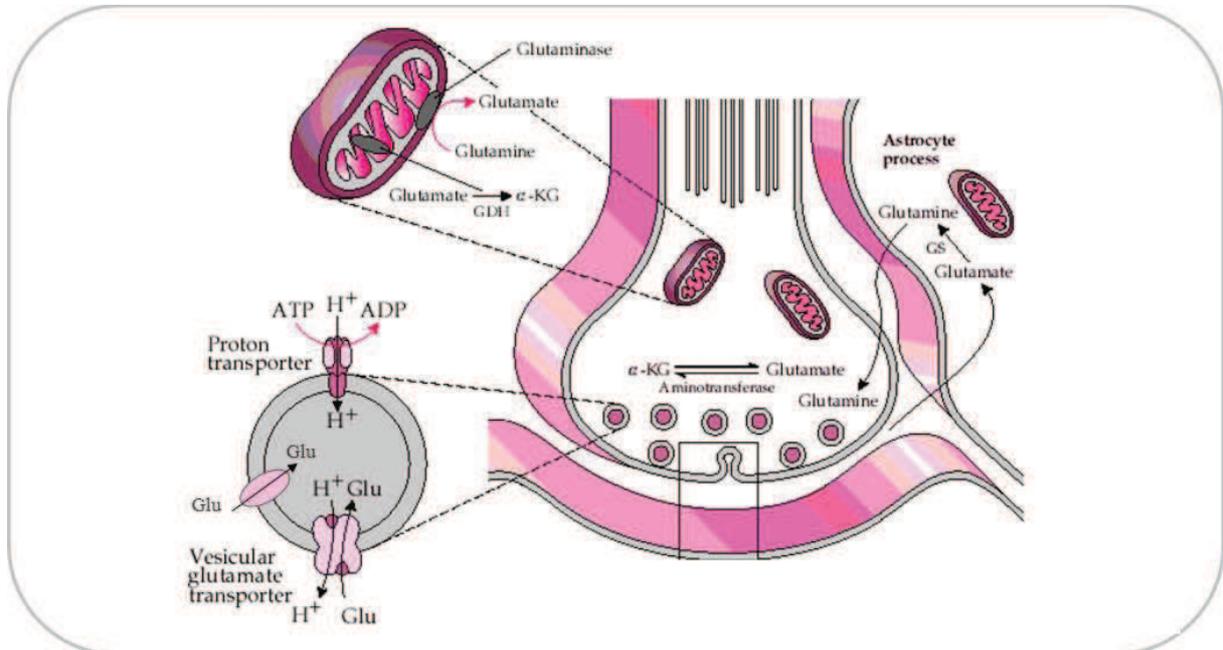


Figure 25. Illustration des processus de synthèse et de métabolisme du glutamate, ainsi que de sa capture neuronale, gliale et vésiculaire. GS: glutamine synthase, Glu: glutamate ; α -KT: alpha-cétoglutarate ; GDH: glutamate déhydrogénase (extrait de Fundamentals of Neuropsychopharmacology, Feldman and Quenzer, 1984).

Ces canaux calciques voltage-dépendants sont des complexes protéiques hétéro-oligomériques. Jusqu'à cinq sous-unités les constituent, dont la sous-unité majeure $\alpha 1$ et les sous-unités auxiliaires $\alpha 2$, β , γ , qui permettent de moduler l'expression des canaux et la cinétique des courants. On distingue en fonction de leur seuil d'activation deux familles de VSCC.

Les canaux à « bas seuil »

Egalement appelés canaux LVA pour Low Voltage Activated, ils s'activent pour des potentiels faiblement dépolarisés (de l'ordre de $-70/-60\text{mV}$). Cette famille ne compte que le canal de type T pour *transient* car il présente des cinétiques d'ouverture et de fermeture rapides. Sa conductance, c'est-à-dire sa capacité à laisser passer le Ca^{2+} , est faible.

Les canaux à « haut seuil »

Les canaux HVA pour High Voltage Activated sont activés par une dépolarisation élevée ($> -40\text{mV}$). Cette famille comprend différentes classes de canaux, distinguées par leurs critères biophysiques (activation, inactivation, conductance) et pharmacologiques (sensibilité à différentes toxines inhibitrices) (tableau 4).

- le type L pour *long lasting* car à cinétique de fermeture lente et forte conductance.

- le type N pour *neither T or L* et *neuronal*. Ils présentent des caractéristiques intermédiaires entre les types T et L, notamment pour le seuil d'activation et la conductance.
- le type P pour *purkinje* car ils ont été identifiés dans les cellules de Purkinje. On y associe le type Q (après P) car les deux protéines sont issues du même gène, et diffèrent par épissage alternatif. Leurs caractéristiques sont très proches de celles des types L et N.
- le type R pour *residual* car le courant de type R correspond au courant résiduel après blocage des canaux de type T, L, N P/Q par leurs antagonistes respectifs. Il présente un seuil d'activation intermédiaire.

Type	Seuil d'activation	Inactivation	Conductance	références
T - transitoire	bas	rapide	faible	(Tareilus and Breer, 1995; Dolphin, 2006; Weber et al., 2010)
L - lent	haut	lente	élevée	
N - neuronal	intermédiaire	lente/rapide	intermédiaire à élevée	
P - purkinje	haut	lente	intermédiaire	
Q - après P		rapide		
R - résiduel	intermédiaire	rapide		

Tableau 4. Les différents types de canaux calciques dépendants du potentiel.

Les canaux de type N, P/Q sont majoritairement distribués, de manière non uniforme, sur les axones des neurones excitateurs (pour revue : Reid et al., 2003). Leur ouverture est liée à la libération rapide des vésicules de neurotransmetteur (Evans and Zamponi, 2006; Weber et al., 2010). Les canaux de type R contribueraient également à la libération de glutamate dans certains neurones. Des travaux récents ont suggéré un rôle des canaux de type L et T dans la régulation de l'activité synaptique (Carbone et al., 2006; Person and Raman, 2011).

Ces canaux sont sujets à d'importantes modulations par des mécanismes impliquant notamment protéines G et seconds messagers, sollicités par exemple par des rétrocontrôles dépendant de l'activité (Dolphin, 2006; Evans and Zamponi, 2006).

2.2. Le compartiment postsynaptique: l'épine dendritique

Cette partie sera focalisée sur les synapses de type axo-dendritique, agencement prédominant des synapses glutamatergiques dans le SNC.

2.2.1. L'épine dendritique

90% des synapses glutamatergiques se forment sur des excroissances spécialisées du compartiment dendritique. Ces structures complexes et hautement organisées sont appelées épines dendritiques. Leur première observation date de la fin du XIXème siècle par RAMON Y CAJAL, qui émit l'hypothèse qu'elles connectaient l'axone aux dendrites. Soixante ans plus tard, le développement de la microscopie électronique permit de vérifier les

suppositions de Cajal. Des études d'imagerie en « direct » à haute résolution ont mis en évidence que les épines étaient des structures dynamiques (pour revue : Bhatt et al., 2009). Leur nombre, leur taille et leur forme varient au cours du développement cérébral mais également en réponse à l'activité synaptique. Cette plasticité morphologique se manifeste, par exemple, au cours de la maturation des contacts synaptiques. Immatures, les épines sont de fines protrusions allongées appelées filopodes. Matures, elles sont classiquement organisées en une tête globuleuse de 0,5 à 2µm de diamètre, connectée au prolongement dendritique par un cou étroit long de 0,5 à 2µm (revue : Hering and Sheng, 2001; Calabrese et al., 2006) (figure 26). Cette aptitude à modifier leur forme est gouvernée par un réseau mobile complexe de protéines du cytosquelette, notamment l'actine (Hotulainen and Hoogenraad, 2010).

Les épines dendritiques permettent d'augmenter la surface de connectivité des dendrites. De plus, elles constituent des compartiments postsynaptiques semi-autonomes regroupant les différents partenaires impliqués dans la transmission synaptique et sa régulation (figure 27) :

- les récepteurs au glutamate.
- leurs protéines associées, comme les protéines d'ancrage et de signalisation.
- les éléments du cytosquelette.
- les ions, notamment le Ca^{2+} .
- les organites comme le RE, des ribosomes, des ARN messagers et des mitochondries.

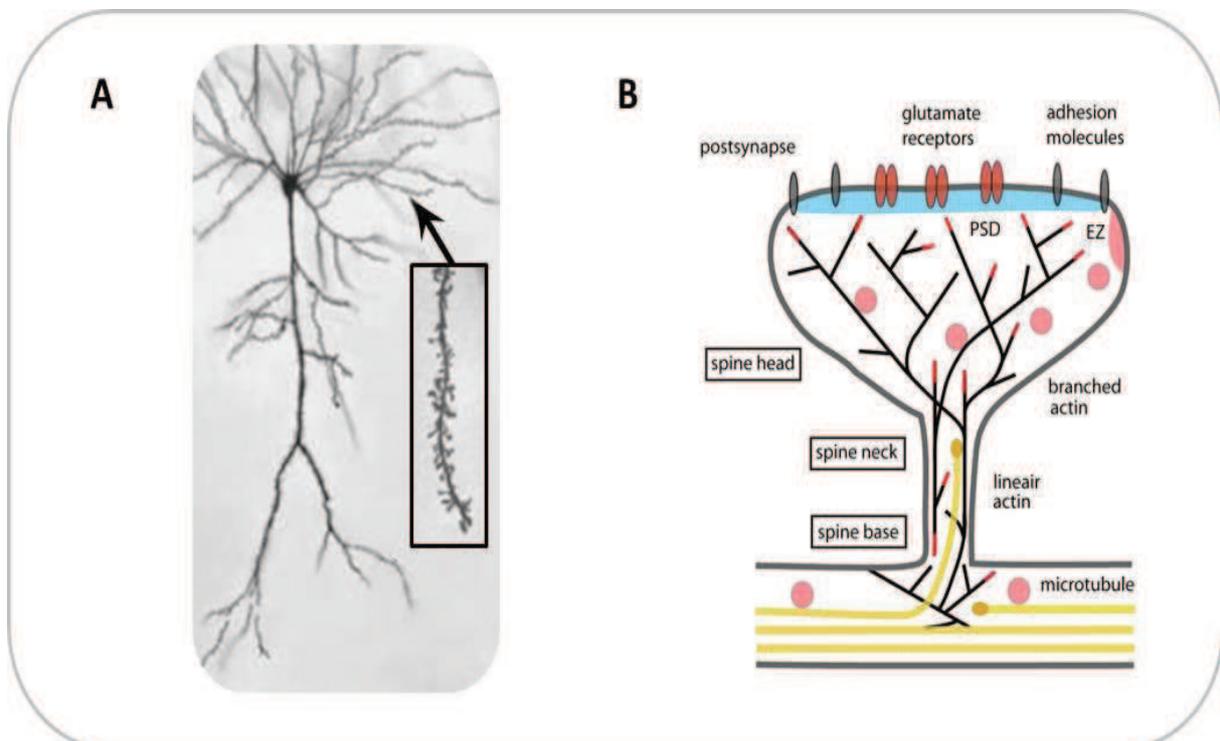


Figure 26. L'épine dendritique A. Microphotographie d'un neurone et son arborisation dendritique. L'encart correspond au zoom d'une dendrite basale sur laquelle les épines dendritiques sont distinguables. B. Schéma d'une épine dendritique mature représentant l'organisation du réseau cytosquelettique. L'épine est composée d'une tête reliée à la dendrite par un cou. PSD: densité postsynaptique ; EZ: zone d'endocytose (d'après Hotulainen and Hoogenraad, 2010).

La forme des épines a une importance majeure dans la signalisation calcique. Elle permet de contrôler les concentrations du second messenger pour qu'ils puissent agir rapidement et efficacement (Dur-e-Ahmad et al., 2011). En effet, les épines sont des compartiments à faible capacité de tampon calcique permettant des changements de la concentration en Ca^{2+} larges et très rapides (Sabatini et al., 2002).

La présence des organites intracellulaires au sein même de l'épine permet une synthèse protéique locale rapide (Hering and Sheng, 2001; Nimchinsky et al., 2002).

Ainsi, ces compartiments postsynaptiques autonomes permettraient d'un point de vue fonctionnel:

- d'améliorer la connectivité synaptique.
- de compartimenter le signal électrique pour optimiser sa filtration et son intégration.
- de compartimenter la signalisation biochimique impliquée notamment dans la plasticité des synapses (Yuste, 2011).
- de gouverner les phénomènes de plasticité structurale.

Elles contrôlent donc la force et la plasticité de la transmission synaptique (Segal, 2005).

2.2.2. La densité postsynaptique

L'observation des synapses au microscope électronique a révélé la présence d'une zone dense aux électrons au niveau de la membrane postsynaptique (figure 23). Etroitement apposée à la zone active présynaptique, elle est appelée densité postsynaptique (PSD). Elle est constituée par un ensemble de protéines d'échafaudage interagissant entre elles ainsi qu'avec les récepteurs glutamatergiques, les filaments d'actine du cytosquelette, les intermédiaires métaboliques des voies de transduction, les stocks calciques ou encore de nombreuses enzymes. Ceci constitue une matrice structurale complexe qui ancre récepteurs et canaux ioniques à la membrane, et rassemble les molécules de signalisation comme les kinases ou les phosphatases à la synapse (figure 27).

Ces interactions protéiques forment des complexes permettant, par exemple, l'adressage et l'ancrage membranaire des récepteurs glutamatergiques ainsi que leur couplage aux voies de transduction. La famille des guanylate kinases associées à la membrane ou MAGUK (Membrane-Associated Guanylate Kinase) assure cette fonction dans l'ensemble des cellules. La PSD-95 (ou SAP 90) en est le représentant le plus connu. Elle contient un motif particulier d'acides aminés, le domaine PDZ, qui interagit avec les récepteurs au glutamate pour assurer leur localisation fonctionnelle. L'interaction entre les récepteurs glutamatergiques de type AMPA et la PSD95 se fait de manière indirecte par la stargazine (Chen et al., 2000). Les protéines PICK1 (protéines qui interagissent avec la protéine kinase C ou PKC) forment des complexes avec les récepteurs de type AMPA pour les maintenir à la membrane postsynaptique (Xia et al., 1999). Le couplage récepteurs AMPA/protéine GRASP-1 (protéine associée à GRIP) ou récepteurs de type NMDA/synGAP (protéine activatrice des Ras-GTPase) permettent la formation de complexes liant ces récepteurs aux voies métaboliques dépendantes des petites protéines G de la famille Ras (Kim et al., 1998; Ye et al., 2000).

Ces complexes protéiques sont aussi impliqués dans la morphologie synaptique. La PSD-95 interagit avec la neuroligine, une protéine membranaire postsynaptique associée à la β -neurexine présynaptique, pour former un complexe de jonction maintenant le lien physique entre les éléments pré- et postsynaptiques (Kim and Sheng, 2004). Les protéines de la famille Shank assurent la connexion avec les éléments du cytosquelette, participant ainsi avec Homer à la régulation de la morphologie des épines dendritiques (Sala et al., 2001). La PSD est donc une structure macromoléculaire impliquée dans l'organisation structurale et fonctionnelle de la synapse et dont le fonctionnement repose sur l'agencement et l'organisation de multiples partenaires protéiques (Scannevin and Huganir, 2000).

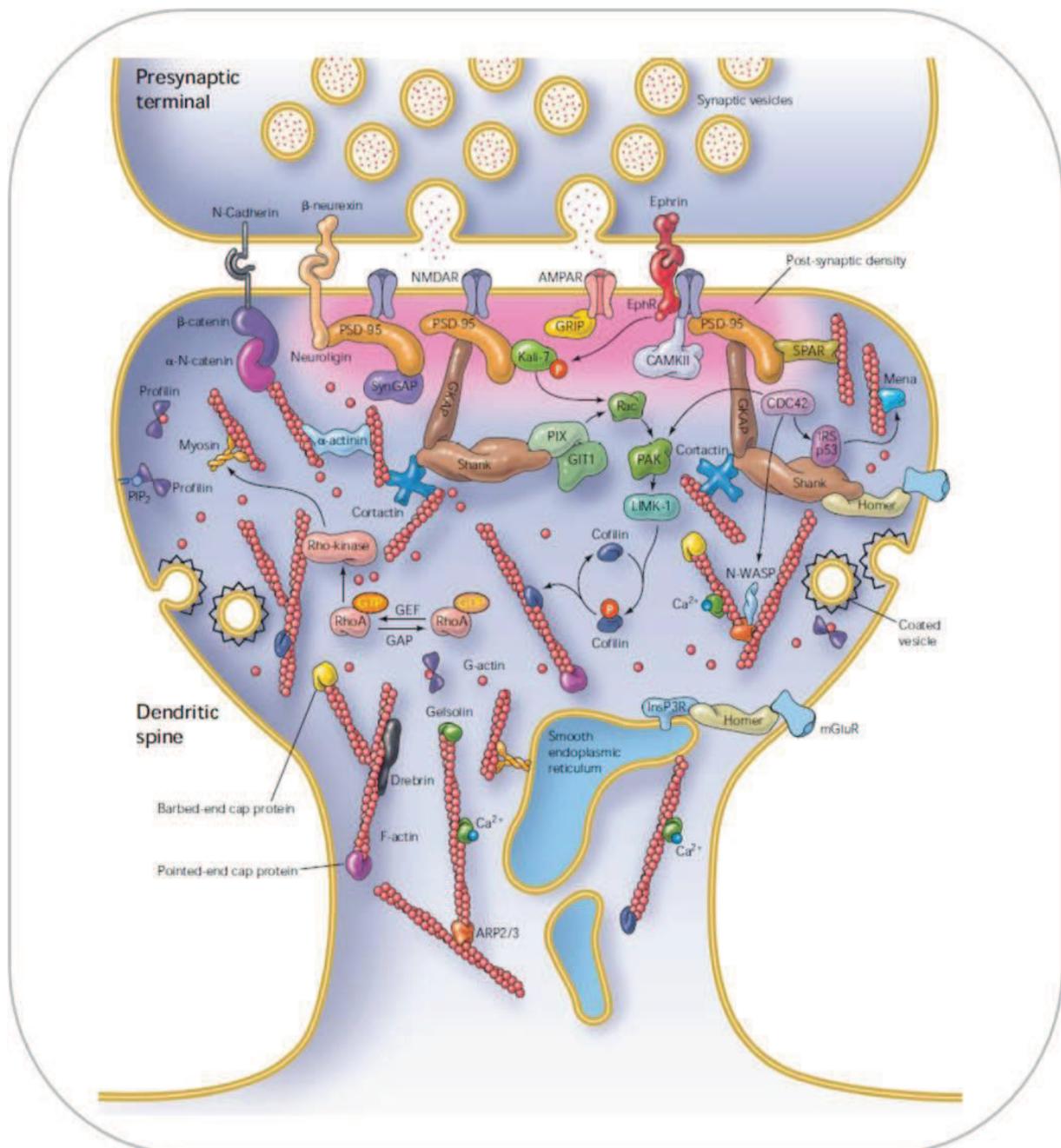


Figure 27. Représentation schématique de l'organisation de la densité postsynaptique présente au niveau de l'épine dendritique d'une synapse glutamatergique. Les récepteurs glutamatergiques

ionotropiques de type AMPA et NMDA sont groupés au niveau de la zone active postsynaptique grâce à une matrice protéique dense appelée la densité postsynaptique (PSD, en rose). Ces récepteurs connectent les protéines d'échafaudage à domaine PDZ de la PSD comme la PSD-95 qui ancre les récepteurs au niveau de la synapse et recrute des complexes de signalisation (régulateurs des RhoGTPases, protéines kinases...). L'actine est la base structurale principale gouvernant la forme des épines. A travers le réseau d'interactions protéiques, les filaments d'actine se lient indirectement aux récepteurs et à d'autres protéines transmembranaires (neuroligines, cadhérines...), régulant ainsi le développement et la forme des épines (d'après Calabrese et al., 2006).

2.2.3. Les récepteurs au glutamate

Les approches pharmacologiques et moléculaires ont permis de classer les récepteurs du glutamate (Nakanishi 1992). En se basant sur leurs modalités de transduction, deux types de récepteurs sont distingués : les récepteurs ionotropiques, récepteurs canaux, et les récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G. La première sous-unité de récepteur ionotropique au glutamate a été clonée en 1989 (Hollman et al., 1989), suivie du clonage du premier récepteur métabotropique en 1991 (Masu et al., 1991).

2.2.3.1. Les récepteurs ionotropiques: iGluR

Les iGluR sont des récepteurs canaux transmembranaires impliqués dans la transmission synaptique rapide. La liaison du glutamate induit un changement de conformation du récepteur-canal, qui passe alors d'un état fermé à un état ouvert. Il est ainsi perméable aux cations, principalement au sodium (Na^+), au potassium (K^+) et dans certains cas au Ca^{2+} (Burnashev, 1996; Magleby, 2004). Ces récepteurs canaux sont des complexes hétérotétramériques de sous-unités combinées (Rosenmund, 1998). Malgré leur diversité phylogénétique, toutes les sous-unités des iGluR partagent une structure commune : un domaine N-terminal extracellulaire, quatre fragments membranaires dont trois transmembranaires, et un domaine C-terminal intracellulaire (figure 28). Ces protéines possèdent deux larges domaines extracellulaires : l'un N-terminal, l'autre défini par la boucle L située entre les troisième M3 et quatrième M4 fragments membranaires. Le domaine N-terminal participe à l'assemblage des sous-unités en tétramère (Ayalon and Stern-Bach, 2001). Le domaine C-terminal porte les sites potentiels de phosphorylation et d'ancrage aux protéines cytoplasmiques de la PSD qui contrôlent l'adressage et la localisation des récepteurs. Le site de liaison de l'agoniste est compris entre deux domaines extracellulaires non-consécutifs en interaction : le S1 situé en amont du domaine transmembranaire M1, et le S2 situé dans la boucle L entre les domaines transmembranaires M2 et M3. La région formant le pore est constituée d'une boucle en épingle à cheveux, membranaire, créant la zone de perméabilité aux ions. On distingue pharmacologiquement trois types de récepteurs ionotropiques : les AMPA pour amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-ioxazole-propionate, les NMDA pour N-méthyl-D-aspartate, les kaïnate (KAR), qui tirent chacun leur nom de leur agoniste sélectif synthétique (AMPA, NMDA) ou naturel (acide kaïnique) (pour revue: Traynelis et al., 2010).

Les récepteurs AMPA: AMPA-R

Les AMPA-R sont les acteurs majeurs de la transmission synaptique rapide. Quatre gènes codent pour les quatre sous-unités GluR1, GluR2, GluR3 et GluR4 des AMPA-R. La majorité de ces récepteurs est composée de la sous-unité GluR2 obligatoire combinée à une sous-unité GluR1 ou GluR3, GluR4 étant exprimée essentiellement dans une période développementale définie (Carroll and Malenka, 2000). Ces récepteurs sont perméables au Na⁺ et K⁺, l'imperméabilité au Ca²⁺ étant conférée par la sous-unité GluR2 (Pellegrini-Giampietro et al., 1997). Différents domaines C-terminaux sont générés par épissage alternatif, diversifiant les sites de phosphorylation des récepteurs ou les interactions avec des protéines partenaires de la PSD ou (pour revues : Lüscher and Frerking, 2001; Song and Huganir, 2002). Le nombre d'AMPA-R présents dans la PSD détermine en partie le poids de la transmission synaptique. Il a notamment été montré que l'insertion des AMPA-R dans la PSD est un des mécanismes de la potentialisation à long-terme (Shi, 1999). Depuis, les mécanismes permettant de réguler le nombre d'AMPA-R dans la PSD ont fait l'objet d'études intensives pointant le rôle critique des protéines de liaison et de phosphorylation des récepteurs (Song and Huganir, 2002). Les AMPA-R sont également retrouvés au niveau présynaptique. Ces récepteurs pourraient ainsi réguler la libération de neurotransmetteur sur les terminaisons glutamatergiques (cf. **3.2.1.**) voire même GABAergiques (Bureau and Mulle, 1998).

Ainsi, la distribution subcellulaire et les interactions protéiques des AMPA-R sont des éléments essentiels pour la régulation fine de la transmission synaptique par le glutamate.

Les récepteurs NMDA: NMDA-R

Les NMDA-R sont composés d'une combinaison de quatre voire cinq sous-unités. Il existe six sous-unités différentes : NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3. NR1, sous-unité obligatoire s'associe avec les sous-unités NR2 et/ou NR3. Les sous-unités NR2 et NR3 ne forment pas de récepteurs fonctionnels homo-oligomériques (Cull-Candy et al., 2001; Carroll and Zukin, 2002). Au cours du développement, les sous-unités NR2B sont remplacées par les NR2A (Kew et al., 1998). Sur NR1 se trouve le site de fixation du co-agoniste, la glycine ou la D-sérine, nécessaire à l'activation du récepteur (Bowery, 1987; Mothet et al., 2000). Ces récepteurs sont perméables au Na⁺, au K⁺ et au Ca²⁺. Au potentiel de repos du neurone, la liaison du glutamate sur le NMDA-R n'est pas suffisante pour permettre l'entrée d'ion par le canal. Une dépolarisation membranaire aux alentours de -40 mV est nécessaire pour lever le blocage du canal par l'ion magnésium (Mg²⁺) (Nowak et al., 1984). Cette propriété fait du NMDA-R un détecteur de coïncidence entre les activités pré- (la libération de glutamate) et postsynaptiques (dépolarisation membranaire). Ceci confère aux NMDA-R, via la signalisation calcique, une place centrale dans la régulation de la transmission synaptique et les phénomènes de plasticité synaptique. Il existe également des NMDA-R présynaptiques impliqués dans la régulation de la libération de neurotransmetteur (Buonanno, 2011; Larsen et al., 2011).

Les récepteurs Kainate : KA-R

Ils sont moins bien connus que les AMPA-R ou NMDA-R car leur étude a longtemps été freinée par le manque d'outil permettant leur caractérisation (agonistes, antagonistes et anticorps spécifiques). Leur structure globale est identique à celle des AMPA-R et NMDA-R ; ils peuvent être localisés dans les domaines pré- ou postsynaptiques. Cinq sous-unités ont été clonées : GluR5, GluR6, GluR7, KA1 et KA2. Elles peuvent être classées en fonction de leur affinité pour l'acide kainique: les sous-unités KA1-2 et les sous-unités GluR5 à 7 ont respectivement une faible et une forte affinité pour le kainate (revue Pinheiro and Mulle, 2006). Ces sous-unités sont exprimées dans différentes régions du cerveau et possèdent des propriétés pharmacologiques et électrophysiologiques distinctes. Les KA-R sont activés par de faibles concentrations de kainate et génèrent des réponses synaptiques minimales comparativement à celles des AMPA-R, qui ont des cinétiques de désactivation plus lentes (Straub et al. 2011; Castillo et al. 1997). Ils sont perméables au Na^+ et K^+ , et dans certains cas au Ca^{2+} (Lee et al. 2001; Burnashev et al. 1995). Ils interviennent également dans la régulation fine de la transmission synaptique glutamatergique.

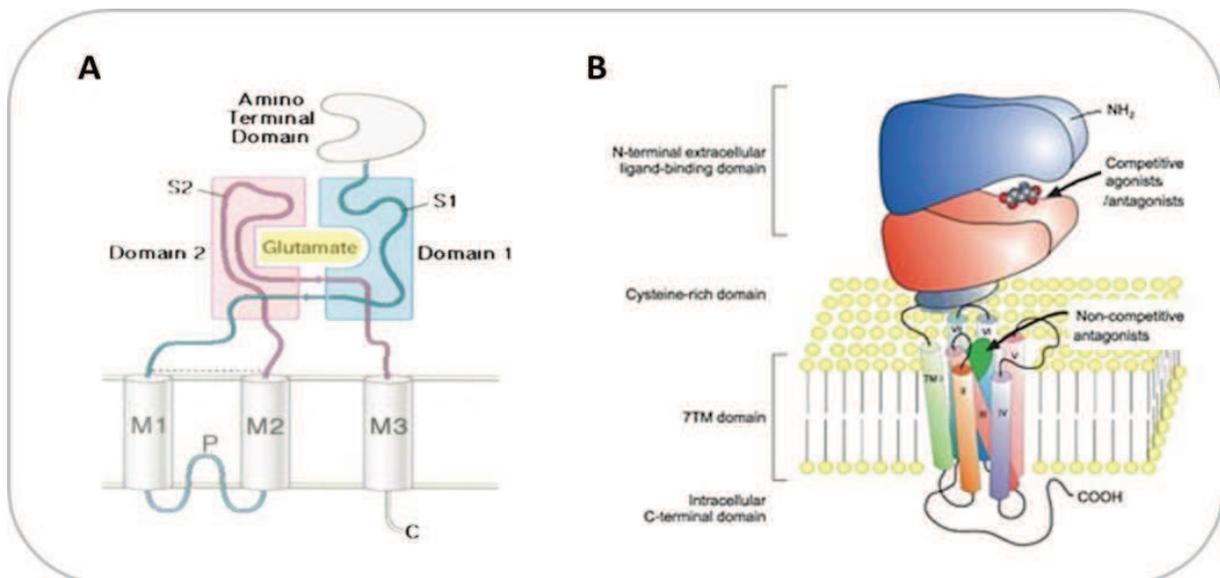


Figure 28. Les récepteurs au glutamate ionotrope et métabotrope. **A.** Structure générale d'une sous-unité de récepteur ionotrope au glutamate. Le domaine N-terminal est extracellulaire et le C-terminal, intracellulaire. Les segments S1 et S2 permettent la liaison à l'agoniste. **B.** Représentation schématique d'un récepteur métabotrope au glutamate. Le domaine liant le glutamate se trouve dans le domaine N-terminal ; il est suivi du domaine heptahélice et du domaine C-terminal cytosolique (d'après Armstrong and Gouaux, 2000 et Spooren and Gasparini, 2004).

2.2.3.2. Les récepteurs métabotropiques: mGluR

Les mGluR sont des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPG). Ils sont formés de sept hélices protéiques transmembranaires hydrophobes ancrées dans la membrane. Ils possèdent un large domaine N-terminal extracellulaire, un domaine conservé riche en cystéine, les sept segments transmembranaires reliés entre eux par de courtes boucles extra- et intracellulaires et un domaine C-terminal de taille variable (figure 28). La caractéristique structurale des mGluR est la présence du site de fixation du ligand dans le

domaine N-terminal extracellulaire organisé en deux domaines globulaires pivotants. Comme de nombreux RCPG, les mGluR forment des homodimères stabilisés par des ponts disulfures existant entre les cystéines du domaine extracellulaire (Romano et al., 1996).

Il existe huit sous-types de mGluR classés en trois groupes en fonction de leur homologie de séquence, de leur pharmacologie, de leur voie de transduction et de leur localisation cellulaire (pour revue : Conn and Pin, 1997).

Le groupe **I** comprend les mGluR1 et mGluR5. Ils sont couplés positivement à la phospholipase C (PLC) via des protéines G de type Gq. La PLC induit la formation d'inositol-tri-phosphate (IP3) qui permet la libération des stocks calciques intracellulaires. Elle induit aussi la formation de diacylglycerol (DAG), un activateur de la protéine kinase C (PKC).

Le groupe **II** inclue les mGluR2 et mGluR3, et le groupe **III** les mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8. Les groupes **II** et **III** sont couplés négativement à l'adénylate cyclase (AC) via une protéine G de type Gi/Go. Ceci induit une diminution de production AMPc, un activateur de la protéine kinase A (PKA).

Les mGluR sont exprimés dans la majorité des structures du SNC. Ceux du groupe **II** ont une localisation principalement présynaptique alors que ceux du groupe **I** sont localisés sur la postsynapse, de manière pérисynaptique (Anwyl, 1999). Le type **III** est retrouvé principalement en pré- mais également en postsynapse.

De nombreux variants d'épissage sont reportés pour la queue C-terminale, créant ainsi une large variété de domaines intracellulaires potentiellement accessibles à de multiples partenaires protéiques (Enz, 2007). Fonctionnellement, les mGluR participent à et régulent la transmission synaptique par le biais de divers effecteurs comme la PKC, l'IP3, le Ca^{2+} , ou des canaux ioniques membranaires (Niswender and Conn, 2010). Les mGluR des groupes **II** et **III** modulent la libération de neurotransmetteur en agissant comme auto-récepteurs présynaptiques de manière homo- (même synapse) ou hétéro-synaptique (autre synapse, par exemple GABAergique). Les mGluR du groupe **I** sont, quant à eux, principalement postsynaptiques (Coutinho and Knopfel, 2002) modulent l'activité des canaux ioniques et des iGluR (Dhami and Ferguson, 2006). La variété des rôles tenus par les mGluR se reflète dans la diversité de leur localisation autour de la synapse glutamatergique et sur les cellules gliales (pour revue : Nicoletti et al., 2011).

3. La transmission synaptique glutamatergique basale

La transmission synaptique se base sur un principe fondamental : la polarisation des neurones. En effet, il existe une différence de potentiel entre le milieu intracellulaire, négatif, et le milieu extracellulaire, positif. Au repos, la valeur de potentiel de membrane est stable, de l'ordre de -70mV pour un neurone pyramidal. Cette différence de potentiel est due en grande partie à la différence de concentrations ioniques de ces deux compartiments, secondaire à une perméabilité sélective des canaux (notamment potassiques) présents à la membrane plasmique, par lesquels les ions diffusent passivement selon un gradient électrochimique. Elle est maintenue en permanence par un transport actif d'ions via la pompe membranaire sodium-potassium (pompe $Na^+/K^+-ATPase$).

Les neurones sont des cellules excitables, c'est-à-dire capables de recevoir et d'intégrer électriquement une information, et conductrices, c'est-à-dire capable de transmettre cette information à un autre neurone.

3.1. Séquence fonctionnelle

Cette transmission est polarisée. En effet, elle se fait suivant une direction préférentielle des dendrites vers le corps cellulaire (ou soma), puis du corps cellulaire vers la terminaison axonale. L'information afférente est intégrée au niveau du compartiment postsynaptique, l'épine dendritique, qui la conduit généralement vers le soma. Cette information électrique se propage ensuite le long de l'axone du neurone qui l'a intégrée. Comme expliqué précédemment, le relais qui assure la transmission de l'influx nerveux au neurone suivant est la synapse. Dans le cas de la transmission synaptique chimique, l'information est convertie en message chimique au niveau de la terminaison axonale.

3.1.1. Genèse et propagation de l'influx nerveux

Le message chimique arrive aux dendrites où il est converti en message électrique (courants ioniques, cf. **3.1.3.**) puis se propage vers le soma généralement de manière passive et décroissante par conduction électrotonique. A ce niveau, le « shunt » par des afférences GABAergiques est possible. Le soma est rattaché à l'axone par le cône d'émergence, où se trouve le « segment initial » très riche en canaux sodiques dépendants du potentiel (Voltage Sensitive Sodium Channels ou VSSC). C'est à ce niveau qu'est initié le potentiel d'action (PA) correspondant à une dépolarisation locale, brève et stéréotypée de la membrane plasmique. En effet, les VSSC, suffisamment activés par la sommation spatiale et temporelle des dépolarisations arrivant au segment initial, génèrent le PA (figure 29). Ce phénomène est de type « tout-ou-rien » car si la somme des dépolarisations n'est pas suffisante pour atteindre le seuil, aucun PA ne sera émis. C'est l'intégration du signal nerveux.

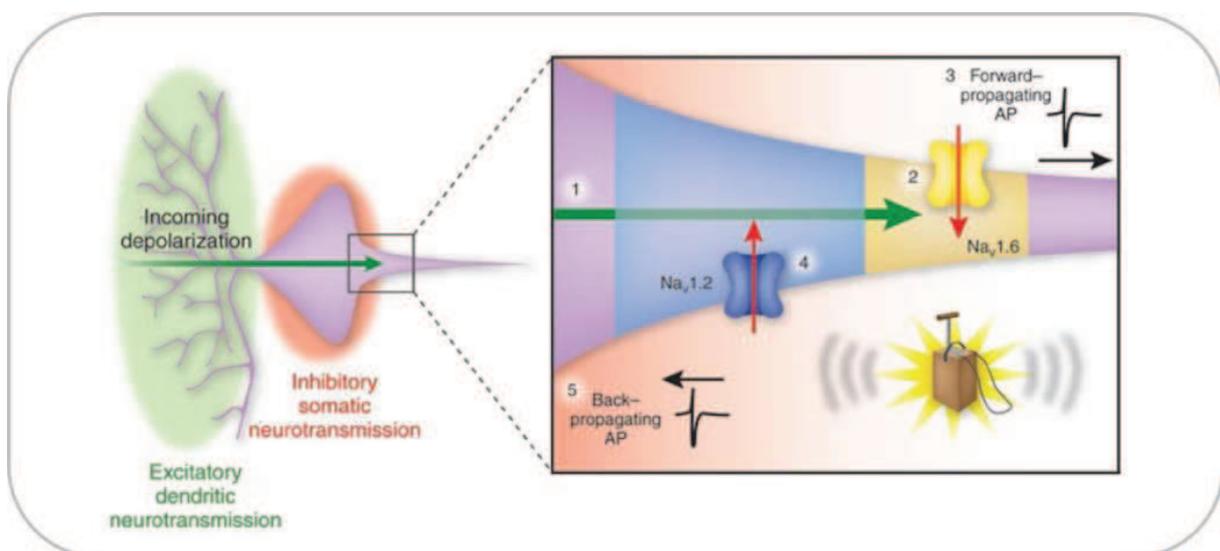


Figure 29. L'initiation du potentiel d'action au niveau du segment initial de l'axone. La transmission excitatrice à travers les dendrites d'une cellule pyramidale entraîne une dépolarisation locale (en vert) qui se propage de manière électrotonique à travers le soma (flèche verte). Elle peut être shuntée par

des afférences inhibitrices GABAergiques (cercle rouge). Toutefois, avec un input synaptique suffisant, la dépolarisation se propage jusqu'au segment initial (encart). Là (1), la dépolarisation atteint une zone riche en canaux Na^+ à haut seuil d'activation ($\text{Na}_v1.2$, bleu). La dépolarisation passe au travers sans les activer (flèche verte). Quand la vague dépolarisante arrive au niveau de canaux Na^+ à bas seuil ($\text{Na}_v1.6$, jaune), ceux-ci s'ouvrent (2) et initient un courant Na^+ entrant (flèche rouge). Ceci induit une dépolarisation locale qui active les canaux $\text{Na}_v1.6$ voisins, créant une réaction en chaîne responsable de l'initiation et de la propagation antérograde du potentiel d'action (PA, 3). Les canaux $\text{Na}_v1.2$ sont alors activés (4), initiant un PA rétrograde (5) qui ne ré-activera pas les canaux $\text{Na}_v1.6$ alors inactivables (d'après Dulla and Huguenard, 2009).

L'axone constitue, avec le soma, l'unité majeure de conduction du neurone. L'influx nerveux caractérisé par une modification instantanée, localisée et transitoire de la perméabilité membranaire se propageant le long de l'axone. En effet, une fois le premier PA généré, les PA se propagent par réaction en chaîne jusqu'à la terminaison axonale grâce à des VSSC dépolarisants et des canaux potassiques (VSKC) repolarisants repartis le long de l'axone. Des cellules gliales spécialisées, les cellules de Schwann, s'enroulent autour de l'axone formant ainsi les couches de myéline appelées nœuds de Ranvier qui permettent d'accélérer la conduction de l'influx nerveux (Debanne et al., 2011). Certains sous-types de VSSC assureraient la propagation rétrograde du PA vers les dendrites (Hu et al., 2009).

3.1.2. Mécanismes de libération du glutamate

Les PA se propagent jusqu'aux terminaisons axonales, zones riches en VSCC à haut seuil qui alors s'activent. Leur ouverture entraîne un influx calcique massif au niveau du bouton terminal. C'est dans les années 1950-1960 que Paul FATT, neuroscientifique britannique, et Bernard KATZ, biophysicien allemand, ont mis en évidence l'implication du Ca^{2+} dans l'exocytose de neurotransmetteur. Ils ont montré que cette libération était quantique (le neurotransmetteur est libéré par paquet de taille constante, un quantum représentant une vésicule) et que le Ca^{2+} augmentait la probabilité d'un quantum d'être libéré. Ces premières études sur l'axone géant de calamar et la jonction neuromusculaire ont révélé que la relation entre concentration calcique et libération de neurotransmetteur n'était pas linéaire, et dépendait de la machinerie protéique impliquée dans la fusion entre la membrane vésiculaire et la membrane neuronale.

Les protéines majoritairement responsables de la libération sont les protéines SNARE, pour Soluble NFS Attachment (SNAP) Receptor (le NFS étant le premier élément protéique identifié nécessaire à la fusion entre membrane et vésicules). Deux groupes sont distingués:

- v-SNARE vésiculaires comme les synaptobrévines (ex: VAMP2).
- t-SNARE (t pour *target*) sur la membrane présynaptique comme la syntaxine ou SNAP25.

L'association des v-SNARE/t-SNARE forme un complexe protéique VAMP-syntaxine-SNAP25 très stable nichant les vésicules au niveau de la zone active. D'autres protéines, comme la synaptotagmine présente au niveau de la membrane vésiculaire, ont un rôle crucial dans l'exocytose. La figure 30 retrace les différentes étapes de l'exocytose vésiculaire.

La première étape de la fusion consiste en l'arrimage des vésicules à la membrane. Il mettrait en jeu des complexes de protéines autres que les SNAREs recrutées

séquentiellement sous la dépendance d'un signal contrôlé par de petites GTPases. Ces complexes définiraient alors des sites de fusion, en activant localement la machinerie SNARE. La deuxième étape est l'amorçage de la fusion membranaire. Elle dépend de protéines chaperonnes comme Munc13 qui a un rôle principal dans cette étape en activant la syntaxine. Le complexe SNARE est maintenu dans une conformation « fermée » inhibant la fusion. La troisième étape est l'activation du complexe SNARE pour la fusion. Les canaux VSCC à la membrane présynaptique sont organisés en microdomaines en étroite association physique avec le complexe SNARE (Stanley, 1997). C'est l'augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire au sein de ces microdomaines qui induit la fusion membranaire. En effet, le Ca^{2+} interagit avec, en autres, la synaptotagmine. Cette protéine est considérée comme *le* senseur calcique du complexe. L'augmentation du signal calcique stimule l'interaction de la synaptotagmine avec le complexe SNARE. La modification tridimensionnelle de ce complexe ternaire conduit à la fusion de la vésicule avec la membrane plasmique et à l'exocytose du glutamate dans la fente synaptique (Galli and Haucke, 2004; Ziv and Garner, 2004; Augustine, 2001).

Le complexe SNARE serait ensuite dissocié par l'action des SNAP et du NSF.

L'exocytose vésiculaire peut s'effectuer selon trois processus distincts :

- « kiss-and-stay » : le pore s'ouvre puis se ferme et la vésicule reste à la membrane.
- « kiss-and-run » : le pore de fusion s'ouvre et se ferme, la vésicule se détache de la membrane puis s'arrime à nouveau (après avoir été éventuellement rechargée).
- la vésicule est intégrée à la membrane et l'excès membranaire est récupéré sous forme d'une vésicule tapissée de clathrine, qui sera soit de nouveau remplie, soit adressée après endocytose clathrine-dépendante vers le réseau trans-golgien (Sudhof, 2004).

Trois mécanismes peuvent arrêter l'exocytose et donc faire cesser la libération de glutamate dans la fente synaptique :

- l'ouverture de canaux potassiques, qui ramènent le potentiel de membrane à sa valeur d'origine et inhibent ainsi les canaux dépendants du voltage.
- l'activation de pompes calciques, situées sur le RE et la mitochondrie, qui captent les ions Ca^{2+} entrés dans la cellule, faisant ainsi cesser le signal calcique.
- l'épuisement des vésicules synaptiques chargées en neurotransmetteur capable de fusionner avec la membrane (fatigue synaptique).

Ces mécanismes participent à de nombreuses formes de plasticités exprimées par les terminaisons présynaptiques.

3.1.3. Réception du message et intégration dendritique

Les neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique atteignent la membrane postsynaptique par simple diffusion. C'est l'étape qui, avec le délai nécessaire pour provoquer l'exocytose, nécessite le plus de temps dans la transmission synaptique.

L'intégration du message se fait au niveau du compartiment postsynaptique, c'est-à-dire dans la majorité des synapses glutamatergiques, l'épine dendritique.

Deux types de transmission glutamatergique sont distingués en fonction des récepteurs impliqués:

Transmission glutamatergique rapide

Au cours de la transmission rapide (environ 1ms), le glutamate se fixe sur les iGluR de type AMPA, NMDA et Kainate. Leur activation se manifeste par un changement de conformation permettant l'ouverture du canal. Le transit d'ions cationiques via les AMPA-R et KA-R, principalement Na^+ , dépolarise la dendrite.

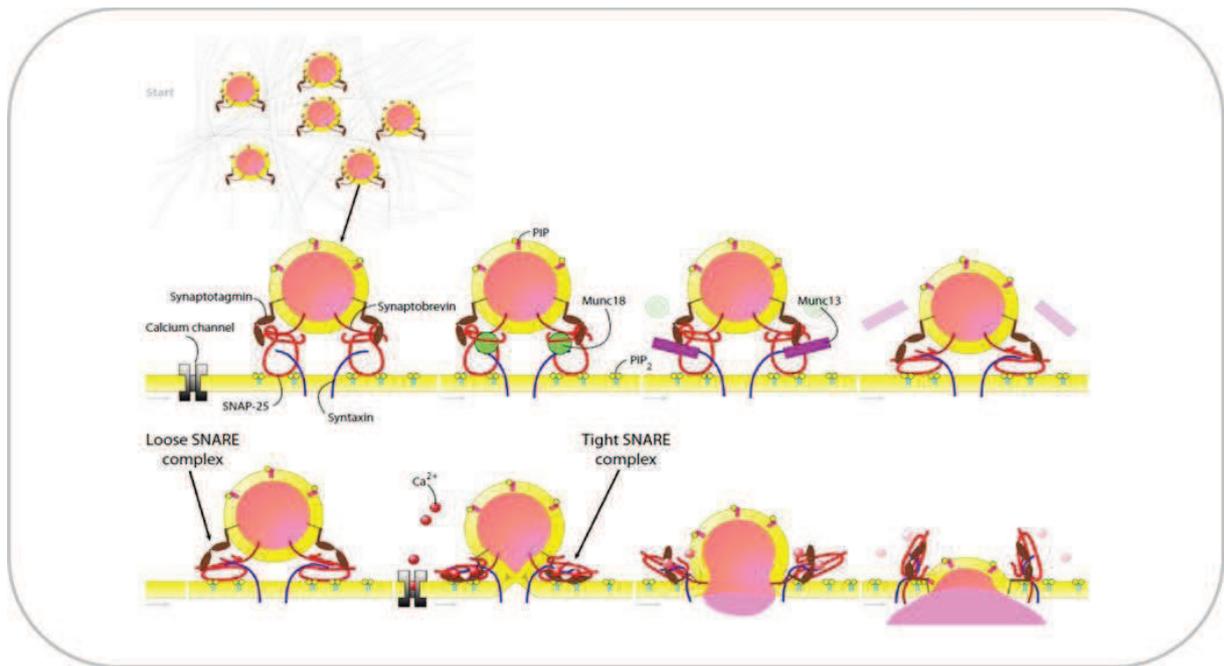


Figure 30. Schéma représentant les mécanismes principaux de l'exocytose du glutamate. Les vésicules sont recrutées au niveau du pool de réserve correspondant aux vésicules synaptiques attachées à l'actine via la synapsine. Ces vésicules se déplacent et s'attachent à la membrane plasmique. L'amorçage, dont les mécanismes sont encore inconnus, se met en place. Deux protéines liées à la syntaxine, Munc18 et Munc13, pourraient y participer. Cette étape permettrait la formation d'un complexe entre les protéines v-SNARE présentes au niveau des vésicules synaptiques, comme la synaptobrevine, et les t-SNARE de la membrane plasmique, comme SNAP25. La formation du complexe SNARE synaptobrevine/SNAP-25/syntaxine rapproche la vésicule synaptique de la membrane plasmique : elle est arrimée. L'entrée de calcium entraînerait une modification conformationnelle de la synaptotagmine qui permettrait un changement d'état du complexe SNARE induisant la fusion des bicouches lipidiques. Les membranes vésiculaires seraient ainsi intégrées à la membrane plasmique (d'après Galli and Haucke, 2004).

Dans le cas des NMDA-R, détecteurs de coïncidence, une dépolarisation préalable est nécessaire pour lever le bloc Mg^{2+} et assurer le transit d'ions dépolarisants Na^+ et Ca^{2+} . Ces mouvements ioniques génèrent des courants ou potentiels postsynaptiques excitateurs (CPSE ou PPSE). Leur intégration somatique en PA au niveau du segment initial dépend de plusieurs paramètres :

- l'amplitude unitaire de ces courants, ceux-ci se propageant par conduction électrotonique de façon passive et décroissante.

- la manière dont les événements unitaires non-simultanés s'additionnent dans le temps (sommation temporelle).
- l'addition des événements unitaires apparaissant simultanément dans différentes régions de l'arborisation dendritique (sommation spatiale).

Ceci repose à la fois sur la localisation par rapport au soma de la synapse activée, de la morphologie de l'arborisation dendritique et des différentes conductances dendritiques (Magee, 2000; Reyes, 2001). L'organisation de l'arborisation dendritique a donc une importance dans la filtration de l'information afférente (Takahashi et al., 2012) (pour revue sur les neurones pyramidaux : Spruston, 2008).

La perméabilité des NMDA-R au Ca^{2+} leur confère un rôle primordial dans la transmission glutamatergique. Les NMDA-R interagissent notamment avec la protéine kinase II dépendante du Ca^{2+} et de la calmoduline, la CaMKII (Strack and Colbran, 1998). C'est la protéine la plus abondante de la PSD. Elle est directement activée par l'influx calcique qui transite via les NMDA-R et joue un rôle crucial dans la régulation de la transmission synaptique (figure 35) (Lisman et al., 2012). De plus, le Ca^{2+} est un second messenger qui active un grand nombre d'enzymes capables de réguler la transmission synaptique.

Transmission glutamatergique lente

Le glutamate se fixe sur ses mGluR postsynaptiques, principalement ceux du groupe I. Leurs voies de couplage intracellulaires (Gq, IP3 et PLC) sont principalement modulatrices. Cet effet du glutamate sur les mGluR est lent: il peut prendre d'une centaine de millisecondes à plusieurs minutes pour se mettre en place. Ses effets modulateurs sur la transmission synaptique seront détaillés en 3.2.3.3.. Les mGluR n'ont cependant pas qu'un rôle régulateur lent. Ils peuvent jouer sur l'excitabilité postsynaptique en agissant sur les conductances ioniques membranaires. Ceci peut se faire :

- directement via les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G qui activent les VSCC de type L
- indirectement via la libération des stocks Ca^{2+} intracellulaires induite par IP3 ou/et par la PKC qui favorise l'ouverture de canaux calciques.

Cet influx calcique activerait des conductances potassiques Ca^{2+} -dépendantes (Fagni et al., 2000). L'effet des mGluR postsynaptiques est donc généralement inhibiteur. Par exemple, dans les neurones dopaminergiques de la VTA, l'activation de mGluR1 postsynaptiques par une stimulation répétitive des afférences glutamatergiques induit un courant postsynaptique inhibiteur (CPSI). Ce CPSI lent (délai de 300msec) dépend de l'activation d'une conductance K^+ par le Ca^{2+} (Fiorillo and Williams, 1998). Toutefois, les mGluR auraient également des effets excitateurs lents, comme par exemple au niveau de l'hippocampe (Congar et al., 1997).

Après activation, des mécanismes de désensibilisation des récepteurs se mettent en place. Ils permettent un contrôle de la durée d'activation pour éviter les effets néfastes d'une stimulation prolongée.

Dans le cas des récepteurs ionotropiques, cette désensibilisation correspond au temps nécessaire à la dissociation du complexe glutamate-récepteur par changement d'état conformationnel (Armstrong et al., 2006).

Le mécanisme est plus complexe pour les récepteurs métabotropiques. La désensibilisation des mGluR implique le découplage physique du récepteur avec la protéine G. Ceci se fait par phosphorylation des résidus sérine-thréonine présents au niveau de la queue C-terminale du récepteur (Dhami and Ferguson, 2006). Les mGluRs activent la PKC qui en retour désensibilise les mGluR (Gereau and Heinemann, 1998).

3.2. Régulation et modulation de la transmission synaptique

Le contrôle de l'activité synaptique est un point crucial dans le bon fonctionnement neuronal. Il permet notamment de préserver les neurones de l'excitotoxicité glutamatergique médiée par le Ca^{2+} , d'autant que les épines dendritiques sont des compartiments pauvres en tampon calcique (Sabatini et al., 2002).

3.2.1. Régulations présynaptiques: la libération du glutamate

La présence de récepteurs au glutamate au niveau des terminaisons axonales a été mise en évidence par des expériences utilisant des agonistes. Ces récepteurs présynaptiques permettent une régulation fine de la libération de glutamate. Celle-ci est dite « autocrine » car elle dépend de l'activation d'autorécepteurs présents sur la terminaison présynaptique (pour revue : Pinheiro and Mulle, 2008) (figure 31).

Via les iGluR présynaptiques

Les AMPA-R, KA-R et, de manière plus controversée, les NMDA-R exprimés à la surface des membranes présynaptiques régulent également la libération de glutamate. Ils agissent par une action ionotrope directe qui augmente le niveau de dépolarisation de la terminaison axonale et donc facilite l'influx calcique et la libération de glutamate. Ceci se fait par inactivation des canaux potassiques ou par facilitation de l'activité des canaux calciques (Pinheiro and Mulle, 2008). L'influx calcique direct via les NMDA-R présynaptiques augmente la libération de glutamate (Woodhall et al., 2001; Larsen et al., 2011). Il existerait également des AMPA-R et KA-R perméables au Ca^{2+} et des NMDA-R au niveau des neurones GABAergiques du cervelet qui participeraient directement à la libération de neurotransmetteur (Satake et al., 2004, 2006; Rossi et al., 2008).

De plus, les iGluR inhiberaient la libération de glutamate par les voies de signalisation dépendantes des mGluR. Ceci a notamment été mis en évidence pour de fortes stimulations des KA-R. Leur activation par application de kaïnate inhiberait la transmission glutamatergique dans l'hippocampe (Frerking et al., 2001) et le Nac (Casassus and Mulle, 2002). De même, le glutamate endogène au niveau des synapses thalamo-corticales active les KA-R présynaptiques, aboutissant à l'inhibition de la libération de glutamate (Kidd et al., 2002).

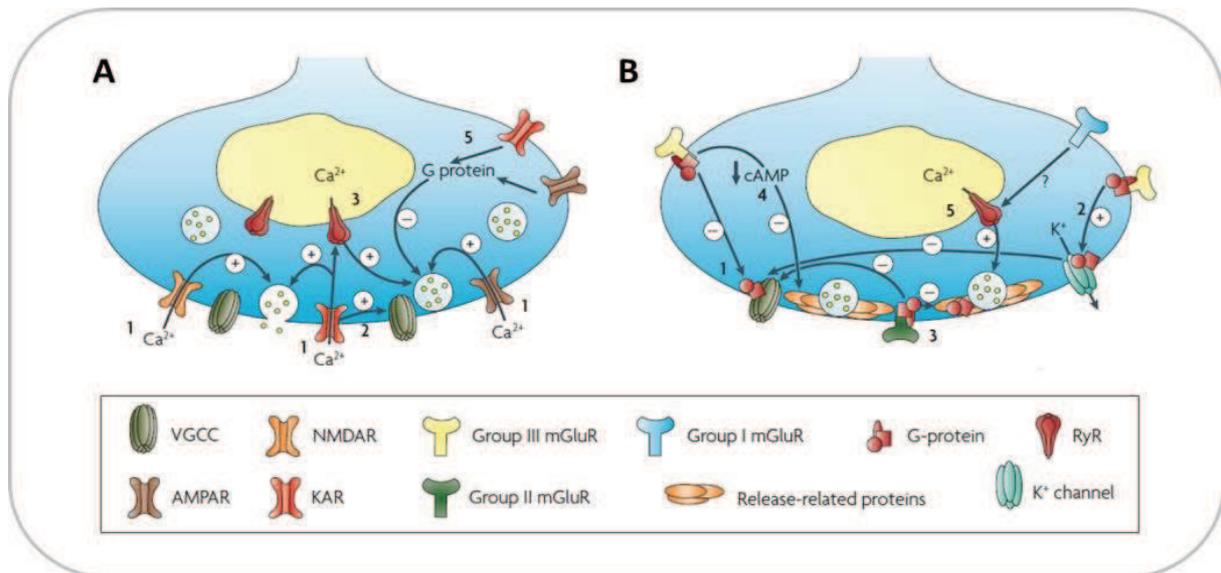


Figure 31. Mécanismes d'action des récepteurs glutamatergiques présynaptiques. A. L'activation des iGluR par le glutamate endogène aboutit généralement à la facilitation synaptique à travers des mécanismes incluant le transit direct d'ions Ca^{2+} à travers les AMPA-R, les KA-R ou les NMDA-R (1), ou bien la dépolarisation de la terminaison axonale et l'augmentation de l'entrée de Ca^{2+} via les VGCC (2). Les iGluR présynaptiques peuvent aussi participer à la libération des stocks calciques intracellulaires médiée par le Ca^{2+} (3). Enfin, l'activation des AMPA-R and KA-R présynaptiques pourrait inhiber la libération neurotransmetteur via une voie dépendante des protéines G (5), probablement par inhibition des VGCC ou activation des VSKC (non montré). B. L'activation des mGluR présynaptiques aboutit généralement à l'inhibition de la libération de glutamate. Ceci peut se produire à travers l'action directe de sous-unités des protéines G, qui peuvent inhiber les canaux VGCC (1), activer les conductances potassiques présynaptiques qui augmentent le seuil du PA et réduisent son amplitude (2), et interagissent avec la machinerie protéique de libération (3). De plus, les mGluR présynaptiques peuvent diminuer la production d'AMP cyclique (4). Enfin, les mGluR du groupe I facilite la libération de glutamate à travers un processus rapide de libération du Ca^{2+} intracellulaire induit par le Ca^{2+} lui-même et sensible à la ryanodine (5). Ryr: récepteur à ryanodine (adapté de Pihheiro and Mulle, 2008).

Via les mGluR présynaptiques

Les mGluR des groupes II et III ont une localisation présynaptique distincte près des sites de libération du glutamate (Ferraguti and Shigemoto, 2006). Ils régulent la transmission glutamatergique dans la plupart des structures du SNC (Schoepp, 2001). De nombreux mécanismes ont été proposés pour expliquer leur effet modulateur de la libération de glutamate. Ils agissent majoritairement par rétrocontrôle négatif. Par exemple, l'activation pharmacologique des mGluR III inhibe la libération de glutamate dans le Nac (Manzoni et al., 1997) et dans le CPF (Huang et al., 2007). Ou encore, l'équipe a montré que les mGluR2,3 activés de manière endogène par le glutamate synaptique inhibent de manière autocrine la transmission dans le NAc (Robbe et al., 2002). Ceci se fait par suppression de l'activité des canaux calciques présynaptiques, par activation des canaux potassiques, ou par régulation de la machinerie de libération. En effet, l'activation de mGluR II et III présynaptiques déprime les VGCC de type P/Q. L'inhibition de ces canaux calciques peut être médiée directement par les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G dissociées (O'Connor, 1999) ou indirectement via réduction de l'activité phosphorylante de PKA (Robbe et al., 2002). Les

VSCC possèdent en effet des sites de phosphorylation qui permettent de moduler leur conductance. De la même façon, les mGluR peuvent contrôler les conductances potassiques présynaptiques (Cochilla and Alford, 1998). Ces canaux potassiques sont responsables de courant K^+ hyperpolarisants ou repolarisants impliqués dans la régulation du potentiel de repos. Leur activation diminue la dépolarisation présynaptique donc l'influx calcique associé. Une étude récente a mis en évidence un mécanisme présynaptique impliquant les K^+ permettant la régulation de la taille du quantum : la concentration potassique présynaptique jouerait sur l'échange K^+/H^+ impliqué dans le remplissage vésiculaire en neurotransmetteur (Goh et al., 2011). Les mGluR peuvent également réguler directement la machinerie protéique de libération de glutamate. En effet, les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G peuvent interagir avec les complexes SNARE, et diminuer le nombre de site de libération (Delaney et al., 2007). Il existerait également un mécanisme activateur de la libération vésiculaire par les mGluR présynaptiques à travers la sollicitation des stocks calciques intracellulaires (del Riõ et al., 1999).

Il existe également une régulation de type paracrine faisant intervenir d'autres neuromodulateurs comme l'adénosine (Manzoni and Bockaert, 1995), le GABA, la sérotonine l'ATP ou encore les endocannabinoides (eCB). Ces modulateurs se fixent sur leurs récepteurs présynaptiques appelés hétérorécepteurs. Par exemple, aux synapses entre cellule pyramidale et interneurone du néocortex, la stimulation de l'interneurone inhibe la transmission glutamatergique par action du GABA libéré sur ses récepteurs métabotropiques (GABA-B) présents sur le neurone pyramidal présynaptique (Zilberter et al., 1999).

3.2.2. Le glutamate dans la fente synaptique

Transporteurs et recapture du glutamate

Neurones et astrocytes expriment des transporteurs membranaires au glutamate, les EAAT (pour Excitatory Amino Acid Transporters). Ils permettent la recapture du glutamate de la fente synaptique, contrôlant sa concentration ainsi que l'amplitude et la cinétique de la réponse postsynaptique qu'il génère. Le blocage pharmacologique des transporteurs augmente la durée (Carter and Regehr, 2000) ou l'amplitude des réponses glutamatergiques rapides au niveau de certaines synapses (Ohta et al., 2002). La clairance du glutamate par les transporteurs neuronaux et gliaux joue un rôle prépondérant dans le contrôle de la transmission glutamatergique (Bergles et al., 1999; Kondratskaya et al., 2010).

Prolongement astrocytaires et diffusion du glutamate

Ces transporteurs permettent de contrôler en partie la propagation extrasynaptique du glutamate. En effet, le glutamate diffuse à l'extérieur de la fente synaptique et active des récepteurs extrasynaptiques, souvent les mGluR pré- ou postsynaptiques (Oliet et al., 2001 ; Brasnjo and Otis, 2001), et des NMDA-R situés sur des synapses adjacentes ("spillover") (Arnth-Jensen et al., 2002). Le contrôle physiologique de la transmission glutamatergique par les transporteurs a été notamment mis en évidence au niveau de l'hypothalamus de rattes gestantes (Oliet et al., 2001). Ce modèle révèle que les transporteurs gliaux, dont la

proximité avec la fente synaptique varie physiologiquement en fonction de la rétractation des prolongements astrocytaires, régulent la transmission en permettant ou non le débordement de glutamate sur les récepteurs mGluR III présynaptiques.

3.2.3. Régulations postsynaptiques de la transmission glutamatergique

Les principales régulations touchent la composition de la membrane postsynaptique en récepteurs, notamment le nombre de récepteurs à la synapse, leur constitution ou plus spécifiquement la conductance des iGluR.

3.2.3.1. Le trafic dendritique des récepteurs glutamatergiques

La composition membranaire en récepteur au niveau de la PSD n'est pas figée. Les récepteurs glutamatergiques iGluR et mGluR retrouvés à la surface membranaire sont stabilisés par les interactions avec les protéines d'échafaudage de la PSD et les protéines du cytosquelette. Ces stabilisations sont réversibles et les récepteurs peuvent être également retrouvés dans des compartiments intracellulaires ou dispersés à la membrane (péri- ou extrasynaptiques) (figure 32). Ceci permet une variation du nombre et mais également de la composition en sous-unités des récepteurs. Deux processus assurent ce phénomène :

Les cycles d'endo- et d'exocytose des récepteurs

La dynamique intracellulaire des récepteurs est un point de contrôle crucial de la transmission synaptique. Un exemple majeur illustre ce phénomène: les variations de la force synaptique dépendent essentiellement de l'insertion/internalisation des AMPA-R (Malinow and Malenka, 2002). Il existe également des cycles de recyclage et dégradation des NMDA-R et mGluR. Cette dynamique est sous-tendue par une machinerie locale. En effet, il existe au niveau de l'épine dendritique des domaines exocytotiques (présence de t-SNARE et de syntaxine) et endocytotiques (présence de clathrine) qui assurent le trafic rapide des récepteurs membranaires. Ils sont internalisés par endocytose vers des compartiments de stockage temporaire assurant leur « tri », les endosomes. Ils peuvent ensuite soit repartir à la membrane synaptique par exocytose (recyclage membranaire), soit emprunter les systèmes de dégradation intracellulaire.

Ces mécanismes sont sous-tendus par des interactions complexes entre les récepteurs et les protéines de la PSD impliquées dans ces trafics. Le cycle d'endo-/exocytose des récepteurs peut se faire de manière soit constitutive, soit régulée par l'activité, ces deux modes impliquant des mécanismes distincts. Par exemple, l'activation des NMDA-R entrainerait une exocytose d'AMPA-R contrôlée par des mécanismes dépendants de la complexine, protéine postsynaptique liant les protéines SNARE n'intervenant pas dans l'exocytose constitutive (Ahmad et al., 2012). Les AMPA-R seraient également internalisés par leur propre stimulation (Lin et al., 2000) ou par activation des mGluR (Snyder et al., 2001; Choi et al., 2011) (pour revue sur les AMPA-R: Carroll et al., 2001). L'endocytose des NMDA-R dépendrait aussi des mGluR (Lau and Zukin, 2007). Outre les modifications quantitatives de récepteurs des iGluR synaptiques, ces processus permettent également des variations

qualitatives, à savoir des remaniements de leur composition en sous-unités. Concernant les mGluR, leur endocytose est secondaire à la désensibilisation induite par la fixation du glutamate et dépendrait de la β -arrestine. Elle pourrait également avoir lieu sans liaison préalable du glutamate (Dhami and Ferguson, 2006).

Plusieurs études de microscopie électronique et d'immunocytochimie après co-marquage de récepteurs, de protéines de la PSD et de protéines endo/exocytotiques ont montré que ces processus d'endo/exocytose n'avaient pas lieu au niveau de la PSD mais sur des sites adjacents (Blanpied et al., 2002; Petralia et al., 2003). Plus précisément, une étude récente suggérerait que l'exocytose implique préférentiellement des sites extrasynaptiques tandis que l'endocytose dépendante des NMDA-R se limite à des zones péri-PSD (Tao-Cheng et al., 2011). Un autre mécanisme permettrait l'acheminement spécifique à la PSD.

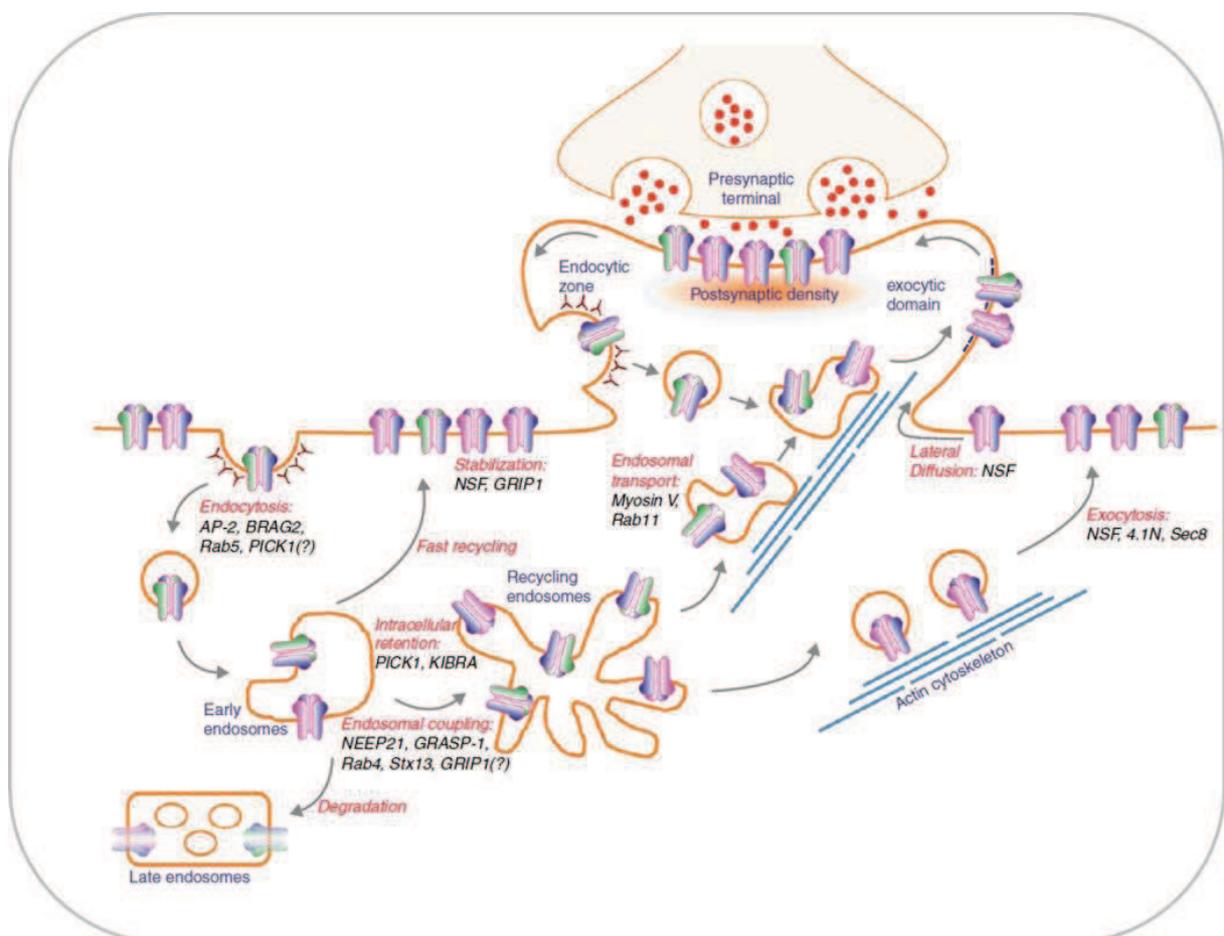


Figure 32. Le trafic intracellulaire des récepteurs glutamatergiques de type AMPA. Les AMPA-R sont assemblés dans le RE et l'appareil de Golgi du soma et des dendrites et acheminés à la dendrite grâce au réseau de microtubules via un trafic vésiculaire dépendant des kinésines. Ils sont ensuite insérés dans la membrane plasmique. Ils sont incorporés à la synapse par diffusion latérale et stabilisés par les protéines d'échafaudage de la PSD. Les AMPA-R matures sont soumis à un recyclage constitutif à travers un trafic endosomal. Ils sont internalisés vers l'endosome précoce par un mécanisme d'endocytose clathrine-dépendant. De là, ils peuvent être soit redélivrés à la membrane plasmique directement (recyclage rapide) ou via l'endosome de recyclage, ou bien entrer dans une voie de dégradation via l'endosome tardif. L'épine dendritique présente des domaines exocytotiques (présence de t-SNARE et de syntaxine) et endocytotiques où les AMPA-R sont rapidement

internalisés et recyclés. Ces voies complexes sont étroitement régulées par une série d'interactions orchestrées par des molécules intracellulaires (d'après Anggono and Huganir, 2012).

La diffusion latérale des récepteurs dans la membrane postsynaptique

Les mouvements membranaires des récepteurs au niveau de la membrane synaptique sont des mécanismes clé sous-tendant les variations du nombre de récepteurs fonctionnels à la PSD (Borgdorff and Choquet, 2002; pour revue: Choquet and Triller, 2003). La diffusion latérale permet, par exemple, un échange entre les récepteurs désensibilisés et des récepteurs fonctionnellement naïfs (Heine et al., 2008).

3.2.3.2. Le cycle de phosphorylation des récepteurs

Les récepteurs au glutamate possèdent de nombreux sites de phosphorylation au niveau de leur queue C-terminale intracellulaire, zone d'interaction protéique. Ces phosphorylations modulent la localisation des récepteurs, en jouant sur les interactions avec d'une part les protéines d'échafaudage de la PSD, et d'autre part les protéines impliquées dans les cycles d'endo/exocytose. En effet, l'état de phosphorylation de la queue C-terminale des AMPA-R est un point clé dans la régulation de leur trafic intracellulaire (Malinow and Malenka, 2002). Ces phosphorylations permettent également de réguler la conductance et la probabilité d'ouverture du canal des iGluR (Raymond et al., 1993; Lee et al., 2000), ainsi que la désensibilisation et le couplage aux voies de signalisation intracellulaire des mGluR (pour revue : Dhami and Ferguson, 2006; Kim et al., 2008)

Les kinases/phosphatases impliquées dans les cycles de phosphorylation sont principalement des sérine/thréonine kinases (PKA, PKC, CaMKII) et phosphatases (calcineurine, PP1). Elles sont activées par des seconds messagers intracellulaires. Par exemple, la CaMKII est activée par le Ca^{2+} et également par la calmoduline, protéine elle-même dépendante du Ca^{2+} . La CaMKII phosphoryle les AMPA-R sur divers résidus sérine, ce qui augmente leur perméabilité et stimule leur exocytose à la synapse (Lisman et al., 2012). La PKA activée par l'AMPc phosphoryle la sous-unité GluR1 au niveau d'une sérine placée en 845 provoquant l'augmentation de la conductance ionique du récepteur (Roche et al., 1996). La calcineurine, phosphatase dont l'activation dépendant du Ca^{2+} , régule l'endocytose et la signalisation des mGluR du groupe I (Ferreira et al., 2009).

3.2.3.3. La régulation par les mGluR postsynaptiques

Les mGluR de type I régulent l'excitabilité postsynaptique en modulant les canaux K^+ et Ca^{2+} (mécanismes décrits en **3.1.1**). D'autres mécanismes plus lents rentrent en jeu. En effet, les protéines Gq auxquelles ils sont couplés permettent l'activation de la PKC. Celle-ci hydrolyse un phospholipide membranaire produisant le DAG et l'IP3. L'IP3 libère le Ca^{2+} présent au niveau des stocks calciques intracellulaires du RE. Le DAG et le Ca^{2+} permettent l'activation de la PKC. Celle-ci, tout comme la PKA, peut phosphoryler les iGluR, ce qui module leur conductance (Tan et al., 1994; Cho et al., 2003). Comme énoncé précédemment, la phosphorylation peut également avoir un effet sur les trafics intracellulaires des récepteurs.

4. La plasticité synaptique

Les synapses sont des structures dynamiques. Les mécanismes de régulation exposés en **3.2.** reflètent ce caractère plastique, mais ne représentent toutefois qu'une partie des processus mis en jeu. On définit par « plasticité synaptique » la capacité des synapses à modifier l'efficacité de leur connexion en fonction de leur propre activité. Elle est issue d'une combinaison complexe de remaniements morphofonctionnels à la fois pré- et postsynaptiques, comme par exemple :

- des réorganisations du nombre ou de la composition des récepteurs à la membrane postsynaptique, gouvernés à la fois par leur trafic intracellulaire et leur diffusion latérale (plasticité « fonctionnelle », cf. III **3.2.3.1**).
- des modifications du nombre de terminaisons présynaptiques ou de la probabilité de libération du glutamate.
- des modifications morphologiques des épines dendritiques fonctionnelles, comme par exemple la variation de leur nombre (plasticité « structurale ») (Segal, 2005 ; Bosch and Hayashi, 2011; O'Donnell et al., 2011; Murakoshi and Yasuda, 2012).

Ces phénomènes peuvent se manifester à plusieurs échelles de temps. On distingue de fait la plasticité à court-terme, exprimée sur des temps très courts (de l'ordre de la milliseconde) et durant, pour les longues, au maximum quelques minutes, de la plasticité à long-terme (à partir d'une heure, jusqu'à plusieurs jours).

4.1. Plasticité synaptique à court-terme

La plasticité à court-terme représente des modulations rapides et réversibles de la force synaptique. Les mécanismes impliqués, principalement présynaptiques, permettraient de diminuer (dépression) ou d'augmenter (facilitation, augmentation) la force synaptique. Elle est généralement induite expérimentalement par des paires de stimulations espacées d'un intervalle court, soit inférieur à 200 ms.

4.1.1. La dépression à court-terme : STD

La STD est principalement due à une déplétion du pool synaptique de neurotransmetteur RRP (Zucker and Regehr, 2002). Elle pourrait également être due à l'inactivation des sites de libération par inhibition de la fusion vésiculaire, ou bien à la réduction de l'influx calcique consécutive soit à l'inactivation des canaux calciques, soit à leur inhibition Ca^{2+} -dépendante (Fioravante and Regehr, 2011).

Des mécanismes postsynaptiques seraient également mis en jeu, comme la saturation ou la désensibilisation des récepteurs, notamment AMPA (Deng and Klyachko, 2011). Leur mobilité membranaire pourrait être également impliquée, par échange de récepteurs désensibilisés avec des récepteurs naïfs (Heine et al., 2008) (figure 33).

La STD implique également les mécanismes de rétrocontrôle négatif dépendants des récepteurs présynaptiques exposés en **3.2.1.** Par exemple, une forme de STD dépendante des eCB, la DSE (pour Depolarisation induced Suppression of Excitation), est induite par une

dépolarisation brève du neurone aboutissant à la production et la libération d'eCB. Ceux-ci inhibent transitoirement, via leurs récepteurs présynaptiques, la libération de glutamate (cf. 4.2.2. *LTD rétrograde dépendante des eCB*) (Kreitzer and Regehr, 2001; Maejima et al., 2001).

4.1.2. La potentialisation à court-terme : STP

La facilitation est une forme de STP généralement due à l'augmentation de la concentration résiduelle en Ca^{2+} et à l'augmentation sous-jacente de probabilité de libération. Cette facilitation calcique engendrée par une première stimulation peut s'expliquer par la saturation des tampons calciques présynaptiques, la facilitation des courants Ca^{2+} présynaptiques ou le changement de sensibilité des senseurs calciques.

L'augmentation est une forme d'amplification synaptique de plus lente que la facilitation et agirait par amélioration de la fusion vésiculaire. Elle apparaîtrait après des stimulations haute-fréquence soutenues.

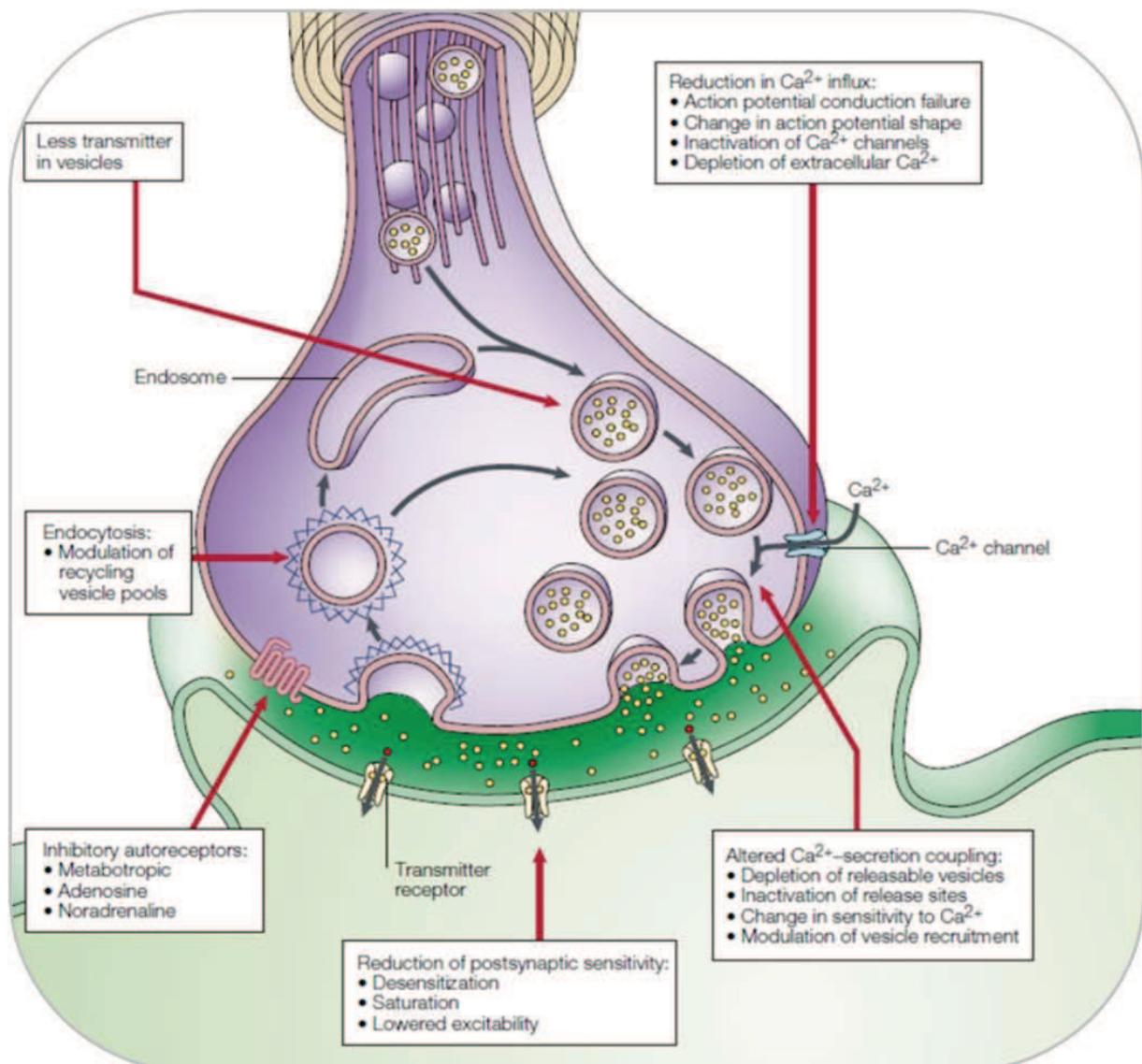


Figure 33. Mécanismes de dépression à court-terme et leurs sites d'action (d'après von Gersdorff and Borst, 2002)

Ces formes de plasticité synaptique permettent un codage fin de l'information, en conférant aux synapses la capacité de filtrer l'input synaptique (Abbott and Regehr, 2004; Deng and Klyachko, 2011). Elles seraient utilisées dans de nombreux processus de traitement de l'information et auraient un rôle crucial dans la mémoire sensorielle, la mémoire de travail, la prise de décision, les fonctions attentionnelles et ainsi que l'apprentissage perceptuel (Jääskeläinen et al., 2011). Au niveau du CPF par exemple, la facilitation améliorerait la capacité des circuits neuronaux à maintenir des connexions récurrentes suite à une stimulation transitoire. Ce type de connectivité engendre au sein des réseaux préfrontaux des activités persistantes, impliquées dans la mémoire à court-terme (Hempel et al., 2000).

4.2. Plasticité synaptique à long-terme

La première preuve physiologique de la plasticité synaptique a été faite par deux chercheurs scandinaves, Timothy BLISS et Terje LOMO, à la fin des années 60. Ils ont montré que la stimulation répétitive des afférences provenant de la voie perforante induisait une potentialisation de plusieurs heures de la transmission au sein du gyrus denté chez le lapin anesthésié (Bliss and Lomo, 1973). De nombreuses études se sont alors concentrées sur les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués de ce processus.

Les différentes formes de plasticités à long-terme ont ainsi été découvertes. Elles seront décrites avec leurs mécanismes dans les structures où elles ont été historiquement mises en évidence, c'est-à-dire principalement l'hippocampe et le cervelet.

Deux phases mécanistiques sont distinguées (Morris and Frey, 1997) :

- l'induction: cette phase transitoire correspond aux mécanismes moléculaires et cellulaires nécessaires aux événements initiateurs ou déclencheurs.
- l'expression: elle fait référence aux mécanismes responsables du maintien du changement d'efficacité synaptique.

Ces mécanismes varient en fonction des synapses et des circuits où ils opèrent.

Les propriétés fonctionnelles qui distinguent les iGluR leur font jouer un rôle fondamentalement différent dans la plasticité synaptique : les NMDA-R, détecteurs de coïncidence entre activité pré- et postsynaptique, joueraient, de part leur perméabilité calcique, un rôle majeur dans l'induction de la plasticité, alors que les AMPA-R seraient des acteurs de l'expression.

Différents protocoles sont utilisés pour générer expérimentalement les formes de plasticités synaptiques dépendantes de l'activité. Des stimulations téaniques à haute-fréquence ou à basse-fréquence induisent généralement respectivement la potentialisation ou la dépression de la transmission synaptique.

4.2.1. La potentialisation à long-terme: LTP

Les études menées pour dévoiler la mécanistique sous-jacente à la plasticité synaptique ont permis de dévoiler deux formes majeures de LTP : la première dépendante de mécanismes postsynaptiques, la seconde basée sur des mécanismes présynaptiques (figure 34).

La LTP dépendante des NMDA-R (figure 34A)

Elle fut découverte au début des années 1980 au niveau des synapses formées par les collatérales de Schaeffer et les neurones pyramidaux de CA1 (Collingridge et al., 1983).

Le mécanisme postsynaptique central de l'induction de la LTP implique séquentiellement:

- l'activation des NMDA : suite à la libération présynaptique de glutamate, la membrane est dépolarisée par les AMPA-R, ce qui délivre le NMDA-R de son bloc Mg^{2+} permettant l'entrée de Ca^{2+} dans l'épine dendritique.
- l'augmentation de Ca^{2+} : c'est l'élément déclencheur crucial de la LTP. Il permet d'activer une cascade de signalisation intracellulaire complexe, incluant de nombreuses protéines kinase, notamment la CaMKII.
- l'activation de la CaMKII : elle permet son autophosphorylation et sa translocation à la synapse. Elle phosphoryle alors les AMPA-R, modifiant ainsi leur trafic intracellulaire et leur conductance (cf. 3.2.3.2). La CaMKII est le médiateur de la LTP (figure 35).

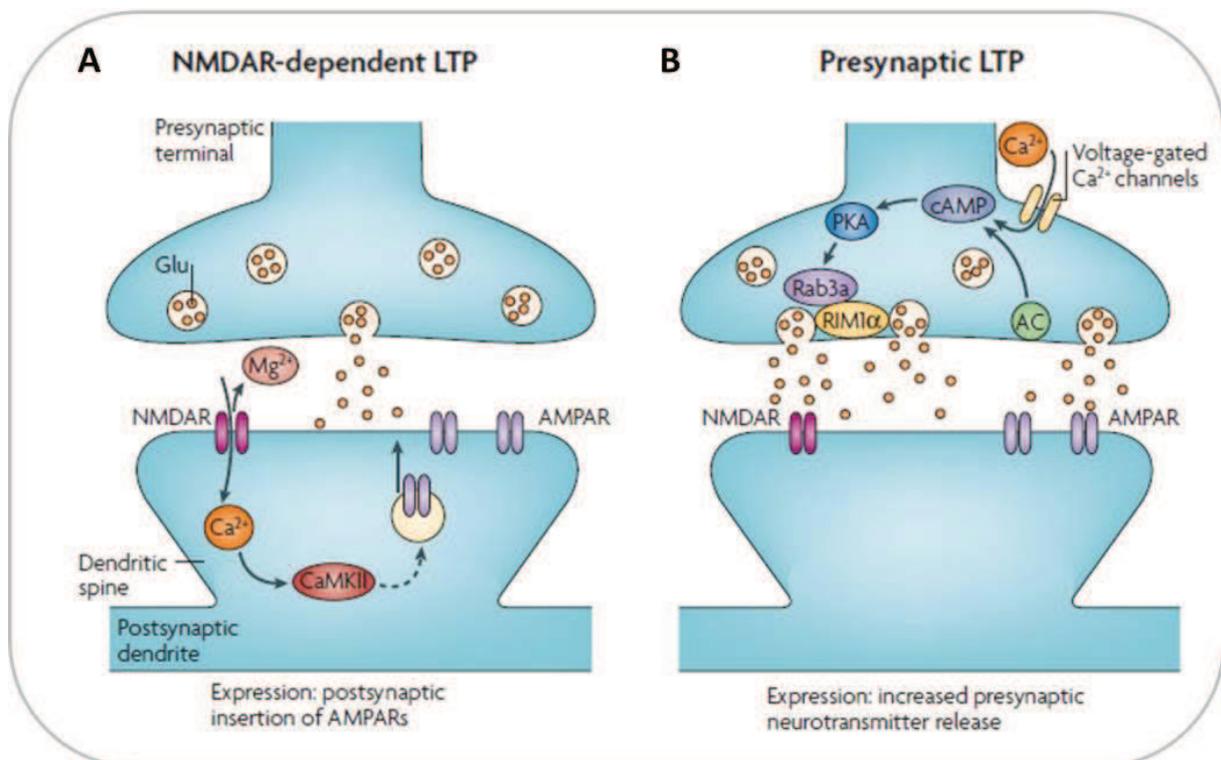


Figure 34. Schéma simplifié de l'induction et de l'expression des différentes formes de LTP observées dans le cerveau des rongeurs. **A.** La LTP dépendante des NMDA-R. Son initiation implique l'activation des NMDA-R et de la CaMKII. Le retrait voltage-dépendant du bloc magnésium des NMDA-R permet à la synapse de détecter la coïncidence entre la libération présynaptique de glutamate et la dépolarisation postsynaptique. L'insertion d'AMPA-R à la membrane postsynaptique est le mécanisme majeur sous-tendant l'expression de la LTP. **B.** La LTP présynaptique. L'activité synaptique répétitive induit une entrée calcique présynaptique, qui active l'AC entraînant une augmentation du taux d'AMPc et donc l'activation de la PKA. Ceci modifie en retour les fonctions de Rab3a et RIM1 α générant une augmentation persistante de la libération de glutamate (d'après Kauer and Malenka, 2007).

Le mécanisme primaire sous-tendant l'augmentation de la force synaptique pendant la LTP est l'exocytose et la diffusion latérale des AMPA-R aboutissant à une augmentation de leur

nombre à la membrane synaptique (Makino and Malinow, 2009) (pour revue : Malinow and Malenka, 2002). Ceci est dû aux kinases, qui, activées par le Ca^{2+} , phosphorylent les récepteurs, mais également les protéines impliquées dans l'exocytose et des protéines d'échafaudage. Les AMPA-R nouvellement insérés et stabilisés seraient en premier lieu majoritairement composés de la sous-unité GluR1, puis plus tardivement de la sous-unité GluR2 perméable au Ca^{2+} (Barry, 2002), ce qui entretient l'influx calcique dans l'épine dendritique.

Il y a également « création » de nouvelles synapses suite au démasquage de synapses jusqu'alors « silencieuses » (Isaac et al., 1995; Liao et al., 1995). Ces synapses silencieuses ne possèdent pas d'AMPA-R mais uniquement des NMDA-R. Leur démasquage est dû au recrutement synaptique d'AMPA-R induit par l'activation de NMDA-R (ces récepteurs s'activent alors que si des événements, comme par exemple les dépolarisations dans des épines avoisinantes, dépolarisent l'épine considérée) et de la CaMKII (pour revue : Kerchner and Nicoll, 2008).

De nouveaux NMDA-R, constitués préférentiellement de sous-unités NR2A, seraient également insérés à la synapse suite à l'activation de la PKC (Grosshans et al., 2002) (pour revue : Lau and Zukin, 2007; Hunt and Castillo, 2012). L'augmentation des conductances des iGluR par phosphorylation participe également au renforcement synaptique. Par exemple, la PKA phosphoryle la sérine 845 de la sous-unité GluR1 des AMPA-R aboutissant à l'augmentation de la probabilité d'ouverture du canal (Banke et al., 2000). Ou encore, la PKA améliorerait la conductance calcique des NMDA-R (Skeberdis et al., 2006).

Le maintien, ou phase tardive, de la LTP nécessite la transcription génique et la synthèse protéique locale au niveau des dendrites (Nguyen et al., 1994). Elle requerrait la PKA, la CaMKIV et les MAPK, qui activeraient des facteurs de transcription clé, dont CREB, permettant ainsi la production d'AMPA-R, de CaMKII ou de protéines impliquées dans le trafic de récepteurs (Frey et al., 1993; Citri and Malenka, 2008).

Des modifications structurales au niveau des épines aboutissant à la formation de nouvelles synapses seraient également mises en jeu au cours de la phase tardive de la LTP. Les principaux phénomènes seraient l'apparition de nouvelles épines (Engert and Bonhoeffer, 1999), l'élargissement des épines préexistantes (Yang et al., 2008) et leur rattachement à la PSD ou encore la scission d'épine en deux synapses fonctionnelles (Lüscher et al., 2000; Toni et al., 1999). Ceci sollicite des réorganisations actives du réseau de protéines cytosquelettiques (figure 40). La LTP implique donc une augmentation de la force synaptique associée également à un accroissement physique de la synapse (pour revue : Yuste and Bonhoeffer, 2001).

La LTP présynaptique (figure 34B)

Elle a été initialement décrite au niveau des synapses entre les fibres moussues des cellules granulaires et les neurones pyramidaux de CA3. Elle a également été retrouvée dans le néocortex et dans le cervelet. Son induction ne dépend pas des NMDA-R ni d'autres phénomènes postsynaptiques. En effet, elle serait initiée par une augmentation de la

concentration calcique présynaptique due à une activité répétée. Cette élévation de Ca^{2+} active l'AC qui produit de l'AMPc induisant l'activation de la PKA. Celle-ci phosphoryle entre autres un constituant majeur de la zone active impliquée dans la fusion vésiculaire : la protéine RIM1. Ceci modifie les interactions de RIM1 avec d'autres protéines de la machinerie de libération, notamment Rab3. Il a été montré que d'une part, RIM1 conférait une activité synaptique soutenue grâce au maintien de l'influx calcique via les VSCC présynaptique et à l'ancrage des vésicules proches de ces canaux (Kiyonaka et al., 2007) et d'autre part, Rab3 limitait le nombre de vésicules « fusionnables » en fonction du Ca^{2+} (Geppert and Südhof, 1998). La modification de l'interaction RIM1/Rab3 aboutit à l'augmentation de la probabilité de libération et au recrutement de sites de libération nouveaux ou jusqu'alors « silencieux » (Castillo et al., 1997a, 2002).

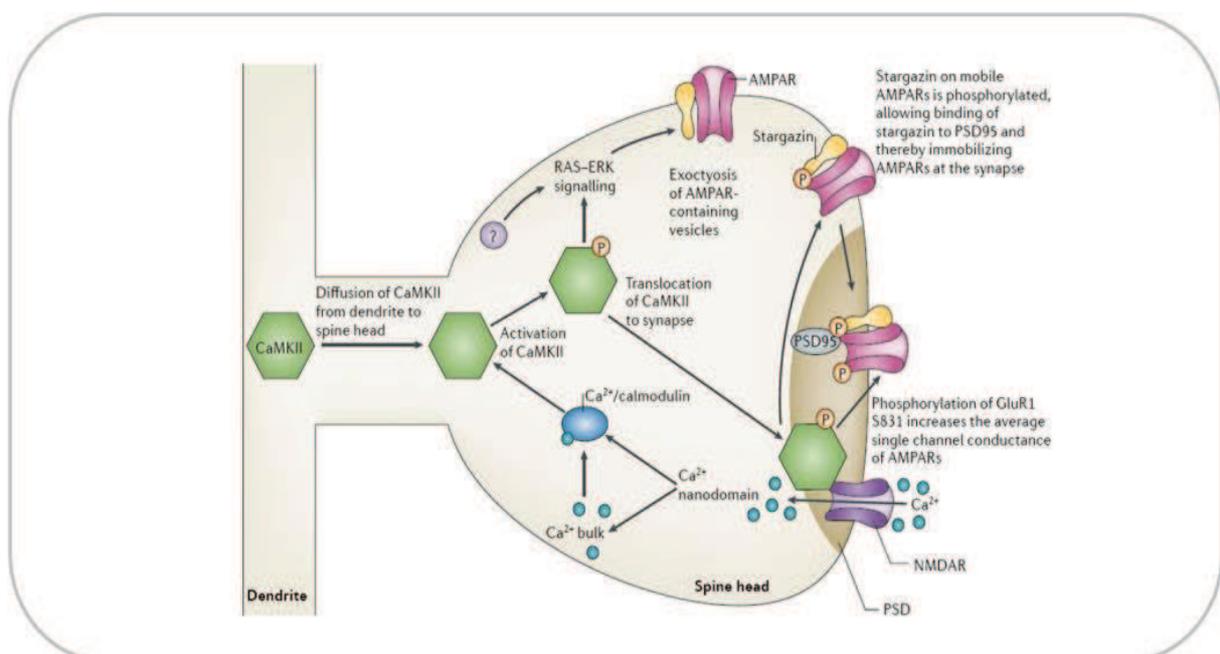


Figure 35. Le rôle de la CaMKII dans la transmission médiée par les AMPA-R pendant la phase précoce de la LTP. L'entrée de Ca^{2+} à travers les NMDA-R induit l'activation de la calmoduline, qui active à son tour la CaMKII. La CaMKII s'autophosphoryle et est transloquée à la PSD. Elle facilite alors la transmission AMPA de deux manières. D'une part, elle phosphoryle la sous-unité GluR1 des AMPA-R au niveau de la sérine 831, ce qui entraîne une augmentation de la conductance du canal. D'autre part, elle phosphoryle la stargazine lui permettant ainsi d'interagir avec PSD95 et donc d'augmenter le nombre d'AMPA-R à la synapse. L'activité CaMKII stimule également la fusion des vésicules contenant les AMPA-R avec la membrane, augmentant ainsi la concentration membranaire extrasynaptique des récepteurs, ce qui participe à la phase tardive de la LTP. La CaMKII activée est également impliquée dans la synthèse protéique et la croissance des épines (d'après Lisman, 2012).

4.2.2. La dépression à long-terme: LTD

Si aucun mécanisme complémentaire ne venait réduire les effets de la LTP, les synapses finiraient par se retrouver saturées à leur poids maximal. Comme pour la LTP, différentes formes de dépression à long-terme ont été reportées (pour revue : Collingridge et al., 2010) (figure 36) :

La LTD dépendante des NMDA-R (figure 36A)

Elle a été en premier lieu caractérisée dans l'aire CA1 de l'hippocampe (Dudek and Bear, 1992). Induite par des stimulations basse-fréquence, elle requiert l'activation des NMDA-R, et l'entrée sous-jacente de Ca^{2+} . L'augmentation de la concentration calcique postsynaptique, plus faible que dans la LTP (Cummings et al., 1996), entraîne le recrutement synaptique et l'activation de la cascade de phosphatases calcineurine et PP1. Celles-ci inactivent et délocalisent par déphosphorylation la PKA et la PKC, constituant ainsi le mécanisme inducteur central. Par exemple, la diminution de la phosphorylation via la PKA de GluR1 entraîne une diminution de la probabilité d'ouverture des AMPA-R. L'expression et le maintien de cette LTD résultent de la perte synaptique par endocytose d'AMPA-R liée à leur déphosphorylation directe par ces phosphatases ainsi que celle de nombreux composants de la machinerie endocytotique. L'activation des NMDA-R aboutirait également à la dégradation de la PSD-95 et donc à une diminution des AMPA-R ainsi que des NMDA-R à la membrane (Colledge et al., 2003).

Comme pour la LTP, l'expression stable de la LTD nécessite :

- une synthèse protéique locale (Kauderer and Kandel, 2000; Manahan-Vaughan et al., 2000). Toutefois, celle-ci ne dépendrait pas de la transcription génique *de novo* mais uniquement de la traduction d'ARNm présents dans l'épine (Manahan-Vaughan et al., 2000) (pour revue : Klann and Dever, 2004).
- des modifications structurales au niveau des épines. Elles constitueraient en une diminution du nombre d'épines ou leur amincissement (Nägerl et al., 2004) (pour revue Bosch and Hayashi, 2011) (figure 40).

Les trois LTD décrites ci-dessous impliquent les mGluR (pour revue: Bellone et al., 2008).

La LTD dépendante des mGluR du groupe I (figure 36B)

Elle a été mise en évidence au niveau des synapses entre fibres parallèles et cellules de Purkinje du cervelet et également au niveau des synapses hippocampiques. Elle est induite par l'activation des mGluR du groupe I, postsynaptiques. L'activation sous-jacente de la PKC induit la phosphorylation de la sérine 880 des GluR2 ce qui provoque l'endocytose des AMPA-R (Matsuda et al., 1999; Chung et al., 2000). Cette LTD serait également étroitement dépendante d'une traduction protéique locale à partir des ARNm présents, déclenchée par l'activation de mGluR (Linden, 1996; Huber, 2000). Elle impliquerait des protéines de liaison à l'ARN différentes de celles de la LTD dépendante des NMDA-R, comme par exemple FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein) (Pfeiffer and Huber, 2006) (pour revue : Gladding et al., 2009).

La LTD présynaptique dépendante des mGluR du groupe II

Elle a été caractérisée en premier lieu dans l'hippocampe (Huang et al., 1999) et est très représentée dans tout le SNC. Elle dépend de l'activation des mGluR II présynaptiques, couplés négativement à la voie présynaptique AC/AMPC/PKA, ce qui aboutit à une diminution de la probabilité de libération de glutamate (ces mécanismes sont décrits dans

cette même partie en **3.2.1.**). Elle ne serait pas dépendante de la synthèse protéique (Pöschel and Manahan-Vaughan, 2005).

La LTD rétrograde dépendante des eCB (figure 36C)

Découverte récemment et observée dans de nombreuses structures, cette forme de LTD est une combinaison de mécanismes pré- et postsynaptiques. Elle requiert l'activation des mGluR I postsynaptiques qui, via le Ca^{2+} et la PLC, induisent la production d'eCB par des enzymes spécifiques (Gerdeman et al., 2002; Robbe et al., 2003). Deux composés dérivés des acides gras membranaires sont produits :

- l'anandamide, par la phospholipase D (DiMarzo et al., 1994).
- le 2-arachidonylglycérol (2-AG), par la DAG lipase et la PLC (Stella et al., 1997).

Une fois libérés dans la fente synaptique, ces messagers rétrogrades agissent sur des récepteurs métabotropiques présynaptiques couplés aux protéines Gi/o, les CB1-R. L'activation de CB1-R diminue la probabilité de libération de neurotransmetteur par des mécanismes similaires à ceux des mGluR II–III présynaptiques (Mato et al., 2008). La contribution relative de ces deux eCB dans la LTD dépend des structures. Il a par exemple été mis en évidence par l'équipe que le 2-AG était spécifiquement responsable de l'induction de la LTD dans le CPF (Lafourcade et al., 2007).

L'inactivation des eCB est contrôlée par leur dégradation cellulaire. En effet, il existe des enzymes hydrolytiques spécifiques de chaque composé, comme l'acide gras amide hydrolase (FAAH) pour l'anandamide (DiMarzo et al., 1994) et la lipase monoacylglycérol (MAG-lipase) pour le 2-AG (Dinh et al., 2002).

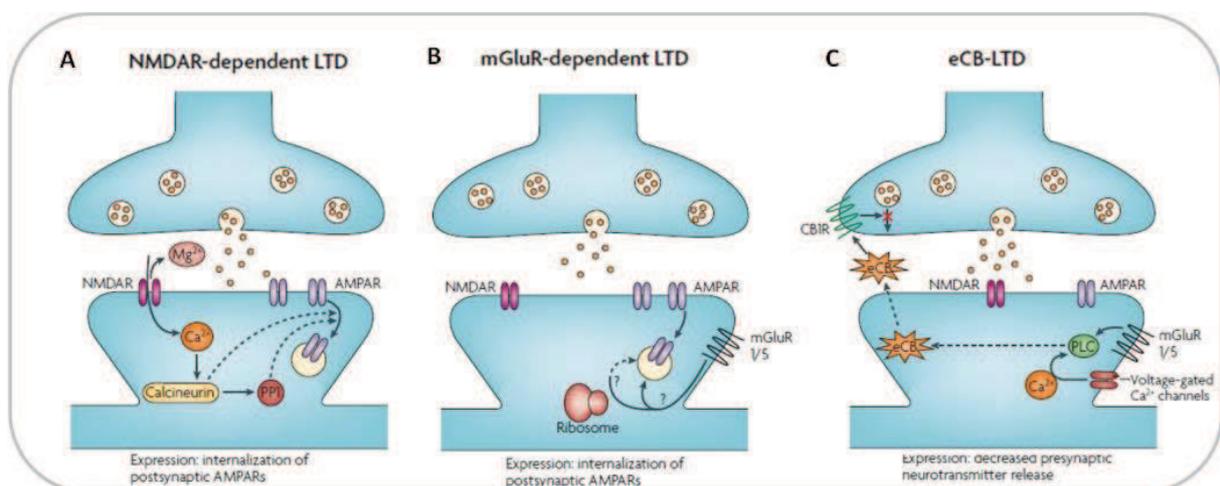


Figure 36. Schéma simplifié de l'induction et l'expression des différentes formes de LTD observées dans le cerveau des rongeurs **A.** La LTD dépendante des NMDA-R. Elle est déclenchée par l'entrée de Ca^{2+} à travers les NMDA-R, induisant l'augmentation de l'activité des protéines phosphatases calcineurine et PP1. Le mécanisme primaire de son expression implique l'internalisation des AMPA-R postsynaptiques et la régulation négative des NMDA-R. **B.** La LTD dépendante des mGluR. L'activation des mGluR1/5 postsynaptiques déclenche l'internalisation des AMPA-R. **C.** La LTD dépendante des endocannabinoïdes. L'activation des mGluR1/5 aboutit à l'activation de la PLC, ainsi qu'à l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire dans le neurone postsynaptique, ce qui initie la synthèse d'endocannabinoïdes (eCB). Les eCB sont alors libérés par le neurone postsynaptique, et agissent de

manière rétrograde en se fixant sur des récepteurs métabotropiques (CB1-R) présynaptiques, aboutissant à la diminution de la libération de glutamate (d'après Kaufer and Malenka, 2008).

Les formes de LTP et LTD présentées ci-dessus sont médiées par des mécanismes impliquant le glutamate lui-même ou les eCB, messagers rétrogrades. La plasticité synaptique peut également être induite de manière trans-synaptique. En effet, les différents systèmes de neuromodulation sont également impliqués dans la plasticité des synapses glutamatergiques. Par exemple, une étude récente a mis en évidence que l'acétylcholine endogène libérée par des stimulations synaptiques serait suffisante pour induire une LTD au niveau des synapses glutamatergiques du CPFm (Caruana et al., 2011). Elle serait induite par stimulation des récepteurs cholinergiques présynaptiques de types muscariniques du groupe M1 couplés à la PLC.

4.3. Bidirectionnalité, coopérativité et plasticité de la plasticité synaptique

Bidirectionnalité

Les synapses sont capables d'exprimer à la fois la LTP ou la LTD.

Ceci est bien illustré par une forme expérimentale de plasticité associative, la STDP (pour Spike Timing Dependant Plasticity). Mise en évidence dans les années 1990, elle correspond à une règle causale cohérente avec le postulat du neuropsychologue canadien, Donald HEBB. A la fin des années 1940, alors qu'il cherche à comprendre les fondements neurophysiologiques de l'apprentissage, Hebb constate que l'apprentissage d'une tâche motrice en réponse à un stimulus augmente avec la répétition de l'action. Il émet alors l'hypothèse que l'apprentissage dépend du changement d'efficacité synaptique au sein des réseaux neuronaux activés par un stimulus. En effet, selon Hebb, deux neurones activés de manière concomitante renforcent leur connexion. En 1973, Gunther STENT étend le postulat de Hebb et propose que si un neurone échoue à faire décharger un autre neurone, alors la connexion entre les deux sera diminuée (Stent, 1973). La théorie de Hebb sera à la base de la STDP vérifiée expérimentalement vingt ans plus tard.

L'évolution de l'efficacité synaptique dépend des dates précises de décharge entre les neurones pré- et postsynaptiques. Il y a potentialisation quand le neurone présynaptique décharge légèrement avant le postsynaptique, et dépression dans le cas opposé (Markram and Tsodyks, 1996; Markram, 1997). Cette règle n'est toutefois pas fixe. En effet, certaines synapses potentialisent « à l'envers », comme par exemple, au niveau des connexions cortico-striatales (Fino and Venance, 2010).

Les mécanismes sur lesquels repose la STDP sont à la fois pré- et postsynaptiques. Les LTP et LTD dépendantes des NMDA-R ainsi que la LTD dépendante des eCB peuvent être induites par la STDP (Dan and Poo, 2006; Fino and Venance, 2010).

L'intensité de la variation de concentration calcique détermine l'orientation LTP ou LTD. En effet, les kinases et phosphates impliquées dans l'expression de ces plasticités ne présentent pas les mêmes sensibilités au Ca^{2+} (Fino and Venance, 2010). Par exemple, la sensibilité calcique de la calcineurine est supérieure à celle de la CaMKII ou de la PKC. Ainsi des

concentrations calciques modérées activent préférentiellement la calcineurine et des concentrations plus fortes, la CaMKII. L'activité de cette dernière est en effet très finement contrôlée par le Ca^{2+} : elle est directement dépendante d'une part du Ca^{2+} , d'autre part, de la calmoduline dont l'activité est elle-même dépendante du Ca^{2+} . De plus, une fois activée, elle possède la capacité de s'autophosphoryler, ce qui lui permet de rester active même après la chute de la concentration calcique (Lisman and Goldring, 1988) (figure 35).

La transition de modification synaptique LTP–LTD est en accord avec la théorie BCM développée dans les années 1980 par Elie BIENENSTOCK, Leon COOPER et Paul MONROE (Bienenstock et al., 1982). Le modèle avait été mis au point pour expliquer la bidirectionnalité des changements de transmission synaptique dépendants de l'activité dans le cortex visuel. Il prédit que la direction et le degré de la plasticité synaptique changent en fonction du patron d'activation synaptique. L'hypothèse avait également été émise que le seuil de modification de la théorie BCM, ou point Θ , n'est pas constant mais régulé par l'activité neuronale antérieure ou concurrente (figure 37).

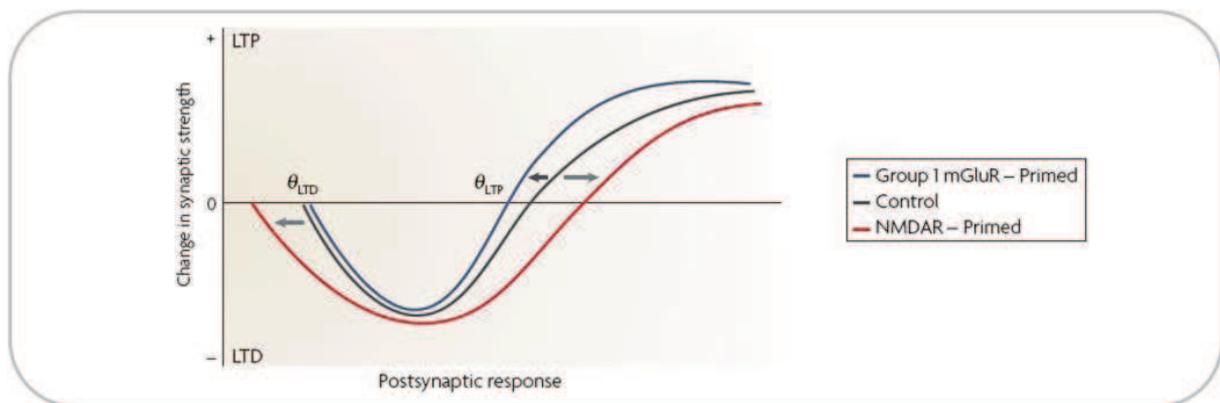


Figure 37. Exemple de métaplasticité médiée par les récepteurs au glutamate. La courbe contrôle (noire) reflète le changement de la force synaptique dans l'hippocampe en réponse à l'activité afférente à différents niveaux de décharge du neurone postsynaptique. Θ_{LTD} et Θ_{LTP} correspondent au seuil de décharge postsynaptique nécessaire pour avoir une LTD ou une LTP suite à la stimulation afférente. Une activation antérieure des NMDA-R diminue le seuil de LTD et augmente le seuil de LTP (rouge, flèche grise). A l'inverse, l'activation de mGluR diminue le seuil de LTP (bleu, flèche noire) (d'après Abraham, 2008).

Coopérativité

Les synapses ne fonctionnent pas de manière indépendante les unes des autres. Une étude dans l'hippocampe utilisant une nouvelle approche expérimentale permettant de stimuler des synapses individuelles (stimulation synaptique optique par « décaillage » de glutamate) a montré que l'induction de la LTP au niveau d'une épine diminuait transitoirement (pendant 10 min) le seuil d'induction de LTP dans le voisinage immédiat ($< 10 \mu\text{m}$). En conséquence, une faible stimulation est alors suffisante pour induire la plasticité fonctionnelle et structurale dans les synapses avoisinantes (Harvey and Svoboda, 2007). Ainsi, l'activité convergente de plusieurs neurones sur un seul facilite le renforcement de ses synapses (Sabatini, 2007).

Métoplasticité

La plasticité synaptique peut elle-même être modulée par l'activité synaptique. Cette forme de plasticité de la plasticité ou plasticité d'ordre supérieur est appelée métoplasticité. Elle se visualise sur le graphe BCM par une modification des seuils d'induction de la LTD ou de la LTP, soit un déplacement du point Θ (figure 37). Elle a lieu quand un événement synaptique ou cellulaire aboutit à un changement persistant dans la direction ou le degré d'une plasticité induite par un patron d'activation synaptique donné (Abraham and Bear, 1996).

Par exemple, l'induction d'une LTP dans l'hippocampe par un tétanus soutenu des collatérales de Schaeffer serait inhibée par une faible stimulation préalable de ces mêmes fibres (Huang et al., 1992). Cet effet serait spécifique de ces afférences, transitoire et médié par les NMDA-R. La CaMKII serait aussi impliquée dans ces changements de plasticité (Mayford et al., 1995; Zhang et al., 2005).

Les phénomènes de coopération synaptique décrits ci-dessus illustreraient le concept de métoplasticité de type hétérosynaptique : l'activité d'un groupe de synapses pourrait affecter la plasticité subséquente d'un groupe de synapses voisines (Sabbatini, 2007 ; Abraham, 2008). Ou encore, comme énoncé précédemment, les divers neuromodulateurs (glutamate, GABA, endocannabinoïdes, acétylcholine, sérotonine, dopamine...) modifieraient les états fonctionnels des synapses en agissant différenciellement sur les compartiments pré- ou postsynaptiques. Ces très nombreux états de plasticité accroissent considérablement la « capacité computationnelle » de chaque synapse, c'est-à-dire la capacité d'augmenter, de diminuer, de filtrer, d'intégrer ou encore de moduler les signaux moléculaires antérogrades et rétrogrades circulant entre ses domaines pré- et postsynaptiques.

4.4. Rôle physiologique de la plasticité à long terme

Il est maintenant largement admis que les processus de plasticité synaptique sont des corrélats cellulaires et moléculaires de la mémoire et de l'apprentissage, ainsi que d'autres formes de plasticités dépendantes de l'activité (Citri and Malenka, 2008). L'apprentissage entraîne des changements durables de l'efficacité synaptique des neurones concernés, qui sont nécessaires à son établissement. En effet, l'inhibition de la plasticité synaptique pendant un apprentissage affecte la mémoire de cet événement.

4.4.1. Plasticité synaptique hippocampique et apprentissage spatial

Dans les années 1970, John O'KEEFE et Lynn NADEL démontrent que l'hippocampe du rongeur contient une véritable carte spatiale de l'environnement dans lequel il évolue (O'Keefe and Nadel, 1978). En effet, certains neurones pyramidaux de la région CA1 s'activent uniquement lorsque le rat se trouve dans une région précise de son environnement. Ces "cellules de lieu", nombreuses dans CA1, permettent de former une carte cognitive très précise capable d'informer continuellement l'animal de l'endroit où il se trouve. De plus, l'exploration d'un nouvel environnement induit la formation d'une nouvelle carte cognitive très stable. Un rôle prépondérant dans la mémoire spatiale est donc attribué

à l'hippocampe. C'est au sein de la boucle trisynaptique de cette structure, présentant une forte propension à la LTP, que la mémoire spatiale semble être encodée. L'inactivation, par des approches pharmacologiques ou géniques ciblant l'hippocampe, de protéines impliquées dans la plasticité synaptique a permis d'observer des corrélations entre ces plasticités hippocampiques et des tâches de mémoire dépendante de l'hippocampe (pour revue : Lynch, 2004). Par exemple, il a été montré que des rongeurs ayant subi une infusion d'antagoniste NMDA-R intra-hippocampe présentaient des altérations de la LTP dans l'hippocampe et des défauts de l'apprentissage spatial (Morris and Frey, 1997). Des résultats similaires ont été obtenus chez des souris déficientes pour la sous-unité NR1 des NMDA-R hippocampiques (Tsien et al., 1996), ou bien chez des souris présentant une mutation de gène codant pour la CaMKII empêchant son autophosphorylation (Kang et al., 2001). Il a également été montré que des mutations géniques (inactivation de la PSD95 ou de la sous-unité $\alpha 1$ des protéines Gi/o) associée cette fois-ci à une augmentation de la LTP dans l'hippocampe induisaient des déficits de mémoire et d'apprentissage spatiaux (Migaud et al., 1998; Pineda et al., 2004).

4.4.2. Plasticité synaptique de l'amygdale et conditionnement de peur

Le conditionnement de peur pavlovien est un type d'apprentissage associatif dont l'induction et le maintien dépendent de l'amygdale (Sigurdsson et al., 2007). L'association temporelle d'un stimulus neutre avec un stimulus nocif (cf. II 4.2) crée une trace mnésique, et induit en conséquence l'apprentissage d'une réponse de peur associée au stimulus neutre. Les informations relatives aux stimuli conditionné et non-conditionné convergent vers noyau latéral de l'amygdale (NLA). De nombreuses études ont confirmé l'hypothèse que la LTP des afférences sensorielles sur le NLA est nécessaire et suffisante pour générer cette trace mnésique (Sigurdsson et al., 2007). La LTP dépendante des NMDA-R peut être induite dans le NLA par stimulation des fibres afférentes corticales et thalamiques.

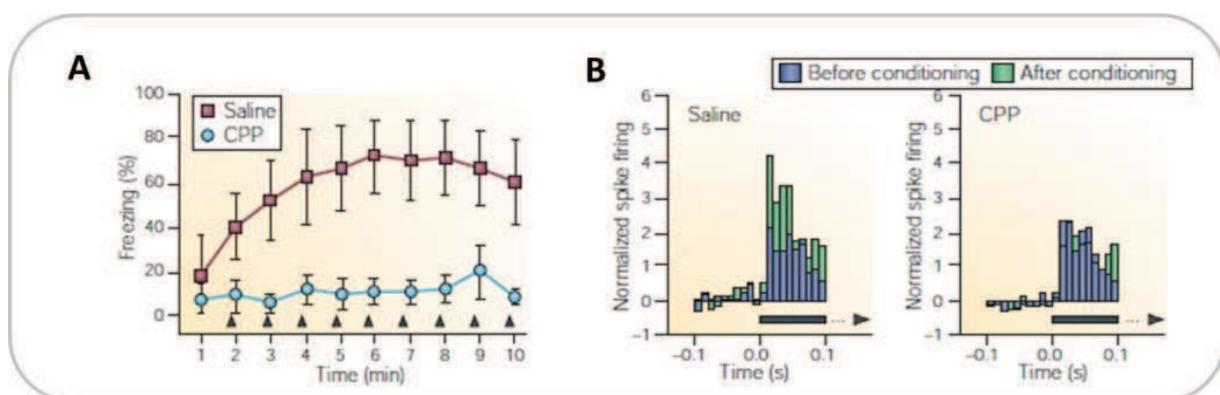


Figure 38. Conditionnement de peur, plasticité associative et NMDA-R dans l'amygdale. L'augmentation de la réponse de peur au cours du conditionnement (A, rouge) est associée à une potentialisation des décharges neuronales de l'amygdale latérale (B, saline) : en effet, la fréquence de décharge induite par le stimulus conditionné est plus élevée après (vert) qu'avant conditionnement (bleu). L'administration systémique d'un antagoniste des NMDA-R, le CPP, bloque la réponse de peur (A, bleu) mais également la potentialisation de décharges neuronales suite au conditionnement (B, CPP) (d'après Maren and Quirk, 2004).

Il a été montré que l'induction du conditionnement de peur entraînait une potentialisation synaptique au sein du NLA, dépendante des NMDA-R (figure 38) (Tsvetkov et al., 2002; Goosens and Maren, 2004). Ceci occlurait une éventuelle induction subséquente de la LTP. Le conditionnement de peur induirait l'insertion de nouveaux AMPA-R au niveau des synapses thalamo-NLA, et le blocage préalable de ces mécanismes d'insertion empêcherait l'acquisition de la peur conditionnée (Rumpel et al., 2005).

De plus, l'extinction de la peur conditionnée, constituant un nouvel apprentissage, s'accompagne d'une séquence « dépression-potentialisation » de l'efficacité synaptique au niveau du CPFm (Herry et al., 1999). La LTP au sein du CPFm serait responsable du maintien de ce nouvel apprentissage (Herry and Garcia, 2002). Le processus d'extinction serait également facilité par le système eCB via son effet inhibiteur sélectif sur les réseaux GABAergiques locaux de l'amygdale (Marsicano et al., 2002).

4.5. Pathologies liées aux plasticités synaptiques : quelques exemples

4.5.1. Plasticité synaptique mésocorticolimbique et addiction

Au cours de ce dernier siècle a émergé une hypothèse majeure : le substrat principal de l'addiction correspondrait à une défaillance des processus de mémoire associative à long-terme des circuits neuronaux mésocorticolimbiques. Les drogues toxicomanogènes usurperaient les mécanismes adaptatifs normaux sous-tendant les apprentissages liés à la récompense. Le site d'action des drogues toxicomanogènes le mieux dévoilé est le système mésolimbique, principalement le Nac, la VTA et le CPF. La transmission glutamatergique au sein de ces structures est un point critique dans la médiation de nombreuses formes de plasticité comportementale à long-terme induite par les drogues (Everitt and Wolf, 2002; Kalivas, 2009). De nombreuses études ont montré qu'il existait une relation entre comportement addictif et plasticité synaptique (Kalivas and O'Brien, 2008; Mamedi and Lüscher, 2011). Par exemple, l'inhibition pharmacologique des NMDA-R bloque la LTP et la LTD dans de nombreuses régions (Malenka and Bear, 2004), mais également les adaptations comportementales associées aux propriétés renforçantes des drogues (Kim et al., 1996). De plus, les drogues toxicomanogènes induiraient l'insertion d'AMPA-R au niveau des neurones dopaminergiques de la VTA, occluant ainsi l'induction de la LTP au niveau des synapses glutamatergiques contactant ces neurones (Kauer and Malenka, 2007). Récemment, l'équipe et ses collaborateurs ont mis en évidence un lien entre plasticité synaptique et développement de l'addiction. La transition d'une consommation de drogue régulière et contrôlée vers l'addiction résulterait d'un défaut persistant de plasticité synaptique dans le Nac (Kasanez et al., 2010). En effet, la LTD glutamatergique dépendante des NMDA-R est défectueuse au sein du Nac de rats s'auto-administrant de manière prolongée la cocaïne. Cette plasticité est récupérée progressivement chez les animaux maintenant un comportement contrôlé de prise de drogue. Cependant, le défaut est persistant chez les animaux qui développent un comportement compulsif de prise de cocaïne (c'est-à-dire ceux qui continuent à s'auto-administrer la drogue en dépit de son association à une punition).

Cette perte de plasticité, ou anaplasticité, reflèterait un défaut d'adaptation cérébrale à l'origine de la perte de contrôle de la prise de drogue : les sujets « addicts » présenteraient une incapacité à contrecarrer les modifications pathologiques induites par les drogues toxicomanogènes.

4.5.2. Plasticité synaptique et dépression

Un concept alternatif à l'hypothèse monoaminergique de la dépression a récemment été proposé pour l'étiologie des désordres dépressifs majeurs (MDD). Il suggère que des dysfonctions de la plasticité cérébrale représenteraient une voie commune sous-tendant les caractéristiques biologiques et cliniques de ces pathologies (Castrén, 2005; Krishnan and Nestler, 2008). Des études récentes ont montré que des changements de la plasticité synaptique et donc de l'activité des réseaux étaient un point critique dans le développement des MDD. La plasticité synaptique serait augmentée dans le système émotionnel et diminuée dans les structures du système exécutif (Nissen et al., 2010). Par exemple, la LTD hippocampique serait facilitée dans un modèle de dépression chez le rongeur, et cette facilitation serait contrecarrée par traitement chronique des animaux avec un antidépresseur (Holderbach et al., 2007). Une étude de la même équipe cette fois-ci chez l'homme a mis en évidence que la LTP corticale induite par stimulation visuelle était diminuée chez les patients dépressifs, et que cet effet était rétabli par application d'un antidépresseur (sertraline) (Normann et al., 2007). Des études précliniques ont indiqué que le système eCB participait au contrôle de l'humeur et des émotions (Lutz, 2009) et était impliqué dans la dépression (Vinod and Hungund, 2006). L'équipe et ses collaborateurs ont montré récemment que chez des rongeurs au régime alimentaire carencé en oméga 3, l'absence de LTD dépendante des eCB au sein du CPF, structure clé dans la régulation des émotions (cf. II.4.2.), pouvait expliquer leurs comportements dépressifs (Lafourcade et al., 2011).

En conclusion, la synapse glutamatergique est une entité morphofonctionnelle plastique remarquablement complexe, hautement structurée et finement régulée, qui assure une communication efficace et adaptable entre les neurones.

En outre, l'activité de synapses excitatrices est contrebalancée par celle des synapses inhibitrices, également douées de plasticité synaptique. L'équilibre subtil entre synapses excitatrices et synapses inhibitrices est un point crucial dans le bon fonctionnement des réseaux neuronaux.

IV. La trisomie 21, une synaptopathie ?

On entend par synaptopathie toute pathologie affectant la synapse, soit toute affection relative aux dysfonctions synaptiques. Ces désordres fonctionnels entraînent une altération de l'organisation et donc de la fonction des circuits neuronaux, pouvant expliquer les phénotypes cognitifs et émotionnels observés dans diverses pathologies.

Comme pour l'addiction ou la dépression (cf. III.4.5), l'hypothèse de l'origine synaptique du retard mental a été avancée au cours de ces dernières années (Vaillend et al., 2008). Les données génétiques, combinées avec des études fonctionnelles, suggèrent que la dérégulation de subtils mécanismes orchestrant l'activité et la plasticité synaptiques sont en jeu dans une variété de retards mentaux. Sachant que le phénotype majeur de la trisomie 21 est le retard mental, et que d'autres désordres cognitifs et émotionnels, comme la dépression, sont retrouvés dans la pathologie, ne pourrait-on pas parler de synaptopathie dans le cadre des déficits cognitifs et émotionnels associés à la trisomie 21 ?

1. Anomalies structurales dans la trisomie 21

Dans la première partie de l'introduction ont été présentées les anomalies des structures cérébrale et neuronale observées chez les patients atteints de trisomie 21 et les différents modèles murins de la maladie. Elles sont résumées schématiquement dans la figure 39.

Les altérations cognitives n'ont pas encore été reliées aux caractéristiques histologiques de la trisomie 21. Il est toutefois difficile de les attribuer à une simple réduction de volume cérébral ou de densité neuronale. En effet, la corrélation entre structure neuronale et différence de taille cérébrale est difficile à établir. De plus, les différents aspects structuraux des neurones comme la taille de l'arborisation dendritique basale, leur structure de branchement ou encore la densité et la morphologie des épines dendritiques peuvent varier indépendamment (Benavides-Piccione et al., 2004) (pour revue sur le CPF : Elston, 2003).

Des études ont émis l'hypothèse que les déficits cognitifs de la trisomie 21 ne seraient pas exclusivement dus à des anomalies neuroanatomiques mais à la diminution du nombre de synapses excitatrices. Comme on l'a vu précédemment (cf. III), les contacts excitateurs synaptiques sur les neurones glutamatergiques sont en grande partie localisés sur les épines dendritiques, ces structures postsynaptiques spécialisées permettant la ségrégation fonctionnelle des afférences individuelles. En conséquence, la densité d'épines est généralement une mesure indirecte du nombre de synapses. Une altération de la morphologie et/ou de la densité des épines dendritiques est souvent associée à un défaut de transmission et/ou de la plasticité synaptique (Calabrese et al., 2006; van Spronsen and Hoogenraad, 2010; Penzes et al., 2011).

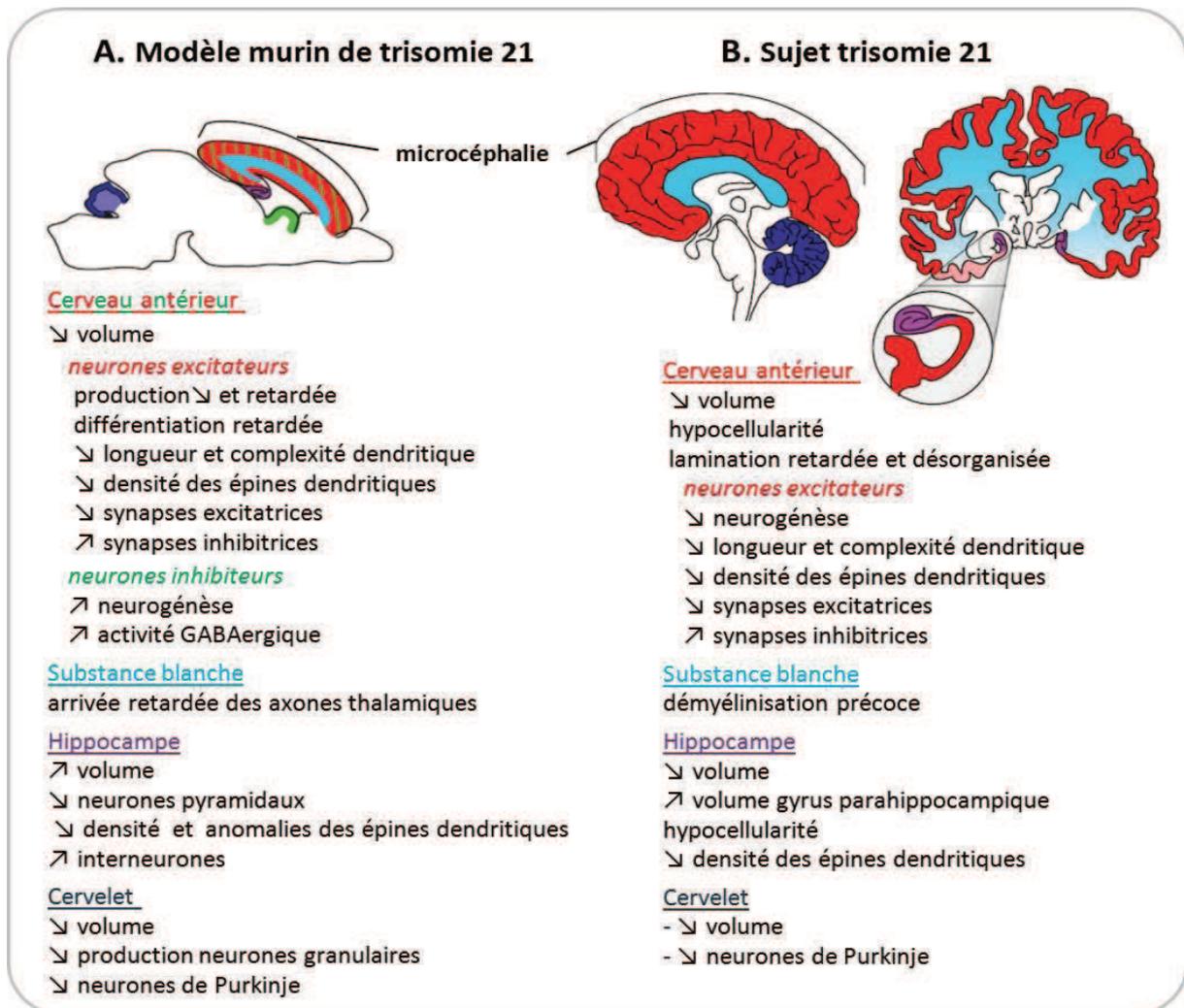


Figure 39. Comparaison des altérations anatomiques observées dans le cerveau de modèles murins et le cerveau de patients trisomie 21. **A.** De nombreux modèles murins de la trisomie 21 présentent un défaut de production des neurones excitateurs et inhibiteurs dans le cerveau antérieur du néocortex (Chakrabarti et al., 2007 ; Haydar et al., 1996), un retard de développement de la substance blanche (Chakrabarti et al., 2007), et des défauts de formation et de maintien des synapses (Chakrabarti et al., 2010). De plus, les interneurons surnuméraires hippocampiques induisent une sur-inhibition des PN (Chakrabarti et al., 2010). Des défauts de prolifération des précurseurs des cellules granulaires aboutissent à une diminution de volume global et de la constitution neuronale du cervelet. **B.** La plupart de ces anomalies expliqueraient les conséquences de trisomie 21 au niveau de la morphologie cérébrale et du comportement de sujets adultes (d'après Haydar and Reeves, 2011).

La plupart des désordres neuropsychiatriques sont accompagnés d'une modification du nombre et/ou des altérations morphologiques des épines (pour revue : Blanpied and Ehlers, 2004; van Spronsen and Hoogenraad, 2010) (figure 40). Par exemple, l'addiction est étroitement associée à des remaniements structuraux (pour revue : Robinson and Kolb, 1999; Mulholland and Chandler, 2007). Il a été notamment reporté une augmentation de la densité et de la largeur des épines du CPF et du striatum après administration chronique de drogues toxicomanogènes (pour revue: Koob, 1997; Robinson and Kolb, 1999; Crombag et al., 2005; Kalivas, 2009). Les états dépressifs sont quant à eux associés à une diminution du nombre des épines (Glantz and Lewis, 2001; Norrholm and Ouimet, 2001).

De plus, bien que les phénotypes spécifiques varient, l'altération du nombre -généralement une diminution- et de la structure des épines dendritiques sont des découvertes communes dans plusieurs types de retard mental comme les troubles du spectre autistique, le syndrome de l'X fragile, le syndrome de Rett, ou encore comme l'a vu précédemment la trisomie 21, suggérant une origine synaptique commune dans de nombreux désordres cognitifs différents (Kaufmann and Moser, 2000; van Spronsen and Hoogenraad, 2010).

Des études fonctionnelles des synapses sont donc nécessaires pour décrypter les mécanismes physiopathologiques sous-tendant les déficits neurocognitifs de la trisomie 21.

2. Dysfonctionnements synaptiques dans les modèles murins de trisomie 21

L'analyse systématique et comparative à l'échelle de la synapse des différents modèles (poly- ou monogéniques) de trisomie 21 permet de révéler les bases synaptiques de la maladie. Les études électrophysiologiques chez ces modèles murins se sont jusqu'à maintenant, principalement focalisées sur l'hippocampe, structure clé dans le système d'apprentissage et de mémoire.

2.1. La transmission glutamatergique

Très peu d'études sur les caractéristiques électrophysiologiques des neurones et la transmission synaptique basale ont été réalisées chez les différents modèles murins de trisomie 21.

2.1.1. Les propriétés neuronales

Une étude sur des cultures de neurones hippocampiques de souris Ts16 n'a révélé aucune modification des propriétés passives, à savoir le potentiel membranaire de repos, la résistance ou encore la capacitance membranaire. Toutefois, ces neurones posséderaient des propriétés actives modifiées: la phase de dépolarisation des potentiels d'action serait plus lente associée à une diminution du courant sodique entrant (*galzicki 1993*). Des études pharmacologiques ont révélé une diminution de la densité de canaux sodiques et une augmentation des canaux calciques de type L (Galdzicki et al., 2001).

Chez les souris Ts65Dn, une étude de 2010 au niveau du striatum ne révèle aucune altération des propriétés basales des neurones épineux principaux et des interneurons cholinergiques (Di Filippo et al., 2010). Les propriétés intrinsèques des neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe ont été étudiées récemment chez ces animaux (Best et al., 2011). Une diminution de la capacitance membranaire et une hyperpolarisation du potentiel membranaire ont été reportées, mais aucun changement de l'excitabilité des neurones.

2.1.2. La transmission synaptique basale excitatrice

Outre les défauts des épines dendritiques cités précédemment, une étude chez les souris Ts65Dn a mise en évidence des défauts de l'ultrastructure synaptique dans le cortex temporal. En effet, elle révèle une diminution du nombre de synapses asymétriques

(synapses glutamatergiques, cf. III) mais pas des synapses symétriques (synapses GABAergiques) ainsi qu'un élargissement des synapses asymétriques. Selon les auteurs, l'augmentation du point de contact synaptique induite par l'élargissement permettrait de compenser le déficit synaptique excitateur (Kurt et al., 2000)

Une autre étude de l'ultrastructure synaptique cette fois-ci dans l'hippocampe de souris Ts65Dn met en évidence une diminution du nombre de synapses, associée à une diminution du volume des épines sans changement du volume de la PSD (Popov et al., 2011).

Une approche protéomique sur des préparations de synaptosomes cérébraux (fractions enrichies en synapses) n'a révélé aucun changement drastique de la composition protéique de la PSD et de la zone active présynaptique (Fernandez et al., 2009).

Les souris Ts65Dn ne présenteraient pas de modification de la transmission basale glutamatergique, mais une augmentation de la transmission inhibitrice (Kleschevnikov et al., 2004).

Toutefois, une étude sur des tranches organotypiques d'hippocampe issues de souris Ts65dn a reporté des altérations synaptiques au sein des connections associatives de CA3 à savoir une réduction de la transmission glutamatergique et une augmentation de la transmission inhibitrice (Hanson et al., 2007).

La transmission synaptique glutamatergique basale et le tonus inhibiteur seraient intacts au sein du gyrus denté des souris Tc1 (O'Doherty et al., 2005).

L'activité spontanée de culture primaire de neurones corticaux issus de souris surexprimant le gène Dyrk1a (mcDNA-TgDyrk1a d'Estivill, Altafaj et al., 2001) a été récemment étudiée par une approche de matrice d'électrodes (MultiElectrode Array, MEA). Une diminution du nombre des décharges a été reportée, reflétant une réduction de l'activité spontanée (Martinez de Lagran et al., 2012).

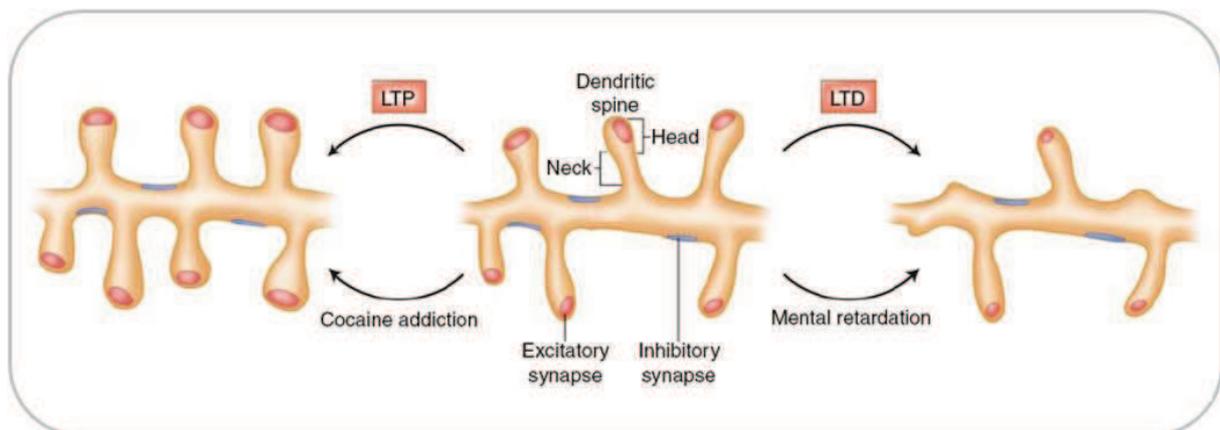


Figure 40. La plasticité structurale des épines dendritiques. Des remaniements morphologiques majeurs des épines dendritiques sont associés à la LTP (à gauche) ou la LTD (à droite). Dans les retards mentaux, les cascades de signalisation intracellulaire mises en jeu sont analogues à celles impliquées dans la LTD, aboutissant à des épines plus fines et immatures. A l'inverse, l'addiction à la cocaïne a des similarités avec la LTP, aboutissant à des épines plus grosses, de forme globuleuse, et matures. Les changements synaptiques moléculaires et morphologiques sont une caractéristique commune des pathologies et sont responsables des altérations cognitives des maladies neuropsychiatriques (d'après van Spronsen and Hoogenraad, 2010).

2.2. La plasticité synaptique glutamatergique

Patients trisomie 21

Une étude par stimulation magnétique transcrânienne a été réalisée sur des sujets adolescents atteints de trisomie 21. Elle a mis en évidence par un paradigme basé sur des paires de stimulations associatives que les patients présentaient au niveau du cortex moteur primaire une excitabilité corticale normale mais un défaut de potentialisation à long terme dépendante des NMDA-R (Battaglia et al., 2008).

Le modèle Tc1

La potentialisation à long terme serait réduite au sein du gyrus denté du modèle Tc1 (O'Doherty et al., 2005).

Le modèle Ts65dn

C'est le modèle qui a été le mieux caractérisé d'un point de vue électrophysiologique.

On a vu précédemment que ce modèle présentait des déficits hippocampiques marqués, notamment au niveau de la mémoire spatiale (cf. I).

Au niveau de la région CA1 de l'hippocampe, un défaut d'induction et de maintien de la LTP a été reporté (Siarey et al., 1997) ainsi qu'une augmentation de la LTD (Siarey et al., 1999). Les défauts de la LTP hippocampique seraient associés à une altération des protéines impliquées dans la plasticité synaptique comme la CaMKII, ERK, la PKA ou encore la PKC (Siarey et al., 2006).

Ces souris présenteraient une absence de LTP au sein du gyrus denté, bien que la transmission synaptique glutamatergique basale n'y soit pas affectée. Ceci résulterait d'un défaut d'activation des NMDA-R. Les auteurs ont ensuite montré que l'application d'un antagoniste des récepteurs ionotropiques au GABA (GABA-A) impliqués dans la transmission inhibitrice rapide permettait de palier le défaut NMDA-R et de restaurer une LTP normale chez ces animaux. Ils constatèrent également que la transmission inhibitrice était améliorée au sein de cette structure. Ceci leur a permis de conclure que, au sein du gyrus denté des Ts65Dn, les voies impliquées dans les mécanismes de plasticité synaptique ne seraient pas altérées et que le défaut de LTP observé serait principalement dû à l'augmentation de l'inhibition (Kleschevnikov et al., 2004) (figure 41).

L'étude de Hanson 2007 sur des cultures organotypiques d'hippocampe au sein CA3, a également montré que la machinerie de la LTP ne serait pas altérée chez les Ts65Dn. En effet, ils ne reportent pas de défaut de LTP dans leur système expérimental leur permettant d'activer directement un neurone présynaptique s'affranchissant ainsi de la transmission inhibitrice (Hanson et al., 2007).

Une hypothèse expliquant ce déficit est qu'il y aurait un décalage du ratio excitation/inhibition de la transmission synaptique évoquée suite à une stimulation électrique. Ceci serait dû à la diminution de la production des neurones pyramidaux et donc à la diminution du ratio neurones excitateurs/neurones inhibiteurs. Le recrutement

préférentiel de l'inhibition synaptique limiterait au niveau des neurones postsynaptiques la dépolarisation (réduction de l'activation des NMDA-R) requise pour l'induction de la LTP. Une étude subséquente propose pour la première fois une stratégie thérapeutique intéressante pour corriger les défauts synaptiques et comportementaux observés chez les souris Ts65Dn. Elle est basée sur l'administration systémique chronique d'antagonistes des récepteurs GABA-A. Ce traitement permettrait de restaurer chez ces animaux d'une part les défauts de plasticité observés au sein du gyrus denté, et d'autre part leurs capacités cognitives (Fernandez et al., 2007). L'usage de ces composés comme traitement clinique est toutefois limité par leurs propriétés épiléptogéniques.

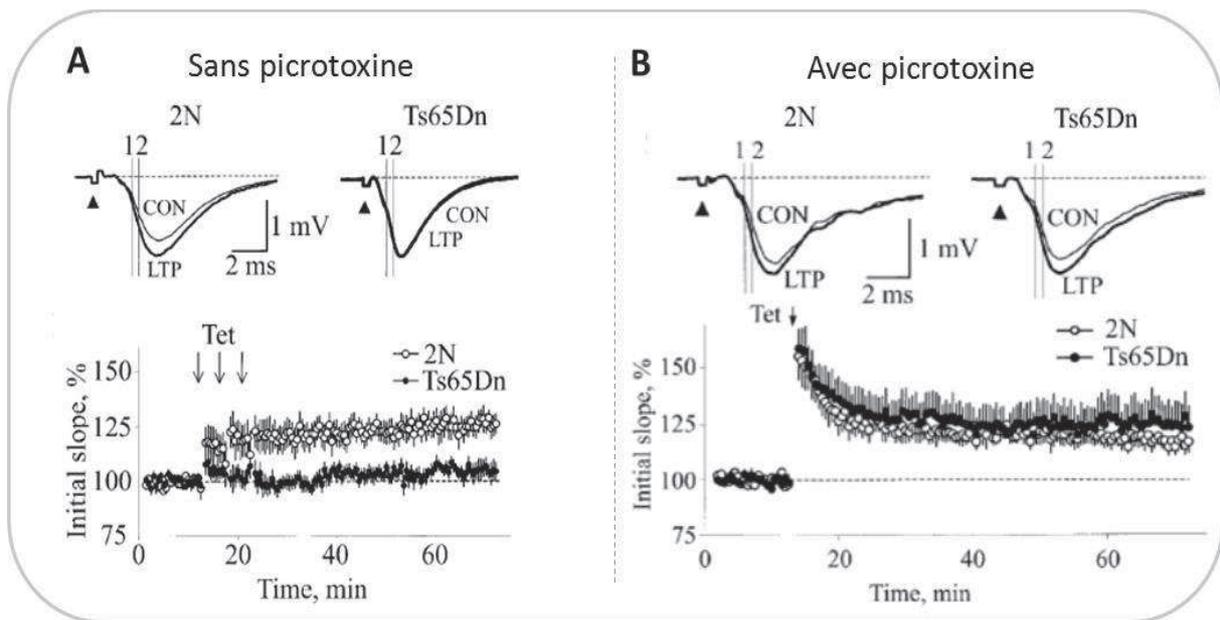


Figure 41. L'absence de LTP dans le gyrus denté des souris Ts65Dn est restaurée après blocage de la transmission GABAergique. A. Les traces représentent des potentiels de champ postsynaptiques excitateurs enregistrés dans les souris contrôles (gauche) et les souris Ts65Dn (droite) avant (CON pour contrôle) et 50 minutes après stimulation tétanique (LTP). La stimulation tétanique (flèche) induit une LTP dans le gyrus denté de souris contrôles (2N) qui est absente chez les souris Ts65Dn. B. Avec application de picrotoxine, un antagoniste des récepteurs GABA-A, la LTP induite par stimulation tétanique (flèche) est normale chez les souris Ts65Dn (d'après Kleschevnikov et al., 2004).

Il a également été montré qu'au niveau du striatum des souris Ts65Dn, les plasticités synaptiques étaient intactes dans les neurones épineux, mais que la LTP était absente dans les interneurons (Di Filippo et al., 2010).

Une étude récente a mis en évidence une augmentation de la LTD dépendante des NMDA-R dans la région hippocampique CA1, qui pouvait être normalisée par une incubation préalable des tranches avec un antagoniste des NMDA-R, la mémantine (Scott-McKean and Costa, 2011).

Les modèles Ts1Cje et Ts1Rhr

Comme pour les souris Ts65Dn, le modèle Ts1Cje manifeste au sein de la région CA1 de l'hippocampe une réduction de la LTP et une augmentation de la LTD, mais également un défaut de plasticité à court terme (Siarey et al., 2005).

Comme pour les souris Ts65Dn, le groupe de William Mobley a mis en évidence que la LTP au sein du gyrus denté pouvait être induite en présence d'inhibiteur de la transmission GABA (Belichenko et al., 2007b). Ils ont mis en évidence les mêmes phénomènes chez les souris Ts1rhR (Belichenko et al., 2009).

Les modèles monogéniques surexprimant Dyrk1a

Seulement deux études électrophysiologiques ont été réalisées sur des modèles murins surexprimant Dyrk1a.

Le modèle YAC152F7, surexprimant cinq gènes dont Dyrk1a, ne présenterait pas de modification de la LTP hippocampique (Smith et al., 1997).

Une étude de 2001 a révélé des défauts de plasticité synaptique dans la région CA1 de l'hippocampe du modèle hBAC-TgDyrk1a, à savoir une meilleure induction de la LTP et une diminution de l'induction de la LTD (Ahn et al., 2006).

Des désordres synaptiques ont donc été observés chez les modèles étudiés, suggérant un défaut fonctionnel de la synapse dans la trisomie 21.

La compréhension des mécanismes physiopathologiques est la première étape indispensable avant d'aborder toute approche thérapeutique.

3. Trisomie 21, synapse et cortex préfrontal

Aucune étude électrophysiologique n'a été menée au niveau du CPF de ces différents modèles murins de trisomie 21. Pourtant, comme on l'a vu en II, cette structure a un rôle central dans les fonctions cognitives supérieures mais également dans le contrôle émotionnel, deux composantes affectées dans la trisomie 21. En effet, le retard mental et les désordres de l'humeur comme les troubles dépressifs et les troubles obsessionnels compulsifs sont des caractéristiques communes chez les individus atteints de trisomie 21 (Altafaj et al., 2001; Walker et al., 2011).

Des dysfonctions préfrontales ont été évoquées dans la pathologie mais aucune étude ne les a, à ce jour, mises en évidence (Nadel, 2003).

V. Problématique et objectifs

La thématique générale du laboratoire est centrée sur le « décryptage » de la plasticité synaptique dans les pathologies cérébrales, l'objectif spécifique étant de démêler les dysfonctionnements synaptiques et de proposer de nouvelles approches thérapeutiques pour les synaptopathies. Suivant l'exemple de la théorie de mGluR dans le syndrome de l'X fragile (Dölen and Bear, 2008), on peut envisager identifier dans la trisomie 21 des altérations synaptiques, d'en déterminer les causes, et de proposer des cibles puis des nouvelles approches thérapeutiques.

Des dysfonctions synaptiques spécifiquement au sein du CPF sont-elles associées à la trisomie 21 ?

L'utilisation des modèles murins de référence est un premier pas pour dévoiler les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la maladie, en connectant les causes génétiques aux processus qui établissent et/ou modifient la fonction des circuits neuronaux. Le gène *Dyrk1a* est un candidat majeur dans les symptômes cognitifs de la pathologie (cf. **1.3**). Le modèle murin mBACtgDyrk1a récemment développé par l'équipe du Docteur Delabar est généré à partir d'un transgène *Dyrk1a* murin sous le contrôle de son propre promoteur (Guedj et al., 2012). Ceci permet l'expression contrôlée de manière endogène d'une seule copie supplémentaire du gène *Dyrk1a*, mimant ainsi le dosage génique *Dyrk1a* retrouvé dans la trisomie 21.

Les souris Ts65Dn sont à l'heure actuelle le modèle murin de référence pour l'étude de la trisomie 21, car ces animaux possèdent la plupart des caractéristiques phénotypiques retrouvées dans la maladie.

La caractérisation électrophysiologique des modèles mBACtgDyrk1a et Ts65Dn s'est limitée d'une part localement à l'hippocampe et d'autre part spécifiquement à certaines formes de plasticité synaptique.

Les objectifs principaux de ma thèse ont été :

- 1) d'identifier l'effet de la surexpression de *Dyrk1a* sur le fonctionnement et la plasticité des circuits neuronaux glutamatergiques au sein du CPF de souris mBACtgDyrk1a afin d'établir un lien entre ce gène candidat et les déficits cognitifs de la trisomie 21.
- 2) de tester des approches thérapeutiques, notamment une stratégie correctrice basée sur l'inhibition par l'EGCG de l'activité enzymatique de la protéine *Dyrk1a*, pour pallier les éventuels défauts synaptiques observés chez les souris mBACtgDyrk1a.
- 3) d'étudier sommairement les circuits neuronaux glutamatergiques au sein du CPF du modèle murin Ts65Dn.

Pour cela, un état des lieux morphofonctionnel de la transmission synaptique glutamatergique au sein des couches V/VI du CPF du modèle mBACtgDyrk1a et du modèle Ts65Dn a été établi, à savoir la caractérisation :

- des propriétés intrinsèques des neurones.
- de la densité et la morphologie des épines dendritiques.

- de la transmission basale glutamatergique.
- des différentes formes de plasticité synaptique expérimentale.

Les résultats sont présentés dans la partie suivante sous la forme:

1. d'un premier article, soumis pour publication et en révision, relatif au 1) et au 2).
2. d'un deuxième article en préparation concernant au 1) et au 2).
3. de données préliminaires et non publiées concernant le 3).
4. d'une publication dans le cadre d'une collaboration avec le groupe de Nephi Stella, Seattle, University of Washington, en rapport avec le 2).

La présentation de chaque étude sera suivie d'une courte discussion.

Une conclusion générale finale permettra de remettre ces travaux dans contexte plus global.

RESULTATS

1. Etude 1: “Green tea rescues prefrontal deficits in a mouse model of Down syndrome”.

En preparation, Molecular Psychiatry

1.1. Contexte de l'étude

Le gène *Dyrk1a* code pour une sérine-thréonine kinase, DYRK1A, fortement impliquée dans le développement cérébral et les fonctions synaptiques. C'est un gène candidat majeur dans le développement des déficits neurocognitifs associés à la trisomie 21 (cf. Introduction I.3.).

Ce gène est surexprimé chez les patients atteints de trisomie 21 et dans la majorité des modèles murins polygéniques de la maladie. Toutefois les conséquences spécifiques de la présence d'une copie supplémentaire de *Dyrk1a* dans l'activité synaptique demeurent inconnues. Un nouveau modèle murin de surexpression de *Dyrk1a* a récemment été développé par l'équipe du docteur Jean-Maurice Delabar. Il contient le gène *Dyrk1a* murin sous contrôle de son propre promoteur, mimant ainsi le dosage génique *Dyrk1a* retrouvé dans la trisomie 21 (cf. introduction I.4.4.5 ; Guedj et al., 2012).

Le CPF est une structure clé dans les fonctions exécutives et la régulation des fonctions émotionnelles, de ce fait son implication est fortement suspectée dans la manifestation de ces symptômes (cf. Introduction IV.3.). Il serait donc intéressant d'étudier le fonctionnement synaptique de cette structure dans le modèle monogénique mBACtg*Dyrk1a*.

L'activité de la protéine DYRK1A est inhibée par l'EGCG, polyphénol contenu naturellement dans le thé vert (cf. Introduction I.3.4.1). L'équipe du Docteur Jean-Maurice Delabar a mis en évidence qu'un traitement du modèle 152F7 surexprimant cinq gènes dont *Dyrk1a* permettait de restaurer leurs défauts cognitifs, conférant ainsi au thé vert un potentiel thérapeutique intéressant.

1.2. But de l'étude et approches expérimentales

Dans cette étude, nous avons cherché à savoir :

- 1- dans quelle mesure la surexpression de *Dyrk1a* affectait une fonction cognitive dépendante du CPF, la mémoire de travail, ainsi que l'activité synaptique préfrontale en relation.
- 2- si l'inhibition de l'activité de l'enzyme par le thé vert riche en EGCG restaurait les paramètres affectés chez les mBACtg*Dyrk1a*.

Pour cela, nous avons combiné des approches :

- d'électrophysiologie ex-vivo (étude sur des tranches de cerveau contenant le CPF)
- d'imagerie confocale

à des techniques, dans le cadre de collaboration avec des équipes parisiennes :

- biochimiques, Jean-Maurice Delabar (BFA, CNRS EAC 4413)
- comportementales, Benoit Delatour (CRICM, UMPC, INSERM UMR S975, CNRS UMR 7225)

La mémoire de travail a été évaluée par un test d'alternance spontanée dans le labyrinthe en Y. Les taux cellulaires de protéines impliquées dans l'activité synaptique ont été déterminés par immunoblot (western ou dot blot). La quantification des épines dendritiques a été estimée après reconstruction tridimensionnelle des dendrites obliques des neurones pyramidaux à partir d'image obtenue par microscopie confocale.

L'activité neuronale au sein des couches V/VI du CPF a été étudiée par des enregistrements électrophysiologiques en patch-clamp pour la réponse synaptique de neurone unique et extracellulaires pour l'activité de populations neuronales. Les propriétés intrinsèques des neurones pyramidaux ont été examinées par des expériences en patch-clamp, mode « courant imposé ». La transmission glutamatergique basale a été étudiée majoritairement par des enregistrements en patch-clamp mode « potentiel imposé » des courants postsynaptiques excitateurs spontanés et évoqués de neurones pyramidaux. La potentialisation à long-terme dépendante des NMDA-R de la réponse synaptique a été mesurée par étude des champs de potentiel postsynaptique excitateurs enregistrés au sein des couches V/VI en réponse à un protocole d'induction classique de type stimulation « theta burst » (TBS, cinq trains composés chacun de quatre stimulations à 100 Hertz espacées d'un intervalle de 200 millisecondes, le tout répété quatre fois à 10 secondes d'intervalle).

Un traitement à l'extrait de thé vert a été effectué sur les souris contrôles et mBACtgDyrk1a. Il consiste en un mois de prise par les animaux adultes d'un extrait de thé vert décaféiné dilué dans l'eau de boisson.

1.3. Résultats

Dans une première partie de l'étude, nous avons montré que la surexpression de Dyrk1a induisait :

- un défaut de mémoire de travail, faculté dépendante du CPF.
- un défaut de LTP dépendante des NMDA-R.
- une augmentation substantielle de la densité des épines présentes au niveau des dendrites obliques.
- aucun changement des propriétés intrinsèques des neurones pyramidaux.
- aucune modification de la transmission excitatrice basale au sein du CPF.

D'autre part, nous avons mis en évidence qu'un traitement chronique à l'extrait de thé vert enrichi en EGCG permettait de normaliser les paramètres biochimiques, comportementaux, morphologiques et électrophysiologiques affectés chez les souris mBACtgDyrk1a, soit :

- la mémoire de travail.
- la LTP dépendante des NMDA-R.
- la densité des épines dendritiques des neurones pyramidaux du CPF.
- la quantité de CAMKII phosphorylée du CPF.

Green tea rescues prefrontal deficits in a mouse model of Down syndrome

Aurore Thomazeau^{1,2,3}, Zsuzsa Penke⁴, Olivier Lassalle^{1,2,3}, Benoit Souchet⁵, Jillian lafrati^{1,2,3}, Fayçal Guedj⁵, Nathalie Janel⁵, Pascale Chavis^{1,2,3}, Jean Delabar⁵, Benoit Delatour⁴, and Olivier J. Manzoni^{1,2,3}

¹INSERM U901, Marseille, 13009, France.

²Université de la Méditerranée UMR S901 Aix-Marseille 2, France.

³INMED, Marseille, 13009, France.

⁴CRICM, UPMC/INSERM UMR-S 975 - CNRS UMR 7225, Paris, France.

⁵ Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Adaptive Functional Biology, EAC CNRS 4413, 75205, Paris, France.

Author contributions: A.T., J.D., B.D., P.C., Z.P., N.J. and O.J.M. designed research; A.T., Z.P., J.I., B.S., F.G. and O.L. performed research; A.T., Z.P.V., J.I., O.L. and B.D. analyzed data; and A.T., J.D., B.D., P.C. and O.J.M. wrote the paper; O.J.M. supervised the entire project.

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments: This work was supported by INSERM, CNRS, ANR “DsTher” (J.D., B.D., & O.J.M.), Fondation Jérôme Lejeune (O.J.M. & J.D.) and Fondation pour la Recherche Médicale (A.T. & O.J.M.).

Summary

The synaptic basis for the prefrontal dysfunction, including working memory deficits, reported in Down syndrome (DS) patient remains unknown. Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A (*Dyrk1a*) localizes in the DS critical region of chromosome 21 and is a major candidate for DS-associated cognitive deficit. How the *Dyrk1a* gene influences prefrontal cortex-dependent behavior and synapses is unknown. Here we report that spontaneous alternation in a Y-maze is impaired in mBACtgDyrk1a transgenic mice expressing an extra copy of *Dyrk1a*. Diminished working memory correlates with alteration of dendritic spine density, synaptic protein levels and long-term potentiation in prefrontal cortex pyramidal neurons. Administration of green tea extracts containing epigallocatechin gallate, a potent DYRK1A inhibitor, to adult mBACtgDyrk1a mice normalizes their behavioral, synaptic and morphological deficits. Our data shed light on previously undisclosed partial DS endophenotypes and identify green tea extract as a viable therapeutic strategy to correct synaptic and behavioral deficits of the disease.

Down syndrome (DS), the most common form of intellectual disability, is a chromosomal disorder resulting from the presence of all or part of an extra Chromosome 21. Localized in the Down syndrome critical region of chromosome 21q22.2¹, the gene *Dyrk1a* is overexpressed in DS and is the ortholog of *Drosophila* minibrain². As a member of the dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase family, DYRK1A phosphorylates numerous proteins, including transcription factors and is thought to control cell proliferation and to contribute to brain development^{3,4}. DYRK1A that normally interacts with the REST/NRSF chromatin-remodeling complex controls over two hundred genes⁵ and its overexpression has a wide impact on multiple signaling pathways. Thus, converging evidence indicates that *Dyrk1a* is a strong candidate gene for the learning and neuronal abnormalities associated with DS^{3,4}.

Neuropsychological evaluation of subjects with DS has evidenced hippocampal dysfunction⁶ as well as impairments of executive functions⁷ indicative of altered functions of the prefrontal cortex (PFC). The PFC is essential to working memory that underlies the capability to hold information online. This cortical brain region also plays a key role in reasoning, planning and emotionally guided behaviors⁸⁻¹⁰. PFC malfunctions are a common denominator in several neuropsychiatric diseases of environmental or genetic origin¹¹. However, the exact contribution of PFC dysfunction to DS and in particular the synaptic basis for the working memory defects reported in DS patients^{6,7} remains obscure. In this context, how an additional copy of the *Dyrk1a* gene influences PFC-dependent behavior and synapses is still unknown.

In the present study, we evaluated PFC-dependent behavior, biochemical synaptic markers, excitatory synaptic plasticity and dendritic morphology in pyramidal PFC neurons of adult mBACtgDyrk1a mice, a model of DS overexpressing *Dyrk1a* under the control of its own regulatory sequences³. Our new data uncover synaptic abnormalities in the prelimbic PFC of mBACtgDyrk1a mice, a prefrontal area involved in working memory and action planning¹². These anomalies are associated with memory impairments and hence may underlie part of the multiple cognitive and behavioral deficits described in DS. Furthermore, our results indicate that in vivo inhibition of DYRK1A function in adults using green tea extracts containing high

levels of epigallocatechin gallate, a natural inhibitor of DYRK1A¹³, could alleviate some neuromorphological and cognitive impairments associated to the DS condition.

Results

We first quantified DYRK1A brain protein levels in mBACtgDyrk1a mice. As expected from the expression of an additional copy of the gene³, we found that there was about 50% more DYRK1A in mBACtgDyrk1a than wild type congeners (**Sup. Fig. 1**).

Impaired working memory in mBACtgDyrk1a mice.

The PFC is essential to the temporary storage and the recall of information over a short time period, a general process known as working memory^{9, 14, 15}. Lesion experiments have shown that the prelimbic area of the PFC is critically involved in working memory^{8, 9}, assessed for instance in spatial alternation designs^{16, 17}. Importantly, impaired spatial alternation performance has already been reported in other DS mice models¹⁸. We therefore used a spontaneous alternation paradigm in a Y-maze to assess the effects of *Dyrk1a* overexpression on short-term PFC-dependent spatial working memory¹⁹. We found that the rate of spontaneous alternation (visiting each arm in turn) was affected in mBACtgDyrk1a mice: they alternated less than wild type mice ($p < 0.0005$, **Fig. 1A**). Noteworthy, exploratory activity in the Y-maze was also affected by *Dyrk1a* overexpression: the total number of arm entries was higher in mBACtgDyrk1a mice compared with wild type animals (44.50 ± 4.04 , $n = 8$ wild-type versus 62.00 ± 3.24 , $n = 7$ mBACtgDyrk1a; * $p = 0.0174$, Mann-Whitney U test).

The present finding extends previous reports of hippocampus-related memory deficits and alteration of hippocampal synaptic plasticity in animal models of DS^{3, 13, 20} by showing that similar anomalies appear in a task that is dependent of the PFC, a structure fundamental to higher cognitive functions. These results are consistent with the idea that mBACtgDyrk1a mice have an impaired working memory.

Based on the prevalence of structural and functional synaptic anomalies in intellectual disabilities, we next searched for the synaptic and morphological correlates of working memory deficits in mBACtgDyrk1a mice.

Synaptic potentiation is impaired in mBACtgDyrk1a mice.

Activity- and N-methyl-D-Aspartate receptor (NMDAR)-dependent long-term potentiation (LTP) is probably the most widely expressed and extensively studied

form of synaptic plasticity in the CNS. LTP can be induced in rat PFC layers V/VI following stimulation of layers II/III²¹⁻²³. Specifically, theta burst stimulation (TBS) of these pyramidal synapses in the PFC induces NMDAR-dependent LTP²¹⁻²³. Accordingly, we confirmed that TBS induced LTP of extracellular field excitatory postsynaptic potentials (fEPSP) in deep layer pyramidal synapses in prelimbic PFC slices prepared from adult wild type mice. The TBS-LTP was completely prevented by the NMDAR antagonist D-AP5 (50 μ M, not shown, 99.62 ± 0.30 , $n = 6$, wild type baseline versus 87.95 ± 7.19 $n = 6$, wild type 25-30; $P > 0.05$, Mann-Whitney U-test) confirming that it depends on NMDAR activation.

To test the hypothesis that the expression of an additional copy of the *Dyrk1a* gene affects the ability of pyramidal PFC synapses to express LTP, we compared TBS-induced LTP in slices prepared from wild type mice and mBACtgDyrk1a littermates. We found that this key form of synaptic plasticity was totally ablated in mBACtgDyrk1a mice (**Fig. 1B-C**). Although post-tetanus potentiation was observed in both genotypes (compare the first 3 minutes post-TBS, **Fig. 1B-C**), the fEPSP rapidly returned to baseline levels in mBACtgDyrk1a mice but remained stably enhanced for the duration of the recording in wild type mice. Cumulative probability distribution plot of the normalized fEPSP 30 minutes after LTP induction further shows that LTP was never observed in mBACtgDyrk1a (**Fig. 1D**). Together these data reveal that the ability to maintain LTP is impaired in mBACtgDyrk1a mice.

Pyramidal neuron spine density is augmented in mBACtgDyrk1a mice.

Alteration of neuronal morphology - in particular dendritic arborization and/or spine anomalies - is common in neuropsychiatric diseases, and constitutes a core feature of intellectual disability²⁴. Synaptic transmission and plasticity malfunctions often correlate with morphological alterations, especially at the level of dendritic spines, the loci of excitatory synaptic transmission²⁴.

In support of a role of DYRK1A in dendritic morphology, a reduction of neocortical spine density of principal neurons from the superficial layers of the M2 motor cortex has been reported in both *Dyrk1a* haploinsufficient and *Dyrk1a* overexpressing mice²⁵⁻²⁷. However, in spite of the obvious importance of the PFC in cognitive functions, the effect of an additional copy of the *Dyrk1a* gene on PFC pyramidal neuron spines has never been evaluated.

We compared dendritic spine density and morphology in mBACtgDyrk1a mice and their wild type littermates. We performed a three-dimensional reconstruction following confocal imaging of deep layer PFC pyramidal neurons that were filled with neurobiotin during the electrophysiological recordings described below. Quantitative spine analysis was performed on oblique dendrites because they form the principal target of excitatory synapses impinging on layer V/VI PFC pyramidal neurons. There was a sizeable augmentation of spine density in mBACtgDyrk1a mice (**Fig. 2A-B**). Indeed, expression of an additional copy of the *Dyrk1a* gene almost doubled spine density in pyramidal PFC neurons (0.76 ± 0.07 spine/ μm , $n = 8$ cells from 5 wild-type versus 1.41 ± 0.10 spine/ μm , $n = 10$ cells from 6 mBACtgDyrk1a; *** $P = 0.003$, Mann-Whitney U-test). Neither the spine head size (**Fig. 2C**) nor the average spine length (**Fig. 2D**) were altered in mBACtgDyrk1a mice, suggesting that *Dyrk1a* overexpression specifically impacted on spine density and arguing against the possibility that the “extra” spines are immature. In search of a biochemical correlate of the augmented spine density in mBACtgDyrk1a mice, we quantified the levels of PSD-95, an essential postsynaptic scaffolding protein highly expressed in excitatory spines that allows the clustering and anchoring of numerous essential synaptic proteins²⁸. Supporting our spine density results, we found that PSD-95 protein levels were augmented in PFC extracts from mBACtgDyrk1a mice (100.00 ± 6.53 , $n = 11$ wild type, black bar, versus 122.82 ± 5.44 , $n = 10$ BACtgDyrk1a, white bar; * $P = 0.0378$, Mann-Whitney U-test, see also **Fig. 5D**).

Intrinsic and synaptic properties of PFC pyramidal neurons are normal but the pCAMKII/CAMKII ratio is reduced in mBACtgDyrk1a mice.

We subsequently examined whether altered pyramidal neuron spine density in the PFC of mBACtgDyrk1a and LTP were accompanied by alterations of the intrinsic properties of layers V/VI pyramidal neurons. Independently of their genotypes, all recorded pyramidal neurons showed similar membrane responses profiles in response to a series of somatic current steps (**Fig. 3A**) and a strong inward rectification, shown as a shift from linearity in the I-V plots (**Fig. 3B**). The resting membrane potentials (**Fig. 3C**), the rheobases (i.e. the minimal current necessary to evoke action potential firing, (**Fig. 3D**), and the number of action potentials induced in response to somatic current steps (**Fig. 3E**), were similar in pyramidal neurons

sampled in wild type and mBACtgDyrk1a mice. Thus, the overexpression of *Dyrk1a* did not impact on the intrinsic properties of PFC pyramidal neurons.

Next, we evaluated if alterations of basic synaptic properties paralleled those in spine density that we observed in mBACtgDyrk1a PFC synapses. We first measured if the augmented spine density resulted in changes in the synaptic quantal size of AMPAR transmission or in the probability of spontaneous transmitter release. To test these possibilities, AMPAR sEPSCs were isolated in pyramidal neurons voltage clamped at -70 mV. The frequency of spontaneous events was similar in the two genotypes suggesting that basal release probability was not modified by *Dyrk1a* overexpression (**Fig. 4A**). Similarly, the amplitude of AMPAR sEPSCs was undistinguishable in slices from wild type and mBACtgDyrk1a mice (**Fig. 4B**). Second, input/output relationships were similar in wild type and mBACtgDyrk1a mice, suggesting that excitability of PFC glutamatergic synapses was unaltered in mBACtgDyrk1a mice (**Fig. 4C**). To test if the LTP impairment is due a presynaptic modification in the probability of glutamate release in mBACtgDyrk1a mice we used a powerful assay relying on the progressive inhibition of NMDAR-mediated EPSCs by an open-channel blocker of NMDAR upon successive synaptic stimulations (see methods, ^{29, 30}). The results show that the release probability at excitatory synapses impinging onto layer V/VI pyramidal neurons is identical in wild type and in mBACtgDyrk1a mice (**Fig. 4D**). The relative contribution of AMPAR and NMDAR to excitatory synaptic currents is an indicator of synaptic plasticity ^{31, 32}. We measured the ratio between AMPAR- and NMDAR-evoked EPSCs and found that this index was indistinguishable between the two groups of mice, suggesting that expression of an additional copy of *Dyrk1a* did not alter the overall gain of PFC excitatory synapses (**Fig. 4E**). Because it was recently suggested that GluN2B subunit of the NMDAR is critical for LTP in the PFC and PFC-related working memory ³³, we also evaluated the relative contribution of GluN2B subunit to the NMDAR-EPSC in our two genotypes. To this aim, we measured the fraction of the total NMDAR-EPSC that is sensitive to ifenprodil, a selective antagonist of GluN2B-containing NMDAR. The effects of ifenprodil were similar in wild type and mBACtgDyrk1a littermates (**Sup. Fig. 2**). Thus, changes in the fraction of GluN2B-containing NMDAR at PFC synapses are unlikely to underlie the lack of LTP that characterizes mBACtgDyrk1a mice.

Finally, as kinases play a critical role in the induction and the maintenance of LTP we assessed the level of phosphorylation of CAMKII (T286). The pCAMKII/CAMKII ratio

was markedly decreased in mBACtgDyrk1a mice (**Fig. 4F**). Thus while our physiological experiments suggest that the lack of LTP in the PFC of mBACtgDyrk1a mice cannot readily be explained by modifications of the basic synaptic properties, of the release probability or of the NMDAR subunit composition of PFC pyramidal synapses, these data provide a plausible molecular substrate to the inability to trigger LTP at PFC synapses of mBACtgDyrk1a mice.

Green tea extract restores working memory and normalizes LTP and spine density in adult mBACtgDyrk1a mice.

DYRK1A kinase activity is inhibited *in vitro* by a natural polyphenol abundantly found in green tea, epigallocatechin gallate (EGCG)³⁴. Naturally occurring green tea polyphenols rescue behavioral and morphological abnormalities associated with *Dyrk1a* overexpression: lifelong treatment with green tea infusion restored behavioral and morphological deficits in a polygenic model overexpressing *Dyrk1a* and four other HSA21 genes (YACtg152F7)¹³. Thus, we tested whether green tea could restore synaptic functions, spine density and behavior in adult mBACtgDyrk1a mice. Four month old mBACtgDyrk1a mice were given *ad libitum* access to water containing decaffeinated green tea extract (GTE, 0.8mg/ml EGCG) for 4-6 weeks.

This simple treatment fully rehabilitated both behavioral and synaptic functional deficits in mBACtgDyrk1a mice. Thus, in marked contrast with untreated littermates, working memory (**Fig. 5A**) and TBS-LTP were normal in GTE-treated mBACtgDyrk1a mice (**Fig. 5B**). Strikingly, the GTE rehabilitation of working memory and LTP was paralleled by concomitant normalization of the spine density of PFC pyramidal neurons (**Fig. 5C**) and of pCAMKII and PSD-95 levels (**Fig. 5D**).

While the GTE treatment had no significant effects on working memory, spine density, PSD-95 levels or LTP in wild-type littermates, it augmented pCAMKII levels in the PFC of wild-type littermates.

Discussion

In this study, we took advantage of a newly generated mouse model of partial DS³ that expresses a third copy of *Dyrk1a*, a main candidate gene for the intellectual deficits of DS^{3, 4, 35, 36}, with the aim to shed new light on the synaptic basis for the prefrontal dysfunctions affecting DS patient. Our principal results are two fold. First we disclose profound alterations of PFC dendritic architecture, synaptic plasticity and working memory in adult mBACtgDyrk1a. Second, based on the present findings and on the known inhibitory effects of green tea extracts (GTE) on DYRK1A kinase activity, we tested the restorative potential of in vivo treatment with green tea extracts. We show that GTE provided in drinking water for 6 weeks is sufficient to restore normal structural, synaptic and behavioral functions in adult mice modeling DS.

The PFC is fundamental to cognitive functions and emotional behavior^{9, 15} and although impairments of executive functions are observed in DS subjects⁷ the synaptic substrates of PFC dysfunctions in DS model have curiously been overlooked. The PFC participates in complex cognitive tasks that require working memory, the capability to hold information for its immediate use¹⁵. We found that working memory is impaired in our mouse model of partial DS. Furthermore, we show for the first time that PFC synaptic plasticity and spine density deficits paralleled working memory impairments in DS mice. This observation suggests a link between morpho-functional deficits of PFC circuits and altered working memory. Noteworthy, congruence between synaptic plasticity defects and behavioral deficits has been made in the context of DS in another brain area involved in memory and learning, the hippocampus. Indeed, subjects with DS present hippocampal dysfunction⁶ and reduced LTP correlates with lower hippocampal-dependent spatial learning in the Ts65dn mice model of DS^{3, 13, 18, 37, 38}. Thus multiple evidences illustrate the relations between impairments of LTP and related behavioral deficits in DS mouse models.

Converging evidence suggest that DYRK1A is important to cortical development and neuronal morphology^{3, 27, 35}. A current hypothesis is that alteration in spines and dendrites morphology is a core feature of neuropsychiatric diseases²⁴. Thus the present observation of a marked increase in the spine density at oblique dendrites in pyramidal neurons of mBACtgDyrk1a mice is reminiscent of that reported in the *fmr1*^{-/-} mouse model of Fragile X, another prominent human genetic disease associated with severe intellectual impairment^{24, 39}. Contrasting with the *fmr1*^{-/-} mice however,

our experiments did not reveal abnormally elongated spines in PFC pyramidal neurons.

In the M2 motor cortex, reduced dendritic arborization and spine density were measured in both haploinsufficient and overexpressing *Dyrk1a* mice^{25, 27}. In contrast, we found a marked increase in the spine density at oblique dendrites of PFC pyramidal neurons of mBACtgDyrk1a. This discrepancy is likely due to differences in the cortical areas structures considered (prelimbic PFC area versus motor cortex), the layers where the analysis were made (deep versus superficial layers), the dendrites of interest (oblique versus basal) or the type of promoter driving *Dyrk1a* expression (endogenous versus exogenous). In all cases, a major underlying concept in the neurobiology of DS is that of gene dosage and all available evidences point to a tight relationship between the numbers of copies of *Dyrk1a* and spine abnormalities.

DYRK1A has the potential to control multiple pre and postsynaptic targets directly and/or at the gene regulation level and determining which targets underlies the present effects on synaptic plasticity remains beyond the scope of the present study. In all cases, we have made the first steps toward the mechanistic understanding of the endophenotypes of DS, by showing marked alterations in the expression levels and/or phosphorylation of the most essential postsynaptic proteins involved in synaptic and spine plasticity, pCAMKII and PSD95. We found, in agreement with local increase in synaptic densities, significantly elevated levels of postsynaptic PSD95 in PFC extracts from mBACtgDyrk1a mice. This result is in seeming discrepancy with a recent report²⁷. It is likely that this reflects regional differences between our PFC extracts and the total cortical extracts used by Martinez's and colleagues²⁷.

Furthermore, the constancy of the average spine heads size in mBACtgDyrk1a and wild type mice is in accord with similarity of spontaneous EPSCs size in both genotypes. The fact that the augmented spine density and PSD95 levels do not correlate with either alterations in the size or frequency of spontaneous synaptic events suggests that homeostatic mechanisms may have been engaged.

Perhaps the most striking finding of our study is the fact that numerous morpho-functional and behavioral deficits of mBACtgDyrk1a mice are fully reversible by DYRK1A pharmacological inhibition. Indeed we show that EGCG-rich GTE restores

normal dendritic, synaptic properties and corrects working memory deficits when administered in adult *Dyrk1a* overexpressing mice. These data favor the idea that the origin of the DYRK1A-related PFC deficits is not merely developmental and that continuous excessive DYRK1A activity is detrimental to optimal PFC functioning.

A primary goal of preclinical research is to propose innovative therapeutic approaches. By showing that EGCG-rich GTE allows restorative structural, functional and behavioral plasticity in adult partial-DS mice, our study provides new neurophysiological basis to the current interest in the therapeutic use of green tea and indicates that GTE may be a viable therapeutic alternative to alleviate some of the cognitive deficits associated with DS by directly tackling their morphological and physiological substratum.

METHODS

Animals

All animal experiments were performed according to the criteria of the European Communities Council Directive (86/609/EEC).

To generate the *Dyrk1a* overexpressing mouse and the murine bacterial artificial chromosome 189N3 (BAC-189N3) strain, the HM-1 embryonic stem (ES) cells was electroporated with the BAC-189N3 retrofitted with a G418 resistance gene. ES clone was selected for overexpression of *Dyrk1a* close to 1.5 ratio, and injected into blastocysts³. All mice were weaned at 21 days. After weaning, they were caged socially in same-sex groups. The offspring were genotyped by PCR using tail genomic DNA as previously described (9). The PCR primer sequences were: forward and reverse mutated. PCR conditions were as follows: 1 cycle, 3 min at 95°C; 40 cycles, 45 sec at 95°C, 45 sec at 53°C, 45 sec 72°C; 1 cycle, 5 min at 72°C. Male Tg189N3 (mBACtgDyrk1a) mice and controls from the same litter were used in electrophysiological and morphological studies at 4 to 6 months of age.

Green tea treatment

Male (3-4 months old) wild type and mBACtgDyrk1a mice were fed with water or with green tea extract (GTE)-containing water. GTE was administered orally, in the form of a solution containing 0.25% green tea decaffeinated extract (LifeExtension© For Longer Life©, Ft. Lauderdale, FL, USA) and 0.25% glucose. GTE contained ~45% EGCG. The GTE solution was freely available in home cage feeding bottles and was renewed every 24 hours. Depending on daily intake, the dose ranged between 120mg and 200 mg/kg. Administration of the diet started 4-6 weeks before experimentation and continued, for behaviorally assessed mice, on the testing day.

Biochemistry

Immunoblotting was performed following standard protocols using either western blots or slot blots (according to antibody specificity). Proteins were prepared in modified NP40 lysis buffer and subjected to SDS electrophoresis on acrylamide gels under reducing conditions before being transferred to Hybond-C Extra membrane (GE Healthcare Europe GmbH, Saclay, France); alternatively a slot blot apparatus (SHM-

48; SCIE-Plas Ltd., U.K.) was used to increase the number of samples with highly specific antibodies. After transfer, membranes were blocked in 10% nonfat dry milk in Tris buffered saline-Tween (TBS-T; 1.5 mM Tris, 5 mM NaCl, 0.1% Tween-20) and probed overnight at 4 °C with primary anti-DYRK1A (1/250; Abnova Corporation, Tebu, France), PSD-95 (1/1000; Thermofischer Scientific, Rockford, USA), anti-CAMKII and anti pCAMKII (1/5000 and 1/1000; Abcam, Paris, France) antibodies, followed by horseradish peroxidase-labeled anti-species specific antibodies. The membranes were rinsed in TBS-T and the immunocomplexes were detected using Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology, Tebu, France) following manufacturer's instructions. β -actin (1/4000, Sigma-Aldrich, France) was used as an internal control for Western blots and total protein stained with red Ponceau was used as standard for slot blots. Digitized images of the immunoblots obtained using a LAS-3000 imaging system (Fuji Photo Film Co., Ltd.) were used for densitometry measurements with an image analyzer (UnScan It, Silk Scientific Inc., USA).

Behavior

Working memory and exploratory activity were assessed using a spontaneous alternation task that relies on the natural tendency of a mouse placed in the Y-maze to move from one arm of the maze to another. The Y-maze consisted of three transparent Plexiglas arms (10 cm wide; 25 cm long; 30 cm height), with a 120° angle between two adjacent arms. The experimental room was lighted with a halogen lamp (15 lux). During the test, mice were placed at the center of the maze and allowed to explore it freely. The sequence of entries into the three arms was automatically recorded with ANY-maze (Stoelting, Wood Dale, USA) over a period of 10 min. In order to diminish odor cues, the maze was cleaned with 70% ethanol solution between animals. Measured parameters were the total number of arm entries and the spontaneous alternation score calculated as the number of performed alternations (i.e. entries in three different arms consecutively) divided by the total possible number of alternations (i.e. total number of arm entries minus two).

Prefrontal cortex slice preparation

Prefrontal cortex slices were prepared as previously described⁴⁰. Mice were anesthetized with isoflurane and decapitated. The brain was sliced (300 μ m) in the coronal plane (Integraslice, Campden Instruments, Leicester, U.K.) and maintained in

physiological saline (4°C). Slices were stored for 30 min at 32–35°C in artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing 126 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2.4 mM MgCl₂, 1.2 mM CaCl₂, 18 mM NaHCO₃, 1.2 mM NaH₂PO₄ and 11 mM glucose, equilibrated with 95% O₂/5% CO₂. Slices were stored at 22 ± 2 °C until recording.

Electrophysiology

Whole-cell patch-clamp and extracellular field recordings were made from layer V/VI pyramidal cells in coronal slices of mouse prelimbic PFC⁴⁰. For recording, slices were superfused (2ml/min) with ACSF. All experiments were done at 32–35 °C. The ACSF contained picrotoxin (100 µM) to block GABA_A receptors. To evoke synaptic currents, 150-200 µs stimuli were delivered at 0.1Hz through an ACSF-filled glass electrode placed in layer II/III. For extracellular field experiments, the recording pipette was filled with ACSF. The glutamatergic nature of the field excitatory postsynaptic potential (fEPSP) was confirmed at the end of the experiments using the ionotropic glutamate receptor antagonist 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX, 20 µM), that specifically blocked the synaptic component without altering the non-synaptic component (data not shown). LTP was induced using a theta-burst stimulation (TBS) protocol consisting of five trains of burst with four pulses at 100Hz, at 200ms interval, repeated four times at intervals of 10s²³.

For whole-cell patch-clamp, pyramidal neurons in PFC layer V/VI were visualized using an infrared microscope (BX-50, Olympus). Experiments were made with electrodes containing 128mM cesium methane-sulfonate (CH₃O₃SCs, voltage clamp) or potassium gluconate (KGlu, current clamp and voltage clamp), 20mM NaCl, 1mM MgCl₂, 1mM EGTA, 0.3mM CaCl₂, 2mM Na²⁺-ATP, 0.3mM Na⁺-GTP, 10mM glucose buffered with 10mM HEPES, pH 7.3, osmolarity 290mOsm. Electrode resistance was 4–6MΩ. If access resistance (no compensation, <25MΩ) changed by >20%, the experiment was rejected. To perform current–voltage (*I–V*) curves and to test neuronal pyramidal neuron excitability, a series of hyperpolarizing and depolarizing current steps were applied immediately after breaking in the cell.

Voltage Clamp experiments

AMPA-spEPSCs and evoked EPSCs were recorded at -70mV (KGlu-based solution). To determine the ratio of AMPAR-mediated/NMDAR-mediated EPSC, neurons were first recorded at -70mV then at +40mV (CH₃O₃SCs-based solution)³².

The progressive block of NMDAR-EPSCs by the open-channel blocker MK-801 allowed estimating the release probability of glutamate^{29, 30}. NMDAR-EPSCs was recorded at +40 mV in the presence of 20 μ M DNQX, and synaptic inputs were activated every 10 sec. After a 10 min baseline, MK-801 (40 μ M) was added to the bath, and synaptic stimulation was stopped during 15 min to ensure bath equilibration of the drug. Synaptic input stimulation was then resumed every 10 sec until total blockade of NMDA-EPSCs. The progressive block of NMDAR-EPSCs by MK-801 was fitted using a double exponential: $R = a * \%_{fast} * \text{Exp}(-t/\tau_{fast}) + b * \%_{slow} * \text{Exp}(-t/\tau_{slow})$ where R is the response amplitude, a and b are constants, t the corresponding stimulus number, τ_{fast} and τ_{slow} the time constants, $\%_{fast}$ is the fraction of the span accounted for by the faster component, $\%_{slow} = 100 - \%_{fast}$ ²⁹.

Data acquisition and analysis

The potential reference of the amplifier was adjusted to zero before breaking into the cell or entering the slice. Data were recorded on a MultiClamp700B (Axon Instruments), filtered at 2kHz, digitized (20kHz, DigiData 1440A, Axon Instrument), collected using Clampex 10.2 and analyzed using Clampfit 10.2 (all from Molecular Device, Sunnyvale, USA). Analysis of both area and amplitude of fEPSP and EPSCs was performed (graphs depict amplitudes for patch clamp experiments and areas for field recordings). The magnitude of LTP was calculated 25-30 minutes after TBS as percentage of baseline responses.

AMPA-spEPSCs amplitude and inter-interval time were analyzed with AxographX (Kagi, USA) using a double exponential template: $f(t) = \text{exp}(-t/\text{rise}) + \text{exp}(-t/\text{decay})$, rise = 0.5ms and decay = 3ms. The threshold of amplitude detection was set at 5pA.

For ES-Coupling analysis, ten traces were recorded for each stimulus. EPSP slopes were determined. ES-Coupling changes were quantified by determining the spiking probability for a given EPSP slope. The value of ES-Coupling obtained for each animal was calculated by averaging the spiking probability corresponding to each class of EPSP slope. EPSP slopes were measured during the first 2ms, sorted in 0.5mV/ms bins, and the firing probability was determined for each bin.

To determine the AMPA/NMDA ratio, the AMPAR component amplitude was measured from EPSC at -70mV. The NMDAR component amplitude was determined 40ms after the start of dual component EPSC at +40mV, when the AMPA component is over³².

Drugs

Drugs were added at the final concentration to the ACSF. Picrotoxin was from Sigma (St. Quentin Fallavier, France). DNQX, MK801 and D-APV were from the National Institute of Mental Health's Chemical Synthesis and Drug Supply Program (Rockville, MD, USA). Ifenprodil was from Tocris (Bristol, UK).

Dendritic spine reconstruction and quantification.

Whole-cell recorded neurons were loaded with neurobiotin through patch pipettes. Slices were fixed overnight in 4% PFA and revealed with Texas Red-conjugated Avidin for subsequent confocal imaging. Only pyramidal neurons within layer V/VI of the PFC showing proper filling of the distal dendritic tree were included in the analysis. Stack images were acquired using an Olympus Fluoview FV500 confocal microscope equipped with a 60x oil-immersion objective. The tri-dimensional morphology reconstruction and analysis were performed with Imaris (Bitplane).

Statistical analysis.

The value n corresponds to the number of animals for the behavioral experiments, to the number of cells for morphological experiments and to the number of individual cells or animals in the electrophysiology experiments (maximum of 3 cells from a single animal). All values are given as mean \pm s.e.m. and statistical significance was set at $P < 0.05$.

Statistical analysis of electrophysiological and morphological data was performed with GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Two sample comparisons were made with the Mann-Whitney t test. Kolmogorov–Smirnov tests were used for comparing the cumulative distributions of amplitudes and inter-event intervals of AMPAR-spEPSCs.

Figure legends

Figure 1. Working memory and long-term potentiation in the prefrontal cortex are impaired in mBACtgDyrk1a mice.

A. Cognitive performance in the Y maze. The effects of *Dyrk1a* overexpression on short-term spatial memory were assessed using a spontaneous alternation paradigm in a Y-maze. Working memory was impaired in mBACtgDyrk1a mice. The rate of spontaneous alternation (visiting each arm in turn) was decreased in mBACtgDyrk1a mice (white bar) compare to wild type littermates (black bar) (100.00 ± 7.04 , $n = 8$ wild-type versus 71.88 ± 4.72 , $n = 6$ mBACtgDyrk1a; * $P = 0.0117$ Mann-Whitney U-test). The data are normalized to the baseline level of performance of wild type mice. Horizontal lines represent the mean value. Error bars represent S.E.M. **B-D.** Long-term potentiation was abolished in mBACtgDyrk1a mice. Theta Burst Stimulation (TBS) of layers II/III induced a long-term potentiation (LTP) of evoked fEPSP recorded in layer V/VI pyramidal neurons in wild type mice (black symbols) but not in mBACtgDyrk1a mice (white symbols). Representative experiments showing the time courses of fEPSP normalized to baseline are illustrated (**B**) in a wild type mouse, black symbols and (**C**) in a mBACtgDyrk1a mouse, white symbols. **D.** Cumulative probability distribution of the normalized fEPSP 30 minutes after LTP induction (wild type, $n = 12$, black symbols; mBACtgDyrk1a, $n = 8$, white symbols).

Figure 2. The density of spines was augmented but spine shape and length unchanged in PFC pyramidal neurons of mBACtgDyrk1a mice.

A. Representative 3D reconstruction of spines and shafts from pyramidal PFC neurons of wild-type (left) and mBACtgDyrk1a mice (right). Calibration bars: 5 μ m. **B.** There was an increase in the density of spines on oblique dendrites of layer V/VI PFC pyramidal neurons in mBACtgDyrk1a mice compared to wild type littermates (0.76 ± 0.07 , $n = 8$ cells from 5 wild-type versus 1.41 ± 0.10 , $n = 10$ cells from 6 mBACtgDyrk1a; *** $P = 0.003$, Mann-Whitney U-test). **C, D.** In contrast, the distributions of the average diameter of the spine head (**C**) and the spine length (**D**) were similar in wild type ($n = 7$ neurons, black symbols) and in mBACtgDyrk1a mice ($n = 9$ neurons, white symbols). Kolmogorov–Smirnov test, $P > 0.05$. Error bars represent S.E.M

Figure 3. The basic intrinsic properties of layers V/VI PFC pyramidal neurons are similar in wild type mice and BACtgDyrk1a littermates.

A. Typical membrane responses to somatic current steps of PFC pyramidal neurons from wild type or BACtgDyrk1a mice. **B.** Summary of all the current-voltage (I-V) curves recorded in the two genotypes showing no difference between wild type (n = 24, black symbols) and BACtgDyrk1a mice (n = 16, white symbols; $P > 0.05$, Mann-Whitney U test). The resting membrane potential (**C.** -71.08 ± 0.71 , n = 24 cells from wild type mice, black symbols; -69.69 ± 1.14 , n = 16 cells from mBACtgDyrk1a mice, white symbols) and the rheobase (**D.** 133.33 ± 11.13 , n = 24 cells from wild type mice, black symbols; 112.50 ± 9.68 , n = 16 cells from mBACtgDyrk1a mice, white symbols) were similar in both genotypes ($P > 0.05$, Mann-Whitney U test). Horizontal lines represent the mean value. Error bars represent S.E.M. **E.** Summary of current-firing curves indicating that the number of evoked action potentials in response to somatic current steps was similar in pyramidal neurons from BACtgDyrk1a (n = 24, black symbols) and wild type mice (n = 16, white symbols; $P > 0.05$, Mann-Whitney U test).

Figure 4. Basal synaptic properties of layers V/VI PFC pyramidal neurons in wild type mice and mBACtgDyrk1a littermates.

A-B. The distributions of the inter-event intervals (**A**) and the amplitudes (**B**) of spontaneous EPSCs (sEPSPc) were identical in wild type (n = 17, black symbols) and in mBACtgDyrk1a mice (n = 18, white symbols). Kolmogorov–Smirnov test, $P > 0.05$. Error bars represent S.E.M. **C.** There was no change in synaptic excitability in PFC of mBACtgDyrk1a mice. Input/output curves of evoked EPSCs in layer V/VI pyramidal neurons in wild type (n = 9, black symbols) and in mBACtgDyrk1a mice (n = 7, white symbols) for increasing stimulation intensities. Average mean sEPSCs are represented. **D.** The release probability at synapses impinging onto layer V-VI pyramidal neurons is identical in (black bars) and in mBACtgDyrk1a mice (white bars, $P > 0.05$, Mann-Whitney U test). The probability of glutamate release was estimated from the rate of exponential two-phase decay (τ fast and τ slow) of the amplitude of consequent evoked NMDAR-mediated currents in the presence of MK-801 (40 μ M, see methods) (τ slow: 47.08 ± 9.91 , n = 6 cells from 5 wild type versus 73.52 ± 16.59 , n = 7 cells from 5 mBACtgDyrk1a; τ fast: 13.89 ± 3.28 , n = 9 cells from 7 wild type

versus 11.47 ± 2.02 , $n = 9$ cells from 5 mBACtgDyrk1a). Horizontal lines represent the mean value. Error bars represent S.E.M. **E.** Summary showing that the AMPAR-mediated EPSCs/NMDAR-mediated EPSCs ratio was similar in PFC pyramidal neurons of wild type (black symbols) and mBACtgDyrk1a mice (white symbols) (4.17 ± 0.65 , $n = 11$ wild type versus 3.53 ± 0.39 , $n = 10$ mBACtgDyrk1a; $P > 0.05$, Mann-Whitney U test). Horizontal lines represent the mean value. **F.** The pCAMKII/CAMKII ratio was decreased in PFC of mBACtgDyrk1a mice (white symbols) compared to wild type littermates (black symbols) (100.00 ± 12.66 , $n = 11$ wild type versus 54.78 ± 6.36 , $n = 11$ mBACtgDyrk1a; * $P = 0.0127$, Mann-Whitney U-test). The data are normalized to the baseline level of wild type mice. Horizontal lines represent the mean value. Error bars represent S.E.M.

Figure 5. Drinking green tea extract restored normal morpho-functional and behavioral properties of adult mBACtgDyrk1a mice.

4-5 month-old mBACtgDyrk1a mice were treated for one month with green tea extract (GTE, drinking water). **A.** *In vivo* treatment GTE restored working memory in mBACtgDyrk1a mice (compare white bar to light green bar). The treated transgenic mice had memory performance comparable to that of wild-type mice (compare black bar and light green bar). GTE treatment strongly improved alternation performance of mBACtgDyrk1a mice (71.88 ± 4.72 , $n = 6$ mBACtgDyrk1a, white bar, versus 93.35 ± 6.03 , $n = 7$ mBACtgDyrk1a GTE, light green bar; * $P = 0.014$, Mann-Whitney U-test). GTE has no effect on alternation performance of wild type mice (100.00 ± 7.03 , $n = 8$ wild type, black bar, versus 117.05 ± 4.19 , $n = 7$ wild type GTE, dark green bar; $P > 0.05$, Mann-Whitney U-test). The data presented on the graph are normalized to the baseline level of performance of wild type mice fed with water. Error bars represent S.E.M. **B.** Theta Burst Stimulation (TBS) of layers II/III induced a long-term potentiation (LTP) of evoked fEPSP recorded in layer V/VI pyramidal neurons in wild type mice ($n = 12$, black symbols; 98.60 ± 0.58 , baseline versus 121.76 ± 3.21 , 25-30 min; $P < 0.0001$, Mann-Whitney U-test) but not in mBACtgDyrk1a mice ($n = 8$, white symbols; 98.02 ± 0.84 , baseline versus 93.99 ± 3.98 , 25-30 min; $P > 0.05$, Mann-Whitney U-test). The GTE treatment restored normal long-term potentiation in mBACtgDyrk1a mice ($n = 10$, light green symbols; 99.80 ± 0.30 , baseline versus 125.51 ± 2.09 , 25-30 min; $P < 0.0001$, Mann-Whitney U-test) but had no effect on wild-type mice ($n = 8$, dark green symbols; 99.06 ± 0.32 baseline versus 120.27 ± 4.62 ,

25-30 min; $P=0.003$, Mann-Whitney U-test). Average time courses of mean fEPSP were normalized to baseline. Error bars represent S.E.M. **C.** The GTE treatment restored normal spine density of mBACtgDyrk1a mice (1.41 ± 0.10 , $n = 10$ cells from 6 mBACtgDyrk1a, white bar, versus 0.96 ± 0.07 , $n = 14$ cells from 8 mBACtgDyrk1a GTE, light green bar; ** $P = 0.002$, Mann-Whitney U-test). The treatment has no effect on the spine density of wild type mice (0.76 ± 0.07 , $n = 8$ cells from 5 wild-type, black bar, versus 0.94 ± 0.07 , $n = 10$ cells from 10 wild type GTE, dark green bar; $P > 0.05$, Mann-Whitney U-test). Error bars represent S.E.M. **D.** GTE normalized PSD95 and pCAMKII levels. The PSD95 level was increased in mBACtgDyrk1a mice (100.00 ± 6.53 , $n = 11$ wild type, black bar, versus 122.82 ± 5.44 , $n = 10$ mBACtgDyrk1a, white bar; * $P = 0.0378$, Mann-Whitney U-test). The GTE treatment brought PSD95 level in mBACtgDyrk1a mice back to normal levels (122.82 ± 5.44 , $n = 10$ mBACtgDyrk1a versus 98.42 ± 7.84 , $n = 7$ mBACtgDyrk1a GTE, light green bar; * $P = 0.014$, Mann-Whitney U-test). On the contrary GTE had no effects on PSD95 in wild type mice (100.00 ± 6.53 , $n = 11$ wild type versus 83.57 ± 5.84 , $n = 10$ wild type GTE, dark green bar; $P > 0.05$, Mann-Whitney U-test). The pCAMKII level was decreased in mBACtgDyrk1a mice (100.00 ± 11.15 , $n = 11$ wild type, black bar versus 62.54 ± 6.27 , $n = 12$ mBACtgDyrk1a, white bar; * $P = 0.0106$, Mann-Whitney U-test). The GTE treatment largely increased pCAMKII level in mBACtgDyrk1a mice (62.54 ± 6.27 , $n = 12$ mBACtgDyrk1a versus 119.48 ± 12.50 , $n = 7$ mBACtgDyrk1a GTE, light green bar; ** $P = 0.0027$, Mann-Whitney U-test) and also in wild type mice (100.00 ± 11.15 , $n = 11$ wild type versus 141.95 ± 9.50 , $n = 10$ wild type GTE, dark green bar; * $P = 0.0124$, Mann-Whitney U-test). The CAMKII level was the same in wild type and mBACtgDyrk1a mice (100.00 ± 5.26 , $n = 11$ wild type, black bar, versus 113.84 ± 4.74 , $n = 12$ mBACtgDyrk1a, white bar; $P > 0.05$, Mann-Whitney U-test). The GTE treatment had no effect on CAMKII level either in wild type mice (100.00 ± 5.26 , $n = 11$ wild type versus 93.79 ± 7.34 , $n = 10$ wild type GTE, dark green bar; $P > 0.05$, Mann-Whitney U-test) or in mBACtgDyrk1a mice (113.84 ± 4.74 , $n = 12$ mBACtgDyrk1a versus 104.58 ± 10.90 , $n = 7$ mBACtgDyrk1a GTE, light green bar; $P > 0.05$, Mann-Whitney U-test). The presented data are normalized to the baseline protein level of wild type mice fed with water. Error bars represent S.E.M.

References

1. Delabar, J.M., *et al.* Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur J Hum Genet* **1**, 114-124 (1993).
2. Dahmane, N., *et al.* Transcriptional map of the 2.5-Mb CBR-ERG region of chromosome 21 involved in Down syndrome. *Genomics* **48**, 12-23 (1998).
3. Guedj, F., *et al.* DYRK1A: A master regulatory protein controlling brain growth. *Neurobiol Dis* **46**, 190-203 (2012).
4. Becker, W. Recent insights into the function of DYRK1A. *Febs J* **278**, 222 (2011).
5. Lepagnol-Bestel, A.M., *et al.* DYRK1A interacts with the REST/NRSF-SWI/SNF chromatin remodelling complex to deregulate gene clusters involved in the neuronal phenotypic traits of Down syndrome. *Hum Mol Genet* **18**, 1405-1414 (2009).
6. Pennington, B.F., Moon, J., Edgin, J., Stedron, J. & Nadel, L. The neuropsychology of Down syndrome: evidence for hippocampal dysfunction. *Child Dev* **74**, 75-93 (2003).
7. Lanfranchi, S., Jerman, O., Dal Pont, E., Alberti, A. & Vianello, R. Executive function in adolescents with Down Syndrome. *J Intellect Disabil Res* **54**, 308-319 (2010).
8. Laroche, S., Davis, S. & Jay, T.M. Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses: dual roles in working memory and consolidation. *Hippocampus* **10**, 438-446 (2000).
9. Goldman-Rakic, P.S. Cellular and circuit basis of working memory in prefrontal cortex of nonhuman primates. *Prog Brain Res* **85**, 325-335; discussion 335-326 (1990).
10. Jones, M.W. A comparative review of rodent prefrontal cortex and working memory. *Curr Mol Med* **2**, 639-647 (2002).
11. Goto, Y., Yang, C.R. & Otani, S. Functional and dysfunctional synaptic plasticity in prefrontal cortex: roles in psychiatric disorders. *Biol Psychiatry* **67**, 199-207 (2010).
12. Seamans, J.K., Floresco, S.B. & Phillips, A.G. Functional differences between the prelimbic and anterior cingulate regions of the rat prefrontal cortex. *Behav Neurosci* **109**, 1063-1073 (1995).

13. Guedj, F., *et al.* Green tea polyphenols rescue of brain defects induced by overexpression of DYRK1A. *PLoS One* **4**, e4606 (2009).
14. Funahashi, S. Prefrontal cortex and working memory processes. *Neuroscience* **139**, 251-261 (2006).
15. Goldman-Rakic, P.S. Regional and cellular fractionation of working memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13473-13480 (1996).
16. Brito, G.N. & Brito, L.S. Septohippocampal system and the prelimbic sector of frontal cortex: a neuropsychological battery analysis in the rat. *Behav Brain Res* **36**, 127-146 (1990).
17. Delatour, B. & Gisquet-Verrier, P. Prelimbic cortex specific lesions disrupt delayed-variable response tasks in the rat. *Behav Neurosci* **110**, 1282-1298 (1996).
18. Belichenko, N.P., *et al.* The "Down syndrome critical region" is sufficient in the mouse model to confer behavioral, neurophysiological, and synaptic phenotypes characteristic of Down syndrome. *J Neurosci* **29**, 5938-5948 (2009).
19. Deacon, R.M. & Rawlins, J.N. T-maze alternation in the rodent. *Nat Protoc* **1**, 7-12 (2006).
20. Siarey, R.J., *et al.* Altered signaling pathways underlying abnormal hippocampal synaptic plasticity in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *J Neurochem* **98**, 1266-1277 (2006).
21. Lynch, M.A. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* **84**, 87-136 (2004).
22. Hirsch, J.C. & Crepel, F. Blockade of NMDA receptors unmasks a long-term depression in synaptic efficacy in rat prefrontal neurons in vitro. *Exp Brain Res* **85**, 621-624 (1991).
23. Hirsch, J.C. & Crepel, F. Use-dependent changes in synaptic efficacy in rat prefrontal neurons in vitro. *J Physiol* **427**, 31-49 (1990).
24. Penzes, P., Cahill, M.E., Jones, K.A., VanLeeuwen, J.E. & Woolfrey, K.M. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* **14**, 285-293 (2011).
25. Benavides-Piccione, R., *et al.* Alterations in the phenotype of neocortical pyramidal cells in the Dyrk1A^{+/-} mouse. *Neurobiol Dis* **20**, 115-122 (2005).
26. Benavides-Piccione, R., *et al.* On dendrites in Down syndrome and DS murine models: a spiny way to learn. *Prog Neurobiol* **74**, 111-126 (2004).

27. Martinez de Lagran, M., *et al.* Dyrk1A Influences Neuronal Morphogenesis Through Regulation of Cytoskeletal Dynamics in Mammalian Cortical Neurons. *Cereb Cortex* (2012).
28. Feng, W. & Zhang, M. Organization and dynamics of PDZ-domain-related supramodules in the postsynaptic density. *Nat Rev Neurosci* **10**, 87-99 (2009).
29. Chavis, P. & Westbrook, G. Integrins mediate functional pre- and postsynaptic maturation at a hippocampal synapse. *Nature* **411**, 317-321 (2001).
30. Rosenmund, C., Clements, J.D. & Westbrook, G.L. Nonuniform probability of glutamate release at a hippocampal synapse. *Science* **262**, 754-757 (1993).
31. Kauer, J.A. & Malenka, R.C. Synaptic plasticity and addiction. *Nat Rev Neurosci* **8**, 844-858 (2007).
32. Kasanetz, F. & Manzoni, O.J. Maturation of excitatory synaptic transmission of the rat nucleus accumbens from juvenile to adult. *J Neurophysiol* **101**, 2516-2527 (2009).
33. Cui, Y., *et al.* Forebrain NR2B overexpression facilitating the prefrontal cortex long-term potentiation and enhancing working memory function in mice. *PLoS One* **6**, e20312 (2011).
34. Bain, J., McLauchlan, H., Elliott, M. & Cohen, P. The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem J* **371**, 199-204 (2003).
35. Fotaki, V., Martinez De Lagran, M., Estivill, X., Arbones, M. & Dierssen, M. Haploinsufficiency of Dyrk1A in mice leads to specific alterations in the development and regulation of motor activity. *Behav Neurosci* **118**, 815-821 (2004).
36. Tejedor, F.J. & Hammerle, B. MNB/DYRK1A as a multiple regulator of neuronal development. *Febs J* **278**, 223-235 (2011).
37. Fernandez, F., *et al.* Pharmacotherapy for cognitive impairment in a mouse model of Down syndrome. *Nat Neurosci* **10**, 411-413 (2007).
38. Garner, C.C. & Wetmore, D.Z. Synaptic pathology of down syndrome. *Adv Exp Med Biol* **970**, 451-468 (2012).
39. Bagni, C. & Greenough, W.T. From mRNP trafficking to spine dysmorphogenesis: the roots of fragile X syndrome. *Nat Rev Neurosci* **6**, 376-387 (2005).
40. Lafourcade, M., *et al.* Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions. *Nat Neurosci* **14**, 345-350 (2011).

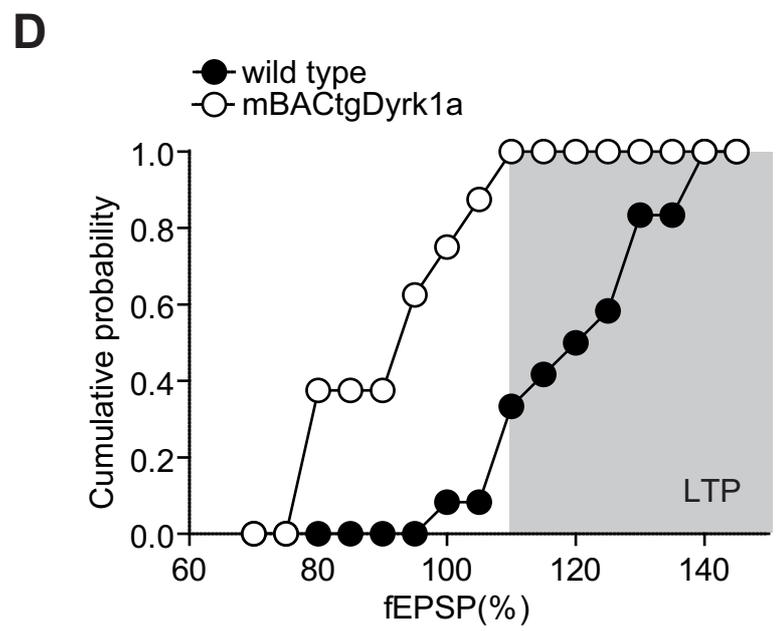
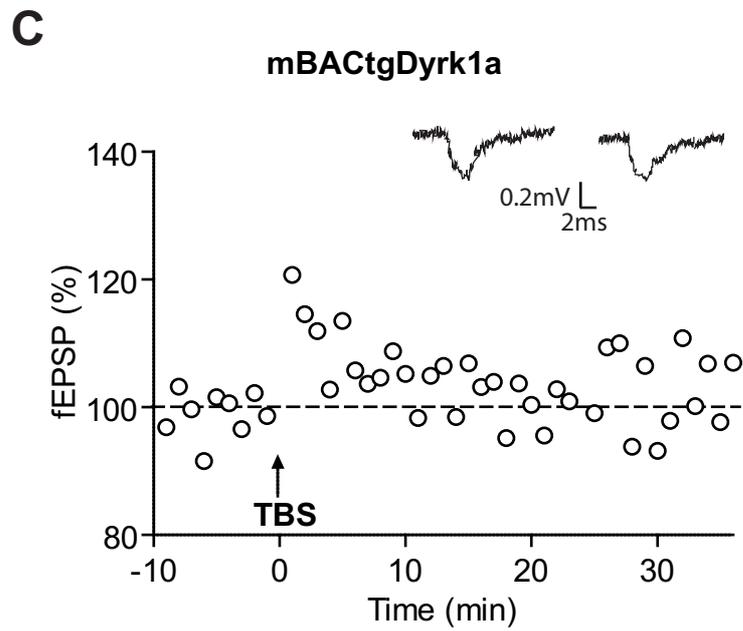
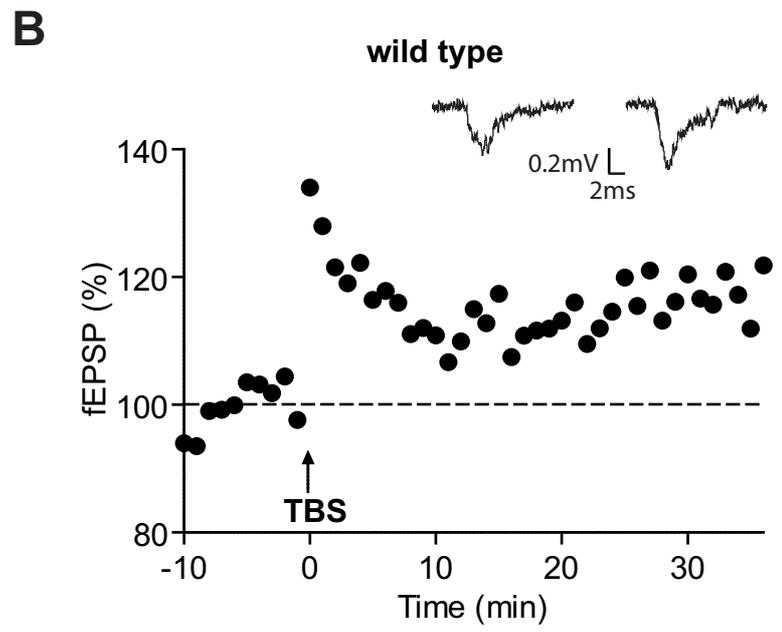
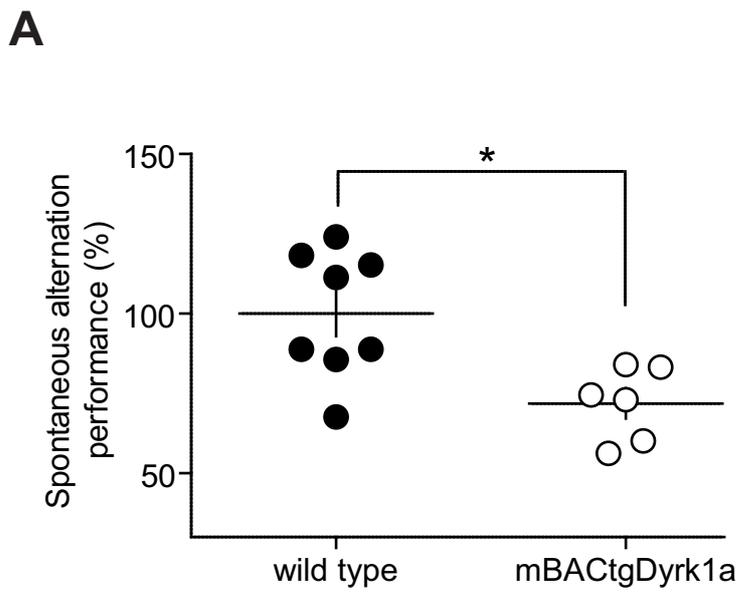


Figure 1

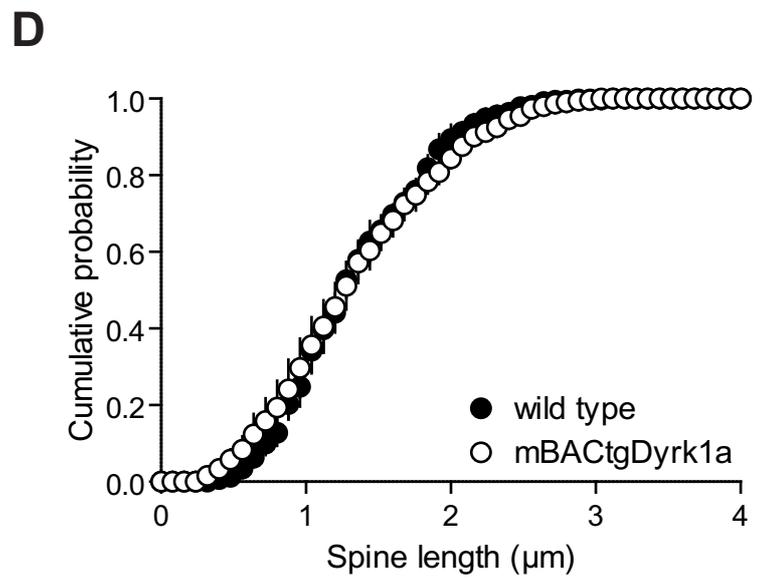
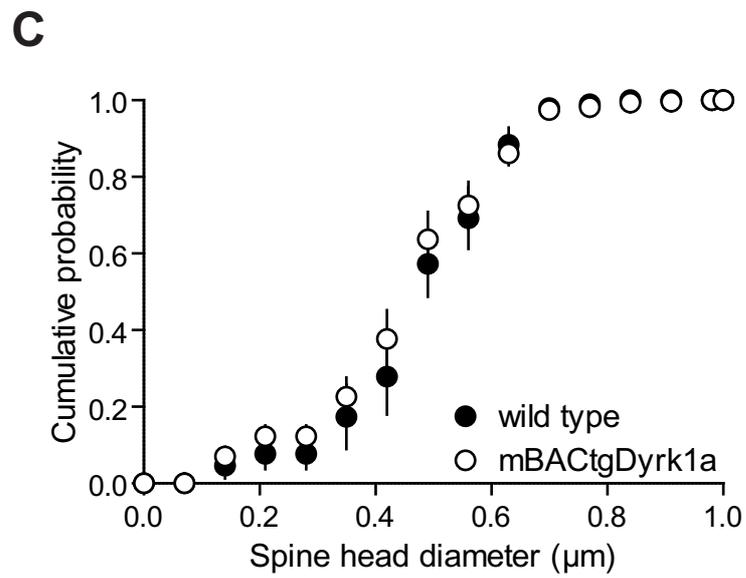
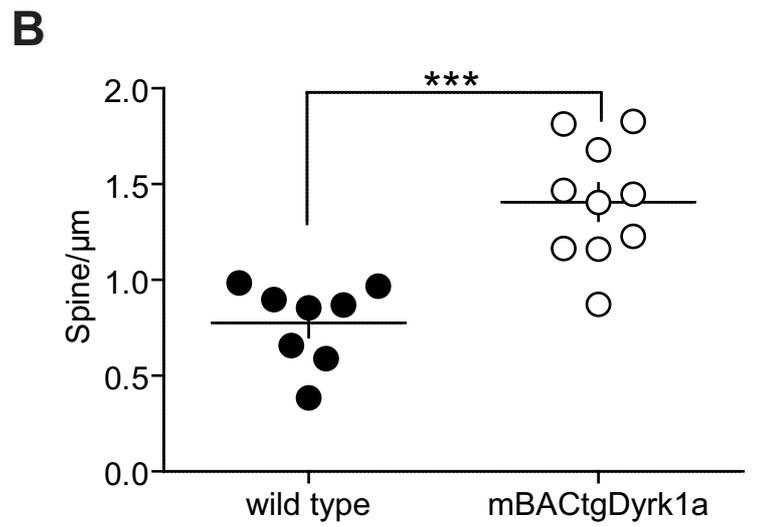
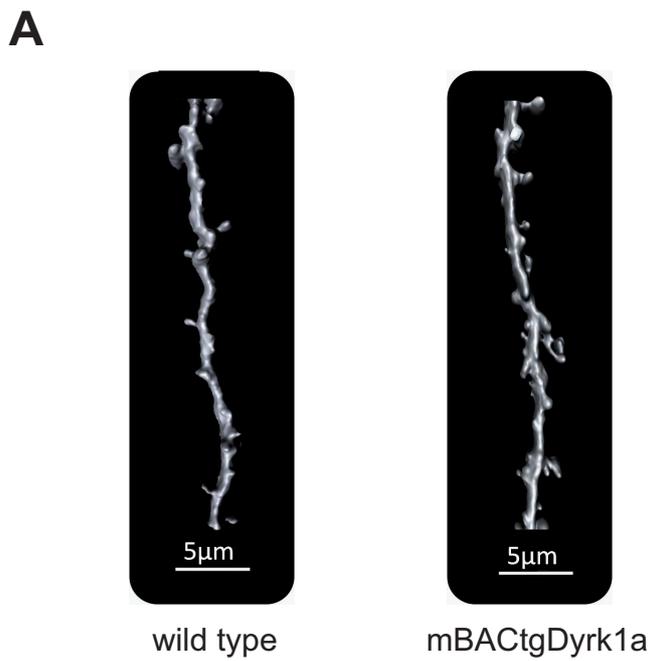


Figure 2

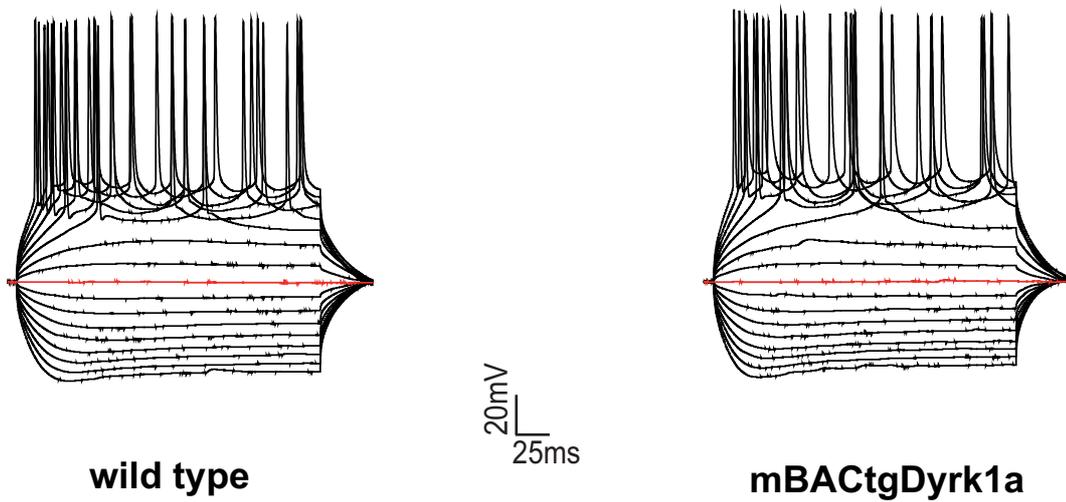
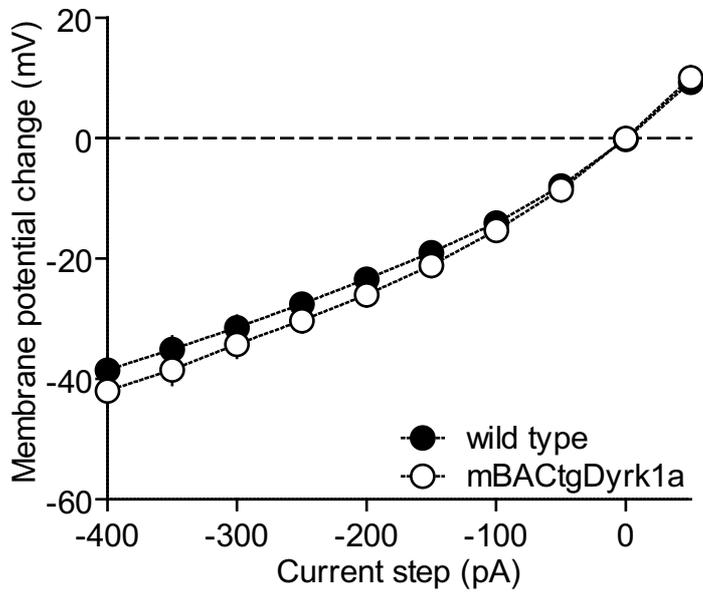
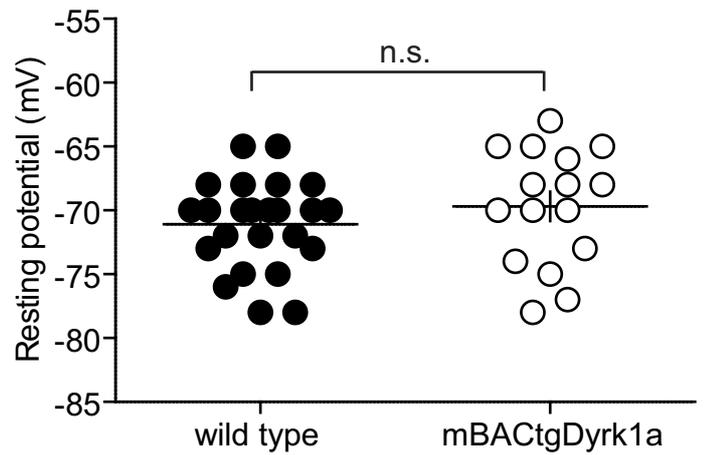
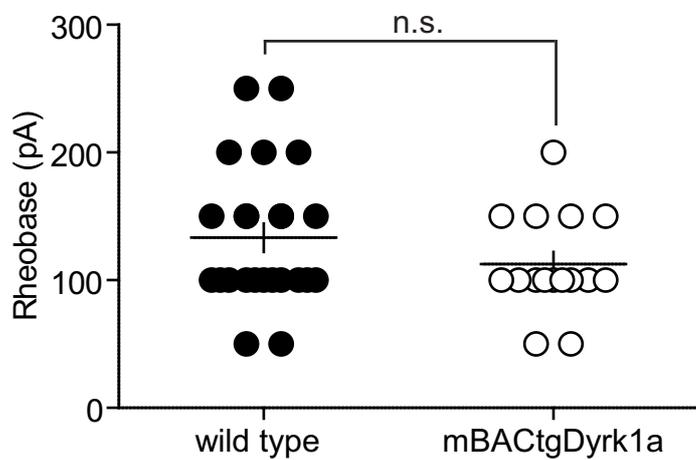
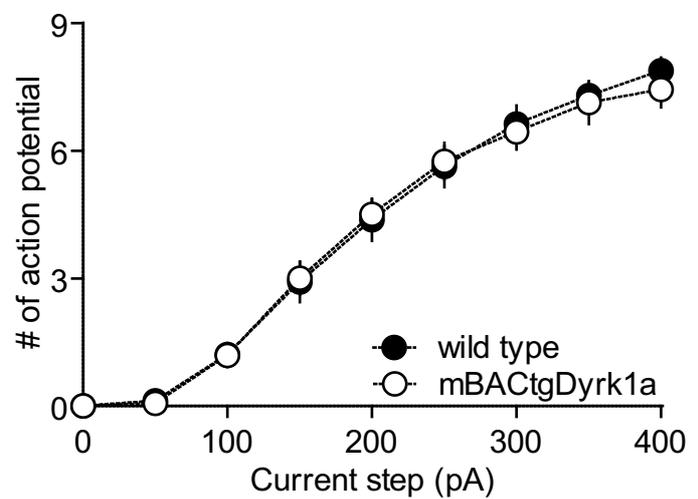
A**B****C****D****E**

Figure 3

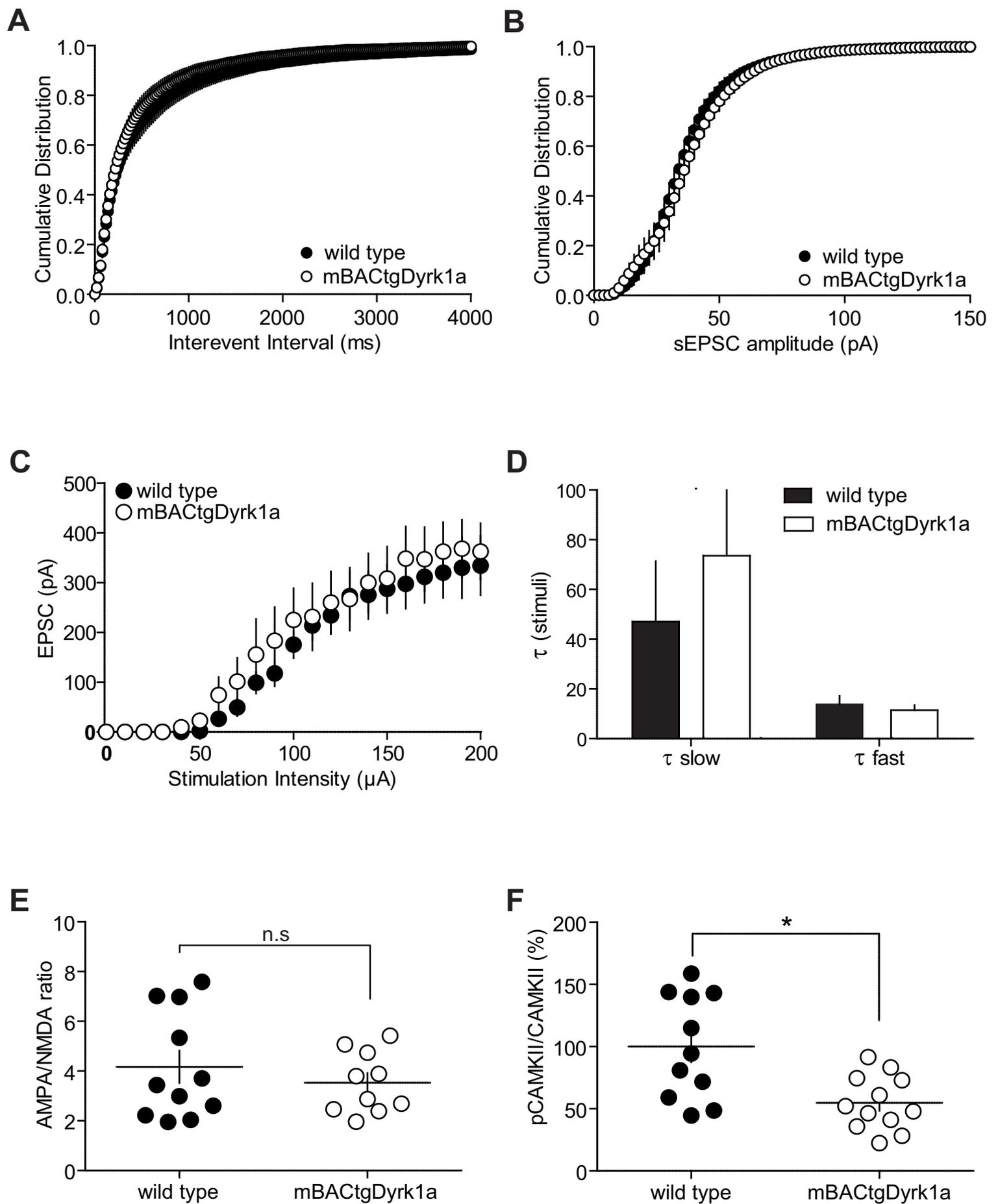


Figure 4

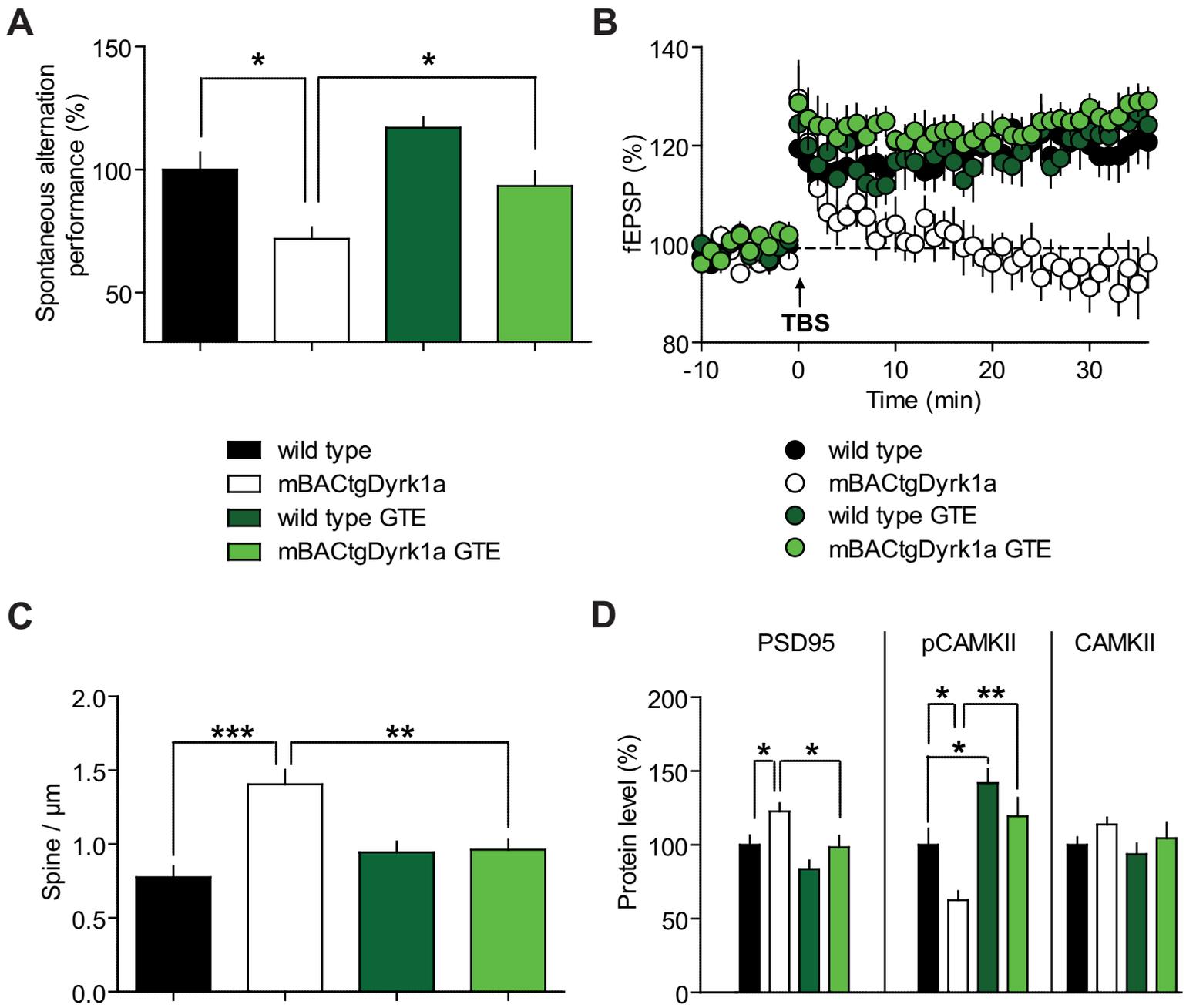


Figure 5

Supplementary Material

Green tea rescues prefrontal deficits in a mouse model of Down syndrome

Aurore Thomazeau, Zsuzsa Penke, Olivier Lassalle, Benoit Souchet, Jillian Iafrati, Fayçal Guedj, Nathalie Janel, Pascale Chavis, Jean Delabar, Benoit Delatour, and Olivier J. Manzoni

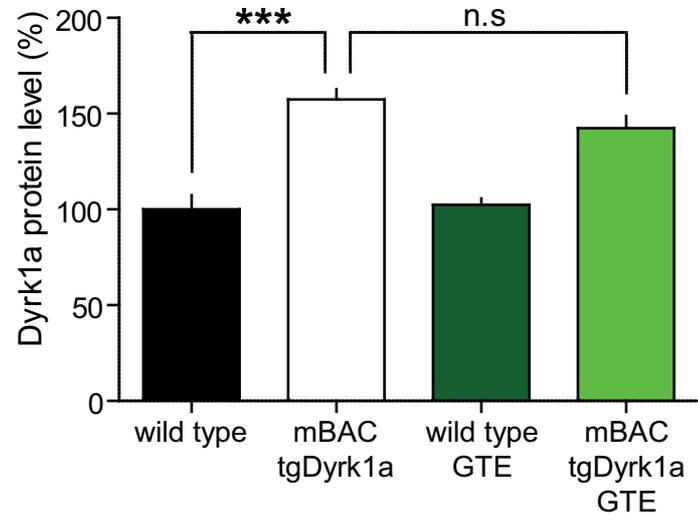
Supplementary Figure Legends

Supplementary Figure 1. DYRK1A protein level in wild type and mBACtgDyrk1a mice in control condition or treated with GTE.

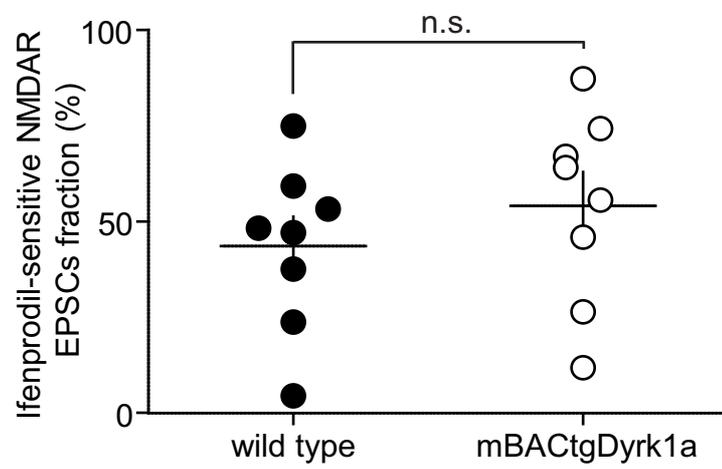
DYRK1A protein level is increased in mBACtgDyrk1a (white bar) mice compare to wild type mice (black bar) (100.00 ± 7.49 , $n = 8$ wild type versus 157.40 ± 5.28 , $n = 12$ mBACtgDyrk1a; *** $P = 0.0002$, Mann-Whitney U test). The GTE treatment had no effect on the DYRK1A protein level of wild type mice (compare black bar and dark green bar, 100.00 ± 7.49 , $n = 8$ wild type versus 102.48 ± 3.24 , $n = 10$ wild type GTE; $P > 0.05$, Mann-Whitney U test), nor of mBACtgDyrk1a (compare white bar and light green bar, 157.40 ± 5.28 , $n = 12$ mBACtgDyrk1a versus 142.46 ± 6.26 , $n = 7$ mBACtgDyrk1a GTE; $P > 0.05$, Mann-Whitney U test). The data are normalized to the baseline DYRK1A level of wild type mice fed with water. Error bars represent S.E.M.

Supplementary Figure 2. Ifenprodil inhibits a similar fraction of the NMDAR-mediated EPSC in the PFC of wild-type and mBACtgDyrk1a mice.

The fraction of the NMDAR-mediated EPSC sensitive to bath application of ifenprodil ($3 \mu\text{M}$, 15 min) a GluN2B-containing NMDAR inhibitor, was similar in PFC pyramidal neurons from wild type (black symbols) or mBACtgDyrk1a mice (white symbols) (1.77 ± 0.18 , $n = 7$ wild type versus 2.33 ± 0.37 , $n = 7$ mBACtgDyrk1a; $P > 0.05$, Mann-Whitney U test). Horizontal lines represent the mean value. Error bars represent S.E.M.



Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2

1.4. Discussion

Dans cette étude, nous avons mis en évidence un déficit cognitif préfrontal associé à un défaut de plasticité synaptique et une altération de la densité des épines dendritiques des neurones pyramidaux au sein des couches V/VI du CPF. Nous avons ensuite montré qu'un traitement au thé vert riche en EGCG, un polyphénol naturel inhibiteur de l'activité DYRK1A, dans l'eau de boisson pendant 1 à 2 mois était suffisant pour restaurer chez les animaux adultes des phénotypes normaux.

Le modèle mBACtgDyrk1a ne surexprime qu'une seule copie supplémentaire du gène Dyrk1a et contient 1.5 fois plus de protéine DYRK1A comparé aux souris ne surexprimant pas le gène. Cette relation directe dosage génique/dosage protéique mime parfaitement les phénotypes de la trisomie 21.

DYRK1A et épines dendritiques

La protéine DYRK1A interagit avec des protéines du cytosquelette (Park et al., 2012b), elles-mêmes impliquées dans la formation et le maintien des épines (Hotulainen and Hoogenraad, 2010). Il est donc envisageable qu'elle ait des effets, directs ou indirects, sur la morphologie neuronale, notamment au niveau des épines dendritiques, structures hautement malléables. Sachant le lien étroit en dosage génique et activité DYRK1A, l'augmentation de densité d'épines que nous avons obtenue chez les souris mBACtgDyrk1a corrèle avec les résultats des travaux dirigés par Guy Elston, à savoir une diminution du nombre d'épines dendritiques chez un modèle murin haploinsuffisant pour le gène Dyrk1a (Benavides-Piccione et al., 2005). Une étude récente suggère cependant que la surexpression de Dyrk1a induit une diminution du nombre d'épines (Martin de Lagran et al., 2012). Il faut noter que ces résultats ont été trouvés (Altafay et al., 2001) :

- au niveau des dendrites basales.
- dans des cultures de neurones pyramidaux issus du cortex moteur.
- chez un modèle murin contient au minimum deux copies supplémentaires du gène Dyrk1a (cf. Introduction **1.4.4.1**).

L'existence de nombreuses différences interstructurales au sein du SNC et l'importance du dosage génique Dyrk1a dans l'activité de la kinase pourraient expliquer une telle divergence de résultats.

Un excès d'épines ne serait pas indéniablement lié à l'amélioration de la connectivité neuronale. Ces épines peuvent en effet être non-contactées, contactées mais non-fonctionnelles, ou encore contactées par de « mauvais » partenaires (patron anormal).

Une augmentation du nombre d'épines dendritiques est également retrouvée dans un modèle murin du syndrome de l'X fragile, autre cause majeure de retard mental d'origine génétique (Scotto-Lomassese et al., 2011) (pour revue : Irwin et al., 2000).

En complément de l'analyse des épines dendritiques, il pourrait être également intéressant de dresser le profil de l'arborisation dendritique globale des neurones pyramidaux étudiés.

DYRK1A et activité synaptique

L'absence d'effet de la surexpression de Dyrk1a sur les propriétés neuronales intrinsèques ainsi que sur la transmission glutamatergique basale pourrait s'expliquer par la mise en place de mécanismes compensatoires ou homéostatiques. L'absence de modification de l'activité spontanée, en dépit d'une augmentation de la densité d'épines, coïnciderait avec le fait que ces épines soient non-fonctionnelles ou non-contactées. Il serait alors intéressant de quantifier les terminaisons présynaptiques fonctionnelles. L'absence de modification de fréquence des événements spontanés et de l'excitabilité synaptique chez les souris mBACtgDyrk1a ne suggérerait aucune modification du nombre de synapses.

L'absence de LTP dépendante des NMDA-R pourrait être en relation directe avec des taux anormaux de pCAMKII observés. En outre, les phénomènes de plasticité synaptique entraînent des modifications durables de la structure même des synapses (plasticité structurale) permettant de consolider, ou au contraire d'éliminer, des réseaux spécifiques de connexions neuronales en fonction de leur activation au cours d'apprentissages. L'absence de LTP que nous avons observée chez les souris mBACtgDyrk1a pourrait également s'expliquer par une perte de flexibilité morphologique due à une augmentation du nombre d'épines basales. Pour répondre à cette question, il serait intéressant de visualiser de manière dynamique la pousse des nouvelles épines induite par la plasticité synaptique (Bagal et al., 2005; Kwon and Sabatini, 2011).

Il est envisageable de mesurer la LTD dépendante des NMDA-R chez ces même souris. Toutefois, l'inhibition à l'EGCG a permis de mettre en évidence que la protéine DYRK1A n'était pas impliquée dans la LTD dépendante des NMDA-R au sein de l'hippocampe (Peineau et al., 2009).

Pharmacothérapie

De manière catégorique, l'administration systémique par l'eau de boisson d'extraits de thé vert riche en EGCG pendant un à deux mois restaure les paramètres biochimiques, morphologiques, synaptiques et comportementaux affectés chez les souris mBACtgDyrk1a. Ceci est d'autant plus surprenant que le traitement est effectué sur des animaux adultes avec des déficits déjà fermement établis. L'inhibition sélective de l'activité DYRK1A est donc efficace pour pallier les effets délétères induits par la surexpression du gène.

La restauration des épines dendritiques met bien en évidence le caractère dynamique de ces structures morphologiques. Elles sont finement régulées, révélant leur importance majeure dans l'activité des réseaux synaptiques.

Nos résultats démontrent que de nombreux effets délétères de la surexpression de DYRK1A sont réversibles, ce qui implique que les déficits sont directement causés par l'activité DYRK1A excessive durant la période adulte.

De manière intéressante, un traitement aigu (préincubation d'une heure) à l'EGCG de tranches contenant l'hippocampe a été testé sur les souris Ts65Dn. Il permettrait de restaurer la LTP qui est absente chez ces animaux (Xie et al., 2008). Ceci met en évidence

que le blocage de l'activité kinase excessive serait suffisant pour normaliser la LTP altérée chez ces animaux, révélant ainsi l'implication spécifique et réversible du surdosage Dyrk1a dans l'activité synaptique.

Cette étude permet de mettre en évidence :

- le rôle de **DYRK1A** dans la fonction synaptique.
- le lien entre la surexpression de Dyrk1a et les phénotypes neurocognitifs associées à la trisomie 21.
- le potentiel thérapeutique du ciblage de l'activité **DYRK1A** pour améliorer ces phénotypes.

2. Etude 2: “Overexpression of Dyrk1a alters endocannabinoid-mediated retrograde synaptic long-term depression in the mouse prefrontal cortex”.

En préparation

2.1. Contexte de l'étude

Le système endocannabinoïde est un système cérébral régulateur impliqué dans la gestion des réponses émotionnelles appropriées et dans le contrôle de l'humeur (Lutz, 2009). Il est impliqué dans diverses formes de plasticité synaptique permettant ainsi une régulation fine de l'activité neuronale (Freund et al., 2003). La dépression à long terme dépendante des eCB est retrouvée dans de nombreuses structures et est sous-tendue par des mécanismes à la fois pré- et postsynaptiques (cf. Introduction III.4.2.2). Elle est médiée par le 2-AG dans le CPF (Lafourcade et al., 2007). Les eCB sont produits et libérés à la demande par les neurones postsynaptiques, et leur inactivation dépend étroitement de leur dégradation enzymatique. La MAG-lipase et l'ABDH6 sont deux enzymes de dégradation du 2-AG et contrôlent ainsi l'efficacité de la signalisation endocannabinoïde dans le CPF (cf. Etude 4, Marrs et al., 2010). Cette structure est une région cérébrale clé dans la régulation des émotions et de l'humeur (cf. Introduction II. 4.2 et 5.4).

Des troubles de l'affect (intelligence émotionnelle) et de l'humeur associés à des dysfonctions préfrontales sont communément retrouvés dans la trisomie 21. Sachant que le gène *Dyrk1a* est un candidat majeur dans l'expression des phénotypes neurocognitifs associés à la pathologie :

- existe-t-il un lien entre la protéine DYRK1A et le système endocannabinoïde?
- les extraits du thé vert sont-ils en mesure de normaliser d'éventuels déficits de la LTD dépendante des eCB, ou est-il nécessaire d'envisager d'autres approches thérapeutiques et dans ce cas, lesquelles?

2.2. But de l'étude et approches expérimentales

Cette étude a pour objectifs d'examiner:

- les conséquences de la surexpression du gène *Dyrk1a* sur la LTD dépendante des eCB au sein des couches de sortie du CPF.
- l'effet du traitement au thé vert sur cette forme de plasticité synaptique.
- l'effet du blocage de la dégradation du 2-AG en interférant avec l'activité de ses enzymes de dégradation (cf. Etude 4).

Pour cela, les mêmes approches électrophysiologiques que celles exposées dans l'étude 1 ont été utilisées sur les souris *mBACtgDyrk1a*.

Des approches pharmacologiques ont également été utilisées afin d'inhiber spécifiquement l'activité des enzymes de dégradation du 2-AG, soit la MAG-lipase et l'ADHB6 (cf. Etude 4).

2.3. Résultats

Dans ce travail, nous avons dans un premier temps mis en évidence que la LTD dépendante des eCB induite par un stimulus téanique (10 minutes à 10 hertz) était absente chez les souris mBACtgDyrk1a (**Figure 1**).

Cette forme de LTD dépendant à la fois de mécanismes pré- et postsynaptiques, nous avons en premier lieu cherché à caractériser d'éventuelles altérations des mécanismes présynaptiques.

Un défaut en libération de glutamate pourrait expliquer l'absence de LTD. Nous avons donc dans un premier temps examiné la probabilité de libération du glutamate chez les souris mBACtgDyrk1a. Pour cela, nous avons étudié une forme de plasticité à court-terme dépendante de mécanismes présynaptiques (cf. Introduction **III.4.1.2.**). Cette facilitation à court-terme induite par des paires de stimulations n'est pas affectée chez les souris mBACtgDyrk1a (**Figure 2**). Corroborées par les résultats de l'étude précédente, ces données indiquent que la machinerie de libération présynaptique serait fonctionnelle chez ces animaux et ne serait pas donc responsable de l'absence de LTD dépendante des eCB.

Les eCB produits par le neurone postsynaptique et libérés dans la fente synaptique agissent sur leurs récepteurs métabotropiques CB1-R couplés négativement à la voie AC/PKA via les protéines Gi/o. Nous avons donc ensuite cherché à caractériser d'éventuels défauts des CB1-R présynaptiques chez les souris mBACtgDyrk1a. Nous avons pour cela testé un agoniste de ces récepteurs, le CP55,940, à différentes concentrations et observé la dépression de la libération synaptique de glutamate induite par stimulation des récepteurs. La courbe dose-réponse obtenue est similaire chez les deux groupes de souris (**Figure 3**). Ceci ne révélerait donc aucune altération fonctionnelle des CB1-R ainsi que de leurs voies de couplage chez les souris mBACtgDyrk1a.

De plus, nous avons mis en évidence que la LTD dépendante des mGluR2,3, était intacte chez ces animaux. Nous l'avons induite pharmacologiquement, par application sur les tranches d'un agoniste spécifique des récepteurs mGluR2,3 le LY379268. (**Supplementary figure 2**). Cette forme de LTD présynaptique emprunte la même signalisation intracellulaire que la LTD dépendante des eCB, traduisant une bonne fonctionnalité de la voie de transduction de cette forme de plasticité synaptique.

Nous avons exploré plus en détail l'activité de ces acteurs intracellulaires en aval des CB1-R. La PKA est un médiateur important. En effet, nous avons montré que l'inhibition de l'activité de cette kinase bloquait l'induction de la LTD dépendante des eCB dans les souris contrôles (**Supplementary figure 1**). La dépression induite par l'inhibition pharmacologique de la PKA est similaire chez les deux lignées murines (**Figure 4A**). Toutefois, l'activité de la voie AC/PKA serait altérée chez ces animaux. En effet, l'application d'un activateur de l'AC, la forskoline, induit une potentialisation chez les animaux contrôle, mais un potentiel moindre chez les animaux aneuploïdes (**Figure 4B**). La voie AC/PKA serait donc altérée chez les souris mBACtgDyrk1a d'une manière qu'il reste à préciser, affectant soit l'AC soit l'activation de la PKA. Cette altération ne serait cependant pas en cause dans l'absence observée de LTD dépendante des eCB.

De plus, nous avons mis en évidence en parallèle de l'étude **1** qu'un traitement des animaux aux extraits de thé vert permettait de restaurer la facilitation dépendante de l'AC chez les souris mBACtgDyrk1a (**Figure 5A**), mais n'avait à l'inverse aucun effet sur la LTD dépendante des eCB (**Figure 5B**).

Ceci révèle que des mécanismes autres que présynaptiques expliqueraient l'absence de LTD chez les animaux mBACtgDyrk1a.

Nous avons alors cherché à savoir si la production d'eCB pouvait être en jeu.

L'augmentation de la quantité basale de 2-AG permettait-elle de faciliter l'induction de la LTD? Nous avons pour cela cherché à limiter la dégradation du 2-AG. Nous avons bloqué sélectivement l'activité des enzymes de dégradation du 2-AG, la MAG-lipase et l'ABHD6, puis nous avons examiné si la LTD pouvait être alors induite par le protocole de stimulation téтанique. L'application du JLZ184, un inhibiteur spécifique de la MAG-lipase, permet de restaurer la LTD dépendante du 2-AG chez les souris mBACtgDyrk1a (**Figure 6A**). A l'inverse, l'application du WWL70, un inhibiteur de l'ABDH6, ne permet pas de restaurer la LTD chez les souris mBACtgDyrk1a (**Figure 6B**).

METHODS

Animals

All animal experiments were performed according to the criteria of the European Communities Council Directive (86/609/EEC). To generate the *Dyrk1a* overexpressing mouse and the murine bacterial artificial chromosome 189N3 (BAC-189N3) strain, the HM-1 embryonic stem (ES) cells was electroporated with the BAC-189N3 retrofitted with a G418 resistance gene. ES clone was selected for overexpression of *Dyrk1a* close to 1.5 ratio, and injected into blastocysts 3. All mice were weaned at 21 days. After weaning, they were caged socially in same-sex groups. The offspring were genotyped by PCR using tail genomic DNA as previously described (9). The PCR primer sequences were: forward and reverse mutated. PCR conditions were as follows: 1 cycle, 3 min at 95°C; 40 cycles, 45 sec at 95°C, 45 sec at 53°C, 45 sec 72°C; 1 cycle, 5 min at 72°C. Male Tg189N3 (mBACtgDyrk1a) mice and controls from the same litter were used in electrophysiological and morphological studies at 4 to 6 months of age.

Green tea treatment

Male (3-4 months old) wild type and mBACtgDyrk1a mice were fed with water or with green tea extract (GTE)-containing water. GTE was administered orally, in the form of a solution containing 0.25% green tea decaffeinated extract (LifeExtension© For Longer Life©, Ft. Lauderdale, FL, USA) and 0.25% glucose. GTE contained ~45% EGCG. The GTE solution was freely available in home cage feeding bottles and was renewed every 24 hours. Depending on daily intake, the dose ranged between 120mg and 200 mg/kg. Administration of the diet started 4-6 weeks before experimentation and continued, for behaviorally assessed mice, on the testing day.

Prefrontal cortex slice preparation

Prefrontal cortex slices were prepared as previously described 40. Mice were anesthetized with isoflurane and decapitated. The brain was sliced (300 μ m) in the coronal plane (Integraslice, Campden Instruments, Leicester, U.K.) and maintained in physiological saline (4°C). Slices were stored for 30 min at 32–35°C in artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing 126 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2.4 mM MgCl₂, 1.2 mM CaCl₂, 18 mM NaHCO₃, 1.2 mM NaH₂PO₄ and 11 mM glucose, equilibrated with 95% O₂/5% CO₂. Slices were stored at 22 \pm 2 °C until recording.

Electrophysiology

Whole-cell patch-clamp and extracellular field recordings were made from layer V/VI pyramidal cells in coronal slices of mouse prelimbic PFC 40. For recording, slices were superfused (2ml/min) with ACSF. All experiments were done at 32–35 °C. The ACSF contained picrotoxin (100 μ M) to block GABAA receptors. To evoke synaptic currents, 150-200 μ s stimuli were delivered at 0.1Hz through an ACSF-filled glass electrode placed in layer II/III. For extracellular field experiments, the recording pipette was filled with ACSF. The glutamatergic nature of the field excitatory postsynaptic potential (fEPSP) was confirmed at the end of the experiments using the ionotropic glutamate receptor antagonist 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX, 20 μ M), that specifically blocked the synaptic component without altering the nonsynaptic component (data not shown). LTD was induced using a low frequency tetanic protocol consisting of 10 hertz stimulation during 10 minutes.

For whole-cell patch-clamp, pyramidal neurons in PFC layer V/VI were visualized using an infrared microscope (BX-50, Olympus). Experiments were made with electrodes containing 128mM potassium gluconate (KGlu), 20mM NaCl, 1mM MgCl₂, 1mM EGTA, 0.3mM CaCl₂, 2mM Na²⁺-ATP, 0.3mM Na⁺-GTP, 10mM glucose buffered with 10mM HEPES, pH 7.3, osmolarity 290mOsm. Electrode resistance was 4–6MΩ. If access resistance (no compensation, <25MΩ) changed by >20%, the experiment was rejected. To perform the voltage-clamp experiments, evoked EPSCs were recorded at -70mV (KGlu-based solution).

Data acquisition and analysis

The potential reference of the amplifier was adjusted to zero before breaking into the cell or entering the slice. Data were recorded on a MultiClamp700B (Axon Instruments), filtered at 2kHz, digitized (20kHz, DigiData 1440A, Axon Instrument), collected using Clampex 10.2 and analyzed using Clampfit 10.2 (all from Molecular Device, Sunnyvale, USA). Analysis of both area and amplitude of fEPSP and EPSCs was performed (graphs depict amplitudes for patch clamp experiments and areas for field recordings). The magnitude of LTD was calculated 25-30 minutes after tetanic protocol as percentage of baseline responses.

Drugs

Drugs were added at the final concentration to the ACSF. Picrotoxin was from Sigma (St. Quentin Fallavier, France). DNQX and JZL184 were from the National Institute of Mental Health's Chemical Synthesis and Drug Supply Program (Rockville, MD, USA). CP55,940, H89, LY379268 and WWL70 were from Tocris (Bristol, UK).

Statistical analysis.

The value *n* corresponds to the number of animals. All values are given as mean ± s.e.m. and statistical significance was set at $P < 0.05$. Statistical analysis of electrophysiological and morphological data was performed with GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Two sample comparisons were made with the Mann-Whitney *t* test.

Figure Legends

Figure 1. Endocannabinoids-mediated long-term depression is abolished in mBACtgDyrk1a mice.

A. Low frequency (10 minutes at 10 Hertz) of layers II/III induced a long-term depression (LTD) of evoked EPSCs recorded in layer V/VI pyramidal neurons in wild type mice (black symbols) (100.90 ± 0.86 , $n = 8$, wild type baseline versus 73.72 ± 2.90 $n = 7$, wild type 25-30; $P = 0.003$, Mann-Whitney U-test) but not in mBACtgDyrk1a mice (99.03 ± 1.40 , $n = 8$, mBACtgDyrk1a baseline versus 102.02 ± 4.50 $n = 7$, mBACtgDyrk1a 25-30; $P > 0.05$, Mann-Whitney U-test). **B.** Cumulative probability distribution of the normalized EPSCs 30 minutes after the LTD induction (wild type, $n = 7$, black symbols; mBACtgDyrk1a, $n = 7$, white symbols).

Figure 2. Presynaptic CB1 Receptor is intact in mBACtgDyrk1a mice.

Dose-response curve for the cannabimimetic CP55,940 in wild type (black symbols) and mBACtgDyrk1a littermates (white symbols) (0.1 mM : 29.09 ± 4.59 $n = 9$ versus 29.48 ± 4.90 $n = 7$. 1 mM : 38.87 ± 4.85 $n = 10$ vs 44.12 ± 5.00 $n = 8$. 10 mM : 43.72 ± 5.93 $n = 8$ vs 42.87 ± 5.32 $n = 8$; $P > 0.05$, Mann-Whitney U-test). fEPSPs amplitudes were measured 30 minutes after application of CP55,940. Each point is expressed as the percentage of inhibition of its basal value. Error bars represent S.E.M..

Figure 3. Short-term plasticity is intact mBACtgDyrk1a mice.

A. Representative recording of successive stimuli induced EPSCs in wild type and mBACtgDyrk1a mice. **B.** Summarized results showing similar in paired-pulse ratio after Dyrk1a overexpression. Time interval between stimulations varied from 25 to 400 ms (wild type, white bar, versus mBACtgDyrk1a, black bar. 25 ms : 1.96 ± 0.16 $n = 9$ versus 2.07 ± 0.11 $n = 8$. 50 ms : 1.73 ± 0.09 $n = 12$ vs 1.69 ± 0.09 $n = 8$. 100 ms : 1.46 ± 0.08 $n = 10$ vs 1.31 ± 0.10 $n = 7$. 200 ms : 1.22 ± 0.06 $n = 9$ vs 1.19 ± 0.06 $n = 6$. 300 ms : 1.15 ± 0.07 $n = 8$ vs 1.07 ± 0.04 $n = 7$. 400 ms : 1.16 ± 0.09 $n = 4$ vs 1.16 ± 0.06 $n = 3$; $P > 0.05$, Mann-Whitney U-test). EPSCs sizes were normalized to the amplitude of the first response. Histograms represent the mean value. Error bars represent S.E.M..

Figure 4. The AC/AMPC/PKA pathway is affected in mBACtgDyrk1a mice.

A. PKA activity is intact in mBACtgDyrk1a mice. Application of the PKA inhibitor, H89 (10 μ M), induced a depression of evoked EPSCs recorded in layers V/VI pyramidal neurons in wild type mice (black symbols) (97.42 ± 1.20 , $n = 9$, wild type baseline versus 78.08 ± 4.82 $n = 7$, wild type 25-35; $P = 0.002$, Mann-Whitney U-test), and in mBACtgDyrk1a mice (98.89 ± 0.34 , $n = 9$ mBACtgDyrk1a baseline versus 85.31 ± 6.61 $n = 7$, mBACtgDyrk1a 25-35; $P = 0.0229$, Mann-Whitney U-test). Average time course of mean EPSCs were normalized to baseline. Error bars represent S.E.M.. **B.** The Adenylate Cyclase activator forskoline (10 μ M) largely augmented evoked EPSCs in wild type mice (black symbols, 100.19 ± 2.27 , $n = 6$, wild type

baseline versus 165.17 ± 5.67 $n = 6$, wild type 30-35; $P = 0.0022$, Mann-Whitney U-test). The forskoline enhancement in BACtgDyrk1a mice (white symbols, 96.74 ± 1.52 , $n = 9$, mBACtgDyrk1a baseline versus 132.26 ± 10.61 , $n = 8$, mBACtgDyrk1a 30-35; $P = 0.0055$, Mann-Whitney U-test) was greatly reduced compared to wild type mice (30-35: 165.17 ± 5.67 $n = 6$, wild type versus 132.26 ± 10.61 , $n = 8$, mBACtgDyrk1a 30-35; $P = 0.02$, Mann-Whitney U-test).

Figure 5. Drinking tea extracts restore the AC-dependant potentiation but not the endocannabinoids-mediated long-term depression in mBACtgDyrk1a mice.

A. GTE treatment rescue the forskoline enhancement in mBACtgDyrk1a (light green symbols, 99.89 ± 0.78 , $n = 12$, mBACtgDyrk1a baseline versus 184.34 ± 20.40 , $n = 7$, mBACtgDyrk1a 30-35; $P = 0.0005$, Mann-Whitney U-test) and had no effect on wild type mice (dark green symbols, 100.33 ± 1.83 $n = 8$, wild type baseline versus 193.31 ± 19.42 $n = 5$, wild type 30-35; $P = 0.0016$, Mann-Whitney U-test). Average time course of mean fEPSPs were normalized to baseline (wild type, black symbols; BACtgDyrk1a, white symbols, BACtgDyrk1a GTE, grey symbols). Error bars represent S.E.M. **B.** 4-5 month-old mBACtgDyrk1a mice were treated for one month with green tea extract (GTE, drinking water). **A.** GTE treatment of adults mice had no effect on eCB-LTD in mBACtgDyrk1a mice (light green symbols) (99.43 ± 0.67 , $n = 7$, mBACtgDyrk1a GTE baseline versus 111.18 ± 7.35 $n = 7$, mBACtgDyrk1a GTE 25-35; $P > 0.05$, Mann-Whitney U-test). Moreover, the GTE treatment abolished eCB-LTD in wild type mice (dark green symbols) (100.14 ± 0.83 , $n = 12$, wild type GTE baseline versus 82.04 ± 6.54 $n = 8$, wild type GTE 25-30; $P > 0.05$, Mann-Whitney U-test). Average time course of mean EPSCs were normalized to baseline. Error bars represent S.E.M..

Figure 6. Inhibition of MAG lipase but not ABDH6 rescues LTD in mBACtgDyrk1a mice.

A. Bath incubation with the selective MAG lipase inhibitor, JZL184 ($1 \mu\text{M}$), restored eCB-LTD in mBACtgDyrk1a mice (grey symbols) (100.93 ± 1.71 , $n = 10$, mBACtgDyrk1a JZL184 baseline versus 82.04 ± 6.54 $n = 8$, mBACtgDyrk1a JZL184 25-30; $P = 0.043$, Mann-Whitney U-test). **B.** In contrast, bath incubation with the potent selective ABDH6 inhibitor, WWL70 ($10 \mu\text{M}$), had no effect on eCB-LTD (grey-circled white symbols) (100.94 ± 2.29 , $n = 6$, mBACtgDyrk1a JZL184 baseline versus 97.95 ± 13.41 $n = 4$, mBACtgDyrk1a JZL184 25-30; $P > 0.05$, Mann-Whitney U-test). Average time course of mean EPSCs were normalized to baseline. Error bars represent S.E.M..

Supplementary figure legends

Supplementary figure 1. Endocannabinoids-mediated long-term depression depends on PKA activity.

Application of the PKA inhibitor, H89 (10 μ M), blocked the LTD induction of evoked EPSCs recorded in layers V/VI pyramidal neurons in wild type mice (black symbols) (97.53 ± 1.63 , n = 6, wild type baseline versus 120.77 ± 15.59 n = 6, wild type 25-30; P > 0.05, Mann-Whitney U-test). Average time course of mean EPSCs were normalized to baseline. Error bars represent S.E.M..

Supplementary figure 2. mGluR2/3 LTD is normal in mBACtgDyrk1a mice.

10 minutes application of the mGluR2,3 agonist, LY379268 (100 nM), induced similar LTD of evoked fEPSPs recorded in layers V/VI pyramidal neurons in wild type mice (black symbols) (97.09 ± 0.98 , n = 6, wild type baseline versus 53.50 ± 9.07 n = 6, wild type 25-30; P = 0.0022, Mann-Whitney U-test) and in mBACtgDyrk1a mice (white symbols) (96.53 ± 0.94 , n = 4, mBACtgDyrk1a baseline versus 48.60 ± 5.02 n = 4, mBACtgDyrk1a 25-30; P = 0.0286, Mann-Whitney U-test). Average time course of mean fEPSPs were normalized to baseline. Error bars represent S.E.M..

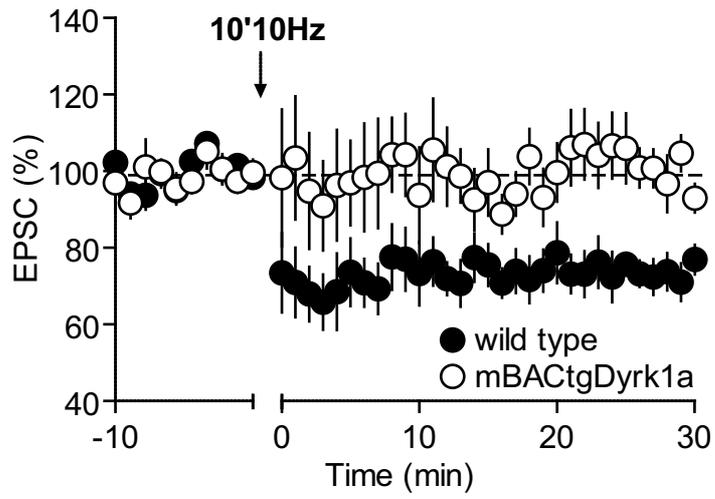
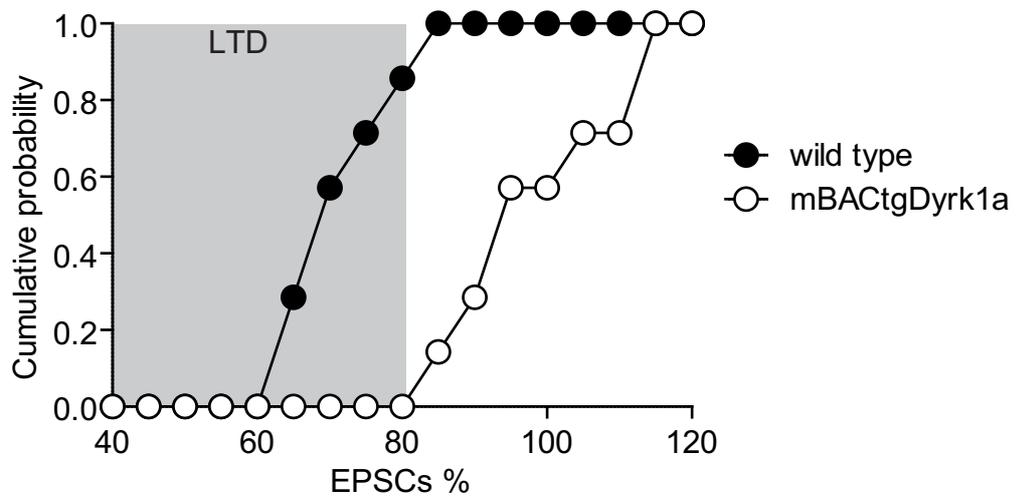
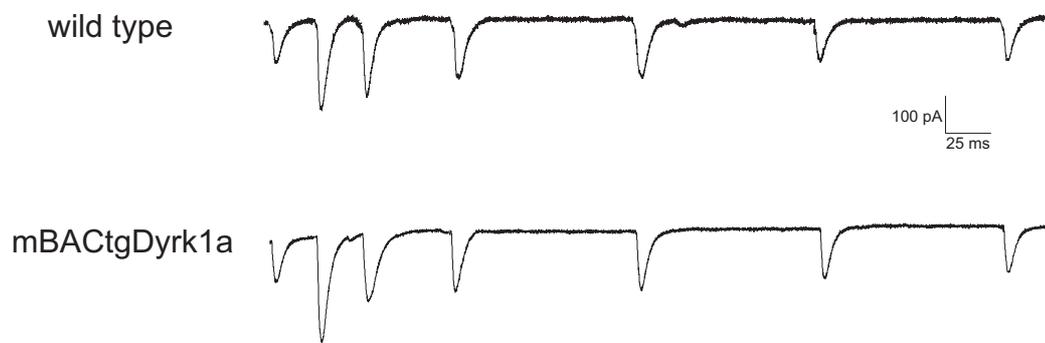
A**B**

Figure 1

A



B

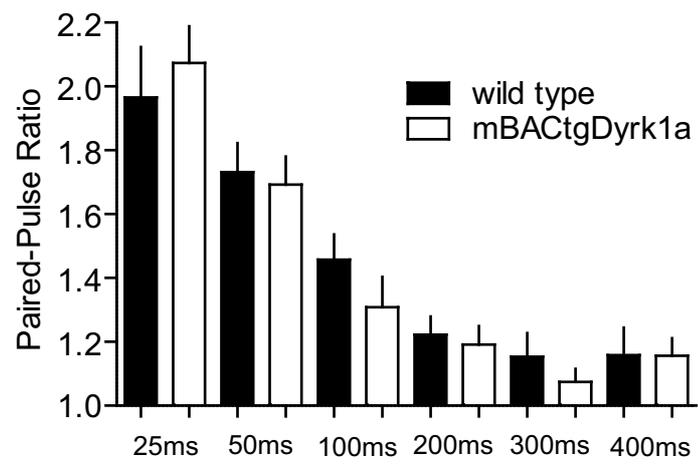


Figure 2

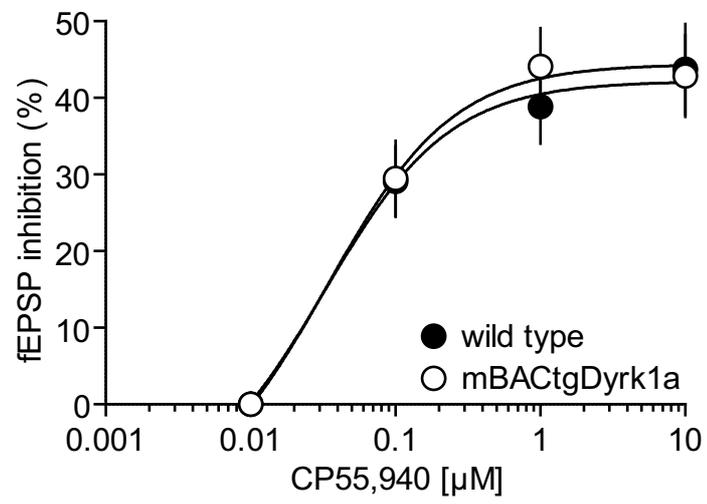
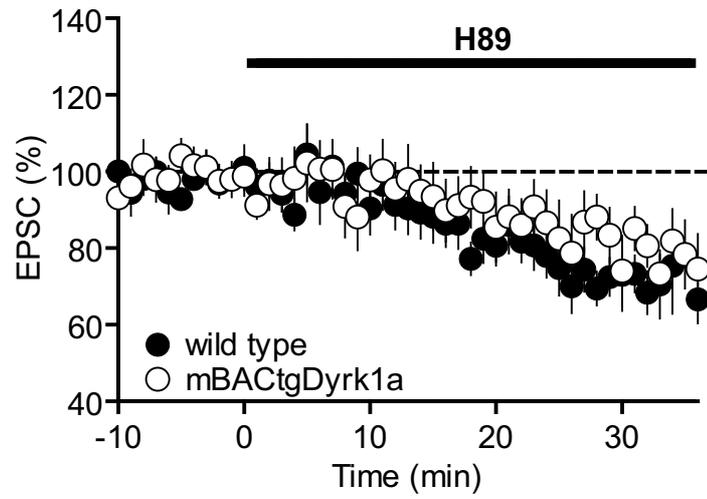
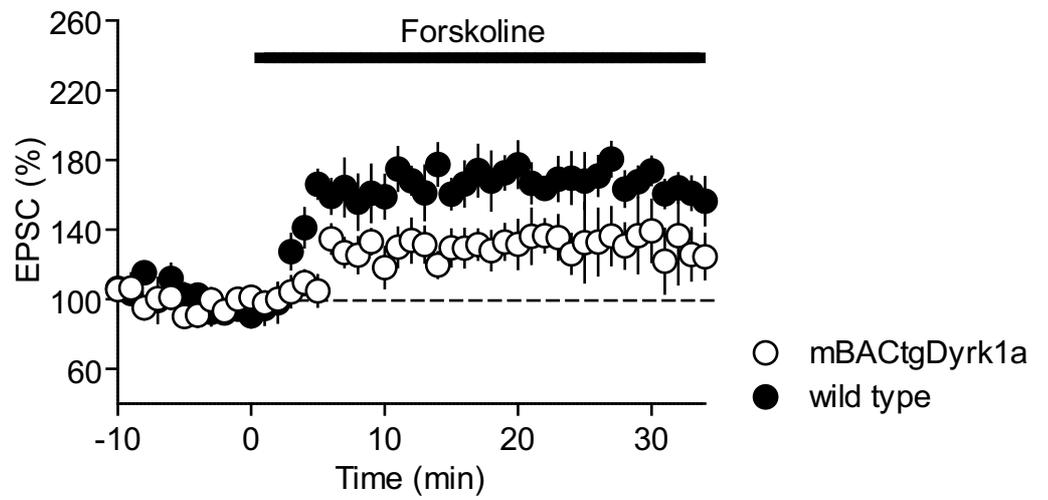
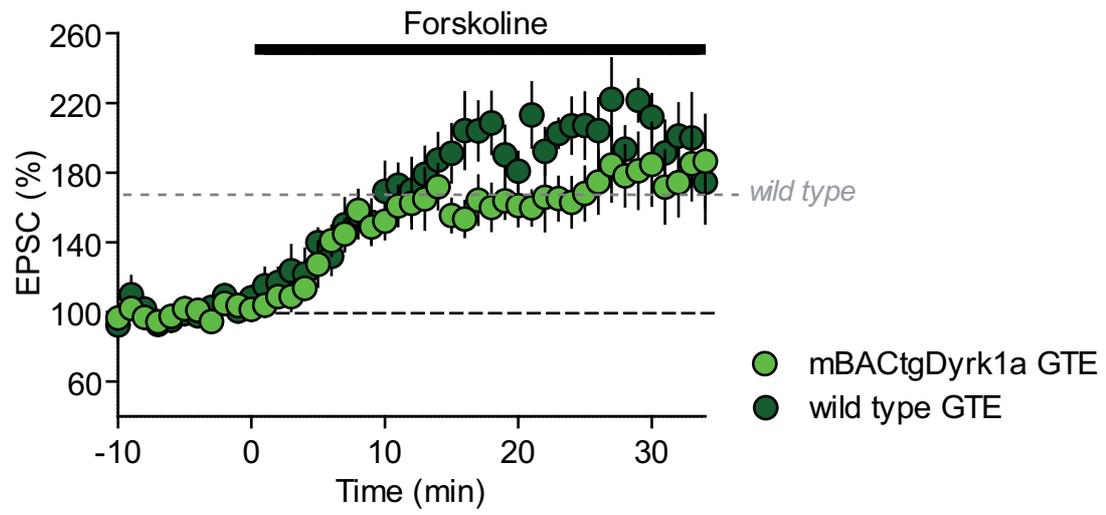
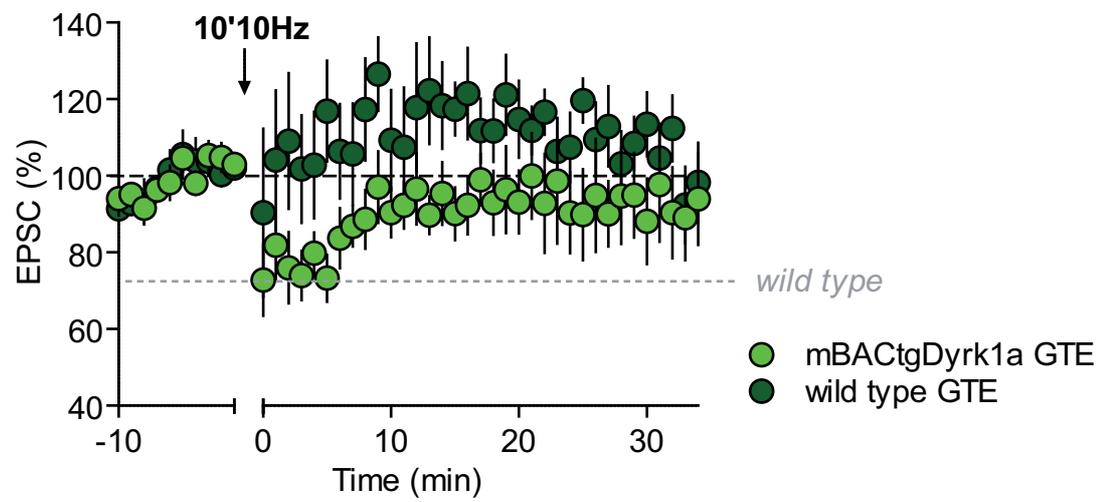
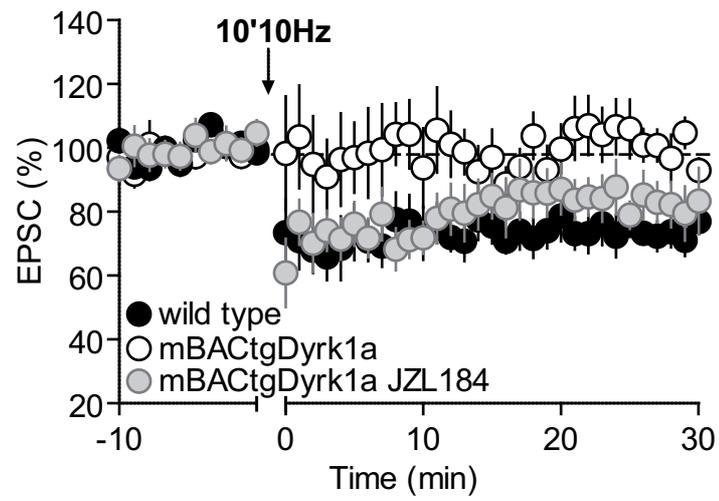
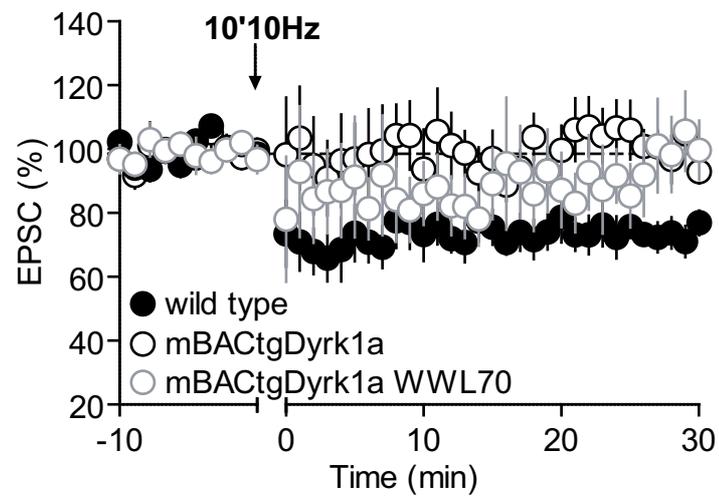
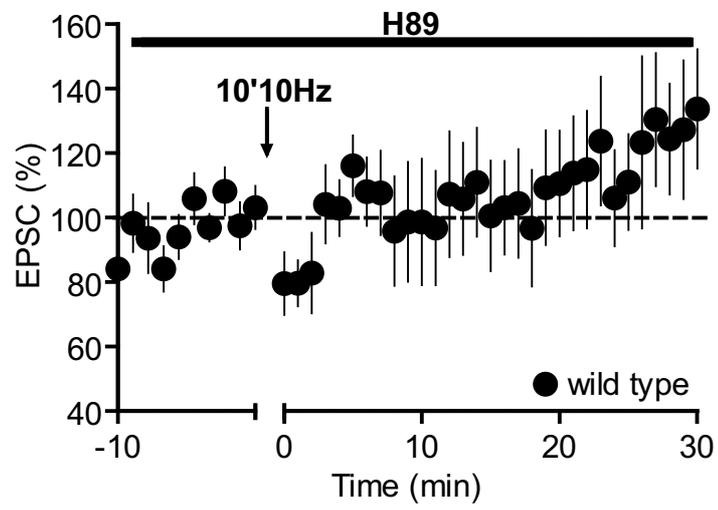


Figure 3

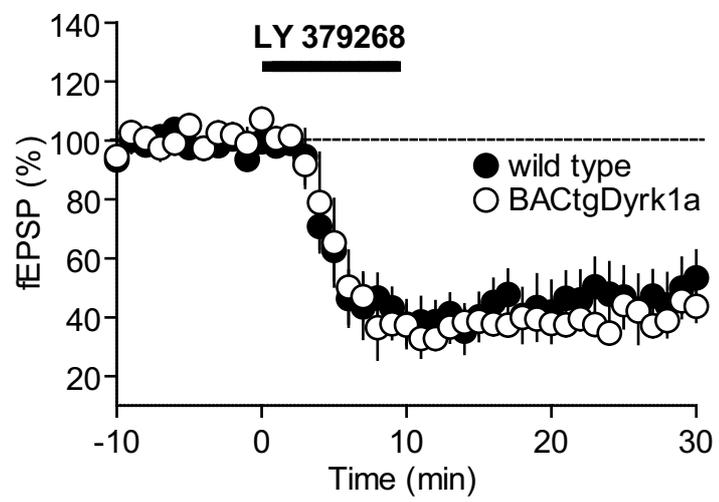
A**B****Figure 4**

A**B****Figure 5**

A**B****Figure 6**



Supplementary figure 1



Supplementary figure 2

2.4. Discussion

Dans cette étude, nous avons montré que la surexpression du gène *Dyrk1a* induisait des altérations de la LTD dépendante des eCB au sein du CPF. Ceci ne s'expliquerait ni par un défaut dans la machinerie de libération présynaptique, ni par une altération fonctionnelle des récepteurs CB1-R présynaptiques et de leur voie de couplage. Nous avons ensuite montré que le traitement au thé vert n'était pas efficace pour restaurer cette forme de plasticité. Cependant, un traitement aigu des tranches issues de souris *mBACtgDyrk1a* avec l'inhibiteur de la MAG-lipase permettait le recouvrement de la LTD endocannabinoïde.

DYRK1A et plasticité endocannabinoïde

Ces résultats traduiraient un lien étroit entre la surexpression du gène *Dyrk1a* et le cycle de production/dégradation des eCB. Différents mécanismes peuvent être impliqués :

- l'activation des récepteurs postsynaptiques mGluR5.
- la production du 2-AG par la DAG-lipase.
- la dégradation du 2-AG.

Tester l'activité mGluR5 par application d'un agoniste pourrait être une première étape. Toutefois, elle ne permettrait pas d'éclaircir quel (-s) mécanisme (-s) en aval du récepteur est (sont) affecté (-s). De plus, l'activation pharmacologique directe et massive du récepteur est difficile à interpréter car tous les récepteurs, pas exclusivement les synaptiques, sont touchés. Les mGluR5 sont normalement positionnés en pérисynaptique. Leur déplacement dans le compartiment extrasynaptique les découplerait de la DAG-lipase affectant ainsi la production d'eCB. La DAG-lipase pourrait elle aussi être délocalisée, et donc découplée du mGluR5. Ce cas de figure est observé dans le modèle murin du syndrome de l'X fragile (Sepers et al, en révision, Nature Communication).

Aspect thérapeutique

Il est intéressant de voir que, contrairement aux résultats obtenus dans la première étude, le traitement aux extraits de thé vert n'a ici aucun effet sur la LTD dépendante des eCB. Mieux encore, il aurait des effets délétères sur cette forme de plasticité car il abolit la LTD chez les souris contrôles. Ceci reflète la sensibilité et l'étroite régulation de la plasticité endocannabinoïde.

Nous avons également réalisé des traitements aigus des tranches contenant le CPF des souris *mBACtgDyrk1a* à l'EGCG ou encore à l'harmine. Ce procédé ne permet pas non plus de restaurer la LTD chez les animaux surexprimant *Dyrk1a*. Il est envisageable que l'augmentation de la durée et/ou de la concentration en EGCG de ce traitement pourrait en améliorer l'efficacité.

Les expériences avec les inhibiteurs des enzymes de dégradations appuient l'hypothèse que la kinase DYRK1A aurait un rôle dans la production d'eCB. Elles permettent d'une part de comprendre les mécanismes physiopathologiques des défauts engendrés par la surexpression du gène *Dyrk1a*, et d'autre part d'envisager de nouvelles pistes thérapeutiques.

Le fait que l'inhibition de l'ABDH6 ne permette pas de restaurer la LTD s'expliquerait par le fait que cette enzyme ne participe que minoritairement à l'hydrolyse du 2-AG. En effet, 80% de la dégradation du 2-AG est assurée par la MAG-lipase, et les 20% restant par l'ABHD6 (Marrs et al., 2010, cf. 4). De plus, elles ont chacune des spécificités propres telles que :

- leur localisation cellulaire : la MAG-lipase est localisée dans les terminaisons présynaptiques, l'ABDH6 est présente au niveau de la membrane postsynaptique.
- leur répartition intracellulaire : la MAG-lipase est cytosolique tandis que l'ABHD6 est ancrée à la membrane postsynaptique.
- leur taux cellulaire : même si elle est très effective dans l'hydrolyse du 2-AG, la MAG-lipase n'est que faiblement exprimée contrairement à l'ABDH6, plus fortement représentée.

Une autre hypothèse explicative pour le manque d'effet du WWL70 pourrait être que la surexpression du gène *Dyrk1a* interfère, directement ou non, avec l'expression ou encore l'activité de l'ABDH6.

L'utilisation d'un autre inhibiteur spécifique de l'enzyme, le WWL123 (Bachovchin et al., 2010) pourrait confirmer notre résultat.

On pourrait également essayer un cocktail d'inhibiteurs ciblant à la fois la MAG-lipase et l'ABHD6. Toutefois, l'augmentation trop importante de l'accumulation du 2-AG peut aboutir à l'activation tonique des CB1-R et à leur désensibilisation subséquente (Marrs et al., 2010).

La signalisation endocannabinoïde pourrait également être évaluée chez les souris *mBACtgDyrk1a* par l'étude d'une forme de plasticité à court terme dépendante du 2-AG: la DSI ou la DSE (« Depolarization Induced Suppression of Inhibition/Excitation »). La DSI peut être induite au niveau des couches II/III du CPF (Yoshino et al., 2011 ; Marrs et al., 2010).

Cette étude, parallèlement à l'étude précédente, révèle :

- **l'importance du rôle physiologique joué par la protéine DYRK1A dans les phénomènes de plasticité synaptiques et son interaction, directe ou non avec le système endocannabinoïde.**
- **une nouvelle piste thérapeutique pour déjouer les effets néfastes engendrés par la surexpression du gène *Dyrk1a* sur la signalisation endocannabinoïde.**

3. Etude 3 : Profil synaptique glutamatergique dans le CPF du modèle murin de trisomie 21 Ts65Dn.

Données préliminaires non publiées

3.1. Contexte de l'étude

Les études comparatives des différents modèles murins de trisomie 21 sont intéressantes pour comprendre l'implication relative des différents gènes candidats dans les phénotypes de la maladie. Les deux études précédentes ont mise en évidence que la perturbation du dosage génique de la protéine DYRK1A avait des effets délétères sur la gamme de plasticité synaptique des neurones pyramidaux préfrontaux, sur leur densité d'épine, le tout associé à des défauts comportementaux. Ces résultats confirment l'implication de la protéine DYRK1A dans l'activité synaptique et l'hypothèse de gène candidat dans les déficits neurocognitifs associés à la trisomie 21.

Le parallèle entre le modèle Ts65Dn et le modèle monogénique Dyrk1a est intéressant dans la mesure où les souris Ts65Dn surexpriment également, en plus de nombreux autres gènes, le gène Dyrk1a. Comme précisé précédemment, le modèle Ts65Dn, modèle de référence pour la trisomie 21, a fait l'objet de nombreuses études électrophysiologiques, mais jusque-là uniquement au sein de l'hippocampe.

3.2. But de l'étude et approches expérimentales

Le but de cette étude a donc été de caractériser la transmission et la plasticité synaptique glutamatergique au sein du CPF des souris Ts65Dn.

Des approches d'électrophysiologiques similaires aux études précédentes ont été utilisées, soit des enregistrements de neurone unique en patch-clamp et de potentiels de champs extracellulaires effectués sur des tranches contenant le CPF.

3.3. Résultats

3.3.1. Propriétés intrinsèques des neurones pyramidaux du CPF

Les caractéristiques intrinsèques des neurones pyramidaux des couches V/VI du CPF ont été étudiées en patch-clamp mode « current-clamp ».

Les courbes représentant la relation entre le courant injecté dans le neurone et la variation du potentiel membranaire révèlent une différence entre les souris Ts65Dn et les souris contrôles de la même portée. En effet, les neurones pyramidaux des souris aneuploïdes présentent une augmentation de la rectification entrante (**Fig. 1A**). Toutefois, aucune variation du potentiel de membrane n'a été reportée (**Fig. 1B**). L'intensité minimale de courant à injecter pour induire le premier PA est plus élevée chez les souris Ts65Dn, traduisant une diminution de l'excitabilité membranaire (**Fig. 1C**). Cependant, le nombre de PA émis suite à l'injection incrémentielle de courant est identique chez les deux lignées de souris (**Fig. 1D**).

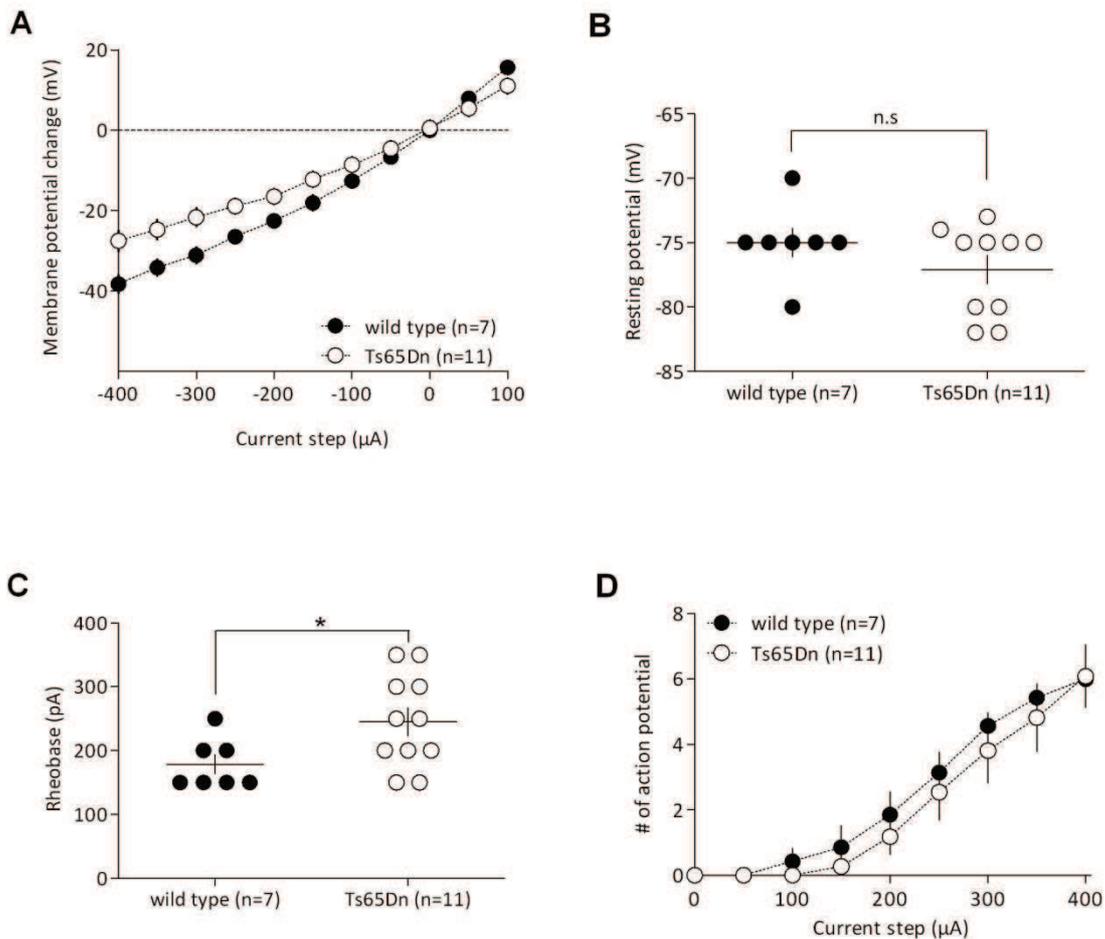


Fig. 1. Les propriétés intrinsèques des neurones pyramidaux des couches V/VI du CPF sont modifiées chez les souris Ts65Dn.

A. Résumé des courbes courant-voltage (I-V) enregistrées dans les neurones pyramidaux des deux lignées montrant une augmentation de la rectification entrante chez les souris Ts65Dn (symboles blancs) par rapport aux souris contrôles (symboles noirs). Le potentiel membranaire de repos est similaire dans les deux génotypes (**B.** -75.00 ± 1.09 , souris contrôles, symboles noirs ; -77.10 ± 1.10 , souris Ts65Dn, symboles blancs ; $P > 0.05$, test de Mann-Whitney) à l'inverse de la rhéobase, qui est plus élevée chez les souris Ts65Dn (**C.** 168.75 ± 16.19 , souris contrôles, symboles noirs ; 245.45 ± 25.56 , souris Ts65Dn, symboles blancs ; $P = 0.0496$, test de Mann-Whitney) La ligne horizontale représente la valeur moyenne. **D.** Le résumé des courbes courant-décharge indique que le nombre de potentiel d'action évoqués en réponse à des pas d'injection de courant est similaire dans les neurones pyramidaux des deux lignées. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne.

3.3.2. Gamme de plasticité synaptique

Nous avons ensuite étudié chez ces animaux diverses formes de plasticité synaptique reposant sur des mécanismes distincts.

La LTD dépendante des eCB est absente chez les souris Ts65Dn. Le stimulus téτανique basse fréquence (10 minutes à 10 hertz) induit une LTD chez les souris contrôles, et, de manière surprenante, une LTP chez les souris Ts65Dn (**Fig.2**). Nous avons ensuite examiné la facilitation dépendante de la voie de signalisation AC/AMPC présynaptique. Cette forme de plasticité n'est pas affectée chez les animaux Ts65Dn. En effet, la potentialisation induite par l'activation pharmacologique de l'AC est intacte dans la lignée aneuploïde (**Fig.3**). La LTP dépendante des NMDA-R postsynaptiques n'est également pas altérée chez les souris Ts65Dn (**Fig.4**). La stimulation téτανique de type « théta burst » des couches II/III du CPF induit une augmentation de la réponse des potentiels de champs évoqués des couches V/VI similaire dans les deux lignées.

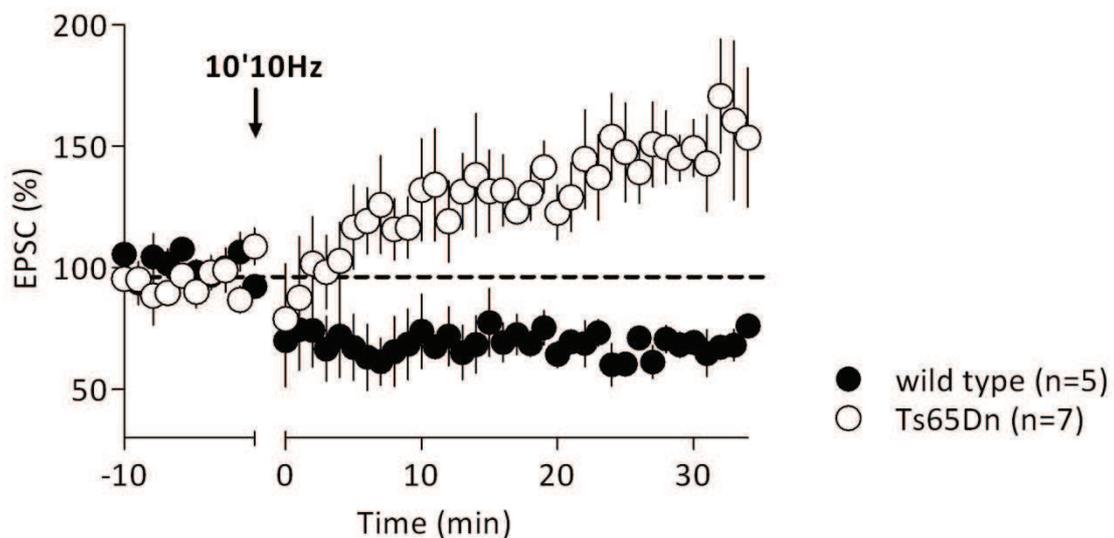


Fig. 2. La LTD dépendante des endocannabinoïdes est absente chez les souris Ts65Dn.

Une stimulation basse fréquence (10 minutes à 10 hertz) des couches II/III induit une dépression à long-terme des CPSE enregistrés dans les neurones pyramidaux des couches V/VI du CPF dans les souris contrôles (symboles noirs, 101.28 ± 1.07 , ligne de base versus 72.57 ± 4.08 , 30-35 minutes ; $P = 0.0079$, test de Mann-Whitney), mais une potentialisation à long-terme chez les souris Ts65Dn (symboles blancs, 95.27 ± 2.21 , ligne de base versus 149.47 ± 20.40 , 30-35 minutes ; $P = 0.0025$, test de Mann-Whitney).

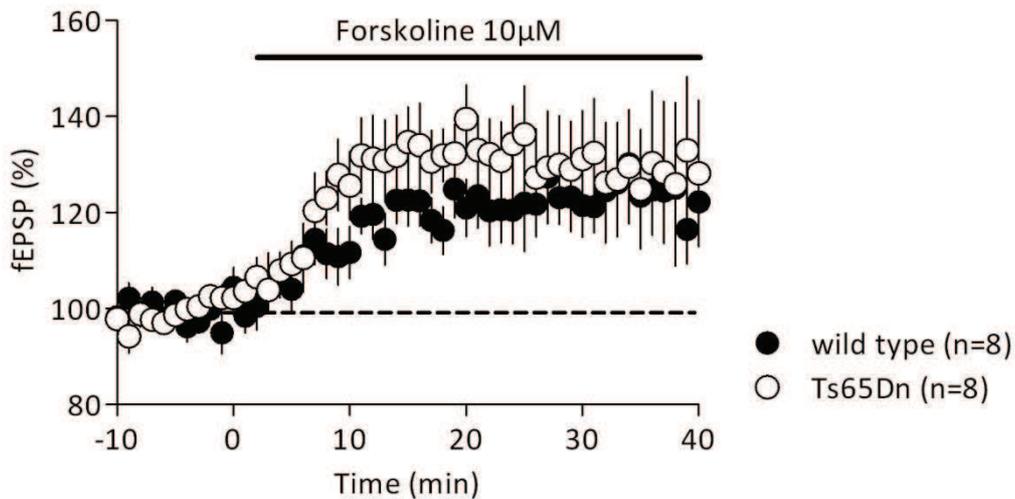


Fig. 3. La facilitation dépendante de l'adénylate cyclase est intacte chez les souris Ts65Dn.

L'incubation dans le bain de perfusion de l'activateur de l'adénylate cyclase, la forskoline, induit une augmentation des PPSEchs enregistrés dans les couches V/VI dans les souris contrôles (symboles noirs, 98.63 ± 0.55 , ligne de base versus 122.75 ± 6.81 , 35-40 minutes ; $P = 0.0104$, test de Mann-Whitney) et dans les souris Ts65Dn (symboles blancs, 98.94 ± 0.24 , ligne de base versus 131.97 ± 13.46 , 35-40 minutes ; $P = 0.0205$, test de Mann-Whitney).

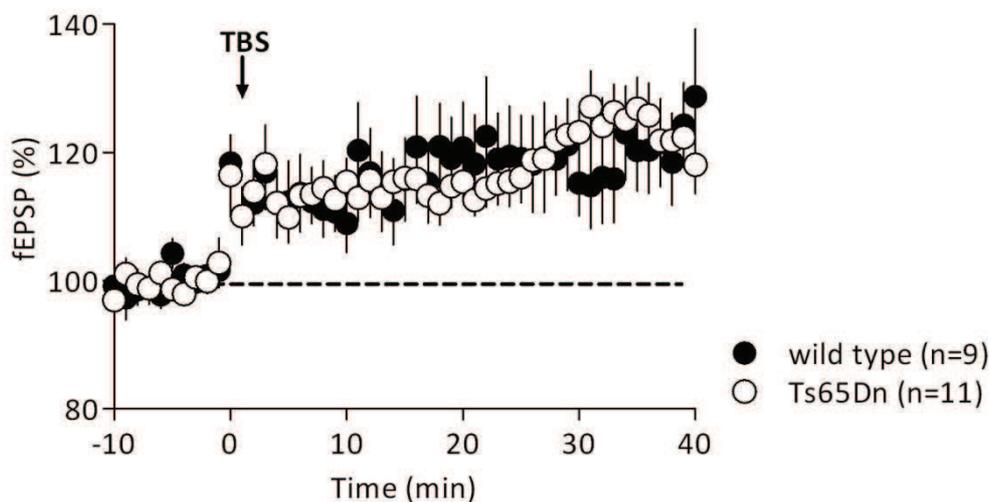


Fig. 4. La LTP dépendante des NMDA-R est intacte dans le modèle murin Ts65Dn.

Une stimulation de type « thêta burst » (TBS) des couches II/III du CPF induit une potentialisation à long-terme des PPSEc enregistrés dans les couches V/VI dans les souris contrôles (symboles noirs, 99.82 ± 0.29 , ligne de base versus 119.15 ± 5.88 , 35-40 minutes ; $P = 0.0056$, test de Mann-Whitney) et dans les souris Ts65Dn (symboles blancs, 99.67 ± 0.35 , ligne de base versus 123.17 ± 4.49 , 35-40 minutes ; $P = 0.0039$, test de Mann-Whitney).

3.4. Discussion

Dans cette étude, nous avons montré que les souris Ts65Dn présentaient des modifications des propriétés intrinsèques des neurones pyramidaux ainsi qu'une gamme de plasticité synaptique partiellement affectée au sein du CPF.

Ce modèle murin de trisomie 21 surexprime environ 130 gènes de l'analogie murin du HSA21, le MMU16, notamment le gène *Dyrk1a*. Cependant, ces résultats diffèrent de ceux obtenus chez les souris *mBACtgDyrk1a*. Les déficits des souris Ts65Dn absents chez les *mBACDyrk1a* refléteraient la mise en place de mécanismes néfastes sous-tendus par la surexpression de gènes autres que *Dyrk1a*. A l'inverse, l'absence chez les Ts65Dn des défauts retrouvés chez les *mBACDyrk1a* traduirait des activités synergiques et/ou compensatoires de ces gènes présents en trois copies.

Le quantité de protéine DYRK1A serait 1,5 fois supérieure dans les cerveaux des animaux Ts65Dn (Dowjat et al., 2007). Il serait cependant nécessaire de s'assurer que ce taux est similaire spécifiquement au sein du CPF des animaux Ts65Dn.

La gamme des plasticités synaptiques glutamatergiques serait nettement moins altérée chez les souris Ts65Dn comparativement aux souris *mBACtgDyrk1a*. Parmi les plasticités testées, seule la LTD dépendante des endocannabinoïdes est défailante. D'un point de vue mécanistique, cette forme de plasticité est plus complexe que les plasticités dépendantes des NMDA-R ou des mGluR, car elle implique une série de partenaires à la fois pré- et postsynaptiques. Ceci pourrait expliquer le fait qu'elle soit plus sensible à des modifications cellulaires.

Toutefois, le protocole utilisé dans notre étude, le plus commun pour étudier la LTD dépendante des endocannabinoïdes, induit étonnement une LTP chez les souris Ts65Dn. Une seule forme LTP dépendante d'endocannabinoïde a été reportée jusque-là, et impliquerait les CB1R astrocytaires (Navarrete and Araque, 2010). Une étude a cependant montré que les endocannabinoïdes pouvaient faciliter l'induction de la LTP dans l'hippocampe par suppression de la transmission inhibitrice (Carlson et al., 2002). Or, dans notre cas, la transmission inhibitrice médiée par les GABA-R est bloquée pharmacologiquement. Il serait donc important de mettre en évidence l'éventuelle implication dans cette LTP des endocannabinoïdes ou, hypothèse plus probable, celle des NMDA-R.

Pour une comparaison plus exhaustive avec les *mBACtgDyrk1a*, il serait nécessaire d'approfondir l'étude du profil synaptique de ces animaux, à savoir :

- la transmission glutamatergique basale.
- la LTD dépendante des mGluR2,3 présynaptiques.
- la densité des épines dendritiques.
- la longueur et complexité de l'arborisation dendritique.

Le parallèle entre ce modèle d'étude plus complet de la trisomie 21 avec le modèle monogénique de surexpression de *Dyrk1a* fait ressortir la complexité des mécanismes physiopathologiques responsables des symptômes neurocognitifs de la maladie.

4. Collaboration: “The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors”

Nature Neuroscience, 2010

J’ai participé au début de ma thèse à un projet collaboratif supervisé par le docteur Nephi Stella (University of Washington, Seattle, Washington) relatif à la régulation fonctionnelle des eCB par leurs enzymes de dégradation.

4.1. Contexte de l’étude

Les eCB, l’anandamide et le 2-AG, sont des dérivés des phospholipides membranaires et contrôlent :

- la neurotransmission, via leurs récepteurs CB1 neuronaux dont l’activation induit une diminution de la libération de neurotransmetteur.
- la neuroinflammation, via les récepteurs CB2 présents au niveau des cellules microgliales régulant leur motilité et la production de neuromodulateurs.

Ces composés sont produits à la demande (Marsicano et al., 2003). Les étapes enzymatiques impliquées dans la production et l’inactivation des eCB sont donc des points critiques dans la régulation de leur fonction. Leurs enzymes de dégradation permettent de contrôler leur accumulation dans la fente synaptique et donc leur efficacité d’activation des récepteurs. L’anandamide est dégradée par la FAAH et le 2-AG majoritairement par la MAG lipase (Blankman et al., 2007). L’inhibition sélective des enzymes hydrolytiques distinctes permet un contrôle différentiel de la signalisation endocannabinoïde, chaque hydrolase pouvant fournir un potentiel thérapeutique unique.

4.2. But de l’étude et approches expérimentales

Deux nouvelles enzymes de dégradation du 2-AG ont récemment été mises en évidence : l’ α/β Hydrolase Domain Protein 6 (ABHD6) et l’ABDH12 (Blankman et al., 2007). Le contrôle, par ces enzymes, de l’accumulation et de l’efficacité du 2-AG au niveau de ses récepteurs demeure inconnu.

Pour éclaircir ce point, cette étude a combiné différentes techniques de :

- transgénèse par utilisation de ARNsh dirigés contre les gènes codant pour les différentes enzymes (ABDH6, FAAH) afin d’en éteindre l’expression.
- pharmacologie pour l’inhibition spécifique de ces enzymes
- biochimie afin de tester leur activité hydrolytique.
- immunocyto/histochimie pour leur localisation cellulaire.
- imagerie par microscopie électronique également pour leur localisation subcellulaire
- épifluorescence pour mesurer la migration microgliale.
- électrophysiologie pour tester le rôle des enzymes dans la plasticité synaptique.

Elles ont été utilisées sur :

- des cultures cellulaires:

- de microglies murines (lignée BV-2, C57BL/6)
- de fibroblastes de singe (lignée COS-7)
- des tranches de cerveau de souris contenant le CPF.

4.3. Résultats

Dans cette étude, différents points ont été mis en évidence, d'une part dans les cellules microgliales, d'autre part dans les neurones.

L'ABHD6 hydrolyse le 2-AG dans les cellules microgliales

L'ABHD6 participerait pour environ 20% à la dégradation du 2-AG dans des fractions cellulaires isolées ainsi que dans des cellules intactes.

L'ABHD6 contrôle l'efficacité du 2-AG au niveau des CB2-R

L'inactivation du gène codant pour l'ABHD6 induit une augmentation de la migration microgliale CB2-R dépendante.

L'ABHD6 est exprimée dans les neurones

Une grande quantité d'ARNm du gène codant pour l'ABHD6 est retrouvée dans les cerveaux murins adultes et les cultures neuronales primaires.

L'utilisation de l'inhibiteur synthétique spécifique de l'ABHD6, le WWL70, a mis en évidence que la contribution relative de l'enzyme dans la dégradation du 2-AG était plus importante dans les neurones que dans les cellules microgliales.

L'ABHD6 et la MAG lipase contrôlent l'accumulation du 2-AG dans les neurones

L'ABHD6, la MAG lipase mais pas la FAAH hydrolysent le 2-AG dans les neurones intacts. L'inhibition de ces deux enzymes par respectivement le WWL70 et le JZL184 a montré que les deux, mais préférentiellement la MAG lipase, régulaient l'accumulation « stimulus-dépendante » du 2-AG sans en affecter le taux basal. Ceci se fait de manière non-chevauchante, traduisant un contrôle indépendant par l'ABHD6 et de la MAG lipase de l'accumulation du 2-AG.

L'ABHD6 régule la LTD dans le CPF de souris adulte

L'ABDH6 est exprimée de manière postsynaptique dans les neurones glutamatergiques du CPF de souris adultes.

On a vu précédemment qu'une stimulation téτανique (10 minutes à 10 hertz) induisait dans le CPF une forme de LTD dépendante de l'effet du 2-AG sur les CB1-R présynaptiques (cf introduction III.4.2.2.). Un stimulus sous-liminaire (5 minutes à 10 hertz) échoue à induire cette LTD. Toutefois, l'inhibition des enzymes hydrolytiques du 2-AG par le WWL70 ou le JZL184 facilite l'induction de la LTD par stimulation sous-liminaire. Ceci révèle que la MAG lipase mais également l'ABHD6 permettent de contrôler l'efficacité du 2-AG au niveau des CB1-R présynaptiques.

The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors

William R Marrs¹, Jacqueline L Blankman^{2,11}, Eric A Horne^{3,11}, Aurore Thomazeau⁴, Yi Hsing Lin³, Jonathan Coy³, Agnes L Bodor⁵, Giulio G Muccioli⁶, Sherry Shu-Jung Hu⁷, Grace Woodruff⁸, Susan Fung¹, Mathieu Lafourcade⁴, Jessica P Alexander², Jonathan Z Long², Weiwei Li², Cong Xu³, Thomas Möller⁹, Ken Mackie⁷, Olivier J Manzoni⁴, Benjamin F Cravatt² & Nephthys Stella^{3,10}

The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol (2-AG) regulates neurotransmission and neuroinflammation by activating CB₁ cannabinoid receptors on neurons and CB₂ cannabinoid receptors on microglia. Enzymes that hydrolyze 2-AG, such as monoacylglycerol lipase, regulate the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors. We found that the recently described serine hydrolase α - β -hydrolase domain 6 (ABHD6) also controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors. In cells from the BV-2 microglia cell line, ABHD6 knockdown reduced hydrolysis of 2-AG and increased the efficacy with which 2-AG can stimulate CB₂-mediated cell migration. ABHD6 was expressed by neurons in primary culture and its inhibition led to activity-dependent accumulation of 2-AG. In adult mouse cortex, ABHD6 was located postsynaptically and its selective inhibition allowed the induction of CB₁-dependent long-term depression by otherwise subthreshold stimulation. Our results indicate that ABHD6 is a rate-limiting step of 2-AG signaling and is therefore a bona fide member of the endocannabinoid signaling system.

In the nervous system, the endocannabinoids (eCBs) arachidonylethanolamide (anandamide) and 2-AG are produced and inactivated by neurons and glia^{1,2}. The production of eCBs increases in response to specific stimuli, including membrane receptor activation, ion channel opening and calcium influx². eCBs are inactivated by cellular uptake followed by intracellular enzymatic hydrolysis^{3,4}. The balance between this production and inactivation dictates the levels of extracellular eCB accumulation and the ensuing activation of CB₁ receptors expressed by neurons (regulating neurotransmitter release) and CB₂ receptors expressed by microglia (regulating their motility and ability to produce immunomodulators)⁴⁻⁷. Thus, the enzymatic steps that control the production and inactivation of eCBs constitute promising molecular targets for indirectly modulating CB₁ and CB₂ receptor activity, and thereby controlling neurotransmission and neuroinflammation.

Of all the steps that control the accumulation of eCBs, the hydrolytic enzymes that inactivate anandamide and 2-AG represent the most promising pharmacological and genetic targets for fine-tuning the local accumulation of these lipid transmitters. Inhibition of fatty acid amide hydrolase (FAAH) increases anandamide levels in the brain and leads to CB₁-mediated analgesia, and also has anxiolytic and antidepressant effects⁸⁻¹⁰. The inhibition of monoacylglycerol lipase (MAGL) increases

2-AG levels in the brain and leads to CB₁-mediated analgesia and hypomotility¹¹⁻¹³. Notably, these therapeutic outcomes are achieved without eliciting the broad spectrum of cognitive effects that are typically associated with direct CB₁ receptor agonists⁸⁻¹². Conversely, concomitant inhibition of FAAH and MAGL leads to an increase in the levels of both anandamide and 2-AG in the brain, recapitulating many of the effects produced by direct CB₁ receptor agonists¹⁴. Together, these results suggest that the selective inhibition of distinct eCB-hydrolyzing enzymes allows differential control of eCB signaling, with each hydrolase likely to provide unique therapeutic opportunities. This idea has led to the search for novel enzymes responsible for eCB hydrolysis.

There is evidence that, in addition to MAGL, the brain expresses other enzymes that can hydrolyze 2-AG. Pharmacological inhibition of MAGL in crude brain homogenates does not fully eliminate 2-AG hydrolysis, leaving ~20% of this activity intact^{15,16}. Furthermore, immunoprecipitation of MAGL from brain cytosolic fractions reduces 2-AG hydrolysis by only ~50%¹⁷. BV-2 cells hydrolyze 2-AG even though they do not express MAGL mRNA¹⁸. Two new enzymes that are expressed in the brain and can hydrolyze 2-AG (ABHD6 and ABHD12) were recently identified using a functional proteomics approach¹⁵ (activity-based protein profiling–multidimensional protein identification technology:

¹Neurobiology and Behavior Graduate Program, University of Washington, Seattle, Washington, USA. ²The Skaggs Institute for Chemical Biology and Department of Chemical Physiology, The Scripps Research Institute, La Jolla, California, USA. ³Department of Pharmacology, University of Washington, Seattle, Washington, USA. ⁴INSERM U862, Equipe Physiopathologie de la plasticité synaptique, Bordeaux, France. ⁵Department of Otolaryngology, University of Washington, Seattle, Washington, USA. ⁶Bioanalysis and Pharmacology of Bioactive Lipids Laboratory, CHAM7230, Louvain Drug Research Institute, Université catholique de Louvain, Bruxelles, Belgium. ⁷Department of Psychological and Brain Sciences, Gill Center for Biomolecular Science, Indiana University, Bloomington, Indiana, USA. ⁸Neurobiology Undergraduate Program, University of Washington, Seattle, Washington, USA. ⁹Department of Neurology, University of Washington, Seattle, Washington, USA. ¹⁰Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, University of Washington, Seattle, Washington, USA. ¹¹These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to N.S. (nstella@uw.edu).

Received 16 March; accepted 23 June; published online 25 July 2010; doi:10.1038/nn.2601

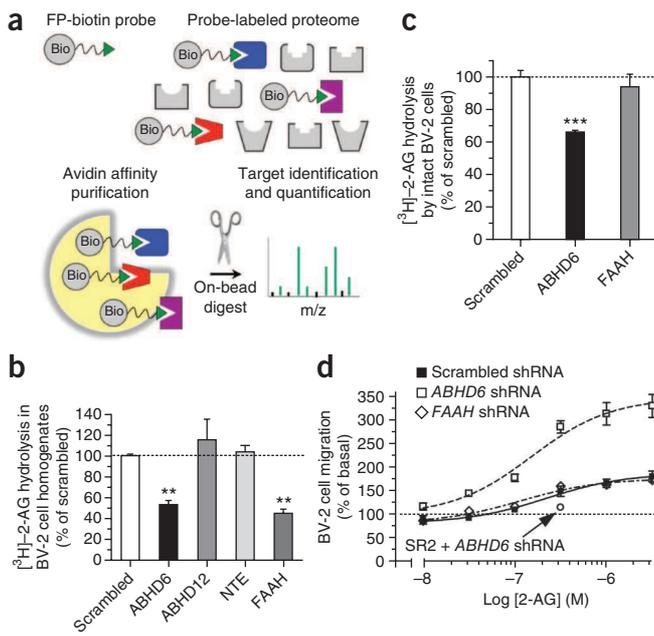


Figure 1 ABHD6 hydrolyzes 2-AG in BV-2 cells and controls the efficacy of 2-AG at CB₂ receptors. **(a)** Cartoon scheme of the ABPP-MudPIT procedure used to identify serine hydrolases expressed by BV-2 cells. **(b)** [³H]-2-AG hydrolysis in homogenates prepared from BV-2 cells infected with shRNAs targeting *ABHD6*, *ABHD12*, *NTE* or *FAAH*, compared to scrambled shRNA. ***P* < 0.01 compared to scrambled response (ANOVA one-way, Dunnett's post test). **(c)** [³H]-2-AG hydrolysis in intact BV-2 cells infected with shRNA targeting either *ABHD6* or *FAAH*, compared to scrambled shRNA. ****P* < 0.0001 compared to scrambled response (Student's *t* test). **(d)** 2-AG-induced cell migration of BV-2 cells infected with shRNA targeting *ABHD6* or *FAAH*, compared to scrambled shRNA. Data are expressed as percentage of basal migration (migration of the shRNA-treated clones in the presence of 0.1% DMSO). The 2-AG response is inhibited by pretreatment with the CB₂ receptor antagonist SR144528 (SR2, 200 nM). Data are shown as mean ± s.e.m. of 3–5 independent experiments, each performed in triplicate. The percentage knockdown was systematically verified for each infection and reported in **Supplementary Table 1**.

ABPP-MudPIT¹⁹). Whether these enzymes control the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors in intact brain cells still needs to be directly tested. Here we used ABPP-MudPIT to identify the unknown 2-AG-hydrolyzing activity expressed by BV-2 cells, and found that it is ABHD6. We then tested whether ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors in several models: intact BV-2 cells, mouse microglia in primary culture, mouse neurons in primary culture, and slices prepared from adult mouse brain.

RESULTS

ABHD6 hydrolyzes 2-AG in BV-2 cells

It has been shown that the unknown 2-AG-hydrolyzing activity expressed by BV-2 cells is sensitive to methyl arachidonyl fluorophosphonate (MAFP), a non-selective serine hydrolase inhibitor, and enriched in the mitochondrial fraction of these cells¹⁸. These results suggest that this enzyme can be isolated from BV-2 cell fractions by using a fluorophosphonate-based probe that targets serine hydrolases (FP-biotin)²⁰, and subsequently identified by the functional proteomics platform ABPP-MudPIT^{19,21} (**Fig. 1a**). As an initial proof of concept, we found that the FP-biotin probe inhibited ~90% of the [³H]-2-AG hydrolysis in BV-2 mitochondrial fractions (**Supplementary Fig. 1**). We carried out FP-biotin pull-down and subsequent ABPP-MudPIT analysis on both BV-2 mitochondrial and BV-2 cytosolic fractions (which show a ~10-fold difference in their amount of 2-AG-hydrolyzing activity¹⁸) with the goal of identifying serine hydrolases that are differentially expressed between these two fractions. Of the ten enzymes that were most highly enriched in the mitochondrial fraction (**Table 1**), four have been shown to hydrolyze 2-AG: ABHD12, NTE, FAAH and ABHD6 (ref. 15). MAGL was not detected in either of the BV-2 cell fractions, consistent with the previous finding that BV-2 cells do not express *MAGL* mRNA¹⁸. Thus, using FP-biotin probes and ABPP-MudPIT analysis,

we identified ABHD12, NTE, FAAH and ABHD6 as viable candidates for the unknown 2-AG-hydrolyzing activity expressed by BV-2 cells.

We then used short hairpin RNA (shRNA) constructs to selectively knockdown the expression of each candidate enzyme in BV-2 cells to determine the relative contribution of each enzyme to the 2-AG hydrolysis measured in these cells. To obtain reliable knockdowns of each enzyme, we tested 25 shRNA constructs (**Supplementary Table 1**). Using the most efficient shRNAs, we found that knocking down the expression of *ABHD6* or *FAAH* each reduced [³H]-2-AG hydrolysis in BV-2 cell homogenates by ~50%, whereas knocking down the expression of *ABHD12* or *NTE* had no significant effect (**Fig. 1b**). These data provide two important results. First, they confirm genetically that FAAH is responsible for ~50% of the [³H]-2-AG hydrolysis measured in BV-2 cell homogenates (consistent with the finding that ~50% of the [³H]-2-AG hydrolysis in BV-2 cell homogenates is sensitive to the FAAH inhibitor URB597¹⁸). Second, they suggest that ABHD6 (rather than ABHD12 or NTE) is responsible for the remaining 50% of the 2-AG hydrolysis in BV-2 cell homogenates, and thus lead us to conclude that ABHD6 is the novel enzyme for which we have been searching.

ABHD6 controls 2-AG's efficacy at CB₂ receptors

Results showing that an enzyme hydrolyzes a specific lipid in cell homogenates do not necessarily mean that the enzyme also hydrolyzes this lipid in intact cells. For example, FAAH hydrolyzes both anandamide and 2-AG in cell homogenates, but often only hydrolyzes anandamide in intact cells^{18,22}. To determine whether ABHD6 hydrolyzes

Table 1 Four serine hydrolases were identified as candidates for the 2-AG-hydrolyzing activity measured in BV-2 cells

IPI number	Common name	Abbreviation	2-AG hydrolase activity	Spectral counts (mitochondrial fraction)	Spectral counts (cytosolic fraction)
IPI00331610	Patatin-like phospholipase domain 7 (NTE-related esterase)	PNPLA7	No	163	0
IPI00165731*	α-β hydrolase 12	ABHD12	Yes	44	0
IPI00128034*	Neuropathy target esterase	NTE	Yes	31	0
IPI00117176*	Fatty acid amide hydrolase	FAAH	Yes	24	0
IPI00321386*	α-β hydrolase 6	ABHD6	Yes	23	0
IPI00108883	FAM108B	FAM108B	No	23	0
IPI00403586	Arylacetamide deacetylase-like 1 (KIAA1363)	AADA CL1	No	260	1
IPI00170213	α-β hydrolase 11	ABHD11	No	64	2
IPI00319188	Lipoprotein lipase	LPL	No	37	2
IPI00136683	Acyl coenzyme A thioester hydrolase 2	ACOT2	No	35	3

ABPP was performed on subcellular fractions from BV-2 cells to identify functional serine hydrolases. Listed are the ten enzymes that were the most abundant in the mitochondrial fraction relative to the cytosolic fraction. *indicates enzymes that are known to hydrolyze 2-AG when transfected and their activity assessed in homogenates.

Table 2 *ABHD6* is abundantly expressed in brain and more is found in neurons than microglia

	<i>HPRT</i> CT	δ CT (<i>ABHD6</i>)	Relative (%)
Brain	21.5–23.7	1.8	100
BV-2	22.9–23.2	3.9	23
Microglia	20.8–23.0	4.7	13
Neurons	23.2–24.2	3	44

Levels of *ABHD6* mRNA were quantified by qPCR and normalized to the housekeeping gene *HPRT*. Here the range of threshold cycles (CT) that we obtained in our measurements is provided, showing that *HPRT* can be used to compare *ABHD6* mRNA levels between different cells and tissue. Relative expression levels of *ABHD6* (calculated using δ - δ CT) were assessed in BV-2 cells, microglia and neurons, and compared to total brain (which was set at 100%). Independent qPCR measurements were performed in independent cell cultures and brain tissue samples ($N = 3$ to 4).

2-AG in intact cells, we incubated intact BV-2 cells in culture with [3 H]-2-AG and measured the production of free [3 H]-glycerol. Intact BV-2 cells efficiently hydrolyzed [3 H]-2-AG, and this activity was significantly reduced in BV-2 cells infected with shRNA targeting *ABHD6*, whereas this activity was unaffected in BV-2 cells infected with shRNA targeting *FAAH* (Fig. 1c). These data show that, unlike *FAAH*, *ABHD6* hydrolyzes 2-AG in intact BV-2 cells.

BV-2 cell migration is stimulated by 2-AG, and this response is blocked by the CB₂ receptor antagonist SR144528 (ref. 23). Here, to determine whether *ABHD6* controls the efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors, we tested whether *ABHD6* knockdown in BV-2 cells increases this response. Using an unbiased method that quantifies cell migration with a near-infrared-emitting dye²⁴, we found that 2-AG increased the migration of BV-2 cells infected with either scrambled shRNA or shRNA targeting *FAAH* ~2-fold, but stimulated by ~3-fold the migration of BV-2 cells infected with shRNA targeting *ABHD6* (Fig. 1d). This result supports the notion that less 2-AG is hydrolyzed when *ABHD6* is knocked down, and thus more 2-AG reaches and activates CB₂ receptors. Three controls are worth noting here. First, the stimulatory effect of 2-AG on the migration of *ABHD6*-knockdown BV-2 cells was blocked by the CB₂ receptor antagonist SR144528 (Fig. 1d). Second, CB₂ receptor expression (as determined by radioligand binding using [3 H]-CP55940 and SR144528 at 100 nM) did not differ between BV-2 cells infected with scrambled shRNA or shRNA targeting *ABHD6* (data not shown), indicating that these infections did not affect CB₂ receptor expression. Third, the half-maximum effective concentration (EC₅₀) of 2-AG to stimulate BV-2 cell migration did not differ between BV-2 cells infected with scrambled shRNA or shRNA targeting *ABHD6*, suggesting that the coupling of CB₂ receptors to second messenger signaling was not affected by shRNA treatment (Fig. 1d). Together, these results indicate that *ABHD6* hydrolyzes 2-AG in intact cells and controls its efficacy at CB receptors, making this enzyme a rate-limiting step in controlling the bioactivity of this lipid transmitter.

Neurons express *ABHD6*

To explore the expression of *ABHD6* in primary brain cells, we quantified both *ABHD6*

mRNA and *ABHD6* enzymatic activity in various mouse brain preparations. Using quantitative PCR (qPCR), we found that *ABHD6* mRNA was abundant in adult mouse brain and neurons in primary culture, and low in mouse microglia in primary culture (Table 2). To measure the enzymatic activity of *ABHD6*, we determined the amount of [3 H]-2-AG hydrolysis that is blocked by WWL70, a highly selective *ABHD6* inhibitor²⁵. This study provided three further pieces of evidence that WWL70 is an effective and specific inhibitor of mouse *ABHD6* activity. First, WWL70 dose-dependently inhibited [3 H]-2-AG hydrolysis in homogenates prepared from *ABHD6*-transfected COS-7 cells (Fig. 2a); by contrast, the selective MAGL inhibitor JZL184¹¹ had no significant effect on [3 H]-2-AG hydrolysis in these homogenates (Fig. 2b). Second, WWL70 inhibited ~50% of the [3 H]-2-AG hydrolysis in BV-2 cell homogenates (Fig. 2c). Third, WWL70 did not directly interact with CB₁ or CB₂ receptors (Supplementary Fig. 2).

WWL70 inhibited ~20% of the [3 H]-2-AG hydrolysis in homogenates prepared from adult mouse brain (data not shown), which is in line with a previous report showing that *ABHD6* accounts for a small portion of the overall 2-AG hydrolysis measured in whole brain homogenates¹⁵. In homogenates prepared from neurons in primary culture, WWL70 inhibited ~50% of the total [3 H]-2-AG hydrolysis (Fig. 2d). These results reveal that whereas adult mouse brain shows a higher overall 2-AG hydrolysis activity than neurons in primary culture (13.2 versus 3.8 pmol of 2-AG per mg of protein per min), the relative contribution of *ABHD6* is greater in neurons in primary culture than in adult mouse brain. In homogenates prepared from microglia in primary culture, WWL70 had no significant effect on [3 H]-2-AG hydrolysis (Supplementary Fig. 3), consistent with the lower level of *ABHD6* mRNA in these cells. Thus, we focused our next set of experiments on the functional significance of *ABHD6* in neurons.

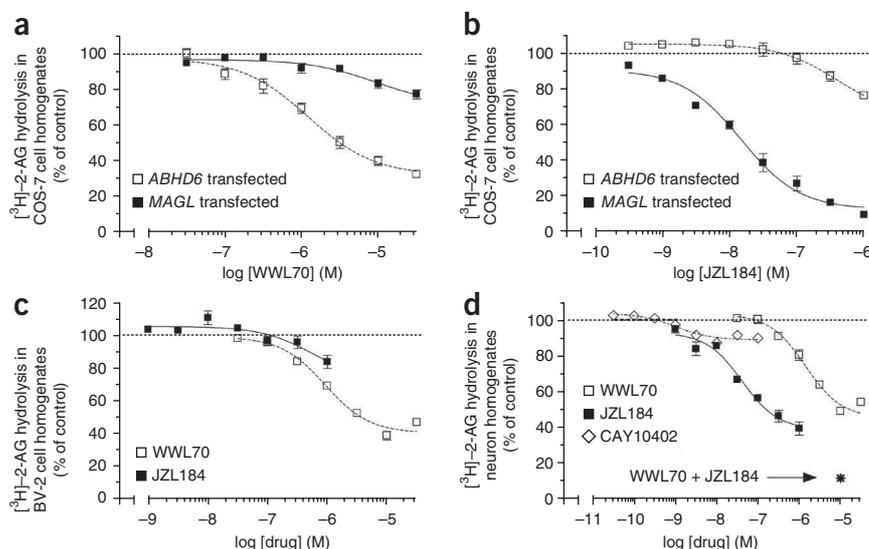
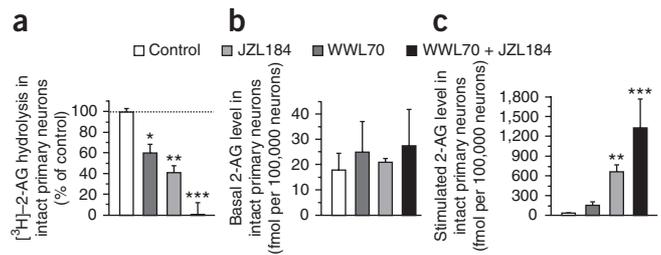


Figure 2 Effect of the *ABHD6* inhibitor WWL70 and the MAGL inhibitor JZL184 on [3 H]-2-AG hydrolysis in cell homogenates. [3 H]-2-AG hydrolysis in homogenates prepared from (a,b) COS-7 cells transfected with mouse *ABHD6* (5 μ g of protein per reaction) or with mouse *MAGL* (0.25 μ g of protein per reaction); (c) BV-2 cells (10 μ g of protein per reaction); and (d) mouse neurons in primary culture (1 μ g of protein per reaction). For the combination of the two inhibitors in d, WWL70 was used at 10 μ M and JZL184 at 1 μ M. Data are mean \pm s.e.m. of 3 to 4 independent experiments. Each experiment was performed in triplicate with homogenates or cells from independent transfections and cell preparations. Transfection of COS-7 cells with *ABHD6* increased [3 H]-2-AG hydrolysis by about twofold compared to COS-7 cells transfected with empty vector, whereas transfection of COS-7 cells with *MAGL* increased [3 H]-2-AG hydrolysis by 17-fold compared to COS-7 cells transfected with empty vector (data not shown).

Figure 3 Effect of WWL70 and JZL184 on [^3H]-2-AG hydrolysis and 2-AG accumulation in intact neurons in primary culture. **(a)** [^3H]-2-AG hydrolysis by intact primary neurons after 30 min pretreatment with WWL70 (10 μM) or JZL184 (1 μM). The data are expressed as % of control hydrolysis (pretreatment with 0.1% DMSO). **(b,c)** Levels of 2-AG in intact primary neurons pretreated for 30 min with WWL70 (10 μM), JZL184 (1 μM) or vehicle (0.1% DMSO, control; **b**) and stimulated with glutamate (100 μM) and carbachol (1 mM) for 2.5 min, after which lipids were extracted and 2-AG amounts measured by GC-MS (**c**). Treatment with glutamate plus carbachol led to a 2.5-fold increase in 2-AG amounts (in fmol per 100,000 cells: 18 to 44). Data are shown as mean \pm s.e.m. of 3–6 independent experiments. Experiments were performed in triplicate for the hydrolysis assay and in duplicate for 2-AG quantification by GC-MS, using cells from independent cell culture preparations. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (ANOVA one-way, Bonferroni's post test).



ABHD6 and MAGL control 2-AG accumulation in neurons

Previous results indicate that 2-AG hydrolysis in neurons is mediated by MAGL²⁶, and we now show that ABHD6 is also likely to be involved. We investigated the relative contributions of MAGL and ABHD6 to 2-AG hydrolysis in two neuronal preparations: (i) Homogenates prepared from neurons in primary culture, and (ii) intact neurons in primary culture. We used the ABHD6 inhibitor WWL70 and the MAGL inhibitor JZL184. We confirmed the efficacy of JZL184 at inhibiting mouse MAGL activity, as it inhibited [^3H]-2-AG hydrolysis in homogenates prepared from MAGL-transfected COS-7 cells (**Fig. 2b**). Note that these inhibitors can be used to discriminate the activities of these two enzymes, as 1 μM JZL184 did not significantly affect 2-AG hydrolysis in homogenates prepared from ABHD6-transfected COS-7 cells and 10 μM WWL70 did not significantly affect 2-AG hydrolysis in homogenates prepared from MAGL-transfected COS-7 cells (**Fig. 2a,b**). When tested in homogenates prepared from primary neurons, JZL184 inhibited ~50% of the total 2-AG hydrolysis (**Fig. 2d**). Furthermore, the combination of the maximally effective concentrations of WWL70 and JZL184 blocked almost all of the 2-AG hydrolysis in these homogenates (**Fig. 2d**). These results show that ABHD6 and MAGL are each responsible for about half of the total 2-AG hydrolysis in primary neuron homogenates. The remaining 2-AG hydrolysis in neuron homogenates (~10%) is probably mediated by FAAH, as its selective inhibitor CAY10402 blocks 10% of this activity (**Fig. 2d**).

We then tested the relative contributions of ABHD6 and MAGL to 2-AG hydrolysis in intact neurons. Here we performed two sets of experiments. First, we incubated intact neurons in primary culture with [^3H]-2-AG and measured the production of [^3H]-glycerol. These cells efficiently hydrolyzed [^3H]-2-AG and this activity was significantly reduced by treatment with either WWL70 or JZL184, with JZL184 being more efficacious (**Fig. 3a**). The combination of

WWL70 and JZL184 (10 and 1 μM , respectively) blocked all of the 2-AG hydrolysis in these cells (**Fig. 3a**), which supports the idea that FAAH does not hydrolyze 2-AG in intact cells. In the second set of experiments, we pretreated neurons in primary culture with WWL70 and JZL184 (alone and in combination), and then quantified eCB levels under either basal or stimulated conditions by using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The stimulation we chose was a combination of glutamate and carbachol because this treatment has been shown to increase 2-AG production in these cells²⁷. Neither WWL70 nor JZL184 affected basal 2-AG levels (**Fig. 3b**). Conversely, WWL70 induced a ~2-fold potentiation of the stimulated response, and JZL184 induced a ~7-fold potentiation of the stimulated response (**Fig. 3c**). Combining the two inhibitors resulted in a more significant potentiation of the stimulated response than JZL184 alone (**Fig. 3c**), recapitulating what was seen with our intact cell hydrolysis assay (**Fig. 3a**). Neither of these inhibitors had a significant effect on anandamide levels (**Supplementary Fig. 4**). These results show that both ABHD6 and MAGL regulate stimulus-dependent accumulation of 2-AG without affecting the basal level of this eCB in neurons in primary culture. Although it is clear that MAGL is much more efficient at controlling the stimulated accumulation of 2-AG in these cells, it seems that ABHD6 and MAGL might have non-overlapping functions. Specifically, WWL70 increased by ~2-fold the stimulated accumulation of 2-AG in both the presence and absence of JZL184 (**Supplementary Fig. 5**). This suggests that ABHD6 and MAGL independently control the stimulated accumulation of 2-AG in intact neurons.

ABHD6 regulates eCB-LTD in adult mouse prefrontal cortex

Both CB₁ receptors and MAGL are expressed presynaptically in neurons²⁸. To visualize ABHD6 expression, we generated a rabbit polyclonal antibody that recognizes a 38-amino-acid sequence in the middle of the mouse ABHD6 protein (**Supplementary Fig. 6**). This antibody recognizes ABHD6, as it labels ABHD6-transfected COS-7 cells (using GFP as a

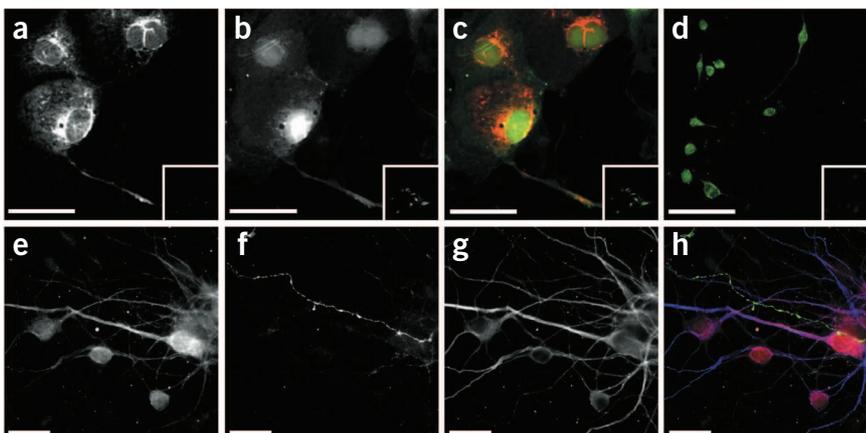


Figure 4 Visualization of ABHD6 protein in different cell types. **(a–h)** Representative images of COS-7 cells transfected with plasmids encoding ABHD6 and GFP (**a–c**; scale bar, 50 μm), BV-2 cells (**d**; scale bar, 100 μm) and mouse neurons in primary culture (**e–h**; scale bar, 20 μm). Fluorescence detection of primary antibodies recognizing ABHD6 (**a, d, e**; red in **c, h**), CB₁ receptor (**f**, green in **h**), or MAP2 (**g**, blue in **h**). Fluorescence detection of GFP (**b**, green in **c**). Insets show pre-incubation with 5 μg per ml of the ABHD6 immunizing peptide (**a–d**).

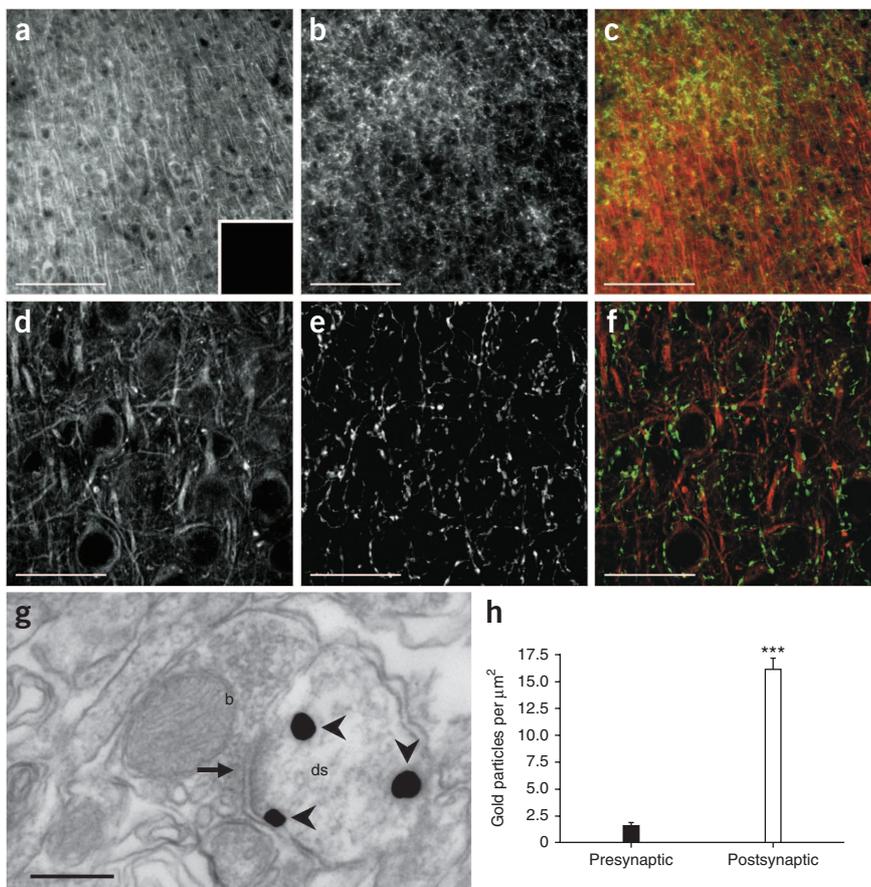


Figure 5 Localization of ABHD6 protein in mouse prefrontal cortex. (a–f) Fluorescent immunohistochemical staining of adult mouse prefrontal cortex (scale bars: a–c, 100 μm ; d–f, 20 μm) using antibodies that recognize ABHD6 (a,d; red in c,f) and CB_1 receptors (b,e; green in c,f). Inset in a shows pre-incubation with 5 μg per ml of the ABHD6 immunizing peptide. (g) Electron micrograph of antibodies recognizing ABHD6 (arrowheads) in adult mouse prefrontal cortex, labeled with silver-enhanced gold particles (scale bar, 200 nm). Note that ABHD6 is predominantly found on the postsynaptic side of the synapse (arrow) in dendritic spines (ds), and not in presynaptic boutons (b). (h) Quantitative analysis of all electron microscopy images using ImageJ software. The number of gold particles on pre- and postsynaptic sides of identifiable synapses were manually counted and then normalized to the area of the respective structures for comparison. Data are mean \pm s.e.m. of 154 identifiable synapses, in two animals. *** $P < 0.001$ (unpaired two-tailed t -test).

By activating presynaptic CB_1 receptors, 2-AG induces several forms of synaptic plasticity^{29–31}. To test whether ABHD6 controls 2-AG's ability to induce synaptic plasticity, we tested long-term depression (LTD) in prefrontal cortical slices prepared from adult mouse. Sub-threshold stimulation of pyramidal neurons in layer 2 of this brain area induces eCB-dependent LTD (eCB-LTD) in layer 5 when a non-specific inhibitor of 2-AG hydrolysis, URB602, is added³². Importantly,

the FAAH inhibitor URB597 has no effect on this response³². Thus, we sought to determine which 2-AG hydrolase(s), MAGL or ABHD6, is responsible for regulating this cortical eCB-LTD. First, we confirmed that sub-threshold stimulation (5 min at 10 Hz) in layer 2 does not induce LTD in layer 5 (Fig. 6a). Using this sub-threshold stimulation protocol, we found that application of WWL70 allowed the induction of robust LTD (a 22% reduction in synaptic transmission for at least 40 min after the stimulation). This response was mediated by CB_1 receptors, as it was fully blocked by the CB_1 antagonist AM251 (Fig. 6b). The MAGL inhibitor JZL184 also facilitated LTD induction at these

transfection marker; Fig. 4a–c and Supplementary Fig. 7), whereas it does not label ABHD6-transfected COS-7 cells when the antibody is pre-absorbed with the immunizing peptide (Fig. 4a–c) or when the antibody is tested on pcDNA-transfected COS-7 cells (Supplementary Fig. 7). Using this antibody, we confirmed ABHD6 expression in BV-2 cells (Fig. 4d) and a lack of detectable ABHD6 expression in primary microglia (data not shown). In neurons in primary culture, this antibody showed that ABHD6 is mainly expressed in the cell soma and dendrites, where it co-localizes with MAP2 and not with axonal CB_1 receptors (Fig. 4e–h). In adult mouse brain, ABHD6 is abundantly expressed in cortical areas (Supplementary Fig. 8). More specifically, in the prefrontal cortex, ABHD6 often juxtaposes, but does not overlap, with presynaptic CB_1 receptors (Fig. 5a–f). Accordingly, using electron microscopy, we found that most of the ABHD6 immunoreactivity was detected in post-synaptic structures (Fig. 5g,h). Using various cellular markers, we confirmed that ABHD6 is expressed by many principal glutamatergic neurons, as well as by some GABAergic interneurons and astrocytes, but not by microglia (Supplementary Fig. 9). Together, these results show that neurons express ABHD6, and that this enzyme is prevalent in the post-synaptic spines of glutamatergic neurons. This finding raises the question of whether ABHD6 participates in the control of 2-AG's efficacy at neuronal CB_1 receptors in the adult brain.

the FAAH inhibitor URB597 has no effect on this response³². Thus, we sought to determine which 2-AG hydrolase(s), MAGL or ABHD6, is responsible for regulating this cortical eCB-LTD. First, we confirmed that sub-threshold stimulation (5 min at 10 Hz) in layer 2 does not induce LTD in layer 5 (Fig. 6a). Using this sub-threshold stimulation protocol, we found that application of WWL70 allowed the induction of robust LTD (a 22% reduction in synaptic transmission for at least 40 min after the stimulation). This response was mediated by CB_1 receptors, as it was fully blocked by the CB_1 antagonist AM251 (Fig. 6b). The MAGL inhibitor JZL184 also facilitated LTD induction at these

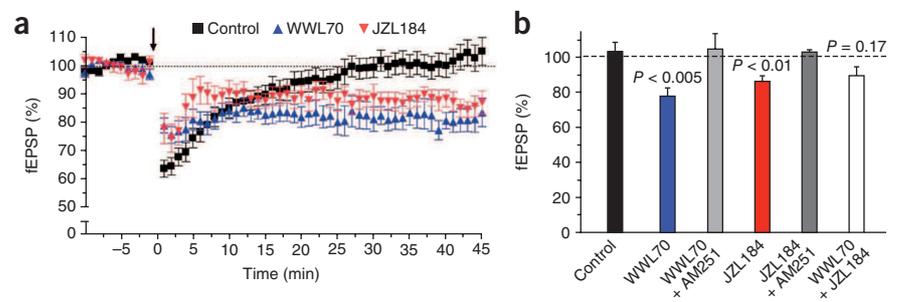


Figure 6 Effect of WWL70 and JZL184 on CB_1 -dependent LTD in mouse prefrontal cortex. Field potentials measured in layer 5 after stimulation in layer 2 (arrow, 5 min at 10 Hz). Both the area and amplitude of the field excitatory postsynaptic potential (fEPSP) were measured (graphs depict area). Slices were preincubated for 10 min with WWL70 (10 μM), JZL184 (1 μM) or vehicle (0.01% DMSO, control), and the inhibitors remained present in the superfusion medium throughout the experiment. (a) Time course and (b) summary of the 40-min time point. Data are mean \pm s.e.m. of at least ten different brain slices. Statistical significance (above bars) was calculated relative to control (Mann Whitney).

synapses (14%), and this response was also CB₁-dependent (Fig. 6b). Surprisingly, the combination of WWL70 and JZL184 in this paradigm did not induce significant LTD, which might reflect an increase in the baseline level (before electrical stimulation) of 2-AG in these brain slices after pre-treatment with both inhibitors. Together, these results indicate that, like MAGL, ABHD6 is a rate-limiting enzyme for 2-AG inactivation in adult mouse brain, and that its postsynaptic expression allows it to regulate the efficacy of 2-AG at presynaptic CB₁ receptors.

To further characterize the roles of ABHD6 and MAGL in regulating synaptic plasticity in cortex, we used two relevant short-term synaptic plasticity paradigms, namely depolarization-induced suppression of inhibition (DSI) and depolarization-induced suppression of excitation (DSE). Using standardized induction protocols, we found that neither DSI nor DSE could be induced in cortical layer 5 (Supplementary Fig. 10). In contrast, we could induce DSI in cortical layer 2; however, the decay rate of this effect was not altered by treatment with either WWL70 or JZL184 (Supplementary Fig. 10), suggesting that ABHD6 and MAGL are not involved in the regulation of this form of short-term synaptic plasticity in cortical layer 2.

DISCUSSION

BV-2 cells do not express MAGL and yet they efficiently hydrolyze 2-AG, providing evidence for the existence of another enzyme that can hydrolyze this eCB¹⁸. The serine hydrolases ABHD6 and ABHD12, which were identified in adult mouse brain, can hydrolyze 2-AG when they are heterologously expressed in COS-7 cells and their activity is assayed in cell homogenates¹⁵. We now report that ABHD6 is responsible for the previously uncharacterized endogenous 2-AG-hydrolyzing activity in BV-2 cells, and that this enzyme controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors in intact BV-2 cells, neurons, and adult mouse brain slices, but not in primary microglia.

Although BV-2 cells are widely used as a surrogate model for studying the immune function of microglia, many laboratories have reported that their phenotype is quite different from that of microglia in primary culture and adult brain. Adding to this list of differences, we found that BV-2 cells express functional ABHD6, whereas microglia, whether they are in primary culture or in adult mouse brain, do not. It is worth noting that the phenotype of microglia is extremely plastic, and thus it is possible that specific pathogens or immunomodulators might induce ABHD6 expression in these cells. In line with this notion, Epstein-Barr virus antigens induce ABHD6 expression in B cells³³. A question that remains unanswered at this point is: What is the enzyme responsible for the 2-AG-hydrolyzing activity measured in homogenates prepared from primary microglia, as this activity is unaffected by the ABHD6 inhibitor WWL70 and the MAGL inhibitor JZL184 (Supplementary Fig. 3)?

In neurons in primary culture, 2-AG hydrolysis is mediated by both MAGL and ABHD6; however, when assessing their relative contributions to this process, we found slight differences depending on the assay that was used and the conditions that were tested. Specifically, when measuring 2-AG hydrolysis in neuron homogenates, we found that ABHD6 and MAGL contributed about equally (Fig. 2d). Here, in a homogenous environment, the relative contributions of ABHD6 and MAGL to the hydrolysis of 2-AG are dictated by both their intrinsic enzymatic activity and their expression. Because ABHD6 has a lower intrinsic 2-AG hydrolysis activity than MAGL¹⁵, our results suggest that ABHD6 is expressed at a higher level than MAGL in primary neurons. When determining the relative contributions of ABHD6 and MAGL to 2-AG hydrolysis in intact neurons in primary culture, we found that the less abundant enzyme, MAGL, has a greater role

in controlling 2-AG levels than the more abundant enzyme, ABHD6 (Fig. 3). This predominant role for MAGL over ABHD6 in intact neurons in primary culture was found in two different experimental conditions: when [³H]-2-AG was provided from the extracellular space, and when endogenous 2-AG production was stimulated by receptors expressed at the plasma membrane (glutamatergic and cholinergic receptors). These results indicate that MAGL and ABHD6 are found in distinct sub-cellular locations, and that MAGL is strategically positioned within intact neurons in primary culture to hydrolyze 2-AG when this lipid reaches the cells from the extracellular space, as well as when it is endogenously produced.

Three independent sets of data further support the notion that MAGL and ABHD6 have distinct sub-cellular locations in neurons, resulting in the independent control of 2-AG accumulation. First, dual inhibition of MAGL and ABHD6 activities in intact neurons in primary culture had an additive effect on both the hydrolysis of exogenously applied 2-AG and the stimulated production of endogenous 2-AG (Fig. 3). Second, an analysis of their amino acid sequences indicates that ABHD6 is likely to be an integral membrane enzyme, whereas MAGL is a cytosolic enzyme that peripherally associates with membranes^{15,34}. Western blot analysis of sub-cellular fractions from mouse brain supports this prediction, as ABHD6 immunoreactivity was found only in the membrane fraction, whereas MAGL immunoreactivity was distributed between both membrane and cytosolic fractions (Supplementary Fig. 11). Third, our immunofluorescence and electron microscopy images revealed that ABHD6 is expressed in postsynaptic dendrites in the adult brain, whereas there is evidence that MAGL is localized to presynaptic axon terminals²⁸. Thus, the relative contributions of MAGL and ABHD6 to the control of 2-AG levels in intact neurons in primary culture and adult brain are probably dictated by their distinct sub-cellular localizations.

Inhibition of either ABHD6 or MAGL had a similar effect on synaptic plasticity at cortical layer 5 excitatory synapses (that is, inhibition of either enzyme allowed the induction of CB₁-dependent LTD by an otherwise sub-threshold stimulation; Fig. 6). This suggests that the amount of 2-AG that reaches presynaptic CB₁ receptors is controlled both at the site of 2-AG production (postsynaptic) by ABHD6 and at the site of the CB₁ receptor targets (presynaptic) by MAGL. This sort of redundancy is likely to offer the system greater versatility to fine-tune the magnitude and duration of 2-AG signaling. Furthermore, 2-AG produced by other cell types found in the nervous system, such as glia and invading immune cells, is also likely to be regulated at the source of production by these cells' own 2-AG-hydrolyzing enzyme(s)^{35,36}. Thus, whereas ABHD6 is strategically positioned to regulate neuronal—and perhaps also astroglial—production of 2-AG, MAGL is well positioned to control the amount of 2-AG that reaches presynaptic CB₁ receptors regardless of the source of the 2-AG. We were surprised to find that the co-inhibition of both MAGL and ABHD6 did not allow subthreshold stimulation to produce significant LTD of cortical layer 5 glutamatergic synapses (Fig. 6b). Although it is counterintuitive, this result could reflect a saturation effect in which basal 2-AG levels in the brain slice are elevated by the inhibitors before the electrical stimulation, thus inducing LTD prematurely and reducing the measured difference between synaptic efficacy before and after the electrical stimulation. Accordingly, basal neuronal activity is much higher in brain slices than in dissociated neurons in primary culture, and thus inhibition of 2-AG hydrolysis would be expected to have a greater effect on basal 2-AG levels in brain slices (Fig. 6) than in neurons in primary culture (Fig. 3). Together, our results suggest that the relative contributions of MAGL, ABHD6 and any other 2-AG-hydrolyzing enzymes to the regulation

of 2-AG signaling will vary depending on the cellular origin of this eCB and the type of stimulation that increases its production. This arrangement could offer an additional modality in the control of 2-AG signaling in various pathophysiological conditions.

The identification and characterization of enzymes that hydrolyze eCBs is necessary to obtain a mechanistic understanding of this signaling system and to exploit these pathways for therapeutic gain. The criteria that a hydrolytic enzyme needs to fulfill to be considered a bona fide member of the eCB signaling system include showing that it hydrolyzes eCBs in intact cells and tissue, and that this enzymatic activity controls the efficacy of eCB signaling at cannabinoid receptors. Thus, the results provided by our study suggest that ABHD6 should be added to the list of members of the eCB signaling system.

METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper at <http://www.nature.com/natureneuroscience/>.

Note: Supplementary information is available on the Nature Neuroscience website.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the National Institute on Drug Abuse (DA14486 and DA26430 to N.S., DA017259, DA009789 and DA025285 to B.F.C. and DA026161 to J.L.B.) and from the National Institute of General Medical Sciences (PHS NRSA 2T32 GM007270 to W.R.M.).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

W.R.M. prepared the cell cultures, performed the hydrolysis experiments, conducted the data analysis and wrote the manuscript. J.L.B. performed the ABPP experiments and contributed to the data analysis. E.A.H. performed the GC-MS and immunofluorescence experiments and contributed to the electron microscopy experiments and data analysis. A.T. and M.L. performed the electrophysiology experiments. Y.H.L. prepared the cell culture transfections and the shRNA constructs, and performed the qPCR experiments. J.C. contributed to the immunofluorescence experiments. A.L.B. performed the electron microscopy experiments. G.G.M. contributed to the hydrolysis experiments. S.S.-J.H. contributed to antibody production. G.W. and S.F. performed the cell migration experiments. J.P.A. contributed to the ABPP experiments. J.Z.L. and W.L. produced the hydrolase inhibitors. C.X. contributed to the cell culture experiments. T.M. provided the transgenic mice. K.M. provided antibodies. O.J.M. supervised the electrophysiology experiments. B.F.C. supervised the ABPP experiments and the development of hydrolase inhibitors. N.S. supervised the project and wrote the manuscript.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Published online at <http://www.nature.com/natureneuroscience/>.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprintsandpermissions/>.

- Stella, N. Endocannabinoid signaling in microglial cells. *Neuropharmacology* **56** (Suppl. 1): 244–253 (2009).
- Horne, E. & Stella, N. The ins and outs of endocannabinoid signaling in healthy and diseased brain. *Future Lipidol.* **3**, 435–452 (2008).
- Marrs, W. & Stella, N. Measuring endocannabinoid hydrolysis: refining our tools and understanding. *AAPS J.* **11**, 307–311 (2009).
- Di Marzo, V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 438–455 (2008).
- Katona, I. & Freund, T.F. Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat. Med.* **14**, 923–930 (2008).
- Straiker, A. & Mackie, K. Cannabinoids, electrophysiology, and retrograde messengers: challenges for the next 5 years. *AAPS J.* **8**, E272–E276 (2006).
- Cabral, G.A. & Griffin-Thomas, L. Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation. *Expert Rev. Mol. Med.* **11**, e3 (2009).
- Gobbi, G. *et al.* Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 18620–18625 (2005).
- Fegley, D. *et al.* Characterization of the fatty acid amide hydrolase inhibitor cyclohexyl carbamic acid 3'-carbamoyl-biphenyl-3-yl ester (URB597): effects on anandamide and oleylethanolamide deactivation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **313**, 352–358 (2005).
- Kathuria, S. *et al.* Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat. Med.* **9**, 76–81 (2003).
- Long, J.Z. *et al.* Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 37–44 (2009).
- Burston, J.J. *et al.* N-arachidonyl maleimide potentiates the pharmacological and biochemical effects of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol through inhibition of monoacylglycerol lipase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **327**, 546–553 (2008).
- Bisogno, T. *et al.* Development of a potent inhibitor of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis with antinociceptive activity *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta* **1791**, 53–60 (2009).
- Long, J.Z. *et al.* Dual blockade of FAAH and MAGL identifies behavioral processes regulated by endocannabinoid crosstalk *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 20270–20275 (2009).
- Blankman, J.L., Simon, G.M. & Cravatt, B.F. A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem. Biol.* **14**, 1347–1356 (2007).
- Saario, S.M. *et al.* Characterization of the sulfhydryl-sensitive site in the enzyme responsible for hydrolysis of 2-arachidonoyl-glycerol in rat cerebellar membranes. *Chem. Biol.* **12**, 649–656 (2005).
- Dinh, T.P., Kathuria, S. & Piomelli, D. RNA interference suggests a primary role for monoacylglycerol lipase in the degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Mol. Pharmacol.* **66**, 1260–1264 (2004).
- Muccioli, G.G. *et al.* Identification of a novel endocannabinoid-hydrolyzing enzyme expressed by microglial cells. *J. Neurosci.* **27**, 2883–2889 (2007).
- Jessani, N. *et al.* A streamlined platform for high-content functional proteomics of primary human specimens. *Nat. Methods* **2**, 691–697 (2005).
- Liu, Y., Patricelli, M.P. & Cravatt, B.F. Activity-based protein profiling: the serine hydrolases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 14694–14699 (1999).
- Yates, J.R. III, McCormack, A.L. & Eng, J. Mining genomes with MS. *Anal. Chem.* **68**, 534A–540A (1996).
- Goparaju, S.K., Natsuo, U., Yamaguchi, H. & Yamamoto, S. Anandamide amidohydrolase reacting with 2-arachidonoylglycerol, another cannabinoid receptor ligand. *FEBS Lett.* **422**, 69–73 (1998).
- Walter, L. *et al.* Non-psychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J. Neurosci.* **23**, 1398–1405 (2003).
- Miller, A.M. & Stella, N. Microglial cell migration stimulated by ATP and C5a involve distinct molecular mechanisms: quantification of migration by a novel near-infrared method. *Glia* **57**, 875–883 (2008).
- Li, W., Blankman, J.L. & Cravatt, B.F. A functional proteomic strategy to discover inhibitors for uncharacterized hydrolases. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 9594–9595 (2007).
- Dinh, T.P. *et al.* Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 10819–10824 (2002).
- Stella, N. & Piomelli, D. Receptor-dependent formation of endogenous cannabinoids in cortical neurons. *Eur. J. Pharmacol.* **425**, 189–196 (2001).
- Gulyas, A.I. *et al.* Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur. J. Neurosci.* **20**, 441–458 (2004).
- Wilson, R.I. & Nicoll, R.A. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signaling at hippocampal synapses. *Nature* **410**, 588–592 (2001).
- Stella, N., Schweitzer, P. & Piomelli, D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* **388**, 773–778 (1997).
- Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimoto, Y., Uchigashima, M. & Watanabe, M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol. Rev.* **89**, 309–380 (2009).
- Lafourcade, M. *et al.* Molecular components and functions of the endocannabinoid system in mouse prefrontal cortex. *PLoS One* **2**, e709 (2007).
- Maier, S. *et al.* Cellular target genes of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J. Virol.* **80**, 9761–9771 (2006).
- Marrs, W. & Stella, N. 2-AG + 2 new players = forecast for therapeutic advances. *Chem. Biol.* **14**, 1309–1311 (2007).
- Walter, L., Dinh, T. & Stella, N. ATP induces a rapid and pronounced increase in 2-arachidonoylglycerol production by astrocytes, a response limited by monoacylglycerol lipase. *J. Neurosci.* **24**, 8068–8074 (2004).
- Witting, A., Walter, L., Wacker, J., Moller, T. & Stella, N. P2X7 receptors control 2-arachidonoylglycerol production by microglial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 3214–3219 (2004).

ONLINE METHODS

Drugs. 2-AG was from Cayman Chemical. [³H]-2-AG (radiolabeled on the glycerol moiety) was from American Radiolabeled Chemicals and the National Institute on Drug Abuse drug supply system. WWL70 and JZL184 were synthesized in the laboratory of B. Cravatt. SR144528 was a gift from Sanofi Research.

Cell culture. BV-2 and COS-7 cells were expanded in DMEM (HyClone Cat. # SH30243.01) supplemented with HEPES (10 mM), NaHCO₃ (10 mM), penicillin (100 U ml⁻¹), streptomycin (100 μg ml⁻¹) and FBS (10%, HyClone Cat. # SH30071.03). Mouse neurons and microglia in primary culture were prepared as described^{23,37} and according to the guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Washington. Briefly, for neurons, one day-old mouse brains (C57BL/6) were collected, and their meninges and cerebellum removed. The remaining brain tissue was chopped and the cells dissociated and plated in 10-cm dishes (BD Falcon) coated with poly-D-lysine (0.1 mg ml⁻¹) at 5.0 × 10⁵ cells per ml of Neurobasal Medium (Gibco Cat. # 21103-049) supplemented with B-27 (2%), Glutamax (1%), penicillin (100 U ml⁻¹), and streptomycin (100 μg ml⁻¹). Neurons were tested after 7–8 d in culture. For microglia, dissociated cells resulting from two brains were added to DMEM (10 ml) supplemented with NaHCO₃ (10 mM), penicillin (100 U ml⁻¹), streptomycin (100 μg ml⁻¹) and FBS (10%), and plated in 75-ml flasks coated with poly-ornithine (0.001%). The resulting floating microglia were plated in uncoated 10-cm dishes at 5.0 × 10⁴ cells per ml of MEM (Gibco Cat. # 51200-038) supplemented with CellGro (10%, Cat. # 40-101-CV). Microglia were tested after 24–48 h in culture.

ABPP-MudPIT analysis of BV-2 cytosolic and mitochondrial proteomes. BV-2 cells in culture were detached, rinsed by centrifugation, resuspended in Tris buffer (300 μl, 50 mM, pH 7.5) and lysed by sonication. Cytosolic and mitochondrial fractions were prepared as described¹⁸, and shipped to the Cravatt laboratory for ABPP-MudPIT analysis. Specifically, BV-2 cytosolic and mitochondrial proteomes (1 mg in 1 ml Tris buffer) were incubated with FP-biotin (5 μM, 1 h, room temperature). Enrichment of the FP-labeled proteome was performed as described¹⁹, except that the Lys-C digestion step was omitted. MudPIT analysis was performed as described on an LTQ ion trap mass spectrometer (ThermoFisher) coupled to an Agilent 1100 series HPLC¹⁹. The tandem MS data were searched against the mouse IPI database with the SEQUEST algorithm, and results were filtered and grouped with DATASELECT³⁸. Peptides with cross-correlation scores greater than 1.8 (+1), 2.5 (+2), 3.5 (+3) and δCN scores >0.08 were included in subsequent spectral counting analysis. The average spectral counts of two cytosolic and three mitochondrial samples are reported for serine hydrolases with average spectral counts >15 and greater than tenfold enrichment in mitochondrial versus cytosolic samples.

qPCR. RNA was extracted using PerfectPure RNA Cultured Cell Kit (5 Prime). Reaction mixtures were prepared using Brilliant II 1-Step QRT-PCR Master Mix (Stratagene). Primer and probe combinations were designed using the Roche Universal Probe Library Assay Design Center (<http://www.universalprobelibrary.com>). Primers were from Operon and universal probes were from Roche. Reactions were run using a Stratagene Mx3000P QPCR system and consisted of 30 min incubation at 45 °C, followed by a 10-min denaturation at 95 °C and 40 cycles of 1 min at 95 °C and 30 s at 60 °C.

shRNA. Plasmids expressing shRNAs were purchased from the Sigma MISSION shRNA library or constructed in our laboratory (targeting sequences were inserted into pLKO.1 (Addgene plasmid 10878), according to the manufacturer's instructions³⁹). Each set of plasmid carrying a specific shRNA construct was transfected into AD293 cells using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, according to the manufacturer's instructions). After 72 h, the supernatant of AD293 containing the lentiviruses was applied directly to BV-2 cells. After 16 h, the medium of BV-2 cells was replaced by DMEM supplemented with FBS (10%). After 24 h, the medium of BV-2 cells was replaced by DMEM supplemented with FBS (10%) and puromycin (2 μg ml⁻¹), and cells were kept for 5–9 d in culture for selection. qPCR was systematically performed on each batch to assess for % knockdown. Selected clones were then split and expanded for specific experiments.

Cell migration. Cell migration was performed and calculated as described²⁴. Briefly, BV-2 cells were incubated for 30 min in MEM containing the nuclear

fluorescent dye DRAQ5. Cells were then resuspended in MEM supplemented with Cellgro (10%) and loaded in upper chamber of a 96-well chemotaxis apparatus (Neuroprobe, 7 × 10⁴ cells per 390 μl, filters with 10-μm pores). Lower wells contained the same medium supplemented with 2-AG. Migration occurred over 3 h (37 °C, 5% CO₂), after which the filter was removed and the cells that had not migrated were thoroughly wiped off the top side of the filter. The fluorescence emitted by the cells that had migrated toward the bottom surface of the filter was measured using an Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR).

Transfections. COS-7 cells (~90% confluent in 10-cm dishes) were transfected with expression vectors (OpenBioSystems, 3 μg per dish) by using Lipofectamine 2000. After 4–6 h, the medium was changed and the cells were incubated for an additional 30–36 h in DMEM + FBS (10%). For ICC, transfections were performed similarly, but using cells grown on 12-mm coverslips placed in 24-well plates (~60% confluent). Here, GFP-expressing vectors (40 ng) were also added to identify the cells that had been transfected.

[³H]-2-AG hydrolysis in cell homogenates and intact cells. Cell homogenates were prepared as described¹⁸. Homogenates were added to silanized glass tubes that contained 100 μl of Tris-HCl buffer (100 mM, pH 7.4) supplemented with fatty acid-free BSA (0.1%), [³H]-2-AG (~1 nM) and inhibitors or vehicle (DMSO, 0.1%). Tubes containing this solution, but without cell homogenate, were used as control for non-enzymatic [³H]-2-AG hydrolysis (blank) and this value was systematically subtracted from values obtained with homogenates. Tubes were incubated for 10 min in a shaking water bath at 37 °C. Reactions were stopped by adding ice-cold MeOH-CHCl₃ (1:1, 2 ml) and vortexing. Linear enzymatic activity with a set amount of protein was systematically verified and chosen for each homogenate. The hydrophobic and hydrophilic phases were separated by centrifugation (800g, 10 min). One milliliter of upper phase was recovered and mixed with Ecocint (4 ml) for radioactivity determination by liquid scintillation. For intact cells, the following [³H]-2-AG solution was prepared in a silanized glass vial and allowed to equilibrate at room temperature for 75 min: MEM supplemented with BSA (0.15%) and [³H]-2-AG (~1 nM). Cells grown in 12-well plates were pre-treated with inhibitors or vehicle for 30 min by adding 0.1 ml to each well. Cells were then rinsed twice with MEM supplemented with fatty acid-free BSA (0.15%) and incubated with [³H]-2-AG solution for 20 min (with gentle shaking in a water bath at 37 °C). Non-specific hydrolysis was determined by adding 2-AG (100 μM), and this value was systematically subtracted from each data point. The entire medium (~1 ml) was recovered in a silanized glass tube, ice-cold MeOH (2 × 1 ml) was added to the cells, and the resulting lysate pooled with the media. CHCl₃ was added such that there was a final ratio of 1:2:2 for MEM:MeOH:CHCl₃. The amount of [³H]-glycerol present in the hydrophilic phase was quantified by liquid scintillation as described above.

ICC and IHC. The following primary and secondary antibodies were used: affinity-purified ABHD6 (rabbit polyclonal, 1:2000 (IHC), 1:10,000 (ICC)), CB1 (guinea pig polyclonal, raised against the full carboxyl terminus of rat CB1, 1:2,000 (ICC and IHC)⁴⁰), MAP2 (mouse monoclonal, 1:500, Chemicon), SMI32 (mouse monoclonal, 1:1,000, AbCAM), GFAP (mouse monoclonal, 1:400, Millipore), GFP (mouse monoclonal, 1:400, Invitrogen), goat anti-rabbit conjugated with Texas Red (1:250, Invitrogen) or conjugated with Alexa555 for triple staining experiments (1:500, Invitrogen), goat anti-guinea pig conjugated with Alexa488 (1:500, Invitrogen), goat anti-mouse conjugated with Alexa647 (1:500, Invitrogen). Antibodies were diluted in PBS supplemented with donkey serum (2.5%) and Triton X-100 (0.5%) with or without 5 μg ml⁻¹ of the immunizing peptide and shaken at 4 °C for 18 h. For ICC, cells were fixed with PFA (4% in PBS) for 20 min (warming from 4 °C to room temperature), permeabilized with PBS supplemented with goat serum (5%) and saponin (0.1%) at room temperature for 30 min, incubated for 18 h at 4 °C in PBS supplemented with goat serum (2.5%), and incubated in PBS supplemented with Fc block (0.5 μg per cover slip; BD Bioscience) for 5 min at room temperature. Cells were then incubated with primary antibodies for 90 min at room temperature, washed 5× with PBS at room temperature and incubated for 1 h at room temperature with secondary antibodies. Cells were then rinsed 7× in PBS and once with de-ionized water. Cover slips were mounted with Vectashield and sealed with nail polish. For IHC, mice (WT C57BL/6, GAD67-GFP C57BL/6 or Iba1-GFP C57BL/6; 8 wks old) were perfused and fixed with PFA (4% in PBS), and whole brains cryoprotected in 15%

sucrose (24 h), followed by 30% sucrose (48 h). Coronal sections that included the prefrontal cortex (30 μm) were prepared using a microtome and stored in PBS at 4 °C. Sections were rinsed 3 \times with PBS and incubated for 90 min at room temperature with PBS supplemented with donkey serum (5%) and Triton X-100 (1%). Primary antibodies, which had been incubated for 16–18 h with or without 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of the inoculation peptide in PBS supplemented with donkey serum (2.5%) and Triton X-100 (0.5%), were applied to each section for 16–18 h at 4 °C with gentle agitation. Sections were then rinsed 6 \times with PBS supplemented with Tween-20 (0.05%, at room temperature). Sections were then incubated with secondary antibodies diluted in PBS with supplemented with donkey serum (2.5%) and Triton X-100 (0.5%) for 1 h at room temperature with gentle agitation, followed by seven rinses with PBS and one rinse with deionized water. Sections were mounted onto charged slides and allowed to dry for ~18 h, after which coverslips were mounted with Vectashield and sealed with nail polish. All fluorescent images were collected on a Zeiss Axio Observer Z1 equipped with a Pan-Apochromatic 20 \times /0.8DicII (single plane) or Pan-Apochromatic 63 \times /1.4 oil lens (Z-stack images at 0.26 μm that were deconvolved using an Apotome). The same exposure settings were used for the experimental, immunizing peptide, and secondary only controls. Images were processed in Photoshop by gating the background to the secondary-only control. The intensity was gated to the experimental image and was the same setting used for the immunizing peptide control.

Electron microscopy. Two C57BL/6 mice were perfused by one of two methods (similar results were obtained independent of the perfusion method). Both mice were perfused through the heart by first washing with saline followed by either (i) 4% paraformaldehyde with 0.1% glutaraldehyde (TAAB) in acetate buffer (pH 6.0; 5 min) followed by 4% paraformaldehyde with 0.1% glutaraldehyde in borate buffer (pH 8.5; 50 min)⁴¹; or (ii) 4% paraformaldehyde with 0.1% glutaraldehyde for 30 min. Immediately after perfusion, the brain of each mouse was dissected and coronal sections (50 μm) were cut using a vibratome. All incubations and washes were carried out on a horizontal shaker. The sections were washed in phosphate buffer (PB; 5 \times ; 10 min) and incubated in 30% sucrose in PB overnight at 4 °C. Slices were freeze-thawed over liquid nitrogen three times to ensure penetration and then washed in PB (3 \times ; 10 min) before being treated with 0.5% sodium borohydride in PB (15 min). After washes in PB (3 \times ; 10 min) the slices were transferred to 0.05 M Tris-buffered saline (TBS; pH 7.4) before being blocked for 40 min in BSA (3%) in TBS at room temperature. ABHD6 polyclonal antibody (1:1,500, rabbit) was diluted in TBS and incubated with the slices overnight at room temperature. After 18 h, the slices were washed with TBS (4 \times ; 10 min) before being incubated with ultra small gold-conjugated rabbit secondary (1:50; Aurion) diluted in TBS with 0.8% BSA, 0.1% gelatin and 0.05% sodium azide overnight at 4 °C. After washes in the same solution (1 \times ; 30 min) and TBS (3 \times ; 10 min) the slices were postfixed with 2% glutaraldehyde and silver intensified with Aurion R-Gent intensification kit for 15 min.

After intensification, sections were dehydrated by treating with OsO₄ (1% for 1 min then 0.5% for 20 min on ice water), then dehydrated in ethanol and propylene oxide and finally embedded in Durcupan (Fluka). During the 70% ethanol step, the sections were treated with 1% uranyl acetate in 70% ethanol for 40 min. Selected blocks containing different cortical areas within layer 4–5 were selected to be cut into 60-nm ultrathin sections with an Ultramicrotome (Reichert) and mounted on copper grids. Contrast staining was then done with lead citrate for 3 min.

We collected 60,000 \times magnified images using a camera (Morada; Olympus) mounted to an electron microscope (JEM 1200 EXII; Jeol). Specifically, synaptic contacts (which had both an obvious postsynaptic density within a reasonably small postsynaptic site and vesicle accumulation in the presynaptic site, as well as

a synaptic gap between the two sites) containing at least 1 gold particle on either the pre- or postsynaptic side were collected for analysis. Images were analyzed using ImageJ software (NIH) by manually counting gold particles within both pre- and postsynaptic elements of previously specified synapses, and the area of each element was also measured. The number of gold particles was normalized to the area of each element for comparison.

eCB levels. Cells grown in 10-cm dishes (one dish per condition) were pretreated for 30 min with inhibitors or vehicle (DMSO, 0.1%) by adding 1 ml directly to the medium (37 °C, shaking water bath). To stimulate the neurons, glutamate (100 μM) and carbachol (1 mM) were added in 1 ml for an additional 2.5 min²⁷. The reaction was stopped by collecting the medium and adding 5 ml of ice-cold methanol. 2-AG and anandamide were extracted, purified and their levels determined as described⁴². Briefly, the cell medium and homogenate were added to CHCl₃ containing d₅-2-AG (150 pmol) and d₄-anandamide (50 pmol) for Folch extraction. The organic phase was recovered and dried under N₂, and anandamide and 2-AG partially purified by solid-phase chromatography columns (silica), eluting them with ethylacetate/acetone (1:1, 2 ml). The eluate was then dried under N₂, derivitized with BSTFA (SupelCo) and analyzed by CI-GC-MS (Varian CP-8400 Autosampler, CP3800 Varian GC, Varian Saturn 2000 mass spectrometer).

Electrophysiology. Electrophysiology experiments were performed in Bordeaux, France according to the criteria of the European Communities Council Directive (86/609/EEC) and the United States National Institutes of Health *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Mouse brain slices (C57BL/6, ~8 wks old, 300 μm) were prepared as described³². In brief, immediately after cutting, slices containing the prefrontal cortex were stored for ~30 min at 32–35 °C in artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mM): NaCl (126), KCl (2.5), MgCl₂ (2.4), CaCl₂ (1.2), NaHCO₃ (18), NaH₂PO₄ (1.2) and glucose (11), and equilibrated with 95% O₂/5% CO₂. Slices were then placed in the recording chamber at room temperature and superfused with ACSF (2 ml min⁻¹, 32–35 °C). The superfusion medium contained picrotoxin (100 μM) to block GABA_A receptors. Inhibitors were added at the final concentration to the superfusion medium. To evoke synaptic currents, stimuli (100–150 μs duration) were delivered at 0.1 Hz through a glass electrode filled with ACSF placed in layer 2/3. The recording pipette was placed in layer 5/6 and was also filled with ACSF. Both the field excitatory postsynaptic potential (fEPSP) area and amplitude were measured (graphs depict area).

Data analysis. Values are expressed as mean \pm s.e.m. Statistical analysis and dose-response curves were generated using GraphPad PRISM (version 4).

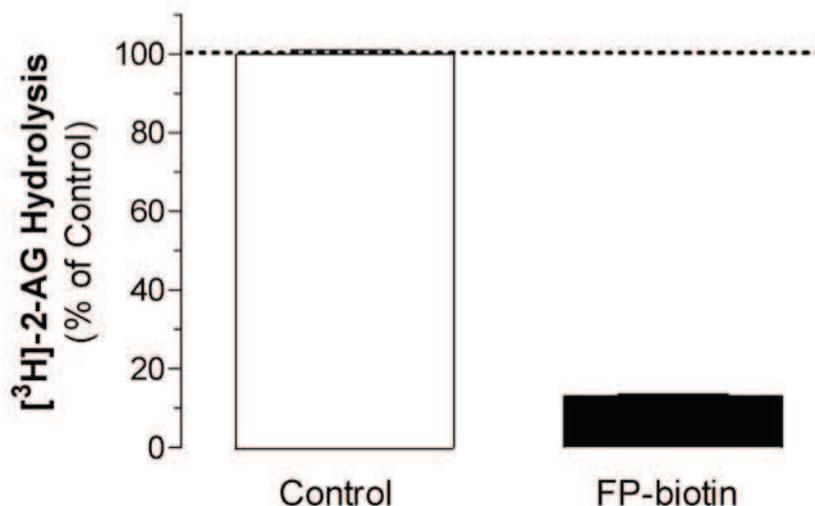
37. Stella, N., Pellerin, L. & Magistretti, P. Modulation of the glutamate-evoked release of arachidonic acid from mouse cortical neurons: involvement of a pH-sensitive membrane phospholipase A2. *J. Neurosci.* **15**, 3307–3317 (1995).
38. Eng, J., McCormack, A.L. & Yates, J.R. III. An approach to correlate MS/MS data to amino acid sequence in a protein database. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **5**, 976–989 (1994).
39. Moffat, J. *et al.* A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. *Cell* **124**, 1283–1298 (2006).
40. Berghuis, P. *et al.* Hardwiring the brain: endocannabinoids shape neuronal connectivity. *Science* **316**, 1212–1216 (2007).
41. Berod, A., Hartman, B.K. & Pujol, J.F. Importance of fixation in immunohistochemistry: use of formaldehyde solutions at variable pH for the localization of tyrosine hydroxylase. *J. Histochem. Cytochem.* **29**, 844–850 (1981).
42. Muccioli, G.G. & Stella, N. An optimized GC-MS method detects nanomolar amounts of anandamide in mouse brain. *Anal. Biochem.* **373**, 220–228 (2007).

ABHD6 controls 2-AG accumulation and efficacy at cannabinoid receptors

William R. Marris, Jacqueline L. Blankman, Eric A. Horne, Aurore Thomazeau, Yi Hsing Lin, Jonathan Coy, Agnes L. Bodor, Giulio G. Muccioli, Sherry Shu-Jung Hu, Grace Woodruff, Susan Fung, Mathieu Lafourcade, Jessica P. Alexander, Jonathan Z. Long, Weiwei Li, Cong Xu, Thomas Möller, Ken Mackie, Olivier J. Manzoni, Benjamin F. Cravatt and Nephi Stella

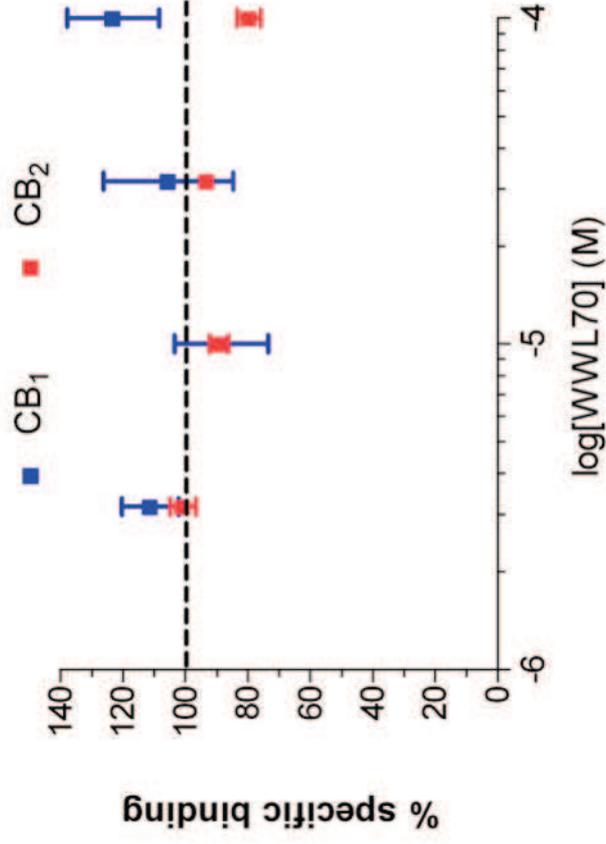
Supplementary Figure 1: The ABPP probe (FP-biotin) inhibits ~90% of the 2-AG hydrolysis in the mitochondrial fraction of BV-2 cells.

Mitochondrial fractions of BV-2 cells were pre-incubated with or without the FP-biotin probe, and [^3H]-2-AG hydrolysis was quantified by measuring [^3H]-glycerol production after a 10 min reaction at 37°C. The FP-biotin probe inhibited ~90% of the total [^3H]-2-AG hydrolysis in this subcellular fraction of BV-2 cells (n=6).



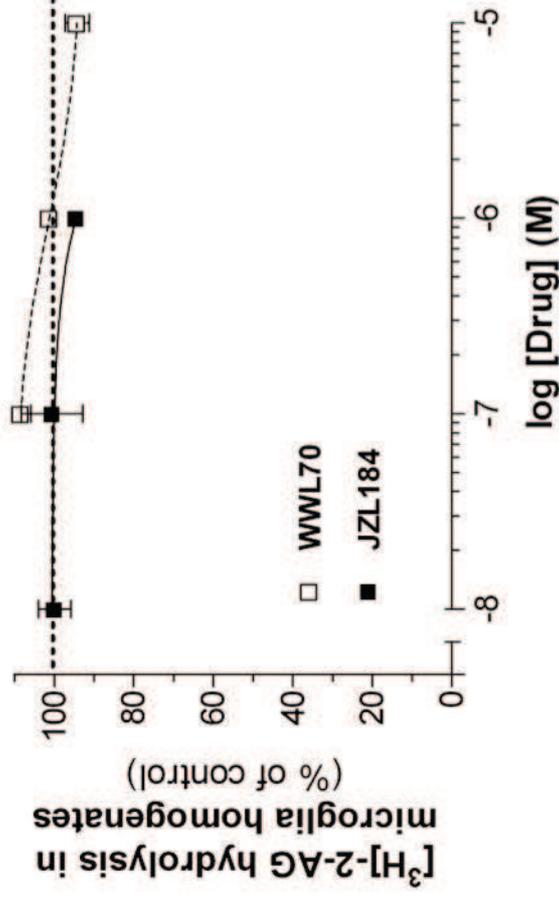
Supplementary Figure 2: WWL70 does not displace the specific binding of CP55940 to CB₁ or CB₂ receptors.

Increasing concentrations of WWL70 were tested on membrane homogenates prepared from cells expressing either mouse CB₁ or mouse CB₂ to determine whether this compound displaces the specific binding of the CB₁/CB₂ agonist [³H]-CP55940 (~1 nM). Data points represent the mean of two independent experiments performed in triplicate.



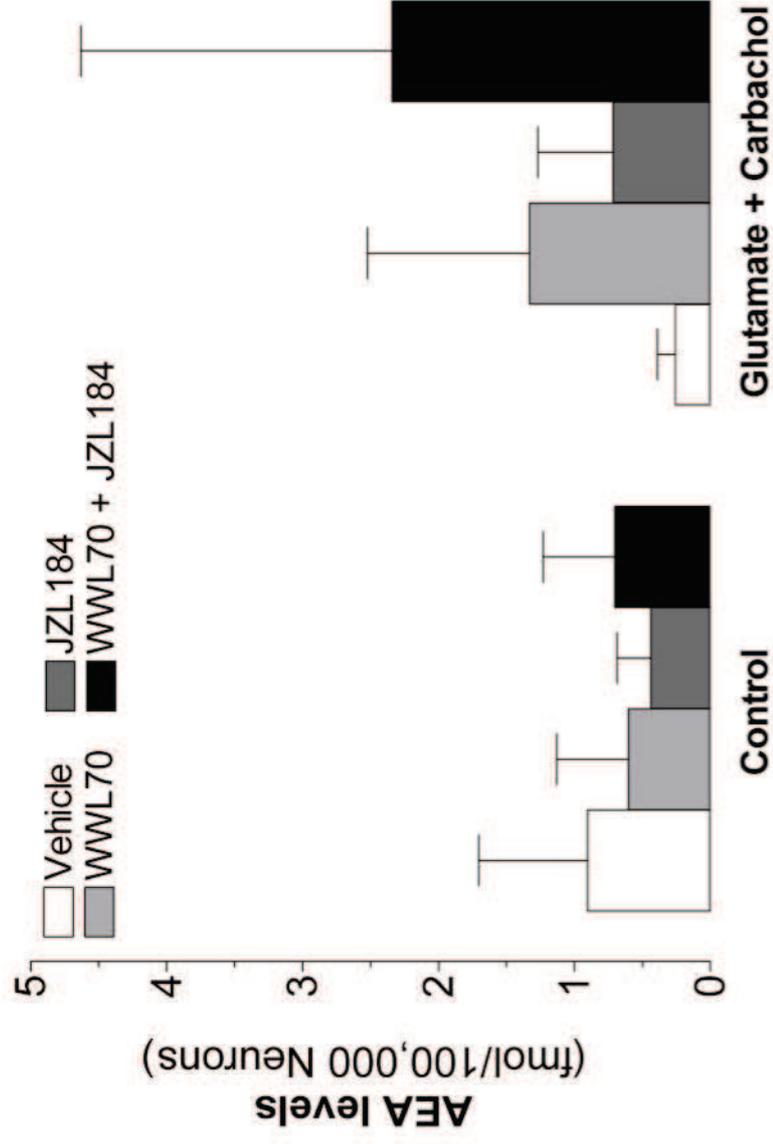
Supplementary Figure 3: 2-AG hydrolysis in microglia does not involve ABHD6 or MAGL.

2-AG hydrolysis in homogenates prepared from microglia in primary culture is not sensitive to the ABHD6 inhibitor WWL70 or the MAGL inhibitor JZL184. [³H]-2-AG hydrolysis was quantified by measuring [³H]-glycerol production after a 10 min incubation at 37°C (N = 3, *i.e.* three independent experiments performed in triplicate).



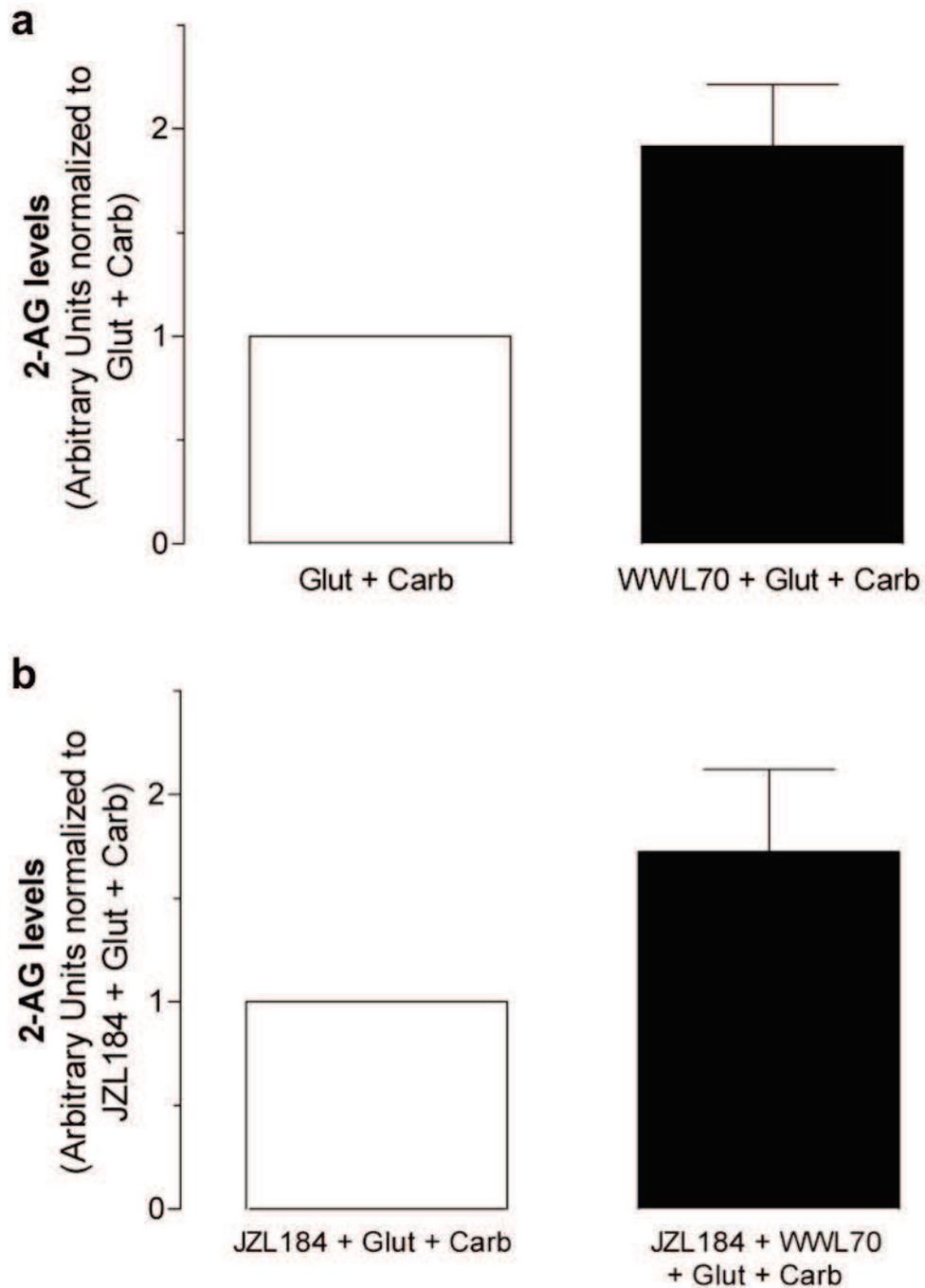
Supplementary Figure 4: Inhibition of ABHD6 and MAGL in intact neurons does not significantly affect AEA levels.

Intact neurons in culture were preincubated with WWL70 (10 μ M) and/or JZL184 (1 μ M) or vehicle (0.1% DMSO) for 30 min, and then stimulated with or without glutamate (100 μ M) + carbachol (1 mM) for 2.5 min. Lipids were then extracted and AEA levels quantified by GC-MS. Data represents mean \pm s.e.m. for three independent experiments, each performed in duplicate.



Supplementary Figure 5: ABHD6 inhibition increases the stimulated accumulation of 2-AG proportionally in both the presence and absence of MAGL inhibition.

Primary neurons in culture were pretreated with WWL70 (10 μ M), JZL184 (1 μ M), or both for 30 min, and then stimulated with a combination of glutamate (100 μ M) and carbachol (1 mM). 2-AG levels were then quantified by GC-MS. Note that WWL70 treatment increased 2-AG accumulation by \sim 2 fold in both the absence (**a**; n=4) and presence (**b**; n=4) of JZL184.



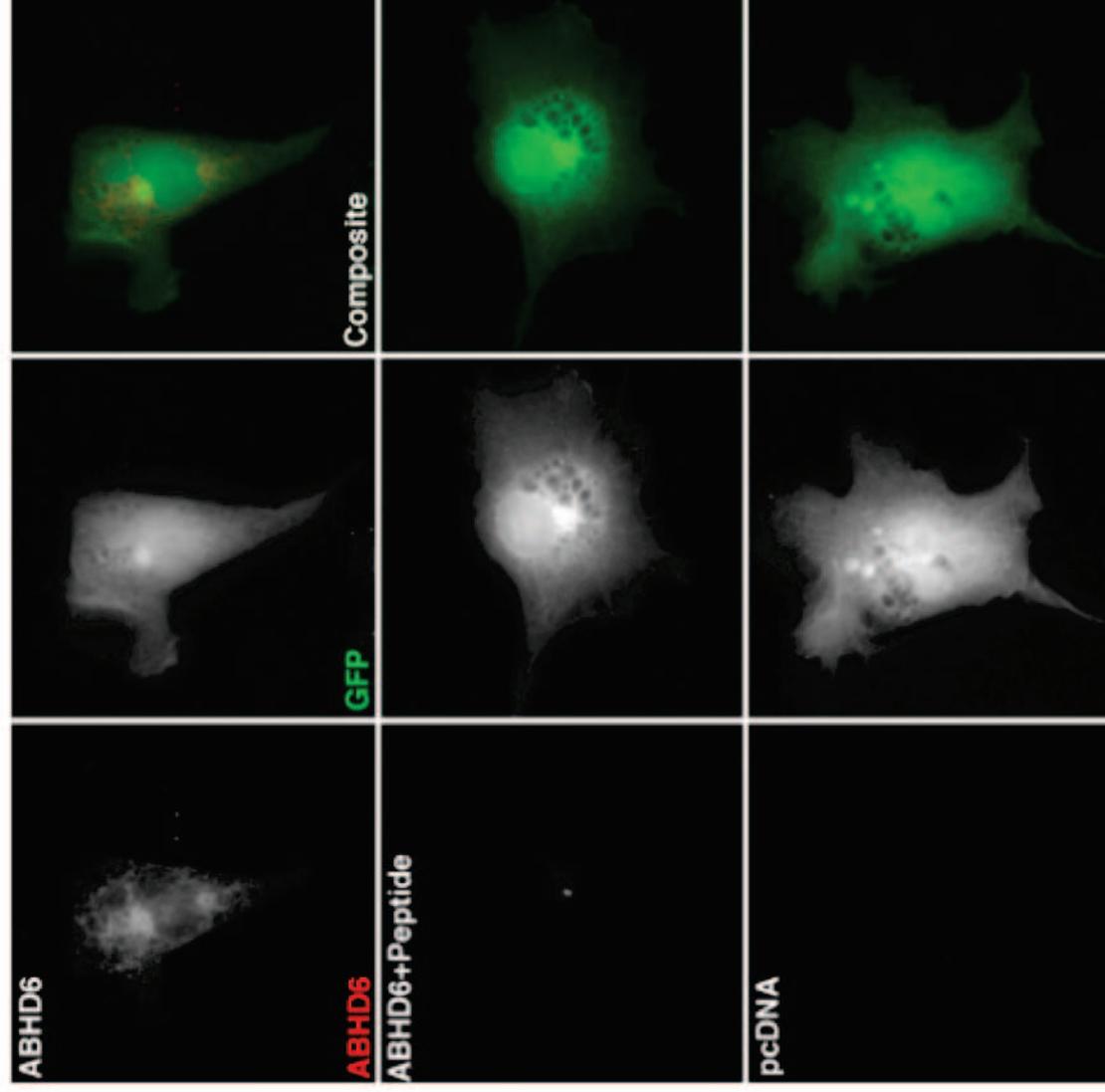
Supplementary Figure 6: **ABHD6 Epitope**

The rabbit polyclonal antibody generated to visualize ABHD6 recognizes a middle epitope (38 amino acids shown here in red).

Amino Acid Sequence for Mouse ABHD6
MDLDVVNMFVIAGGTLAIPILAFVASFLLWPSALIRIYYWYWRRTLGMQVRYAHH
EDYQFCYSFRGRPGHKPSILMLHGFSAHKDMWLSVVKFLPKNLHLVCV DMPGHEG
TTRSSLDDLSIVGQVKRIHQFVECLKLNKKPF HLIGTSMGGHVAGVYAAAYPSDV
CSLSLVCPAGLQYSTDNPFVQRLKELEESAAIQKIPLIPSTPEEMSEMLQLCSYV
RFKVPQQILQGLVDVRIPHNSFYRKLFLFLEIVNEKSRYSLHENMDKIKVPTQIIWG
KQDQVLDVSGADILAKSISNSQVEVLENCGHSVVMERPRKTAKLIVDFLASVHNT
DNKKLN

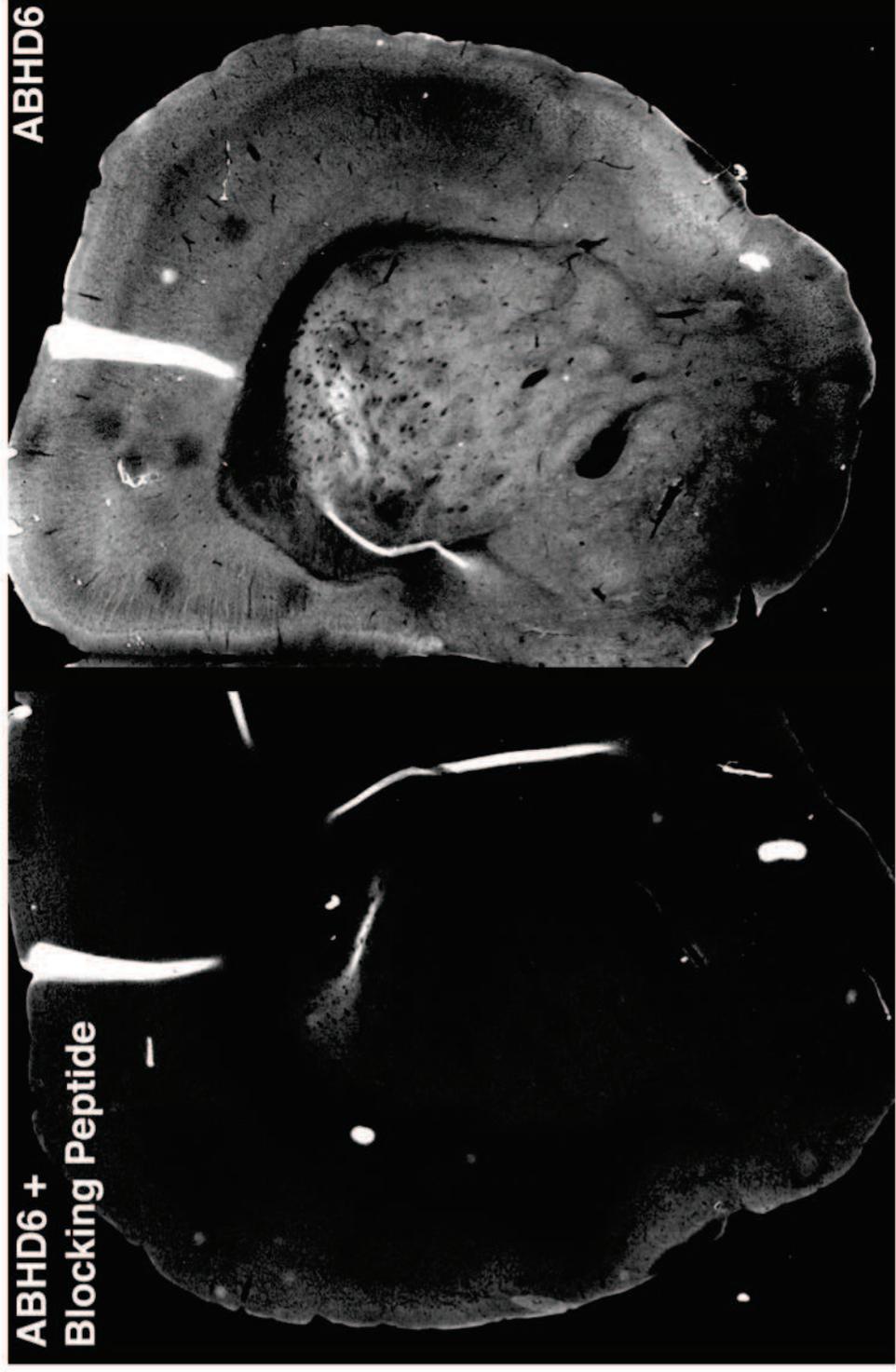
Supplementary Figure 7: ABHD6 antibody labels mouse ABHD6 transfected in COS-7 cells.

COS-7 cells were transfected with a plasmid that expresses both ABHD6 and GFP or a control plasmid that only expresses GFP (pcDNA). Incubation with the ABHD6 antibody (1:1000) resulted in clear labeling of cells expressing this protein (top row). However when the antibody is preincubated with the immunizing peptide (5 μ g; middle row) or when ABHD6 is not expressed (bottom row) then the labeling for ABHD6 is negative.

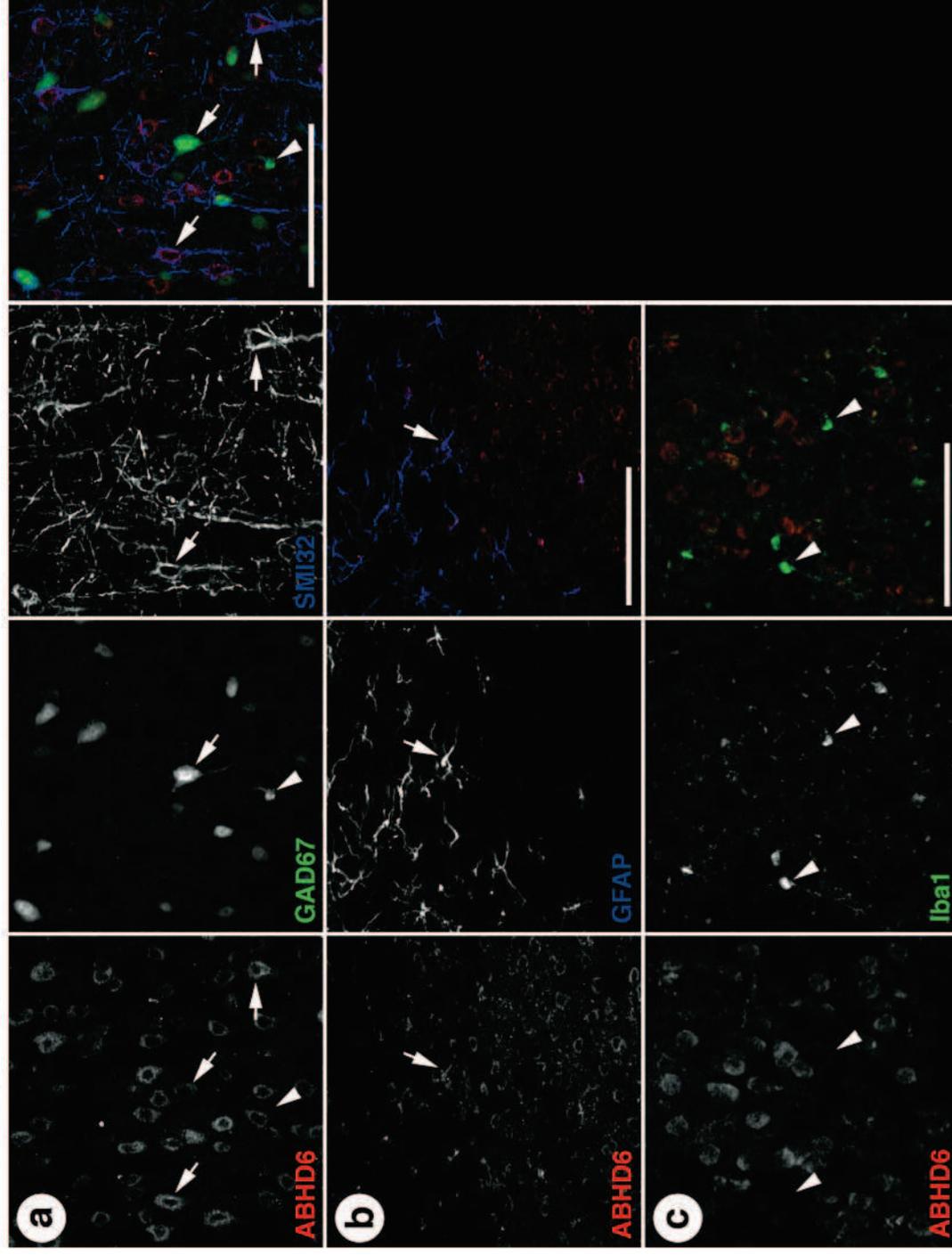


Supplementary Figure 8: ABHD6 expression in mouse brain

Coronal section of a 2 month old mouse brain at 2x magnification showing ABHD6 immunofluorescence +/- blocking peptide.

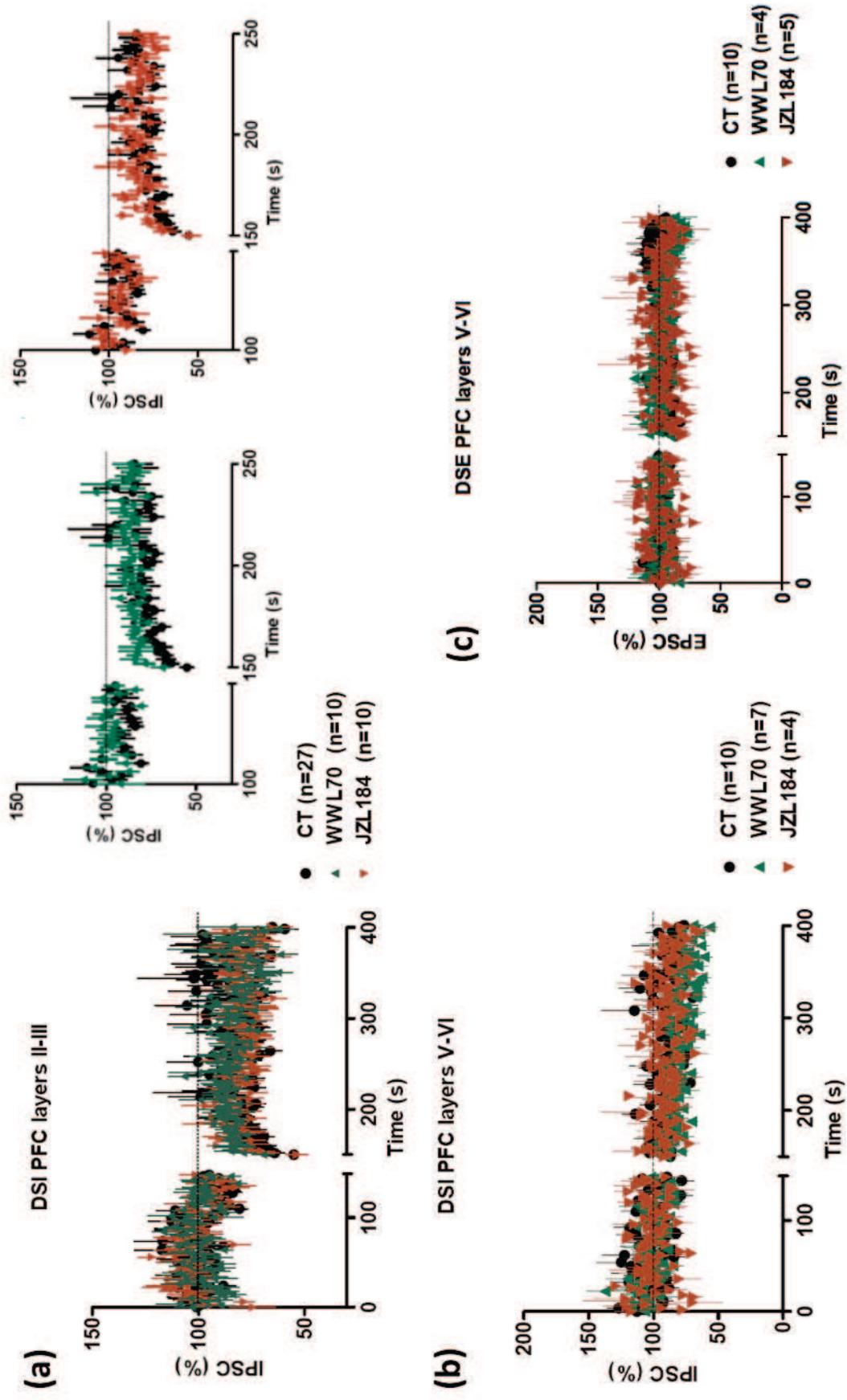


Supplementary Figure 9: ABHD6 is expressed in excitatory neurons, inhibitory neurons, and astrocytes, but not in microglia. **a**) Mouse cortical section expressing GFP in GABAergic interneurons (GAD67; green) were co-stained for ABHD6 (red) and a marker of glutamatergic neurons (SMI32; blue) revealing that ABHD6 is expressed in many glutamatergic neurons and some GABAergic neurons. **b**) Coronal section co-stained for ABHD6 (red) and a marker of astrocytes (GFAP; blue) shows that ABHD6 is also expressed in astrocytes. **c**) Microglia expressing GFP under the Iba1 promoter in the cortex lack staining for ABHD6. Arrows indicate cells positive for ABHD6, whereas arrowheads indicate ABHD6 negative cells. Scale bar = 100 μ m.



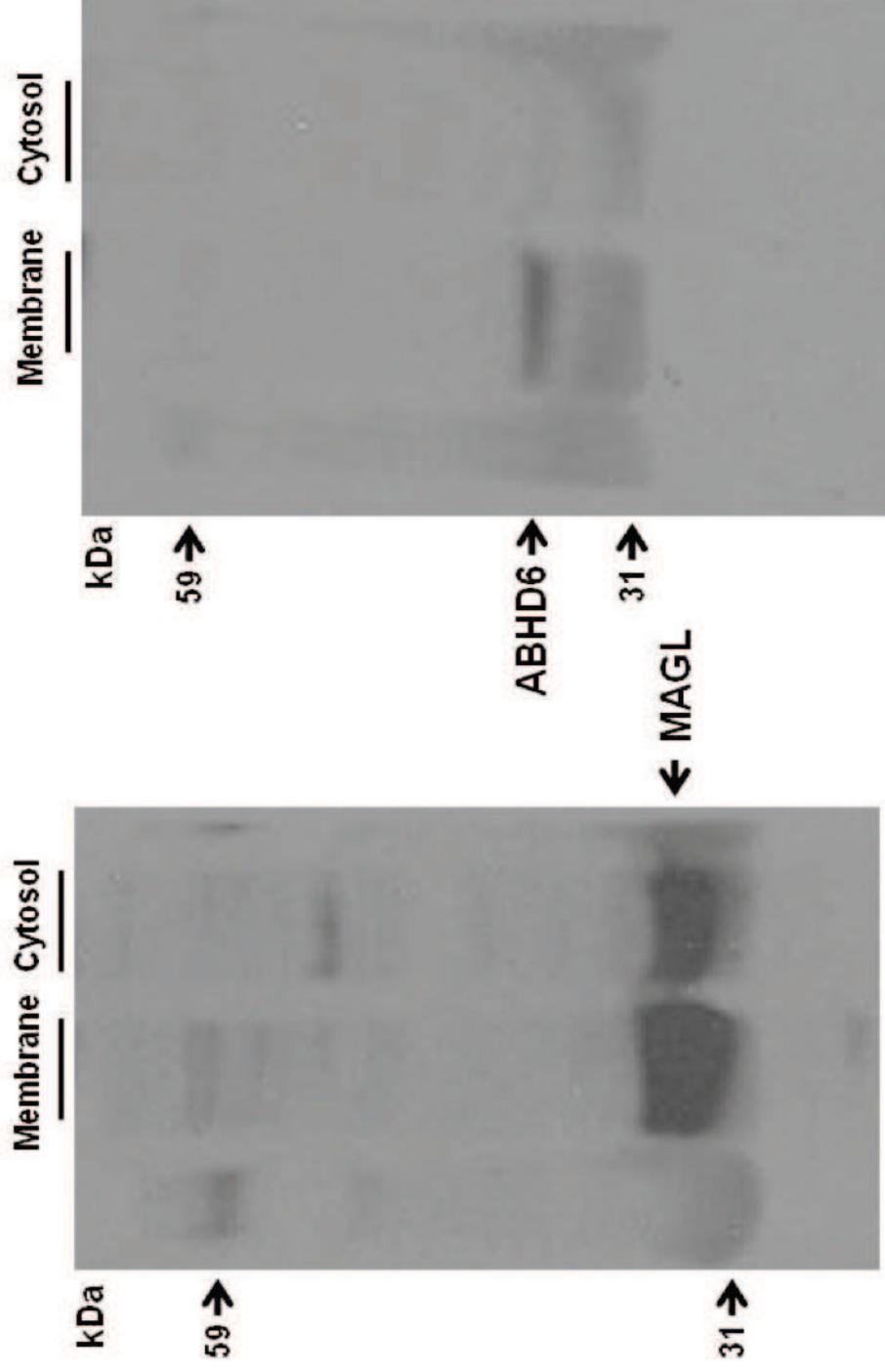
Supplementary Figure 10: Depolarization induced Suppression of Inhibition (DSI) and Excitation (DSE) in mouse cortex.

(a) A 10 second voltage step from -70mV to 0mV induces DSI in cortical layer 2/3. The rate of decay of this effect is not altered by WWL70 (10 μ M) or JZL184 (1 μ M). Insets: Detailed views for each inhibitor. The depolarization protocol did not induce (b) DSI or (c) DSE in cortical layer 5/6.



Supplementary Figure 11: Sub-cellular distribution of MAGL and ABHD6 in mouse brain

Western blots showing that MAGL immunoreactivity is found in both sub-cellular fractions of mouse brain (left blot), whereas ABHD6 immunoreactivity is only found in the membrane fraction (right blot).



Supplementary Table 1: Percent knockdown of each candidate enzyme by different shRNA constructs.

BV-2 cells were infected with the shRNA constructs listed here. The resulting BV-2 knock-down clones were harvested and the corresponding mRNA levels were measured by qPCR. These values were normalized to the respective mRNA levels in BV-2 cells transfected with scrambled shRNA. Results are expressed as the percentage decrease in mRNA levels compared to scrambled. Constructs highlighted in yellow were used for our experiments. n.a. = not applicable (i.e. colonies did not grow).

Scrambled	Knock-Down (%)
CAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTTG	0
FAAH	
GCTCTTTACCTACCTGGGAAACTCGAGTTTCCCAGGTAGGTAAAGAGC	62
GCATTGTGCATGAAAGCCCTACTCGAGTAGGGCTTTCATGCACAATGC	52
GCCCAGATGGAACACTACAAACTCGAGTTTGTAGTGTTCCATCTGGGC	83
CCCTTCTTACCAAACAACATACTCGAGTATGTTGTTTGGTAAGAAGGG	50
GCAGATTTATTCTAGCGAATCTCGAGATTCGCTAGAAATAAATCTGC	47
NTE	
CCTGTTCTAGACTGGGTTATCTCGAGATAACCCAGTCTAGGAACAGG	78
CCTATGAACGTGGACGGATATCTCGAGATATCCGTCCACGTTTCATAGG	66
CCTGTATTGGACCTCACATATCTCGAGATATGTGAGGTCCAATACAGG	55
GCCTGTATTGGACCTCACATACTCGAGTATGTGAGGTCCAATACAGGC	25
CCCGCCTTATTCATCTGCTAACTCGAGTTAGCAGATGAATAAGGCGGG	54
ABHD12	
GCCCTTTCATCTCGGTAGAAACTCGAGTTTCTACCGAGATGAAAGGGC	49
CCCTTATATTGGAGTCTCCATCTCGAGATGGAGACTCCAATATAAGGG	-81
GCAGTGGAATTAATTTGCAACTCGAGTTGCAAATTTAATTCCACTGC	50
GTGGTGATAATCCTGTGTATACTCGAGTATACACAGGATTATCACCAC	62
CCGAGACTTCAAAGTCCAGTTCTCGAGAACTGGACTTTGAAGTCTCGG	n.a.
ABHD6	
GCATGAGAATATGGACAAGATCTCGAGATCTTGTCATATTCTCATGC	-3
CAGACATATTAGCCAAGTCAACTCGAGTTGACTTGGCTAATATGTCTG	-3
CCTGCAGTACTCAACTGACAACCTCGAGTTGTCAGTTGAGTACTGCAGG	n.a.
GCCATTCCAATCCTGGCATTCTCGAGAAATGCCAGGATTGGAATGGC	37
CAGCACTGATAAGAATCTATTCTCGAGAATAGATTCTTATCAGTGCTG	51
CCTGGCATTGTTGCGTCTTCTCGAGAAAGACGCAACAAATGCCAGG	4
TGAGGACTATCAGTTCTGTTACTCGAGTAACAGAACTGATAGTCCTCA	18
CGTGGTCAAGTTCCTCCGAACCTCGAGTTCCGAAGGAAGTGGACCAGC	-34
CCATGGATTCTCCGCACACAACCTCGAGTTGTGTGCGGAGAATCCATGG	19
ATCAGTTTGTAGAATGCCTTACTCGAGTAAGGCATTCTACAACTGAT	24
GCTACTGACTGAGAAGAGAAACTCGAGTTTCTTCTCAGTCAGTAGC	49

4.4. Discussion

Cette étude a mis en évidence l'importance du rôle joué par l'ABDH6 dans la clairance du 2-AG au niveau des cellules microgliales et d'ensembles neuronaux. Cette enzyme permet, comme la MAG-lipase (Wamsteeker and Bains, 2011) mais à un degré moindre, le contrôle de l'accumulation et donc de l'efficacité du 2-AG.

Les eCB sont des composés produits à la demande (Marsicano et al., 2003). Leur dégradation est de ce fait un point critique dans le contrôle de leur action. Nous avons montré qu'au niveau neuronal, la MAG-lipase et l'ABHD6 étaient deux enzymes hydrolytiques qui contrôlaient de manière indépendante mais avec des effets additifs la dégradation du 2-AG. Ainsi, elles assurent ensemble la régulation de l'effet synaptique du 2-AG. Les actions différentielles de ces deux enzymes seraient dictées par leurs caractéristiques propres, à savoir :

- leur distribution synaptique : la MAG-lipase est essentiellement retrouvée au niveau des terminaisons présynaptiques (Gulyas et al., 2004). A l'inverse, nous avons montré dans cette étude que l'ABHD6 était principalement concentrée au niveau des épines dendritiques.
- leur localisation subcellulaire : la MAG-lipase est protéine soluble retrouvée dans le cytosol et associée à la membrane plasmique. L'ABHD6 est quant à elle une protéine transmembranaire orientée vers le cytosol (Blankman et al., 2007).
- leur taux cellulaire

La MAG-lipase, bien que participant à 80% à la dégradation du 2-AG, n'est que faiblement exprimée, à l'inverse de l'ABHD6.

Ainsi, ces deux enzymes contrôlèrent des pools distincts de 2-AG.

Nous avons montré que l'inhibition spécifique de la MAG-lipase ou celle de l'ABHD6 était suffisante pour induire par un protocole sous-liminaire la LTD dépendante du 2-AG. Ceci signifie que l'efficacité du 2-AG sur ses CB1-R présynaptiques est contrôlée de manière aussi importante au niveau du site de production (postsynaptique) qu'au niveau du site d'action (présynaptique).

Toutefois, l'inhibition simultanée des deux enzymes ne permet pas à la stimulation sous-liminaire d'induire la LTD. Ceci s'explique par l'accumulation excessive du 2-AG qui entraîne l'activation tonique et persistante des CB1-R et aboutit donc à leur désensibilisation (Zhong et al., 2011).

La clairance des eCB est donc un point critique dans leur action, des défauts d'élimination pouvant entraîner des déséquilibres homéostatiques à conséquences néfastes. Ceci fait de ces enzymes des cibles de choix dans l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques relatives au désordre du système endocannabinoïde.

CONCLUSION GENERALE - PERSPECTIVES

La trisomie 21, anomalie chromosomique la plus fréquente affectant de nos jours un nouveau-né sur 800 à 1000, est la première cause de retard mental. Elle résulte, dans la majorité des cas, d'une trisomie libre du HSA21 caractérisée par la présence d'une copie additionnelle de ce chromosome dans toutes les cellules somatiques de l'organisme. Le gène *Dyrk1a* du HSA21, de par son implication dans le développement cérébral et dans l'activité synaptique, a été proposé comme gène candidat dans les symptômes neurocognitifs de la pathologie.

Quelques modèles murins surexprimant *Dyrk1a* ont été développés, mais jusque-là, très peu d'études concernant l'activité synaptique glutamatergique ont été menées. Pourtant la transmission et surtout la plasticité synaptique glutamatergique, base cellulaire de l'apprentissage et de la mémoire, sont les acteurs majeurs du fonctionnement cérébral. Leurs défaillances sont susceptibles de sous-tendre le handicap mental ou les autres troubles neurologiques de la trisomie 21 tels que l'instabilité émotionnelle. De plus, ces quelques recherches se sont focalisées sur la région hippocampique, alors que des dysfonctions sévères du CPF sont vraisemblablement également en cause. En effet, cette région cérébrale intégrative est impliquée dans les fonctions exécutives et le contrôle émotionnel, deux points particulièrement affectés chez les patients atteints de trisomie 21.

L'ensemble de ce travail de thèse a permis de mettre en lumière la transmission et la plasticité synaptique glutamatergique au sein du CPF de deux modèles murins de trisomie partielle : une lignée surexprimant le gène *Dyrk1a* murin sous contrôle de son promoteur endogène (*mBACtgDyrk1a*) et le modèle communément utilisé, la lignée *Ts65Dn* surexprimant 130 gènes dont *Dyrk1a*.

Nous avons mis en évidence la composante « synaptopathique » au sein du CPF de ces modèles, ainsi que sa réversibilité. En effet :

- la surexpression de *Dyrk1a* induisait des défauts de la transmission synaptique glutamatergique, principalement au niveau de la gamme de plasticité synaptique fonctionnelle.
- ces paramètres synaptiques étaient altérés différemment par la surexpression concomitante de nombreux autres gènes du chromosome murin analogue au 21 humain.
- le ciblage de l'activité *Dyrk1a* présentait un potentiel thérapeutique particulièrement efficace dans la correction des plasticités synaptiques affectées.
- le ciblage du système endocannabinoïde pouvait être une piste thérapeutique envisageable spécifiquement pour des défauts de la forme de plasticité synaptique dans laquelle il est impliqué.

Caractérisation des dysfonctionnements liés à l'augmentation du dosage génique de Dyrk1a

Un des buts de la recherche génétique actuelle est de comprendre le lien entre les gènes présents en trois copies, la présence de certains traits phénotypiques et leur variabilité. Il s'agit d'établir des corrélations entre le génotype et le phénotype.

Ce travail est globalement ciblé sur le gène Dyrk1a et les effets néfastes de sa surexpression. Le parallèle avec le modèle Ts65Dn est intéressant, dans la mesure où les phénotypes synaptiques observés diffèrent du modèle monogénique Dyrk1a, révélant ainsi la complexité de cette maladie multigénique.

La surexpression de Dyrk1a

Le travail sur le modèle mBACtgDyrk1a a révélé l'importance du rôle joué par la protéine DYKR1A dans la transmission mais surtout dans la plasticité synaptique glutamatergique. Il a également permis de confirmer l'influence des effets du dosage génique de Dyrk1a dans l'activité de la kinase pour laquelle il code.

Il est intéressant de noter que la surexpression du Dyrk1a n'engendre que peu de défauts affectant l'activité synaptique basale. En effet, les altérations morphologiques (épines dendritiques) sembleraient d'un point de vue fonctionnel être efficacement compensées. A l'inverse, un problème notoire dans l'adaptation des circuits neuronaux révèle un défaut drastique de leur flexibilité. Ceci se traduit au niveau synaptique par une réduction remarquable de la gamme de plasticité synaptique suite à la surexpression de Dyrk1a. Elle pourrait être visualisée, selon la théorie BMC, par décalage de la courbe du modèle (cf. III.4.3.) lié aux déplacements des points Θ_{LTD} et/ou Θ_{LTP} (cf. Figure 37).

La dissection des voies de signalisation affectées, des mécanismes défailants, et de protéines impliquées est un point délicat, tant ces paramètres, nombreux et complexes (comme détaillés dans l'introduction) sont étroitement contrôlés et régulés.

Les souris Ts65Dn

L'étude de ce modèle permet de se placer dans un environnement génique plus comparable à celui retrouvé dans la trisomie 21. En effet, le modèle Ts65Dn présente une trisomie de plus d'une centaine de gènes. Les régulations inter-géniques ne sont pour le moment pas connues. Il est possible que l'excès d'expression de gènes du chromosome 21 entraîne un changement dans l'expression de gènes qu'il contient ou que contiennent d'autres chromosomes. Des analyses comparatives de l'expression des gènes présents sur d'autres chromosomes ont mis en évidence que les dérégulations géniques étaient spécifiques du HSA21 chez les fœtus atteints de trisomie 21 (Mao et al., 2003). Toutefois, des études chez le modèle Ts65Dn ont mis en évidence qu'il y aurait une altération de l'expression génique globale chez ces souris (Antonarakis, 2001; Antonarakis et al., 2004). Les phénomènes de régulation expressionnelle sont complexes, donc les dosages géniques subséquents aussi. De plus, les produits des gènes peuvent également interagir entre eux, afin de mettre en place des mécanismes compensatoires/homéostatiques ou à l'inverse d'aggraver les « primo » conséquences.

Les paramètres synaptiques seraient affectés différemment chez les souris Ts65Dn, reflétant la complexité des effets géniques impliqués dans la pathologie.

Les mécanismes neuronaux permettant l'adaptation des circuits cérébraux (par exemple lors de l'apprentissage) ne fonctionneraient pas parfaitement chez les malades atteints de trisomie 21. Les changements fonctionnels et structurels mis en jeu dépendent d'un très grand nombre de protéines synaptiques. Décrypter l'ensemble des désordres synaptiques morphofonctionnels est un point délicat mais essentiel pour la physiopathologie de la maladie.

Pour confirmer la part de Dyrk1a dans les désordres observés chez les modèles surexprimant le gène, quelques points sont à éclaircir.

- Il serait informatif pour mieux comprendre le rôle de DYRK1A dans l'activité synaptique d'approfondir les études sur le modèle hétérozygote.
- Il serait intéressant de pousser l'étude des implications spécifiques de la protéine DYRK1A dans l'activité synaptique dans un contexte où de nombreux autres gènes sont également trisomiques. Une approche serait d'évaluer les conséquences d'un dosage génique normalisé pour Dyrk1a sur un fond génétique Ts65Dn. Ceci pourrait se faire par croisement d'un allèle nul pour Dyrk1a, diminuant ainsi le nombre d'allèles du gène de trois à deux copies (Haydar and Reeves, 2011).

Une autre technique pour normaliser le dosage génique Dyrk1a serait d'en éteindre partiellement l'expression par ARN interférence (Canzonetta et al., 2008; Ortiz-Abalia et al., 2008).

D'un point de vue développemental, existerait-il des fenêtres critiques dans l'apparition des symptômes neuronaux de la trisomie 21? Il pourrait être intéressant de déterminer la séquence de mise en place des désordres synaptiques liés à la surexpression de Dyrk1a (Haydar and Reeves, 2011). Ceci serait envisageable par la génération d'animaux transgéniques conditionnels/inductibles permettant le contrôle de la fenêtre temporelle et spatiale d'expression de modèle de surdosage ou KO de Dyrk1a. Des études développementales seraient également intéressantes chez le modèle Ts65Dn.

Dans nos expériences, la transmission inhibitrice a été systématiquement bloquée. Ceci n'est pas très physiologique d'autant qu'au niveau cortical les interneurons jouent un rôle essentiel dans le traitement de l'information et seraient impliqués dans les désordres psychiatriques majeurs (pour revue : Marín, 2012). Pour le moment, rien n'est connu sur les interactions entre DYRK1A et le système GABAergique. Seule une étude récente révèle que la surexpression de Dyrk1a facilite l'orientation GABAergique de la différenciation neuronale (Mazur-Kolecka et al., 2012). Il serait indispensable d'étudier, dans le CPF des modèles surexprimant Dyrk1a et Ts65Dn, la transmission et la plasticité synaptique GABAergique pour faire le parallèle avec l'activité glutamatergique et repérer d'éventuels déséquilibres excitation/inhibition comme les études dans l'hippocampe des Ts65Dn réalisés par les groupes de Mobley et Garner (Kleschnikov et al., 2004 ; Fernandez et al., 2007).

Démarches thérapeutiques

Un autre intérêt à développer des modèles animaux pour les pathologies est la possibilité d'essais thérapeutiques. Nous avons vu que l'inhibition pharmacologique de l'activité DYRK1A avait un fort pouvoir correctif pour les altérations synaptiques observées chez les animaux mBACtgDyrk1a adultes. La compréhension des mécanismes exacts permet de développer des approches thérapeutiques plus ciblées, comme dans le cadre de la plasticité synaptique dépendante du système endocannabinoïde (cf. Etude 2). Il serait intéressant de voir les effets du thé vert sur les souris Ts65dn, d'autant qu'une étude à montrer qu'une forme de plasticité synaptique pouvait être restaurée chez ces animaux après traitement à l'EGCG (Xie et al., 2008).

Des recherches sont en cours pour développer de nouveaux inhibiteurs synthétiques de l'activité DYRK1A, plus spécifiques et plus puissants que ceux actuellement utilisés, qui peuvent parfois avoir des effets secondaires. Par exemple, l'harmine n'est pas un composé de choix de par ses propriétés épileptogènes et hallucinogènes. L'évaluation de l'effet de substance, d'effets indésirables potentiels, doit en premier lieu passer par l'expérimentation animale.

Ces études prometteuses laissent espérer d'éventuelles thérapies pour soigner certains aspects majeurs de la trisomie 21 dont le handicap intellectuel. Les résultats que nous avons obtenus sont très encourageants et présument que des améliorations des potentialités cognitives et peut-être des capacités d'autonomie des patients porteurs de trisomie 21 par des thérapies postnatales sont envisageables. Il faut encore en démontrer l'efficacité et les bénéfices par des essais cliniques chez les humains, ce qui est en cours dans l'équipe du professeur Mara Dierssen du Centre de Régulation Génomique de Barcelone. En effet, suite à une phase pilote concluante, la deuxième étape de l'essai clinique du traitement à l'EGCG a été lancée en début d'année sur un plus grand échantillon de patients trisomie 21.

Ces traitements basés sur la pharmacologie constituent, dans l'immédiat, une alternative concrète à la thérapie génique, champ d'exploration particulièrement difficile. Mais, ces pistes thérapeutiques sont plus dans un but d'améliorer les conditions de vie des patients (potentialités cognitives et les capacités d'autonomie) que pour, à proprement dit, « soigner » la maladie. La recherche sur la trisomie 21 progresse, et, fait nouveau, commencerait à susciter l'intérêt des laboratoires pharmaceutiques. Ce qu'il faut maintenant, c'est mobiliser les décideurs politiques et les grandes institutions de recherche médicale, car, pour l'instant, leur engagement en faveur de la recherche sur la maladie reste très limité.

Les avancées dans la physiopathologie et les thérapies de la trisomie 21 donneront également une ouverture sur la compréhension d'autres maladies, dont certains mécanismes physiopathologiques et génétiques pourraient être communs, comme par exemple d'autres formes de retard mental telles que le syndrome de l'X fragile, ou encore la maladie d'Alzheimer.

Bibliographie

- Abbott LF, Regehr WG (2004) Synaptic computation. *Nature* 431:796–803.
- Abraham WC (2008) Metaplasticity: tuning synapses and networks for plasticity. *Nature reviews Neuroscience* 9:387.
- Abraham WC, Bear MF (1996) Metaplasticity: plasticity of synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences* 19:126–130.
- Abreu-Villaça Y, Filgueiras CC, Manhães AC (2011) Developmental aspects of the cholinergic system. *Behavioural brain research* 221:367–378.
- Adayev T, Chen-Hwang M, Muralami N, Wang R, Hwang Y-W (2006a) MNB/DYRK1A phosphorylation regulates the interactions of Synaptojanin 1 with endocytic accessory proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 351:1060–1065.
- Adayev T, Murakami N, Wegiel J, Hwang Y-wen (2006b) Kinetic Properties of a MNB/DYRK1A Mutant Suitable for the Elucidation of Biochemical Pathways. *Biochemistry* 45:12011–12019.
- Ahmad M, Polepalli JS, Goswami D, Yang X, Kaeser-Woo YJ, Südhof TC, Malenka RC (2012) Postsynaptic complexin controls AMPA receptor exocytosis during LTP. *Neuron* 73:260–267
- Ahn K-J, Jeong HK, Choi H-S, Ryoo S-R, Kim YJ, Goo J-S, Choi S-Y, Han J-S, Ha I, Song W-J (2006a) DYRK1A BAC transgenic mice show altered synaptic plasticity with learning and memory defects. *Neurobiology of disease* 22:463–472
- Ahn K-J, Jeong HK, Choi H-S, Ryoo S-R, Kim YJ, Goo J-S, Choi S-Y, Han J-S, Ha I, Song W-J (2006b) DYRK1A BAC transgenic mice show altered synaptic plasticity with learning and memory defects. *Neurobiology of disease* 22:463–472
- Altafaj X, Dierssen M, Baamonde C, Martí E, Visa J, Guimerà J, Oset M, González JR, Flórez J, Fillat C, Estivill X (2001) Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome. *Human molecular genetics* 10:1915–1924.
- Anggono V, Huganir RL (2012) Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Current opinion in neurobiology*.
- Antonarakis SE (2001) Chromosome 21: from sequence to applications. *Current Opinion in Genetics & Development* 1:241–246.
- Antonarakis SE, Lyle R, Chrast R, Scott HS (2001) Differential gene expression studies to explore the molecular pathophysiology of Down syndrome. *Brain research Brain research reviews* 36:265–274.
- Antonarakis SE, Lyle R, Dermitzakis ET, Reymond A, Deutsch S (2004) Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nature reviews Genetics* 5:725–738.
- Anwyl R (1999) Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain research reviews* 29:83–120.
- Armstrong N, Gouaux E (2000) Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. *Neuron* 28:165–181.
- Armstrong N, Jasti J, Beich-Frandsen M, Gouaux E (2006) Measurement of conformational changes accompanying desensitization in an ionotropic glutamate receptor. *Cell* 127:85–97.

- Arnstén AFT (2011) Prefrontal cortical network connections: key site of vulnerability in stress and schizophrenia. *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 29:215–223.
- Arnth-Jensen N, Jabaudon D, Scanziani M (2002) Cooperation between independent hippocampal synapses is controlled by glutamate uptake. *Nature neuroscience* 5:325–331.
- Arron JR, Winslow MM, Polleri A, Chang C-P, Wu H, Gao X, Neilson JR, Chen L, Heit JJ, Kim SK, Yamasaki N, Miyakawa T, Francke U, Graef I a, Crabtree GR (2006) NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature* 441:595–600.
- Augustine GJ (2001) How does calcium trigger neurotransmitter release? *Current opinion in neurobiology* 11:320–326.
- Ayalon G, Stern-Bach Y (2001) Functional assembly of AMPA and kainate receptors is mediated by several discrete protein-protein interactions. *Neuron* 31:103–113.
- Bachovchin D a, Ji T, Li W, Simon GM, Blankman JL, Adibekian A, Hoover H, Niessen S, Cravatt BF (2010) Superfamily-wide portrait of serine hydrolase inhibition achieved by library-versus-library screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:20941–20946.
- Baddeley A (1990) Working Memory. *Science* 255.
- Baddeley A (2003) Working memory: looking back and looking forward. *Nature reviews Neuroscience* 4:829–839.
- Bagal A a, Kao JPY, Tang C-M, Thompson SM (2005) Long-term potentiation of exogenous glutamate responses at single dendritic spines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:14434–14439.
- Bain J, McLauchlan H, Elliott M, Cohen P (2003) The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *The Biochemical journal* 371:199–204.
- Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, Klevernic I, Arthur JSC, Alessi DR, Cohen P (2007) The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *The Biochemical journal* 408:297–315.
- Banke TG, Bowie D, Lee H, Haganir RL, Schousboe a, Traynelis SF (2000) Control of GluR1 AMPA receptor function by cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of neuroscience* 20:89–102.
- Barceló F, Knight RT (2002) Both random and perseverative errors underlie WCST deficits in prefrontal patients. *Neuropsychologia* 40:349–356.
- Barceló F, Sanz M, Molina V, Rubia FJ (1997) The Wisconsin Card Sorting Test and the assessment of frontal function: a validation study with event-related potentials. *Neuropsychologia* 35:399–408 .
- Barraclough DJ, Conroy ML, Lee D (2004) Prefrontal cortex and decision making in a mixed-strategy game. *Nature neuroscience* 7:404–410.
- Barry M (2002) Receptor trafficking and the plasticity of excitatory synapses. *Current Opinion in Neurobiology* 12:279–286.
- Battaglia F, Quartarone A, Rizzo V, Ghilardi MF, Di Rocco A, Tortorella G, Girlanda P (2008) Early impairment of synaptic plasticity in patients with Down's syndrome. *Neurobiology of aging* 29:1272–1275.

- Baxter LL, Moran TH, Richtsmeier JT, Troncoso J, Reeves RH (2000) Discovery and genetic localization of Down syndrome cerebellar phenotypes using the Ts65Dn mouse. *Human molecular genetics* 9:195–202.
- Bechara a, Damasio H, Damasio a R, Lee GP (1999) Different contributions of the human amygdala and ventromedial prefrontal cortex to decision-making. *The Journal of neuroscience* 19:5473–5481.
- Bechara a, Damasio H, Tranel D, Anderson SW (1998) Dissociation Of working memory from decision making within the human prefrontal cortex. *The Journal of neuroscience* 18:428–437.
- Bechara A (2004) The role of emotion in decision-making: evidence from neurological patients with orbitofrontal damage. *Brain and cognition* 55:30–40.
- Becker W, Sippl W (2010) Activation, regulation, and inhibition of DYRK1A. *The FEBS journal* 278:246–256.
- Becker W, Weber Y, Wetzell K, Eirmbter K, Tejedor FJ, Joost HG (1998) Sequence characteristics, subcellular localization, and substrate specificity of DYRK-related kinases, a novel family of dual specificity protein kinases. *The Journal of biological chemistry* 273:25893–25902.
- Belichenko NP, Belichenko PV, Kleschevnikov AM, Salehi A, Reeves RH, Mobley WC (2009) The “Down syndrome critical region” is sufficient in the mouse model to confer behavioral, neurophysiological, and synaptic phenotypes characteristic of Down syndrome. *The Journal of neuroscience* 29:5938–5948.
- Belichenko PV, Kleschevnikov AM, Salehi A, Epstein CJ, Mobley WC (2007a) Synaptic and Cognitive Abnormalities in Mouse Models of Down Syndrome: Exploring Genotype-Phenotype Relationships. *The journal of comparative neurology* 504:329–345.
- Belichenko PV, Kleschevnikov AM, Salehi A, Epstein CJ, Mobley WC (2007b) Synaptic and Cognitive Abnormalities in Mouse Models of Down Syndrome: Exploring Genotype-Phenotype Relationships. *The journal of comparative neurology* 504:329–345.
- Belichenko PV, Masliah E, Kleschevnikov AM, Villar AJ, Epstein CJ, Salehi A, Mobley WC (2004) Synaptic structural abnormalities in the Ts65Dn mouse model of Down Syndrome. *The Journal of comparative neurology* 480:281–298.
- Bellone C, Lüscher C, Mameli M (2008) Mechanisms of synaptic depression triggered by metabotropic glutamate receptors. *Cellular and molecular life sciences* 65:2913–2923.
- Benavides-Piccione R, Ballesteros-Yáñez I, de Lagrán MM, Elston G, Estivill X, Fillat C, Defelipe J, Dierssen M (2004) On dendrites in Down syndrome and DS murine models: a spiny way to learn. *Progress in neurobiology* 74:111–126.
- Benavides-Piccione R, Dierssen M, Ballesteros-Yáñez I, Martínez de Lagrán M, Arbonés ML, Fotaki V, DeFelipe J, Elston GN (2005) Alterations in the phenotype of neocortical pyramidal cells in the Dyrk1A^{+/-} mouse. *Neurobiology of disease* 20:115–122.
- Benes FM (2000) Emerging principles of altered neural circuitry in schizophrenia. *Brain research Brain research reviews* 31:251–269.
- Beneyto M, Lewis DA (2011) Insights into the neurodevelopmental origin of schizophrenia from postmortem studies of prefrontal cortical circuitry. *International journal of developmental neuroscience* 29:295–304.
- Bennett MVL, Zukin RS (2004) Electrical Coupling and Neuronal Synchronization in the Mammalian Brain. *Neuron* 41:495–511.

- Bergles DE, Diamond JS, Jahr CE (1999) Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. *Current opinion in neurobiology* 9:293–298.
- Best TK, Cramer NP, Chakrabarti L, Haydar TF, Galdzicki Z (2011) Dysfunctional hippocampal inhibition in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Experimental neurology* 233:749–757.
- Bhatt DH, Zhang S, Gan W-B (2009) Dendritic spine dynamics. *Annual review of physiology* 71:261–282.
- Bienenstock E, Cooper N, Munro W (1982) THEORY FOR THE DEVELOPMENT OF NEURON SELECTIVITY: ORIENTATION AND BINOCULAR INTERACTION VISUAL CORTEX. *Journal of Neuroscience* 2:32–48.
- Birrell JM, Brown VJ (2000) Medial frontal cortex mediates perceptual attentional set shifting in the rat. *The Journal of neuroscience* 20:4320–4324.
- Bittles A, Glasson E (2004) Clinical , social , and ethical implications of changing life expectancy in Down syndrome. *Developmental medicine and child neurology* 46:282–286.
- Blankman JL, Simon GM, Cravatt BF (2007) A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chemistry & biology* 14:1347–1356.
- Blanpied TA, Ehlers MD (2004) Microanatomy of dendritic spines: emerging principles of synaptic pathology in psychiatric and neurological disease. *Biological psychiatry* 55:1121–1127.
- Blanpied TA, Scott DB, Ehlers MD (2002) Dynamics and regulation of clathrin coats at specialized endocytic zones of dendrites and spines. *Neuron* 36:435–449.
- Bliss TVP, Lomo T (1973) LONG-LASTING POTENTIATION OF SYNAPTIC TRANSMISSION IN THE DENTATE AREA OF THE ANAESTHETIZED RABBIT FOLLOWING STIMULATION OF THE PERFORANT PATH. *Journal of Physiology* 232:331–356.
- Bode AM, Dong Z (2009) Epigallocatechin 3-gallate and green tea catechins: United they work, divided they fail. *Cancer prevention research* 2:514–517.
- Borgdorff AJ, Choquet D (2002) Regulation of AMPA receptor lateral movements. *Nature* 417:649–653.
- Bosch M, Hayashi Y (2011) Structural plasticity of dendritic spines. *Current opinion in neurobiology*: 1–6.
- Boucsein C, Nawrot MP, Schnepel P, Aertsen A (2011) Beyond the cortical column: abundance and physiology of horizontal connections imply a strong role for inputs from the surround. *Frontiers in neuroscience* 5:32.
- Bowery NG (1987) Glycine-binding sites and NMDA receptors in brain. *Nature* 326:338.
- Brasnjo G, Otis TS (2001) Neuronal glutamate transporters control activation of postsynaptic metabotropic glutamate receptors and influence cerebellar long-term depression. *Neuron* 31:607–616.
- Buonanno A (2011) Presynaptic NMDA receptors also make the switch. *Nature neuroscience* 14:274–276.
- Bureau I, Mulle C (1998) Potentiation of GABAergic synaptic transmission by AMPA receptors in mouse cerebellar stellate cells: changes during development. *Journal of physiology* 509:817–831.
- Burnashev N (1996) Calcium permeability of glutamate-gated nervous system. *Current Opinion in Neurobiology* 6:311–317.

- Burnashev N, Zhou Z, Neher E, Sakmann B (1995) Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. *The Journal of physiology* 485 2:403–418 .
- Cai Q, Sheng Z-H (2009) Mitochondrial transport and docking in axons. *Experimental neurology* 218:257–267.
- Calabrese B, Wilson MS, Halpain S (2006) Development and regulation of dendritic spine synapses. *Physiology* 21:38–47.
- Canli T, Lesch K-P (2007) Long story short: the serotonin transporter in emotion regulation and social cognition. *Nature neuroscience* 10:1103–1109.
- Canzonetta C et al. (2008) DYRK1A-Dosage Imbalance Perturbs NRSF/REST Levels, Deregulating Pluripotency and Embryonic Stem Cell Fate in Down Syndrome. *The American Journal of Human Genetics* *Journal of Human Genetics* 83:388–400.
- Carbone E, Giacippoli a, Marcantoni a, Guido D, Carabelli V (2006) A new role for T-type channels in fast “low-threshold” exocytosis. *Cell calcium* 40:147–154.
- Carlesimo GA, Marotta L, Vicari S (1997) Long-term memory in mental retardation: Evidence for a specific impairment in subjects with Down’s syndrome. *Science*: 60–68.
- Carlson G, Wang Y, Alger BE (2002) Endocannabinoids facilitate the induction of LTP in the hippocampus. *Nature neuroscience* 5:723–724.
- Carroll RC, Beattie EC, Zastrow MV, Malenka RC (2001) ROLE OF AMPA RECEPTOR ENDOCYTOSIS IN SYNAPTIC PLASTICITY. *Nature Reviews Neuroscience* 2:315–324.
- Carroll RC, Malenka RC (2000) Delivering the goods to synapses. *Nature neuroscience* 3:1064–1066.
- Carroll RC, Zukin RS (2002) NMDA-receptor trafficking and targeting: implications for synaptic transmission and plasticity. *Trends in neurosciences* 25:571–577.
- Carter a G, Regehr WG (2000) Prolonged synaptic currents and glutamate spillover at the parallel fiber to stellate cell synapse. *The Journal of neuroscience* 20:4423–4434.
- Caruana D a., Warburton EC, Bashir ZI (2011) Induction of activity-dependent LTD requires muscarinic receptor activation in medial prefrontal cortex. *The Journal of neuroscience*: the official journal of the Society for Neuroscience 31:18464–18478.
- Casassus G, Mulle C (2002) Functional characterization of kainate receptors in the mouse nucleus accumbens. *Neuropharmacology* 42:603–611.
- Castillo PE, Janz R, Su TC, Tzounopoulos T, Malenka RC (1997a) Rab3A is essential for mossy fibre long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 388:590–593.
- Castillo PE, Malenka RC, Nicoll R a (1997b) Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. *Nature* 388:182–186.
- Castillo PE, Schoch S, Schmitz F, Südhof TC, Malenka RC (2002) RIM1a is required for presynaptic long-term potentiation. *Nature* 415:327–330.
- Castrén E (2005) Is mood chemistry? *Nature reviews Neuroscience* 6:241–246.

- Chakrabarti L, Best TK, Cramer NP, Carney RSE, Isaac JTR, Galdzicki Z, Haydar TF (2010) Olig1 and Olig2 triplication causes developmental brain defects in Down syndrome. *Nature neuroscience* 13:927–934.
- Chakrabarti L, Galdzicki Z, Haydar TF (2007) Defects in embryonic neurogenesis and initial synapse formation in the forebrain of the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *The Journal of neuroscience* 27:11483–11495.
- Chapman RS, Hesketh LJ (2001) Language, cognition, and short-term memory in individuals with Down syndrome. *Down's syndrome, research and practice: the journal of the Sarah Duffen Centre / University of Portsmouth* 7:1–7.
- Chen L, Chetkovich DM, Petralia RS, Sweeney NT, Kawasaki Y, Wenthold RJ, Brecht DS, Nicoll RA (2000) Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature* 408:936–943.
- Chiba T, Kayahara T, Nakano K (2001) Efferent projections of infralimbic and prelimbic areas of the medial prefrontal cortex in the Japanese monkey, *Macaca fuscata*. *Brain research* 888:83–101.
- Childress AR, Mozley PD, McElgin W, Fitzgerald J, Reivich M, Brien CPO (1999) Limbic Activation During Cue-Induced Cocaine Craving. *American Journal of psychiatry* 156:11–18.
- Cho K, Francis JC, Hirbec H, Dev K, Brown MW, Henley JM, Bashir ZI (2003) Regulation of kainate receptors by protein kinase C and metabotropic glutamate receptors. *The Journal of physiology* 548:723–730.
- Choi KY, Chung S, Roche KW (2011) Differential binding of calmodulin to group I metabotropic glutamate receptors regulates receptor trafficking and signaling. *The Journal of neuroscience* 31:5921–5930.
- Choquet D, Triller A (2003) The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. *Nature reviews Neuroscience* 4:251–265.
- Chudasama Y (2011) Animal models of prefrontal-executive function. *Behavioral neuroscience* 125:327–343.
- Chung HJ, Xia J, Scannevin RH, Zhang X, Huganir RL (2000) Phosphorylation of the AMPA receptor subunit GluR2 differentially regulates its interaction with PDZ domain-containing proteins. *The Journal of neuroscience* 20:7258–7267.
- Citri A, Malenka RC (2008) Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33:18–41.
- Cochilla A, Alford S (1998) Metabotropic glutamate receptor-mediated control of neurotransmitter release. *Neuron* 20:1007–1016.
- Colledge M, Snyder EM, Crozier RA, Soderling JA, Jin Y, Langeberg LK, Lu H, Bear MF, Scott JD (2003) Ubiquitination regulates PSD-95 degradation and AMPA receptor surface expression. *Neuron* 40:595–607.
- Collingridge BYGL, Kehl SJ, McLennan H (1983) EXCITATORY AMINO ACIDS IN SYNAPTIC TRANSMISSION IN THE SCHAEFER COLLATERAL-COMMISSURAL PATHWAY OF THE RAT HIPPOCAMPUS. *Journal of Physiology* 334:33–46.
- Collingridge GL, Peineau S, Howland JG, Wang YT (2010) Long-term depression in the CNS. *Nature reviews Neuroscience* 11:459–473.
- Congar P, Leinekugel X, Ben-Ari Y, Crépel V (1997) A long-lasting calcium-activated nonselective cationic current is generated by synaptic stimulation or exogenous activation of group I metabotropic glutamate receptors in CA1 pyramidal neurons. *The Journal of neuroscience* 17:5366–5379.

- Conn PJ, Pin JP (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology* 37:205–237.
- da Costa NM, Martin K a C (2010) Whose Cortical Column Would that Be? *Frontiers in neuroanatomy* 4:16.
- Coutinho V, Knopfel T (2002) Metabotropic Glutamate Receptors: Electrical and Chemical Signaling Properties. *The Neuroscientist* 8:551–561.
- Crombag HS, Gorny G, Li Y, Kolb B, Robinson TE (2005) Opposite effects of amphetamine self-administration experience on dendritic spines in the medial and orbital prefrontal cortex. *Cerebral cortex* 15:341–348.
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current opinion in neurobiology* 11:327–335.
- Cummings JA, Mulkey RM, Nicoll RA, Malenka RC (1996) Ca²⁺ signaling requirements for long-term depression in the hippocampus. *Neuron* 16:825–833.
- Dalley JW, Cardinal RN, Robbins TW (2004) Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 28:771–784.
- Dan Y, Poo M-ming (2006) Spike Timing-Dependent Plasticity: From Synapse to Perception. *Physiological Reviews* 86:1033–1048.
- Davidson RJ (2002) Anxiety and affective style: role of prefrontal cortex and amygdala. *Biological psychiatry* 51:68–80.
- Debanne D, Campanac E, Bialowas A, Carlier E, Alcaraz G (2011) Axon Physiology. *Physiological Reviews* 91:555–602.
- Delabar JM, Aflalo-rattenbach R, Créau N (2006) Developmental Defects in Trisomy 21 and Mouse Models. *The Scientific World Journal* 19;6: 1945–1964.
- Delaney AJ, Crane JW, Sah P (2007) Noradrenaline modulates transmission at a central synapse by a presynaptic mechanism. *Neuron* 56:880–892.
- Delatour B, Gisquet-Verrier P (1996) Prelimbic cortex specific lesions disrupt delayed-variable response tasks in the rat. *Behavioral neuroscience* 110:1282–1298.
- Delatour B, Gisquet-Verrier P (1999) Lesions of the prelimbic-infralimbic cortices in rats do not disrupt response selection processes but induce delay-dependent deficits: evidence for a role in working memory? *Behavioral neuroscience* 113:941–955.
- Delatour B, Gisquet-Verrier P (2000) Functional role of rat prelimbic-infralimbic cortices in spatial memory: evidence for their involvement in attention and behavioural flexibility. *Behavioural brain research* 109:113–128.
- Deng P-Y, Klyachko V a (2011) The diverse functions of short-term plasticity components in synaptic computations. *Communicative & integrative biology* 4:543–548.
- Dermitzakis ET, Reymond A, Lyle R, Scamuffa N, Ucla C, Deutsch S, Stevenson BJ, Flegel V, Bucher P, Jongeneel CV, Antonarakis SE (2002) Numerous potentially functional but non-genic conserved sequences on human chromosome 21. *Nature* 420:578–582.

- Deroche-Gamonet V, Belin D, Piazza PV (2004) Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science* 305:1014–1017.
- Dhami GK, Ferguson SSG (2006) Regulation of metabotropic glutamate receptor signaling, desensitization and endocytosis. *Pharmacology & therapeutics* 111:260–271.
- Di Filippo M, Tozzi A, Ghiglieri V, Picconi B, Costa C, Cipriani S, Tantucci M, Belcastro V, Calabresi P (2010) Impaired plasticity at specific subset of striatal synapses in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Biological psychiatry* 67:666–671.
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz J-C, Piomelli D (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372:686–691.
- Dias R, Robbins TW, Roberts AC (1997) Dissociable forms of inhibitory control within prefrontal cortex with an analog of the Wisconsin Card Sort Test: restriction to novel situations and independence from “on-line” processing. *The Journal of neuroscience* 17:9285–9297.
- Dias R, Robbins TW, Roberts AC (1996) Dissociation in prefrontal cortex of affective and attentional shifts. *Nature* 380:69–72.
- Dierssen M, Benavides-Piccione R, Martínez-Cué C, Estivill X, Flórez J, Elston GN, DeFelipe J (2003) Alterations of neocortical pyramidal cell phenotype in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: effects of environmental enrichment. *Cerebral cortex* 13:758–764.
- Dierssen M, Herault Y, Estivill X (2009) Aneuploidy: From a Physiological Mechanism of Variance to Down Syndrome. *Physiological Reviews* 89:887–920.
- Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D (2002) Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:10819–10824.
- Dolphin AC (2006) A short history of voltage-gated calcium channels. *British journal of pharmacology* 147 Suppl :S56–S62.
- Douglas RJ, Koch C, Mahowald M, Martin K a, Suarez HH (1995) Recurrent excitation in neocortical circuits. *Science* 269:981–985.
- Dowjat WK, Adayev T, Kuchna I, Nowicki K, Palminiello S, Hwang YW, Wegiel J (2007) Trisomy-driven overexpression of DYRK1A kinase in the brain of subjects with Down syndrome. *Neuroscience letters* 413:77–81.
- Down JL (1886) Observations on an ethnic classification of idiots. *Mental retardation* 33:54–56.
- Drago A, Crisafulli C, Sidoti A, Serretti A (2011) The molecular interaction between the glutamatergic, noradrenergic, dopaminergic and serotonergic systems informs a detailed genetic perspective on depressive phenotypes. *Progress in neurobiology* 94:418–460.
- Dudchenko P a (2004) An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 28:699–709.
- Dudek SM, Bear MF (1992) Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:4363–4367.
- Dulla CG, Huguenard JR (2009) Who let the spikes out? *Nature neuroscience* 12:959–960.

- Duncan J, Owen a M (2000) Common regions of the human frontal lobe recruited by diverse cognitive demands. *Trends in neurosciences* 23:475–483.
- Dur-e-Ahmad M, Imran M, Gul A (2011) Calcium dynamics in dendritic spines: a link to structural plasticity. *Mathematical biosciences* 230:55–66.
- Dölen G, Bear MF (2008) Role for metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) in the pathogenesis of fragile X syndrome. *The Journal of physiology* 586:1503–1508.
- D’Esposito M, Cooney JW, Gazzaley A, Gibbs SEB, Postle BR (2006) Is the prefrontal cortex necessary for delay task performance? Evidence from lesion and fMRI data. *Journal of the International Neuropsychological Society* 12:248–260.
- D’Esposito M, Detre JA, Alsop DC, Shin RK, Atlas S, Grossman M (1995) The neural basis of the central executive system of working memory. *Nature* 378:279–281.
- D’Esposito M, Postle BR, Jonides J, Smith EE (1999) The neural substrate and temporal dynamics of interference effects in working memory as revealed by event-related functional MRI. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:7514–7519.
- Van Eden CG, Hoorneman EM, Buijs RM, Matthijssen M a, Geffard M, Uylings HB (1987) Immunocytochemical localization of dopamine in the prefrontal cortex of the rat at the light and electron microscopical level. *Neuroscience* 22:849–862.
- Elston GN (2003) *Cortex, Cognition and the Cell: New Insights into the Pyramidal Neuron and Prefrontal Function*. *Cerebral Cortex* 13:1124–1138.
- Engert F, Bonhoeffer T (1999) Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399:66–70.
- Enz R (2007) The trick of the tail: protein-protein interactions of metabotropic glutamate receptors. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 29:60–73.
- Evans RM, Zamponi GW (2006) Presynaptic Ca²⁺ channels--integration centers for neuronal signaling pathways. *Trends in neurosciences* 29:617–624.
- Everitt BJ, Hutcheson DM, Ersche KD, Pelloux Y, Dalley JW, Robbins TW (2007) The orbital prefrontal cortex and drug addiction in laboratory animals and humans. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1121:576–597.
- Everitt BJ, Wolf ME (2002) Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective. *The Journal of neuroscience* 22:3312–3320.
- Fagni L, Chavis P, Ango F, Bockaert J (2000) Complex interactions between mGluRs, intracellular Ca²⁺ stores and ion channels in neurons. *Trends in neurosciences* 23:80–88.
- Fernandez F, Morishita W, Zuniga E, Nguyen J, Blank M, Malenka RC, Garner CC (2007) Pharmacotherapy for cognitive impairment in a mouse model of Down syndrome. *Nature neuroscience* 10:411–413.
- Fernandez F, Trinidad JC, Blank M, Feng D-D, Burlingame AL, Garner CC (2009) Normal protein composition of synapses in Ts65Dn mice: a mouse model of Down syndrome. *Journal of neurochemistry* 110:157–169.
- Ferraguti F, Shigemoto R (2006) Metabotropic glutamate receptors. *Cell and tissue research* 326:483–504.

- Ferreira LT, Dale LB, Ribeiro FM, Babwah AV, Pampillo M, Ferguson SSG (2009) Calcineurin inhibitor protein (CAIN) attenuates Group I metabotropic glutamate receptor endocytosis and signaling. *The Journal of biological chemistry* 284:28986–28994.
- Ferrer I, Gullotta F (1990) Down' s syndrome and Alzheimer ' s disease: dendritic spine counts in the hippocampus. *Acta Neuropathologica* 79:680–685.
- Fiala JC, Spacek J, Harris KM (2002) Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain research Brain research reviews* 39:29–54.
- Fino E, Venance L (2010) Spike-timing dependent plasticity in the striatum. *Frontiers in synaptic neuroscience* 2:6.
- Fioravante D, Regehr WG (2011) Short-term forms of presynaptic plasticity. *Current opinion in neurobiology* 21:269–274.
- Fiorillo CD, Williams JT (1998) Glutamate mediates an inhibitory postsynaptic potential in dopamine neurons. *Nature* 394:78–82.
- FitzPatrick DR, Ramsay J, McGill NI, Shade M, Carothers AD, Hastie ND (2002) Transcriptome analysis of human autosomal trisomy. *Human molecular genetics* 11:3249–3256.
- Forbes EE, Dahl RE (2011) Research Review: Altered reward function in adolescent depression: what, when and how? *Journal of child psychology and psychiatry* 1:3–15.
- Fortunato JJ, Réus GZ, Kirsch TR, Stringari RB, Fries GR, Kapczinski F, Hallak JE, Zuardi AW, Crippa J a, Quevedo J (2010) Effects of beta-carboline harmine on behavioral and physiological parameters observed in the chronic mild stress model: further evidence of antidepressant properties. *Brain research bulletin* 81:491–496.
- Fotaki V, Dierssen M, Alcántara S, Martí E, Casas C, Visa J, Estivill X, Arbonés ML, Alca S, Martínez S, Soriano E, Arbone ML (2002) Dyrk1A Haploinsufficiency Affects Viability and Causes Developmental Delay and Abnormal Brain Morphology in Mice. *Molecular and cellular biology*: 6636–6647.
- Freeman SB, Taft LF, Dooley KJ, Allran K, Sherman SL, Hassold TJ, Khoury MJ, Saker DM (1998) Population-based study of congenital heart defects in Down syndrome. *American journal of medical genetics* 80:213–217.
- Fremeau RT, Troyer MD, Pahner I, Nygaard GO, Tran CH, Reimer RJ, Bellocchio EE, Fortin D, Storm-mathisen J, Edwards RH (2001) The Expression of Vesicular Glutamate Transporters Defines Two Classes of Excitatory Synapse University of Oslo. *Neuron* 31:247–260.
- Frerking M, Schmitz D, Zhou Q, Johansen J, Nicoll RA (2001) Kainate receptors depress excitatory synaptic transmission at CA3-->CA1 synapses in the hippocampus via a direct presynaptic action. *The Journal of neuroscience* 21(9):2958-66.
- Freund TF, Katona I, Piomelli D (2003) Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiological reviews* 83:1017–1066.
- Frey U, Hunag YY, Kandel ER (1993) Effects of cAMP Simulate a Late Stage of LTP in Hippocampal CA1 Neurons. *Science* 260:1661–1664.
- Funahashi S (2006) Prefrontal cortex and working memory processes. *Neuroscience* 139:251–261.
- Funahashi S, Bruce J, Goldman-Rakic P s (1989) Mnemonic Coding of Visual Space in the Monkey 's Dorsolateral Prefrontal Cortex. *Journal of neuroendocrinology* 61.

- Fuster JM (2001) The prefrontal cortex--an update: time is of the essence. *Neuron* 30:319–333.
- Fuster JM (2002) Frontal lobe and cognitive development. *Journal of neurocytology* 31:373–385.
- Gabbott PL a, Warner T a, Jays PRL, Salway P, Busby SJ (2005) Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *The Journal of comparative neurology* 492:145–177.
- Galdzicki Z, Siarey R, Pearce R, Stoll J, Rapoport SI (2001) On the cause of mental retardation in Down syndrome: extrapolation from full and segmental trisomy 16 mouse models. *Brain research reviews* 35(2):115-45
- Galdzicki Z, Siarey RJ (2003) Understanding mental retardation in Down's syndrome using trisomy 16 mouse models. *Genes, brain, and behavior* 2:167–178.
- Galli T, Haucke V (2004) Cycling of synaptic vesicles: how far? How fast! *Science's STKE: signal transduction knowledge environment* :re19.
- Gardiner K, Davison M (2000) The sequence of human chromosome 21 and implications for research into Down syndrome Gene number. *Genome biology* 1:1–9.
- Geppert M, Südhof TC (1998) RAB3 and synaptotagmin: the yin and yang of synaptic membrane fusion. *Annual review of neuroscience* 21:75–95.
- Gerdeman GL, Ronesi J, Lovinger DM (2002) Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nature neuroscience* 5:446–451.
- Gereau RW, Heinemann SF (1998) Role of protein kinase C phosphorylation in rapid desensitization of metabotropic glutamate receptor 5. *Neuron* 20:143–151.
- von Gersdorff H, Borst JGG (2002) Short-term plasticity at the calyx of held. *Nature reviews Neuroscience* 3:53–64.
- Gladding CM, Fitzjohn SM, Molna E (2009) Metabotropic Glutamate Receptor-Mediated Long-Term Depression: Molecular Mechanisms. *Pharmacological Reviews* 61:395–412.
- Glantz LA, Lewis DA (2001) Dendritic Spine Density in Schizophrenia and Depression. *Archive in general psychiatry* 58:203.
- Goh GY, Huang H, Ullman J, Borre L, Hnasko TS, Trussell LO, Edwards RH (2011) Presynaptic regulation of quantal size: K⁺/H⁺ exchange stimulates vesicular glutamate transport. *Nature neuroscience* 14:1285–1292.
- Gold JI, Shadlen MN (2007) The neural basis of decision making. *Annual review of neuroscience* 30:535–574.
- Goldman-Rakic PS (1995) Cellular Basis of Working Memory Review. *Neuron* 14:477–485.
- Goldstein RZ, Volkow ND (2011) Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: neuroimaging findings and clinical implications. *Nature reviews Neuroscience* 12:652–669.
- Goosens K a, Maren S (2004) NMDA receptors are essential for the acquisition, but not expression, of conditional fear and associative spike firing in the lateral amygdala. *The European journal of neuroscience* 20:537–548.
- Groenewegen HJ, Berendse HW (1994) The specificity of the “nonspecific” midline and intralaminar thalamic nuclei. *Trends in neurosciences* 17:52–57.

- Grosshans DR, Clayton D a, Coultrap SJ, Browning MD (2002) LTP leads to rapid surface expression of NMDA but not AMPA receptors in adult rat CA1. *Nature neuroscience* 5:27–33.
- Guedj F, Pereira PL, Najas S, Barallobre M-J, Chabert C, Souchet B, Sebie C, Verney C, Herault Y, Arbones M, Delabar JM (2012) DYRK1A: A master regulatory protein controlling brain growth. *Neurobiology of disease* 46(1):190-203
- Guedj F, Sébrié C, Rivals I, Ledru A, Paly E, Bizot JC, Smith D, Rubin E, Gillet B, Arbones M, Delabar JM (2009) Green tea polyphenols rescue of brain defects induced by overexpression of DYRK1A. *PloS one* 4:e4606.
- Guidi S, Bonasoni P, Ceccarelli C, Santini D, Gualtieri F, Ciani E, Bartesaghi R (2008) Neurogenesis impairment and increased cell death reduce total neuron number in the hippocampal region of fetuses with Down syndrome. *Brain pathology* 18:180–197.
- Guidi S, Ciani E, Bonasoni P, Santini D, Bartesaghi R (2011) Widespread proliferation impairment and hypocellularity in the cerebellum of fetuses with down syndrome. *Brain pathology* 21:361–373.
- Guihard-Costa A-M, Khung S, Delbecque K, Ménez F, Delezoide A-L (2006) Biometry of face and brain in fetuses with trisomy 21. *Pediatric research* 59:33–38.
- Guimera J, Casas C, Estivill X, Pritchard M (1999) Human Minibrain Homologue (MNBH/DYRK1): Characterization, Alternative Splicing , Differential Tissue Expression , and Overexpression in Down Syndrome. *Genomics* 57:407–418.
- Gulyas a I, Cravatt BF, Bracey MH, Dinh TP, Piomelli D, Boscia F, Freund TF (2004) Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *The European journal of neuroscience* 20:441–458.
- Göckler N, Jofre G, Papadopoulos C, Soppa U, Tejedor FJ, Becker W (2009) Harmine specifically inhibits protein kinase DYRK1A and interferes with neurite formation. *FEBS Journal* 276:6324–6337.
- Haas JS, Zavala B, Landisman CE (2011) Activity-dependent long-term depression of electrical synapses. *Science* 334:389–393.
- Haber SN, Knutson B (2010) The reward circuit: linking primate anatomy and human imaging. *Neuropsychopharmacology* 35:4–26.
- Hammerle B, Carnicero a., Elizalde C, Ceron J, Martinez S, Tejedor FJ (2003) Expression patterns and subcellular localization of the Down syndrome candidate protein MNB/DYRK1A suggest a role in late neuronal differentiation. *European Journal of Neuroscience* 17:2277–2286.
- Hanson JE, Blank M, Valenzuela R a, Garner CC, Madison DV (2007) The functional nature of synaptic circuitry is altered in area CA3 of the hippocampus in a mouse model of Down’s syndrome. *The Journal of physiology* 579:53–67.
- Harvey CD, Svoboda K (2007) Locally dynamic synaptic learning rules in pyramidal neuron dendrites. *Nature* 450:1195–1200.
- Hatton GI, Yang QZ (2001) Ionotropic histamine receptors and H2 receptors modulate supraoptic oxytocin neuronal excitability and dye coupling. *The Journal of neuroscience* 21:2974–2982.
- Hattori M et al. (2000) The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* 405.
- Haydar TF, Blue ME, Molliver ME, Krueger BK, Yarowsky PJ (1996) Consequences of trisomy 16 for mouse brain development: corticogenesis in a model of Down syndrome. *The Journal of neuroscience* 16:6175–6182.

- Haydar TF, Nowakowski RS, Yarowsky PJ, Krueger BK (2000) Role of founder cell deficit and delayed neuronogenesis in microencephaly of the trisomy 16 mouse. *The Journal of neuroscience* 20:4156–4164.
- Haydar TF, Reeves RH (2011) Trisomy 21 and early brain development. *Trends in Neurosciences* 21:1–11.
- Heidbreder C a, Groenewegen HJ (2003) The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 27:555–579.
- Heine M, Groc L, Frischknecht R, Béïque J-C, Lounis B, Rumbaugh G, Huganir RL, Cognet L, Choquet D (2008) Surface mobility of postsynaptic AMPARs tunes synaptic transmission. *Science* 320:201–205.
- Hempel CM, Hartman KH, Wang X, Turrigiano GG, Nelson SB (2000) Multiple Forms of Short-Term Plasticity at Excitatory Synapses in Rat Medial Prefrontal Cortex. *Journal of Neurophysiology* 83:3031–3041.
- Herculano-Houzel S, Collins CE, Wong P, Kaas JH, Lent R (2008) The basic nonuniformity of the cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:12593–12598.
- Hering H, Sheng M (2001) Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nature reviews Neuroscience* 2:880–888.
- Herry C, Garcia R (2002) Prefrontal cortex long-term potentiation, but not long-term depression, is associated with the maintenance of extinction of learned fear in mice. *The Journal of neuroscience* 22:577–583.
- Herry C, Vouimba R-marie, Garcia R (1999) Plasticity in the Mediodorsal Thalamo-Prefrontal Cortical Transmission in Behaving Mice. *Journal of Neurophysiology* 82:2827–2832.
- Himpel S, Panzer P, Eirmbter K, Sayed, Muhammen, Packman LC, Blundell T, Kentrup H, Grötzinger J, Joost H-G (2001) Identification of the autophosphorylation sites and characterization of their effects in the protein kinase DYRK1A. *Biochemical Journal* 359:497–505.
- Hirata Y, Sawaguchi T (2008) Functional columns in the primate prefrontal cortex revealed by optical imaging in vitro. *Neuroscience research* 61:1–10.
- Holderbach R, Clark K, Moreau J-L, Bischofberger J, Normann C (2007) Enhanced long-term synaptic depression in an animal model of depression. *Biological psychiatry* 62:92–100.
- Hollman M, O’Shea-Greenfield A, Rogers SW, Hienemann S (1989) Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nature* 342:643–648.
- Horton JC, Adams DL (2005) The cortical column: a structure without a function. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 360:837–862.
- Hotulainen P, Hoogenraad CC (2010) Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *The Journal of cell biology* 189:619–629.
- Hu W, Tian C, Li T, Yang M, Hou H, Shu Y (2009) Distinct contributions of Na(v)1.6 and Na(v)1.2 in action potential initiation and backpropagation. *Nature neuroscience* 12:996–1002.
- Huang C-C, Yang P-C, Lin H-J, Hsu K-S (2007) Repeated cocaine administration impairs group II metabotropic glutamate receptor-mediated long-term depression in rat medial prefrontal cortex. *The Journal of neuroscience* 27:2958–2968.

- Huang L, Killbride J, Rowan MJ, Anwyl R (1999) Activation of mGluRII induces LTD via activation of protein kinase A and protein kinase C in the dentate gyrus of the hippocampus in vitro. *Neuropharmacology* 38:73–83.
- Huang YY, Colino A, Selig DK, Malenka RC (1992) The influence of prior synaptic activity on the induction of long-term potentiation. *Science* 255:730–733.
- Hubel D, Wiesel TN (1968) RECEPTIVE FIELDS AND FUNCTIONAL ARCHITECTURE OF MONKEY STRIATE CORTEX. *Journal of Physiology* 195:215–243.
- Huber KM (2000) Role for Rapid Dendritic Protein Synthesis in Hippocampal mGluR-Dependent Long-Term Depression. *Science* 288:1254–1256.
- Hunt DL, Castillo PE (2012) Synaptic plasticity of NMDA receptors: mechanisms and functional implications. *Current opinion in neurobiology* 2.
- Hämmerle B, Elizalde C, Tejedor FJ (2008) The spatio-temporal and subcellular expression of the candidate Down syndrome gene Mnb/Dyrk1A in the developing mouse brain suggests distinct sequential roles in neuronal development. *The European journal of neuroscience* 27:1061–1074.
- Hämmerle B, Vera-Samper E, Speicher S, Arencibia R, Martínez S, Tejedor FJ (2002) Mnb/Dyrk1A is transiently expressed and asymmetrically segregated in neural progenitor cells at the transition to neurogenic divisions. *Developmental biology* 246:259–273.
- Irwin S a, Galvez R, Greenough WT (2000) Dendritic spine structural anomalies in fragile-X mental retardation syndrome. *Cerebral cortex* 10:1038–1044.
- Isaac JT, Nicoll R a, Malenka RC (1995) Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP. *Neuron* 15:427–434.
- Ishimatsu M, Williams JT (1996) Synchronous activity in locus coeruleus results from dendritic interactions in pericoerulear regions. *The Journal of neuroscience*: the official journal of the Society for Neuroscience 16:5196–5204.
- Izquierdo A, Belcher AM (2012) *Rodent Models of Adaptive Decision Making* (Kobeissy FH, ed). New York, NY: Springer New York.
- Jardri R, Pouchet A, Pins D, Thomas P (2011) Cortical Activations During Auditory Verbal Hallucinations in Schizophrenia: A Coordinate-Based Meta-Analysis. *American Journal of psychiatry* 168:73–81.
- Jung MW, Qin Y, Lee D, Mook-Jung I (2000) Relationship among discharges of neighboring neurons in the rat prefrontal cortex during spatial working memory tasks. *The Journal of neuroscience*: the official journal of the Society for Neuroscience 20:6166–6172.
- Jääskeläinen IP, Ahveninen J, Andermann ML, Belliveau JW, Raji T, Sams M (2011) Short-term plasticity as a neural mechanism supporting memory and attentional functions. *Brain research* 1422:66–81.
- Kable JW, Glimcher PW (2009) The neurobiology of decision: consensus and controversy. *Neuron* 63:733–745.
- Kalivas PW (2009) The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nature reviews Neuroscience* 10:561–572.
- Kalivas PW, O'Brien C (2008) Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology* 33:166–180.

- Kang H, Sun LD, Atkins CM, Soderling TR, Wilson MA, Tonegawa S (2001) An important role of neural activity-dependent CaMKIV signaling in the consolidation of long-term memory. *Cell* 106:771–783.
- Kasanetz F, Deroche-Gamonet V, Berson N, Balado E, Lafourcade M, Manzoni O, Piazza PV (2010) Transition to addiction is associated with a persistent impairment in synaptic plasticity. *Science* 328:1709–1712.
- Kauderer BS, Kandel ER (2000) Capture of a protein synthesis-dependent component of long-term depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:13342–13347.
- Kauer J a, Malenka RC (2007) Synaptic plasticity and addiction. *Nature reviews Neuroscience* 8:844–858.
- Kaufmann WE, Moser HW (2000) Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cerebral cortex* 10:981–991.
- Kennedy MJ, Ehlers MD (2006) Organelles and trafficking machinery for postsynaptic plasticity. *Annual review of neuroscience* 29:325–362.
- Kentrup H, Becker W, Heukelbach J, Wilmes a, Schürmann a, Huppertz C, Kainulainen H, Joost HG (1996) Dyrk, a dual specificity protein kinase with unique structural features whose activity is dependent on tyrosine residues between subdomains VII and VIII. *The Journal of biological chemistry* 271:3488–3495.
- Kerchner G a, Nicoll R a (2008) Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP. *Nature reviews Neuroscience* 9:813–825.
- Kesner RP, Churchwell JC (2011) An analysis of rat prefrontal cortex in mediating executive function. *Neurobiology of learning and memory* 96:417–431.
- Kew JN, Richards JG, Mutel V, Kemp J a (1998) Developmental changes in NMDA receptor glycine affinity and ifenprodil sensitivity reveal three distinct populations of NMDA receptors in individual rat cortical neurons. *The Journal of neuroscience* 18:1935–1943.
- Kidd FL, Coumis U, Collingridge GL, Crabtree JW, Isaac JTR (2002) A presynaptic kainate receptor is involved in regulating the dynamic properties of thalamocortical synapses during development. *Neuron* 34:635–646.
- Kim CH, Lee J, Lee J-youn, Roche KW (2008) Metabotropic Glutamate Receptors: Phosphorylation and Receptor Signaling. *Journal of Neuroscience Research* 86:1–10.
- Kim E, Sheng M (2004) PDZ domain proteins of synapses. *Nature reviews Neuroscience* 5:771–781.
- Kim HS, Jang CG, Park WK (1996) Inhibition by MK-801 of morphine-induced conditioned place preference and postsynaptic dopamine receptor supersensitivity in mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 55:11–17.
- Kim J, Ragozzino ME (2005) The involvement of the orbitofrontal cortex in learning under changing task contingencies. *Neurobiology of learning and memory* 83:125–133.
- Kim JH, Liao D, Lau LF, Huganir RL (1998) SynGAP: a synaptic RasGAP that associates with the PSD-95/SAP90 protein family. *Neuron* 20:683–691.
- Kim JN, Shadlen MN (1999) Neural correlates of a decision in the dorsolateral prefrontal cortex of the macaque. *Nature neuroscience* 2:176–185.
- Kim S, Lee D (2011) Prefrontal cortex and impulsive decision making. *Biological psychiatry* 69:1140–1146.

- Kim Y, Park J, Song WJ, Chang S (2010) Overexpression of Dyrk1A Causes the Defects in Synaptic Vesicle Endocytosis. *Neurosignals* 18:164–172.
- Kiyonaka S, Wakamori M, Miki T, Uriu Y, Nonaka M, Bito H, Beedle AM, Mori E, Hara Y, De Waard M, Kanagawa M, Itakura M, Takahashi M, Campbell KP, Mori Y (2007) RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca²⁺ channels. *Nature neuroscience* 10:691–701.
- Klann E, Dever TE (2004) Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity. *Nature reviews Neuroscience* 5:931–942.
- Kleschevnikov AM, Belichenko PV, Villar AJ, Epstein CJ, Malenka RC, Mobley WC (2004) Hippocampal long-term potentiation suppressed by increased inhibition in the Ts65Dn mouse, a genetic model of Down syndrome. *The Journal of neuroscience* 24:8153–8160.
- Koenigs M, Huey ED, Calamia M, Raymont V, Tranel D, Grafman J (2008a) Distinct regions of prefrontal cortex mediate resistance and vulnerability to depression. *The Journal of neuroscience*: the official journal of the Society for Neuroscience 28:12341–12348.
- Kola I, Hertzog PJ (1998) Down syndrome and mouse models. *Current Opinion in Genetics & Development* 8:316–321.
- Kondratskaya E, Shin M-C, Akaike N (2010) Neuronal glutamate transporters regulate synaptic transmission in single synapses on CA1 hippocampal neurons. *Brain research bulletin* 81:53–60.
- Konishi S, Nakajima K, Uchida I, Kameyama M, Nakahara K, Sekihara K, Miyashita Y (1998) Transient activation of inferior prefrontal cortex during cognitive set shifting. *Nature neuroscience* 1:80–84.
- Koo KA, Kim ND, Chon YS, Jung M-S, Lee B-J, Kim JH, Song W-J (2009) QSAR analysis of pyrazolidine-3,5-diones derivatives as Dyrk1A inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 19:2324–2328.
- Koob GF (1997) Drug Abuse: Hedonic Homeostatic Dysregulation. *Science* 278:52–58.
- Korenberg JR, Bradley C, Distèche CM (1992) Down syndrome: molecular mapping of the congenital heart disease and duodenal stenosis. *American journal of human genetics* 50:294–302.
- Korenberg JR, Chen XN, Schipper R, Sun Z, Gonsky R, Gerwehr S, Carpenter N, Daumer C, Dignan P, Distèche C (1994) Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:4997–5001.
- Kossut M, Hand P (1984) The development of the vibrissal cortical column: a-deoxyglucose study in the rat. *Neuroscience letters* 46:1–6.
- Krakuski J, Alexander GE, Ph D, Horwitz B, Rapoport SI, Schapiro MB (2002) Relation of Medial Temporal Lobe Volumes to Age and Memory Function in Nondemented Adults With Down ' s Syndrome: Implications for the Prodromal Phase of Alzheimer's Disease. *American Journal of psychiatry* 159:74–81.
- Kreitzer a C, Regehr WG (2001) Cerebellar depolarization-induced suppression of inhibition is mediated by endogenous cannabinoids. *The Journal of neuroscience*: the official journal of the Society for Neuroscience 21:RC174.
- Krimer LS, Goldman-Rakic PS (2001) Prefrontal microcircuits: membrane properties and excitatory input of local, medium, and wide arbor interneurons. *The Journal of neuroscience*: the official journal of the Society for Neuroscience 21:3788–3796.
- Krishnan V, Nestler EJ (2008) The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455:894–902.

- Kurt M a, Davies DC, Kidd M, Dierssen M, Flórez J (2000) Synaptic deficit in the temporal cortex of partial trisomy 16 (Ts65Dn) mice. *Brain research* 858:191–197.
- Kurt MA, Kafa MI, Dierssen M, Davies DC (2004) Deficits of neuronal density in CA1 and synaptic density in the dentate gyrus, CA3 and CA1, in a mouse model of Down syndrome. *Brain research* 1022:101–109.
- Kwon H-B, Sabatini BL (2011) Glutamate induces de novo growth of functional spines in developing cortex. *Nature* 474:100–104.
- Lafourcade M, Elezgarai I, Mato S, Bakiri Y, Grandes P, Manzoni OJ (2007) Molecular components and functions of the endocannabinoid system in mouse prefrontal cortex. *PloS one* 2:e709.
- Lafourcade M, Larrieu T, Mato S, Duffaud A, Sepers M, Matias I, De Smedt-Peyrusse V, Labrousse VF, Bretillon L, Matute C, Rodríguez-Puertas R, Layé S, Manzoni OJ (2011) Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions. *Nature neuroscience* 14:345–350.
- Lander ES et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860–921.
- Lane RD, Reiman EM, Bradley MM, Lang PJ, Ahern GL, Davidson RJ, Schwartz GE (1997) Neuroanatomical correlates of pleasant and unpleasant emotion. *Neuropsychologia* 35:1437–1444.
- Lapiz MDS, Morilak D a (2006) Noradrenergic modulation of cognitive function in rat medial prefrontal cortex as measured by attentional set shifting capability. *Neuroscience* 137:1039–1049.
- Laroche S, Davis S, Jay TM (2000) Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses: dual roles in working memory and consolidation. *Hippocampus* 10:438–446.
- Larsen KB, Laursen H, Graem N, Samuelson GB, Bogdanovic N, Pakkenberg B (2008) Reduced cell number in the neocortical part of the human fetal brain in Down syndrome. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger: official organ of the Anatomische Gesellschaft* 190:421–427.
- Larsen RS, Corlew RJ, Henson M a, Roberts AC, Mishina M, Watanabe M, Lipton S a, Nakanishi N, Pérez-Otaño I, Weinberg RJ, Philpot BD (2011) NR3A-containing NMDARs promote neurotransmitter release and spike timing-dependent plasticity. *Nature neuroscience* 14:338–344.
- Lassen MB, Brown JE, Stobbs SH, Gunderson SH, Maes L, Valenzuela CF, Ray AP, Henriksen SJ, Steffensen SC (2007) Brain stimulation reward is integrated by a network of electrically coupled GABA neurons. *Brain research* 1156:46–58.
- Lau CG, Zukin RS (2007) NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nature reviews Neuroscience* 8:413–426.
- Lee CJ, Kong H, Manzini MC, Albuquerque C, Chao MV, MacDermott a B (2001) Kainate receptors expressed by a subpopulation of developing nociceptors rapidly switch from high to low Ca²⁺ permeability. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 21:4572–4581.
- Lee HK, Barbarosie M, Kameyama K, Bear MF, Huganir RL (2000) Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature* 405:955–959.
- Lepagnol-Bestel A-M et al. (2009) DYRK1A interacts with the REST/NRSF-SWI/SNF chromatin remodelling complex to deregulate gene clusters involved in the neuronal phenotypic traits of Down syndrome. *Human molecular genetics* 18:1405–1414.

- Lewis DA, Gonzalez-burgos G (2000) Proceedings of the Human Cerebral Cortex: From Gene to Structure and Function Intrinsic excitatory connections in the prefrontal cortex and the pathophysiology of schizophrenia. *Brain research bulletin* 52:309–317.
- Liao D, Hessler NA, Malinow R (1995) Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature* 375:400–404.
- Lin JW, Ju W, Foster K, Lee SH, Ahmadian G, Wyszynski M, Wang YT, Sheng M (2000) Distinct molecular mechanisms and divergent endocytotic pathways of AMPA receptor internalization. *Nature neuroscience* 3:1282–1290.
- Linden DJ (1996) A protein synthesis-dependent late phase of cerebellar long-term depression. *Neuron* 17:483–490.
- Lisman J, Yasuda R, Raghavachari S (2012) Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nature reviews Neuroscience* 13:169–182.
- Lisman JE, Goldring M a (1988) Feasibility of long-term storage of graded information by the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase molecules of the postsynaptic density. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:5320–5324.
- Liu T, Sims D, Baum B (2009) Parallel RNAi screens across different cell lines identify generic and cell type-specific regulators of actin organization and cell morphology. *Genome biology* 10:R26.
- Lochhead P a, Sibbet G, Morrice N, Cleghon V (2005) Activation-loop autophosphorylation is mediated by a novel transitional intermediate form of DYRKs. *Cell* 121:925–936.
- Lockstone HE, Harris LW, Swatton JE, Wayland MT, Holland a J, Bahn S (2007) Gene expression profiling in the adult Down syndrome brain. *Genomics* 90:647–660.
- Lott IT, Head E (2001) Down syndrome and Alzheimer's disease: a link between development and aging. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* 7:172–178.
- Lott IT, Head E (2005) Alzheimer disease and Down syndrome: factors in pathogenesis. *Neurobiology of aging* 26:383–389.
- de la Luna S, Estivill X (2006) Cooperation to amplify gene-dosage-imbalance effects. *Trends in molecular medicine* 12:451–454.
- Lutz B (2009) Endocannabinoid signals in the control of emotion. *Current opinion in pharmacology* 9:46–52.
- Lynch MA (2004) Long-Term Potentiation and Memory. *Physiological Reviews* 84:87–136.
- Lüscher C, Frerking M (2001) Restless AMPA receptors: implications for synaptic transmission and plasticity. *Trends in neurosciences* 24:665–670.
- Lüscher C, Nicoll R, Malenka RC, Muller D (2000) Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane. *Nature neuroscience* 3:545–550.
- M Purser HR, Jarrold C (2005) Impaired verbal short-term memory in Down syndrome reflects a capacity limitation rather than atypically rapid forgetting. *Journal of experimental child psychology* 91:1–23.
- Maejima T, Hashimoto K, Yoshida T, Aiba A, Kano M (2001) Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors. *Neuron* 31:463–475.

- Magee JC (2000) Dendritic integration of excitatory synaptic input. *Nature reviews Neuroscience* 1:181–190.
- Magleby KL (2004) Modal gating of NMDA receptors. *Trends in neurosciences* 27:231–233.
- Makino H, Malinow R (2009) AMPA receptor incorporation into synapses during LTP: the role of lateral movement and exocytosis. *Neuron* 64:381–390.
- Malenka RC, Bear MF (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44:5–21.
- Malinow R, Malenka RC (2002) AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annual review of neuroscience* 25:103–126.
- Mameli M, Lüscher C (2011) Synaptic plasticity and addiction: learning mechanisms gone awry. *Neuropharmacology* 61:1052–1059.
- Manahan-Vaughan D, Kulla A, Frey JU (2000) Requirement of translation but not transcription for the maintenance of long-term depression in the CA1 region of freely moving rats. *The Journal of neuroscience* 20:8572–8576.
- Manzoni O, Bockaert J (1995) Metabotropic glutamate receptors inhibiting excitatory synapses in the CA1 area of rat hippocampus. *The European journal of neuroscience* 7:2518–2523.
- Manzoni O, Michel JM, Bockaert J (1997) Metabotropic glutamate receptors in the rat nucleus accumbens. *The European journal of neuroscience* 9:1514–1523.
- Mao R, Wang X, Spitznagel EL, Frelin LP, Ting JC, Ding H, Kim J-whan, Ruczinski I, Downey TJ, Pevsner J (2005) Primary and secondary transcriptional effects in the developing human Down syndrome brain and heart. *Genome biology* 6:R107.
- Mao R, Zielke CL, Ronald Zielke H, Pevsner J (2003) Global up-regulation of chromosome 21 gene expression in the developing down syndrome brain. *Genomics* 81:457–467.
- Maren S, Quirk GJ (2004) Neuronal signalling of fear memory. *Nature reviews Neuroscience* 5:844–852.
- Markram H (1997) Regulation of Synaptic Efficacy by Coincidence of Postsynaptic APs and EPSPs. *Science* 275:213–215.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature reviews Neuroscience* 5:793–807.
- Markram H, Tsodyks M (1996) Redistribution of synaptic efficacy between neocortical pyramidal neurons. *Nature* 382:807–810.
- Marrs WR et al. (2010) The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors. *Nature neuroscience* 13:951–957.
- Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad SC, Cascio MG, Gutiérrez SO, van der Stelt M, López-Rodríguez ML, Casanova E, Schütz G, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Behl C, Lutz B (2003) CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* 302:84–88.
- Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Lutz B (2002) The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 418:530–534.

- Martinez de Lagran M, Benavides-Piccione R, Ballesteros-Yañez I, Calvo M, Morales M, Fillat C, Defelipe J, Ramakers GJ a, Dierssen M (2012) Dyrk1A Influences Neuronal Morphogenesis Through Regulation of Cytoskeletal Dynamics in Mammalian Cortical Neurons. *Cerebral cortex* :1–11.
- Martí E, Altafaj X, Dierssen M, de la Luna S, Fotaki V, Alvarez M, Pérez-Riba M, Ferrer I, Estivill X (2003) Dyrk1A expression pattern supports specific roles of this kinase in the adult central nervous system. *Brain research* 964:250–263.
- Marín O (2012) Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nature reviews Neuroscience* 13:107–120.
- Masu M, Tanabe Y, Tsuchida K, Shigemoto R, Nakanishi S (1991) Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature* 349:760–765.
- Mato S, Lafourcade M, Robbe D, Bakiri Y, Manzoni OJ (2008) Role of the cyclic-AMP/PKA cascade and of P/Q-type Ca⁺⁺ channels in endocannabinoid-mediated long-term depression in the nucleus accumbens. *Neuropharmacology* 54:87–94.
- Matsuda S, Mikawa S, Hirai H (1999) Phosphorylation of serine-880 in GluR2 by protein kinase C prevents its C terminus from binding with glutamate receptor-interacting protein. *Journal of neurochemistry* 73:1765–1768.
- Mayford M, Wang J, Kandel ER, O'Dell TJ (1995) CaMKII regulates the frequency-response function of hippocampal synapses for the production of both LTD and LTP. *Cell* 81:891–904.
- Mazur-Kolecka B, Golabek A, Kida E, Rabe A, Hwang Y-W, Adayev T, Wegiel J, Flory M, Kaczmarek W, Marchi E, Frackowiak J (2012) Effect of DYRK1A activity inhibition on development of neuronal progenitors isolated from Ts65Dn mice. *Journal of neuroscience research* 90:999–1010.
- McClure HM, Belden K, Pieper W., Jacobson CB (1969) Autosomal Trisomy in a Chimpanzee: Resemblance to Down's Syndrome. *Science* 165:1010–1012.
- Mensah A, Mulligan C, Linehan J, Ruf S, O'Doherty A, Grygalewicz B, Shipley J, Groet J, Tybulewicz V, Fisher E, Brandner S, Nizetic D (2007) An additional human chromosome 21 causes suppression of neural fate of pluripotent mouse embryonic stem cells in a teratoma model. *BMC developmental biology* 7:131.
- Meyer-Lindenberg A, Miletich RS, Kohn PD, Esposito G, Carson RE, Quarantelli M, Weinberger DR, Berman KF (2002) Reduced prefrontal activity predicts exaggerated striatal dopaminergic function in schizophrenia. *Nature neuroscience* 5:267–271.
- Migaud M, Charlesworth P, Dempster M, Webster LC, Watabe a M, Makhinson M, He Y, Ramsay MF, Morris RG, Morrison JH, O'Dell TJ, Grant SG (1998) Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* 396:433–439.
- Milad MR, Quirk GJ (2002) Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature* 420:70–74.
- Miller EK (2000) The prefrontal cortex and cognitive control. *Nature reviews Neuroscience* 1:59–65.
- Miller EK, Cohen JD (2001) An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annual review of neuroscience* 24:167–202.
- Miller P, Wang X-J (2006) Inhibitory control by an integral feedback signal in prefrontal cortex: a model of discrimination between sequential stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:201–206.

- Morgan M a, LeDoux JE (1995) Differential contribution of dorsal and ventral medial prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats. *Behavioral neuroscience* 109:681–688.
- Moriya H, Shimizu-Yoshida Y, Omori a, Iwashita S, Katoh M, Sakai a (2001) Yak1p, a DYRK family kinase, translocates to the nucleus and phosphorylates yeast Pop2p in response to a glucose signal. *Genes and development* 15:1217–1228.
- Morris JK, Wald NJ, Watt HC (1999) Fetal loss in Down syndrome pregnancies. *Prenatal diagnosis* 19:142–145.
- Morris RG, Frey U (1997) Hippocampal synaptic plasticity: role in spatial learning or the automatic recording of attended experience? *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 352:1489–1503.
- Mothet JP, Parent a T, Wolosker H, Brady RO, Linden DJ, Ferris CD, Rogawski M a, Snyder SH (2000) D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:4926–4931.
- Mountcastle VB, Davies PW, Berman AL (1957) RESPONSE PROPERTIES OF NEURONS OF CAT ' S SO MATIC SENSORY CORTEX TO PERIPHERAL STIMULI. *Journal of neurophysiology* 20:374–407.
- Mountcastle VB (1978) Brain mechanisms for directed attention. *Journal of the Royal Society of Medicine* 71:14–28.
- Mulholland PJ, Chandler LJ (2007) The thorny side of addiction: adaptive plasticity and dendritic spines. *TheScientificWorldJournal* 7:9–21.
- Murakami N, Bolton D, Hwang Y-W (2009) Dyrk1A binds to multiple endocytic proteins required for formation of clathrin-coated vesicles. *Biochemistry* 48:9297–9305.
- Murakoshi H, Yasuda R (2012) Postsynaptic signaling during plasticity of dendritic spines. *Trends in neurosciences* 35:135–143.
- Myers-Schulz B, Koenigs M (2011) Functional anatomy of ventromedial prefrontal cortex: implications for mood and anxiety disorders. *Molecular psychiatry* 17:132–141.
- Nadel L (2003) Down ' s syndrome: a genetic disorder in biobehavioral perspective. *Genes, brain, and behavior* 2:156–166.
- Nakanishi S (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258:597–603.
- Nakase T, Naus CCG (2004) Gap junctions and neurological disorders of the central nervous system. *Biochimica et biophysica acta* 1662:149–158.
- Navarrete M, Araque A (2010) Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron* 68:113–126
- Nemani VM, Binder DK (2005) Emerging role of gap junctions in epilepsy. *Histology and histopathology* 20:253–259.
- Nestler EJ, Carlezon W a (2006) The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biological psychiatry* 59:1151–1159.

- New L, Jiang Y, Zhao M, Liu K, Zhu W, Flood LJ, Kato Y, Parry GC, Han J (1998) PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase. *The EMBO journal* 17:3372–3384.
- Nguyen PV, Abel T, Kandel ER (1994) Requirement of a Critical Period of Transcription for Induction of a Late Phase of LTP. *Science* 265:1104–1107.
- Nicoletti F, Bockaert J, Collingridge GL, Conn PJ, Ferraguti F, Schoepp DD, Wroblewski JT, Pin JP (2011) Metabotropic glutamate receptors: from the workbench to the bedside. *Neuropharmacology* 60:1017–1041.
- Nimchinsky E, Sabatini BL, Svoboda K (2002) Structure and function of dendritic spines. *Annual review of physiology* 64:313–353.
- Nissen C, Holz J, Blechert J, Feige B, Riemann D, Voderholzer U, Normann C (2010) Learning as a model for neural plasticity in major depression. *Biological psychiatry* 68:544–552.
- Niswender CM, Conn PJ (2010) Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annual review of pharmacology and toxicology* 50:295–322.
- Noble J (1998) Natural history of Down's syndrome: a brief review for those involved in antenatal screening. *Journal of Medical Screening* 5:172–177.
- Normann C, Schmitz D, Fürmaier A, Döing C, Bach M (2007) Long-term plasticity of visually evoked potentials in humans is altered in major depression. *Biological psychiatry* 62:373–380.
- Norrholm SD, Ouimet CC (2001) Altered dendritic spine density in animal models of depression and in response to antidepressant treatment. *Synapse* 42:151–163.
- Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307:462–465.
- Nägerl UV, Eberhorn N, Cambridge SB, Bonhoeffer T (2004) Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron* 44:759–767.
- Næss K-AB, Lyster S-AH, Hulme C, Melby-Lervåg M (2011) Language and verbal short-term memory skills in children with Down syndrome: A meta-analytic review. *Research in developmental disabilities* 32:2225–2234.
- Ochsner KN, Gross JJ (2005) The cognitive control of emotion. *Trends in cognitive sciences* 9:242–249.
- Ogawa Y, Nonaka Y, Goto T, Ohnishi E, Hiramatsu T, Kii I, Yoshida M, Ikura T, Onogi H, Shibuya H, Hosoya T, Ito N, Hagiwara M (2010) Development of a novel selective inhibitor of the Down syndrome-related kinase Dyrk1A. *Nature Communications* 1:1–9.
- Ohta K, Nomura T, Kanno T, Nagai K, Yamamoto S, Yajima Y, Kondoh T, Kohmura E, Saito N, Nishizaki T (2002) L-trans-PDC enhances hippocampal neuronal activity by stimulating glial glutamate release independently of blocking transporters. *Biochemical and biophysical research communications* 295:376–381.
- Oliet SH, Piet R, Poulain D a (2001) Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science* 292:923–926.
- Olson LE, Roper RJ, Baxter LL, Carlson EJ, Epstein CJ, Reeves RH (2004) Down syndrome mouse models Ts65Dn, Ts1Cje, and Ms1Cje/Ts65Dn exhibit variable severity of cerebellar phenotypes. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 230:581–589.

- Olson LE, Roper RJ, Sengstaken CL, Peterson E a, Aquino V, Galdzicki Z, Siarey R, Pletnikov M, Moran TH, Reeves RH (2007) Trisomy for the Down syndrome “critical region” is necessary but not sufficient for brain phenotypes of trisomic mice. *Human molecular genetics* 16:774–782.
- Omote H, Miyaji T, Juge N, Moriyama Y (2011) Vesicular neurotransmitter transporter β : bioenergetics and regulation of glutamate transport. *Biochemistry* 50:5558–5565.
- Ortiz-Abalia J, Sahún I, Altafaj X, Andreu N, Estivill X, Dierssen M, Fillat C (2008) Targeting Dyrk1A with AAVshRNA attenuates motor alterations in TgDyrk1A, a mouse model of Down syndrome. *The American Journal of Human Genetics* 83:479–488.
- van Os J, Kenis G, Rutten BPF (2010) The environment and schizophrenia. *Nature* 468:203–212.
- Owen a M, Stern CE, Look RB, Tracey I, Rosen BR, Petrides M (1998) Functional organization of spatial and nonspatial working memory processing within the human lateral frontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:7721–7726.
- O’Connor V (1999) Calmodulin Dependence of Presynaptic Metabotropic Glutamate Receptor Signaling. *Science* 286:1180–1184.
- O’Doherty A, Ruf S, Mulligan C, Hildreth V, Mick L, Cooke S, Sesay A, Modino S, Vanes L, Linehan JM, Sharpe PT, Brandner S, Timothy V, Bliss P, Henderson DJ, Nizetic D, Tybulewicz VLJ, Elizabeth M, Fisher C (2005) An aneuploid mouse strain carrying human chromosome 21 with Down Syndrome phenotypes. *Science* 309:2033–2037.
- O’Donnell C, Nolan MF, van Rossum MCW (2011) Dendritic spine dynamics regulate the long-term stability of synaptic plasticity. *The Journal of neuroscience* 31:16142–16156.
- O’Keefe J, Nadel L (1978) *The hippocampus as a cognitive map*. Clarendon press Oxford
- Palay SL (1956) Synapses in the central nervous system. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 25:193–202.
- Park J, Oh Y, Yoo L, Jung M-S, Song W-J, Lee S-H, Seo H, Chung KC (2010) DYRK1A phosphorylates p53 and inhibits proliferation of embryonic neuronal cells. *The Journal of biological chemistry* 285:31895–31906.
- Park J, Song W-J, Chung KC (2009) Function and regulation of Dyrk1A: towards understanding Down syndrome. *Cellular and molecular life science* 66:3235–3240.
- Park J, Sung JY, Park J, Song W-J, Chang S, Chung KC (2012a) Dyrk1A negatively regulates the actin cytoskeleton through threonine phosphorylation of N-WASP. *Journal of cell science* 1;125:67-80.
- Park JJ, Sung JY, Song WJ, Chang S, Chung KC (2012b) Dyrk1A negatively regulates the actin cytoskeleton through threonine phosphorylation of N-WASP. *Journal of cell science* 1:67–80.
- Peineau S, Nicolas CS, Bortolotto Z a, Bhat RV, Ryves WJ, Harwood AJ, Dournaud P, Fitzjohn SM, Collingridge GL (2009) A systematic investigation of the protein kinases involved in NMDA receptor-dependent LTD: evidence for a role of GSK-3 but not other serine/threonine kinases. *Molecular brain* 2:22.
- Pellegrini-Giampietro DE, Gorter J a, Bennett MV, Zukin RS (1997) The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca²⁺-permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends in neurosciences* 20:464–470.
- Penzes P, Cahill ME, Jones K a, VanLeeuwen J-E, Woolfrey KM (2011) Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nature neuroscience* 14:285–293.

- Person AL, Raman IM (2011) Deactivation of L-type Ca current by inhibition controls LTP at excitatory synapses in the cerebellar nuclei. *Neurobiology* 66:550–559.
- Peters J, Kalivas PW, Quirk GJ (2009) Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex. *Learning & memory* 16:279–288.
- Petralia RS, Wang Y-xian, Wenthold RJ (2003) Internalization at glutamatergic synapses during development. *European Journal of Neuroscience* 18:3207–3217.
- Pfeiffer BE, Huber KM (2006) Current advances in local protein synthesis and synaptic plasticity. *The Journal of neuroscience* 26:7147–7150.
- Pineda VV, Athos JJ, Wang H, Cervera J, Ippolito D, Boulay G, Birnbaumer L, Storm DR (2004) Removal of G α 1 constraints on adenylyl cyclase in the hippocampus enhances LTP and impairs memory formation. *Neuron* 41:153–163.
- Pinheiro P, Mulle C (2006) Kainate receptors. *Cell and tissue research* 326:457–482.
- Pinheiro PS, Mulle C (2008) Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. *Nature reviews Neuroscience* 9:423–436.
- Pinter J, Eliez S, Schmitt JE, Capone GT, Reiss AL (2001a) Neuroanatomy of Down ' s Syndrome: A High-Resolution MRI Study. *American Journal of psychiatry* 150:1659–1665.
- Pinter JD, Brown WE, Eliez S, Schmitt JE, Capone GT, Reiss a L (2001b) Amygdala and hippocampal volumes in children with Down syndrome: a high-resolution MRI study. *Neurology* 56:972–974.
- Pittenger C, Bloch MH, Williams K (2011) Glutamate abnormalities in obsessive compulsive disorder: neurobiology, pathophysiology, and treatment. *Pharmacology & therapeutics* 132:314–332.
- Pletcher MT, Wiltshire T, Cabin DE, Villanueva M, Reeves RH (2001) Use of comparative physical and sequence mapping to annotate mouse chromosome 16 and human chromosome 21. *Genomics* 74:45–54.
- Popov VI, Kleschevnikov AM, Klimenko O a, Stewart MG, Belichenko PV (2011) Three-dimensional synaptic ultrastructure in the dentate gyrus and hippocampal area CA3 in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *The Journal of comparative neurology* 519:1338–1354.
- Pöschel B, Manahan-Vaughan D (2005) Group II mGluR-induced long term depression in the dentate gyrus in vivo is NMDA receptor-independent and does not require protein synthesis. *Neuropharmacology* 49 Suppl 1:1–12.
- Rachidi M, Lopes C (2007) Mental retardation in Down syndrome: from gene dosage imbalance to molecular and cellular mechanisms. *Neuroscience research* 59:349–369.
- Rahmani Z, Blouin JL, Creau-Goldberg N, Watkins PC, Mattei JF, Poissonnier M, Prieur M, Chettouh Z, Nicole a, Aurias a (1989) Critical role of the D21S55 region on chromosome 21 in the pathogenesis of Down syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86:5958–5962.
- Rakic P (2008) Confusing cortical columns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:12099–12100.
- Rao SG, Williams GV, Goldman-rakic PS (1999) Isodirectional Tuning of Adjacent Interneurons and Pyramidal Cells During Working Memory: Evidence for Microcolumnar Organization in PFC. *Journal of Neurophysiology* 81:1903–1916.

- Raymond L, Blackstone CD, Huganir RL (1993) Phosphorylation of amino acid neurotransmitter receptors in synaptic plasticity. *Trends in neurosciences* 16:147–153.
- Raz N, Torres I, Briggs SD, Spencer WD, Thornton AE, Loken WJ, Gunning FM, McQuain JD, Driesen M, Acker J (1995) Selective neuroanatomic abnormalities in Down ' s syndrome and their cognitive correlates: Evidence from MRI morphometry. *Neurology* 45:356–366.
- Reeves R, Irving N, Moran T, Kitt C, Sisodia S, Schmidt C, Bronson R, Davisson M (1995) A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nature* 11:177–184.
- Reid C a., Bekkers JM, Clements JD (2003) Presynaptic Ca²⁺ channels: a functional patchwork. *Trends in Neurosciences* 26:683–687.
- Reyes a (2001) Influence of dendritic conductances on the input-output properties of neurons. *Annual review of neuroscience* 24:653–675.
- Richtsmeier JT, Zumwalt A, Carlson EJ, Epstein CJ, Reeves RH (2002) Craniofacial Phenotypes in Segmentally Trisomic Mouse Models for Down Syndrome. *American journal of medical genetics* 107:317–324.
- Rilling JK, Sanfey AG (2011) The neuroscience of social decision-making. *Annual review of psychology* 62:23–48.
- Rizzoli SO, Betz WJ (2005) Synaptic vesicle pools. *Nature reviews Neuroscience* 6:57–69.
- del Río E, McLaughlin M, Downes CP, Nicholls DG (1999) Differential coupling of G-protein-linked receptors to Ca²⁺ mobilization through inositol(1,4,5)triphosphate or ryanodine receptors in cerebellar granule cells in primary culture. *European Journal of Neuroscience* 11:3015–3022.
- Robbe D, Alonso G, Chaumont S, Bockaert J, Manzoni OJ (2002) Role of p/q-Ca²⁺ channels in metabotropic glutamate receptor 2/3-dependent presynaptic long-term depression at nucleus accumbens synapses. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 22:4346–4356.
- Robbe D, Alonso G, Manzoni OJ (2003) Exogenous & endogenous cannabinoids control synaptic transmission in mice nucleus accumbens. *Annals New York academy of sciences* 1003:212–225.
- Robbins TW (1996) Dissociating executive functions of the prefrontal cortex. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 351:1463–1470; discussion 1470–1471.
- Robinson TE, Kolb B (1999a) Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *The European journal of neuroscience* 11:1598–1604.
- Robinson TE, Kolb B (1999b) Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *The European journal of neuroscience* 11:1598–1604.
- Roche KW, O'Brien RJ, Mammen a L, Bernhardt J, Huganir RL (1996) Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA receptor GluR1 subunit. *Neuron* 16:1179–1188.
- Roizen NJ, Patterson D (2003) Down's syndrome. *The Lancet* 361:1281–1289.
- Romano C, Yang WL, O'Malley KL (1996) Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. *The Journal of biological chemistry* 271:28612–28616.

- Ronan A, Fagan K, Christie L, Conroy J, Nowak NJ, Turner G (2007) Familial 4.3 Mb duplication of 21q22 sheds new light on the Down syndrome critical region. *Journal of medical genetics* 44:448–451.
- Rosenmund C (1998) The Tetrameric Structure of a Glutamate Receptor Channel. *Science* 280:1596–1599.
- Rossi B, Maton G, Collin T (2008) Calcium-permeable presynaptic AMPA receptors in cerebellar molecular layer interneurons. *The Journal of physiology* 586:5129–5145.
- Rotaru DC, Barrionuevo G, Sesack SR (2005) Mediodorsal thalamic afferents to layer III of the rat prefrontal cortex: synaptic relationships to subclasses of interneurons. *The Journal of comparative neurology* 490:220–238.
- Rowe J, Lavender A, Turk V (2006) Cognitive executive function in Down's syndrome. *The British journal of clinical psychology* 45:5–17.
- Rumpel S, LeDoux J, Zador A, Malinow R (2005) Postsynaptic receptor trafficking underlying a form of associative learning. *Science* 308:83–88.
- Rushworth MFS, Noonan MP, Boorman ED, Walton ME, Behrens TE (2011) Frontal cortex and reward-guided learning and decision-making. *Neuron* 70:1054–1069.
- Sabatini BL (2007) Neighbourly synapses. *Nature* 450:1173–1175.
- Sabatini BL, Oertner TG, Svoboda K (2002) The life cycle of Ca^{2+} ions in dendritic spines. *Neuron* 33:439–452.
- Sago H, Carlson EJ, Smith DJ, Kilbridge J, Rubin EM, Mobley WC, Epstein CJ, Huang TT (1998) Ts1Cje, a partial trisomy 16 mouse model for Down syndrome, exhibits learning and behavioral abnormalities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:6256–6261.
- Sago H, Carlson EJ, Smith DJ, Rubin EM, Crnic LS, Huang TT, Epstein CJ (2000) Genetic dissection of region associated with behavioral abnormalities in mouse models for Down syndrome. *Pediatric research* 48:606–613.
- Sala C, Piëch V, Wilson NR, Passafaro M, Liu G, Sheng M (2001) Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer. *Neuron* 31:115–130.
- Salzman CD, Fusi S (2010) Emotion, cognition, and mental state representation in amygdala and prefrontal cortex. *Annual review of neuroscience* 33:173–202.
- Sanacora G, Zarate C a, Krystal JH, Manji HK (2008) Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nature reviews Drug discovery* 7:426–437.
- Satake S, Song S-Y, Cao Q, Satoh H, Rusakov D a, Yanagawa Y, Ling E-A, Imoto K, Konishi S (2006) Characterization of AMPA receptors targeted by the climbing fiber transmitter mediating presynaptic inhibition of GABAergic transmission at cerebellar interneuron-Purkinje cell synapses. *The Journal of neuroscience* 26:2278–2289.
- Satake SI, Saitow ĀF, Konishi S (2004) AMPA receptor-mediated presynaptic inhibition at cerebellar GABAergic synapses: a characterization of molecular mechanisms. *European Journal of Neuroscience* 19:2464–2474.
- Scannevin RH, Haganir RL (2000) Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. *Nature reviews Neuroscience* 1:133–141.

- Schoenbaum G, Roesch MR, Stalnaker TA (2006) Orbitofrontal cortex, decision-making and drug addiction. *Trends in neurosciences* 29:116–124.
- Schoenbaum G, Setlow B, Ramus SJ (2003) A systems approach to orbitofrontal cortex function: recordings in rat orbitofrontal cortex reveal interactions with different learning systems. *Behavioural Brain Research* 146:19–29.
- Schoepp DD (2001) Unveiling the functions of presynaptic metabotropic glutamate receptors in the central nervous system. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 299:12–20.
- Schultz W (2000) Multiple reward signals in the brain. *Nature Reviews Neuroscience* 1:199–207.
- Scopinho AA, Scopinho M, Lisboa SF, Correa FMDA, Guimarães FS, Joca SRL (2010) Acute reversible inactivation of the ventral medial prefrontal cortex induces antidepressant-like effects in rats. *Behavioural brain research* 214:437–442.
- Scott-McKean JJ, Costa ACS (2011) Exaggerated NMDA mediated LTD in a mouse model of Down syndrome and pharmacological rescuing by memantine. *Learning and memory* 18:774–778.
- Scotto-Lomassese S, Nissant A, Mota T, Néant-Féry M, Oostra B a, Greer C a, Lledo P-M, Trembleau A, Caillé I (2011) Fragile X mental retardation protein regulates new neuron differentiation in the adult olfactory bulb. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 31:2205–2215.
- Seamans JK, Laphis CC, Durstewitz D (2008) Comparing the prefrontal cortex of rats and primates: insights from electrophysiology. *Neurotoxicity research* 14:249–262.
- Sebrié C, Chabert C, Ledru A, Guedj F, Po C, Smith DJ, Rubin E, Rivals I, Beloeil J-C, Gillet B, Delabar J-M (2008) Increased dosage of DYRK1A and brain volumetric alterations in a YAC model of partial trisomy 21. *Anatomical record* 291:254–262.
- Segal M (2005) Dendritic spines and long-term plasticity. *Nature reviews Neuroscience* 6:277–284.
- Shi S (1999) Rapid Spine Delivery and Redistribution of AMPA Receptors After Synaptic NMDA Receptor Activation. *Science* 284:1811–1816.
- Shinohara T, Tomizuka K, Miyabara S, Takehara S, Kazuki Y, Inoue J, Katoh M, Nakane H, Iino A, Ohguma A, Ikegami S, Inokuchi K, Ishida I, Reeves RH, Oshimura M (2001) Mice containing a human chromosome 21 model behavioral impairment and cardiac anomalies of Down's syndrome. *10:1163–1176*.
- Siarey RJ, Carlson EJ, Epstein CJ, Balbo a, Rapoport SI, Galdzicki Z (1999) Increased synaptic depression in the Ts65Dn mouse, a model for mental retardation in Down syndrome. *Neuropharmacology* 38:1917–1920.
- Siarey RJ, Kline-Burgess A, Cho M, Balbo A, Best TK, Harashima C, Klann E, Galdzicki Z (2006) Altered signaling pathways underlying abnormal hippocampal synaptic plasticity in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Journal of neurochemistry* 98:1266–1277.
- Siarey RJ, Stoll J, Rapoport SI, Galdzicki Z (1997) Altered long-term potentiation in the young and old Ts65Dn mouse, a model for Down Syndrome. *Neuropharmacology* 36:1549–1554.
- Siarey RJ, Villar AJ, Epstein CJ, Galdzicki Z (2005) Abnormal synaptic plasticity in the Ts1Cje segmental trisomy 16 mouse model of Down syndrome. *Neuropharmacology* 49:122–128.
- Sigurdsson T, Doyère V, Cain CK, LeDoux JE (2007) Long-term potentiation in the amygdala: a cellular mechanism of fear learning and memory. *Neuropharmacology* 52:215–227.

- Silberberg G, Grillner S, LeBeau FEN, Maex R, Markram H (2005) Synaptic pathways in neural microcircuits. *Trends in neurosciences* 28:541–551.
- Skeberdis VA, Chevaleyre V, Lau CG, Goldberg JH, Pettit DL, Suadicani SO, Lin Y, Bennett MVL, Yuste R, Castillo PE, Zukin RS (2006) Protein kinase A regulates calcium permeability of NMDA receptors. *Nature neuroscience* 9:501–510.
- Slattery D a, Neumann I, Cryan JF (2010) Transient inactivation of the infralimbic cortex induces antidepressant-like effects in the rat. *Journal of psychopharmacology* 25(10):1295-303.
- Smith D, Stevens ME, Sudanagunta SP, Bronson RT, Makhinson M, Watabe AM, O’Dell TJ, Fung J, Weier H-UG, Cheng J-fang, Rubin EM (1997) Functional screening of 2Mb of human chromosome 21q22.2 in transgenic mice implicates minibrain in learning defects associated with Down syndrome. *Nature* 16:28–36.
- Snyder EM, Philpot BD, Huber KM, Dong X, Fallon JR, Bear MF (2001) Internalization of ionotropic glutamate receptors in response to mGluR activation. *Nature neuroscience* 4:1079–1085.
- Song I, Hugarir RL (2002) Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends in neurosciences* 25:578–588.
- Song WJ, Chung SH, Kurnit DM (1997) The murine Dyrk protein maps to chromosome 16, localizes to the nucleus, and can form multimers. *Biochemical and biophysical research communications* 231:640–644.
- Sotres-Bayon F, Quirk GJ (2010) Prefrontal control of fear: more than just extinction. *Current opinion in neurobiology* 20:231–235.
- van Spronsen M, Hoogenraad CC (2010a) Synapse pathology in psychiatric and neurologic disease. *Current neurology and neuroscience reports* 10:207–214.
- van Spronsen M, Hoogenraad CC (2010b) Synapse pathology in psychiatric and neurologic disease. *Current neurology and neuroscience reports* 10:207–214.
- Spruston N (2008) Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nature reviews Neuroscience* 9:206–221.
- Stanley EF (1997) The calcium channel and the organization of the presynaptic transmitter release face. *Trends in neurosciences* 20:404–409.
- Stella N, Schweitzer P, Piomelli D (1997) A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* 388:773–778.
- Stent GS (1973) A Physiological Mechanism for Hebb’s Postulate of Learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70:997–1001.
- Strack S, Colbran RJ (1998) Autophosphorylation-dependent Targeting of Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II by the NR2B Subunit of the N-Methyl- D -aspartate Receptor. *The Journal of biological chemistry* 273:20689–20692.
- Straub C, Hunt DL, Yamasaki M, Kim KS, Watanabe M, Castillo PE, Tomita S (2011) Distinct functions of kainate receptors in the brain are determined by the auxiliary subunit Neto1. *Nature neuroscience* 14:866–873.
- Sudhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annual review of neuroscience* 27:509–547.

- Suetsugu M, Mehraein P (1980) Spine Distribution Along the Apical Dendrites of the Pyramidal Neurons in Down's Syndrome. *Acta Neuropathologica* 50:207–210.
- Suga N (1977) Amplitude spectrum representation in the Doppler-shifted-CF processing area of the auditory cortex of the mustache bat. *Science* 196:64–67.
- Sun J-D, Liu Y, Yuan Y-H, Li J, Chen N-H (2011) Gap Junction Dysfunction in the Prefrontal Cortex Induces Depressive-Like Behaviors in Rats. *Neuropsychopharmacology* 37(5):1305-20.
- Sun P, Yoshizuka N, New L, Moser B a, Li Y, Liao R, Xie C, Chen J, Deng Q, Yamout M, Dong M-Q, Frangou CG, Yates JR, Wright PE, Han J (2007) PRAK is essential for ras-induced senescence and tumor suppression. *Cell* 128:295–308.
- Sweeney JE, Höhmann CF, Oster-Granite ML, Coyle JT (1989) Neurogenesis of the basal forebrain in euploid and trisomy 16 mice: an animal model for developmental disorders in Down syndrome. *Neuroscience* 31:413–425.
- Takahashi N, Kitamura K, Matsuo N, Mayford M, Kano M, Matsuki N, Ikegaya Y (2012) Locally synchronized synaptic inputs. *Science* 335:353–356.
- Takeda K, Ishida A, Takahashi K, Ueda T (2012) Synaptic vesicles are capable of synthesizing the VGLUT substrate glutamate from α -ketoglutarate for vesicular loading. *Journal of neurochemistry* 121: 184-196.
- Tan SE, Wenthold RJ, Soderling TR (1994) Phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C in cultured hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience* 14:1123–1129.
- Tanji Ju, Hoshi E (2008) Role of the Lateral Prefrontal Cortex in Executive Behavioral Control. *Physiological Reviews* 88:37–57.
- Tao-Cheng J-H, Crocker VT, Winters C a, Azzam R, Chludzinski J, Reese TS (2011) Trafficking of AMPA receptors at plasma membranes of hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience* 31:4834–4843.
- Tareilus E, Breer H (1995) PRESYNAPTIC CALCIUM CHANNELS: PHARMACOLOGY AND REGULATION. *Neurochemistry international* 26:539–558.
- Teipel S, Schapiro MB, Alexander GE, Ph D, Krasuski JS, Horwitz B, Rapoport SI, Hampel H (2003) Relation of Corpus Callosum and Hippocampal Size to Age in Nondemented Adults With Down's Syndrome. *American Journal of psychiatry* 160:1870–1878.
- Teipel SJ, Alexander GE, Schapiro MB, Möller H-J, Rapoport SI, Hampel H (2004) Age-related cortical grey matter reductions in non-demented Down's syndrome adults determined by MRI with voxel-based morphometry. *Brain: a journal of neurology* 127:811–824.
- Tejedor F, Zhu XR, Kaltenbach E, Ackermann a, Baumann a, Canal I, Heisenberg M, Fischbach KF, Pongs O (1995) minibrain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in *Drosophila*. *Neuron* 14:287–301.
- Tejedor FJ, Hämmerle B (2010) MNB/DYRK1A as a multiple regulator of neuronal development. *The FEBS journal* 278:223–235.
- Tierney PL, Thierry AM, Glowinski J, Deniau JM, Gioanni Y (2008) Dopamine modulates temporal dynamics of feedforward inhibition in rat prefrontal cortex in vivo. *Cerebral cortex* 18:2251–2262.

- Toni N, Buchs P-A, Nikonenko I, Bron CR, Muller D (1999) LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* 402:421–425.
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R (2010) Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacological reviews* 62:405–496.
- Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S (1996) The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87:1327–1338.
- Tsvetkov E, Carlezon W a, Benes FM, Kandel ER, Bolshakov VY (2002) Fear conditioning occludes LTP-induced presynaptic enhancement of synaptic transmission in the cortical pathway to the lateral amygdala. *Neuron* 34:289–300.
- Ulrich D a., Ulrich BD, Angulo-Kinzler RM, Yun J (2001) Treadmill Training of Infants With Down Syndrome: Evidence-Based Developmental Outcomes. *Pediatrics* 108:e84–e84.
- Uylings HBM, Groenewegen HJ, Kolb B (2003) Do rats have a prefrontal cortex? *Behavioural Brain Research* 146:3–17.
- Vaillend C, Poirier R, Laroche S (2008) Genes, plasticity and mental retardation. *Behavioural brain research* 192:88–105.
- Vertes RP (2004) Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51:32–58.
- Vertes RP, Hoover WB (2008) Projections of the paraventricular and paratenial nuclei of the dorsal midline thalamus in the rat. *The Journal of comparative neurology* 508:212–237.
- Vicari S, Bellucci S, Carlesimo GA (2005) Visual and spatial long-term memory: differential pattern of impairments in Williams and Down syndromes. *Developmental medicine and child neurology* 47:305–311.
- Vicari S, Marotta L, Carlesimo GA (2004) Verbal short-term memory in Down's syndrome: An articulatory loop deficit? *Journal of Intellectual Disability Research*: 80–92.
- Vicari S, Verucci L, Carlesimo G a (2007) Implicit memory is independent from IQ and age but not from etiology: evidence from Down and Williams syndromes. *Journal of intellectual disability research* 51:932–941.
- Vidal-Gonzalez I, Vidal-Gonzalez B, Rauch SL, Quirk GJ (2006) Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. *Learning & memory* 13:728–733.
- Vinod KY, Hungund BL (2006) Role of the endocannabinoid system in depression and suicide. *Trends in pharmacological sciences* 27:539–545.
- Volkow ND, Fowler JS (2000) Addiction, a disease of compulsion and drive: involvement of the orbitofrontal cortex. *Cerebral cortex* 10:318–325.
- Vuksić M, Petanjek Z, Rasin MR, Kostović I (2002) Perinatal growth of prefrontal layer III pyramids in Down syndrome. *Pediatric neurology* 27:36–38.
- Walker JC, Dosen a, Buitelaar JK, Janzing JGE (2011) Depression in Down Syndrome: A review of the literature. *Research in developmental disabilities* 32:1432–1440.
- Wallis JD (2011) Cross-species studies of orbitofrontal cortex and value-based decision-making. *Nature neuroscience* 15:13–19.

- Wamsteeker JI, Bains JS (2011) Monoacylglycerol lipase: stopping surplus at the synapse. *The Journal of physiology* 589:5335–5336.
- Wang C, Shyu B-C (2004) Differential projections from the mediodorsal and centrolateral thalamic nuclei to the frontal cortex in rats. *Brain Research* 995:226–235.
- Wang Y, Markram H, Goodman PH, Berger TK, Ma J, Goldman-Rakic PS (2006) Heterogeneity in the pyramidal network of the medial prefrontal cortex. *Nature neuroscience* 9:534–542.
- Waterston RH et al. (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420:520–562.
- Weber AM, Wong FK, Tufford AR, Schlichter LC, Matveev V, Stanley EF (2010) N-type Ca²⁺ channels carry the largest current: implications for nanodomains and transmitter release. *Nature neuroscience* 13:1348–1350.
- Wegiel J, Kuchna I, Nowicki K, Frackowiak J, Dowjat K, Silverman WP, Reisberg B, DeLeon M, Wisniewski T, Adayev T, Chen-Hwang M-C, Hwang Y-W (2004) Cell type- and brain structure-specific patterns of distribution of minibrain kinase in human brain. *Brain research* 1010:69–80.
- Williams AD, Mjaatvedt CH, Moore CS (2008) Characterization of the cardiac phenotype in neonatal Ts65Dn mice. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 237:426–435.
- Woodhall G, Evans DI, Cunningham MO, Jones RSG (2001) NR2B-Containing NMDA Autoreceptors at Synapses on Entorhinal Cortical Neurons. *Journal of Neurophysiology* 86:1644–1651.
- Xia J, Zhang X, Staudinger J, Huganir RL (1999) Clustering of AMPA receptors by the synaptic PDZ domain-containing protein PICK1. *Neuron* 22:179–187.
- Xie W, Ramakrishna N, Wieraszko A, Hwang Y-W (2008) Promotion of neuronal plasticity by (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Neurochemical research* 33:776–783.
- Yabut O, Domogauer J, D’Arcangelo G (2010a) Dyrk1A overexpression inhibits proliferation and induces premature neuronal differentiation of neural progenitor cells. *The Journal of neuroscience* 30:4004–4014.
- Yabut O, Domogauer J, D’Arcangelo G (2010b) Dyrk1A overexpression inhibits proliferation and induces premature neuronal differentiation of neural progenitor cells. *The Journal of neuroscience*: the official journal of the Society for Neuroscience 30:4004–4014.
- Yang Y, Wang X-bin, Frerking M, Zhou Q (2008) Spine expansion and stabilization associated with long-term potentiation. *The Journal of neuroscience* 28:5740–5751.
- Ye B, Liao D, Zhang X, Zhang P, Dong H, Huganir RL (2000) GRASP-1: a neuronal RasGEF associated with the AMPA receptor/GRIP complex. *Neuron* 26:603–617.
- Yoon PW, Freeman SB, Sherman SL, Taft LF, Gu Y, Pettay D, Flanders WD, Khoury MJ, Hassold TJ (1996) Advanced maternal age and the risk of Down syndrome characterized by the meiotic stage of chromosomal error: a population-based study. *American journal of human genetics* 58:628–633.
- Yoshino H, Miyamae T, Hansen G, Zambrowicz B, Flynn M, Pedicord D, Blat Y, Westphal RS, Zaczek R, Lewis D a, Gonzalez-Burgos G (2011) Postsynaptic diacylglycerol lipase mediates retrograde endocannabinoid suppression of inhibition in mouse prefrontal cortex. *The Journal of physiology* 589:4857–4884.
- Yuste R (2011) Dendritic spines and distributed circuits. *Neuron* 71:772–781.

- Yuste R, Bonhoeffer T (2001) MORPHOLOGICAL CHANGES IN DENDRITIC SPINES ASSOCIATED WITH LONG - TERM SYNAPTIC PLASTICITY. 24:1071-89.
- Zhang L, Kirschstein T, Sommersberg B, Merkens M, Manahan-Vaughan D, Elgersma Y, Beck H (2005) Hippocampal synaptic metaplasticity requires inhibitory autophosphorylation of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II. *The Journal of neuroscience* 25:7697–7707.
- Zhong P, Pan B, Gao XP, Blankman JL, Cravatt BF, Liu QS (2011) Genetic deletion of monoacylglycerol lipase alters endocannabinoid-mediated retrograde synaptic depression in the cerebellum. *The Journal of physiology* 589:4847–4855.
- Zilberter Y, Kaiser KMM, Sakmann B (1999) Dendritic GABA release depresses excitatory transmission between Layer 2/3 Pyramidal and Bitufted Neurons in Rat Neocortex. *Neuron* 24:979–988.
- Ziv NE, Garner CC (2004) Cellular and molecular mechanisms of presynaptic assembly. *Nature reviews Neuroscience* 5:385–399.
- Zucker RS, Regehr WG (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annual review of physiology* 64:355–405.