

Service de Validation des Acquis de l'Expérience

Gilles SANSIG

**DEMANDE DE VALIDATION DES ACQUIS
DE L'EXPERIENCE**

en vue de l'obtention du
Doctorat mention Sciences de la vie et de la santé
Spécialité Neurosciences

Année universitaire 2015/2016

Travaux de recherche réalisés
dans la société Novartis Pharma AG,
au sein du département de Neuroscience.

ÉCOLE DOCTORALE

Sciences de la vie et de la santé

THÈSE présentée par :

Gilles SANSIG

Soutenue le : 31 mai 2016

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Neurosciences

**Des souris *knock-out* pour le
récepteur métabrotrape au glutamate
mGluR7 révèlent son rôle dans la
cognition et les émotions**

THÈSE dirigée par :

M. Weiss Etienne

professeur, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. Beckmann Nicolau

professeur, Novartis

M. Boulay Jean-Louis

professeur, université de Bâle

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. Laroche Edouard

professeur, université de Strasbourg

M. Renaud Jean-Paul

professeur, RiboStruct.

M. Robinet Eric

professeur, université de Strasbourg

Mme Haug Danielle

directrice, université de Strasbourg



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Année Universitaire 2015/2016

DOSSIER DE DEMANDE DE VALIDATION DES ACQUIS DE L'EXPÉRIENCE

Loi n° 2002-72 du 17 janvier 2002 de modernisation sociale et Décret n° 2013-756 du 19 août 2013 relatif aux dispositions réglementaires des livres VI et VII du code de l'éducation.

CANDIDAT(E)

NOM d'usage : SANSIG Prénom : Gilles

Diplôme postulé : Doctorat mention Sciences de la Vie et de la Santé, spécialité Neurosciences

Déclaration sur l'honneur

Je déclare sur l'honneur que toutes les informations fournies dans ce dossier sont exactes.

J'ai été rendu attentif (ve) au fait qu'agrémenter mon travail de citations en omettant d'en citer les sources représente un acte de plagiat. Le plagiat est une atteinte au droit d'auteur et à la propriété intellectuelle.

La présente candidature à la validation des acquis de l'expérience en vue de l'obtention du diplôme postulé, précité, constitue l'unique demande pour ce diplôme pour la même année civile.

Je m'engage également à ne pas présenter plus de trois candidatures à la validation des acquis de l'expérience pour des diplômes, certificats ou titres différents durant la présente année civile.

Fait à Bâle

le 1 Mars 2016

Signature du candidat

La loi punit quiconque se rend coupable de fausses déclarations.

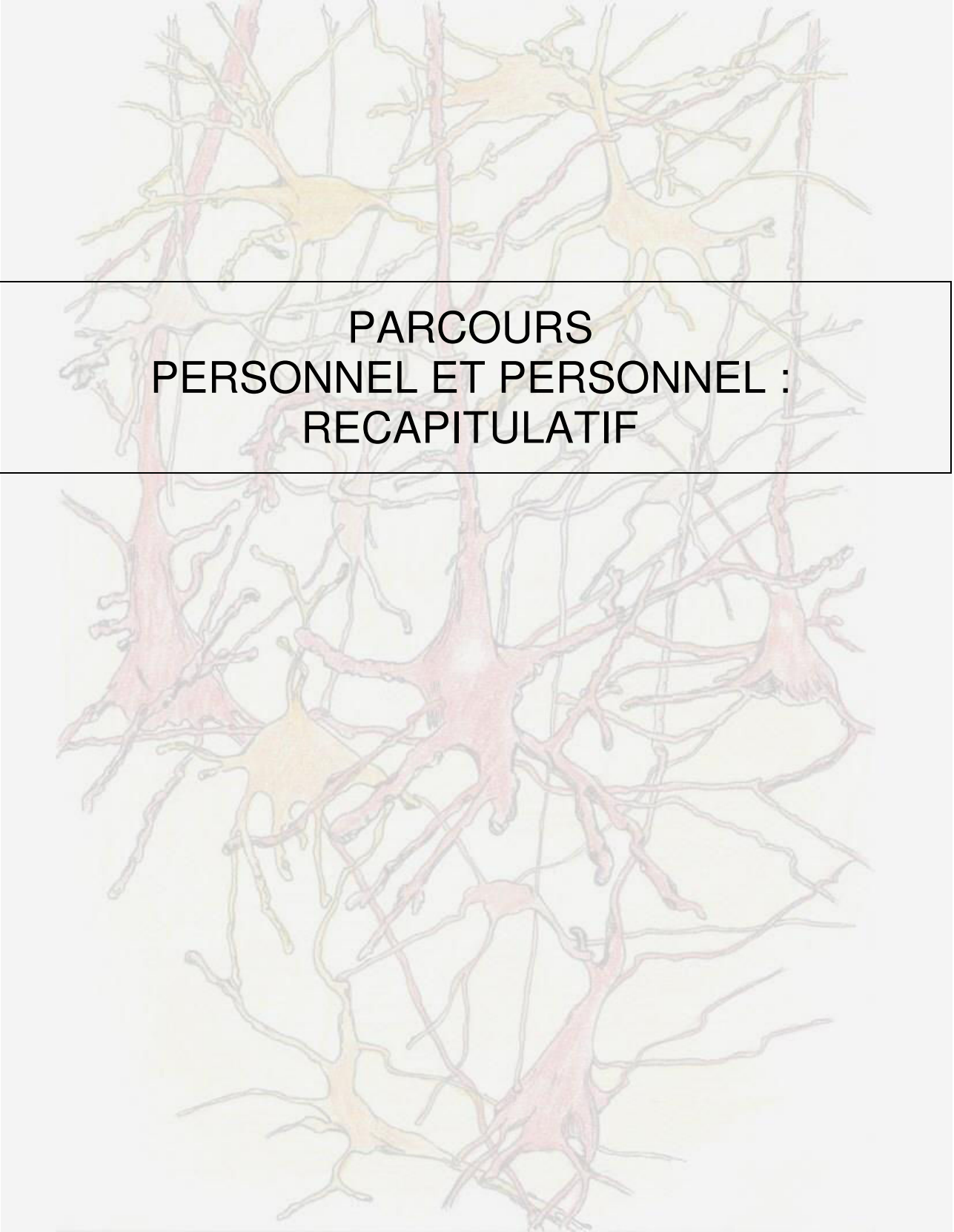
« Constitue un faux toute altération frauduleuse de la vérité, de nature à causer un préjudice et accomplie par quelque moyen que ce soit, dans un écrit ou tout autre support d'expression de la pensée qui a pour objet ou qui peut avoir pour effet d'établir la preuve d'un droit ou d'un fait ayant des conséquences juridiques. Le faux et l'usage de faux sont punis de trois ans d'emprisonnement et de 45000 euros d'amende (code pénal, art. 441-1)

Le fait de se faire délivrer indûment par une administration publique ou par un organisme chargé d'une mission de service public, par quelque moyen frauduleux que ce soit, un document destiné à constater un droit, une identité ou une qualité ou à accorder une autorisation, est puni de deux ans d'emprisonnement et de 30000 euros d'amende » (code pénal art. 441-6)

TABLE DES MATIERES

DOSSIER DE DEMANDE DE VALIDATION	1
DES ACQUIS DE L'EXPÉRIENCE	1
<i>Déclaration sur l'honneur.....</i>	<i>1</i>
TABLE DES MATIERES.....	3
PARCOURS.....	5
PERSONNEL ET PERSONNEL : RECAPITULATIF	5
A/ FICHE ANALYTIQUE.....	6
IDENTITÉ	6
SITUATION ACTUELLE.....	6
SCOLARITÉ / FORMATION	6
B.1 - ACTIVITÉ PROFESSIONNELLE.....	7
B.2 - ACTIVITÉ BÉNÉVOLE ET AUTRES ENGAGEMENTS (ASSOCIATIF, SYNDICAL, POLITIQUE)	9
B.3 - DIPLOMES, TITRES, CERTIFICATS ET/OU CONCOURS OBTENUS.....	10
B.4 - DIPLOMES TITRES, CERTIFICATS ET/OU CONCOURS PRÉPARÉS MAIS NON OBTENUS	15
B.5 - FORMATIONS NON DIPLÔMANTES SUIVIES.....	16
B.6 - PARCOURS D'AUTOFORMATION	17
B.7 - STAGES PRATIQUES EFFECTUÉS DANS LE CADRE DE FORMATIONS DIPLOMANTES	18
C/ CURRICULUM VITAE	23
D/ LISTE DE PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	27
E/ LETTRES DE RECOMMANDATION	31
ANALYSE DES ACQUIS DE L'EXPERIENCE	39
SOMMAIRE.....	41
I. PARCOURS, MOTIVATIONS.....	43
II. PRÉSENTATION DES CONTEXTES D'ACQUISITION ET DE DÉVELOPPEMENT DE MON	
EXPÉRIENCE DE CHERCHEUR.....	48
A. NOVARTIS	48
B. LES INSTITUTS NOVARTIS POUR LA RECHERCHE BIOMÉDICALE (NIBR).	50
III. ANALYSE DES ACQUIS DE MON EXPÉRIENCE DE CHERCHEUR.	53
A. UNE EXPERTISE SCIENTIFIQUE PLURIDISCIPLINAIRE.....	53
1. <i>La mise en fonction du laboratoire de transgénèse.</i>	<i>53</i>
2. <i>Des thymus hyperplasiés : L'analyse des premières souris transgéniques.....</i>	<i>55</i>
3. <i>Les cellules souches embryonnaires de la souris : la naissance d'une passion.....</i>	<i>57</i>
4. <i>La régulation de l'expression des gènes.....</i>	<i>61</i>
5. <i>L'étude du cerveau : de l'esprit aux molécules ou le contraire.</i>	<i>65</i>
6. <i>Le retour à l'Immunologie, 15 ans plus tard.</i>	<i>73</i>

7. Réguler les fonctions physiologiques naturelles.....	79
B. COMMUNIQUER, ENSEIGNER : UN MODE DE VIE.	80
1. Former des collaborateurs.....	80
2. Enseigner.....	81
3. Communiquer.....	82
IV. SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES.	83
V. BIBLIOGRAPHIE.....	86
SUJET DE RECHERCHE :.....	91



PARCOURS PERSONNEL ET PERSONNEL : RECAPITULATIF

IDENTITÉ☐ Mlle ou Mme ☒ M.

NOM : SANSIG Prénom(s) : Gilles

NOM de jeune fille : Date de naissance : 13 10 1964

Ville de naissance : Mulhouse Département de naissance : 68..... Ou Pays de naissance : France

Nationalité : Française ☒ Ressortissant européen ☐ Autre ☐

Adresse personnelle : 22 rue de Hagenthal Code Postal : 68220

Ville : Neuwiller Courriel : gilles.sansig@novartis.com

Tél. personnel : 079 422 02 72 Tél. professionnel : 079 422 02 72 Tél. portable : 079 422 02 72

SITUATION ACTUELLE

Fonction exercée ou dernière fonction exercée en lien avec le diplôme souhaité : Chercheur (Scientist)

Nom de l'employeur : Novartis

Exercez-vous une activité bénévole dans une association ? Oui ☐ non ☐

Vous êtes actuellement :

A En situation d'emploi ☒C. D. D. ☐ intérim ☐ C. D. I. ☒ Contrat aidé ou contrat en alternance ☐Fonctionnaire ☐ Travailleur indépendant, artisan, profession libérale ☐

Si autre, veuillez préciser :

B En recherche d'emploi ☐Inscrit à Pole Emploi ☐ Indemnisé au titre de l'assurance chômage ☐ Bénéficiaire des minima sociaux ☐

Si autre, veuillez préciser :

C En situation d'inactivité ☐Au foyer ☐ Retraité ☐ autre ☐D Reconnu travailleur handicapé ☐**SCOLARITÉ / FORMATION**

Dernière classe suivie	Diplôme le plus élevé obtenu
☐ primaire ou 6 ^{ème} , 5 ^{ème} , 4 ^{ème} du collège ☐ 3 ^{ème} ou première année de CAP ou BEP ☐ 2 ^{ème} , 1 ^{ère} de l'enseignement général ou dernière année de CAP ou de BEP ☐ Terminale ☐ 1 ^{ère} ou 2 ^{ème} année de DEUG/Licence, DUT, BTS, ou équivalent ☐ Licence / Maîtrise, Master 1 ou équivalent ☐ Master 2/DEA/DESS, doctorat ou équivalent	☐ Aucun diplôme ☐ Certificat d'Etude Primaire (CEP) Certificat de Formation Générale (CFG) ☐ Brevet des collèges (BEPC), DNB ou équivalent ☐ CAP, BEP ou autre certification de même niveau ☐ Baccalauréat général, technologique, professionnel, ESEU, DAEU, ou autre certification de niveau IV ☐ DEUG, DUT, BTS ou autre certification de niveau III ☐ Diplôme de niveau II : Licence ou Maîtrise ou Master 1 ou autre certification de niveau II ☒ Diplôme de niveau I : Master 2, titre d'ingénieur diplômé (ou DESS, DEA), doctorat ou autre certification de niveau I ☐ Autres :

Intitulé du diplôme le plus élevé obtenu : Master 2 (Diplom der Universität Basel)

B.1 - ACTIVITÉ PROFESSIONNELLE

Veillez préciser, en commençant par le plus récent, les emplois que vous avez occupés en lien avec le diplôme visé.

Joindre la (ou les) pièce(s) justificative(s) attestant de votre expérience professionnelle. Les pièces en langues étrangère devront être traduites par un traducteur assermenté.

N°	Date		Entreprise, organisme, association,... (Nom et adresse)	Activité de l'entreprise, l'organisme, l'association,...	Intitulé du poste	Principales activités exercées	Quotité du temps de travail (exprimée en % d'un temps plein ou en nb d'heures)
	Du	Au					
1	01/09/2014		Institut de Recherche Biomédical de Novartis (NIBR) Novartis CH-4002 Basel	Exploration des voies de signalisation intracellulaire.	Chercheur en biologie moléculaire et cellulaire (Scientist II)	Différenciation de cellules souches de souris. Analyse de souris transgéniques. Analyse de signalisation cellulaire (GPCRs).	100%
2	01/04/2009	01/09/2014	Institut de Recherche Biomédical de Novartis (NIBR) Novartis CH-4002 Basel	Production d'Anticorps thérapeutiques. (PPA)	Ingénieur-chercheur en production d'anticorps (Scientist II)	Imaginé, dessiné et construit une souris transgénique dont la production endogène d'anticorps de souris est abolie. Construit des vecteurs de transgénèse pour la production d'anticorps humain.	100%
3	01/01/2008	01/04/2009	Institut de Recherche Biomédical de Novartis (NIBR) Novartis CH-4002 Basel	Auto-immunité. Inflammation et Transplantation	Chercheur en Immunologie (Inflammation) (Scientist II)	Construit un model expérimental dans la souris de la sclérose en plaque humaine	100%
4	1994	2007	Institut de Recherche Biomédical de Novartis (NIBR) Novartis CH-4002 Basel	Neurosciences	Chercheur en Neurosciences (Scientist II)	Dessiné et construit des souris transgéniques dans le domaine des neurosciences. Analysé leurs phénotypes.	100%
5	1987	1993	Ciba-Geigy Basel	Département de Biotechnologie	Technicien puis ingénieur puis chercheur.	Construit et analysé des souris transgéniques.	100%

B1 n°1-5 : Certificat de travail



M
Gilles Sansig
22, rue de Hagenthal
F-68220 NEUWILLER

4 mars 2016 / sc / sbo

Certificat de travail – Gilles Sansig – 2006998

Par la présente nous confirmons que M Gilles Sansig, né le 13 octobre 1964, est employé chez Novartis en tant que Scientist II avec un contrat permanent depuis le 1 juillet 1987.

Meilleures salutations

Novartis Pharma AG

A blue ink signature of Karin Schär, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke.

Karin Schär
HR Admin

A blue ink signature of Leonie Baumgartner, featuring a large, stylized 'L' and 'B'.

Leonie Baumgartner
HR Admin

B.2 - ACTIVITÉ BÉNÉVOLE ET AUTRES ENGAGEMENTS (associatif, syndical, politique)

Veillez préciser, en commençant par les plus récentes, les activités que vous avez exercées en lien avec le diplôme visé.

Joindre la (ou les) pièce(s) justificative(s) attestant de vos activités de bénévolat ou autres engagements. Les pièces en langues étrangère devront être traduites par un traducteur assermenté.

N°	Date		Entreprise, organisme, association,... (Nom et adresse)	Activité de l'entreprise, l'organisme, ou l'association	Fonctions exercées	Quotité du temps de travail (exprimée en % d'un temps plein ou en nb d'heures)
	Du	Au				
1						
2						
3						

B.3 - DIPLOMES, TITRES, CERTIFICATS ET/OU CONCOURS OBTENUS

Veillez commencer par le plus récent

Joindre la (ou les) pièce(s) justificative(s) attestant des diplômes, titres, certificats et/ou concours obtenus. Les pièces en langues étrangère devront être traduites par un traducteur assermenté.

N°	Année d'obtention	Etablissement certificateur (Nom et adresse)	Diplôme (en partie ou en totalité), titre, certificat ou concours (Intitulé exact)
1	1996	Université de Bâle Philosophisch-Naturwissenschaftliche Fakultät Universität 4003 Basel Petersplatz.	Master II (Diplom Biologie II).
2	1991	Université de Rennes I 2 rue du Thabor - 35065 Rennes cedex	Certificat d'université en Biotechnologie.
3	1988	Université de Haute-Alsace 1 rue Alfred Werner - 68093 MULHOUSE CEDEX	Examen spécial d'accès aux Etudes Universitaires. Sciences de la vie- chimie.

Philosophisch-
Naturwissenschaftliche Fakultät

UNIVERSITÄT
BASEL

GILLES SANSIG

aus
Frankreich

wird das
D I P L O M
für
Biologie II

aufgrund der in
der "Ordnung der Philosophisch-
Naturwissenschaftlichen Fakultät"
festgelegten Fachprüfungen erteilt

Der Dekan

H. C. H. H.

7. März 1996

*Faculté de philosophie et de sciences
naturelles de l'Université de Bâle (Suisse)*

UNIVERSITÉ DE BÂLE

GILLES SANSIG

originaire de

France

a obtenu le

DIPLÔME

de

Biologie II

*suite aux examens professionnels définis
dans le « Règlement de la
Faculté de philosophie et de sciences
naturelles »*

Le Doyen

(signé)

Le 7 mars 1996

*Traduit de l'allemand le 4 mars 2016 à Schoelcher, Martinique, par Karine VINANT, traductrice-expert près la
Cour d'appel de Fort-de-France, d'après un document numérisé, ne varietur sous le numéro 20160304c.*



RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

Diplôme de l'Université de Rennes I

Nous, PRESIDENT et PROFESSEURS de l'UNIVERSITE de RENNES I,

Vu la délibération du CONSEIL de l'UNIVERSITE de RENNES I

en date du 23 Janvier 1986 instituant et réglementant

le CERTIFICAT D'UNIVERSITE EN BIOTECHNOLOGIE de cette Université,

titre d'Ordre exclusivement scientifique ne conférant aucun des droits attachés aux grades par les lois et règlements;

Après avoir constaté que Monsieur..... S. A. N. S. I. G. filles.....

Né le 13 Octobre 1964 à MILHOUSE (Haut Rhin)

a rempli toutes les conditions exigées par les règlements;

L'avons déclaré digne du DIPLOME de du CERTIFICAT D'UNIVERSITE EN BIOTECHNOLOGIE

..... Sessions 1990 - Mention : PASSABLE

Fait à RENNES, le 15 AVR 1991

Signature de l'imprimant,

Les Membres du Jury
ont signé au Procès-Verbal,

Le Président,

J.C. HARDY

N° 35-0936-C-12

UNIVERSITÉ DE HAUTE ALSACE

A T T E S T A T I O N

Le Président de l'Université de Haute Alsace
certifie que

Monsieur SANSIG Gilles

né(e) le 13.10.1964 à MULHOUSE (68)

a subi avec succès les épreuves de l'examen spécial
d'accès aux Etudes Universitaires (examen B) à la
session de Mai 1988. Mention : Bien

Epreuves optionnelles choisies : Sciences de la

Nature et de la Vie - Chimie

Fait à Mulhouse, le 22 Juin 1988

P. le PRESIDENT

Le Secrétaire Général,



J. DELAY

JD

AVIS IMPORTANT : il n'est pas délivré de duplicata de certificat.
Il appartient au titulaire d'établir ou de faire certifier conforme
les copies qui pourraient lui être nécessaires.

B.4 - DIPLOMES TITRES, CERTIFICATS ET/OU CONCOURS PRÉPARÉS MAIS NON OBTENUS

Veillez commencer par le plus récent

Joindre la (ou les) pièce(s) justificative(s) attestant des diplômes, titres, certificats et/ou concours préparés mais non obtenus. Les pièces en langues étrangère devront être traduites par un traducteur assermenté.

N°	Période de préparation		Établissement (Nom et adresse)	Diplôme, titre, certificat ou concours (Intitulé exact)
	DU	AU		
1				
2				
3				

B.5 - FORMATIONS NON DIPLÔMANTES SUIVIES

Veillez détailler, en commençant par la plus récente, les formations non diplômantes suivies en lien avec le diplôme visé

Joindre la (ou les) pièce(s) justificative(s) attestant des formations non diplômantes suivies. Les pièces en langues étrangère devront être traduites par un traducteur assermenté.

N°	DU	AU	Durée	Intitulé de l'action de formation	Organisme (nom et adresse)	Objectifs
1						
2						
3						

B.6 - PARCOURS D'AUTOFORMATION

Veillez indiquer, en commençant par les plus récentes, les activités personnelles d'autoformation réalisées en lien avec le diplôme visé

N°	Période	Désignation	Mode d'apprentissage	Réalisations éventuelles
1	Janvier 2013	LTK Module 2 (habilitation à diriger des expérimentations animales). Universität Zürich. Institut für Labortierkunde.	Pratique et Théorique (20 heures)	Diplome LTK 2
2	Février 2005	LTK Module 1 (habilitation à conduire des expérimentations animales). Universität Zürich. Institut für Labortierkunde.	Pratique et Théorique (40 heures)	Diplome LTK 1
3	Octobre 2001	Production de vecteurs dérivés de lentivirus. Genetic Therapy Inc, Gaithersburg,	Pratique et Théorique (40 heures)	Implémentation du système lentivirus au sein de Novartis.



Universität Zürich

Institut für LaborTierkunde

Winterthurerstrasse 190
CH-8057 Zürich
Tel. +41 44 635 54 51
Fax +41 44 635 57 03
www.itk.uzh.ch

Education and Training of Persons Conducting Animal Experiments

(Swiss Ordinance on the Education and Training of Persons Conducting Animal Experiments, October 12, 1998)

CONFIRMATION OF ATTENDANCE

Gilles Sansig

has successfully attended the following course between Dezember 11 and 13, 2007:

LTK Module 2: Training for Persons Responsible for Directing Animals Experiments

Course for Persons Supervising the Conduct of Animal Experiments (22 hours).
Together with the LTK Module 1 „Introductory course in Laboratory Animal Science“
and the study-directed practical training this corresponds to FELASA-Category C.

That event has been recommended by the Federation of Swiss Cantonal Veterinary
Officers for recognition by all authorities responsible for animal experimentation (see
letter of October 18th, 2002).

Die obenstehend genannte Veranstaltung wurde mit Schreiben vom 18. Oktober 2002
von der Schweizer Vereinigung der Kantonstierärztinnen und Kantonstierärzte den für
Tierversuche zuständigen Behörden zur Anerkennung empfohlen.

Zürich, December 13, 2007

Prof. Dr. K. Bürki

Dr. H.P. Käsemann
(Responsible Person)

(Logo)

Université de Zurich (Suisse)
Institut des études pour l'expérimentation animale
(*Institut für Labortierkunde*)

Winterthurerstrasse 190
CH-8057 Zurich (Suisse)
Tél. +41 44 635 54 51
Fax : +41 44 635 57 03
www.ltk.uzh.ch

Formation et perfectionnement des personnels effectuant des expérimentations animales
(Ordonnance du 12 octobre 1998 sur la formation et le perfectionnement du personnel spécialisé
dans le domaine de l'expérimentation animale.)

ATTESTATION DE PARTICIPATION

Gilles Sansig

a suivi avec succès la formation suivante entre le 11 et le 13 décembre 2007 :

**Module 2 d'étude pour l'expérimentation animale : formation destinée aux personnes chargées de
diriger les expérimentations animales**

Formation destinée aux personnes qui supervisent la réalisation des essais sur les animaux (22 heures).

Combinée au module 1 d'étude pour l'expérimentation animale, « Introduction à l'expérimentation animale » et à la formation pratique d'études dirigées, cette formation correspond à la catégorie C de la FELASA.

La formation ci-dessus a été recommandée par l'Association suisse des vétérinaires cantonaux pour être reconnue par toutes les autorités compétentes en matière d'expérimentation animale (par courrier du 18 octobre 2002).

Zurich, le 13 décembre 2007

(signé)
Prof. Dr. K. Bürki

(signé)
Dr. H. P. Käsermann

(Responsable)

Université de Berne | Université de Zurich
Faculté Vetsuisse

Traduit de l'anglais le 4 mars 2016 à Schoelcher, Martinique, par Karine VINANT, traductrice-expert près la Cour d'appel de Fort-de-France, d'après un document numérisé, ne varietur sous le numéro 20160304b.





Universität Zürich
Institut für Labortierkunde

Aus- und Weiterbildungsveranstaltungen für Fachpersonal für Tierversuche
(Verordnung über die Aus- und Weiterbildung des Fachpersonals für Tierversuche vom 12. Oktober 1998)

TEILNAHME - BESTÄTIGUNG

Gilles Sansig

hat vom 7.-11. Februar 2005 die nachfolgend genannte Veranstaltung erfolgreich besucht:

LTK Modul 1: Einführung in die Labortierkunde

Kurs für die Ausbildung von Personen, die Tierversuche durchführen (mind. 40 Stunden).

Maus / Ratte / Meerschweinchen / Kaninchen entspricht FELASA-Kategorie B.

Die oben genannte Veranstaltung wurde mit Schreiben vom 27.2.2002 von der Schweizer Vereinigung der Kantonstierärztinnen und Kantonstierärzte den für Tierversuche zuständigen Behörden zur Anerkennung empfohlen.

That event has been recommended by the Federation of Swiss Cantonal Veterinary Officers for recognition by all authorities responsible for animal experimentation (see letter of February 27, 2002).

Zürich, 11.2.2005

Prof. Dr. K. Bürki

Dr. H.P. Käsemann

(Verantwortliche Person)

**Sessions de formation et de perfectionnement destinées aux personnels spécialisés dans le
domaine de l'expérimentation animale**
(Ordonnance du 12 octobre 1998 sur la formation et le perfectionnement du personnel spécialisé
dans le domaine de l'expérimentation animale.)

ATTESTATION DE PARTICIPATION

Gilles Sansig

a suivi avec succès, du 7 au 11 février 2005, la formation suivante :

Module 1 d'étude pour l'expérimentation animale : introduction à l'expérimentation animale

Cours de formation destiné aux personnes qui effectuent des essais sur les animaux (min. 40 heures).
Souris/rats/cobayes/lapins - Correspond à la catégorie B de la FELASA.

La formation ci-dessus a été recommandée par l'Association suisse des vétérinaires cantonaux pour
être reconnue par les autorités compétentes en matière d'expérimentation animale (par courrier du
27 février 2002).

Zurich, le 11.02.2005

(signé)
Prof. Dr. K. Bürki

(signé)
Dr. H. P. Käsermann
(Responsable)



B.7 - STAGES PRATIQUES EFFECTUÉS DANS LE CADRE DE FORMATIONS DIPLOMANTES

Veillez détailler, en commençant par le plus récent, les stages pratiques effectués en France et/ou à l'étranger

Joindre la (ou les) pièce(s) justificative(s) les attestant. Les pièces en langues étrangère devront être traduites par un traducteur assermenté.

N°	Date	Durée	Intitulé et cadre dans lequel le stage a été effectué	Organisme d'accueil (nom, adresse)	Contenu du stage et activités réalisées
1	1995	6 mois	Stage obligatoire de Master II	Novartis	Construction d'un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur du gène humain de la neurotrophine dans un chromosome artificiel de levure pour la production de souris transgéniques.
2	1991	6 mois	Stage obligatoire du certificat de biotechnologie	Ciba	L'expression <i>in vivo</i> de l'antigène T de SV40 dans les cellules épithéliales du thymus révèle en partie leur rôle dans la différenciation des thymocytes.

C/ Curriculum Vitae

Gilles Sansig

Novartis Institute for Biomedical Research
Building WSJ-350.2.04
CH 4002 Basel, Switzerland.
Telephone : +41 61 324 56 41
E-mail : gilles.sansig@novartis.com



Expertises scientifiques

- Génération de souris transgéniques. Génération de souris *knock-out*. *Knock-out* complet et conditionnel (lignée cellulaire et temporel): Manipulation génétique de cellules embryonnaires souches (ES) ; recombinaison homologue; recombinaison *cre-lox*.
- Génération de souris transgéniques à partir de chromosome artificiel de levure (YAC). Electrophorèse en champ pulsé. Recombinaison homologue dans la levure. Transfert de YAC dans des cellules souches embryonnaires.
- Transgénése associée à des vecteurs dérivés d'adénovirus et de lentivirus : Injection stéréotaxique de vecteurs viraux dans le cerveau de souris adultes ; distribution d'ARNi *via* des vecteurs viraux.
- Production d'anticorps thérapeutiques humains dans la souris.

Enseignement

- Introduction à la biologie moléculaire et à la génétique. Novartis
- Immunologie Fondamentale. Novartis
- Production d'anticorps thérapeutique humain dans la souris. Université de Bâle.

Formation

- 2007** **LTK Module 2E** : Habilitation à diriger des expérimentations animales. Universität Zürich. Institut für Labortierkunde.
- 2005** **LTK Module 1** : habilitation à conduire des expérimentations animales. Universität Zürich. Institut für Labortierkunde,
- 1995** **Master II** en Biologie Moléculaire, Université de Bâle, Suisse.
Construction d'un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur du gène humain de la neurotrophine dans un chromosome artificiel de levure pour la production de souris transgéniques
- 1991** **Certificat d'université en Biotechnologie.** Université de Rennes I, France.
Formation à distance diplômante sur 3 ans (Licence). Rapport de stage sur 6 mois de travaux en recherche : L'expression *in vivo* de l'antigène T de SV40 dans les cellules épithéliales du thymus révèle en partie leur rôle dans la différenciation des thymocytes.
- 1988** **Examen spécial d'accès aux Etudes Universitaires.** Sciences de la vie et chimie. Université de Haute-Alsace, Mulhouse, France.

Emplois

- Depuis 2014 :** **Scientist II** Novartis Institute for Biomedical Research (NIBR-DMP). Département de biologie moléculaire et cellulaire. (dans le groupe du Dr Frederic Bassilana).
Différenciation de cellules souches murines et humaines en cellules Entéroendocrine et en cellules neuroendocrines. GPCRs.
- 2014-2009 :** **Scientist II** Novartis Institute for Biomedical Research (NIBR-NBC.PPA).Département de Biotechnologie.
Production d'anticorps (dans le groupe du Dr Elisabetta Traggiai).
Construction de souris transgénique pour la production d'anticorps humains.
- 2008 :** **Scientist II** Novartis Institute for Biomedical Research (NIBR-ATI). Département d'Immunologie (groupe du Dr Anis Mir).
Développement d'un modèle souris d'encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE).
- 2000-2007 :** **Scientist II** Novartis Institute for Biomedical Research (NIBR-NS). Neuroscience.(groupe du Dr. Herman Van der Putten)
- 1994-2000 :** **Scientist II** Département de Neuroscience.
(CNS) Novartis, Basel, Switzerland. (groupe du Dr. Herman Van der Putten)
- 1991-1993 :** **Scientist** Département de Biotechnologie.
Ciba, Basel, Switzerland.(groupe du Dr. Herman Van der Putten)
- 1987-1991 :** **Technicien de laboratoire** Ciba-Geigy Pharma, Department Biotechnology, Basel, Switzerland. (groupe du Dr. Herman Van der Putten).

Cours et workshops

Génétique de la souris

- Production of the BIV lentiviral vector system, Genetic Therapy Inc, Gaithersburg, October 2001
- EMBO course on advanced genome engineering, Heidelberg, April 2000.
- Cold Spring Harbor meeting on mouse molecular genetics, EMBL Heidelberg, August 1993.
- Regio course on gene targeting and embryonic stem cells. Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg/Breisgau, September 1992.

Neurobiologie

- 4th workshop on mouse molecular neurogenetics, The Jackson Lab, Bar Harbor, June 2002
- 8th neural workshop Verbier on Molecular cellular and clinical aspects of neurodegenerative diseases, Verbier, January 2002
- Isolation and propagation of neuronal stem cells, University of Calgary, June-July 1995.

Sécurité en radiations

- Strahlenschutz für Laborleiter und Laborleiterinnen, Paul Scherrer Institut, October 1997

Références

Dr. phil Elisabetta Traggiai, Novartis, Basel
elisabetta.traggiai@novartis.com

Dr. phil Herman Van der Putten, NCL Foundation, Hambourg
PD Dr. phil Jean-Louis Boulay, University Hospital Basel,
PD Dr. phil Etienne Weiss, University of Strasbourg,

hermanvdp87@gmail.com
jean-louis.boulay@unibas.ch
etienne.weiss@unistra.fr

Données personnelles

Date de naissance : 13 octobre 1964
Nationalité : Française
Situation familiale : Célibataire
Langues : Français, anglais, allemand.
Autres activités : Alpinisme, escalade, ski.

D/ LISTE DE PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publication originale comme premier auteur

1. **Sansig G**, Bushell TJ, Clarke RJ, Rozov A, Burnashev N, Portet C, Gasparini F, Schmutz M, Klebs K, Shigemoto R, Flor PJ, Kuhn R, Knoepfel T, Schroeder M, Hampson DR, Collett VJ, Duvoisin RM, Collingridge GL, Van der Putten H. Increased seizure-susceptibility and altered presynaptic facilitation in mice lacking the metabotropic glutamate receptor mGluR7. J Neurosci. 2001 Nov 15; 21(22) : 8734-45.

Publications originales

21. Vigot R, Barbieri S, Bräuner-Osborne H, Turecek R, Shigemoto R, Zhang XP, Luján R, Jacobson LH, Biermann B, Fritschy JM, Vacher CM, Müller M, **Sansig G**, Guetg N, Cryan JF, Kaupmann K, Gassmann M, Oertner TG and Bettler B. Differential compartmentalization and distinct functions of GABAB receptor variants. Neuron. 2006 May 18;50(4):589-601.

20. Hölscher C, Schmid S, Pilz PKD, **Sansig G**, Van der Putten H and Plappert CF. Lack of the metabotropic glutamate receptor subtype 7 selectively modulates Theta rhythm and working memory. Learn Mem. 2005 Sept-Oct ; 12(5) : 450-5.

19. Hölscher C, Schmid S, Pilz PKD, **Sansig G**, Van der Putten H and Plappert CF. Lack of the metabotropic glutamate receptor subtype 7 selectively impairs short-term working memory but not long-term memory. Behav Brain res. 2004 Oct 5 ; 154 (2) : 473-81.

18. Mombereau C, Kaupmann K, Froestl W, **Sansig G**, Van der Putten H and Cryan JFC. Genetic and Pharmacological evidence of a role for GABAB receptors in the modulation of anxiety and antidepressant-like behaviour. Neuropsychopharmacology. 2004 Jun ; 29(6) : 1050-62.

17. Gassmann M, Shaban H , Vigot R, **Sansig G**, Haller C, Barbieri S, Humeau Y, Schuler V, Müller M, Kinzel B, Klebs K, Schmutz M, Froestl W, Heid J, Kelly P.H., Gentry C, Jaton A, Fox A, Van der Putten H, Mombereau C, Lecourtier L, Mosbacher J, Cryan J.F., Fritschy JM, Lüthi A , Kaupmann K and Bettler B. Redistribution of GABAB(1) protein and atypical GABAB responses in GABAB(2)-deficient mice. J Neurosci. 2004 Jul 7 ; 24(27) : 6086-97.

16. Kaupmann K, Cryan JF, Wellendorph P, Mombereau C, **Sansig G**, Klebs K, Schmutz M, Froestl W, Van der Putten H, Mosbacher J, Bräuner-Osborne H, Waldmeier P and Bettler B. Specific γ -hydroxybutyrate-binding sites but loss of pharmacological effects of γ -hydroxybutyrate in GABAB(1)-deficient mice. Eur J. of Neurosci. 2003 Nov ; 18(10) : 2722-30.

15. Cryan JF, Kelly PH, Neijt HC, **Sansig G**, Flor PJ, van Der Putten H. Antidepressant and anxiolytic-like effects in mice lacking the group III metabotropic glutamate receptor mGluR7. Eur J Neurosci. 2003 Jun ; 17(11) : 2409-17.

14. Simonen M, Pedersen V, Weinmann O, Schnell L, Buss A, Ledermann B, Christ F, **Sansig G**, Van der Putten H, Schwab ME.
Systemic deletion of the myelin-associated outgrowth inhibitor Nogo-A improves regenerative and plastic responses after spinal cord injury.
Neuron. 2003 Apr 24 ; 38(2) : 201-11.
13. Bushell TJ, **Sansig G**, Collett VJ, Van Der Putten H, Collingridge GL.
Altered Short-Term Synaptic Plasticity in Mice Lacking the Metabotropic Glutamate Receptor mGlu7. Scientific World Journal. 2002 Mar 15;2(3):730-7.
12. Schuler V, Lüscher C, Blanchet C, **Sansig G**, Kaupmann K, Klebs K, Schumtzt M, Heid J, Gentry C, Urban L, Fox A, Spooren W, Jatón AL, Vigouret JM, Pozza MF, Kelly P, Mosbacher J, Froestl W, Bishoff S, Van der Putten, Bettler B. Epileptic seizures, Hyperalgesia and loss of Detectable Gaba_B responses in Gaba b R1-deficient Mice.
Neuron. 2001 July 19 ; 47-58.
11. Masugi M, Yokoi M, Shigemoto R, Muguruma K, Watanabe Y, **Sansig G**, Van der Putten H, Nakanishi S. Metabotropic glutamate receptor subtype 7 ablation causes deficit in fear response and conditioned taste aversion.
J Neurosci. 1999 Feb 1; 19 (3): 955-63.15.
10. Pluschke G, Joss A, Marfurt J, Daubenberger C, Kashala O, Zwickl M, Stief A, **Sansig G**, Schlapfer B, Linkert S, Van der Putten H, Hardman N, Schroder M.
Generation of chimeric monoclonal antibodies from mice that carry human immunoglobulin Cgamma1 heavy of Ckappa light chain gene segments.
J Immunol Methods. 1998 Jun 1; 215 (1-2): 27-37.
9. Luthi A, Van der Putten H, Botteri FM, Mansuy IM, Meins M, Frey U, **Sansig G**, Portet C, Schmutz M, Schroder M, Nitsch C, Laurent JP, Monard D.
Endogenous serine protease inhibitor modulates epileptic activity and hippocampal long-term potentiation. J Neurosci. 1997 Jun 15 ; 17(12): 4688-99.
8. Arber S, Hunter JJ, Ross J Jr, Hongo M, **Sansig G**, Borg J, Perriard JC, Chien KR, Caroni P. MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure.
Cell. 1997 Feb 7; 88 (3): 393-403.
7. Flor PJ, Van der Putten H, Ruegg D, Lukic S, Leonhardt T, Bence M, **Sansig G**, Knöpfel T, Kuhn R. A novel splice variant of a metabotropic glutamate receptor, human mGluR7b. Neuropharmacology. 1997 Feb ; 36 (2) : 153-9.
6. Mohajeri MH, Bartsch U, Van der Putten H, **Sansig G**, Mucke L, Schachner M. Neurite outgrowth on non-permissive substrates in vitro is enhanced by ectopic expression of the neural adhesion molecule L1 by mouse astrocytes. Eur J Neurosci. 1996 Jun ; 8 (6):1085-97.
5. Moll J, Schmid P, **Sansig G**, Van der Putten H.
The pattern of prothymosin alpha gene expression coincides with that of myc proto-oncogenes during mouse embryogenesis.
Histochem J. 1996 Jan; 28 (1): 45-52.
4. Stief A, Texido G, **Sansig G**, Eibel H, Le Gros G, Van der Putten H.
Mice deficient in CD23 reveal its modulatory role in IgE production but no role in T and B cell development. J Immunol. 1994 Apr 1 ; 152 (7): 3378-90.

3. Moll J, Eibel H, Botteri F, **Sansig G**, Regnier C, Van der Putten H.
Transgenes encoding mutant simian virus 40 large T antigens unmask phenotypic and functional constraints in thymic epithelial cells.
Oncogene. 1992 Nov ; 7 (11): 2175-87.
2. Moll J, Eibel H, Schmid P, **Sansig G**, Botteri F, Palacios R, Van der Putten H.
Thymic hyperplasia in transgenic mice caused by immortal epithelial cells expressing c-kit ligand. Eur J Immunol. 1992 Jun ; 22 (6): 1587-94.
1. Moll J, **Sansig G**, Fattori E, Van der Putten H.
The murine rac1 gene: cDNA cloning, tissue distribution and regulated expression of rac1 mRNA by disassembly of actin microfilaments.
Oncogene. 1991 May ; 6 (5): 863-6.

E/ LETTRES DE RECOMMANDATION

Dr. P. Herman van der Putten

Dr. Serge Bischoff

Dr. Federic Bernard



NCL Foundation | Holstenwall 10 | 20355 Hamburg, Germany

January 25, 2016

Dr. P. Herman van der Putten
Scientific Officer NCL Foundation
herman.vanderputten@ncl-stiftung.de
hermanvdp87@gmail.com

Tel: 0041 61 4210637
Mobile (NCL) 0049 163 738 3083
Mobile (private) 0041 76 4383921

Letter of recommendation for Gilles Sansig

To whom it may concern.

I fully support Gilles Sansig's application to obtain his PhD degree based on prior experiential learning. I have a PhD in Biology (1981) from the University of Nijmegen (NL), was an EMBO and ZWO (NL) postdoctoral fellow at the University of Geneva (1981-1983) and at the Salk Institute in San Diego, USA (1983-1986), a lab head in molecular biology at Ciba-Geigy and Novartis (1986-1999), and in Novartis a member of the NS strategic management board (1999-2003), director of neuropsychiatry (2003) and executive director neuroscience (2004-2012). Currently, I am the scientific officer of the NCL Foundation in Hamburg (Germany).

During my 26 years at Novartis, Gilles Sansig was 20 years a member of my group and he is one of the most dedicated scientists and colleagues I know. Starting as a technician in my lab in 1987, it became quickly clear that he had the agility, the aspirations and the perseverance to become a devoted scientist. During this time Gilles' mastered a lot of science across different therapeutic fields including neuroscience and immunobiology, and he was a key driver in some of the projects including mGluR7 and a key team player in many other projects such as the biology and therapeutic targeting of GABA B receptors, other mGluR receptors and immunomodulators such as CD23. Gilles' was always ready and keen to dive deeply into the science of each project and ask key questions. His contributions to many projects were not only most valuable but also have been indispensable for making them successful. His contributions to a large number of high caliber scientific papers were seminal.

Gilles' experimental skills are very broad. He obtained his Master degree in molecular biology from the University of Basel based on a master thesis that involved the construction of a reporter gene-tagged human neurotrophin gene on yeast artificial chromosomes to generate transgenic mice for testing compounds to enhance neurotrophin gene expression. To this end he learned and applied all the recombinant DNA and yeast technological skills
[Text eingeben]

NCL Foundation

Holstenwall 10, 20355 Hamburg
Tel.: +49 (0) 40 69 666 740
www.ncl-foundation.com

Board

Dr. Frank Stehr
Frank.stehr@ncl-stiftung.de

Foundation Council

Dr. F. Husemann, R. Kuhn,
Dr. C. Borchard, M. Hartleif,
A. Rößler

Bank Account

IBAN: DE50 20050550
059223030
BIC: HASPDEHHXXX
Hamburger Sparkasse

needed to accomplish the task. Aside from a wide range of molecular, biochemical and cell biology techniques, Gilles generated mutations in embryonic stem cells to generate transgenic mice using homologous recombination and Cre-Lox-based technologies, he used yeast artificial chromosome-based recombination technologies to generate transgenic mice, he used lenti- and adeno-associated viral-vector-mediated transgenesis and gene transfer into the central nervous system. Since he left my group, he further broadened his scientific skills by establishing a murine model for experimental autoimmune encephalitis and testing potential therapeutics in the model.

Gilles has always been an excellent team player, ready to help individuals and teams to try and achieve their goals. He has always been both a creative and practical thinker looking for solutions to accomplish tasks. He is a great collaborator, a very pleasant person, a great lab mate and team player, and as mentioned before, an excellent scientist. In brief, I highly recommend you granting him his PhD.

Yours sincerely,



Herman van der Putten
Scientific Officer NCL Foundation, Hamburg.

[Text eingeben]

NCL Foundation

Holstenwall 10, 20355 Hamburg
Tel.: +49 (0) 40 69 666 740
www.ncl-foundation.com

Board

Dr. Frank Stehr
Frank.stehr@ncl-stiftung.de

Foundation Council

Dr. F. Husemann, R. Kuhn,
Dr. C. Borchard, M. Hartleif,
A. Rößler

Bank Account

IBAN: DE50 20050550
059223030
BIC: HASPDEHHXXX
Hamburger Sparkasse

Date: August 30th, 2014

Dr Serge Bischoff

President – CEO

serge.bischoff@rhenovia.com

www.rhenovia.com

Mobile: +33 6 85 64 51 56

Technopole,

20C rue de Chemnitz

F- 68200 MULHOUSE

France

Phone : +33 3 89 32 11 80

To whom it may concern

I am pleased and honored to recommend Gilles Sansig. I was lucky to follow him very closely for over 10 years between 1994 when I came back from a sabbatical at the Salk Institute in California, and we established in my laboratory the technology of in situ hybridization, and 2003, when I left Novartis to create the start-up Rhenovia Pharma.

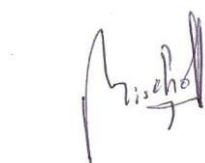
Gilles was in the neighbor lab, and I had an additional opportunity to know Gilles very deeply as I shared for years the office with his supervisor, Dr. Herman van der Putten. It was a unique opportunity to exchange on a daily basis about science, technology but also the occasion to learn more about the personality of Gilles.

From a human and personality point of view, Gilles is a very imaginative and full-of-humor person, being, besides his qualities as experimentalist and extremely skilled molecular biologist, a very pleasant lab mate, partner and collaborator. I remember how he was supporting my younger collaborators especially technicians starting their career at Ciba-Geigy after having been apprentice: he found always the few minutes to provide help, support and encouragements.

As an experimentalist, Gilles is amongst the most skilled persons worldwide in the field of transgenic animals. He is among the pioneers for performing gene manipulation to create knock-in / knock-out animals, and later on conditional transgenic animals intended to better understand diseases / or at least specific features of diseases of the central and peripheral nervous system (especially neurodegenerative diseases such as Alzheimer or Parkinson, but also mental / psychiatric diseases).

As a scientist, Gilles played a key role in the development of an approach which was an emerging, controversial discipline in the 90s and which exploded in the years 2000 providing new insights into many incurable and damaging diseases. He had the chance to meet, and in many cases to collaborate with some of the most renowned researchers in this discipline, which brought Gilles to the highest level of scientific knowledge. He played a key role in numerous studies which resulted in seminal, high caliber publications such as Cell, Neuron, J. Neuroscience.

As an experienced innovator, Gilles brought in at Ciba and then Novartis, approaches and technologies at the forefront of the knowledge: with his deep understanding of this domain since its origin, he was able to influence the debate making this approach indispensable for modern drug discovery. Furthermore, he also acquired such a detailed knowledge of the field (up-to the most detailed piece in the experiment), that he has kept a cold analysis and does not hesitate to recognize the limitations.



August 27th, 2014

Gilles Sansig's Recognition of Prior Experiential Learning Petition

To whom it may concern,

I am writing this letter in support of Gilles Sansig's petition for Recognition of Prior Experiential Learning. I have a PhD in Neuroscience and have been working within the field of neuronal development and neuroinflammation for 15 years, that has included several academic and pharma industry positions (University of Paris, Novartis, Merck Serono). Currently I am a Senior Scientist at EMD Serono based in Billerica, Massachusetts and have worked with this company for 4 years.

I have known Gilles Sansig since 2008 when he was working as a Scientist II in the Autoimmune, Transplantation and Inflammation Group (GIG) at Novartis. We closely collaborated on several novel research projects for developing relevant animal models of human diseases. In the drug discovery effort, it is imperative to test drug as they move from laboratory research discovery stage to clinical development phase. Gilles Sansig performed a key role in these drug stages, specifically in the area referred to as translational medicine, where animal models are utilized. During the time I was working with Gilles Sansig, he accomplished the de novo establishment of EAE (animal model of Multiple Sclerosis) not previously in place within the company. To succeed in such an effort requires collaborative, scientific and technical skills that are the distinctive of a truly scientific investigator. I consider Gilles Sansig such an individual.

More specifically, Gilles Sansig significantly contributed to elaborating the efficacy of fingolimod, a novel sphingosine-1 phosphate (S1P) receptor agonist that was subsequently approved as the first oral treatment for relapsing-remitting Multiple Sclerosis. Furthermore,

his rigorous scientific approach and his overflowing enthusiasm has pushed him to establish cross-functional collaboration within the company aiming to better understand pathological processes of multiple sclerosis with the ultimate goal of characterizing potential new therapeutic molecules. Using transgenic animal and the animal models he has developed, he identified potential new therapeutic targets. Throughout our collaboration period Gilles Sansig demonstrated a strong scientific understanding and the ability to design/execute complex studies to achieve novel findings and support the development of novel therapies that will benefit patients suffering from Multiple Sclerosis.

International recognition comes in several forms, Gilles Sansig's work gave rise to over 20 major publications in prestigious and in high rated scientific journals such as Cell, Neuron, Journal of Neuroscience and to numerous communications in national and international meetings and congresses.

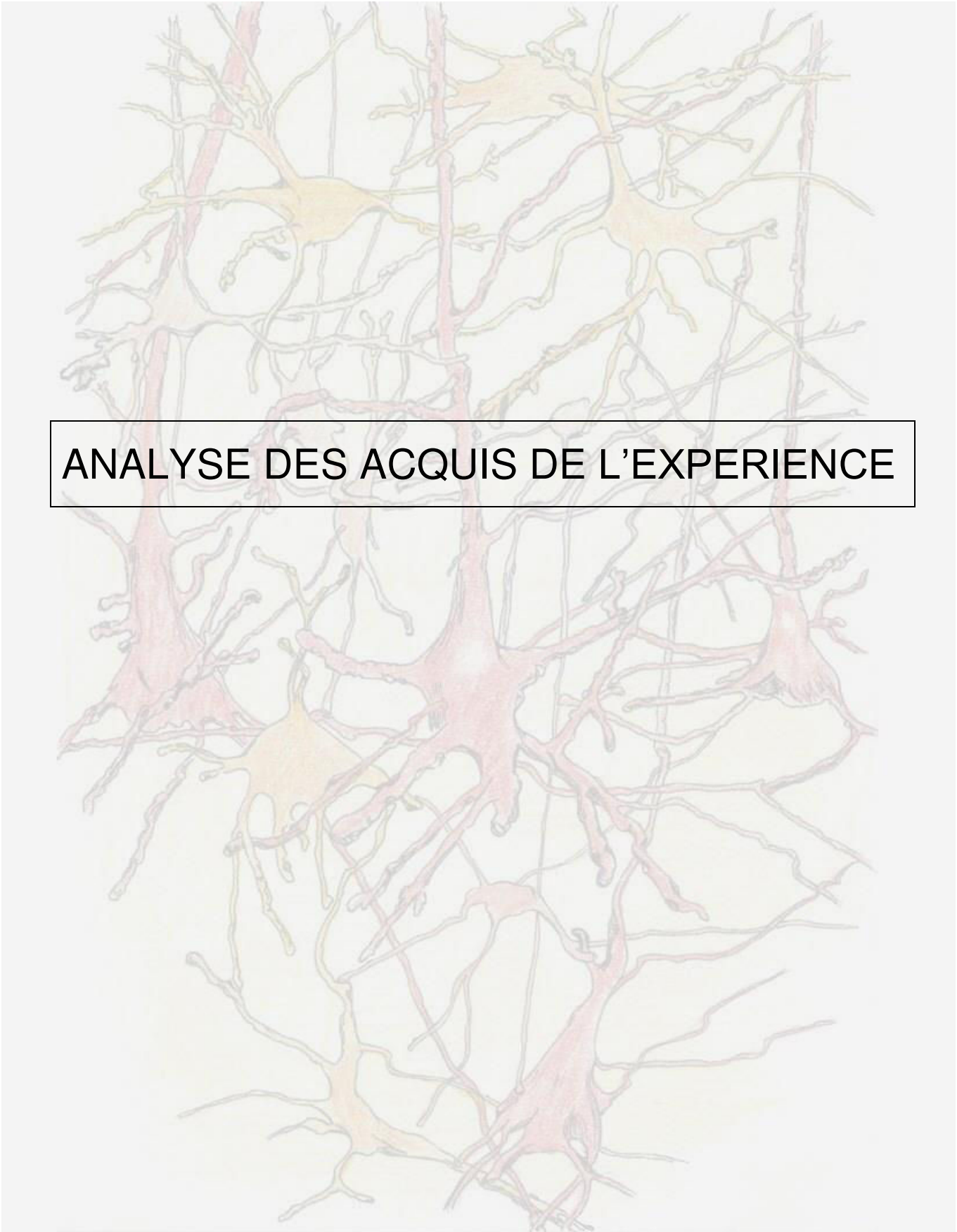
I have been impressed with Gilles Sansig's productivity and he has proved that he is an accomplished researcher whose efforts and expertise in the pharmaceutical industry are geared to benefit public health. It is my belief that Gilles Sansig is going to continue making valuable contributions to biomedical research through his passion, skills and scientific expertise. Based on the above reasons, I respectfully request your favourable consideration of Gilles Sansig's petition for Recognition of Prior Experiential Learning.

If you have further questions, please feel free to contact me.

Sincerely,



Frederic Bernard
Senior Scientist
Neurology eTip
EMD Serono | Global Research & Development
frederic.bernard@emdserono.com



ANALYSE DES ACQUIS DE L'EXPERIENCE

Sommaire

SOMMAIRE	41
I. PARCOURS, MOTIVATIONS.	43
II. PRÉSENTATION DES CONTEXTES D'ACQUISITION ET DE DÉVELOPPEMENT DE MON EXPÉRIENCE DE CHERCHEUR.....	48
A. NOVARTIS	48
B. LES INSTITUTS NOVARTIS POUR LA RECHERCHE BIOMÉDICALE (NIBR).....	50
III. ANALYSE DES ACQUIS DE MON EXPÉRIENCE DE CHERCHEUR.....	53
A. UNE EXPERTISE SCIENTIFIQUE PLURIDISCIPLINAIRE	53
1. <i>La mise en fonction du laboratoire de transgénèse.....</i>	53
2. <i>Des thymus hyperplasiés : L'analyse des premières souris transgéniques</i>	55
3. <i>Les cellules souches embryonnaires de la souris : la naissance d'une passion.....</i>	57
4. <i>La régulation de l'expression des gènes.....</i>	61
5. <i>L'étude du cerveau : de l'esprit aux molécules ou le contraire.</i>	65
i. Le changement de cap.....	65
ii. Le récepteur métabotrope au Glutamate de type 7	66
iii. Les récepteurs métabotropes GABA B.....	69
iv. L'Amygdale.	70
6. <i>Le retour à l'Immunologie, 15 ans plus tard.</i>	73
i. La sclérose en plaque.	73
ii. L'humanisation de souris transgénique	74
7. <i>Réguler les fonctions physiologiques naturelles.</i>	79
B. COMMUNIQUER, ENSEIGNER : UN MODE DE VIE.....	80
1. <i>Former des collaborateurs.</i>	80
2. <i>Enseigner.....</i>	81
3. <i>Communiquer.....</i>	82
IV. SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES.	83
V. BIBLIOGRAPHIE.....	86
SUJET DE RECHERCHE :	91

I. Parcours, motivations.

Tenter d'élucider les mécanismes intimes du fonctionnement du cerveau, c'est se confronter à l'un des problèmes scientifiques majeurs du XXI^e siècle et à l'un des plus grands enjeux de santé publique. Or le génie génétique permet de découvrir les principes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent la conscience. Ainsi, des souris transgéniques déficientes pour le récepteur métabotrope au glutamate 7 révèlent le rôle de cette molécule de signalisation membranaire exprimée à la surface des neurones dans la cognition et les émotions.

Les derniers indiens d'Amérique du Nord vivant de façons traditionnelles nous ont transmis que la nature est unité et interdépendances (Black Elk, Raymond J. DeMaillie, 1999). La biologie moléculaire est la preuve physique et scientifique de cette unité et l'épigénétique aujourd'hui souligne l'interdépendance de tous les êtres vivants. La vie, en tant que phénomène est apparue dans l'océan il y a 3,5 milliards d'années et du plus simple organisme unicellulaire à la complexité extrême du cerveau humain, les mêmes principes fondamentaux de régulation génétique qui conditionnent la physiologie cellulaire de l'organisme hôte sont parfaitement identiques. Cette remarquable unicité au sein des sciences biologiques a permis de mieux comprendre le fonctionnement des gènes, des cellules et des organismes. Grâce aux progrès majeurs en génétique, nous savons désormais comment la structure du gène détermine l'hérédité et comment la régulation des gènes détermine le développement et les fonctions physiologiques. Ces découvertes ont unifié plusieurs domaines auparavant indépendants de la biologie en une seule discipline cohérente. Les études autrefois séparées de biochimie, de génétique, de biologie cellulaire, de développement et de cancérologie se trouvent désormais rassemblées dans un même champ, la biologie moléculaire. L'unité de la biologie moléculaire a permis d'appréhender la continuité de la structure et de la fonction qui caractérise les cellules d'un organisme, une continuité qui existe dans tout le règne animal et cette perspective met également en lumière l'universalité fondamentale de la nature.

J'ai abordé la biologie moléculaire en 1987, en parfait novice j'assistais alors, au quotidien, à cette unification des différents domaines des sciences de la vie au sein de l'industrie pharmaceutique. Au moment où apparaissent dans quelques laboratoires spécialisés, non seulement les cellules embryonnaires souches de souris, mais également les

méthodes et les outils pour les manipuler génétiquement, je n'ai encore aucune expérience, mais en réussissant à générer des cellules souches génétiquement modifiées, j'ai appris un métier. Si dans un premier temps je conduis les expériences que mes mentors m'ont enseignées, rapidement je me suis essayé à les dessiner, à les réaliser seul et à les interpréter. Toujours dans le cadre d'un axe de recherche et une thématique fixée par mes directeurs, mais avec la liberté de répondre à une question précise plutôt qu'à une autre.

En caractérisant le phénotype d'une souris transgénique *knock-out*, issue de cellules souches que j'ai génétiquement modifiées avec un vecteur que j'ai personnellement dessiné et construit, j'ai participé à l'élucidation de la fonction du récepteur metabrotrape au glutamate de type 7 (mGluR7). Ainsi, ma thèse décrit le rôle fondamental de ce récepteur membranaire au cœur de processus complexes à l'interface des émotions et des fonctions cognitives. Il s'agit d'un moment particulier de mon long parcours scientifique. Cinq années particulièrement fécondes en résultats expérimentaux, mais surtout passionnantes par leurs aspects exploratoires. Une microscopique goutte d'eau dans un océan de savoir. Mais goutte après goutte, ces approches expérimentales issues de la biologie moléculaire ont rejoint celles des neurosciences et de la psychologie cognitive pour former aujourd'hui une synthèse qui se révèle fascinante. Les prémices d'une démonstration scientifique de ce don merveilleux qui fait de nous des êtres humains : la conscience.

L'ensemble de mon long parcours professionnel a eu lieu au sein d'une seule et unique entreprise. De plus, durant 20 ans, j'ai quasiment travaillé dans le même laboratoire, en suivant naturellement l'évolution d'une technologie issue du génie génétique, la transgénèse. En effet, de 1987 à 2007, le laboratoire d'abord fondé, puis dirigé par le Dr Herman Van der Putten, s'est concentré sur la production et l'analyse de souris transgéniques. Néanmoins, l'environnement institutionnel, concurrentiel et technologique en pleine mutation de l'industrie pharmaceutique a naturellement favorisé d'importants changements d'organisation. Ainsi des groupes d'intérêts ont été formés, redessinés, mutés, dissous au gré de projets prometteurs ou de choix stratégiques. Au cœur des années 80, les biotechnologies et plus particulièrement la biologie moléculaire étaient en plein essor dans l'industrie pharmaceutique, et sans véritablement réaliser tout ce qui se jouait alors autour de moi, je débute en 1987 comme technicien de laboratoire dans le département de

Biotechnologie de Ciba-Geigy. Ma première expérience consiste à isoler un fragment d'ADN à partir duquel, Herman va générer la première souris génétiquement modifiée pour l'entreprise Ciba, l'un des deux ancêtres de Novartis. En 1992, le département de Biotechnologie est dissous et entre-temps, mon statut au sein de l'entreprise a évolué. En effet, ma contribution significative à plusieurs découvertes et l'obtention d'un diplôme universitaire de niveau licence après trois années de formation, m'offrent la possibilité de travailler en tant que collaborateur scientifique.

Au tout début des années 90, l'utilisation de souris *knock-out* a gagné l'intérêt des neurosciences. Ainsi, mon laboratoire est intégré dans le département de neuroscience, car de récentes découvertes prouvent que des comportements complexes sont liés aux mutations spécifiquement induites dans le génome d'une souris (Silva, Paylor et al. 1992).

De plus, des expériences d'électrophysiologie permettent désormais de soutenir quantitativement, au niveau cellulaire sur des coupes issues du cerveau de telles souris, les observations des comportementalistes (Silva, Stevens et al. 1992).

Si ces travaux ouvrent d'immenses perspectives quant à la compréhension de la nature physique de la pensée, elles promettent également de révolutionner la recherche et la pratique médicale en neurologie et en psychiatrie. Pour l'industrie pharmaceutique, les souris transgéniques sont alors des modèles animaux pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Ainsi, je participe, jusqu'en 2004, à la génération et aux analyses de différentes souris *knock-out* dans le département de neuroscience, renommé après la création de Novartis, NIBR (Institut de recherche Bio médicale Novartis) neuroscience. J'ai été en charge de créer, mais aussi de maintenir plusieurs dizaines de lignées de souris transgénique afin de réaliser des études nécessitant un nombre important d'animaux. Je dessine et réalise les génotypages de toutes ces lignes et conduis des travaux d'exploration sur la génération de *knock-out* conditionnel et les vecteurs de transgénèses viraux.

À partir de 2004, je me consacre entièrement à la construction de vecteurs viraux puis à leurs injections dans le cerveau de souris transgéniques. Le but de ces expériences est de marquer spécifiquement différentes sous-populations de neurones dans le cerveau, et plus précisément dans l'amygdale de souris transgéniques afin de les caractériser d'abord, et de les manipuler ensuite. Ces souris sont en cours d'analyse lorsque le département de neuroscience est dissous en 2007. Novartis a en effet, décidé de ne plus poursuivre la

recherche de nouveaux médicaments dans le domaine de la psychiatrie et de concentrer son potentiel humain et technologique dans le domaine de l'immunologie. Je suis alors recruté par le directeur d'un groupe qui est en chargé de construire un modèle animal de la sclérose en plaque afin de tester de nouvelles thérapies. Ainsi en 2008, j'expérimente avec succès l'injection d'un peptide synthétique, le MOG, créant un modèle de sclérose en plaque dans la souris. L'année suivante, en 2009, le NIBR Biologique investit dans la construction d'une souris transgénique qui produirait des anticorps humains. Le Directeur de ce département me contacte et me fait une proposition intéressante, il s'agit de dessiner et de réaliser une stratégie qui permettrait à Novartis de produire des anticorps thérapeutiques dans la souris. Rejoint quelques mois plus tard par un chercheur expérimenté et une étudiante en doctorat, je vais travailler sur ce projet jusqu'en août 2014. En septembre 2014, j'ai l'opportunité de rejoindre le laboratoire du Dr Frederic Bassilana dans le NIBR DMP. Il s'agit d'une chance unique d'étudier à nouveau la physiologie, tout en utilisant les technologies les plus modernes issues du génie génétique.

À mes yeux, le métier de chercheur nécessite un véritable apprentissage au contact physique avec la matière. Cette idée s'est d'autant plus renforcée au fur et à mesure de mon expérience personnelle au sein de différents laboratoires de recherche. Au-delà des connaissances théoriques, il faut absolument utiliser ses mains, construire, bricoler.

Mon intérêt premier pour la biotechnologie, un domaine avant tout expérimental, technologique, vient de ce même ordre d'idée. L'ingénierie génétique m'a passionné, d'autant plus que j'ai vécu son installation au cœur de l'industrie pharmaceutique, participant activement à une démarche de pionnier. Pourtant, tout en travaillant, en gagnant de l'expérience et de l'autonomie, mon centre d'intérêt premier s'est déplacé, je ne voulais plus construire, modifier le génome pour lui faire produire une molécule d'intérêt thérapeutique, mais pour comprendre des processus physiologiques. L'immunologie d'abord, comment notre organisme organise sa défense et puis sont arrivées les neurosciences. Par la biologie moléculaire, j'ai eu accès au fonctionnement intime du sommet de l'évolution : le cerveau humain.

En 2004, les nombreux résultats expérimentaux obtenus sur les fonctions du récepteur métabotrope au glutamate de type 7 (mGluR7) à partir d'une souris transgénique que j'avais construite, auraient dû m'encourager à postuler pour une thèse de doctorat, mais je

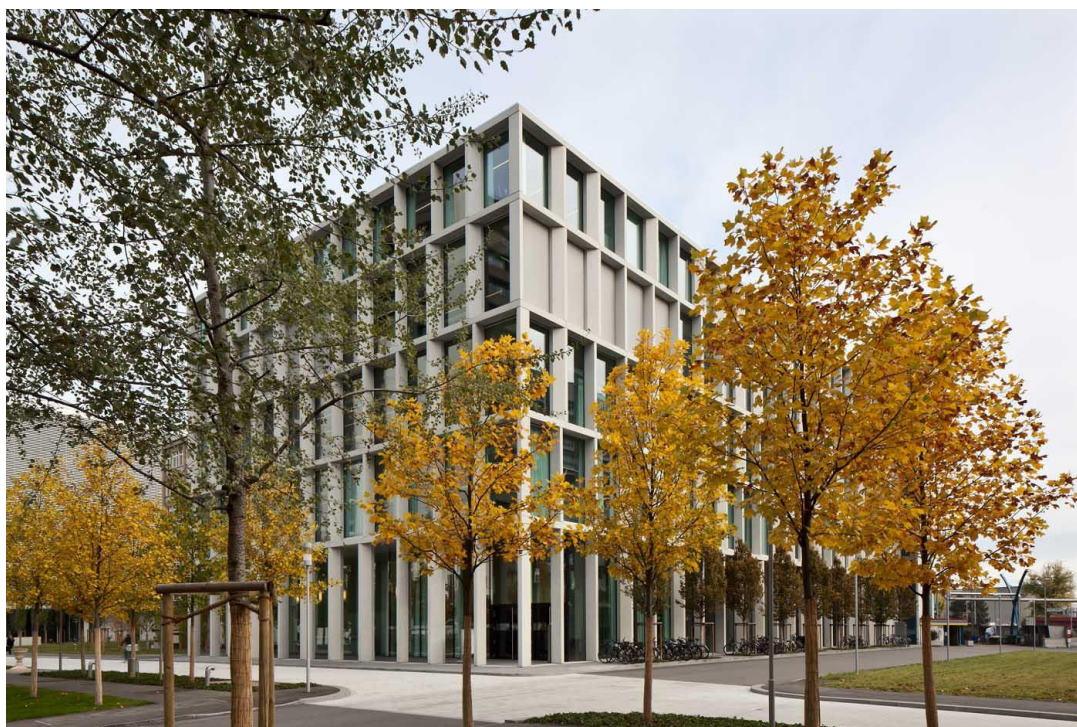
manquais à cette époque de recul. De plus, à la suite des résultats obtenus sur mes souris knock-out, les premiers agents pharmacologiques testés sur des souris de type sauvage ont démontré des résultats contradictoires quant à la fonction de mGluR7. Aujourd'hui, 10 ans plus tard, j'ai gagné en vécu. Le département de neurosciences dans lequel j'officialiais a été dissous. En travaillant depuis, sur des thématiques très différentes, j'ai élargi mon regard sur les sciences de la vie. J'ai pris aussi, je crois, la distance nécessaire avec mon récepteur au glutamate de prédilection pour interpréter, à la lumière des toutes dernières données expérimentales, le rôle clé de mGluR7 dans l'apprentissage, la mémoire et les émotions. De même, j'ai désormais un plaisir infini à présenter mes travaux et ceux de mes collègues, à donner des cours de biologie moléculaire et d'immunologie fondamentale au sein de l'entreprise et à l'Université de Bâle, dans le cadre de séminaires pour les étudiants en doctorat.

Ainsi l'obtention d'un doctorat en biologie me permettrait d'aller au bout d'un long chemin entrepris il y a déjà 29 ans. Ce diplôme serait une forme de certification de mes multiples activités de chercheur. Il sécurisera aussi mon parcours professionnel et donnera une plus grande légitimité à mon projet de développer mes activités d'enseignement à l'université.

II. Présentation des contextes d'acquisition et de développement de mon expérience de chercheur.

A. Novartis

Lorsque j'aperçois au travers des immenses baies vitrées du bâtiment *Chipperfiel*, le campus de Novartis, je suis, après bien des années, fasciné par ce site exceptionnel. Je l'ai vu naître, j'ai vu l'ancien complexe industriel de Sandoz se transformer en un exceptionnel cadre de travail. Un ensemble architectural unique dédié au bien-être et à la création. J'ai vu naître Novartis, fort de ma petite dizaine d'années d'expérience dans les laboratoires de Ciba-Geigy. J'ai vécu la mise en place de la structure actuelle, je connais son origine et les hommes qui l'ont menée et au cours de ces vingt dernières années, j'ai été au quotidien le témoin de toutes ses évolutions.



Novartis dont le siège social est à Bâle, en Suisse, est issue de la fusion, intervenue le 7 mars 1996, entre Sandoz SA et Ciba-Geigy SA, deux compagnies pharmaceutiques traditionnelles au riche passé, mais de culture d'entreprise complètement différente. La création de Novartis était, à cette époque, la plus grande fusion d'entreprises jamais réalisée au monde et Novartis est aujourd'hui un des trois leaders mondiaux dans l'offre de

médicaments destinés à préserver la santé, soigner les malades et améliorer le bien-être. Son objectif est de découvrir, de développer et de commercialiser avec succès des produits innovants pour soigner les patients, soulager la douleur et améliorer la qualité de vie.

La direction de Novartis est assurée par le Comité de direction de Novartis (ECN) sous la houlette de Joseph Jimenez chargé de la supervision des activités commerciales de Novartis. Les membres du Comité de direction sont désignés par le Conseil d'administration et c'est le Conseil d'administration de Novartis qui est responsable de la direction, de la stratégie, de l'organisation et de la gestion de l'entreprise. Novartis comprend six divisions dont la division pharmaceutique est le plus important contributeur, en réalisant un chiffre d'affaires net consolidé de 32,2 milliards d'USD en 2013, soit 56 % du chiffre d'affaires net du Groupe. La division pharmaceutique se compose de quelque quatre-vingt filiales qui employaient au total 65 262 collaborateurs équivalents plein temps au 31 décembre 2013 et vendent ses produits dans environ 155 pays.

Année après année, Novartis est l'un des laboratoires pharmaceutiques qui investit le plus dans la recherche et le développement, avec 22 % du chiffre d'affaires net mondial de la division Pharmaceutique consacré à ce domaine. Cet effort lui permet de disposer en catalogue d'un grand nombre de produits brevetés. Le portefeuille de Novartis comprend actuellement plus de 50 médicaments clés commercialisés, dont la plupart sont des leaders dans leurs domaines thérapeutiques respectifs tels que la clozapine (Clozaril) pour le traitement de la schizophrénie, le diclofenac (Voltaren) contre l'inflammation et la douleur, la cyclosporine (Neoral/Sandimmun), le plus célèbre immunosuppresseur, la carbamazépine (Tegretol) utilisée contre l'épilepsie et le letrozole (Femara) pour le traitement des cancers du sein, pour les plus connus. Pendant plus de dix ans, le Diovan contre l'hypertension a été le produit phare de Novartis, suivi du Glivec contre la leucémie. En outre, le portefeuille de projets en développement inclut 144 nouveaux produits potentiels, de nouvelles indications ou de nouvelles formulations pour des produits existants à différents stades de développement clinique. À partir de 2002, sur la demande de Daniel Vasella, le fondateur historique de Novartis, une nouvelle organisation succède aux traditionnels départements de recherche : les Instituts Novartis pour la Recherche Biomédicale (NIBR). Cette structure est l'œuvre de Mark Fishman, il est alors professeur en Médecine à l'Université d'Harvard et devient par ce fait le premier président de NIBR. Sa mission est de révolutionner la

recherche biomédicale de Novartis. Il impose immédiatement une philosophie personnelle qui se résume en une phrase : « Le focus doit être le patient, la science suivra ». Sa vision est claire et précise, il s'agit d'orienter la recherche de nouveaux médicaments sur les besoins du patient. Pour Mark Fishman, la découverte de nouveaux médicaments représente l'ultime frontière scientifique aux confins d'univers divers comme la chimie, la biologie et la médecine. C'est un lieu qu'il définit comme étant difficile d'y travailler, mais digne des esprits les plus inventifs. En effet, si jusqu'alors les médicaments étaient d'abord synthétisés au hasard puis reliés à une maladie, pour Marc Fishman, il s'agit au contraire de partir d'une pathologie donnée et de définir de potentielles cibles thérapeutiques afin d'y remédier.

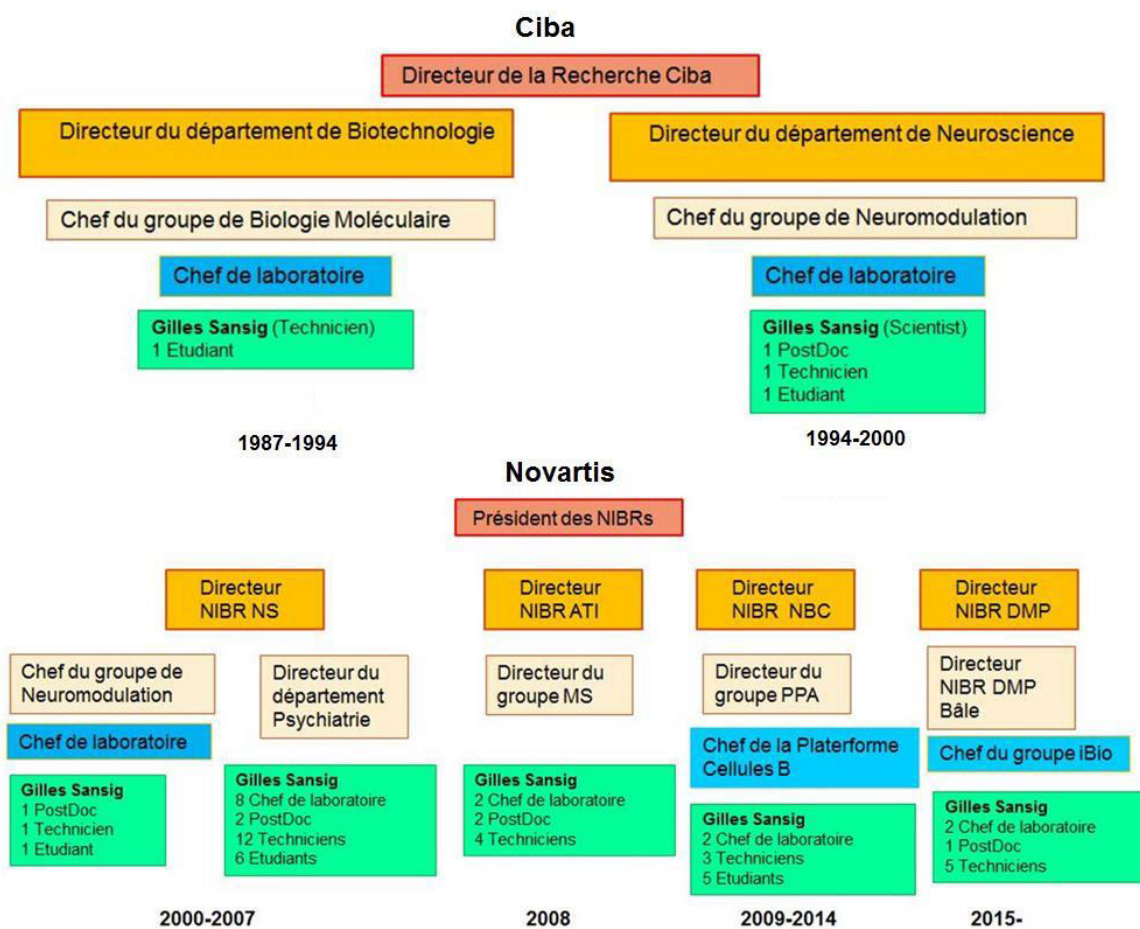
B. Les Instituts Novartis pour la Recherche Biomédicale (NIBR).

Les Instituts Novartis pour la Recherche Biomédicale (NIBR) sont répartis sur plusieurs sites à travers le monde, aux États-Unis d'Amérique (Cambridge, Emeryville, San Diego), en Asie (Shanghai et Singapour) et bien sûr à Bâle en Suisse. Ces instituts regroupent plus de 6 000 chercheurs et cliniciens qui œuvrent au quotidien afin d'approfondir les connaissances sur les mécanismes moléculaires à l'origine des maladies, trouver de nouvelles cibles médicamenteuses et être ainsi en mesure de découvrir des traitements innovants répondant à des besoins médicaux non satisfaits. Huit instituts sont dédiés à des aires thérapeutiques telles que les maladies auto-immunes, transplantation et inflammation (ATI), les maladies cardiovasculaires et métaboliques (CVM), les maladies infectieuses (ID), les maladies de l'appareil locomoteur (MSD), les maladies neurodégénératives et psychiatriques (NS), le cancer (ONC), les maladies ophtalmologiques (OPH) ainsi que les maladies respiratoires (RD). Neuf autres instituts sont des plateformes technologiques comme les sciences analytiques et de l'imagerie (ASI), la biotechnologie (NBC), la chimie protéomique (CPC), les voies de signalisation cellulaire (DMP), la pharmacocinétique (DMPK), le métabolisme des médicaments (MAP), la chimie (GDC), l'unité de découverte de nouvelle indication (NIDU) et la sécurité pré clinique (PCS). Auxquels s'ajoutent quatre instituts de recherche fondamentale, plus académiques et plus orientés sur la formation de jeunes chercheurs : The Novartis Institute for Tropical Diseases (NITD) de Singapour, The Novartis Vaccines Institute for Global Health (NVGH) de Sienne en Italie, The Genomics Institute of the Novartis Research Foundation (GNF) de San Diego en Californie et le Friedrich Miescher Institute for

Biomedical Research (FMI) de Bâle en Suisse. L'ensemble de ces Instituts Novartis pour la Recherche Biomédicale (NIBR) travaille dans un réseau aux multiples nœuds d'intersections, autant technologiques que scientifiques, bien que financièrement et structurellement indépendants les uns des autres. Novartis favorise ainsi un environnement de travail motivant, avec une forte émulation professionnelle, des valeurs de respect et d'ouverture. Notre culture d'entreprise est fondée sur l'excellence : la valeur de l'investissement et des contributions personnelles est reconnue, les possibilités de développement sont encouragées et réelles. Dès la création de Novartis, j'ai été employé par le NIBR Neuroscience. Celui-ci a été mis en place sur les fondations des anciens départements de neuroscience des entreprises Sandoz et Ciba-Geigy. Ainsi, j'ai continué à poursuivre mes travaux qui avaient leurs sources dans l'un des deux ancêtres de Novartis. Lorsqu'en 2007, pour des raisons stratégiques, l'ensemble des activités de cet institut a été arrêté, j'ai été recruté par le NIBR maladies auto-immunes, Transplantation et Inflammation (ATI) créé au même moment avant de rejoindre le NIBR biologiques puis le NIBR DMP.

J'ai ainsi connu quatre différents instituts avec chacun leur organisation propre, leurs objectifs et leurs projets spécifiques. L'unité de base de ces différentes organisations de groupe de recherche reste pourtant toujours le laboratoire. Constitué d'un chef de laboratoire et d'un ou plusieurs associés permanents ainsi qu'un ou plusieurs stagiaires, étudiants en doctorat ou stagiaires postdoctoraux. Cette structure maîtrise le plus souvent une voire plusieurs technologies et s'associe au gré des projets à d'autres laboratoires pour former des groupes d'intérêt toujours plus grands.

Mes différents postes chez Ciba et Novartis :



Abréviations

NIBR : Institut pour la Recherche Biomédicale de Novartis

NS : Neurosciences

ATI : Auto-immunité Transplantation et Inflammation

NBC : Biotechnologies

DMP : Voies de signalisations développementales,

MS : Sclérose en plaque

PPA : Production de protéines et d'anticorps

iBio : Biologie innovatrice.

III. Analyse des acquis de mon expérience de chercheur.

A. Une expertise scientifique pluridisciplinaire

1. La mise en fonction du laboratoire de transgénèse.

Au cœur des années 80, sous l'impulsion d'un microbiologiste visionnaire, le professeur Jakob Nüesch, l'entreprise pharmaceutique suisse Ciba-Geigy décide d'investir dans le domaine, alors en plein essor, des biotechnologies et construit sur son site principal de Bâle, un institut uniquement dédié à ces technologies. Ce bâtiment, le K-681, spécifiquement construit pour la recherche et le développement de molécules thérapeutiques d'origine biologique est alors le cadre d'une intense activité de recherche qui va complètement transformer les stratégies visant à découvrir de nouveaux médicaments. Sous-jacent aux biotechnologies, le projet de cet institut est de développer et d'utiliser le génie génétique (ou ingénierie génétique), un ensemble de techniques, ayant pour objet l'utilisation des connaissances acquises en génétique pour utiliser, reproduire, ou modifier le génome des êtres vivants. Depuis sa naissance, dix ans plus tôt, le génie génétique s'est en effet, imposé comme une technique indispensable dans tous les secteurs de la recherche en biologie. Ainsi, à partir de 1986, Ciba-Geigy imagine grâce au génie génétique et à l'utilisation de fermenteurs à l'échelle industrielle, la production de substances rares ou difficiles à extraire de leur organisme d'origine. Le projet phare étant la production d'un antithrombotique, l'hirudine, une petite protéine aux propriétés anticoagulantes sécrétée naturellement par les glandes salivaires des sangsues.

C'est dans ce cadre particulier, que je suis recruté en septembre 1987, par le directeur du département de biologie moléculaire, le Dr Hans Hofstetter pour assister un jeune chercheur, recruté quelques mois auparavant, le Dr Herman van der Putten qui est chargé de mettre en place la technologie de production de souris transgéniques. La micro-injection d'un ADN étranger dans l'œuf fécondé d'une souris est une technique naturellement assez délicate et en 1987, très peu de laboratoires de par le monde la maîtrisent (Palmiter, Brinster et al. 1982). De plus, les connaissances au niveau de l'expression d'un gène étranger dans le génome d'une souris étaient encore très restreintes. Le projet était ambitieux,

d'autant plus qu'il fallait tout installer, acheter du matériel et organiser un laboratoire pour qu'il soit immédiatement opérationnel. Ma première expérience de biologie moléculaire a consisté à préparer l'ADN qui allait être micro-injecté dans le noyau des œufs fécondés de souris. À cette époque lointaine, les kits commerciaux n'existaient pas encore et toutes les étapes clés de cette procédure étaient sujettes à investigation. De la préparation de bactéries compétentes pour y produire en grande quantité le vecteur génétique qui contenait l'ADN à injecter, jusqu'à l'isolement à proprement dit de cet ADN par séparation sur un gel d'agarose puis par dialyse.

Ainsi, j'ai purifié sur un gel d'agarose un fragment d'ADN contenant le gène de l'antigène T du virus SV40 placé en amont du promoteur du gène de la somatolibérine humaine (GRF), une construction génétique qu'avait générée Herman à l'Institut Salk de San Diego avant de rejoindre Ciba-Geigy. Il a injecté cet ADN dans le noyau d'œufs fécondés de souris qu'il a réimplanté dans quatre mères porteuses et j'ai moi-même développé l'autoradiographie qui a démontré la présence du transgène dans le génome de 2 souris transgéniques sur 12 naissances. Ce *Southern blot* fut mon premier d'une très longue liste. Tout comme mon premier *Northern blot*, quelques semaines plus tard, qui a démontré l'expression du transgène dans une des deux souris transgéniques. L'isolement, la séparation d'ARN par électrophorèse sur gel dénaturant, puis le transfert sur membrane de cellulose avaient alors une certaine aura. Il s'agissait d'expériences délicates, car l'ARN messager contrairement à l'ADN ou aux protéines est naturellement beaucoup plus exposé aux possibles dégradations inhérentes au procédé d'extraction. En réussissant la préparation de l'ADN étranger et en démontrant non seulement son intégration dans le génome d'une souris transgénique, mais également son expression sous forme d'ARN messager, je gagnais mon statut de technicien sous la forme de mon premier contrat à durée indéterminée. Cette expérience initiale, la génération de la première souris transgénique pour Ciba-Geigy peut être considérée comme l'acte fondateur du laboratoire dans lequel je vais travailler durant 20 ans. En participant à sa création, j'ai eu l'opportunité d'organiser un laboratoire, de le rendre fonctionnel tout en intégrant les techniques de base sous-jacentes à la manipulation de l'ADN.

2. Des thymus hyperplasiés : L'analyse des premières souris transgéniques

Les premières souris transgéniques obtenues dans le laboratoire d'Herman Van der Putten présentaient un phénotype d'ordre immunologique et c'est donc naturellement, que mes projets de recherche initiaux s'orientèrent vers cette discipline. En effet, l'expression de l'antigène large T d'origine virale dans un sous-groupe particulier de cellules épithéliales du thymus de souris transgéniques provoquait une hyperplasie du thymus. Les récentes découvertes sur le développement des lymphocytes T et leurs interactions avec les cellules épithéliales du thymus par nos voisins de l'Institut d'Immunologie de Bâle (Bluthmann, Kisielow et al. 1988, Kisielow, Teh et al. 1988, von Boehmer 1992) avaient, à la fin des années 80, créé une dynamique particulière dans ce domaine précis de l'immunologie. Ainsi en identifiant et en caractérisant, par des expériences d'immunohistochimie et d'hybridation *in situ*, un sous-groupe particulier de cellules épithéliales transformées par l'oncogène viral large T, nous étions au cœur du débat (Moll, Eibel et al. 1992). D'autant plus que j'ai réussi à dériver à partir de thymus issus de nos souris transgéniques, ces cellules épithéliales devenues immortelles en culture. Ce qui m'a permis de démontrer que ces cellules, que nous avons alors dénommées Epi-A1, exprimaient un certain nombre de gènes tels que l'interleukine 7 (IL-7), l'interleukine 6 (IL-6), le facteur de stimulation des macrophages (MCSF) et le facteur de transformation beta 3 (TGF-β3), importants pour le développement des thymocytes.

Cette caractérisation des ARN messagers issus des cellules Epi-A1 par Northern Blot, m'a également permis de découvrir que ces cellules exprimaient le récepteur de l'interleukine 4 (IL-4) et le ligand de c-kit (KL), deux facteurs qui conditionnent avec d'autres molécules la différenciation des progéniteurs des cellules hématopoïétiques. De plus, en stimulant les cellules Epi-A1 avec IL-4, je réussissais à montrer qu'en réponse au traitement par IL-4, l'expression du ligand de c-kit était considérablement augmentée, contribuant ainsi significativement à mes deux premières publications scientifiques (Moll, Eibel et al. 1992, Moll, Eibel et al. 1992). J'ai également utilisé ces résultats pour la rédaction de mon rapport de stage afin d'obtenir le Certificat d'Université de Biotechnologie de l'Université de Rennes I (Sansig G. 1990), une formation à distance sur 3 ans, diplômante qui correspond à une licence. Parallèlement à ces travaux de caractérisation de notre première souris

transgénique, avec mon collègue Juergen Moll, alors étudiant en doctorat dans notre laboratoire, nous avons réussi fortuitement à isoler l'oncogène murin Rac1, homologue du gène Rac1 humain. À l'origine, nous avons construit une librairie d'ADN complémentaire dans le bactériophage lambda à partir d'ARN de thymus de souris afin d'isoler le gène de la Thymosine alpha, mais en utilisant une sonde d'oligonucléotide dérivée de l'ARN messager de la Thymosine de bovin, nous avons isolé le gène de souris Rac1. Pendant que Juergen séquençait cet ADN complémentaire, j'étudiais en réalisant de nombreux *Northern Blots*, la distribution tissulaire du gène de Rac1 dans la souris. Démontrant ainsi l'abondance d'ARN messager dans le thymus et la rate ainsi que dans différentes lignées cellulaires d'origine hématopoïétique dont les cellules T et B. De plus, en perturbant le cytosquelette de cellules rénales LLC-PK de porc avec de la Cytochalasine B, j'ai réussi à réguler à la baisse l'ARN messager de RAC1, en accord avec les spéculations d'alors, quant au rôle de Rac1 dans l'exocytose (Moll, Sansig et al. 1991).

À la même époque, le Dr Peter Schmid, pionnier dans une technique fondamentale de la biologie moléculaire alors en plein développement, l'hybridation *in situ*, rejoignait le département de Biotechnologie dans un laboratoire voisin. Sous sa tutelle, j'ai appris et conduit des expériences d'hybridation *in situ* sur des embryons de souris. Démontrant que le gène de la *prothymosine alpha*, une protéine décrite comme exerçant une fonction dans la différenciation et la maturation des lymphocytes T est exprimé durant le développement dans les mêmes tissus que le proto-oncogène myc (Moll, Schmid et al. 1996). L'ensemble de ces résultats a été obtenu durant mes trois premières années dans le laboratoire du Dr Herman Van der Putten. J'analyse cette période comme celle de l'apprentissage de la réalité d'un laboratoire. J'étais un novice absolu, c'était mes premières expériences de biologie moléculaire, mais en participant au développement des techniques de transgénèse et en évoluant au cœur des avancées scientifiques dans le domaine particulier des lymphocytes T, je me constituais un savoir-faire pratique et théorique qui allait me permettre d'être rapidement autonome sur une problématique scientifique donnée. En effet, Herman m'a non seulement appris à manipuler correctement, mais également à penser.

Avec le recul, je réalise d'autant plus, l'importance de tous ces cours particuliers, qu'il m'offrait gracieusement des heures durant. Patient, appuyé contre la paillasse, il m'expliquait, sur un bout de papier, toutes les théories alors en cours en biologie cellulaire

et en immunologie. Si ces premières années sont pour moi synonymes d'apprentissage, j'ai eu également la chance d'encadrer notre première étudiante du laboratoire. De plus, en obtenant de solides résultats grâce aux *Northern Blot*, j'ai rapidement acquis un statut d'expert en ARN. Ainsi des chercheurs bien plus expérimentés, issus d'autres départements de recherche de l'entreprise, passaient quelques jours avec moi au sein de notre laboratoire pour apprendre la préparation, le transfert et l'hybridation d'ARN messagers. Transmettre le savoir est un aspect du travail de chercheur que j'ai toujours considéré comme très important et j'ai eu depuis d'innombrables satisfactions à enseigner l'art et la manière des manipulations génétiques.

3. Les cellules souches embryonnaires de la souris : la naissance d'une passion.

À partir de 1988, Herman m'offre un inestimable cadeau, il me permet d'établir au sein de notre laboratoire, la manipulation des cellules embryonnaires souches de souris. En effet, deux ans plus tôt, en 1986, Mario Capecchi, Oliver Smithies et Martin Evans (prix Nobel de médecine et physiologie en 2007), réussissaient par mutagenèse dirigée, on parlait alors de « recombinaison homologe » dans les cellules embryonnaires souches de souris, à détruire spécifiquement un gène dans le génome d'une souris (Thomas and Capecchi 1986, Thomas, Folger et al. 1986).

Aujourd'hui, la manipulation de cellules souches embryonnaires (ES) de souris est une technique standard, mais à l'aube des années 90, ce procédé était loin d'être établi et j'ai eu le bonheur unique au sein de Ciba-Geigy, de le développer, m'assurant ainsi non seulement une promotion hiérarchique en passant de technicien de laboratoire à chercheur, mais aussi d'obtenir une certaine reconnaissance de mes pairs dans le domaine. En effet, en réussissant à générer les toutes premières souris *knock-out* dès 1989 (Stief, Texido et al. 1994), j'entrais dans le petit cercle d'initiés des généticiens de la souris, et rencontrais ainsi dans les différents congrès de ces années-là, tous les scientifiques de renom qui jusqu'alors me faisaient rêver.

J'éprouve aujourd'hui une véritable nostalgie de ces toutes premières expériences de biologie cellulaire, de ce laborieux travail de défrichage où il s'agissait de mettre au point tous les paramètres sous-jacents à la génération d'une souris *knock-out*. Isolées à partir de

blastocyste, plusieurs types de cellules souches embryonnaires de souris (cellule ES) étaient alors en circulation de par le monde, les cellules ES dites CCE développée par Elisabeth Robertson (Kuehn, Bradley et al. 1987) de l'Université d'Oxford, les cellules ES dites D3 caractérisé par Tom Doetschman dans le laboratoire de Rolf Kemler à l'institut Max Plant de Freiburg (Doetschman, Gregg et al. 1987) et les cellules ES E14 découvertes par Martin Hooper à l'Université d'Edinburgh (Hooper, Hardy et al. 1987).

J'ai eu l'occasion de travailler avec les trois souches initiales de cellules ES, mais c'est avec les cellules E-14 que nous a gracieusement offert le Dr Andrée Dierich (Lufkin, Dierich et al. 1991) du laboratoire du Pr Pierre Chambon de l'Université de Strasbourg, que j'ai pu obtenir le premier véritable succès scientifique : des souris *knock-out* pour le récepteur de faible affinité (CD23) à l'immunoglobuline E (IgE) (Stief, Texido et al. 1994).

Les connaissances sur le CD23 ont progressé considérablement depuis quelques années. Cette molécule, sous forme de protéine membranaire ou de fragments solubles circulants, présente des activités biologiques multiples, spécifiques des types cellulaires qui l'expriment : prolifération des lymphocytes B, présentation de l'antigène, défense antiparasitaire, différenciation de certains précurseurs hématopoïétiques et régulation de la synthèse des IgE (Bonney, Lecoanet-Henchoz et al. 1997). Mais en 1988, les fonctions de ce récepteur étaient uniquement spéculatives. Il se trouve que le gène de CD23 venait d'être cloné par nos collègues du département de biologie moléculaire (Ludin, Hofstetter et al. 1987) et que Ciba-Geigy était alors très intéressé par son possible rôle dans la modulation des IgE et l'allergie (de Weck, Stadler et al. 1985). Ainsi, avec le Dr Aribert Stief, qui venait de débiter dans notre laboratoire son stage post doctoral, j'ai dessiné puis construit le vecteur nécessaire à l'inactivation du gène de CD23 par recombinaison homologue. J'ai conduit seul la transfection, la sélection et les analyses des cellules souches ainsi obtenues, établissant un solide protocole expérimental qui a conduit à la génération de la souris finale.

En parallèle, Gemma Texido, étudiante en doctorat dans le laboratoire de Hans Hofstetter a généré des souris transgéniques qui exprimaient une forme soluble et forme membranaire de CD23 dans les lymphocytes T et B. Réunies, ces deux lignées de souris transgéniques nous ont permis de démontrer la fonction de CD23 dans la production d'anticorps (Stief, Texido et al. 1994, Texido, Eibel et al. 1994). Si en 1989, la génération d'une souris *knock-out* pour CD23 fut mon premier succès expérimental à titre personnel, ce succès en a appelé d'autres,

et très vite, je me suis retrouvé au centre de plusieurs collaborations. En effet, à cette époque, très peu de chercheurs avaient conduit ce type d'expérience et de ce fait, bien avant que mes résultats soient publiés, mon nom commençait à circuler dans les laboratoires de génétique des alentours. Ainsi, pour le directeur de l'Institut Frederic Miescher (FMI), j'ai travaillé sur la génération d'une souris déficiente pour une protéase extracellulaire, la Nexin 1. Parallèlement, l'une de ses étudiantes en doctorat, générait des souris transgéniques, dans le cerveau desquelles, la production de Nexin 1 était considérablement augmentée. Ces deux lignées distinctes de souris transgéniques présentaient des épisodes épileptiques et de nombreuses expériences d'électrophysiologie conduites par un laboratoire spécialisé dans ce domaine, démontraient que cette protéase modulait la potentialisation à long terme (ou PLT), un processus de renforcement synaptique étudié pour son rôle probable dans plusieurs types de mémoire (Mansuy, van der Putten et al. 1993, Luthi, Van der Putten et al. 1997).

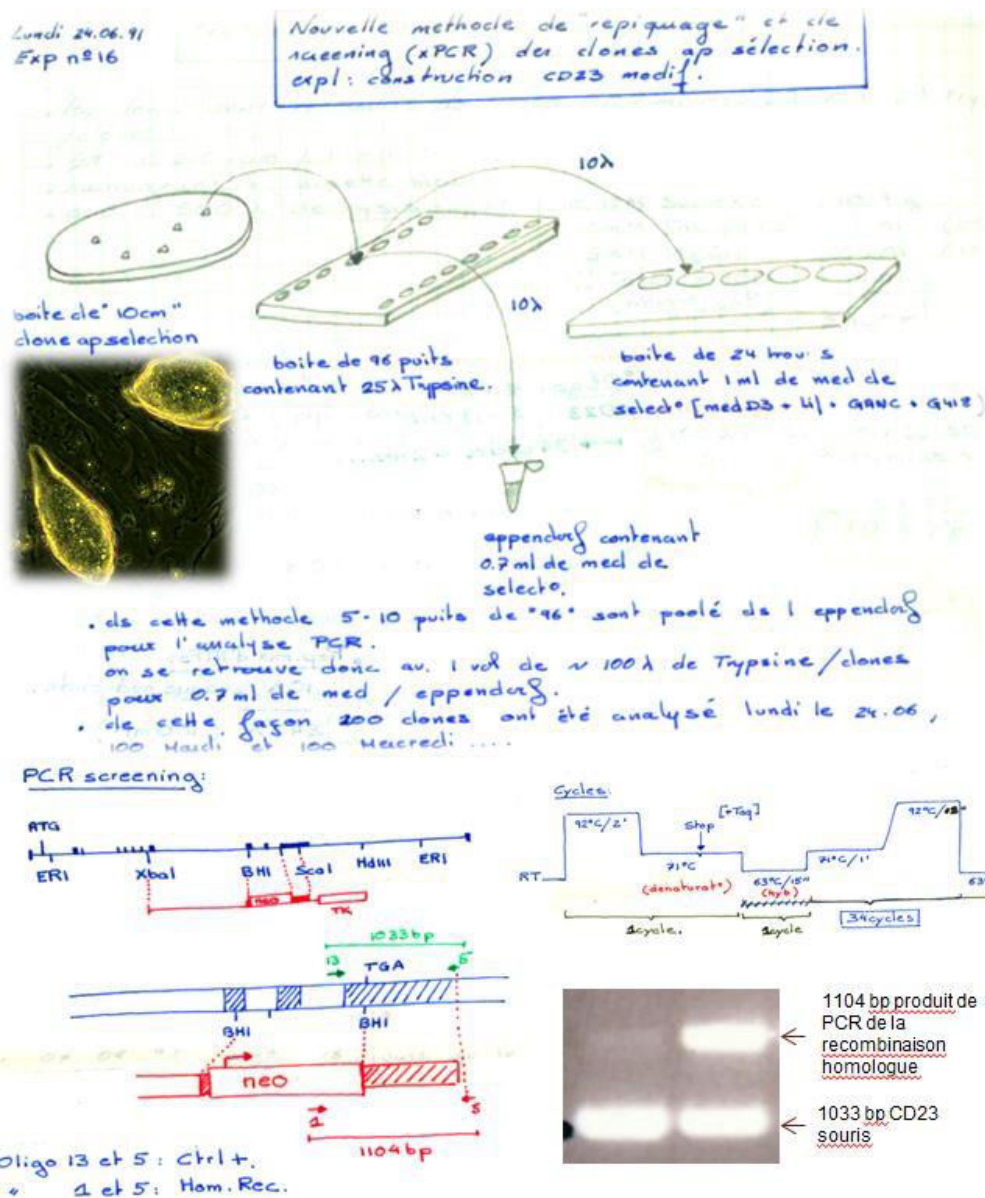


Figure 1 : Extrait de mon cahier de laboratoire, le premier protocole de PCR appliqué au screening de cellules ES de souris *knock-out* pour le gène de CD23. En haut, représentation schématique de l'isolation et du passage de clones de cellules ES. En bas à droite, représentation du vecteur de ciblage du gène de souris CD23 (rouge) et sa position dans le génome (bleue), ainsi que de la stratégie de PCRs avec la position relative des amorces sens et anti-sens. À gauche, les cycles de PCRs et les bandes (fragments d'ADN) obtenues sur gel d'agarose.

J'étais fasciné, ces souris transgéniques mutantes étaient devenues la source de bien des investigations exaltantes sur une pathologie humaine, l'épilepsie, mais elles m'offraient aussi une fenêtre personnelle pour étudier les processus cellulaires et moléculaires sous-jacents à la mémoire, l'apprentissage et la conscience. Ainsi entre 1990 et 1994, en assistant en direct,

au fur et à mesure des expériences réalisées sur les souris *knock-out* pour la Nexin, je me formais aux théories en cours dans les neurosciences. Un chercheur de l'Institut Frédéric Miescher imaginait à peu près à la même époque, élucider la fonction d'une protéine appelée protéine LIM du muscle (MLP), spécifique des cellules différenciées des muscles squelettiques. Son étudiante en doctorat d'alors avait dessiné avec mon aide et construit seule un vecteur afin d'inactiver le gène MLP. Je lui ai généré des cellules souches de souris à partir desquels une souris MLP déficiente a été créée (Arber, Hunter et al. 1997).

Il s'agissait là de la première souris *knock-out* d'une très longue série. En effet, cette expérience marque le tout début de la construction d'une plateforme de transgénèse dirigée d'abord par le Dr Florence Botteri, puis reprise quelques années plus tard par Jean-François Spetz au sein de l'Institut Friedrich Miescher à Bâle. Ainsi, après la génération successive de plusieurs souris *knock-out*, j'avais la charge de transférer cette technologie de notre laboratoire vers cet institut de recherche fondamentale financé par Ciba-Geigy puis par Novartis et aujourd'hui encore, toutes les souris génétiquement modifiées issues du FMI proviennent des cellules embryonnaires souches de souris (E14) que j'avais personnellement cultivées avec un protocole que j'avais mis au point seul.

4. La régulation de l'expression des gènes.

À l'aube des années 90, même si tous les problèmes ne sont pas encore résolus de manière totalement satisfaisante, les laboratoires de biologie moléculaire qui travaillent sur les techniques de transgénèse ont appris à faire pénétrer un gène nouveau dans le patrimoine génétique d'un organisme supérieur. Les gènes que l'on cherche à injecter chez les souris consistent en des molécules d'ADN contenant l'information nécessaire à la synthèse d'une protéine (enzyme, hormone, etc.) jugée intéressante pour des raisons scientifiques, voire même économiques. La méthode la plus couramment utilisée pour intégrer l'ADN étranger dans le génome des souris transgéniques est fondée sur la micro-injection et elle présente plusieurs inconvénients. Ainsi on ne peut savoir à l'avance le nombre de copies d'un gène donné qui vont s'insérer dans le patrimoine génétique de l'animal traité. Ce nombre varie couramment de zéro à cinquante par cellule. L'insertion de ces copies semble se faire au hasard, ce qui a parfois pour effet d'inactiver certains gènes de la cellule hôte et de provoquer des anomalies morphologiques plus ou moins graves. Les

gènes introduits s'expriment-ils convenablement ? C'était alors une question évidemment importante, car de ce fonctionnement dépend l'expression d'un caractère nouveau chez la souris traitée et mes propres expériences sur les souris transgéniques générées au sein du laboratoire suggéraient que le taux de fonctionnement du gène étranger est totalement imprévisible. Cette limite scientifique m'interrogeait particulièrement, lorsqu'une publication m'a suggéré une issue possible (Stief, Winter et al. 1989). Il semblait que des séquences d'ADN, appelés MAR pour régions qui s'attachent à la matrice du noyau cellulaire, identifiées aux extrémités lointaines du gène du lysozyme de poulet avaient le pouvoir de rendre l'expression d'un transgène indépendante de son site d'intégration, ainsi que du nombre de copies insérées dans le génome hôte. J'ai donc redessiné puis construit à partir des deux vecteurs de transgénèse qui avaient démontré des résultats pour notre laboratoire, GRF-SV40/T et Thy1-CD23, des constructions génétiques qui contenaient également à leurs extrémités des séquences MAR. Des souris transgéniques ont été générées à partir de ces constructions. Elles avaient intégré le transgène et l'exprimaient pour certaines, mais aucune différence significative dans cette expression ne les distinguait des souris transgéniques précédemment générées avec ces mêmes vecteurs sans les séquences MAR. Quelques années plus tard, les avancées scientifiques démontraient que ma tentative n'était pas totalement insensée, il manquait simplement quelques pierres à l'édifice (Bonifer, Huber et al. 1996). En effet, pour que l'expression d'un transgène soit indépendante de son site d'intégration et pour que cette expression ne soit pas limitée par le nombre de copies du gène étranger inséré dans le génome de l'hôte, tous les éléments de régulations du gène donné doivent être présents. Autrement dit, pour une expression transgénique satisfaisante, il s'agirait, ni plus ni moins, de transférer un *locus complet*, c'est-à-dire non seulement sa partie transcrite en ARN, mais également les séquences régulatrices de sa transcription.

Or, les *locus* complets de certains gènes eucaryotes dépassent les méga bases d'où des limites technologiques évidentes quant à la manipulation et au transfert de telles portions d'ADN. À partir de 1988 (Cooke and Cross 1988), apparaît dans la littérature scientifique un outil issu de la génétique de la levure qui semble avoir les propriétés nécessaires à la manipulation et au transfert de portions de génome complet. Ces chromosomes artificiels de levure (YAC) me semblent alors être l'avenir de la transgénèse. Ainsi, j'arrive à convaincre, non sans mal, Herman, de me laisser travailler quelque 10 mois dans un laboratoire voisin

afin de me familiariser avec la génétique de la levure. L'idée bien sûr est de construire des YAC pour les transférer ensuite dans mes cellules souches, elles-mêmes insérées dans l'embryon d'une souris et de démontrer la faisabilité de la procédure.

Ainsi à partir de février 1994, je travaille avec des généticiens de la levure, sur un projet qui vise à introduire des *locus* génétiques humains d'intérêt dans des YAC. Deux collègues isolent et analysent dans la levure, les régions génétiques des interleukines humaines. Pour ma part, je travaille sur le gène humain du facteur neurotrophique issu du cerveau (BDNF). Le BDNF fut le second facteur neurotrophique qui fut caractérisé après le facteur de croissance des nerfs (NGF). Le BDNF agit sur certains neurones du système nerveux central et du système nerveux périphérique. Il est impliqué dans la survie des neurones existants (Barde 1990). Il encourage la croissance et la différenciation de nouveaux neurones et des synapses. Avec le recul, le fait de pouvoir travailler sur le gène de BDNF et de pouvoir identifier et caractériser les régions régulatrices de ce dernier fut une grande chance pour l'avenir. En effet, parallèlement aux travaux pratiques, complexes et laborieux, je me suis construit de solides connaissances scientifiques sur les facteurs neurotrophiques alors très en vue pour leur potentiel thérapeutique en neuroscience (Schatzl 1995). Durant ces dix mois, je vais non seulement construire une carte des régions régulatrices humaines du gène BDNF, mais sur le support physique que constitue un chromosome artificiel de levure, je vais recombinaisonner de façon homologue un marqueur (la luciférase) en lieu et place de la région codante du gène BDNF. Ce travail va être l'objet d'un rapport qui me permettra d'obtenir un Master en Biologie Moléculaire à l'université de Bâle (Sansig, 1995). Un travail que les professeurs Josef Pfeilschifter et Peter Philipsen du Biozentrum de l'université de Bâle patronneront en octobre 1995. Après mon travail de Master, je réussis à fusionner des levures contenant un YAC qu'un de mes collègues a génétiquement modifié avec des cellules ES de souris. Ce travail n'intéresse plus à ce moment précis nos laboratoires respectifs qui sont passés à d'autres projets, mais pour nous, c'est l'aboutissement d'une expérience extrêmement complexe et la démonstration que le transfert d'immenses régions du génome d'un organisme à un autre est possible. Ces travaux sont alors abandonnés et je m'attèle à d'autres tâches. Néanmoins, l'expérience acquise sur la manipulation des YAC et leur utilisation en transgénèse va me permettre 13 ans plus tard de revenir dans un autre contexte à ce type de travaux.

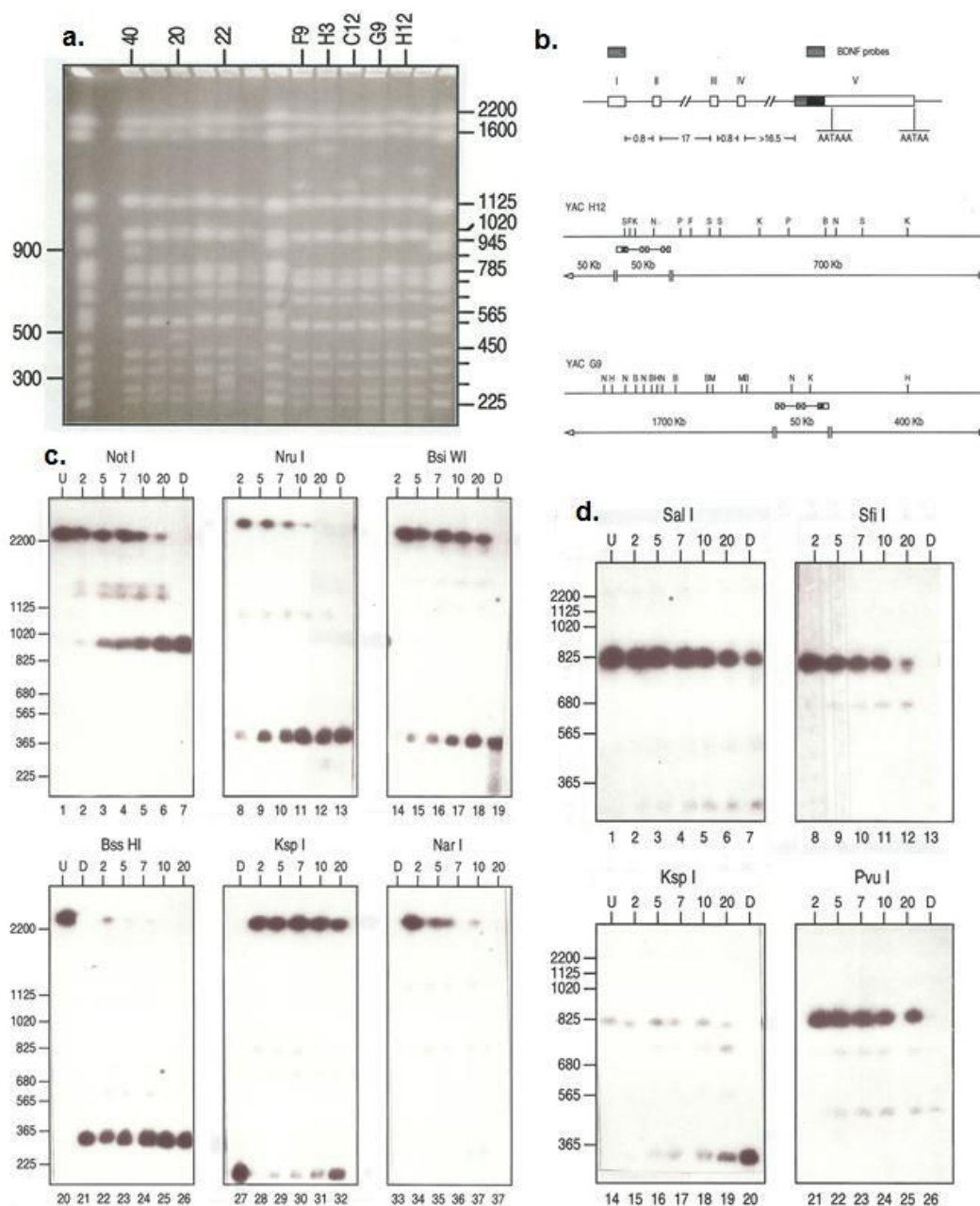


Figure 2. Analyse par électrophorèse en champ pulsé (PFGE) des chromosomes artificiels de levure (YAC) contenant le gène humain du facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF). a. PFGE des YACs F9, H3, C12, G9 et H12 qui contiennent le gène BDNF. La taille des fragments d'ADN est montrée à droite et à gauche du gel. b. Représentation schématique du gène humain de BDNF, les carrés représentant les différents exons, ainsi que les sondes utilisées pour cartographier les YACs (BDNF probes). En bas, cartes de restriction représentatives des YACs G9 et H12 avec la position du gène BDNF. c.d. Exemples de Southern Blot à partir des digestions partielles des YAC G9 et H12 avec différentes enzymes de restrictions.

5. L'étude du cerveau : de l'esprit aux molécules ou le contraire.

i. Le changement de cap.

L'étude du gène de BDNF marque le début d'une longue période de 12 ans, dans laquelle tous mes projets scientifiques concerneront différents aspects des neurosciences. En effet, en 1994, le département de biotechnologie de Ciba-Geigy est restructuré et les laboratoires de biologie moléculaire sont dissous. J'ai alors le choix de me consacrer uniquement aux cellules souches embryonnaires de souris, en participant à la construction d'une plateforme technologique dédiée aux souris transgéniques, ou alors de rejoindre le département de neurosciences. Sans hésitation aucune, à l'époque, je m'engage sur cette seconde option. Deux ans, plus tard, en 1996, Ciba fusionne avec Sandoz pour devenir Novartis. Le laboratoire du Dr Herman Van der Putten survit à la fusion et les projets, initiés pour Ciba-Geigy se poursuivent au sein de Novartis.

Ainsi, dans un premier temps, je travaille avec un étudiant en doctorat de l'Université de Zurich, sur la construction d'un vecteur de transgénèse afin d'exprimer dans les astrocytes d'une souris transgénique la molécule d'adhérence cellulaire neurale L-1 (Schachner 1989). L-1, également décrite sous le nom de L1CAM est une protéine transmembranaire. L-1 était alors soupçonnée d'être capable de promouvoir la croissance des axones des neurones durant le développement du système nerveux central. La capacité des neurones à allonger (étendre) leurs axones est de première importance pour l'établissement de connexions entre les neurones durant le développement. Mais c'est également un phénomène requis pour rétablir une connexion entre les neurones après une lésion. Herman Van der Putten a produit une souris transgénique avec notre vecteur et j'ai analysé l'expression du transgène au niveau de l'ARN et des protéines alors que mon collègue a réussi, sur des cultures de neurones et sur des nerfs optiques dérivés de cette souris à démontrer que l'expression ectopique de L-1 dans les astrocytes favorise la croissance des axones (Mohajeri, Bartsch et al. 1996).

Toujours dans ce même domaine des neurosciences, j'ai eu la chance unique de contribuer avec une équipe de l'École Polytechnique de Zurich (ETH) à démontrer que la délétion de la protéine associée à la myéline (Nogo-A) dans une souris transgénique permet la régénération fonctionnelle des fibres nerveuses après lésion de la moelle épinière (Simonen, Pedersen et al. 2003). Au-delà des retombées de l'important aspect scientifique

de cette découverte, ce travail m'a permis de manipuler dès 1996, un tout nouvel outil, les chromosomes artificiels de bactérie (BAC). Bien plus stables que les chromosomes artificiels de levure (YAC), les BAC représentent alors l'avenir pour qui cherche à manipuler le génome d'un organisme. Afin de construire le vecteur qui va servir à inactiver le gène de Nogo-A dans les cellules embryonnaires souches de souris, j'isole de la première librairie commerciale construite par l'entreprise « Research Genetics », un BAC de 15 kb, ce qui va aussi me permettre de caractériser physiquement le *locus* de NOGO-A.

En 1992, une publication cosignée par Samuel Weiss et Brent Reynolds dans le fameux magazine « *Science* », provoque un véritable séisme (Reynolds and Weiss 1992). Il existe des cellules souches neurales, il est possible de les isoler à partir du cerveau d'une souris ou d'un rat et de les maintenir en culture à l'infini. Il est également possible de les différencier en neurones, en cellules gliales et en astrocytes. Contrairement à ce qui était pensé jusqu'ici, la neurogenèse ne se produit pas uniquement durant le développement embryonnaire et jusqu'à l'adolescence, mais continue à évoluer physiologiquement durant toute la vie adulte. C'est une véritable révolution scientifique et en effectuant durant l'été 1995, un inoubliable séjour dans le laboratoire de Samuel Weiss à l'université de Calgary, j'ai la chance unique d'apprendre à isoler et à propager des *neurosphères* à partir de la zone sous-ventriculaire (ZSV) qui borde les ventricules latéraux d'une souris adulte. Malheureusement, pour des raisons de propriétés intellectuelles, ces travaux n'ont pu être poursuivis au sein de Ciba à mon retour. C'est le grand regret de ma vie de chercheur, car j'aurais adoré poursuivre ce domaine d'investigation que sont les cellules souches neuronales.

ii. Le récepteur métabotrope au Glutamate de type 7

À partir de 1993, un médecin et physicien du département de neuroscience s'associe à un biologiste et à un chimiste de Ciba pour étudier le potentiel thérapeutique des récepteurs métabotropes au glutamate (mGluRs) (Knopfel, Kuhn et al. 1995). Ensemble, ils parviennent à convaincre le directeur du département de neuroscience d'initier un projet visant la découverte et le développement de molécules chimiques qui permettraient de moduler les récepteurs mGluRs (Nicoletti, Bruno et al. 1996). Les récepteurs métabotropes sont des protéines membranaires qui en réponse à l'action d'un ligand changent leur conformation et activent une cascade d'événements intracellulaires. Ils viennent tout juste d'être isolés et

caractérisés (Schoepp and Conn 1993). Ces récepteurs mGluRs sont localisés sur les neurones du système nerveux central et sur les cellules gliales. Ils constituent une famille de 8 membres. Les récepteurs mGluR1 et mGluR5 post-synaptiques participent au phénomène de potentialisation à long terme. Les récepteurs mGluR 2, 3, 4, 7, et 8 sont pré-synaptiques et provoquent une diminution de libération du glutamate. Afin d'identifier des molécules pharmacologiques spécifiques au mGluRs, il s'agit d'abord de cloner les gènes humains de ces différents récepteurs pour pouvoir ensuite les exprimer dans un système cellulaire adéquat, sur lequel un screening serait possible. Ainsi, alors qu'un collègue s'attèle au clonage des gènes humains des récepteurs mGluR2 et mGluR4, je me charge du clonage du gène humain du récepteur mGluR7. Je découvre par la même occasion qu'il existe deux variants d'épissage produisant deux isoformes du même gène et que parmi tous les membres de la famille mGluRs, le gène de mGluR7 est le plus conservé (Flor, Van Der Putten et al. 1997).

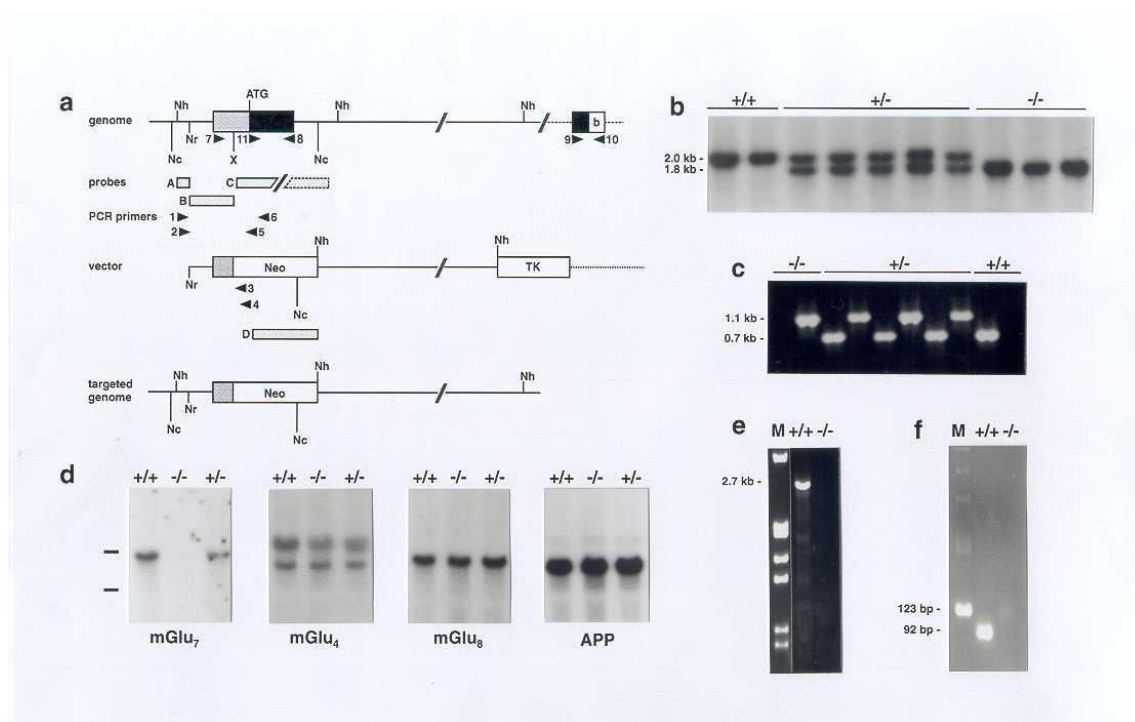


Figure 3 : l'Analyse moléculaire du *knock-out* du gène de la souris mGluR7. **a.** Schéma de l'ADN génomique du gène mGluR7, du vecteur de ciblage ainsi que du gène mGluR7 perturbé (ko), des sondes (barres pointillées), et des amorces de PCR (flèches). Neo, gène de résistance à la néomycine; TK, le gène de la thymidine kinase du virus de l'herpès; Nh, NheI; Nc, NcoI; Nr, NruI; X, XhoI. **b.** L'analyse par transfert d'ADN génomique extrait des souris *knock-out* (Southern Blot). Le résultat montré est issu d'une litière de souris F2 obtenues par croisement d'une paire de souris F1 hétérozygotes +/- pour le *knock-out* de mGluR7. L'ADN génomique a été digéré par NheI. La sonde A a été utilisée (comme indiqué en a). Les allèles de type sauvage et les allèles mutants sont représentés par des fragments d'ADN de 2 055 et 1.885 kb, respectivement. **c.** le génotypage par PCR. Exemple d'un résultat typique de PCR en utilisant de l'ADN génomique extrait de queue de souris mGluR7 + / + (wt), mGluR7 + / - (hétérozygotes) et mGluR7 - / - (ko). Les paires d'amorces 1 + 3 livrent un produit de 1,1 kb (allèle mutant). Les amorces 7 + 8 montrent un fragment d'ADN de 0,7 kb (allèle de type sauvage). **d.** l'analyse de l'expression du gène mGluR7 par transfert d'ARN (Northern Blot). L'ARN total a été isolé à partir du cerveau des souris mGluR7 + / +, mGluR7 + / -, mGluR7 et - / -. Les sondes d'ADNc utilisés étaient APP, mGluR7, mGluR4, et mGluR8. **e. f.** RT-PCR. Les ARN messagers spécifiques du gène mGluR7 de 2,7 kb (amorces 11 + 10) et de 0,092 kb (amorces 9 + 10) ont été détectés facilement à partir d'ARN extrait du cerveau des souris mGluR7 + / + (wt), et sont inexistant dans les souris mGluR7 - / - (ko).

Alors qu'à cette époque, l'utilisation de souris *knock-out* commence doucement à envahir les journaux scientifiques (Silva, Paylor et al. 1992, Silva, Stevens et al. 1992), j'imagine une stratégie pour inactiver le gène de mGluR7 dans des cellules embryonnaires souches. Ainsi, grâce à l'ADN complémentaire du gène humain de mGluR7, je réussis à isoler une portion d'ADN génomique de souris correspondante au premier exon codant du gène de mGluR7 et à dériver un vecteur afin d'inactiver ce gène par recombinaison homologue dans des cellules embryonnaires souches de souris. À partir de ces cellules souches, une souris transgénique, déficiente pour le récepteur mGluR7 sera générée et suivront sept années d'études afin d'élucider les fonctions physiologiques de ce récepteur. Pour la première fois, j'écrivais une publication scientifique (Sansig, Bushell et al. 2001). Cinq autres publications scientifiques sont venues couronner nos investigations sur mGluR7 et de nombreuses collaborations avec les plus grands laboratoires dans ce domaine particulier des neurosciences m'ont permis d'élargir considérablement mes connaissances sur la structure et le fonctionnement du cerveau (Masugi, Yokoi et al. 1999, Bushell, Sansig et al. 2002, Cryan, Kelly et al. 2003, Holscher, Schmid et al. 2004, Holscher, Schmid et al. 2005). Ces travaux sont présentés en détail dans ma thèse de doctorat, réévalués à la lumière des données actuelles. Ensemble, toutes ces expériences réalisées sur les souris *knock-out* pour le récepteur mGluR7 ont abouti aux hypothèses d'aujourd'hui quant au potentiel thérapeutique de ligands sélectifs pour mGluR7.

iii. Les récepteurs métabotropes GABA B.

Dans les laboratoires de Ciba, l'ancestral précurseur de Novartis, avait été découverte une atypique molécule psychotrope, le baclofène. À l'origine commercialisée sous le nom de Lioréal, il s'agit d'un dérivé aromatique halogéné de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA). C'est un myorelaxant qui agit au niveau de la moelle épinière favorisant la relaxation des muscles squelettiques. Grâce à cette molécule, deux biologistes moléculaires du département de Neurosciences de Novartis, ont réussi à cloner les gènes des récepteurs métabotropes au GABA (GABA_B). Suspectés d'exister depuis longtemps, ces récepteurs n'avaient jamais pu être isolés physiquement et grâce à une astucieuse stratégie de clonage à partir d'une librairie d'expression, mes deux collègues sont entrés dans l'histoire des neurosciences en 1997 (Bettler, Kaupmann et al. 1998).

Très rapidement, pratiquement tout le département de neuroscience de Ciba s'est mis à travailler d'une manière ou d'une autre sur ces récepteurs. Ainsi, avec l'aide de Valérie Schuler qui a construit les vecteurs, j'ai généré des cellules ES de souris déficientes pour les deux types de récepteurs GABA_B, appelés respectivement R1 et R2.

Des souris knock-out ont vu le jour peu de temps plus tard (Schuler, Luscher et al. 2001), et en parallèle de mes travaux sur mGluR7, j'ai administré ces deux importantes colonies de souris afin que de nombreuses expériences de comportement et d'électrophysiologie viennent éclairer les fonctions physiologiques de ces récepteurs (Kaupmann, Cryan et al. 2003, Gassmann, Shaban et al. 2004, Mombereau, Kaupmann et al. 2004, Vigot, Barbieri et al. 2006).

Le Glutamate et le GABA sont les neurotransmetteurs les plus abondants du cerveau des mammifères. Les effets inhibiteurs du GABA servent à contrebalancer les effets excitateurs du glutamate. Un déséquilibre entre ces deux neuromédiateurs est impliqué dans l'épilepsie ou l'ischémie cérébrale. Il n'est donc pas étonnant que les premiers phénotypes observés sur nos souris transgéniques, qu'il s'agisse de mGluR7 ou de GABA_BR1, soient liés à l'épilepsie (Sansig, Bushell et al. 2001, Schuler, Luscher et al. 2001). En approfondissant nos investigations, nous avons également observé dans ces deux types de souris mutantes des altérations de la mémoire, de l'apprentissage, des fonctions cognitives, mais aussi des émotions. J'ai énormément pris de plaisir à étudier ces phénomènes physiologiques complexes.

iv. L'Amygdale.

Alors que l'étude des phénotypes des souris *knock-out* pour mGluR7 et Gaba_B me permet d'acquérir des connaissances approfondies sur l'anatomie et l'organisation fonctionnelle sous forme de circuitries neuronales du cerveau, ces projets sont abandonnés. En effet, les progrès sur le développement d'agents pharmacologiques spécifiques à ces récepteurs metabotropes déçoivent Novartis. Aucune molécule n'est alors réellement spécifique pour un récepteur donné, et à partir de 2004, je suis contraint à développer de nouvelles activités.

J'ai entre temps appris, lors d'un séjour de deux mois dans une entreprise de biotechnologie spécialisée dans la thérapie génétique (Genetic Therapy Inc) à Gaithersburg

aux États-Unis en 2001, à préparer des vecteurs génétiques dérivés de lentivirus (Matukonis, Li et al. 2002, Molina, Matukonis et al. 2002). En effet, ces outils avaient alors prouvé leur efficacité quant au transfert d'un gène d'intérêt dans les neurones (Wong, Goodhead et al. 2006). Ainsi, j'imagine construire des vecteurs dérivés de lentivirus qui contiendraient des petits ARN d'interférence pour une cible particulière exprimée dans une région donnée du cerveau et les injecter directement dans le cerveau de souris pour non pas éteindre complètement ce gène, mais atténuer son expression dans une région précise (Wiznerowicz, Szulc et al. 2006). Ce projet intéresse mon département, mais comme je n'ai aucune expérience dans le design d'ARN d'interférence, je rejoins pour quelques mois l'Institut Génomique (GNF) de San Diego en Californie, où avec l'aide d'experts je dessine et clone, toute une petite collection d'ARN d'interférence.

Durant mon séjour en Californie, mon chef de laboratoire, le Dr Herman Van der Putten est promu au sein de Novartis, à la tête d'un tout nouveau département de Psychiatrie.

L'objectif du département est la modulation des neurones de l'amygdale. Ce noyau est situé dans la région antéro-interne du lobe temporal, en avant de l'hippocampe et sous le cortex.

L'amygdale fait partie du système limbique et est impliquée dans la reconnaissance et l'évaluation de la valence émotionnelle des stimuli sensoriels, dans l'apprentissage associatif et dans les réponses comportementales et végétatives associées en particulier à la peur et à l'anxiété. L'amygdale fonctionnerait comme un système d'alerte et serait également impliquée dans la détection du plaisir. Ainsi, à mon retour du GNF, Herman me charge d'élucider les structures cellulaires et moléculaires de l'amygdale. Deux années durant je vais utiliser nombre de vecteurs dérivés de lentivirus et d'adénovirus afin de marquer spécifiquement par injection stéréotaxique dans le cerveau de souris transgéniques, des neurones particuliers de l'amygdale. Ceci afin de les caractériser par immunohistochimie, mais aussi en visualisant directement des marqueurs fluorescents (par exemple, GFP) sur des coupes de tissu, les neurones qui sous-tendent les émotions. De même, je vais utiliser des petits ARN d'interférences pour déréguler dans les interneurones gabaergiques de l'amygdale, l'enzyme nécessaire à la synthèse du neurotransmetteur Gaba. C'est un travail passionnant et après deux ans de travaux les premiers résultats sont encourageants, aussi

lorsqu'en décembre 2007, Herman m'annonce la dissolution de son département, le monde s'écroule sous mes pieds.

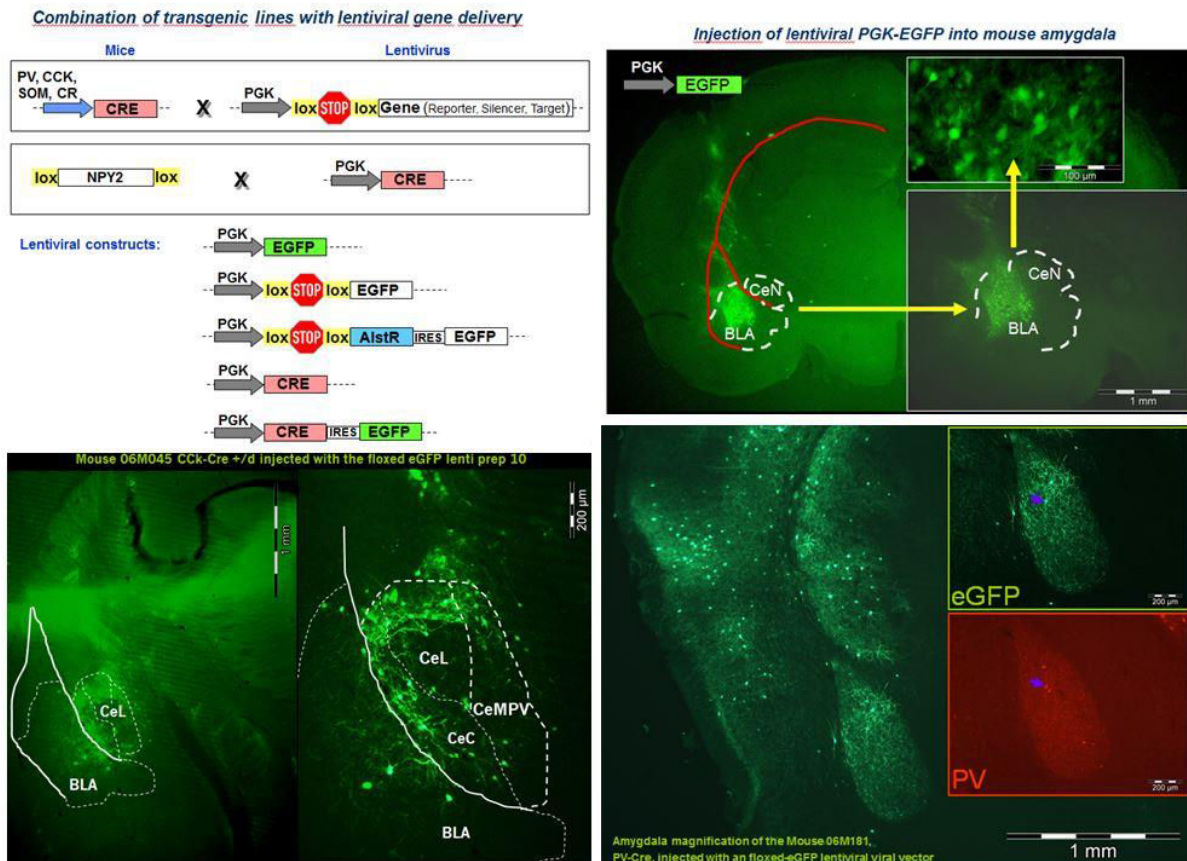


Figure 4 : L'utilisation de vecteurs dérivés de lentivirus et de souris transgéniques pour la validation de nouvelles cibles moléculaires dans la circuiterie de l'anxiété de l'Amygdale. En haut à droite, la représentation schématique des différentes souris transgéniques générées : Paravalbumine (PV)-Cre, cholecystokinine (CCK)-Cre, calretinine (CR)-Cre and somatostatine (SOM)-Cre. PV, CCK, CR et SOM étant des gènes marqueurs des différents sous-types d'interneurones GABA. Cre est la recombinase du phage P1 qui catalyse spécifiquement la recombinaison entre deux sites *lox*. Juste en dessous, la liste des différents vecteurs dérivés de lentivirus utilisé par injection stéréotactique dans le cerveau de souris. En haut, à droite, une coupe d'un cerveau de souris de type sauvage injecté avec un lentivirus PGK-eGFP. L'expression du gène GFP est visible tout autour du site d'injection sans spécificité cellulaire. En bas, à droite. La région de l'Amygdale avec ses différents noyaux BLA, noyau basolatéral, CeL, noyau central d'une souris transgénique CCK-Cre injecté avec un lentivirus PGK-floxed eGFP. L'expression du gène GFP est restreinte aux interneurones CCK+. En bas, à droite, l'Amygdale d'une souris transgénique PV-Cre, injecté avec un lentivirus PGK-floxed eGFP. L'expression du gène GFP est restreinte aux interneurones PV+.

6. Le retour à l'Immunologie, 15 ans plus tard.

i. La sclérose en plaque.

Heureusement pour moi, alors que les Neurosciences ne sont plus d'actualité pour Novartis, se crée en décembre 2007 sur le campus de Bâle, un immense département d'Immunologie qui rassemble des projets scientifiques aussi divers que l'auto-immunité, la transplantation d'organe et l'inflammation (ATI). Au sein de ce NIBR, se constitue un groupe qui a été chargé d'étudier l'inflammation et l'auto-immunité et son directeur me propose de développer au sein de son équipe, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale, ou encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE) dans la souris. L'EAE est un modèle animal de sclérose en plaques utilisé en laboratoire. L'EAE consiste en l'injection, chez un animal, d'un agent pathogène, provoquant chez celui-ci une réaction auto-immune dirigée contre la myéline du système nerveux central, ce qui conduit à une démyélinisation des fibres nerveuses et un dommage axonal, comme c'est le cas dans la pathologie humaine. Ainsi avec l'aide de deux jeunes collègues, nous avons, en quelques mois, réussi à décrire un nouveau modèle d'EAE induit par la glycoprotéine oligodendrogliale de la myéline (MOG) dans des souris C57/Bl6. Un modèle qui de manière réellement standardisée et prédictible provoqua une maladie proche de la forme progressive de la sclérose en plaques rencontrée chez l'Homme. Au travers de six différentes expériences, nous avons mesuré l'efficacité de deux molécules produites par Novartis quant à la diminution ou non, des symptômes de la maladie.

Nous avons également utilisé des souris transgéniques déficientes pour un récepteur afin de vérifier sa possible fonction dans ce type de pathologie et à l'aide de médicaments déjà en clinique par exemple, la Copaxone® nous avons démontré que notre modèle EAE souris pouvait être comparé à ce même type de pathologie chez l'homme. Parallèlement à ces travaux, j'ai été chargé d'établir un solide essai par méthode immuno-enzymatique (ELISA) afin d'explorer l'action de molécules « candidates » sur la réponse humorale lors du développement de la maladie dans nos expériences EAE. En utilisant différents isotypes d'anticorps IgG sur des sérums de souris et de rats issus d'expériences EAE, j'ai pu démontrer la diminution d'immunoglobulines IgG2a et IgG2b dans des souris et des rats traités par une molécule de Novartis. Pour des raisons de propriétés intellectuelles, ces travaux n'ont pu être pour l'instant, publiés, mais ils ont fait l'objet de deux rapports

internes et le modèle EAE souris, que nous avons décrit est aujourd'hui intensément étudié afin de caractériser des potentiels médicaments pour la sclérose en plaques (Sansig, Bernard et al, 2009, Sansig and Mir, 2009).

Autant l'utilité de telles expériences me semble évidente, autant ce travail pénible, parce que au contact quotidien avec la souffrance de ces dizaines de rongeurs à qui on induit une sévère maladie, m'a réellement usé psychologiquement allant jusqu'à développer une maladie auto-immune, le syndrome de Lyell.

Dans ce contexte particulièrement pénible, durant l'automne 2008, à ma plus grande surprise, je suis contacté par le directeur du département de production de protéines et d'anticorps (PPA) du NIBR biotechnologie. Ce dernier aimerait produire à des fins thérapeutiques des anticorps humains dans des souris transgéniques. Il sait que dans les années 90, j'avais travaillé sur ce type de projet et me propose de rejoindre son département pour dessiner d'abord, puis réaliser une telle souris.

ii. L'humanisation de souris transgénique

Au tout début des années 90, la biotechnologie était en pleine effervescence, l'utilisation de molécules biologiques thérapeutiques offrait à l'industrie pharmaceutique une alternative aux molécules chimiques jusqu'ici seuls maîtres sur le marché des médicaments. Les avancées scientifiques et technologiques permettaient d'imaginer de multiples méthodes pour produire des anticorps humains à des fins thérapeutiques. L'utilisation de souris transgéniques pour produire des anticorps humains est donc tout naturellement apparue dans les laboratoires de biologie moléculaire, à peu près au même moment, partout dans le monde (Taylor, Carmack et al. 1992, Bruggemann, Davies et al. 1993, Jakobovits 1995, Jakobovits, Green et al. 1995). À cette même époque, un étudiant en doctorat du laboratoire voisin au mien, au sein du département de biotechnologie de Ciba va mettre en place cette véritable révolution technologique qu'est la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Une méthode aujourd'hui routinière qui a profondément révolutionné toute la biologie moléculaire. Très vite celui-ci isole par PCR les gènes des régions constantes des anticorps humains.

Il dessine et construit des vecteurs transgéniques afin d'échanger ces mêmes gènes des régions constantes d'anticorps de souris par leur homologue humain, dans des hybridomes de souris, mais également dans des cellules embryonnaires souches de souris. Je lui transfère les vecteurs dans les cellules souches et Herman génère une souris humanisée pour les régions constantes des gènes des chaînes d'anticorps lourdes et légères kappa (Pluschke, Joss et al. 1998). Ce qui à cette époque est une avancée technologique et scientifique ne sera pas soutenu, au sein de l'entreprise Ciba et si aujourd'hui, plusieurs modèles de ce type de souris produisent des anticorps thérapeutiques qui sont entrés en clinique (Jakobovits, Amado et al. 2007), ce projet est abandonné dès 1993.

D'où ma surprise, lorsque j'apprends par le directeur du NIBR biotechnologie en octobre 2008, que la production d'anticorps humains dans les souris transgéniques est à nouveau soutenue par Novartis. Ainsi, dès janvier 2009, alors que je termine la rédaction des rapports qui décrivent nos modèles de souris pour la sclérose en plaques, j'imagine une stratégie pour produire des anticorps humains dans une souris transgénique. J'ai plusieurs contraintes d'ordre technologiques, mais aussi au niveau des propriétés intellectuelles.

Il m'apparaît néanmoins rapidement qu'il nous faut dans un premier temps inactiver la production endogène d'anticorps dans la souris. Je m'attache alors à dessiner des vecteurs pour éteindre les *locus* d'immunoglobulines de souris. C'est pour moi une renaissance, devant mon ordinateur, je suis heureux face aux banques de gènes. L'organisation des gènes d'anticorps me fascine. D'autant plus qu'avec le soutien de la plateforme de transgénèse que dirige le Dr Bernd Kinzel, nous obtenons rapidement des cellules embryonnaires souches (ES) de souris, puis des souris dans lesquels la production d'anticorps est abolie. Mieux, ces souris *knock-out* pour les chaînes lourdes (IgH) et légères kappa (IgK) d'anticorps ne produisent plus de cellules B (Isken, Tchorz et al, 2011, Isken, Tchorz et al, 2011).

En parallèle, j'imagine une stratégie pour isoler physiquement les immenses *loci* d'anticorps humains. Naïvement, j'espère qu'à l'ère post séquençage du génome humain, il me sera possible d'acquérir des chromosomes artificiels de levure (YAC) qui contiennent les gènes humains nécessaires à la production d'immunoglobulines et de simplement les transférer par fusion entre des levures et des cellules ES dans le génome de la souris. Une méthode complexe et sophistiquée que j'avais utilisée avec succès en 1995. Rapidement, je réalise que de tel YAC, s'ils ont effectivement existé, ils sont aujourd'hui impossibles à

obtenir. En effet, des compagnies de biotechnologie ont déjà mis la main dessus. Les intérêts financiers liés à de tels outils sont énormes, ce sont de précieuses sources de génome humain pour qui souhaite produire des anticorps dans des systèmes cellulaires ou transgéniques. Néanmoins, il est encore possible d'acheter toute la collection de chromosomes artificiels de bactérie (BAC) sous-jacente aux *loci* d'anticorps humain. Le problème, c'est qu'il va falloir trouver une solution pour relier physiquement ces différents BAC. Entre-temps, mon directeur, recrute mon nouveau chef de laboratoire. Ce dernier est une légende vivante de l'immunologie.

Il a non seulement travaillé pour deux récipiendaires du prix Nobel, mais il est le premier scientifique à avoir physiquement isolé un gène d'anticorps. C'est pour moi, une chance formidable et durant les 2 ans et demi où l'on va travailler ensemble au quotidien, je vais énormément apprendre de ce singulier personnage. La stratégie initiale, que j'ai dérivée du système de recombinaison dans la bactérie (Muylers, Zhang et al. 1999, Copeland, Jenkins et al. 2001), pour fusionner nos BAC par recombinaison homologue ne lui convient pas. Trop lente, trop fastidieuse à ses yeux. D'autant plus que mes premiers résultats expérimentaux ne vont pas dans la bonne direction. Je lui soumetts alors une deuxième approche, qui vient tout juste d'être découverte par Yvan Larionov (Kouprina and Larionov 2006, Kouprina, Noskov et al. 2006). Il redessine cette méthode, il la modifie et nous réussissons ainsi à reconstituer par recombinaison homologue dans la levure, les 3 *loci* d'anticorps humains sous la forme de chromosome artificiel circulaire de levure (cYAC). Je les transfère dans des cellules ES de souris par fusion et nous obtenons à partir de ces cellules ES des souris transgéniques. Malheureusement, jamais nous n'observerons d'anticorps humain dans le sang de ces souris, nos *loci* ne sont pas fonctionnels.

Un projet alternatif à la génération des *loci* complets vise la génération d'un *locus* artificiel humain de complexité réduite. Notre étudiante en doctorat le produit sous forme de plasmide afin de pouvoir obtenir plus facilement des souris transgéniques. Ces vecteurs vont partiellement fonctionner dans des cellules B de souris en culture, mais dans les souris leur utilisation s'est avérée très peu efficace. Au printemps 2012, mon chef de laboratoire atteint d'un cancer cesse toute activité. Au même moment la plateforme de transgénèse qui nous soutient dans la production de souris est dissoute. Si j'ai néanmoins réussi à soutenir notre étudiante pour achever son doctorat en mars 2014 (Villemin, 2014), je n'ai pu mener à

terme l'objectif initial, malgré une tentative désespérée de transgénèse à l'institut Génomique de Novartis à San Diego en Californie, et un essai de collaboration avec l'École Polytechnique de Zurich, qui a échoué pour des raisons de propriétés intellectuelles. De plus en février 2014, Novartis acquiert une compagnie spécialisée dans l'immunothérapie des cancers (CoStim Pharmaceuticals), qui utilise des souris transgéniques produisant des anticorps humains, mon projet n'a donc plus de sens et mon directeur me demande alors d'utiliser ces souris humanisées et de mettre au point les techniques d'hybridomes au sein de son département, ce que j'entreprends lorsqu'une nouvelle opportunité m'interpelle. En effet, eu sein du NIBR DMP, depuis deux ans désormais, une intense activité de recherche concerne les cellules souches et l'édition de génome et un poste dans ce laboratoire du futur est ouvert. Je postule et l'obtiens.

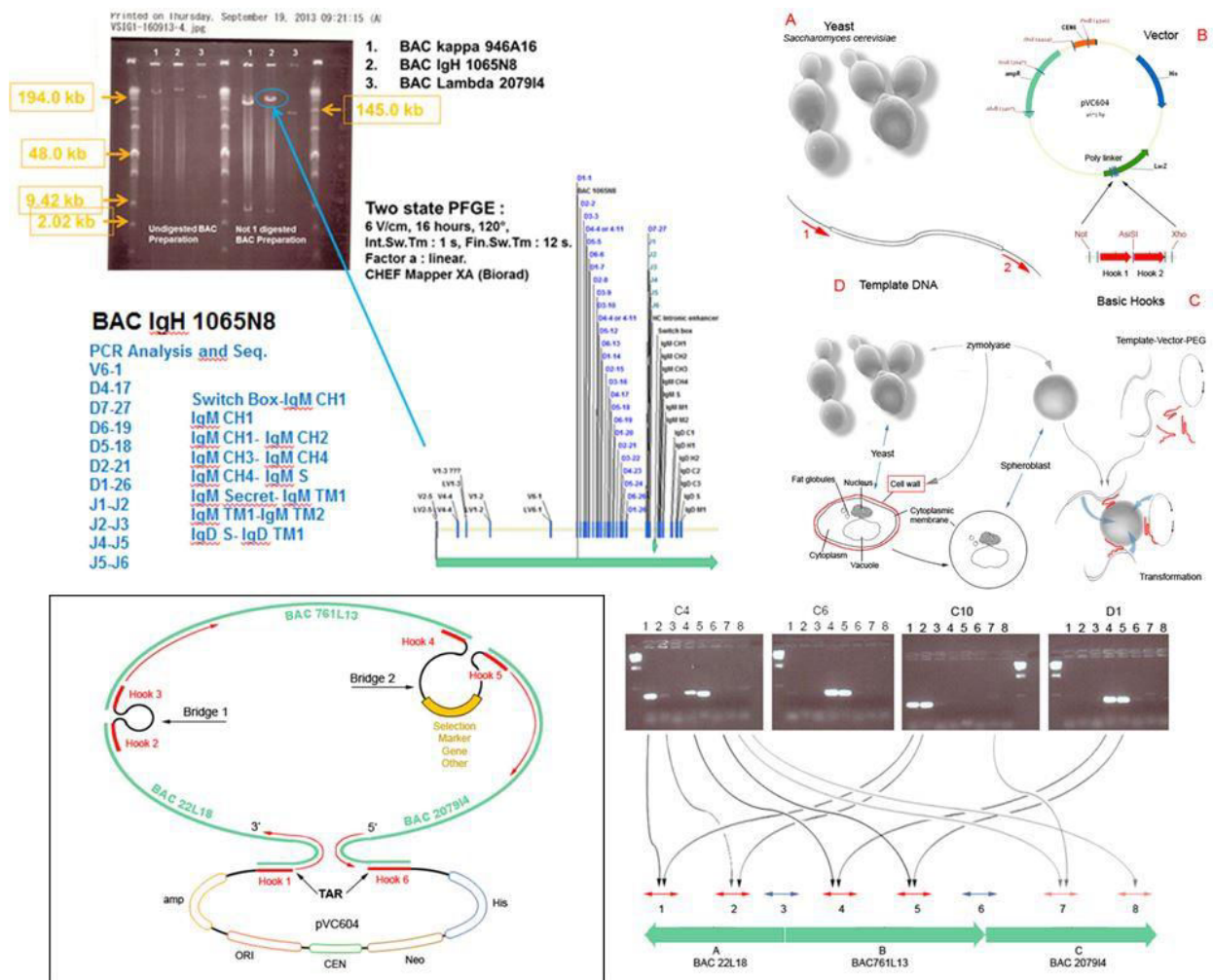


Figure 4 : La reconstitution des *loci* humain des gènes d'anticorps. En haut à droite, Caractérisation par gel d'électrophorèse à champ pulsé et PCR des chromosomes artificiels de bactéries (BAC) qui contiennent les gènes humains d'anticorps. Le BAC IgH 1065N8 qui contient la région centrale V-D-J-C de la chaîne lourde humaine d'anticorps est montré en exemple. En haut à gauche, le principe de l'isolation de *locus* génomique par la méthode de « TAR cloning » pour « Transform - Associated-Recombination » dans la levure. Brièvement, des amorces de 60 paires de bases, spécifiques aux extrémités 5' et 3' du *locus* d'intérêt (flèches rouges 1 et 2 ainsi que hook1 et hook2) permettent par recombinaison homologue de capturer la région génomique ciblée dans des sphéroplastes de levures fraîchement préparés par digestion enzymatique. En bas, à droite, la carte du *locus* humain des gènes d'anticorps codant pour la chaîne légère lambda. Un *locus* reconstitué dans la levure par les connexions de 3 différents BAC via des « bridges » (bridge1 et bridge2), des ponts moléculaires synthétiques contenant un gène de sélection.

7. Réguler les fonctions physiologiques naturelles.

Ainsi, le 1er septembre 2014, je rejoins le groupe du Dr Frederic Bassilana au sein du NIBR DMP, pour travailler à nouveau sur l'élucidation du rôle physiologique de récepteurs couplés aux protéines G et aux modulations de voies de signalisation cellulaire.

Ce laboratoire est l'un des tout premiers au monde à utiliser une nouvelle technologie qui permettrait de réécrire l'ADN des cellules. Plusieurs méthodes rendent possibles ces remaniements du génome par découpes ciblées de l'ADN, mais la technique la plus prometteuse, nommée CRISPR-Cas9 est en fait la somme de plusieurs découvertes réalisées depuis les années 1980 et elle a connu un essor extraordinaire depuis 2012. CRISPR-Cas9 est un mécanisme issu de la machinerie cellulaire des bactéries, chez qui il joue le rôle de système immunitaire. Il permet de reconnaître et de découper l'ADN des virus qui infectent la cellule.

Ce mécanisme a été récupéré et adapté par les biologistes pour cibler des séquences bien précises de l'ADN et y faire une coupure dans un ou plusieurs sites avec une précision chirurgicale. Il est possible alors de modifier un gène, d'en introduire un nouveau ou de le retirer (Riordan, Heruth et al. 2015). Utiliser cette technologie représente à mes yeux la continuité de mon parcours au sein des sciences de la vie, car elle représente, ni plus ni moins, que l'actuel sommet de l'art de la transgénèse. Dans le même ordre d'idée, j'ai également débuté un projet qui vise la génération de cellules spécialisées à partir de cellules embryonnaires souches de souris. Ainsi, j'ai eu en début d'année l'immense plaisir de dériver des cellules embryonnaires souches à partir de blastocytes issus de souris transgéniques. Cellules souches que je vais désormais essayer de différencier dans la lignée d'intérêt. Le but est de produire en masse de telles cellules différenciées afin de les caractériser et d'identifier de nouvelles cibles moléculaires qui permettraient de réguler leurs fonctions physiologiques naturelles.

B. Communiquer, enseigner : un mode de vie.

La pratique de la recherche au quotidien n'est pas restreinte à la seule réalisation d'expériences scientifiques. Ainsi la formation de collaborateurs et d'étudiants, mais aussi les différentes formes de communications inhérentes au métier de chercheur, telle que la présentation orale de ses travaux, ou la rédaction de publications ont toujours fait partie de mon travail. Il s'agit là, à mes yeux, d'une source de satisfaction et de motivation tout aussi importante que les résultats scientifiques. En y consacrant une grande partie de mon temps libre, la communication et l'enseignement ont dépassé le cadre strictement professionnel pour devenir un véritable mode de vie.

1. Former des collaborateurs.

Je travaillais depuis quelques mois seulement, lorsque j'ai enseigné une technique de biologie moléculaire que j'avais apprise à peine plus tôt. En effet, en 1987, la biologie moléculaire n'était pratiquée au quotidien au sein de Ciba-Geigy que par une petite poignée de chercheurs et de techniciens. Et, la mission du laboratoire de biologie moléculaire, dirigée par le Dr Hans Hofstetter au sein du département de biotechnologie était alors non seulement liée à des travaux de recherche proprement dits, comme la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques ou l'élucidation des processus physiologiques liés à des pathologies humaines, mais également de moderniser les méthodes en cours dans l'industrie pharmaceutique.

Ainsi dès mes débuts et cela s'est poursuivi jusqu'à aujourd'hui, j'ai toujours immédiatement transmis les méthodes que je venais moi-même d'apprendre ou de développer à mes collègues parfois plus expérimentés, mais souvent plus novices.

Lorsque j'ai réussi en 1989 à générer le premier *knock-out* du laboratoire, des demandes issues de laboratoires publics, parfois très connus, me sont parvenues, et je me suis retrouvé à former un grand nombre de chercheurs à la recombinaison homologe dans les cellules embryonnaires souches de souris.

De même, dès ma première année, j'ai encadré les étudiants de passage au sein de notre laboratoire. Si dans un premier temps, je me contentais de leur apprendre à manipuler correctement, assez rapidement, je me suis retrouvé à discuter, organiser et finalement à

corriger leurs rapports. Au fur et à mesure que croissait mon savoir théorique, je le transmettais aux stagiaires, mais également aux techniciens avec qui je travaillais. En 1994, j'ai dessiné un projet pour des travaux de Master, et j'ai ainsi essayé avec une étudiante de l'université de Besançon de réaliser un *knock-out* conditionnel pour le récepteur mGluR7, qui à cette époque aurait été une immense avancée dans le domaine de la transgénèse. Si nous avons réussi à générer une construction génétique et à la transférer avec succès à des cellules embryonnaires souches de souris, cette dernière a complètement inactivé son gène cible. Dans les pas de cette étudiante a suivi un autre, que j'ai formé à la génération et à la gestion de lignées de souris transgéniques. En tout, j'ai encadré une douzaine de chercheurs aujourd'hui actifs dans divers laboratoires de biologie moléculaire, et ce jusqu'à l'année dernière où je m'occupais seul de deux étudiantes en Master ainsi que d'une étudiante en doctorat.

2. Enseigner.

Un autre aspect fondamental de la communication et de l'enseignement au sein de l'entreprise concerne le multiculturalisme. En effet, Novartis c'est avant tout un environnement de travail multiculturel : plus de 100 nationalités sont représentées sur les sites suisses de Novartis. Une telle diversité constitue ainsi un précieux enrichissement sur le plan professionnel, mais favorise également une ouverture culturelle profondément ancrée au niveau personnel.

Si j'ai depuis toujours présenté mes propres travaux ainsi que des séminaires issus de la littérature, ce qu'on appelle dans le jargon des laboratoires, le *journal club*, depuis trois ans, j'anime également un cours interne à Novartis sur les principes de base de la biologie moléculaire. Une formation destinée aux chercheurs, techniciens et cliniciens de Novartis afin qu'ils se familiarisent avec les fondements et les progrès du génie génétique. Ce cours bénéficie d'un très grand succès au sein de Novartis et est ainsi reconduit deux fois par an.

Depuis deux ans, j'anime également un cours d'immunologie spécifiquement adressé aux associés du NIBR Biologique dans le but de délivrer aux techniciens et aux chercheurs en biotechnologie les aspects fondamentaux de l'immunologie.

Dans le même ordre d'idée, de par des collègues, professeurs à l'université de Bâle, je donne de temps à autre un cours destiné aux étudiants en doctorat sur la transgénèse et plus particulièrement sur l'humanisation de souris transgéniques.

3. Communiquer.

La communication à l'intérieur, mais aussi à l'extérieur du laboratoire m'a toujours semblé être un aspect non seulement fondamental, mais également vital du parcours d'un chercheur. Je me souviens ainsi parfaitement de ma toute première présentation orale devant l'ensemble du département de biotechnologie de Ciba-Geigy sur la régulation des gènes eucaryotes et les séquences d'attachement à la matrice du noyau des cellules. Ce plaisir de faire partager mes recherches à mes collègues ne m'a plus jamais quitté et régulièrement, je présente l'avancée de mes travaux au sein des différents départements de Novartis, mais parfois aussi à l'extérieur lors de symposium organisé par les universités.

Plus formelles et d'autant plus formatrices sont les défenses des projets devant les différents comités qui jugent de leur validité et donc de leur survie. Si durant la majeure partie de mon itinéraire, mes chefs de laboratoire m'en ont déchargé, j'ai néanmoins bénéficié de cet exercice sur le projet visant à l'élucidation des structures de l'Amygdale ainsi que sur l'humanisation de souris transgénique.

Le deuxième aspect de la communication scientifique concerne l'écriture de publication pour les journaux spécialisés ainsi que de rapport interne à Novartis. J'ai ainsi participé à la rédaction de 22 publications scientifiques. Si pour certaines, il s'agissait uniquement d'un court paragraphe ou d'une figure, pour d'autres la tâche fut bien plus importante. Quelques manuscrits sont également tombés dans l'oubli, car refusés par les éditeurs, je n'ai pas trouvé l'énergie et le temps de les retravailler. J'ai aussi participé à la rédaction de cinq rapports scientifiques internes, dont trois que j'ai écrits seul. Un dernier point concerne les demandes aux autorités cantonales suisses afin d'effectuer des expériences sur les animaux. En effet, aux chercheurs qui imaginent une expérience dans laquelle des animaux doivent être utilisés, la législation suisse impose la soumission d'une requête aux vétérinaires cantonaux.

Il s'agit alors de décrire avec précision l'expérience imaginée, argumenter et illustrer d'exemples concrets. Si les autorités vétérinaires du Canton la jugent acceptable, elles

délivrent une licence qui permet de débiter les travaux. Responsable de plusieurs travaux *in vivo*, j'ai ainsi écrit et obtenu trois différentes licences.

IV. Synthèse et perspectives.

Transformer son idée en une réalité physique est à mes yeux la mission première d'un chercheur et à plusieurs reprises durant toutes ces années passées au sein des différents laboratoires de Ciba puis de Novartis, j'ai eu cet immense bonheur. Pourtant, constamment tourné vers le futur, je n'ai jamais pris le recul de me pencher sur mon parcours professionnel et cet exercice qu'est la démarche de la VAE m'en a donné l'occasion. En rédigeant ma thèse de doctorat et ce bilan de compétence, il m'est apparu que ma longue expérience dans de multiples disciplines biologiques telles que la génétique, l'immunologie et les neurosciences me permettent aujourd'hui d'interroger par des expériences scientifiques toutes les hypothèses qui parcourent sans cesse mon cerveau. Dans un certain sens, la VAE permet de prendre conscience de ses possibilités, elle met en lumière les progrès effectués et m'a démontré une certaine unité sous-jacente à mon cheminement.

En effet, d'aussi loin que je me souviens, j'ai toujours été profondément fasciné par les Indiens d'Amérique du Nord. Enfant, j'ai découvert « Elan Noir parle » de John G Neihardt. Le récit de la vie d'un indien sioux, au crépuscule de leurs ancestrales modes d'existence. Ce livre, devenu culte entre-temps, est toujours d'actualité, il est au cœur même de mes recherches. En effet, il y a plus de 150 ans, la grande vision qui révéla à Elan Noir, l'harmonie du monde a trouvé aujourd'hui un support physique : la biologie moléculaire. Elan Noir, adolescent dans un monde où ses pères et ses grands-pères parlent au vent et aux pierres a observé, lors de sa vision un arbre dans un cercle. À la fin de sa longue vie, Elan Noir est devenu un homme médecin important pour son peuple et il va relater avec précision à John Neihardt que l'arbre lui apparut comme le symbole de la vie : toutes les formes de vie sur terre sont issues d'un tronc commun et régies par les mêmes lois. Le cercle c'est l'interdépendance de toutes ces formes de vie entre elles et avec l'ensemble de l'univers. De Charles Darwin au séquençage du génome humain, tout semble indiquer qu'Elan Noir avait vu juste. Le vivant dans son ensemble est issu des mêmes éléments et est régi par les mêmes principes physico-chimiques : de la plus rustique bactérie au cerveau humain !

Aux commandes de cet extraordinaire orchestre, le génome. La mémoire organique de 3,5 milliards d'années d'évolution.

Au cours de mon itinéraire au sein des sciences de la vie, j'ai vécu l'avènement du règne absolu de la biologie moléculaire dans les différents domaines de la biologie. Une révolution qui a conduit au séquençage du génome humain et qui transforme aujourd'hui la médecine. Il y a près de 30 ans désormais, je l'ai vu pour la première fois cet ADN. Précipité dans l'éthanol à 100 %. Cette réalité m'a fasciné et aujourd'hui encore, à chaque fois que j'isole de l'ADN génomique à partir d'un tissu ou de cellules en culture et qu'arrive l'étape où je peux le visualiser, je suis tout autant ému. J'ai appris, entre-temps à manipuler cet ADN, à l'analyser et à le modifier. L'épigénétique est venue bouleverser les fondements que j'ai appris à l'école, renforçant encore un peu plus la vision d'Elan Noir sur l'interdépendance entre un organisme et son environnement et ce n'est pas la seule chose qui a bouleversé les sciences de la vie.

Lorsque j'ai débuté dans le laboratoire de biologie moléculaire du Dr Herman Van der Putten, il n'y avait, chose inimaginable aujourd'hui, pas d'ordinateur. Pire, aucun « kit » commercial ne permettait d'isoler physiquement de l'ADN ou de l'ARN. Seules les enzymes de restriction étaient déjà faciles à se procurer. Une bonne semaine d'intense labeur m'était alors nécessaire pour une expérience standard de génotypage, quand désormais, en à peine trois heures j'ai la réponse à ma question. En 1987, le clonage de mon tout premier gène m'a pris trois mois et l'élucidation de sa séquence de nucléotides, tout autant.

Si aujourd'hui, devant mon ordinateur, les programmes de bio-informatique analysent en quelques secondes les séquences de centaines de gènes, au début je peinais des jours entiers sur une feuille blanche à décrypter pour une région seulement d'un seul gène, les bandes de mes immenses gels de polyacrylamide. Sans nostalgie aucune, car les actuelles possibilités offrent des outils illimités pour interroger la nature, j'ai l'intime conviction que ce long cheminement, ces contacts physiques quotidiens avec l'ADN m'ont définitivement forgé aux sciences de la vie. En évoluant depuis 29 ans aux frontières de la connaissance humaine du vivant, je n'ai fait qu'attiser encore plus profondément ma curiosité naturelle.

Tous ces travaux de recherches qui constituent mon long parcours professionnel me motivent désormais à postuler au doctorat. Ce diplôme qui concrétiserait non seulement l'évolution de mes connaissances dans les différents domaines de la biologie, mais constituerait également une reconnaissance particulière de mes travaux en neurosciences. De plus, un doctorat donnera une plus grande légitimité à mon projet de développer mes activités d'enseignement à l'université.

V. Bibliographie

- Arber, S., et al. (1997). "MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure." Cell **88**(3): 393-403.
- Black Elk, Raymond J. DeMallie. Le sixième grand-père. Black Elk et la grande vision. Edition du Rocher. collection nuage rouge.1999
- Barde, Y. A. (1990). "The nerve growth factor family." Prog Growth Factor Res **2**(4): 237-248.
- Bettler, B., et al. (1998). "GABAB receptors: drugs meet clones." Curr Opin Neurobiol **8**(3): 345-350.
- Bluthmann, H., et al. (1988). "T-cell-specific deletion of T-cell receptor transgenes allows functional rearrangement of endogenous alpha- and beta-genes." Nature **334**(6178): 156-159.
- Bonifer, C., et al. (1996). "Prerequisites for tissue specific and position independent expression of a gene locus in transgenic mice." J Mol Med (Berl) **74**(11): 663-671.
- Bonnefoy, J. Y., et al. (1997). "Structure and functions of CD23." Int Rev Immunol **16**(1-2): 113-128.
- Bruggemann, M., et al. (1993). "Designer mice: the production of human antibody repertoires in transgenic animals." Year Immunol **7**: 33-40.
- Bushell, T. J., et al. (2002). "Altered short-term synaptic plasticity in mice lacking the metabotropic glutamate receptor mGlu7." ScientificWorldJournal **2**: 730-737.
- Cooke, H. and S. Cross (1988). "pYAC-4 Neo, a yeast artificial chromosome vector which codes for G418 resistance in mammalian cells." Nucleic Acids Res **16**(24): 11817.
- Copeland, N. G., et al. (2001). "Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics." Nat Rev Genet **2**(10): 769-779.
- Cryan, J. F., et al. (2003). "Antidepressant and anxiolytic-like effects in mice lacking the group III metabotropic glutamate receptor mGluR7." Eur J Neurosci **17**(11): 2409-2417.
- de Weck, A. L., et al. (1985). "Factors influencing human IgE synthesis in vitro and in vivo." Int Arch Allergy Appl Immunol **77**(1-2): 38-44.
- Doetschman, T., et al. (1987). "Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells." Nature **330**(6148): 576-578.
- Flor, P. J., et al. (1997). "A novel splice variant of a metabotropic glutamate receptor, human mGluR7b." Neuropharmacology **36**(2): 153-159.
- Gassmann, M., et al. (2004). "Redistribution of GABAB(1) protein and atypical GABAB responses in GABAB(2)-deficient mice." J Neurosci **24**(27): 6086-6097.

Holscher, C., et al. (2004). "Lack of the metabotropic glutamate receptor subtype 7 selectively impairs short-term working memory but not long-term memory." Behav Brain Res **154**(2): 473-481.

Holscher, C., et al. (2005). "Lack of the metabotropic glutamate receptor subtype 7 selectively modulates Theta rhythm and working memory." Learn Mem **12**(5): 450-455.

Hooper, M., et al. (1987). "HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells." Nature **326**(6110): 292-295.

Isken A, Tchorz J, Manneville C, Wirshing J, Leonhard B, Hennek T, Doche S, Traunecker A, Sansig G, Degl-Innocenti E, Isnardi I, Kinzel B. Generation of an Igh knock-out mouse model in a C57Bl/6 background. Method/Study Report, Novartis. 2011.

Isken A, Tchorz J, Manneville C, Wirsching J, Leonhard B, Hennek T, Doche S, Traunecker A, Sansig G, Degl-Innocenti E, Isnardi I, Kinzel B. Generation of an Igkc knock-out mouse model in a C57Bl/6 background. Method/Study Report, Novartis. 2011.

Jakobovits, A. (1995). "Production of fully human antibodies by transgenic mice." Curr Opin Biotechnol **6**(5): 561-566.

Jakobovits, A., et al. (2007). "From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice." Nat Biotechnol **25**(10): 1134-1143.

Jakobovits, A., et al. (1995). "Production of antigen-specific human antibodies from mice engineered with human heavy and light chain YACs." Ann N Y Acad Sci **764**: 525-535.

Kaupmann, K., et al. (2003). "Specific gamma-hydroxybutyrate-binding sites but loss of pharmacological effects of gamma-hydroxybutyrate in GABA(B)(1)-deficient mice." Eur J Neurosci **18**(10): 2722-2730.

Kisielow, P., et al. (1988). "Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules." Nature **335**(6192): 730-733.

Knopf, T., et al. (1995). "Metabotropic glutamate receptors: novel targets for drug development." J Med Chem **38**(9): 1417-1426.

Kouprina, N. and V. Larionov (2006). "TAR cloning: insights into gene function, long-range haplotypes and genome structure and evolution." Nat Rev Genet **7**(10): 805-812.

Kouprina, N., et al. (2006). "Selective isolation of large chromosomal regions by transformation-associated recombination cloning for structural and functional analysis of mammalian genomes." Methods Mol Biol **349**: 85-101.

Kuehn, M. R., et al. (1987). "A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice." Nature **326**(6110): 295-298.

Ludin, C., et al. (1987). "Cloning and expression of the cDNA coding for a human lymphocyte IgE receptor." EMBO J **6**(1): 109-114.

Lufkin, T., et al. (1991). "Disruption of the Hox-1.6 homeobox gene results in defects in a region corresponding to its rostral domain of expression." Cell **66**(6): 1105-1119.

Luthi, A., et al. (1997). "Endogenous serine protease inhibitor modulates epileptic activity and hippocampal long-term potentiation." J Neurosci **17**(12): 4688-4699.

Mansuy, I. M., et al. (1993). "Variable and multiple expression of Protease Nexin-1 during mouse organogenesis and nervous system development." Development **119**(4): 1119-1134.

Masugi, M., et al. (1999). "Metabotropic glutamate receptor subtype 7 ablation causes deficit in fear response and conditioned taste aversion." J Neurosci **19**(3): 955-963.

Matukonis, M., et al. (2002). "Development of second- and third-generation bovine immunodeficiency virus-based gene transfer systems." Hum Gene Ther **13**(11): 1293-1303.

Mohajeri, M. H., et al. (1996). "Neurite outgrowth on non-permissive substrates in vitro is enhanced by ectopic expression of the neural adhesion molecule L1 by mouse astrocytes." Eur J Neurosci **8**(6): 1085-1097.

Molina, R. P., et al. (2002). "Mapping of the bovine immunodeficiency virus packaging signal and RRE and incorporation into a minimal gene transfer vector." Virology **304**(1): 10-23.

Moll, J., et al. (1992). "Transgenes encoding mutant simian virus 40 large T antigens unmask phenotypic and functional constraints in thymic epithelial cells." Oncogene **7**(11): 2175-2187.

functions in these cells are regulated by cellular differentiation and interleukin 4 (IL-4).

Moll, J., et al. (1992). "Thymic hyperplasia in transgenic mice caused by immortal epithelial cells expressing c-kit ligand." Eur J Immunol **22**(6): 1587-1594.

Moll, J., et al. (1991). "The murine rac1 gene: cDNA cloning, tissue distribution and regulated expression of rac1 mRNA by disassembly of actin microfilaments." Oncogene **6**(5): 863-866.

Moll, J., et al. (1996). "The pattern of prothymosin alpha gene expression coincides with that of myc proto-oncogenes during mouse embryogenesis." Histochem J **28**(1): 45-52.

Mombereau, C., et al. (2004). "Genetic and pharmacological evidence of a role for GABA(B) receptors in the modulation of anxiety- and antidepressant-like behavior." Neuropsychopharmacology **29**(6): 1050-1062.

Muyrers, J. P., et al. (1999). "Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination." Nucleic Acids Res **27**(6): 1555-1557.

Nicoletti, F., et al. (1996). "Metabotropic glutamate receptors: a new target for the therapy of neurodegenerative disorders?" Trends Neurosci **19**(7): 267-271.

Palmiter, R. D., et al. (1982). "Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes." Nature **300**(5893): 611-615.

Pluschke, G., et al. (1998). "Generation of chimeric monoclonal antibodies from mice that carry human immunoglobulin Cgamma1 heavy of Ckappa light chain gene segments." J Immunol Methods **215**(1-2): 27-37.

Reynolds, B. A. and S. Weiss (1992). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." Science **255**(5052): 1707-1710.

Riordan, S. M., et al. (2015). "Application of CRISPR/Cas9 for biomedical discoveries." Cell Biosci **5**: 33.

Sansig Gilles. L'expression in vivo de l'antigène T de SV40 dans les cellules épithéliales du thymus révèle en partie leur rôle dans la différenciation des thymocytes. Certificat d'Université de Biotechnologie. Université de rennes I. 1990

Sansig Gilles. Construction of reporter-gene-tagged human neurotrophin gene on yeast artificial chromosomes to generate transgenic mice. Diplomarbeit. Biozentrum der Universität Basel. Oktober 1995

Sansig, G., et al. (2001). "Increased seizure susceptibility in mice lacking metabotropic glutamate receptor 7." J Neurosci **21**(22): 8734-8745.

Sansig G, Bernard F, Bourikas D, Mir A. Establishment of a murine Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) model. Method/Study Report, Novartis. 2009.

Sansig G, Mir A. Establishment of an anti-MOG ELISA as read out for FTY720 treatment in murine EAE experiments. Method/Study Report, Novartis. 2009.

Schachner, M. (1989). "Families of neural adhesion molecules." Ciba Found Symp **145**: 156-169, discussion 169-172.

Schatzl, H. M. (1995). "Neurotrophic factors: ready to go?" Trends Neurosci **18**(11): 463-464.

Schoepp, D. D. and P. J. Conn (1993). "Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology." Trends Pharmacol Sci **14**(1): 13-20.

Schuler, V., et al. (2001). "Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B(1))." Neuron **31**(1): 47-58.

Silva, A. J., et al. (1992). "Impaired spatial learning in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice." Science **257**(5067): 206-211.

Silva, A. J., et al. (1992). "Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice." Science **257**(5067): 201-206.

Simonen, M., et al. (2003). "Systemic deletion of the myelin-associated outgrowth inhibitor Nogo-A improves regenerative and plastic responses after spinal cord injury." Neuron **38**(2): 201-211.

Stief, A., et al. (1994). "Mice deficient in CD23 reveal its modulatory role in IgE production but no role in T and B cell development." J Immunol **152**(7): 3378-3390.

Stief, A., et al. (1989). "A nuclear DNA attachment element mediates elevated and position-independent gene activity." Nature **341**(6240): 343-345.

Taylor, L. D., et al. (1992). "A transgenic mouse that expresses a diversity of human sequence heavy and light chain immunoglobulins." Nucleic Acids Res **20**(23): 6287-6295.

Texido, G., et al. (1994). "Transgene CD23 expression on lymphoid cells modulates IgE and IgG1 responses." J Immunol **153**(7): 3028-3042.

Thomas, K. R. and M. R. Capecchi (1986). "Introduction of homologous DNA sequences into mammalian cells induces mutations in the cognate gene." Nature **324**(6092): 34-38.

Thomas, K. R., et al. (1986). "High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome." Cell **44**(3): 419-428.

Vigot, R., et al. (2006). "Differential compartmentalization and distinct functions of GABAB receptor variants." Neuron **50**(4): 589-601.

Villemin A. Generation of transgenic vectors encoding human immunoglobulins, functionality assays and transgenesis in mice. Thèse de l'Université de Strasbourg. 20 Mai 2014.

von Boehmer, H. (1992). "T cell development and selection in the thymus." Bone Marrow Transplant **9 Suppl 1**: 46-48.

Wiznerowicz, M., et al. (2006). "Tuning silence: conditional systems for RNA interference." Nat Methods **3**(9): 682-688.

Wong, L. F., et al. (2006). "Lentivirus-mediated gene transfer to the central nervous system: therapeutic and research applications." Hum Gene Ther **17**(1): 1-9.



SUJET DE RECHERCHE :

Des souris *knock-out* pour le récepteur métabotrope au glutamate mGluR7 révèlent son rôle dans la cognition et les émotions

Remerciements

Il y a plus d'un an maintenant, j'ai entrepris une étrange aventure. Un voyage au centre de mon passé alors que mon quotidien depuis près de trente ans a toujours été orienté par et vers le futur. Semaine après semaine j'ai replongé dans mes cahiers de laboratoire et les revues scientifiques d'alors pour reconstituer mon cheminement au cœur de la recherche scientifique. Tout au long de ce voyage particulier, j'ai observé avec le recul d'aujourd'hui non seulement ma vie mais aussi celle de tous mes collègues, compagnons de route, amis, modèles et guides avec qui je partageais les découvertes qui composent cette thèse de doctorat. Écrire est une forme de synesthésie, une fusion, en nous, de différents sens, de différentes perceptions. Lorsque la simple idée d'un mot, de cette petite tache noire sur une page encore blanche fait soudain émerger tout un univers de sons, de formes, de couleurs, d'odeurs, de pensées, d'émotions, de souvenirs.

J'ai pris beaucoup de plaisir à écrire cette thèse, débutée il y a bien longtemps désormais, mais qui à la lumière des constats d'aujourd'hui démontre le potentiel des résultats d'alors.

Écrire, ce "miracle fécond", disait Proust, de "communiquer au milieu de la solitude". Si l'écriture est un acte solitaire, l'ensemble des travaux présentés tout au long de ce document est le fruit des efforts communs de très nombreux chercheurs dans de multiples disciplines scientifiques et j'aimerais bien sûr tous les remercier du fond du cœur. Sans eux, rien n'aurait été possible.

Avant tout je tiens absolument à remercier Etienne Weiss, mon directeur de thèse qui le premier m'a encouragé à entreprendre cette démarche. Qui tout au long de ces derniers mois s'est montré totalement disponible, ouvert, généreux et amical.

Merci à Madame Danièle Haug qui m'a offert la possibilité d'entreprendre cette démarche, qui m'a aidé, corrigé et guidé durant toute la rédaction de cette thèse.

Merci à mon mentor Herman Van der Putten pour m'avoir donné la chance de m'engager dans cette merveilleuse aventure qu'est la recherche scientifique au quotidien. Merci Herman de ta confiance, de nos passionnantes discussions. De cette liberté que tu m'as toujours laissée durant nos vingt années communes. Merci de ton amitié.

Merci à Joseph Szeszak, chef du personnel de Ciba qui a cru en moi et m'a mis le pied à l'étrier.

Merci à Hans Hofstetter qui le premier m'a offert un travail dans son département. Sans lui, rien n'aurait jamais commencé.

Merci à Juergen Moll et à Éric Lagasse, les deux premiers chercheurs qui m'ont réellement inspiré, ceux à qui j'aimerais tant ressembler un peu.

Merci à Catherine Regnier, Samuel Barbieri et à Jean-Louis Boulay, qui depuis toujours m'ont soutenu autant au laboratoire que dans la vie, qui m'ont lu et encouragé.

Merci à Pascale Oddoux, Gemma Texido, Florence Botteri, Isabelle Mansuy, Cornelia Di Gaetano, Fulvia Bono, Silvia Arber, Karen Huebscher, Doris Ruegg, Marie Gabrielle Ludwig, Gosia Kisielow, Elena Fattori, Katia Hoffele, Danielle Mathé, Mireille Redinger, Sabine Kauffmann, Christine Lapize, Geneviève Kuntzelmann, Birgit Ledermann, Claire-Marie Vacher, Valérie Schuler, Noemie Beluch, Sandrine Desrayaud, Elisabetta Traggiai, Emeline Thevenon, Aurore Villemin et ma compagne Bettina Leonhard.

Toutes dévouées à la science, toutes d'inépuisables sources d'inspirations et avec qui ce fut non seulement un très grand honneur de travailler mais également un immense bonheur.

Merci à Peter Schmit, Aribert Stief, Herman Eibel, Ueli Sutter, Graeme Bilbe, Bernd Kinzel, Gary Mac Master, Fred Asselberg, Norman Hartman, Markus Zwickl, Gerd Pluschke, Walter Schurter, Albert Schmidt, Hasan Mohajeri, Marc Urich, Jan Kisielow, Hanspeter Schoeb, Mathias Gsteiger, Benny Bettler, Klemmens Kaupmann, Andreas Lüthi, Martin Gassmann, Will Spooren, Johannes Mosbacher, Mario Pozza, Peter Waldmeier, Wolfgang Froestl, Peter Kelly, Martin Schwab, Brent Reynolds, Samuel Weiss, Rene Molina, Tianci Luo, Anthony Orth, Denis Monard, Pico Caroni, Jean-François Spetz, Frank Buxton, Peter Furst, Peter Philipsen, Joseph Pfeilschifter, Hans-Ruedi Olpe, Frederic Bernard, Dimitris Bourikas, Paul Smith, Marcelin Sablone, Anis Mir, Christoph Heusser, André Traunecker, Thomas Pietzonka, Qiang Zhou, Christian Schmedt, Johann Wirsching, Matthias Müller, Frederic Bassilana et Tewis Bouwmeester.

Tous d'immenses chercheurs sans qui jamais ce long et sinueux chemin parcouru n'aurait été d'aucune façon envisageable et encore moins possible.

Et pour terminer, merci tout particulièrement à Matazo Masugi, Shigetada Nakanishi, John Cryan, Peter Kelly, Peter Flor, Hans Neijt, Trevor Bushell, Vernon Clarke, Andrei Rozov, Nail Burnashev, Chantal Portet, Fabrizio Gasparini, Markus Schmutz, Klaus Klebs, Ryuichi Shigemoto, Rainer Kuhn, Thomas Knoepfel, David R. Hampson, Valerie J. Collett, Congxiao Zhang, Robert Duvoisin, Graham Collingridge, Christian Hölscher, Susanne Schmid, Peter Pilz, et Claudia Plappert.

Non seulement pour leurs idées, leurs suggestions mais aussi et surtout pour leurs prouesses techniques et scientifiques.

Table des matières

Table des matières.....	95
I. Introduction.....	103
1. Le cerveau : l'organe de la pensée	104
1.1. Le cerveau.....	104
1.2. Le cerveau câblé : connexion réseau, motif neuroanatomique de base.	106
1.3. La circulation de l'information.	107
2. Les bases biologiques de la pensée.....	111
2.1. Les synapses sont modifiables.	111
2.1.1. L'habituation	111
2.1.2. La sensibilisation.....	113
2.2. Le conditionnement classique.....	116
2.3. Une nouvelle classe d'actions synaptiques	117
2.4. Le nombre de synapses augmente.....	118
2.5. Deux formes de stockage mnésique.	118
2.6. Régler les synapses artificiellement.	119
2.7. PLT et mémoire déclarative.....	122
3. Le cerveau des émotions.....	123
3.1. La Neuroanatomie des émotions.	124
3.2. Une émotion particulière : la peur	125
3.2.1. L'apprentissage et la mémoire de la peur.....	125
3.2.2. Le conditionnement de la peur	126
3.2.3. La Neuroanatomie du conditionnement de la peur.....	127

3.2.4. Le mécanisme moléculaire sous-jacent à l'apprentissage et à la mémorisation de la peur.....	128
4. Les troubles psychiatriques et cognitifs liés au stress.....	128
5. La génération de souris knock-out.....	130
5.1. Les souris transgéniques comme modèle génétique.....	130
5.2. Pourquoi les souris ?	131
5.3. Le ciblage de gènes chez la souris : une analyse fonctionnelle du génome de mammifère	131
5.3.1. Les cellules embryonnaires souches de souris.....	132
5.3.2. Recombinaison homologe dans les cellules embryonnaires souches de souris	133
6. Phénotypage : les études de comportements chez la souris.....	136
6.1. Les épreuves d'évaluation des fonctions sensorimotrices.....	136
6.2. Les épreuves d'évaluation des fonctions affectives	136
6.3. Les épreuves d'évaluation des fonctions cognitives	138
7. La neurotransmission du glutamate.....	138
7.1. Les récepteurs du glutamate.....	139
8. Le récepteur mGluR7.....	143
8.1. La découverte du récepteur mGluR7.	143
8.2. La signalisation du récepteur mGluR7.....	145
8.3. Les interactions intracellulaires du récepteur mGluR7	146
9. Le récepteur mGluR7 : un régulateur potentiel des processus cognitifs et émotionnels.....	147
10. Des souris déficientes pour le récepteur mGlu7 : un outil important dans la dissection du rôle du récepteur mGlu7 dans la cognition et l'émotivité.	149
10.1. Les souris mGluR7-/- ont des déficits de mémoire de travail et dans les processus d'extinction	149
10.2. Les souris déficientes en récepteur mGluR7 ont une anxiété réduite.....	152

10.3. La déficience en mGluR7 provoque une perturbation de l'axe HPA chez la souris.	152
II. Résultats.....	155
1. Objectif du projet	156
3. Les souris dépourvues du récepteur métabotrope au glutamate mGluR7 présentent un effet antidépresseur et anxiolytique.	157
4. Des souris dépourvues du récepteur métabotrope au glutamate de type 7 démontrent une sensibilité accrue aux crises épileptiques.	158
5. Altération de la plasticité synaptique à court terme dans les souris transgéniques dépourvues du récepteur métabotrope au glutamate mGluR7.	160
6. L'absence de récepteur métabotrope au glutamate mGluR7 altère sélectivement la mémoire de travail à court terme, mais pas la mémoire à long terme.	160
III. Discussion.	163
1. La modulation pharmacologique du récepteur mGluR7 valide son rôle dans la cognition et les émotions	164
2. La susceptibilité à l'épilepsie.	166
3. Le mGluR7 et la plasticité synaptique.	167
4. mGluR7 : polymorphismes et troubles cliniques	169
Publications.....	173
Abstract.....	221
Bibliographie	225

Avant-Propos

À l'intérieur de notre crâne : cent milliards de neurones, dotés chacun de mille à dix mille connexions synaptiques, assistés de mille à cinq mille milliards de cellules gliales, le tout relié électriquement et chimiquement grâce à cinq mille sortes de molécules, dont une centaine de neuromédiateurs.

En fermant les yeux et en imaginant le visage d'un être cher, s'allume un réseau de quelques centaines de millions de neurones dans une véritable jungle. Les moindres souvenirs ou savoirs, les moindres aptitudes, habitudes, sensibilités sont en fait un réseau de neurones reliés par leurs synapses. Un réseau dont la dynamique ne s'arrête jamais.

Les milliards de milliards de réseaux neuronaux et synaptiques possibles dans un cerveau humain forment une entité en permanente reconstitution. Et quand j'utilise le terme « jungle », je l'entends quasiment au sens propre : les neurones et les cellules gliales qui les assistent colonisent notamment tout territoire vacant, telles les espèces végétales, animales ou bactériennes d'une véritable jungle grouillante de vie.

Si nous perdons un neurone par seconde, il est désormais établi que de nouveaux neurones naissent constamment dans la zone « sub-épendymaire », proche du bulbe rachidien, d'où ils migrent ensuite dans tout le tissu cérébral (André et al., 2012).

Le cerveau humain peut être considéré comme l'entité la plus complexe de l'univers connu, mais le feu d'artifice des découvertes récentes dû à l'effondrement des barrières disciplinaires dépasse l'entendement et a fait exploser les anciens schémas (Squire & Kandel, 2005)

En effet, notre cerveau est totalement élastique. On appelle cela aujourd'hui « la plasticité neuronale ». C'est le fait que quasiment n'importe quelle zone du cerveau est modelable et que les zones corticales spécialisées dans telle ou telle fonction sensorielle comme le toucher, la vision ou l'audition, ou motrice comme la commande de centaines de muscles peuvent se remplacer les unes les autres. Même âgé, handicapé, voire amputé de plusieurs lobes, le système nerveux peut ainsi se reconstituer et repartir à l'assaut des connaissances et de l'action sur le monde (Vincent & Liedo, 2013).

Descartes a instauré une immense coupure entre le corps et l'esprit. Aujourd'hui pourtant, les progrès de la biologie moléculaire qui ont permis d'intimes études de la communication cellulaire

interrogent ce dualisme du corps et de l'âme. En effet, les neurosciences ont désormais mis en lumière les mécanismes cellulaires et moléculaires de la mémoire. Ainsi au travers des découvertes permettant de décrire les différents systèmes de mémoire et le stockage mnésique, les neurosciences nous apprennent également qu'être rationnel, ce n'est pas se couper de ses émotions. Le cerveau qui pense, qui calcule, qui décide n'est pas autre chose que celui qui rit, qui pleure, qui aime. Il semblerait même que la capacité d'exprimer et ressentir des émotions est indispensable à la mise en œuvre des comportements rationnels (Damasio, 2010).

De plus, le cerveau est totalement social. Un cerveau n'existe jamais seul, il est toujours en résonance avec d'autres. Mieux, l'être humain est neuronalement constitué pour entrer en empathie avec autrui et aller à son secours. Ce concept de cerveau « neurosocial » est aussi important que la plasticité neuronale et tout aussi révolutionnaire, il signifie que nos neurones entrent sans arrêt en résonance avec ceux d'autrui ; nos intériorités sont en communication directe. C'est-à-dire que nos circuits neuronaux sont faits pour se mettre en phase avec ceux des autres. Partant de là, nous n'avons littéralement pas le même cerveau, donc pas la même vie, selon les relations que nous entretenons avec autrui (André et al., 2012).

Venant de la biologie moléculaire et ayant déjà travaillé plusieurs années dans le domaine de l'immunologie, je ne peux pas dire avec certitude ce qui a déclenché à l'origine mon intérêt pour les mécanismes neuraux qui sous-tendent le fonctionnement du cerveau. Par contre, je me souviens parfaitement à partir de quel moment j'ai acquis l'intime conviction que le récepteur métabotrope au glutamate de type 7 sera mon guide pour explorer la *jungle* à mes yeux d'antan, inextricable, qu'est notre cerveau.

Au début des années 90, je bénéficie d'une certaine expérience dans la manipulation des cellules embryonnaires souches (ES) de souris, et le laboratoire de biotechnologie dans lequel je travaille doit contribuer aux projets du tout nouveau département de Neurosciences de Ciba-Geigy. J'ai alors déjà réalisé plusieurs souris transgéniques pour soutenir des collaborations avec des instituts scientifiques comme le Frederick Miescher Institut (FMI) de Bâle et le Swiss Federal Institute of Technology de Zurich (ETHZ) (Mohajeri et al., 1996) (Luthi et al., 1997), et c'est donc naturellement que j'hérite d'un projet qui consiste à inactiver le gène du récepteur métabotrope au glutamate de type 7 (mGluR7) dans une souris transgénique afin d'élucider la fonction alors inconnue de ce récepteur. Comme je viens de participer au clonage et à la caractérisation du gène humain de mGluR7, j'utilise cet ADN complémentaire (ADNc) humain pour isoler une portion de l'ADN génomique de souris qui me permettra de construire un

vecteur génétique. J'ai passé beaucoup de temps, presque un an en 1994, à construire ce vecteur de ciblage, mais en deux mois, j'ai réussi à générer avec celui-ci, plusieurs clones de cellules souches de souris dans lesquels un allèle de mGluR7 était détruit. Des souris transgéniques knock-out pour le mGluR7 (mGluR7ko) dérivées de ces cellules souches ont ainsi vu le jour et, lorsque j'ai découvert trois semaines après leur naissance qu'elles étaient sujettes pour certaines à de sporadiques crises d'épilepsie, j'ai immédiatement eu la conviction que le mGluR7 allait m'aider à entreprendre l'étude du fonctionnement du cerveau.

En effet, en inactivant un des nombreux récepteurs au glutamate qu'expriment les neurones de mammifère, j'avais sérieusement perturbé la neurotransmission du principal neurotransmetteur excitateur du système nerveux central des vertébrés (Watkins, 1999). Je savais dès lors que j'avais identifié un important responsable de la transmission synaptique. L'étudier, éclaircir son rôle c'était suivre un guide qui m'ouvrait un sentier dans la « jungle » du cerveau

Au fil du temps et des expériences, un véritable lien physique s'est tissé avec le mGluR7 en général et mes souris mutantes en particulier. J'estime ce lien physique comme essentiel. Cette molécule et ses souris transgéniques n'ont pas été un sujet de recherche abstrait, mais bien une réalité physique quotidienne et l'unique source d'études théoriques permanentes durant dix ans. Au fur et à mesure des découvertes et des déconvenues, le mGluR7 m'a dirigé dans l'inextricable forêt de neurones qui compose notre cerveau.

Le mGluR7 a été mon infime faisceau de lumière pour éclairer une minuscule sente qui parcourt l'immense forêt qu'est le cerveau. En suivant de près sa trace, j'ai vécu de l'intérieur les cheminements scientifiques qui aujourd'hui ont révolutionné la neuroscience.

Ainsi en générant cette souris transgénique, j'ai significativement participé à démontrer le rôle fondamental d'un récepteur particulier au cœur de processus complexe (Sansig et al., 2001). En effet, il est aujourd'hui établi que le mGluR7 est à l'interface des fonctions cognitives et des émotions (O'Connor et al., 2010) et s'il n'existe pas encore d'explication complète de la conscience, l'étude de ces souris mGluR7ko, à l'instar de nombreux autres travaux, tendent à démontrer que l'esprit et le corps fonctionnent de manière indissociable (Ledoux, 2005).

Il est parfois difficile de bien cerner le métier de chercheur, tant les domaines de recherche sont diversifiés et impliquent d'importantes différences dans la pratique de ce métier, mais si la vocation première d'un chercheur est l'avancement de la science, mes motivations personnelles sont plutôt de soulager le patient. Ainsi, l'étude de la fonction du mGluR7 a toujours été conditionnée par l'espoir d'identifier une cible thérapeutique et mes travaux ont suggéré que ce récepteur n'est pas uniquement un important régulateur de la neurotransmission glutaminergique, mais également une innovante cible thérapeutique pour des maladies liées au stress comme la dépression et l'anxiété.

I. Introduction

1. Le cerveau : organe de la pensée
2. Les bases biologiques de la pensée
3. Le cerveau des émotions
4. Les troubles psychiatriques et cognitifs liés au stress
5. La génération de souris knock-out
6. Phénotypage : les études de comportement chez la souris
7. La neurotransmission du glutamate
8. Le récepteur mGluR7
9. Le récepteur mGluR7 : un régulateur potentiel des processus cognitifs et émotionnels
10. Des souris déficientes pour le récepteur mGluR7 : un outil important dans la dissection du rôle du régulateur mGluR7 dans la cognition et l'émotivité

1. *Le cerveau : l'organe de la pensée*

Les neurosciences cherchent activement une explication neurologique des phénomènes mentaux. Elles partent de l'hypothèse qu'il existe une corrélation entre les phénomènes mentaux et l'activité de certains groupes de cellules cérébrales (Shepherd, 2009).

Une activité régie est contrôlée par de nombreuses molécules, dont le récepteur métabotrope au glutamate de type 7 (mGluR7). Afin d'apprécier pleinement cette hypothèse et de décrire le rôle fondamental de mGluR7 dans ces processus mentaux, il convient d'examiner comment fonctionnent les cellules nerveuses ou neurones. Comment communiquent-elles et comment sont-elles organisées en réseaux locaux ou réparties, constituant ainsi le cerveau ?

1.1. *Le cerveau*

Le cerveau humain est reconnu comme l'objet le plus complexe de l'Univers. Il contient mille milliards de cellules, dont cent milliards sont des neurones constitués en réseaux, qui règlent l'intelligence, la créativité, l'émotivité, la conscience et la mémoire. Les fondements biologiques de la conscience, de la mémoire et des autres attributs de la pensée résultent d'une sélection naturelle, moteur d'une évolution de plusieurs millions d'années. Contrairement à un ordinateur, notre organe de la pensée n'a pas été construit à des fins précises ni conformément à des principes explicites. Le cerveau humain est divisé en deux gros hémisphères symétriques qui flanquent le noyau central, lequel se prolonge par la moelle épinière. Ces hémisphères plissés sont recouverts d'une couche d'environ deux millimètres d'épaisseur riche en cellules, le cortex. Ce dernier est anatomiquement et fonctionnellement subdivisé en zones sensorielles, en zones de commande du mouvement et en zones moins bien définies, où se déroulent des phénomènes associatifs. Enfoui à l'intérieur du lobe temporal du cerveau, le système limbique est le nom donné à un groupe de structures du cerveau jouant un rôle très important dans le comportement et en particulier, dans diverses émotions comme l'agressivité, la peur, le plaisir ainsi que la formation de la mémoire. Le système limbique comprend :

- l'amygdale qui joue un rôle important dans l'apprentissage, la mémorisation et la gestion des émotions et qui coordonne la réponse corporelle à la peur et à l'agression,
- le gyrus parahippocampique, une zone corticale adjacente à l'hippocampe participant à la visualisation des scènes et des lieux,
- l'hypothalamus, le principal lien entre le système nerveux et le système hormonal,

- les bulbes olfactifs, ces faisceaux de cellules nerveuses sensorielles allant de la cavité nasale à l'intérieur du cerveau. Ils traitent partiellement les informations relatives à l'odorat avant qu'elles ne soient conscientes.
- Les corps mamillaires, de petits amas de cellules nerveuses qui relaient les signaux au thalamus, contribuant ainsi à la vigilance et à la construction de la mémoire
- le gyrus cingulaire, cette partie du cortex limbique située au-dessus du corps calleux. (Swanson, 2012).

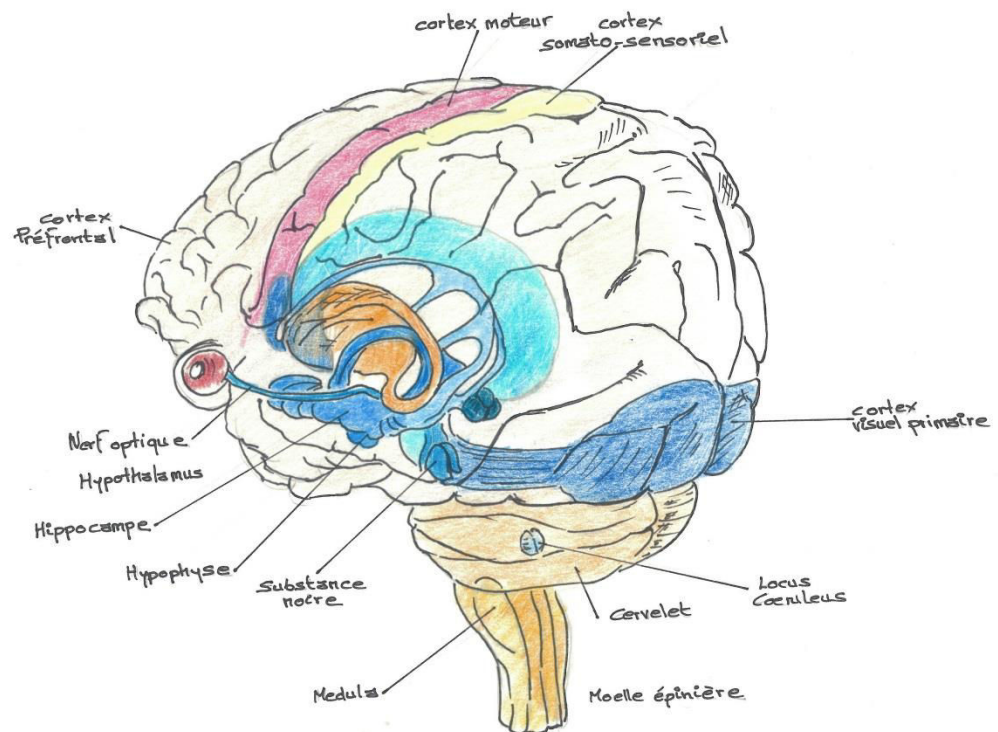


Figure 1 : Le cerveau, l'organe de l'esprit

Les grandes subdivisions anatomiques du cerveau permettent une cartographie approximative de ses capacités. En première approximation, le cerveau possède une symétrie bilatérale, avec deux hémisphères reliés par le corps calleux et d'autres ponts axonaux. Sa partie basale renferme des structures telles que la médulla, chargée de la régulation des fonctions autonomes telles que la respiration, la circulation et la digestion, et le cervelet qui assure la coordination des mouvements. À l'intérieur, le système limbique (en bleu) est un assemblage de structures qui commandent entre autres, le comportement émotif et la mémoire à long terme. La surface complexe des hémisphères cérébraux, nommée cortex à une épaisseur d'environ deux millimètres et une surface totale d'environ un mètre carré et demi. Au plan évolutif, la partie la plus ancienne du cortex fait partie du système limbique. Le néocortex plus récent et plus développé est subdivisé en lobes frontal, temporal, pariétal et occipital, séparés par des plis particulièrement profonds, ou sillons. La pensée et la perception se transmettent sous forme d'influx nerveux nommés potentiels d'action, qui se déplacent le long des axones du

cortex.

Certaines régions du cortex sont dotées de fonctions spécialisées et ont été étudiées en détail, telles que le cortex moteur (en rose), le cortex somatosensoriel (en jaune) et le système visuel (en violet). L'activité collective de toutes les régions du cerveau engendre les phénomènes neurologiques comme l'intelligence, la créativité, l'émotivité, la conscience et la mémoire.

1.2. Le cerveau câblé : connexion réseau, motif neuroanatomique de base.

Les connexions qui font du cerveau un organe « câblé » sont rendues possibles par les prolongements de ses neurones, les axones. Ces axones peuvent être distribués de manière diffuse ou se rassembler en faisceaux qui forment la substance blanche du cerveau. L'influx nerveux ne rencontre jamais de « cul-de-sac » dans le cerveau, son point d'arrivée dans une région est toujours un point de départ potentiel vers d'autres neurones. Chaque neurone du cerveau n'est qu'à quelques synapses de tous les autres et les neurones ne font de connexions significatives qu'avec certains autres neurones très spécifiques. Ainsi, Il existe des circuits d'interaction très particuliers entre certaines régions du cerveau. En simplifiant au maximum, vu la complexité des détails du câblage neural, on observe dans le cerveau trois sortes de systèmes neuroanatomiques :

- Le premier est le motif thalamocortical dont les groupes de neurones étroitement connectés sont reliés à la fois de façon locale et à distance par d'abondantes connexions réciproques. Lorsque les nerfs issus de différents récepteurs sensoriels comme les yeux, les oreilles ou la peau se déplacent vers le cerveau, chacun se connecte au *thalamus* pour former des faisceaux spécifiques de neurones appelés noyaux. Les neurones postsynaptiques de chaque noyau thalamique spécifique projettent alors des axones vers des aires particulières du cortex. Les nombreuses connexions qui relient le thalamus et le cortex ont une caractéristique frappante : non seulement le cortex reçoit beaucoup d'axones venus des neurones thalamiques, mais des fibres axonales réciproques retournent aussi du cortex au thalamus. Ce type de connexions abonde également au sein du cortex lui-même, on les nomme *tractus corticocortical*, tel le paquet de fibres appelé corps calleux qui connecte les deux hémisphères du cortex par plus de deux cents millions d'axones réciproques. Chaque noyau thalamique spécifique ne se connecte pas directement à n'importe quel autre. Cependant à la périphérie du *thalamus*, le noyau réticulé se connecte aux noyaux spécifiques et peut inhiber leur activité.
- Le deuxième est la structure polysynaptique en boucle des circuits inhibiteurs des ganglions de base. Les ganglions de base sont situés au centre du cerveau et sont liés au cortex via le *thalamus*. Leur mode de connexion neurale repose sur des circuits formés de synapses successives et de boucles polysynaptiques reliant les différents ganglions. Si l'on n'observe pas

dans les ganglions de base les structures de connexions réciproques qu'on peut voir dans le cortex lui-même et entre celui-ci et le *thalamus*, la plus grande partie de l'activité des ganglions de base passe par les neurones inhibiteurs qui ont pour neurotransmetteur le GABA. Pour autant, puisqu'il peut y avoir inhibition de l'inhibition ou « *désinhibition* » dans ces boucles, elles peuvent aussi bien stimuler les neurones cibles qu'arrêter leur activité.

- Le troisième se compose des systèmes ascendants. Ces systèmes agissent sur les réponses neuronales qui affectent l'apprentissage et la mémoire, mais qui contrôlent aussi les réponses corporelles nécessaires à la survie. Ils ont chacun un neurotransmetteur différent et, à partir de leur noyau d'origine, ils envoient des axones du haut en bas du système nerveux pour former une structure qui se disperse. Ces noyaux comprennent le *locus ceruleus*, le noyau raphé et les divers noyaux cholinergiques ainsi que l'*hypothalamus*. Ce qui est particulièrement étonnant avec les systèmes ascendants, c'est qu'en se projetant un peu partout, chacun agit sur d'importantes populations de neurones de façon simultanée en libérant son neurotransmetteur spécifique à la manière d'un tuyau d'arrosage qui fuit. (Edelman, 2004)

1.3. La circulation de l'information.

Les spectaculaires synthèses de la vie mentale s'établissent aux interfaces entre les entrées et les sorties des informations depuis les cellules nerveuses qui constituent le cerveau. En d'autres termes, les influx nerveux circulant dans l'architecture neuronale du cerveau sous-tendent tous les phénomènes mentaux. La capacité de communication des neurones produit l'ensemble des aspects de notre vie mentale, depuis la perception sensorielle jusqu'au contrôle du mouvement, depuis la génération de la pensée jusqu'à l'expression de sentiments. Il est donc d'autant plus important d'expliquer comment l'information est transmise entre les neurones. (Squire & Kandel, 2005)

Les neurones sont liés localement les uns aux autres pour former, dans certaines fractions du cerveau, un réseau dense appelé matière grise et ils communiquent sur de longues distances par l'intermédiaire de zones appelées matière blanche. Différents neurones peuvent prendre un grand nombre de configurations et il peut y en avoir plus de deux cents différentes sortes dans le cerveau des mammifères. Cependant, un neurone est polaire et consiste toujours en un corps cellulaire et un ensemble arborescent d'extensions appelées dendrites ainsi qu'une longue extension spécialisée, dite axone, qui le connecte à d'autres neurones par le biais de synapses.

Les signaux circulent le long des axones, sous forme d'impulsions électriques nommées « potentiel d'action » parce qu'ils se propagent *activement*. Un potentiel d'action provient d'une perturbation du potentiel transmembranaire de repos qui est d'environ 65 mV. Lorsque le potentiel transmembranaire d'un neurone se réduit de -65 à -75 mV, on parle alors de *dépolarisation*, celui-ci augmente sa capacité à générer un potentiel d'action. Ainsi une dépolarisation est excitatrice. À l'inverse, dans le cas d'une augmentation de la valeur absolue du potentiel membranaire de repos de -65 à -75 mV, appelée *hyperpolarisation*, les neurones en question diminuent leur génération de potentiels d'actions. L'hyperpolarisation est inhibitrice.

Le potentiel d'action est donc un signal électrique dépolarisant qui se propage à partir des dendrites et du corps cellulaire du neurone, le long de l'axone jusqu'aux terminaisons présynaptiques, où le neurone entre en contact avec un autre neurone.

Le potentiel d'action est un changement de potentiel électrique au niveau de la membrane du neurone, créé par l'entrée des ions sodium (Na^+) dans la cellule et la sortie subséquente des ions potassium (K^+), à travers des pores spécifiques de la membrane cellulaire, les *canaux ioniques*. Les canaux ioniques s'ouvrent et se ferment selon une séquence précise le long des voies du signal, créant un changement de potentiel qui se propage le long de la cellule. Les potentiels d'action se déplacent le long de la membrane de l'axone sans faille ou distorsion, à des vitesses de conduction de 1 à 100 mètres par seconde. Le potentiel d'action est un signal électrique en tout ou rien, rapide et transitoire, dont l'amplitude est de 100 à 120 mV et la durée à un endroit donné, de 1 à 10 millisecondes. L'amplitude du potentiel d'action reste constante tout au long de l'axone, car l'impulsion en tout ou rien est continuellement générée par la membrane lors de sa propagation le long de l'axone (Fig. 2). (Shepherd, 1994)

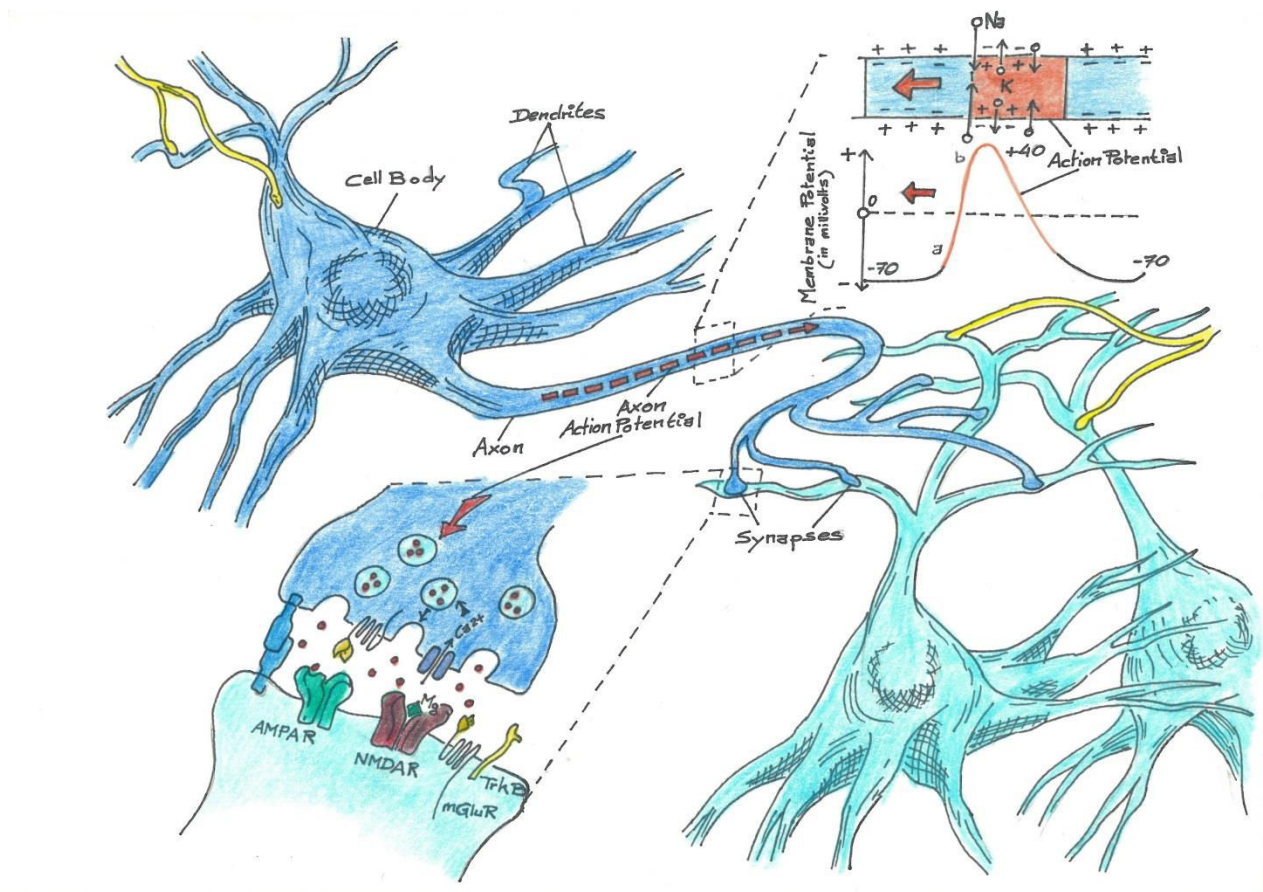


Figure 2 : Comment les neurones communiquent.

Un neurone qui vient d'être stimulé (en bleu foncé) transmet des signaux à d'autres neurones (en bleu pâle) en envoyant des impulsions électriques, les potentiels d'action. Ces impulsions se propagent le long de l'axone unique de la cellule. Elles sont ensuite converties en signaux chimiques dans les synapses, les points de contact entre neurones. Le neurone qui émet le signal est appelé neurone présynaptique, et celui qui reçoit ce signal est le neurone postsynaptique. Lorsqu'un neurone est au repos, sa membrane externe maintient un potentiel électrique de -70 mV. La membrane maintient un tel potentiel en pompant des ions potassium (K^+) hors de la cellule, plus rapidement qu'elle ne laisse entrer des ions sodium (Na^+). La stimulation par d'autres cellules augmente l'entrée du sodium. Ainsi, lorsque les ions sodium s'accumulent au-delà d'un seuil critique, le neurone engendre un potentiel d'action. Le potentiel membranaire s'inverse momentanément (a), puis revient en quelques millisecondes à son état négatif (b). Ces changements ioniques provoquent l'entrée d'ions sodium supplémentaires en aval de la zone axonique modifiée, amorçant ainsi la propagation de l'influx nerveux sur toute la longueur de l'axone (flèche rouge). Lorsque l'influx nerveux atteint les terminaisons des axones, ces terminaisons libèrent des molécules de neuromédiateur.

Ces molécules diffusent dans la synapse et se fixent à des récepteurs qui leur sont spécifiques, présents sur des dendrites et d'autres parties des cellules postsynaptiques. Cette fixation conduit les neurones récepteurs à ouvrir des canaux ioniques, ce qui entraîne la production de nouveaux potentiels d'action.

Notre compréhension première des mécanismes de la communication intracérébrale date du début du XX^e siècle et de l'extraordinaire contribution du célèbre anatomiste espagnol, Santiago Ramon y Cajal. En formulant la doctrine du neurone, mais surtout en découvrant que les neurones communiquent les

uns avec les autres au niveau de points de contact très spécialisés, les synapses, Cajal a inventé la neurobiologie.

Une synapse est formée de trois composantes : une terminaison présynaptique, une cellule cible postsynaptique et un petit espace entre les deux qui sépare les deux neurones. Cet espace appelé fente synaptique mesure environ 20 nanomètres de large. La terminaison présynaptique d'une cellule communique à travers la fente synaptique soit avec le corps cellulaire, soit avec les dendrites d'une cellule cible postsynaptique (Fig. 2).

Le courant produit par un potentiel d'action dans la cellule présynaptique ne peut pas franchir directement l'espace synaptique pour activer la cellule cible postsynaptique. Le signal provoque un événement majeur au niveau de la synapse. Au moment où le potentiel d'action atteint la terminaison présynaptique, il provoque l'ouverture des canaux de la membrane aux ions calcium (Ca^{2+}) et l'entrée importante et rapide des ions Ca^{2+} dans les terminaisons présynaptiques.

Cette augmentation de Ca^{2+} provoque la libération d'une substance chimique communément appelée *neurotransmetteur*. Ce neurotransmetteur diffuse alors dans l'espace synaptique, où il agit comme un signal cible en se liant avec son récepteur spécifique qui se trouve à la surface de la cellule postsynaptique. L'interaction du neurotransmetteur avec son récepteur entraîne un potentiel synaptique exciteur dépolarisant dans le neurone postsynaptique qui, s'il est assez grand, génère à son tour un potentiel d'action dans ce dernier.

Les différentes régions du cerveau ont différents neurotransmetteurs dont les propriétés changent le *timing*, l'amplitude et la succession de l'éveil neuronal. Pour assurer et préserver les structures complexes de l'activité dynamique dans le cerveau, certains neurones sont inhibiteurs, ils suppriment ainsi l'éveil des autres neurones qui sont excitateurs.

Ainsi les neurotransmetteurs couramment utilisés par les neurones sont des acides aminés ou leurs dérivés. Le glutamate est le neurotransmetteur le plus couramment utilisé par les neurones excitateurs alors que l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) est propre aux neurones inhibiteurs.

Alors que le potentiel d'action est un signal ample, invariant, en tout ou rien, le signal au niveau de la synapse, le potentiel synaptique, est variable et modifiable. Ces deux dernières propriétés particulières de la transmission du signal au niveau de la synapse sous-entendent les plus remarquables activités du cerveau, l'apprentissage, la mémoire et l'expression des sentiments (Kandel, 2012a).

2. Les bases biologiques de la pensée.

Au cours des trois dernières décennies, la neurobiologie, c'est-à-dire l'étude du cerveau, et la psychologie cognitive, ou l'étude de la pensée, ont progressivement fusionné pour éclairer d'un jour nouveau les phénomènes de la perception, du langage, de la mémoire et de la conscience. Grâce notamment aux travaux effectués sur l'apprentissage sur des modèles animaux, les bases cellulaires et moléculaires de ces fonctions mentales sont aujourd'hui entrevues. Ainsi l'apprentissage, c'est-à-dire l'acquisition de nouvelles connaissances et la mémoire à la conservation des connaissances acquises semble résulter de modifications de l'intensité de couplage entre les neurones du cerveau (Kandel & Hawkins, 1992).

2.1. Les synapses sont modifiables.

L'expérience modifie la synapse, car non seulement les synapses sont versatiles dans leur structure et dans leurs fonctions, mais elles s'avèrent également extrêmement adaptables, on dit aussi plastiques, ce qui sous-entend que les synapses ont la capacité de se modifier (Kolb & Whishaw, 2013).

Par une remarquable intuition Ramon y Cajal formula dès la fin du XIX^e siècle l'hypothèse de la plasticité synaptique, selon laquelle la force des connexions synaptiques, la facilité avec laquelle le potentiel d'action d'une cellule excite ou inhibe sa cellule cible, n'est pas fixée, mais modifiable. Cajal postulait que la force synaptique pouvait être modifiée par l'activité neuronale, suggérant ainsi que l'apprentissage pourrait utiliser la malléabilité des synapses et produirait des modifications prolongées de la force des connexions synaptiques en provoquant la croissance de nouvelles synapses. La persistance de ces modifications anatomiques pourrait servir de fondement à la mémoire.

Cette idée selon laquelle, l'apprentissage pouvait être sous-tendu par des changements structurels à l'échelle de la synapse a par la suite été développé par Donald O. Hebb dans son livre « L'Organisation du Comportement » en 1949. Selon Hebb, lorsqu'un axone d'une cellule A est proche d'une cellule B et participe de manière répétée et persistante à son activation, des processus de croissance ou des changements métaboliques prennent place dans l'une des cellules ou dans les deux, de sorte que l'efficacité de A, en tant que l'une des cellules activant B, se trouve augmentée (Milner et al., 1998).

2.1.1. L'habituation

Le premier exemple de plasticité synaptique fût démontré chez l'aplysie, un mollusque marin, lorsque Eric Kandel et Irving Kupfermann réalisèrent qu'elle possède un réflexe de retrait défensif. En

effet, cet invertébré possède un organe respiratoire externe, la branchie, qui est partiellement recouverte par le repli du manteau. Celui-ci a un prolongement charnu, le siphon. Quand on touche légèrement le repli du manteau ou le siphon, ce dernier se contracte et la branchie se rétracte brusquement dans une cavité située sous le repli du manteau (Fig. 3).

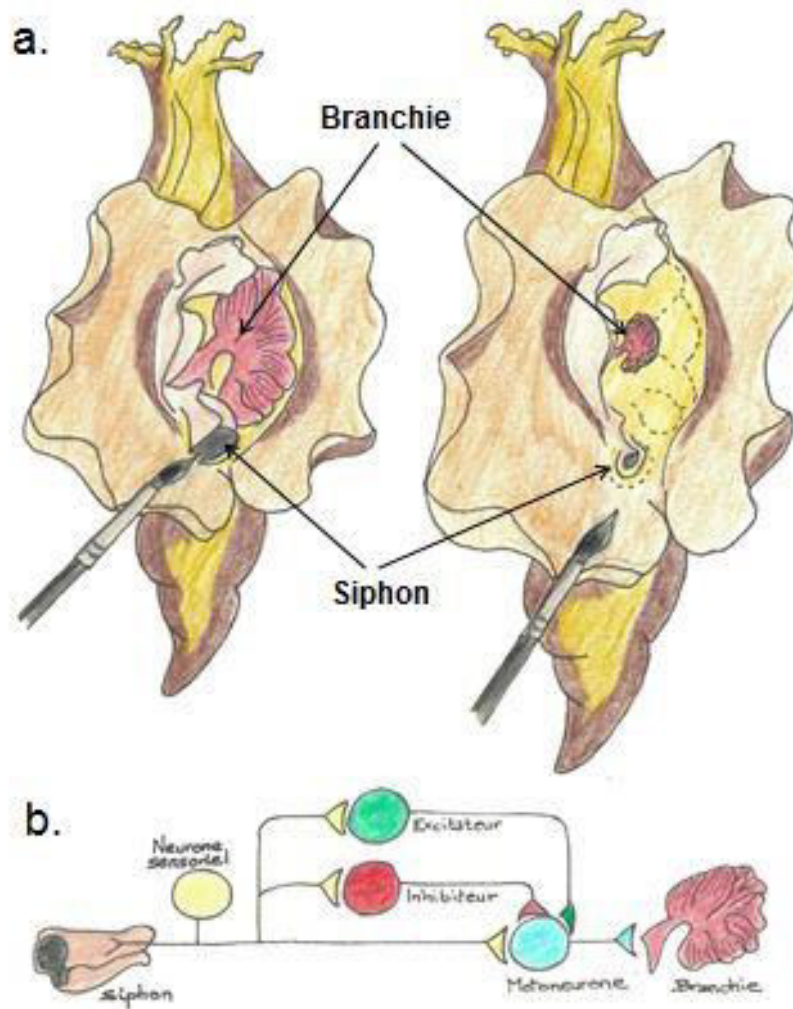


Figure 3 : a. Le réflexe de retrait de la branchie et du siphon chez l'aplysie. Une légère stimulation tactile du siphon avec un pinceau (à gauche) entraîne une contraction du siphon et un retrait de la branchie sous les replis du manteau.

b. Représentation très schématique du réflexe de retrait de la branchie, ne montrant qu'un exemplaire de chaque type de neurone impliqué.

Le circuit neuronal de ce comportement a été tracé au début des années 1970. La stimulation de la peau du siphon active deux ensembles de 40 neurones sensoriels qui à leur tour activent directement les

6 motoneurones de la branchie et les 7 du siphon ainsi que plusieurs groupes d'interneurones excitateurs et inhibiteurs qui projettent également sur les motoneurones (Fig. 3b) (Kandel, 2009).

En réponse à une nouvelle stimulation du siphon, les neurones sensoriels recevant l'information du siphon excitent fortement les interneurones et les motoneurones de la branchie. Ces informations convergent vers les motoneurones et les font décharger de façon répétée, entraînant un réflexe brusque de rétraction de la branchie. Si le stimulus est répété, la réponse réflexe diminue. Un potentiel d'action dans n'importe quel neurone sensoriel produit alors encore un potentiel synaptique excitateur dans les deux types de cellules cible : les interneurones et les motoneurones, cependant, ce potentiel synaptique est plus faible. Il est si faible qu'il ne suscite dans un premier temps que très peu de potentiel d'action dans les cellules cibles, puis plus du tout. Comme les connexions entre les neurones sensoriels et leurs cibles s'affaiblissent quand les stimulations tactiles du siphon sont répétées, un potentiel d'action dans les neurones sensoriels ne produit plus aussi facilement un potentiel d'action dans les interneurones ou dans les motoneurones. De plus, les connexions synaptiques excitatrices entre les interneurones excitateurs et les motoneurones s'affaiblissent également. Il en résulte une réduction de l'amplitude de la réponse réflexe de rétraction de la branchie, autrement dit, une habituation (Castellucci and Kandel, 1976).

En étudiant la dépression synaptique qui se produit dans la connexion entre un neurone sensoriel et un motoneurone lors de cette habituation, Castellucci, Kandel et leurs collaborateurs ont non seulement observés qu'un affaiblissement durable proportionnel aux sessions d'entraînement peut être obtenu, mais aussitôt que les synapses retrouvent leurs capacités normales, l'animal recommençait à répondre aux stimulations tactiles en retirant brusquement sa branchie et son siphon. D'un point de vue moléculaire, ils ont également démontré que la diminution des potentiels synaptiques résulte exclusivement d'une diminution du nombre de paquets de transmetteurs libérés par chaque potentiel d'action (Mayford et al., 2012).

Ainsi des connexions synaptiques élémentaires sous-tendent les changements plastiques consécutifs à l'apprentissage et ces changements durables forment la base cellulaire du stockage mnésique à court terme.

2.1.2. La sensibilisation

L'habituation permet à un animal d'apprendre les propriétés des stimuli sans importance. La sensibilisation, par contre, lui permet d'apprendre celles des stimuli nocifs ou menaçants. Le réflexe de

retrait de la branchie chez l'aplysie, très nettement atténué par l'habituation, se renforce tout aussi nettement avec la sensibilisation. Après avoir reçu un choc sur la queue, la réaction de l'aplysie à la stimulation du siphon est fortement renforcée : elle rétracte davantage sa branchie qui se trouve alors entièrement dans la cavité du manteau. La mémoire de l'animal pour ce stimulus nociceptif se manifeste par la durée du renforcement du réflexe de retrait de la branchie à chaque stimulation tactile du siphon, et elle est d'autant plus durable que le stimulus nociceptif est répété. Un simple choc sur la queue produit un souvenir à court terme qui dure quelques minutes. Quatre ou cinq chocs entraînent un souvenir à long terme qui dure au moins deux jours et davantage d'essais produisent un souvenir qui va durer pendant plusieurs semaines (Kandel et al., 2014).

Si l'habituation provoque une diminution de la force synaptique, la sensibilisation provoque au contraire un renforcement. Ainsi l'application d'un stimulus nociceptif sur la queue augmente le nombre de connexions synaptiques dans le circuit neuronal du réflexe de retrait de la branchie, dont les connexions réalisées par les neurones sensoriels de la peau du siphon à la fois sur les motoneurones et les interneurones, ainsi que les connexions entre les interneurones et les motoneurones (Fig. 4a).

Les mêmes connexions peuvent donc participer au stockage de différentes formes de mémoire : les synapses dont la force est augmentée servent de site de stockage mnésique pour certaines formes d'apprentissage, comme la sensibilisation, et les synapses dont la force est diminuée servent de site de stockage pour d'autres formes d'apprentissage, comme l'habituation. Ces études de la sensibilisation ont mis en évidence les différents mécanismes moléculaires utilisés par les neurones pour permettre une plasticité synaptique à court terme.

Un neurotransmetteur modulateur, libéré pendant l'apprentissage, active au sein de certains neurones un second messenger signalant la voie dont l'activité peut persister pendant plusieurs minutes. En recrutant l'AMPC, la voie du second messenger amplifie l'action du neurotransmetteur. L'AMPC active ensuite la PKA, ce qui conduit à la fermeture des canaux K^+ , et amène davantage de Ca^{2+} dans les terminaisons présynaptiques. De plus, l'AMPC et la PKA activent directement une famille de protéines cibles qui ne requièrent pas le Ca^{2+} , mais agissent sur la mobilisation et la fusion de vésicules, ce qui augmente encore la libération de neurotransmetteur. De cette façon, les connexions synaptiques sont renforcées pendant toute la durée de la mémoire à court terme (Castellucci & Kandel, 1976).

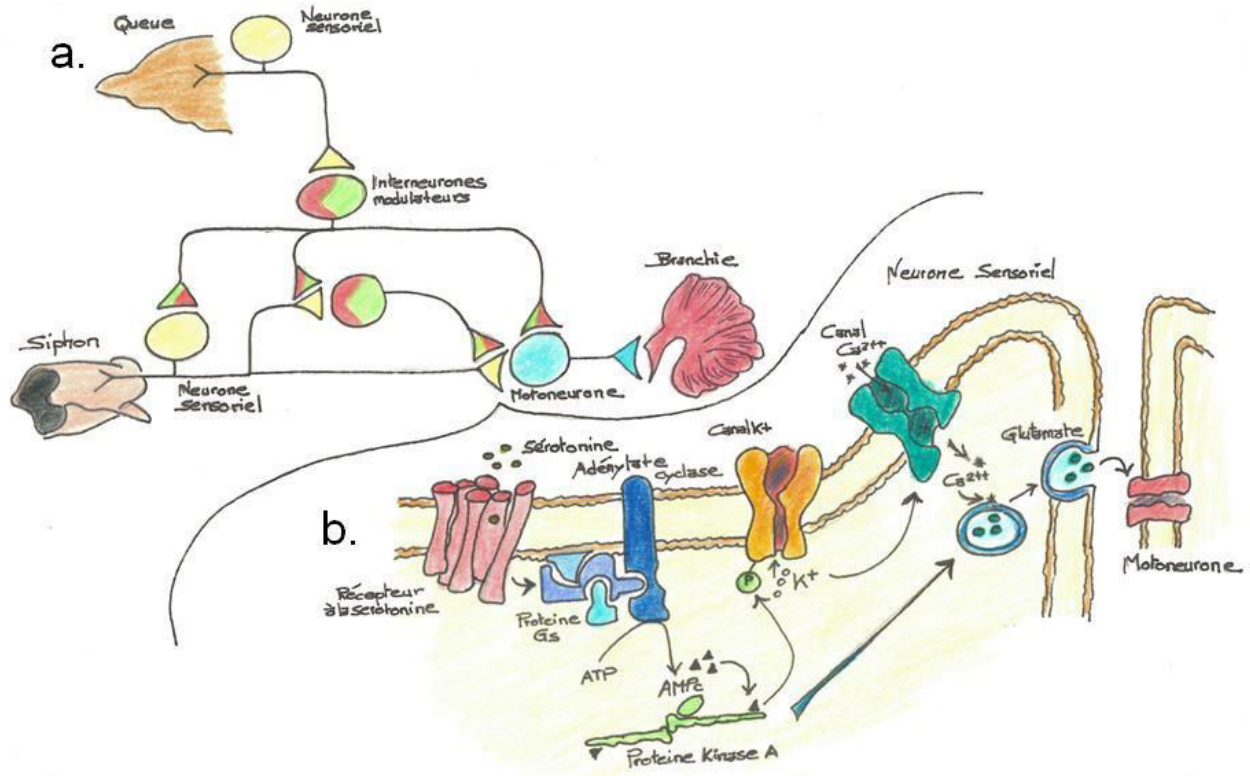


Figure 4 : a. Le Circuit de la sensibilisation du réflexe du retrait de la branchie chez l'aplysie.

Un seul neurone de chaque type est représenté par souci de simplification. Un stimulus nociceptif appliqué sur la queue active les neurones sensoriels qui excitent des interneurones modulateurs. Les signaux de ces interneurones réalisent des contacts synaptiques avec les neurones sensoriels du siphon et augmentent la libération de neurotransmetteur.

b. Les étapes biochimiques de la facilitation présynaptique du neurone sensoriel.

La sérotonine (neurotransmetteur) se lie aux **récepteurs sérotoninergiques**, aussi appelés **récepteurs 5-hydroxytryptamine** (abrégiés en **5-HT**), qui après une série d'étapes impliquant le couplage avec une protéine Gs, conduit à l'activation de l'effecteur enzymatique adénylate cyclase, à une augmentation du niveau d'AMPc, et finalement à l'activation de la protéine kinase AMPc-dépendante (PKA). La PKA agit au moins sur deux sites. Premièrement, elle ferme les canaux K⁺, provoquant une augmentation du potentiel d'action, et en conséquence une augmentation du flux entrant de Ca²⁺ au travers des canaux calciques. L'amplification du potentiel d'action augmente à son tour la libération de neurotransmetteurs. Deuxièmement, la PKA agit directement sur les étapes des mécanismes de libération.

L'habituation et la sensibilisation sont les deux exemples d'apprentissage les plus simples, car un individu n'apprend les propriétés que d'un seul type de stimulus. Elles sont considérées comme non associatives. L'association de deux stimuli nécessite un apprentissage plus complexe appelé le conditionnement classique, décrit pour la première fois par Ivan Pavlov au début du XX^e siècle en étudiant les réflexes digestifs chez le chien. Le conditionnement classique, également appelé conditionnement pavlovien s'effectue lorsqu'un *stimulus neutre* (SN), c'est-à-dire un stimulus qui ne déclenche, de prime abord, aucune réponse est associé à un *stimulus inconditionnel* (SI) qui lui,

déclenche une réponse (inconditionnelle) de manière réflexe, sans apprentissage nécessaire. Ce *stimulus inconditionnel* déclenche automatiquement une certaine réponse : la *réponse inconditionnelle* (RI). Puis, en présentant de façon régulière et fréquente un *stimulus neutre* en présence du *stimulus inconditionnel* une association habituellement inconsciente se crée entre les deux stimuli. Ainsi, le *stimulus neutre* se transforme en *stimulus conditionnel* (SC) et reprend une réponse similaire, sinon une réponse identique, à celle du *stimulus inconditionnel* (donc, à la *réponse inconditionnelle*). Cette réponse est alors la *réponse conditionnelle* puisqu'elle reste la réponse voulue, celle du conditionnement classique (Rescola & Wagner, 1972).

2.2. Le conditionnement classique.

En 1983, Eric Kandel et ses collaborateurs ont montré que le réflexe de retrait de la branchie chez l'aplysie pouvait se prêter au conditionnement classique. Un léger contact ou un faible choc électrique appliqué sur le siphon est utilisé comme SN et un courant électrique fort appliqué sur la queue est utilisé comme SI. Lorsque ces deux stimuli sont associés pendant une dizaine d'essais, la petite stimulation du siphon parvient à déclencher un retrait marqué de la branchie et du siphon et conduit ainsi à une libération supplémentaire de neurotransmetteur. En effet, les neurones sensoriels libèrent du glutamate qui active deux types de récepteurs ionotropiques : un récepteur conventionnel et un récepteur N-Méthyl-D-aspartate (NMDA) favorisant le flux de calcium. Dans des conditions comme l'habituation et la sensibilisation, seul le récepteur au glutamate conventionnel est actif, car le canal du récepteur NMDA est bloqué par des ions magnésium (Mg^{2+}). Cependant, lorsque le SC et le SI sont appariés, le motoneurone génère toute une série de potentiels d'action qui entraînent l'expulsion du Mg^{2+} du canal NMDA. Le Ca^{2+} fait alors irruption par le canal NMDA dans le motoneurone postsynaptique et déclenche la production d'un messenger rétrograde qui informe les cellules présynaptiques d'augmenter la libération de neurotransmetteur (Hawkins et al., 1983).

Ces études du conditionnement classique ont apporté deux données fondamentales. Premièrement, elles fournissent un exemple des multiples facettes d'une même synapse : les mêmes connexions synaptiques participent à trois types d'apprentissage (l'habituation, la sensibilisation et le conditionnement classique) et contribue ainsi à différentes formes de stockage mnésique. Deuxièmement, elles illustrent que même des formes complexes d'apprentissage et de stockage mnésique utilisent des mécanismes de plasticité synaptique à la fois pré- et postsynaptiques de façon combinée (Hawkins & Kandel, 1984). Des variantes de ce mécanisme hebbien ont été découvertes depuis dans le cerveau de mammifères et sont utilisées pour stocker des souvenirs.

2.3. Une nouvelle classe d'actions synaptiques

Un choc électrique appliqué sur la queue produit une sensibilisation du réflexe de retrait de la branchie. La durée de la rétention dépend du nombre de chocs électrique sur la queue. Un choc produit un souvenir à court terme durant quelques minutes. Ce souvenir à court terme ne requiert pas la synthèse d'une nouvelle protéine. Au contraire, quatre ou cinq chocs sur la queue entraînent un souvenir à long terme durant un jour ou plus, et un apprentissage plus long produit un souvenir encore plus persistant, durant des semaines. Ces modifications plus durables exigent la synthèse de nouvelles protéines. Ainsi la sensibilisation répétée à des stimuli permet à la PKA d'être transférée au noyau, où elle active une cascade de réactions géniques qui initie, comme nous le verrons au chapitre suivant, un processus de croissance stable et auto-entretenu au sein du neurone. Un neurotransmetteur modulateur peut donc avoir une double fonction : d'une part, comme nous l'avons vu au chapitre précédent, une exposition unique produit une modification transitoire de la force synaptique durant quelques minutes et d'autre part, une exposition prolongée produit un changement stable dans l'architecture du neurone.

La protéine kinase (PKA) AMPc-dépendante, est un tétramère formé de quatre sous-unités. Deux sous-unités catalytiques servent d'enzymes actifs pour phosphoryler les protéines, et deux sous-unités régulatrices inhibent les sous-unités catalytiques. Seules les sous-unités régulatrices disposent de sites de liaison pour l'AMPc. Quand le niveau d'AMPc augmente, celui-ci se lie aux sous-unités régulatrices qui subissent un changement de forme et libèrent les sous-unités catalytiques qui peuvent alors diffuser dans le noyau.

Une fois transférée dans le noyau, la PKA phosphoryle un certain nombre de facteurs de transcription, dont CREB-1 (« cAMP-reponse element binding protein-1 ») et c'est l'action de la forme phosphorylée de la protéine CREB-1 liée à son élément réponse AMPc (ou CRE pour « cAMP-response element ») sur l'ADN qui active les gènes nécessaires à la formation des souvenirs à long terme. Émergeant des études génétiques, sous-jacentes à l'apprentissage chez l'aplysie, mais également chez la mouche du vinaigre ou drosophile, une régulation de transcription inhibitrice (un redresseur) appelée CREB-2 a également été découverte (Bartsch et al., 1995).

Ainsi le passage en mémoire à long terme n'est possible qu'en inactivant le répresseur CREB-2 et en activant l'activateur CREB-1. La régulation de CREB-2 est différente de celle de CREB-1. Le CREB-2 est régulé par une protéine kinase appelée MAP pour « mitogen-activated protein » (Kandel, 2012b).

2.4. Le nombre de synapses augmente.

En étudiant le réflexe de retrait chez l'aplysie, Craig Bailey et Mary Chen ont montré que la rétention à long terme était due aux modifications de l'anatomie cellulaire (Bailey et al., 1988). Après une procédure d'apprentissage qui produit une rétention de la sensibilisation durant trois semaines, le nombre de terminaisons synaptiques par neurone sensoriel double, passant de 1300 à 2600. Ces modifications persistent aussi longtemps que celle du réflexe de retrait de la branchie. Lorsque la mémoire décline au bout de trois semaines, les terminaisons synaptiques régressent progressivement à leur nombre initial. Ces modifications anatomiques ne se limitent pas aux neurones sensoriels présynaptiques. Chez les animaux sensibilisés, les processus dendritiques de la cellule postsynaptique se développent également pour s'adapter à la croissance synaptique. Ainsi, une caractéristique du stockage mnésique à long terme est qu'il requiert une modification structurale coordonnée à la fois dans les cellules pré- et postsynaptiques (Bailey and Kandel, 1993). Cette tendance à développer de nouvelles connexions anatomiques en réponse à l'expérience a été démontrée dans le cerveau de mammifère à partir de 1990 et s'avère être, depuis, une caractéristique universelle. En effet, le développement de nouvelles synapses dans l'hippocampe est corrélé à la *facilitation* plus souvent appelée *Potentialisation* à long terme (PLT) (Carasatorre & Ramirez-Amaya, 2012).

2.5. Deux formes de stockage mnésique.

L'habituation, la sensibilisation et le conditionnement classique développés dans le chapitre précédent sont des formes de mémoire non déclarative, des mécanismes de stockage mnésique résultant d'une expérience entraînant une modification du comportement qui ne nécessite pas un rappel conscient. Ces systèmes de mémoire sont relativement simples, mais comprennent néanmoins une forme à court terme d'une durée de quelques minutes et une forme à long terme s'étendant au moins sur plusieurs jours (Kandel, 2001).

Contrairement à la mémoire implicite, le souvenir conscient de choses passées nécessite un système complexe. En effet, la mémoire procédurale et déclarative diffère considérablement au niveau comportemental et cellulaire de la mémoire non déclarative. Ces deux systèmes de mémoire utilisent une logique différente (rappel inconscient pour la mémoire non déclarative versus rappel conscient pour la mémoire déclarative) et ils sont stockés dans différentes zones du cerveau. Néanmoins, comme résumé dans le chapitre suivant, ces deux types de mémoire partagent une même logique moléculaire. Dans les deux systèmes, la mémoire à court terme implique la modification covalente de protéines préexistantes et des changements dans la force des connexions synaptiques préexistantes, tandis que la

mémoire à long terme nécessite la synthèse de nouvelles protéines et la croissance de nouvelles connexions. De plus, ces deux formes de mémoire utilisent la PKA, la MAP kinase, la protéine CREB-1, CREB-2 comme voie de signalisation pour la conversion de la mémoire à court terme en mémoire à long terme. Enfin, les deux formes utilisent des changements morphologiques au niveau des synapses pour stabiliser la mémoire à long terme (Bailey et al., 2008).

2.6. Régler les synapses artificiellement.

Conscients de l'importance du travail de Brenda Milner sur le rôle de l'hippocampe et du lobe temporal interne dans le stockage mnésique, Tim Bliss et Terje Lomo interrogent les synapses des neurones de l'hippocampe. Comment peuvent-ils stocker les informations (Corkin, 1997) ? Et ils découvrent qu'une salve de stimulations à haute fréquence (stimulation tétanique) appliquée artificiellement sur une voie hippocampique dans le cerveau d'un lapin, produit une augmentation de la transmission synaptique qui dure des heures chez un animal anesthésié, et des jours, voir des semaines chez un animal alerte et libre de ses mouvements (Bennett, 2000). Cette facilitation est désormais appelée la facilitation à long terme, et plus couramment la potentialisation à long terme (PLT).

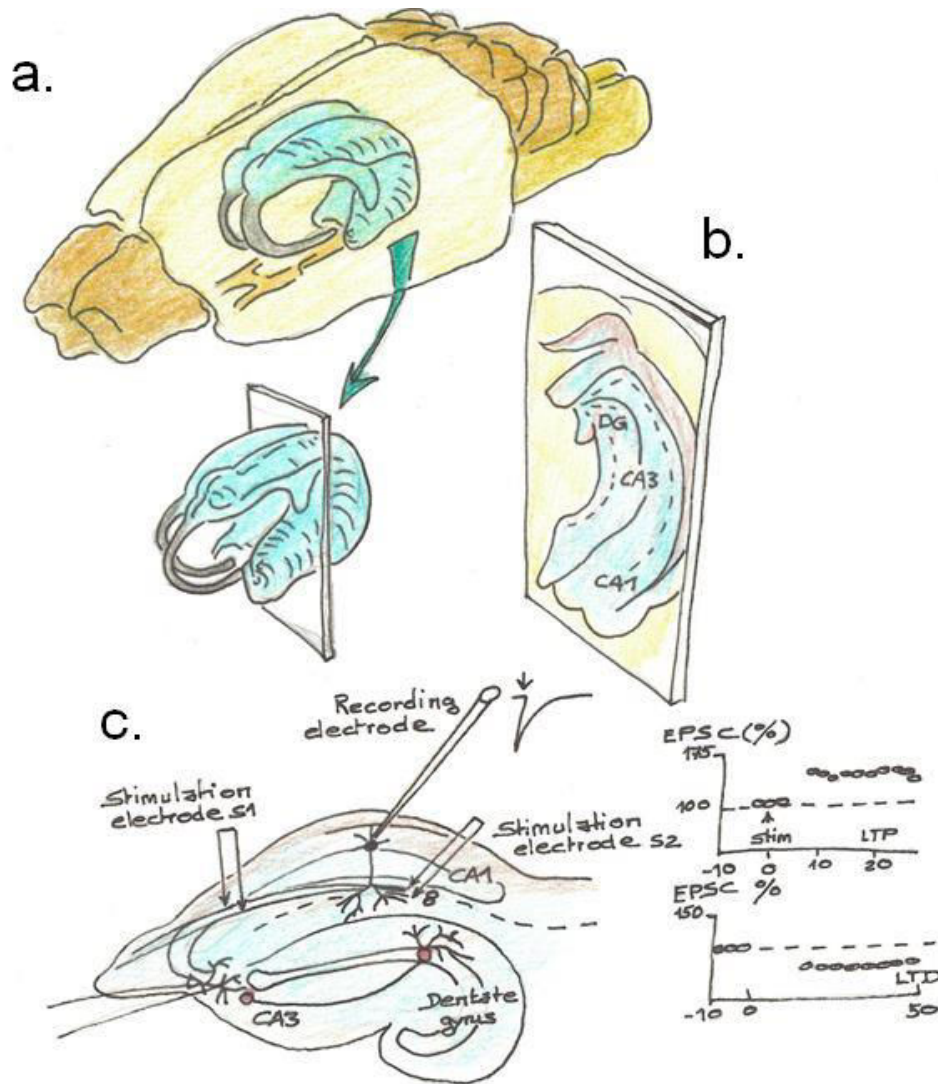


Figure 5 : La Potentialisation à long terme (PLT). a. L'hippocampe est une petite structure, de la taille d'une petite graine de céréale chez la souris et d'un pouce d'enfant chez l'homme. Située en profondeur dans la partie interne du lobe temporal. L'information entre et sort de l'hippocampe par l'intermédiaire de trois voies principales indiquées sur la coupe de gauche (b) : la voie perforante qui part du cortex entorhinal vers les cellules granulaires du gyrus denté ; la voie des fibres moussues, qui va des cellules granulaires du gyrus denté aux cellules pyramidales de la région CA3 de l'hippocampe ; et la voie collatérale de Schaffer, qui va de la région CA3 à la région CA1. (c) Le dispositif expérimental pour enregistrer une potentialisation à long terme (PLT) dans la voie collatérale de Schaffer de la région CA3 à la région CA1 de l'hippocampe. Une salve de stimulations électriques est appliquée sur la voie collatérale de Schaffer pendant une seconde à 100 Hz (100 impulsions par seconde) et une microélectrode enregistre les potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSE) produits par une population de cellules du champ CA1. (c) Les enregistrements de potentiels postsynaptiques excitateurs (EPSC) montrent une stimulation conséquente en haut, ainsi qu'une diminution en bas, de 10 Hz pendant 15 minutes. Au niveau des synapses entre les collatérales de Schaffer et les cellules pyramidales de CA1 un train de stimulation à haute fréquence (HFS, 2 trains de 100 Hz à 20 s d'intervalle) induit une PLT des EPSP médiés par les récepteurs AMPA, et un train de stimulation à basse fréquence (LFS, 100 Hz pendant 5 min) induit une LTD des EPSP AMPA chez la souris.

La potentialisation à long terme (PLT) a plusieurs formes. Dans les voies perforantes et collatérales de Schaffer, la PLT est associative, elle nécessite une activité présynaptique suivie de près par une activité post-synaptique. Par contre, dans la voie des fibres moussues, la PLT est non associative et ne nécessite aucune activité coïncidente (Bliss & Collingridge, 1993).

Ainsi, la potentialisation à long terme (PLT) est un processus de renforcement synaptique qui correspond à une augmentation d'amplitude de la réponse post-synaptique à la suite d'une intense activation concertée de la synapse. De manière schématique, les récepteurs NMDA, du fait de leur forte perméabilité au calcium, sont essentiels à l'induction de la LTP, mais ne sont pas sujets à potentialisation. Les récepteurs AMPA sont quant à eux, les cibles principales de cette plasticité : leur nombre s'accroît dans la zone post-synaptique, entraînant une augmentation du signal post-synaptique. Les processus mis en jeu sont complexes et font intervenir la phosphorylation par la calmoduline kinase II, l'exocytose et la stabilisation des récepteurs AMPA par des protéines d'ancrage au niveau post-synaptique.

On distingue plusieurs types de PLT :

- La **PLT précoce** est inductible avec un unique stimulus à 100 Hz (*tetanus*) qui active des kinases (ex : CaMKII) ne dure pas plus que quelques heures.
- La **PLT tardive** est persistante (dure environ 24 h) et nécessite par contre un très fort stimulus téτανique voire plusieurs pour être induite, avec élévation de la concentration intracellulaire d'AMPc et recrutement de plusieurs kinases, comme PKA et MAPK qui active la transcription de CREB la plupart du temps (mais d'autres facteurs de transcription semblent certaines fois être activés à la place de CREB-3. La PLT persistante est corrélée avec la mémoire à long terme, notamment dans l'hippocampe.

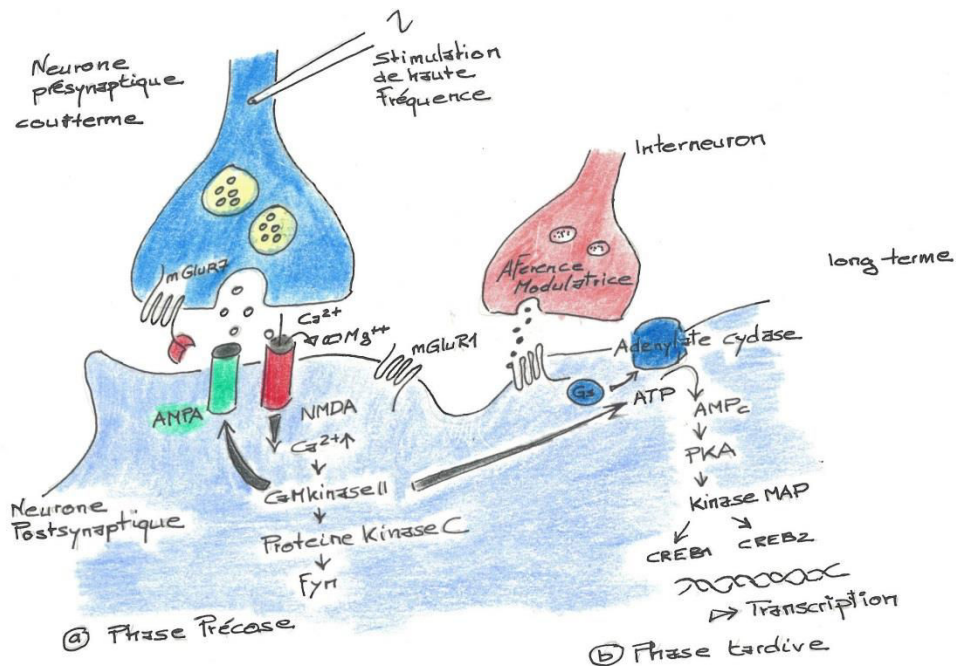


Figure 6 : Les phases précoces et tardives de la PLT.

(a) Une salve isolée de stimulations provoque l'initiation de la phase précoce de la PLT en activant les récepteurs NMDA et en favorisant l'entrée de Ca^{2+} dans le neurone postsynaptique. Le Ca^{2+} lie la calmoduline pour activer les seconds messagers (des protéines kinases) qui phosphorylent les récepteurs inotropes non NADA et augmentent ainsi la sensibilité de ces récepteurs au glutamate.

(b) Lorsque les salves sont répétées, le flux entrant de Ca^{2+} implique alors l'adénylate cyclase qui active la PKA via l'AMPc. Celle-ci, une fois transportée dans le noyau du neurone postsynaptique phosphoryle le CREB qui à son tour active la transcription de gènes nécessaire respectivement, aux changements structuraux et à la croissance neuronale qui sous-tendent à la PLT.

2.7. PLT et mémoire déclarative

En 1986, Richard Morris découvre la première connexion entre PLT et mémoire spatiale en montrant chez le rat que les récepteurs NMDA doivent être activées pour l'apprentissage spatial (Morris, 2003), ouvrant ainsi la voie à d'amples recherches qui ont conduit à un ensemble plus détaillé des corrélations entre la mémoire et les phases de PLT.

À partir de 1990, avec l'émergence des techniques de transgénèse, il est vite devenu possible de manipuler sélectivement des gènes individuels dans un animal intact pour comparer les effets de ces manipulations sur la mémoire à long terme d'une part, et d'autre part sur les différentes formes de PLT dans des tranches d'hippocampe isolées. Ces techniques ont révélé le rôle de kinases spécifiques tel que la CAMKII ou le facteur de transcription fyn dans la PLT et la mémoire spatiale (Silva et al., 1992a).

Les souris génétiquement modifiées ont été également utilisées pour déterminer les conséquences de défauts sélectifs dans la phase tardive de la PLT. Ainsi, Ted Abel a développé des souris transgéniques qui expriment un gène mutant qui bloque la sous-unité catalytique de la PKA (Abel et al., 1997), alors que Silva et Rusiko Bourtchouladze étudié des souris avec des mutations dans CREB -1 (Bourtchouladze et al., 1994).

Ces deux lignées de souris knock-out ont développé un grave défaut dans la mémoire spatiale à long terme et les deux avaient des défauts plus ou moins similaires de PLT : la première phase était normale alors la phase tardive a été bloquée, fournissant des preuves solides de lien entre les phases de LTP pour les phases de stockage de la mémoire.

Les récentes découvertes de la fonction de CPEB3, un régulateur local de la synthèse de protéine ainsi que de la protéine kinase Mzeta (PKMzeta), dans le maintien de stockage de la mémoire chez l'aplysie et les mammifères soulignent encore une fois les processus de signalisation moléculaire, conservés durant l'évolution qui sous-tendent le fonctionnement biologique de la mémoire (Pavlopoulos et al., 2011) (Serrano et al., 2008).

Ces mêmes aspects cellulaires et moléculaires, cette plasticité des synapses, cette régulation génique sont également les fondements des émotions.

3. *Le cerveau des émotions.*

Alors que le terme « émotion » est généralement intuitivement entendu, cela reste un mot difficile à définir. Si actuellement il n'y a pas de réel consensus dans la littérature quant à sa signification, une émotion est communément décrite comme un état mental, associé à des modifications corporelles consciemment ressenties qui surgissent spontanément. Ainsi, les émotions englobent une large gamme d'états personnels accompagnés par un certain nombre de changements physiologiques et de comportements observables. D'importants progrès dans la compréhension des bases neurales de l'émotion ont été réalisés au cours des dernières décennies.

Les axes de recherche actuels se situent dans le fait de délimiter physiquement quelles structures et quels réseaux de neurones sont nécessaires à des réponses émotionnelles. Dans une commune perspective, il s'agit également d'identifier davantage et plus précisément les mécanismes moléculaires agissant dans ces zones du cerveau. Une autre importante question relative aux émotions concerne la façon dont les événements émotionnels sont appris et stockés, dans le but de comprendre comment des

changements dans le fonctionnement des mécanismes et des réseaux engagés dans le traitement des émotions peuvent conduire à des troubles de l'humeur tels que la dépression et les troubles anxieux.

Nous verrons plus loin comment les souris knock-out pour le récepteur métabotrope au glutamate mGluR7 se sont révélées être un intéressant outil pour disséquer la fonction de ce récepteur particulier dans les émotions, mais avant cela il s'agit d'examiner brièvement les mécanismes neuronaux impliqués dans le traitement des émotions.

3.1. La Neuroanatomie des émotions.

Les résultats obtenus à partir des études d'imagerie chez l'humain ainsi que les résultats obtenus à partir d'expérimentations sur les animaux ont identifié l'amygdale, le cortex préfrontal, le cortex cingulaire antérieur, et l'hypothalamus comme étant les quatre principales structures impliquées dans le traitement des émotions (Daggleish, 2004).

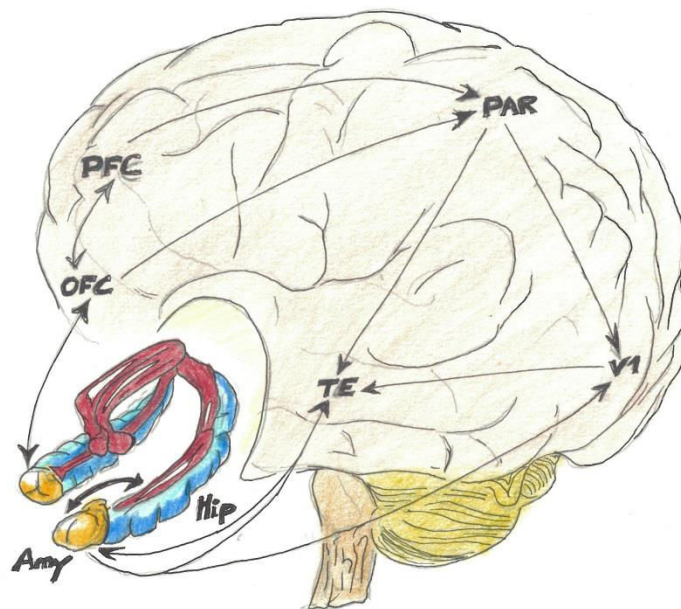


Figure 7 : Les zones du cerveau impliquées dans les émotions.

L'amygdale (AMY) projette des connexions réciproques avec des régions répandues dans le cortex, y compris avec toutes les étapes des voies perceptives (cortex visuel primaire, V1, cortex temporal inférieur, TE) ainsi que les régions préfrontales (cortex orbitofrontal, OFC, cortex préfrontal, PFC). Cette connectivité permet à l'amygdale de recevoir de riches informations sensorielles et de renforcer ainsi la représentation neuronale de stimuli émotionnels via une rétroaction vers et à partir des voies sensorielles. La plupart de ces projections proviennent du noyau basal de l'amygdale. En revanche, la plupart des entrées visuelles de l'amygdale projettent vers le noyau latéral, qui connecte le noyau basal puis les zones de niveau supérieur. En plus de sa

connectivité aux régions sensorielles, l'amygdale présente également de multiples connexions aux zones préfrontales qui relaient l'entrée vers les régions impliquées dans les formes délibérées de la prise de décision. Ainsi, à la suite de l'activation de l'amygdale, de multiples systèmes cérébraux peuvent dynamiquement se réorganiser et traiter de façon appropriée à une réponse face à l'environnement. PAR = cortex pariétal. (adapté de William A. Cunningham and Tobias Brosch. Motivational Saliency: Amygdala Tuning From Traits, Needs, Values, and Goals. Current Directions in Psychological Science. 2012 21 : 54).

3.2. Une émotion particulière : la peur

Une grande partie de nos connaissances en neurobiologie sur les relations entre mémoire et émotion a été obtenue chez l'animal à partir d'une émotion particulière : la peur. La peur est une réaction normale déclenchée lorsque notre organisme perçoit ou anticipe un danger. Son rôle est de nous protéger en plaçant notre corps en alerte et en favorisant de ce fait, le déclenchement d'une réponse rapide et adaptée, c'est-à-dire faire face au danger ou le fuir. Chez l'Homme, la peur peut être définie selon deux composantes : une composante implicite physiologique et une composante explicite subjective. La première regroupe l'ensemble des réponses de défense de notre organisme face au danger : comportement de fuite ou d'immobilité, décharge d'hormones de stress, tremblements, sueurs, augmentation de la pression sanguine et du rythme cardiaque. Ces réponses sont automatiques, innées, et pour la plupart communes à l'ensemble des espèces animales (Rodrigues et al., 2009).

3.2.1. L'apprentissage et la mémoire de la peur

La mémoire émotionnelle est l'acquisition et le stockage d'informations relatives aux événements émotionnellement proéminents (LeDoux, 1993). Elle recrute plusieurs régions du cerveau en fonction de la nature de la mémoire, mais exige toujours l'amygdale. L'hippocampe et ses régions corticales associés peuvent également jouer un rôle dans la mémoire émotionnelle, en particulier dans le stockage de la mémoire explicite et de la mémoire consciente auxquelles est associée une composante émotionnelle. Ainsi une émotion résulte du recrutement l'amygdale et de l'hippocampe qui n'est pas uniquement dédié aux émotions.

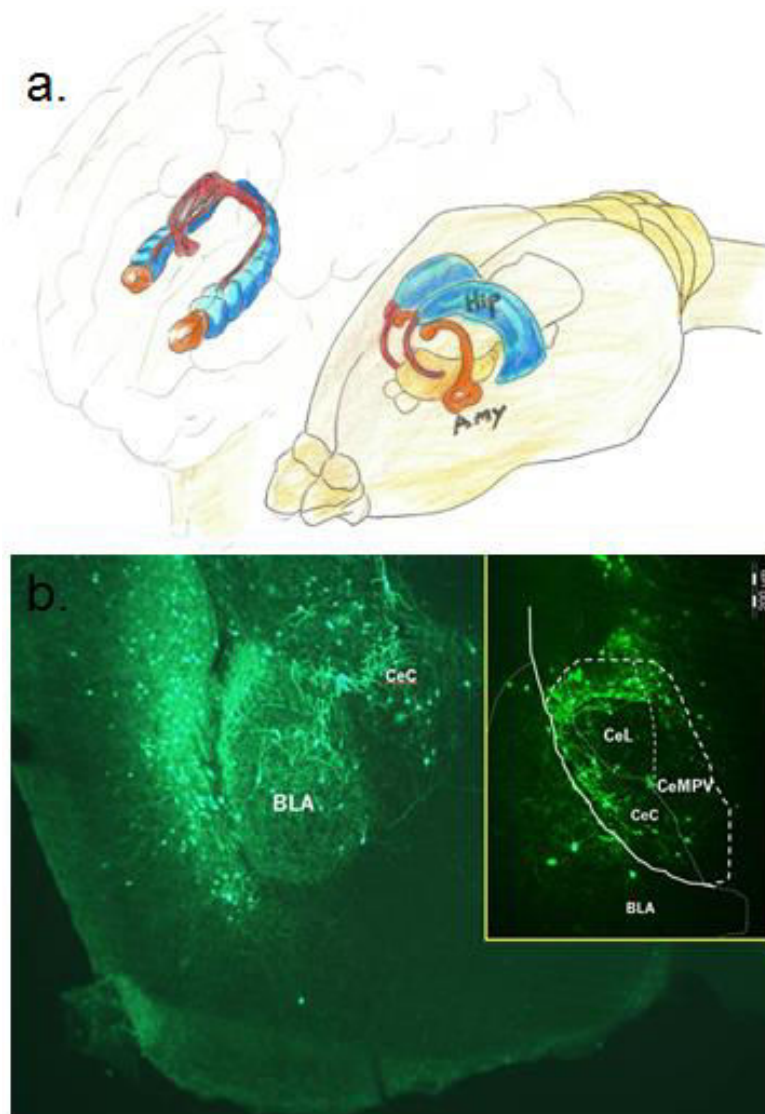


Figure 8 : La structure de l'amygdale de la souris.

a. représentation schématique de la structure de l'amygdale et de l'hippocampe dans son contexte cérébral, respectivement chez l'homme et la souris. La taille de ces deux structures par rapport à leur cerveau respectif est volontairement exagérée pour une plus grande visibilité des formes particulières de ces deux régions.

b. Une coupe sagittale du cerveau d'une souris transgénique qui exprime la protéine fluorescente verte dans les interneurons de l'amygdale permet de distinguer les différents noyaux de l'amygdale. BLA : noyau latéral. CeC : noyau central.

3.2.2. Le conditionnement de la peur

Le conditionnement de la peur est basé sur la découverte d'Ivan Pavlov discuté dans le chapitre précédent (le conditionnement classique). Rapidement, le conditionnement de la peur comprend un ou plusieurs stimuli neutres (SN) par exemple un bruit, une lumière, une place (contexte) associée à un stimulus aversif dit inconditionnel (SI) par exemple un choc. L'animal est conditionné lorsqu'il a appris à

répondre physiologiquement au SN sans la présence de SI. Toutefois, une exposition répétée de l'animal entraîné au SN sans SI conduit à l'extinction de la réponse conditionnelle.

3.2.3. La neuroanatomie du conditionnement de la peur.

La circuiterie sous-jacente au conditionnement de la peur a été très étudiée. L'information sensorielle c'est-à-dire l'information auditive, visuelle, gustative, olfactive, ainsi que l'information somatosensorielle est envoyée vers le noyau latéral de l'amygdale par les entrées des régions corticales et thalamiques (LeDoux, 1993).

La voie cortico-amygdale fournit sur le stimulus menaçant des informations sensorielles lente et détaillée, car filtré par le contrôle conscient, tandis que la voie thalamo-amygdale offre une information beaucoup plus rapide, mais moins détaillée sur le stimulus menaçant (Rodrigues et al., 2009).

Les informations dérivant du SN et du SI convergent dans le noyau latéral de l'amygdale, et cette information intégrée est ensuite envoyée au noyau central, soit directement, soit indirectement par l'intermédiaire du noyau latéral accessoire et du noyau intercalé. Le noyau central de l'amygdale a de nombreuses projections vers l'extérieur de l'amygdale. Ainsi, des projections quittent l'amygdale centrale vers le tronc cérébral et l'hypothalamus, et ce sont ces voies qui contrôlent l'expression des comportements de défense, les sécrétions hormonales et les réponses autonomes qui font partie de la réponse comportementale à la peur (Delgado et al., 2006).

Des liaisons directes entre le noyau latéral de l'amygdale et le noyau central de l'amygdale existent, mais ces connexions sont tout à fait minimes. Cependant, il existe entre ces deux noyaux, plusieurs connexions indirectes par le biais de sous-noyaux. En effet, le noyau latéral aussi bien que le noyau basal de l'amygdale projettent vers un réseau de neurones inhibiteur, la région intercalée, elle projette vers le noyau central. Comme la grande majorité des neurones de l'amygdale sont des neurones inhibiteurs, l'activation des neurones de la région intercalée conduit à une diminution de l'inhibition dans le noyau central de l'amygdale et par conséquent à une augmentation de la peur (Franklin & Mansuy, 2013).

3.2.4. Le mécanisme moléculaire sous-jacent à l'apprentissage et à la mémorisation de la peur.

Le glutamate libéré à la suite du stimulus neutre (SN) se lie aux différents récepteurs au glutamate, y compris les récepteurs AMPA, les récepteurs NMDA, et les récepteurs métabotropiques au glutamate sur les cellules de l'amygdale latérale (Rodrigues et al., 2004).

Au repos, les récepteurs NMDA sont imperméables au calcium, lorsque le glutamate se lie au récepteur NMDA et que le neurone est dépolarisé, le canal s'ouvre et le calcium est autorisé à entrer dans la cellule. Ainsi, les récepteurs NMDA sont des détecteurs de coïncidence, et sont la clé des modifications synaptiques dépendant de l'expérience. Par conséquent, lorsque le stimulus aversif (SI) dépolarise les cellules au sein du noyau latéral de l'amygdale alors que tout le glutamate est lié à des récepteurs NMDA, suite au stimulus neutre, le calcium peut entrer dans la cellule. Cette augmentation intracellulaire de calcium conduit à l'activation de la protéine kinase et des cascades de signalisation secondaire qui sont nécessaires pour la formation de la mémoire. Ainsi, le rôle de la protéine kinase dépendante à l'AMP cyclique (PKA) ainsi que celui des « *Mitogen-activated protein kinases* » (MAPK) ont été étudié extensivement dans le cadre du conditionnement de la peur et il résulte de toutes ces expériences que le mécanisme de la potentialisation à long terme (PLT) discuté au chapitre précédent est au cœur du processus de conditionnement de la peur. Il semblerait ainsi qu'une augmentation de la force synaptique entre les entrées et les neurones du noyau latéral de l'amygdale régule la peur.

4. Les troubles psychiatriques et cognitifs liés au stress

La compréhension des complexes interactions entre le stress et la génétique qui conduisent à la manifestation de troubles pathologiques importants tels que la dépression, l'anxiété et le dysfonctionnement cognitif est l'un des domaines clés de la recherche en neurosciences.

En effet, les désordres des états émotionnels et cognitifs sont un énorme problème de santé publique. En outre, les traitements courants qui ciblent principalement les monoamines ou la neurotransmission GABAergique, sont d'une efficacité limitée dans une proportion significative de patients et de plus, sont très souvent associés à un fardeau d'effets secondaires gênants. Il en résulte donc un énorme besoin de nouvelles stratégies de traitement (Van Ameringen et al., 2004).

Il est clair que le stress prédispose une susceptibilité à des troubles psychiatriques. Le stress aigu altère le fonctionnement du cerveau de telle sorte que l'organisme peut s'adapter aux défis de

l'environnement. Cependant, un stress inapproprié, sévère ou prolongé induit des changements anormaux dans le cerveau. Des désordres qui altèrent sa capacité à réguler de manière appropriée les réponses physiologiques et comportementales aux facteurs de stress ultérieurs (Arnsten, 2009 ; Cryan & Holmes, 2005 ; McEwen, 2007 ; Lupien et al., 2009).

Il est aujourd'hui largement admis que l'exposition chronique au stress ou à des événements stressants de la vie peut conduire au développement de troubles graves comme la dépression et l'anxiété (Anisman & Matheson, 2005) (Kendler et al., 1999) (Nemeroff & Vale, 2005) (Van Praag, 2004), et ainsi se transformer en un des problèmes de santé les plus courants dans les pays développés. Il est également clair que l'activation aiguë de systèmes de stress lors de l'apprentissage peut faciliter la consolidation de la mémoire tandis que l'exposition chronique au stress peut provoquer des déficits cognitifs en fin de vie (Roosendaal et al., 1999) (Sandi, 2004).

Des études sur l'Homme et sur les rongeurs ont également démontré une atrophie marquée de régions cérébrales spécifiques qui coïncident avec des altérations cognitives et psychiatriques liées au stress et glucocorticoïdes. Bien que beaucoup de ces recherches se sont concentré sur l'hippocampe, ce qui n'a rien de surprenant étant donné le rôle critique de cette structure dans la formation de la mémoire. Un nombre croissant de preuves montre qu'il y a également des altérations dans l'amygdale et dans les régions corticales. Ces régions sont donc également susceptibles de contribuer à la manifestation de stress ainsi qu'aux dysfonctionnements cognitifs associés au stress (Arnsten, 2009) (Lupien et al., 2009).

Étant donné que l'exposition au stress aigu ainsi qu'au stress chronique provoque des changements sur l'émotivité et les fonctions cognitives, il est tout à fait probable qu'il y a un certain nombre de cibles cellulaires convergentes. De croissantes évidences suggèrent que le système glutamatergique pourrait être une cible thérapeutique pertinente pour les troubles psychiatriques et cognitifs liés au stress. En effet, le glutamate est le neurotransmetteur de la grande majorité des synapses excitatrices du cerveau, et les récepteurs métabotropiques au glutamate agissent de manière pré- et post-synaptiques. Ils sont d'importants régulateurs de la neurotransmission dans le système nerveux central (SNC), fournissant un mécanisme par lequel les réponses synaptiques rapides à travers des canaux cationiques peuvent être affinées.

Ainsi le récepteur métabotrope au glutamate de type 7 (mGluR7) exprimé dans les neurones qui composent les circuiteries neuronales qui sous-tendent la cognition et les émotions pourrait être une

potentielle cible thérapeutique quant aux troubles de l'émotion et de la cognition (Masugi et al., 1999) (Hölscher et al., 2005).

5. La génération de souris knock-out

5.1. Les souris transgéniques comme modèle génétique.

La découverte, dans les années 1950, du rôle de l'ADN (acide désoxyribonucléique) et des gènes qu'il contient a donné naissance à une discipline appliquée nouvelle : le génie génétique. Fondé sur un ensemble de techniques, il a pour but d'étudier et d'exploiter les gènes. L'exploitation des gènes suppose que l'on puisse les isoler, déterminer leur structure et les introduire dans des cellules ou des organismes entiers afin de modifier leurs propriétés biologiques. Ainsi, au fil des progrès du génie génétique les biologistes moléculaires ont généré des bactéries *E. coli*, des levures *Saccharomyces cerevisiae*, des nématodes *Caenorhabditis elegans*, des grenouilles *Xenopus*, des mouches drosophiles *melanogaster* et des poissons génétiquement modifiés (Hacking, 2008).

Mais à partir du moment où il fût possible de modifier précisément le génome de la souris, celle-ci est devenue l'animal le plus couramment utilisé comme modèle dans les sciences biologiques et médicales (Capecchi, 2005). Alors que les premières publications scientifiques annoncent deux récents développements suggérant un itinéraire de modifications prédéterminées dans lignées germinales de mammifères, je débutais dans un laboratoire de biologie moléculaire (Doetschman et al., 1987) (Thomas and Capecchi, 1987) (Thomas et al., 1986).

Immédiatement et irrémédiablement fasciné par ce ciblage génique particulier, qui permet une modification conçue du génome d'un mammifère, je parviens à convaincre mes patrons de me laisser implémenter cette technologie. À cette époque, je voyais deux énormes avantages à cette procédure quant à l'introduction de mutations dans le génome de la souris.

Premièrement, c'est l'investigateur et non le hasard qui détermine le *locus* génétique à modifier. Deuxièmement, l'investigateur a un contrôle complet sur la façon de moduler le *locus* génétique choisi. Ce dernier avantage permet notamment de dessiner la modification génétique du gène ou *locus* génétique choisi au plus près de la question biologique adressée. Près de 30 ans plus tard, je travaille toujours sur l'ingénierie de souris transgénique et je m'aperçois avec le recul que je ne m'étais pas trompé, non seulement, cette technique s'est affinée à l'extrême, mais en plus elle profite pleinement

de toutes les nouvelles données issues du séquençage des génomes de l'humain et de la souris. Ainsi, les souris transgéniques ont été essentielles aux progrès dans de nombreux domaines de la recherche et ont permis aux neurosciences de disposer d'un outil sans précédent pour comprendre comment émergent des phénomènes mentaux complexes à partir de réseaux neuronaux formés de différents types de neurones aux propriétés génétiques, physiologiques et anatomiques aussi divers que variés.

5.2. Pourquoi les souris ?

Malgré les 75 millions d'années d'évolution distinct qui séparent l'homme de la souris, ces deux mammifères ont retenu un nombre important de similitudes génétiques et physiologiques. Une similarité d'autant plus apparente lorsqu'elle est comparée aux modèles biologiques traditionnels tels que la mouche drosophile, le vers et la levure. D'un point de vue pratique et économique, les souris sont fécondes, faciles à nourrir et n'ont besoin que de très peu d'espace. De plus les souris se prêtent à une gamme de reproduction assistée y compris des techniques de cryoconservation qui permet la préservation de sperme de lignées génétiquement manipulées (Kile & Hilton, 2005).

D'un point de vue scientifique, il est possible aujourd'hui d'utiliser une ample gamme de puissantes techniques pour manipuler les génomes murins alors que le *background* génétique parfaitement caractérisé et surtout identique d'une souris à une autre (qualifié « d'inbred ») permet de comparer entre les différents laboratoires les résultats d'une expérience donnée. En outre, le séquençage du génome de la souris et la caractérisation d'une série de marqueurs génétiques spécifiques a permis de facilement distinguer des mutations et des modifications génétiques (Waterson et al., 2002).

En résumé, les souris sont d'excellents moyens de modéliser non seulement la physiologie, mais également les maladies humaines grâce à la caractérisation minutieuse, la commodité de la captivité et la relativement proche relation évolutive à l'homme.

5.3. Le ciblage de gènes chez la souris : une analyse fonctionnelle du génome de mammifère

En 1981, les Américains Richard Palmiter et Ralph Brinster transfèrent le gène d'une hormone de croissance d'un rat sur des souris et inventent par la même occasion une méthode de micro-injection qui permet de modifier le matériel génétique d'un mammifère. Ces souris génétiquement modifiées (transgéniques) ont non seulement grandi très rapidement et atteint presque deux fois la taille de leurs

congénères normaux, mais en plus, ces caractéristiques nouvellement acquises ont été transmises aux générations suivantes (Palmiter and Brinster, 1985).

En dehors du fait que cette spectaculaire expérience a engendré une tempête médiatique, elle constituait surtout de solides fondations pour la suite des événements, car si de telles souris transgéniques permettent l'étude d'un gène par l'observation de sa surexpression dans un organisme, l'observation des conséquences de son inactivation pourrait livrer de bien plus amples connaissances. Et à partir de 1987 les toutes premières souris knock-out le confirmèrent (Mansour et al., 1988).

La création de souris knock-out repose sur deux technologies :

- l'isolement et la culture de cellules souches embryonnaires (ES), qui ont la capacité unique de coloniser tous les tissus d'un embryon hôte, y compris sa lignée germinale.
- le développement de méthodes permettant la recombinaison homologe entre un ADN entrant et son apparenté séquence chromosomique, on parle de *ciblage génétique*. En conséquence, il est devenu possible de créer des souris porteuses de mutations nulles dans n'importe quel gène cloné (souris knock-out).

5.3.1. Les cellules embryonnaires souches de souris

À partir de culture d'embryons de souris, deux laboratoires différents obtiennent au début des années 80, des lignées de cellules ayant les propriétés de cellules pluripotentes embryonnaires. Ces cellules, appelées cellules souches embryonnaires (ES), étaient capables après injection dans un embryon précoce, un blastocyste, de coloniser l'ensemble de ses tissus y compris la lignée germinale, donnant ainsi naissance à des chimères. Ainsi des cellules ES d'un certain génotype pouvaient être recyclé in vivo et transmissent aux générations futures (Martin, 1981) (Evans & Kaufman, 1981)

Par la suite, il a non seulement été démontré que ces cellules ES pouvaient être modifiées en culture par manipulation génétique, mais qu'en plus, lorsqu'elles étaient réinjectées dans un embryon de souris, elles permettaient d'obtenir des souris transgéniques (Robertson et al., 1986).

Un tout nouveau procédé d'obtention de souris transgéniques était né, élargissant considérablement la possibilité de transgénèse existante par micro-injection d'ADN dans le zygote.

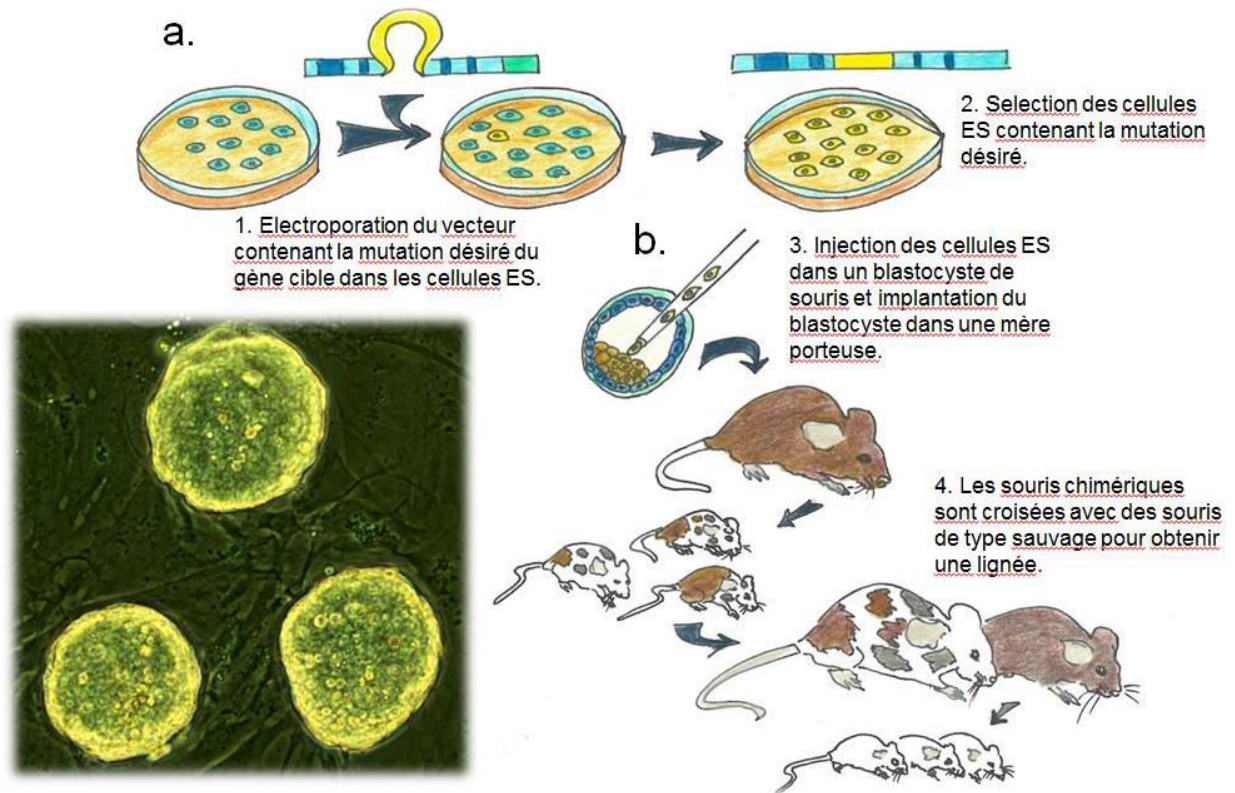


Figure 9 : La génération d'une lignée de souris knock-out à partir de cellules embryonnaires souches qui contiennent la mutation ciblée souhaitée.

a. La première étape implique l'isolement d'une lignée clonale de cellule embryonnaire souche (ES) qui contient la mutation désirée. La sélection positive négative (voir également la figure 10) peut être utilisée pour enrichir une lignée de cellules ES contenant le gène modifié désiré.

b. La deuxième étape consiste à utiliser ces cellules ES pour générer des souris chimères qui ensuite vont transmettre le gène mutant à leur descendance. Ainsi, des cellules ES contenant la mutation ciblée souhaitée sont micro-injectées dans des blastocystes de souris isolés à partir de souris super-ovulées puis fertilisés. Ces embryons sont ensuite transférés chirurgicalement à un pseudo-bénéficiaire, une mère nourricière qui portera les embryons à terme. Pour faciliter l'isolement de la descendance souhaitée, les cellules ES et les blastocystes receveurs sont dérivées de souris pourvues d'allèles de couleur de pelage distinguable (par exemple en utilisant des cellules ES dérivées souris brunes et des blastocystes issus de souris noires). La mesure de la contribution des cellules ES à la formation de la souris chimérique peuvent ainsi facilement être évaluées visuellement par l'observation de la couleur du pelage. De même, la contribution des cellules ES à la lignée germinale peut être évaluée par l'observation de la couleur du pelage des progénitures dérivées des croisements entre souris chimériques et souris noires.

5.3.2. Recombinaison homologe dans les cellules embryonnaires souches de souris

Des études menées par les groupes de Smithies et Capecchi avaient démontré au milieu des années 80 que des cellules de mammifères produisaient l'appareil enzymatique nécessaire à la recombinaison spécifique entre un ADN « entrant » et sa séquence homologue présente in situ dans les

chromosomes, mais il s'agissait alors d'un évènement relativement rare par rapport à l'intégration aléatoire de ce même ADN dans le génome de l'hôte (Smithies et al., 1985) (Wong and Capecchi, 1986).

La rareté des évènements de recombinaisons homologues a été contournée par l'utilisation d'originales procédures de sélections. Dans un premier temps, l'utilisation du gène de Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (hprt) comme cible a permis aux auteurs d'amplifier les cellules ES, après transfection du vecteur portant la mutation nécessaire à l'inactivation du gène hprt, par addition de la drogue FIAU directement dans le milieu de culture (Doetschman et al., 1987).

Ces expériences ont ensuite été étendues à des gènes pour lesquels l'inactivation ne peut être sélectionnée directement, en utilisant diverses approches basées soit sur la sélection ou sur les techniques de dépistage. Ainsi, les vecteurs de ciblage sont généralement équipés d'un gène qui confère aux cellules ES recombinantes une résistance ou une sensibilité à un médicament. Ces marqueurs sélectionnables positifs ou négatifs permettent la sélection de clones de cellules ES ayant intégré le vecteur de ciblage uniquement par recombinaison homologue (Fig. 9 & 10). La sélection positive la plus couramment employée est la résistance à la néomycine, en utilisant le gène de néomycine phosphotransférase (néo), bien que les gènes pour l'hygromycine B phosphotransférase (HPS), la puromycine N-acétyltransférase (puro) et la xanthine/guanine phosphoribosyl transférase (gpt) ont également été utilisés. Alors que le marqueur de sélection positif au centre du vecteur de ciblage est utilisé pour inactiver le gène cible, les marqueurs de contre-sélection sont inclus dans les régions adjacentes du vecteur de ciblage afin d'éliminer les cellules ES dans lesquels l'intégration est aléatoire. Le gène de la thymidine kinase du virus herpès simplex (HSVtk) a été le plus largement utilisé en tant que contre-marqueur de sélection même si la diphtérie toxine (DT) a également été employé (Joyner and Sedivy, 2000).

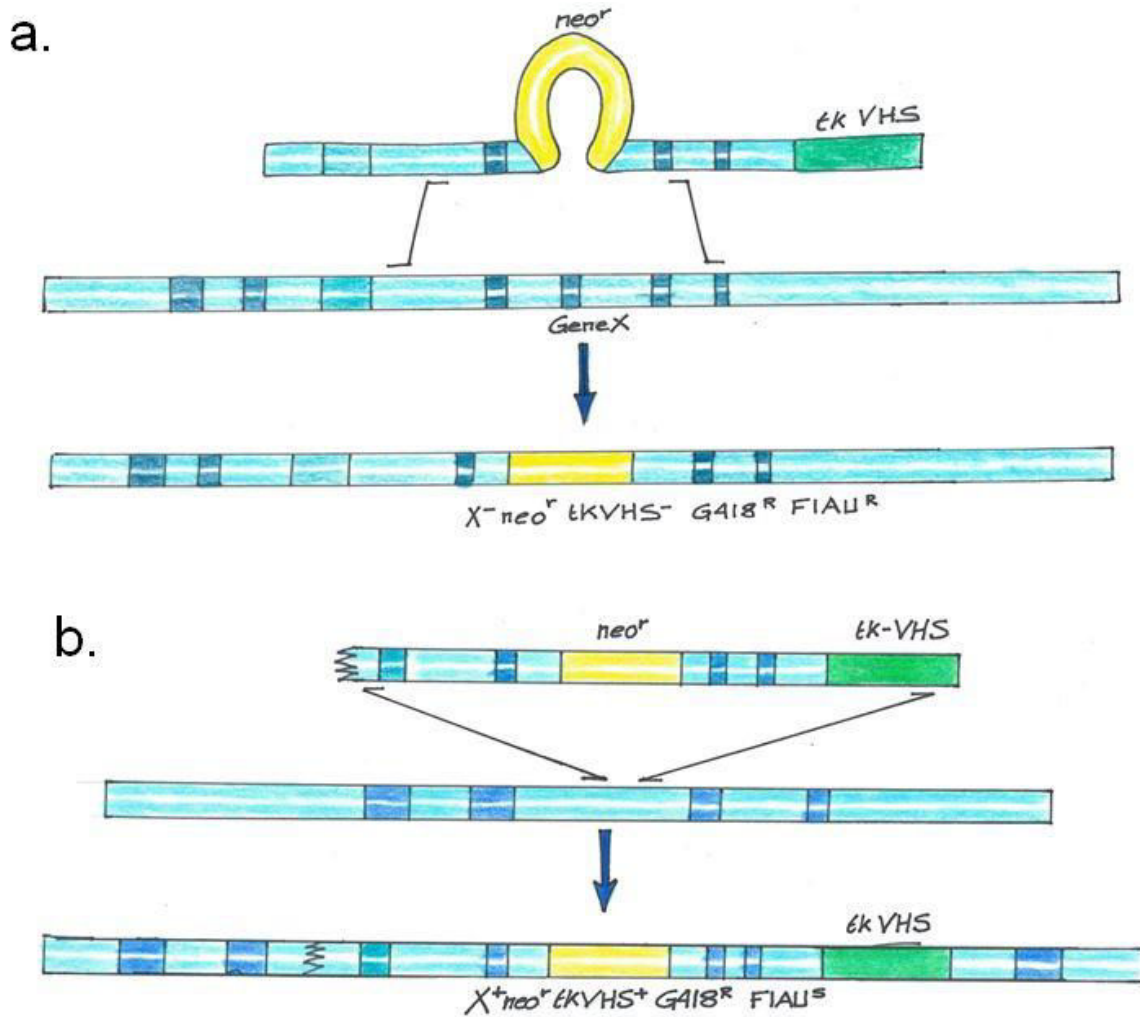


Figure 10 : La sélection positive négative est un protocole de sélection utilisé pour enrichir les lignées de cellules embryonnaires (ES) souches qui contiennent une perturbation ciblée de n'importe quel gène choisi (ici, le gène X), indépendamment de sa fonction ou de son expression dans les cellules ES.

a. Le vecteur de ciblage contient l'insertion du gène de résistance à la néomycine (*neo^r*) dans un exon du gène X, désorganisant ainsi le cadre de lecture de la séquence d'ADN du gène X, et le gène de la thymidine kinase issu du virus de l'herpès (HSV-TK) à une extrémité. Le vecteur de ciblage est représenté en appariement avec une copie chromosomique du gène X. Un événement de recombinaison homologue entre le vecteur de ciblage et son gène cible dans le génome d'une cellule ES produit non seulement l'inactivation d'un allèle du gène X, mais également la perte du gène HSV-tk. Les cellules dans lesquelles cet événement a eu lieu seront ainsi d'un génotype : $X^{+/-}$, $+ neo^{r}$ et HSV-tk, ainsi elles résisteront à la fois au G418 et à la FIAU.

b. Le plus souvent, le vecteur de ciblage sera intégré dans le génome de la cellule hôte dans un site aléatoire, par recombinaison non homologue. Une insertion non homologue de l'ADN exogène dans le génome de la cellule hôte se produit par les extrémités du vecteur de ciblage linéarisé, ainsi le gène HSV-tk restera lié au gène *neo^r*. Des cellules dérivées de ce type d'événement de recombinaison seront donc d'un génotype : $X^{+/-}$, $+ neo^{r}$ et HSV-tk + et donc résistant à G418, mais éliminé par FIAU (un médicament qui tue des cellules contenant un gène HSV-tk fonctionnel, mais qui n'est pas toxique pour les cellules contenant la thymidine kinase endogène). En résumé, les cellules ES qui contiennent l'événement de ciblage désiré survivent à la procédure de sélection

alors que les cellules qui contiennent l'intégration aléatoire beaucoup plus commune du vecteur de ciblage seront éliminées.

6. Phénotypage : les études de comportements chez la souris.

Un comportement peut être considéré comme l'ultime résultat du système nerveux. Ainsi l'observation et l'analyse des comportements sont essentielles pour des souris transgéniques dans lesquelles un gène exprimé dans le cerveau a été muté. La biologie du comportement tient une place centrale dans les neurosciences. Issues d'une illustre et ancienne tradition, de nombreuses méthodes soigneusement contrôlées permettent des tests comportementaux évaluant aussi bien certaines capacités sensorielles, fonctions motrices, l'apprentissage et la mémoire que les interactions sociales, l'addiction, l'anxiété, la dépression et la schizophrénie (Crawley, 1999) (Crawley, 2008) (van der Staay & Steckler, 2001) (Paylor et al., 2006) (Gerlai, 2001).

6.1. Les épreuves d'évaluation des fonctions sensorimotrices

Le test de la plaque chauffante

Ce test mesure les réponses nociceptives d'animaux quand ils sont placés sur une plaque chaude. Ce test est couramment utilisé pour l'évaluation de la sensibilité à la douleur ainsi que l'évaluation des agents analgésiques.

6.2. Les épreuves d'évaluation des fonctions affectives

Le test de champ ouvert

Ce test permet de mesurer l'activité locomotrice générale dans un environnement nouveau. Il permet également d'identifier les comportements anxieux chez les rongeurs. Il crée une situation de conflit entre la tendance naturelle de l'animal à explorer ce nouvel environnement et son aversion pour les espaces ouverts.

Le test d'émergence

Ce test permet d'évaluer le comportement exploratoire spontané et les réactions physiques et émotionnelles des rongeurs. Ce comportement d'anxiété inconditionnée est basé sur l'aversion innée

des rongeurs pour les environnements fortement éclairés. Ce modèle permet une évaluation simple et rapide des troubles de l'anxiété (agoraphobie) et les effets des traitements pharmacologiques.

Le labyrinthe en croix surélevé

Ce test est utilisé pour évaluer l'anxiété et la phobie de se trouver en hauteur face à un espace vide (acrophobie). Il est basé sur la préférence de l'animal pour les endroits sombres et protégés, comparativement aux endroits éclairés et découverts. Ce labyrinthe s'avère particulièrement utile pour vérifier les effets des médicaments anxiolytiques et anxiogéniques.

Le test de la nage forcée

Ce test est utilisé pour évaluer l'état de dépression et les troubles d'adaptation chez les rongeurs. Cette procédure comportementale simple est utilisée pour le développement des antidépresseurs, pour le dépistage et l'étude de mécanismes des états dépressifs.

Le Conditionnement de peur – « Fear conditioning »

Ce test de comportement est dérivé du conditionnement classique découvert par Ivan Pavlov est décrit dans les chapitres précédents. L'animal reçoit un stimulus aversif (SI) avec éventuellement association d'un stimulus conditionnant (CS) ou stimulus neutre (SN). Le rappel du contexte ou du CS conduit à l'immobilité (« freezing »). Ce test est aussi utilisé comme test de mémoire.

Le test de transition clair/foncé pour souris

Le test de la transition jour/nuit est l'un des tests les plus largement utilisés pour mesurer l'anxiété dans le comportement des souris. Le test est basé sur l'aversion naturelle des souris pour les zones éclairées et sur leur comportement exploratoire spontanée dans de nouveaux environnements. Le test est sensible à un traitement anxiolytique. L'appareil se compose d'une chambre noire et d'une chambre brillamment illuminée. Les souris sont autorisées à circuler librement entre les deux chambres. Le nombre d'entrées dans la chambre lumineuse et la durée du temps passé sont ainsi mesurés.

Le test d'enfouissement – « Marble Burying »

Les rongeurs en général, et les souris en particulier, enterrent les objets qu'ils perçoivent comme potentiellement dangereux. Ainsi, quand on place de nouvelles billes dans leur cage, les souris vont les enterrer avec de la litière. Les anxiolytiques, nouveaux et classiques, atténuent ce comportement. On peut donc déduire que ce comportement est motivé, en partie du moins, par l'anxiété. Ainsi, on peut mesurer l'anxiété par le nombre de billes enterrées : plus il y en a, plus l'animal est anxieux.

6.3. Les épreuves d'évaluation des fonctions cognitives

Le labyrinthe aquatique de Morris

Le labyrinthe de Morris est un dispositif aquatique circulaire largement utilisé pour étudier les processus de l'apprentissage spatial et de la mémoire chez l'animal dans une situation aversive. Dans ce test, l'animal doit faire appel à sa mémoire procédurale, de travail et de référence pour localiser la cible (plateforme submergée). Cette épreuve sert également à examiner l'influence du vieillissement, de certains traitements ou anomalies génétiques sur les capacités cognitives.

Le test de l'évitement passif

Le test d'évitement passif est utilisé pour évaluer la mémoire à long ou court terme des rongeurs. Ce test basé sur l'inhibition par association avec une stimulation aversive, fait intervenir la voie thalamo-cortico-amygdalienne et l'hippocampe. Ce test est très utile pour l'étude des interférences de traitements pharmacologiques et à l'étude de mécanismes physiologiques sous-jacents à l'apprentissage et à la mémoire.

Le test du labyrinthe à 8 branches – « Radial maze »

Test utilisé pour évaluer la mémoire spatiale. Le labyrinthe est formé d'une plateforme centrale d'où rayonnent 8 corridors différents. On place de la nourriture au bout de chaque (ou quelques) corridor(s). Dans ce test, on mesure le nombre de choix corrects [visite d'un bras avec récompense] et le nombre d'erreurs [visite d'un bras déjà visité]. L'animal doit apprendre à entrer dans un corridor une seule fois. Chaque visite supplémentaire est considérée comme une erreur. La stratégie la plus simple serait de toujours visiter le corridor adjacent. Mais les rongeurs n'utilisent pas cette tactique et leurs déplacements nous renseignent sur leur processus de planification, de prise de décision et d'impulsivité. Ce test peut aussi être adapté pour mesurer la mémoire de travail et référentielle. Ce test a aussi comme avantage d'éviter le stress de la nage en bassin. Le désavantage est qu'il faut priver l'animal de nourriture et l'entraîner plusieurs fois avant d'atteindre des niveaux de performance asymptotiques.

7. La neurotransmission du glutamate

L'acide glutamique est non seulement l'une des briques élémentaires utilisées pour la synthèse des protéines, c'est aussi le neurotransmetteur exciteur le plus répandu dans le système nerveux central (encéphale + moelle épinière) et un précurseur du GABA dans les neurones GABAergiques. Ainsi, le

glutamate, la forme ionisée de l'acide glutamique, est le médiateur de près de la moitié des neurones centraux (Swanson et al., 2005).

Lorsqu'un potentiel d'action arrive à l'extrémité de l'axone d'un neurone, les vésicules déversent par exocytose, leur glutamate dans la fente synaptique. Le glutamate se lie alors à divers récepteurs post-synaptiques qui sont globalement répartis en récepteurs-canaux ou récepteurs ionotropes (iGlu) et en récepteurs couplés aux protéines G ou récepteurs métabotropes (mGluR) (Conn and Pin, 1997).

7.1. Les récepteurs du glutamate.

Les récepteurs ionotropes au Glutamate (iGlu) sont constitués de sous-unités protéiques distinctes qui traversent la membrane plasmique et forment un pore ionique. Si en l'absence de Glutamate, ce pore est fermé, la fixation du neurotransmetteur aux sites spécifiques du domaine extracellulaire du canal entraîne un changement de conformation des sous-unités qui, en quelques microsecondes, provoque l'ouverture du pore. Ils sont localisés au cœur des synapses, où ils convertissent de manière extrêmement rapide (1 à 2 ms) et brève (quelques dizaines de ms), un message présynaptique, le glutamate, en message post-synaptique électrique.

Deux types de iGlu constituent les acteurs majeurs de cette transmission synaptique rapide : les **Récepteurs NMDA** (NMDA = N-méthyl-D-aspartate) et les **Récepteurs non NMDA** ou **récepteurs AMPA/kainate**. Les récepteurs NMDA et non NMDA sont formés de plusieurs types de sous-unités protéiques qui, en se combinant différemment, donnent lieu à une large variété de récepteurs. Les canaux ioniques activés par le glutamate sont perméables à la fois au Na^+ et au K^+ , mais également au Ca^{2+} (surtout les récepteurs NMDA) (Ferraguti & Shigemoto, 2006).

Les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluRs) sont des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPG). Ce sont des protéines transmembranaires avec sept segments hydrophobes. Par l'intermédiaire des protéines G, les mGluRs stimulés par le glutamate produisent un changement de la concentration intracellulaire de messagers secondaires et si cette voie est beaucoup plus lente que la première, elle produit surtout un effet bien plus durable et une modulation plus fine de la réponse cellulaire au glutamate.

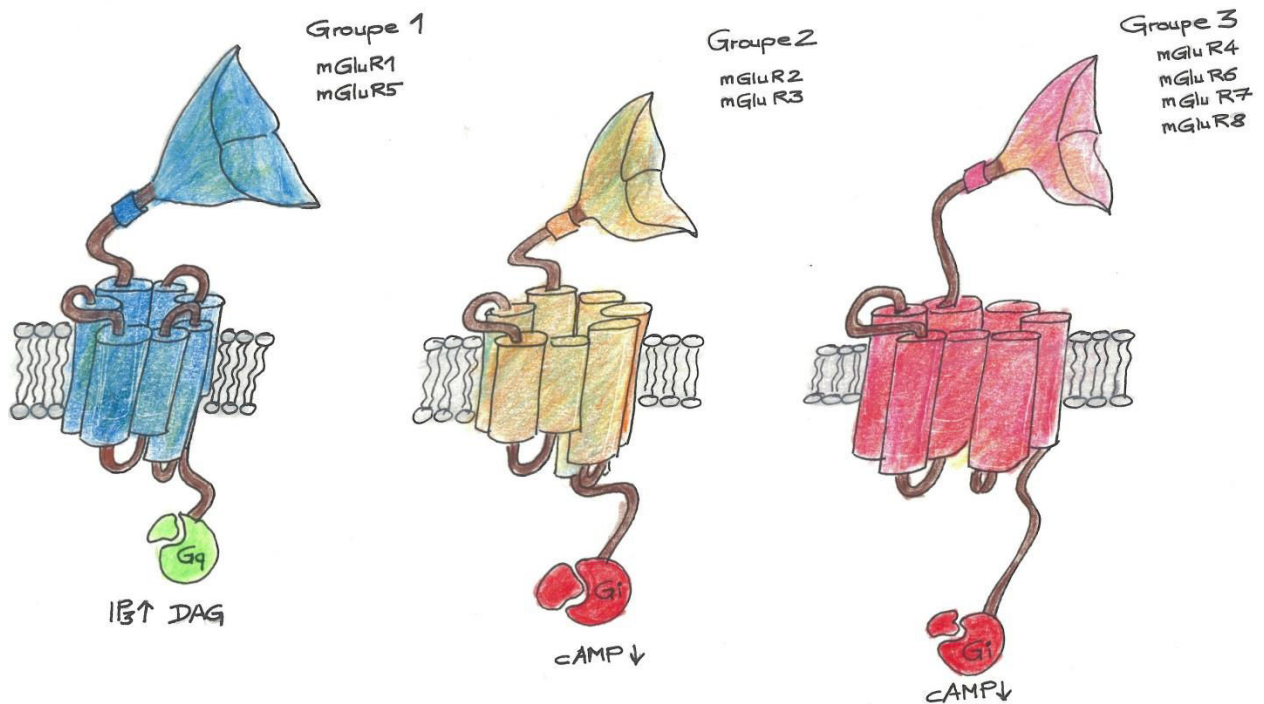


Figure 11 : Représentation schématique des trois groupes qui constitue la famille des récepteurs métabotropes au glutamate avec leur voie de transduction.

Selon leur type, les mGluRs entraînent une stimulation de la phospholipase C, une inhibition de l'adénylcyclase, une activation de la phospholipase A2, une inhibition de l'ouverture des canaux potassiques ou une stimulation des phosphodiesterases ainsi que d'autres effets complexes, dont la modulation de certains canaux récepteurs-dépendants (Nicoletti et al., 2011).

L'influence des mGluRs sur les cellules est diverse et variée. De la régulation de canaux d'ions au contrôle d'une réponse excitative ou inhibitrice par la modulation d'autres récepteurs membranaires tels les récepteurs iGlu (Fig. 12). Fonctionnellement, les mGluRs régulent et participent à la transmission synaptique par le biais de divers effecteurs comme la protéine kinase C (PKC), les récepteurs à l'inositol tri phosphate ou des canaux ioniques membranaires (Niswender and Conn, 2010).

Les mGluRs sont classés en trois groupes en fonction de leur homologie de séquence, de leur pharmacologie et de la voie de transduction à laquelle ils sont couplés.

Le groupe 1 comprend les récepteurs mGluR1 et mGluR5 qui sont couplés positivement à la phospholipase C, via des protéines G de type Gq. Le groupe 2 inclut les récepteurs mGluR2 et mGluR3 et le groupe 3 les récepteurs mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8. Tous les mGluRs du groupe 2 et 3 sont

couplés négativement à l'adénylate cyclase via une protéine G de type Gi/Go (Knöpfel and Uusisaari, 2007).

Il a été mis en évidence plusieurs variantes d'acrophobie pour les récepteurs mGluR1, mGluR5, mGluR4, mGluR7 et mGluR8 différant dans leur domaine C terminal intracellulaire (Pin & Duvoisin, 1995).

La caractéristique structurale des mGluRs est la présence du site de fixation du ligand dans un large domaine N terminal extracellulaire, lié par un domaine riche en cystéines avec le domaine heptahélice (région transmembranaire formée de sept hélices). Les mGluRs possèdent également un domaine C terminal intracellulaire plus ou moins long selon les variant d'épissage (DeBiasi et al., 2001).

Comme de nombreux RCPG, les mGluRs s'associent sous forme de dimères par des ponts disulfures, formés entre les cystéines conservées du domaine extracellulaire riche en cystéines.

Si les mGluRs ne forment pas d'important complexe de récepteur à la surface des neurones, il a été démontré qu'à l'instar du récepteur au GABAB, un très proche cousin, les mGluRs forment non seulement des homodimères, mais également des hétérodimères. Des hétérodimères de différent mGluRs issu d'un même groupe ont été ainsi décrits, de même que des hétérodimères entre mGluRs issus des groupes II et III. Jusqu'à présent aucun hétérodimère de récepteurs mGluRs issu du groupe I et des groupes II/III n'a été observé, suggérant que seuls les récepteurs mGluRs couplés à la même protéine G peuvent former des hétérodimères (Doumazane et al., 2011).

Les récepteurs mGluRs des groupes II et III mGluRs modulent la libération de neurotransmetteur en agissant comme autorécepteurs présynaptiques de manière homo ou hétérosynaptique, alors que les mGluRs du groupe I sont principalement post-synaptiques. La variété des rôles tenus par les récepteurs métabotropiques du glutamate se reflète dans la diversité de leur localisation autour de la synapse glutamatergique et sur les cellules gliales (Coutinho and Knöpfel, 2002).

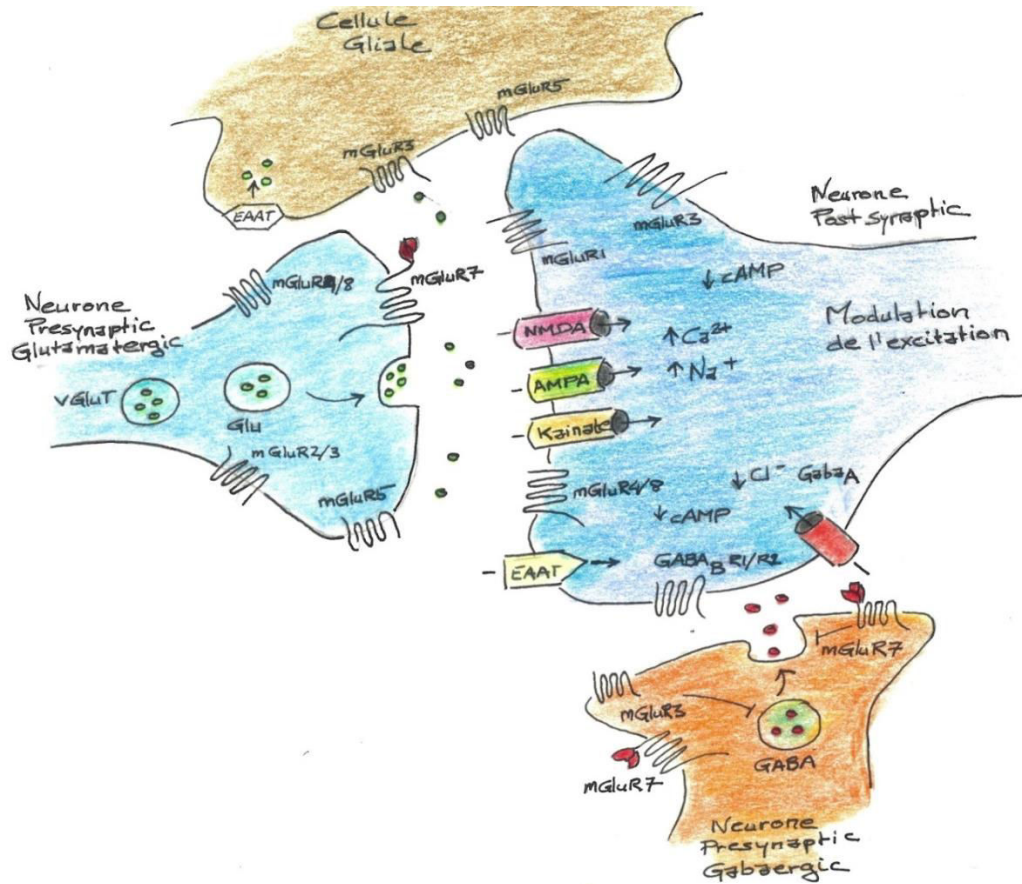


Figure 12 : Une hypothétique Synapse illustrant la localisation synaptique générale et la fonction des récepteurs glutamatergiques.

Les sous-types des récepteurs ionotropiques du glutamate, c'est-à-dire le récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA), le récepteur kainate ainsi que le récepteur alpha-amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate (AMPA), convertissent tous les trois de manière extrêmement rapide un message présynaptique chimique (le glutamate) en message post-synaptique électrique. L'ensemble des trois récepteurs participe également à la médiation des changements de transmission synaptique nécessaires à la plasticité neuronale. Les transporteurs vésiculaires (VGLUT1 et VGLUT2) chargent le glutamate dans les vésicules présynaptiques. Les transporteurs excitateurs d'acides aminés, (EAAT1-5) des cellules gliales, des astrocytes et des neurones facilitent l'absorption du glutamate et régulent ainsi l'arrêt de la transmission synaptique. Les récepteurs métabotropes au glutamate ont diverses localisations pré- et postsynaptique. Leurs fonctions consistent autant à moduler la libération de neurotransmetteurs qu'à réguler l'excitabilité post-synaptique. Par exemple, les mGluRs du groupe II (mGlu2/3) et du groupe III (mGlu4/7/8) fonctionnent sur les terminaux glutamatergiques comme des autorécepteurs au glutamate afin de supprimer la neurotransmission excitatrice au niveau des synapses dans le système nerveux central.

8. Le récepteur mGluR7

8.1. La découverte du récepteur mGluR7.

En 1994, à partir d'une banque d'ADN complémentaire de cerveau antérieur de rat, un clone d'ADNc d'un nouveau récepteur mGluRs appelé mGluR7 a été isolé par l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) en utilisant des séquences d'amorces (« primers ») conservées parmi les autres membres de la famille des mGluRs. Ce sous-type mGluR7 était constitué de 915 résidus d'acides aminés et présentait une architecture structurale commune aux membres de la famille des mGluRs, avec un grand domaine extracellulaire précédant les sept domaines transmembranaires putatifs. De plus, mGluR7 montrait non seulement des similitudes de séquence d'ADN plus élevée pour mGluR4 et mGluR6, mais comme pour mGluR4 et mGluR6, mGluR7 inhibait l'accumulation d'AMP cyclique stimulée par la forskoline en réponse aux agonistes L-2-amino-4-phosphonobutyrate (L-AP4) et L-sérine-O-phosphate (L-SOP) dans les cellules ovariennes de hamster chinois. Par contre, alors que mGluR4 et mGluR6 ne montraient qu'une expression relativement limitée dans le système nerveux central, des analyses par « Northern blot » et des hybridations in situ indiquaient que mGluR7 était largement exprimé dans de nombreuses cellules neuronales (Okamoto et al., 1994).

Si aujourd'hui de multiples études ont mis en lumière, non seulement les différentes propriétés de ce récepteur, mais également son implication physiologique, au milieu des années 90, tout n'était qu'expectation. Ainsi, pour Ciba, Thomas Knoepfel et Fabrizio Gasparini ont initié par leur séminale revue, un projet visant à l'exploration des fonctions de mGluR7 en tant que cible thérapeutique dans le cadre de pathologie tel que l'épilepsie et les maladies mentales (Knoepfel et al., 1995).

L'absence de modulateur pharmacologique nous a d'abord contraints à isoler le gène humain, et à exprimer ce gène dans un système cellulaire hétérologue dans l'espoir de découvrir des agonistes et des antagonistes spécifiques pour mGluR7. Au mieux, des molécules aux effets bénéfiques dans un modèle cellulaire ou animal d'une pathologie humaine, au pire des outils pharmacologiques permettraient avec précision d'attribuer un rôle au récepteur mGlu7 (Flor et al., 1997).

Et, en parallèle des travaux de mes collègues pharmacologistes et chimistes visant au développement d'outils pharmacologiques spécifiques pour le mGluR7, j'ai généré des souris knock-out pour le récepteur mGluR7. Une approche génétique afin de compenser le manque d'outils pharmacologiques dans le but de comprendre la fonction de ce récepteur.

Désormais il est établi que le récepteur mGluR7 est non seulement le récepteur métabotrope le plus largement distribué dans le cerveau, mais il montre également le plus le plus haut degré de conservation évolutive, suggérant ainsi un rôle important pour ce récepteur dans le fonctionnement du système nerveux central.

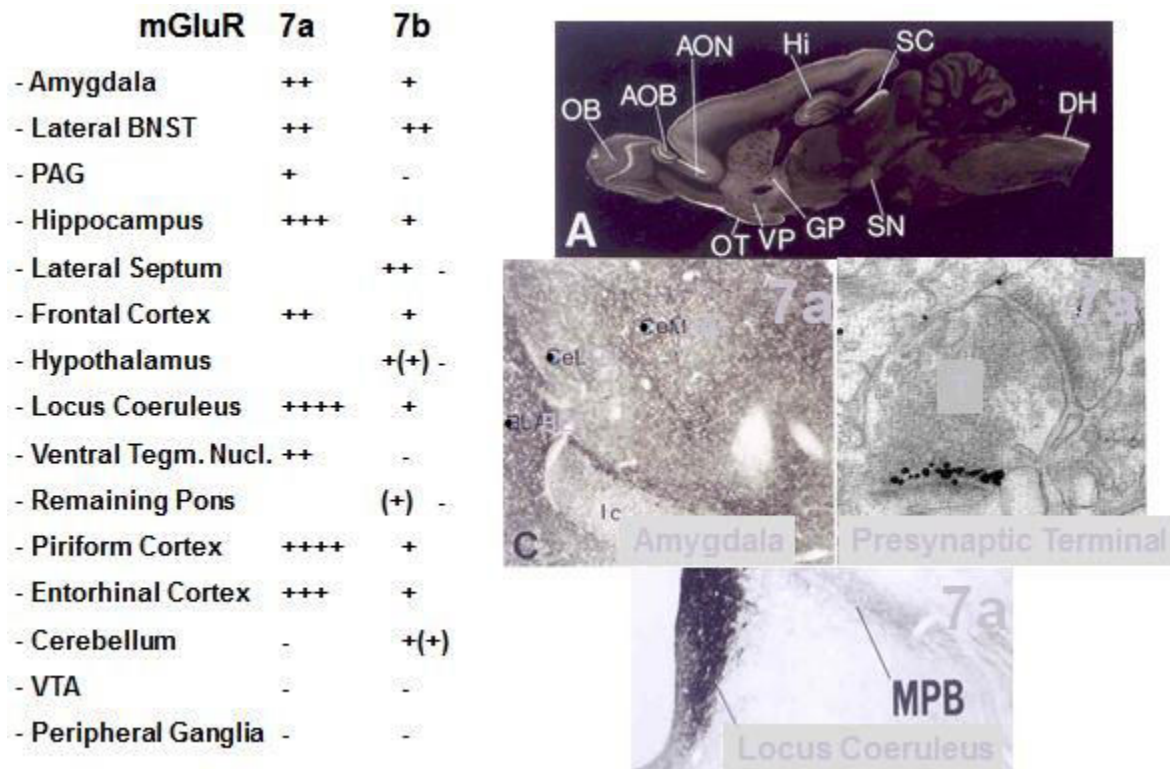


Figure 13 : la distribution du récepteur mGluR7 dans le cerveau.

A droite, les différentes régions du cerveau de souris avec le taux d'expression de mGluR7. Les signes + correspondent à l'intensité d'immuno-réactivité : ++++ plus intense, +++ intense, ++ modérée, + faible, et [] négatif. A gauche (A), la répartition du mGluR7 sur une coupe para sagittale de rat. En points claire, l'immuno-réactivité d'un anticorps anti mglu7 dans le bulbe olfactif (OB), l'ampoule olfactive accessoire (AOB), le noyau olfactif antérieure (AON), la partie superficielle du tubercule olfactif (OT), le pallidum ventral (VP), le globus pallidus (GP), l'hippocampe (Hi), la substance noire (SN), la partie superficielle du colliculus supérieur (SC) et de la corne dorsale de la moelle épinière (DH). En dessous, l'expression du mGluR7a dans l'amygdale (C) et sa localisation présynaptique (points sombres) à droite. En dessous, agrandissement de la forte expression de mGluR7 (en noir), dans le locus coeruleus.

Le récepteur mGluR7 est exprimé sur la membrane des neurones présynaptiques, au cœur même du site synaptique (Fig. 11) et présente une affinité relativement faible pour le glutamate. De la sorte, le récepteur mGlu7 peut rester inactif lorsque la neurotransmission est normale, et n'être actif uniquement que lors d'une libération de glutamate excessive, inhibant ainsi la libération de glutamate supplémentaire dans le neurone présynaptique (Cartmell et al., 2000).

Comme tous les récepteurs mGluRs, la topologie du récepteur mGluR7 est typique des GPCRs. Ils comprennent les 7 hélices transmembranaires connectées par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires avec un domaine C-terminal cytoplasmique et un domaine N-terminal extracellulaire qui contient le site de liaison du glutamate (Ferraguti and Shigemoto, 2006).

Le mGluR7 agit comme un autorécepteur présynaptique qui inhibe la libération de L- glutamate, de ce fait ce récepteur produit une boucle de rétroaction négative. Le mGluR7 est non seulement exprimé par les neurones glutamatergiques, mais il se trouve également à la surface des neurones libérant le neurotransmetteur GABA, le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central. Par conséquent, le récepteur mGluR7 peut inhiber la libération de L-glutamate et/ou la libération de GABA en fonction du type de neurone sur lequel il est situé, ce qui lui permet de produire une large gamme d'effets différents. Dans ce contexte, la fonction du récepteur mGlu7 peut être relative à des événements qui sous-entendent une excitation synaptique excessive due à une libération prolongée de L-glutamate.

8.2. La signalisation du récepteur mGluR7.

Il a tout d'abord été découvert dans un système d'expression hétérologue que le récepteur mGluR7 était couplé à l'adénylate cyclase et que ce couplage était dû à la protéine G inhibitrice (Gi), sensible à la toxine Pertussis (Okamoto et al., 1994) (Saugstad et al., 1994).

Mais il a depuis été démontré que le récepteur mGluR7 conditionne les courants potassiques rectifiants entrants (en anglais *Inwardly Rectifying K⁺ current* ou I_{KIR}), en ouvrant le canal ionique spécifique au potassium K_{IR} (O'Connor et al., 1999), ainsi que la fermeture des canaux calciques dépendants du voltage. Une inhibition sélective de canaux de calciques de type P/Q a également été observée dans des cultures de neurones du cervelet (Fagni et al., 2000) (Perroy et al., 2000).

Plus étonnant encore, le mGluR7 ne serait pas uniquement responsable de l'inhibition d'AMP cyclique par l'action de sa sous-unité G_i , mais ses sous-unités $G_{\alpha 0}$ et $G_{\beta \gamma}$ couplerait la phospholipase C, ce qui permettrait au récepteur mGluR7 d'augmenter la concentration intracellulaire de calcium et de moduler la protéine kinase C (Perroy et al., 2000).

8.3. *Les interactions intracellulaires du récepteur mGluR7*

L'extrémité C-terminale (C-ter) cytoplasmique des variants d'épissage du récepteur mGluR7 se lie à une variété de protéines d'interactions, tels que la protéine PICK1 (protéine interagissant avec la protéine kinase C) (Boudin et al., 2000) (El Far et al., 2000) (El Far and Betz, 2002) (Dev et al., 2001).

La PICK1 se lie également la protéine kinase C alpha (PKC α), et ces trois protéines forment un complexe au niveau des zones actives des terminaisons présynaptiques (El Far and Betz, 2002).

De plus, l'extrémité C-terminale du variant d'épissage a du mGluR7 interagit également avec la protéine kinases Ca²⁺/calmoduline-dépendantes ou CaM kinase, le complexe bêta-gamma qui comprend les sous-unités de protéines G $\beta\gamma$, et les protéines MacMARCKS (pour « macrophages Myristoylated alanine riche C kinase substrat ; MacM »), créant ainsi en aval du mGluR7, des interactions de signalisation complexe (Bertaso et al., 2006).

Afin d'ajouter encore peu de complexité, il a été également démontré que la phosphorylation par la protéine kinase C de la serine 862 de l'extrémité C-ter de mGluR7 inhibe la liaison des sous-unités G $\beta\gamma$ ainsi que l'interaction entre le mGluR7 et la protéine kinases Ca²⁺/calmoduline-dépendantes. Ce système de signalisation complexe peut ainsi fournir un moyen par lequel le mGluR7, peut servir « d'intégrateur » de plusieurs événements de signalisation présynaptiques, y compris la hausse en calcium intracellulaire.

Un élégant ensemble d'études a été réalisé dans lequel l'interaction entre le mGluR7a et la PICK1 a été perturbée par l'utilisation d'un vecteur viral, dans lequel les neuf derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale de mGluR7 ont été utilisés comme appât pour rivaliser pour la liaison de PICK1, avec la pleine longueur de l'extrémité C-ter du mGluR7 (Bertaso et al., 2008)

L'infection in vivo, de neurones avec cette construction a inhibé l'interaction du mGluR7 avec la PICK1 et a conduit à des crises d'épilepsie ainsi qu'à des changements de forme d'ondes spécifiques aux régions thalamo-corticales du cerveau.

De même, des souris transgéniques « knock-in » dans lesquelles les acides aminés qui interagissent avec la PICK1 au sein de l'extrémité C-terminale de mGluR7 ont été mutés, développent des crises spontanées d'épilepsie, confirmant ainsi que l'interaction de mGluR7 avec la PICK1 est importante pour la régulation de la signalisation mGluR7 (Zhang et al., 2008).

Plus récemment, il a été démontré que les voies de signalisation en aval du mGluR7 sont réglées de façon complémentaire par différents sous-types de protéine kinase, les kinases des récepteurs couplés G ou GRK, le GRK4 affectant l'adénylcyclase et la voie de la kinase Jun (JNK), et GRK2 affectant sélectivement la voie des kinases régulées par un signal extracellulaire (ERK1/2). De même, les deux isoformes des arrestines non visuelles, à savoir la bêta-arrestine 1 et la bêta-arrestine 2, exercent des effets opposés sur la signalisation du récepteur mGluR7. Ainsi la b-arrestine 1 module positivement la voie ERK1/2 et l'inhibition de JNK, alors que bêta-arrestine 2 fait le contraire, représentant ainsi un remarquable exemple de « régulation réciproque » de la signalisation d'un récepteur GPCR par les deux isoformes de bêta-arrestine (Iacovelli et al., 2014).

9. Le récepteur mGluR7 : un régulateur potentiel des processus cognitifs et émotionnels

La potentialisation à long terme (PLT) est aujourd'hui considérée comme le mécanisme cellulaire par lequel le cerveau acquiert et stocke des informations. Ainsi, une signalisation persistante entre deux neurones augmente l'efficacité de la synapse concernée et constitue une forme de plasticité synaptique qui sous-entend l'émotion, l'apprentissage et la mémoire (Bliss & Collingridge, 1993).

Si dans un premier temps, le rôle critique de la neuro transmission L-glutamnergique dans la PLT fût démontré par l'activation des canaux ionique NMDA et AMPA, des études utilisant un antagoniste non sélectif des récepteurs mGluRs, l' α -méthyle-4-carboxyphenylglycine (MCPG) ont démontré que l'activation des récepteurs mGluRs est absolument nécessaire pour les deux formes de PLT (la PLT NMDA-dépendante et la PLT NMDA-indépendante) décrite dans l'hippocampe de mammifère (Bashir et al., 1993) (Riedel et al., 1995).

Il a également été démontré qu'une activation unique des récepteurs mGluRs active un interrupteur moléculaire qui permet une induction continue de la PLT sans qu'une nouvelle stimulation des récepteurs mGluRs soit nécessaire (Bortolotto et al., 1994).

L'une des toutes premières preuves expérimentales de l'implication directe d'un récepteur mGluRs dans la PLT a été obtenue grâce aux souris knock-out pour mGluR7. En effet, s'il a été constaté sur des sections d'hippocampe issu du cerveau de ces souris mGluR7 $-/-$ que la PLT pouvait encore être induite, la première étape de la PLT, appelée potentialisation à court terme (STP) a été grandement atténuée. De

même, deux autres paramètres électrophysiologiques de la PLT, la facilitation de fréquence et la potentialisation post-tétanique ont également été fortement réduits dans les souris knock-out pour mGluR7 (Bushell et al., 2002).

De plus, de récents travaux ont démontré que l'activation du récepteur de mGluR7 par l'agoniste sélectif AMN082 atténue la PLT dans l'amygdale des rongeurs (Fendt et al., 2013).

Ensemble, ces études démontrent que les récepteurs mGluRs en général, et le récepteur mGluR7 en particulier, jouent un rôle dans le maintien de la PLT.

En outre, le récepteur mGluR7 est fortement exprimé dans les régions du cerveau associé à l'apprentissage émotionnel telles que le cortex cingulaire, le cortex frontal, l'amygdale, l'hippocampe et le *locus coeruleus* (Shigemoto et al., 1997).

Il est également important de noter que le récepteur mGluR7 a été localisé dans les axones présynaptiques terminaux des neurones de l'amygdale, plaçant ce récepteur au cœur de circuits neuronaux régissant la peur (Masugi et al., 1999).

Les niveaux d'excitabilité des circuits neuronaux régulent les états émotionnels. Une excitabilité inappropriée de circuits neuronaux spécifiques contribue à un état émotionnel négatif tel que l'anxiété et la dépression (Swanson et al., 2005). La modulation de la neurotransmission glutamatergique pourrait donc logiquement conduire à des changements d'humeur.

Le récepteur mGluR7 est non seulement exprimé dans des régions clés du cerveau associées à l'émotion, mais il peut être également largement impliqué dans les niveaux d'excitabilité de circuits neuronaux spécifiques et ainsi avoir une grande influence sur les différents états émotionnels tels que l'anxiété et la dépression en plus du dysfonctionnement cognitif associé à ces troubles. Il est donc raisonnable d'émettre l'hypothèse que le récepteur mGlu7 peut être impliqué dans les mécanismes moléculaires sous-jacents à la cognition et l'émotion.

10. Des souris déficientes pour le récepteur mGlu7 : un outil important dans la dissection du rôle du récepteur mGlu7 dans la cognition et l'émotivité.

Le développement de molécules pharmacologiques sélectives pour le groupe III des récepteurs mGluRs a pris du retard par rapport aux autres récepteurs métabotropes mGluRs, entravant la capacité d'attribuer avec précision un rôle au récepteur mGluR7 dans les états comportementaux complexes. Ainsi, l'avènement de souris dépourvues du récepteur de mGluR7 a contribué à faciliter de telles études (Sansig et al., 2001).

En effet, les souris knock-out pour le récepteur mGluR7 ont démontré le rôle clé du récepteur mGluR7 dans des conditions physiologiques variées allant de l'aversion gustative à l'épilepsie et aux comportements liés à la dépression et à l'anxiété (Cryan et al., 2003) (Sansig et al., 2001). (Masugi et al., 1999)

10.1. Les souris mGluR7-/- ont des déficits de mémoire de travail et dans les processus d'extinction

La comparaison des performances des souris déficientes pour le récepteur mGluR7 par rapport aux performances de leurs homologues de type sauvage dans des tests cognitifs et comportementaux a permis de découvrir les rôles du récepteur mGluR7 dans la cognition et les états émotionnels. Il est toutefois absolument nécessaire d'émettre une mise en garde concernant l'absence de ce gène au cours du développement, car ce fait pourrait conduire à des effets compensatoires, brouillant ainsi les résultats (Crawley, 1999) (Cryan & Holmes, 2005).

Les souris déficientes pour le récepteur mGluR7 affichent des facultés affaiblies aux réactions de peur et un déficit de l'aversion gustative conditionnée (Masugi et al., 1999).

On soupçonne que ces deux tâches d'apprentissage sont dépendantes de l'amygdale qui, avec l'hippocampe, fournit d'importantes informations contextuelles dans l'apprentissage de la peur (Corcoran & Maren, 2001) (Selden et al., 1991).

L'absence du récepteur mGluR7 chez les animaux knock-out conduit à une transmission synaptique altérée dans l'amygdale et l'hippocampe où le récepteur mGluR7 est fortement exprimé, ce qui pourrait

potentiellement conduire à des déficits cognitifs observés dans les essais de comportement. Ces souris knock-out n'ont par ailleurs montré ni déficiences sensorielles ni altération des performances motrices qui pourraient rendre l'interprétation de ces résultats difficiles.

Les souris mGluR7^{-/-} démontrent également une déficience dans l'accomplissement de tâches relativement complexes dans les tests du labyrinthe à 4 et 8 bras, tâches qui nécessitent la mémoire de travail à court terme. Dans l'accomplissement d'une tâche plus simple, le labyrinthe en T, aucune différence entre les animaux knock-out et les contrôles de type sauvage n'a pu être observée. De plus, après un entraînement prolongé, les souris mGluR7^{-/-} ont réussi à égaler les performances de leurs homologues sauvages dans les tests du labyrinthe à 4 et 8 bras (Hölscher et al., 2004) (Goddyn et al., 2008) (Hölscher et al., 2005).

Le terme « mémoire de travail » décrit le stockage à court terme et la mise à jour continue des informations importantes pour le souvenir immédiat. L'apprentissage émotionnel et la mémoire de travail sont tous deux des processus cognitifs de haut niveau, impliquant des circuits de l'amygdale, de l'hippocampe et des structures néocorticales frontales (Bannerman & Sprengel, 2007) (Dash et al., 2007) (Humeau et al., 2007). Ces travaux démontrent que le récepteur mGluR7 est nécessaire pour le stockage à court terme d'informations, afin d'effectuer des tâches d'une complexité relativement élevée, autrement dit le mGluR7 est important pour la mémoire de travail. De même, ces expériences montrent également que le récepteur mGluR7 n'est pas nécessaire à l'accomplissement de tâches simples et dans la formation de la mémoire à long terme, suggérant ainsi que le récepteur mGluR7 facilite la mémoire à court terme en soutenant l'induction et l'entretien des oscillations de réseau dans le cortex et l'hippocampe qui peuvent permettre le stockage temporaire des informations sans affecter la potentialisation à long terme (PLT) qui serait nécessaire à la mémoire à long terme (Hölscher et al., 2004).

En accord avec ces résultats, les souris mGluR7^{-/-} ont également montré un déficit dans l'acquisition de la tâche du labyrinthe de Morris. Un déficit qui lui aussi disparaît lorsque les souris knock-out sont entraînées plus longtemps (Callaerts-Vegh et al., 2006), démontrant à nouveau que récepteur mGluR7 joue un rôle essentiel dans la formation de la mémoire spatiale à court terme, mais que la formation de la mémoire à long terme peut fonctionner de manière indépendante à l'activité du récepteur mGluR7. Fait intéressant, plusieurs études décrivent un retard dans l'extinction de l'apprentissage dans plusieurs tâches comportementales pour les souris mGluR7^{-/-}. En effet, les souris mGluR7 knock-out affichent une extinction retardée de la préférence spatiale apprise dans le labyrinthe d'eau de Morris ainsi qu'une

altération de l'extinction de la peur dans le conditionnement pavlovien de la peur alors que ces mêmes souris mGluR7 knock-out ne présentaient pas de différences dans l'acquisition de la réaction de peur (Callaerts-Vegh et al., 2006).

Il est important de noter que l'extinction de la peur est supposée être due à la formation de nouveaux souvenirs et les données exposées ci-dessus suggèrent que le récepteur mGluR7 joue un rôle essentiel dans cette extinction, en accord avec les résultats montrant que le récepteur mGluR7 est fortement exprimé dans l'hippocampe et l'amygdale, deux régions du cerveau associées à la formation et à l'extinction de la mémoire de la peur (Bouton, 2004) (Corcoran & Maren, 2001) (Fanselow & Poulos, 2005) (Oliveira et al., 2004) (Siegl et al., 2008) (Goddyn et al., 2008).

Andreas Luthi a proposé en 2008, un modèle par lequel différents ensembles de neurones sont activés et désactivés pendant l'acquisition et l'extinction de la peur. Étant donné que le récepteur mGluR7 inhibe la libération du neurotransmetteur excitateur L-glutamate ainsi que la libération du neurotransmetteur inhibiteur GABA, le mGluR7 pourrait être responsable de l'excitation et/ou de l'inhibition responsable de cet allumage et extinction de différents ensembles de neurones. Le fait que le récepteur mGluR7 ne semble pas inhiber l'acquisition de souvenirs terrifiants suggère que ce type de formation de la mémoire est indépendant à la formation de la mémoire spatiale et peut agir à travers différentes régions cérébrales et circuits (Herry et al., 2008).

Il a été démontré que des électroencéphalogrammes (EEG) dans la plage de fréquences de 6-12 Hz (également appelé rythme thêta hippocampique) jouent un rôle important dans la formation de la mémoire de travail. Ainsi, non seulement ces oscillations apparaissent durant la réalisation de tâches sous-jacentes à la mémoire de travail, mais de plus la manipulation pharmacologique ou plus exactement l'inhibition de ces ondes thêta semble supprimer la mémoire de travail (Lee et al., 2005) (Givens and Olton, 1990).

Les souris mGluR7 knock-out ont des oscillations du rythme thêta modifié et cela coïncide avec un déficit dans la mémoire de travail. Ainsi en modulant le rythme dans l'hippocampe, le récepteur mGluR7 faciliterait durant certaines tâches cognitives la formation et le stockage de la mémoire à court terme (Hölscher et al., 2005).

10.2. Les souris déficientes en récepteur mGluR7 ont une anxiété réduite.

Comparées à des souris de type sauvage, les souris mGluR7 knock-out affichent un phénotype de type anxiolytique sur plusieurs tests comportementaux différents ; le labyrinthe en croix surélevé (EPM), la « light-dark box » (boîte lumière versus obscurité), le test de l'escalier, les essais en « open field » (espace ouvert) et le test d'enfouissement « Marble Burying » (Callaerts-Vegh et al., 2006) (Cryan et al., 2003).

Les souris mGluR7 ^{-/-} affichent également un phénotype anxiolytique en utilisant le test de l'hyperthermie induite par le stress (SIH), un test de comportement censé représenter une réponse plus physiologique lorsqu'un animal est exposé à un facteur de stress (Cryan et al., 2003) (Stachowicz et al., 2008).

De plus, les souris déficientes en récepteurs mGluR7 ont également démontré dans le test de la nage forcée (FST) et le test de la suspension par la queue « tail suspension test » (TST), un comportement identique à celui d'une souris de type sauvage sous l'effet d'un antidépresseur (Cryan et al., 2003) (Klak et al., 2007).

Ainsi, pour ces deux essais de comportement, classiquement utilisés pour définir la potence d'un antidépresseur, l'inactivation du gène codant pour le récepteur mGluR7 présentait pour la souris un effet comparable à celui produit par des antidépresseurs.

10.3. La déficience en mGluR7 provoque une perturbation de l'axe HPA chez la souris.

Il est aujourd'hui reconnu que les réactions de stress sont réglementées par l'axe hypothalamo - hypophyso-surrénalien (HPA) (Kloet & Derijk, 2004) (Engelmann et al., 2004) (Herman et al., 2005) (Holsboer, 2000) (Ströhle & Holsboer, 2003). Ainsi, des patients souffrant de troubles affectifs présentent une perturbation de l'axe HPA (De Kloet et al., 2005) (Dinan, 1994) (Holsboer et al., 1980).

En effet, ces patients présentent des niveaux réduits de récepteurs aux glucocorticoïdes (GR), une diminution de la sensibilité à la dexaméthasone, un glucocorticoïde synthétique, un niveau de récepteurs à la sérotonine 5-HT_{1A}, ainsi qu'un taux de facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) modifié (Leitch et al., 2003) (Cryan & Leonard, 2000) (Castren, 2004). L'ensemble de ces paramètres est absolument essentiel aux divers états émotionnels et la dérégulation de l'un ou de tous ces éléments peut conduire à des profils physiopathologiques (Barden, 2004).

En 2006, Mitsuka *et al.* ont montré que les souris déficientes en récepteurs mGlu7 ont dans l'hippocampe, des niveaux de récepteurs GR et 5-HT1A ainsi qu'un taux de BDNF plus élevé que leurs homologues de type sauvage. Ce qui implique une augmentation du feedback négatif dans l'axe HPA qui pourrait conduire à la suppression de l'hyperactivité de cet axe et au phénotype antidépresseur et anxiolytique observé dans le chapitre précédent (Mitsukawa et al., 2006) (Hoshaw et al., 2005).

En tant qu'autorécepteur présynaptique avec une forte expression détectée dans l'amygdale, l'hippocampe et les régions corticales du cerveau, le récepteur mGluR7 a le potentiel d'influer sur les niveaux d'excitation dans de nombreux circuits neuronaux importants à la cognition et l'émotion. Les perturbations de l'axe HPA chez la souris confirment les observations des études comportementales montrant un important effet antidépresseur et des effets anxiolytiques suite à l'inactivation du récepteur mGluR7. Prises ensembles, toutes ces études montrent que le récepteur mGluR7 joue un rôle important non seulement dans la manifestation de changements de comportement, mais également dans les processus physiologiques et moléculaires qui sous-tendent à l'anxiété et à la dépression.

II. Résultats

1. Objectif du projet
2. L'ablation du récepteur métabotrope au glutamate mGluR7 induit un déficit dans la réponse au conditionnement de la peur et dans l'aversion gustative conditionnée.
3. Les souris dépourvues du récepteur métabotrope au glutamate mGluR7 présentent un effet antidépresseur et anxiolytique.
4. Des souris dépourvues du récepteur métabotrope au glutamate de type 7 démontrent une sensibilité accrue aux crises épileptiques.
5. Altération de la plasticité synaptique à court terme dans les souris transgéniques dépourvues du récepteur métabotrope au glutamate mGluR7.
6. L'absence de récepteur métabotrope au glutamate mGluR7 altère sélectivement la mémoire de travail à court terme, mais pas la mémoire à long terme.

1. Objectif du projet

La caractérisation fonctionnelle des récepteurs métabotropes au glutamate (mGluRs) a longtemps été altérée par le fait que des agents pharmacologiques sélectifs n'étaient pas disponibles pour chacun d'eux. Afin de contourner ce manque d'outils sélectifs, les biologistes moléculaires comme, entre autres, Susumu Tonegawa en 1995, ont suggéré l'utilisation de techniques alternatives comme le ciblage de gènes par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires (ES) des cellules (Tonegawa et al., 1995).

Le nombre d'outils moléculaires a considérablement augmenté au cours de la décennie qui a suivi l'isolation des gènes des récepteurs mGluRs, et l'action sélective de ces médicaments sur les sous-types de récepteurs mGluRs s'est également nettement améliorée (Schoepp et al., 1999).

Toutefois, si la disponibilité de ligands sélectifs actifs, combinés à l'utilisation de souris knock-out pour les gènes des récepteurs mGluRs du groupe I (mGluR1, mGluR5), et du groupe II (mGluR2 et mGluR3) a considérablement contribué à l'élucidation des rôles de ces sous-types de mGluRs dans diverses fonctions cérébrales, le développement d'agents sélectifs du groupe III des récepteurs mGluRs n'a eu lieu que très récemment (Gee et al., 2014).

Le présent travail étudie les phénotypes d'une mutation nulle introduite dans le *locus* du gène mGluR7 chez la souris. En effet, le ciblage génique offrait alors la manière la plus précise et la plus spécifique de manipulation d'un récepteur particulier. Ces travaux tendent à élucider le rôle de mGluR7 dans le fonctionnement du système nerveux et dans les maladies. En outre, notre objectif est également d'examiner le potentiel du mGluR7 en tant que cible dans le cadre d'une intervention thérapeutique.

2. L'ablation du récepteur métabotrope au glutamate mGluR7 induit un déficit dans la réponse au conditionnement de la peur et dans l'aversion gustative conditionnée.

Des analyses immunohistochimiques et immunomicroscopiques ont montré que le récepteur métabotrope mGluR7 est fortement exprimé dans l'amygdale et préférentiellement localisée au niveau des terminaisons axonales des neurones présynaptiques glutamatergiques, suggérant ainsi fortement une implication dans les processus neuronaux qui sous-tendent la réponse aversive amygdale-dépendante, lors du conditionnement de la peur.

Pour examiner un comportement dépendant de l'amygdale, des souris knock-out pour mGluR7 (mGluR7^{-/-}) ainsi que leurs homologues de souche sauvage ont été conditionnées à la peur. L'immobilité, également appelée « freezing », a ainsi été observé sur les souris mGluR7 et de type sauvage après application d'un choc électrique sous les pieds (SI).

Alors que les souris de type sauvage ont affiché immédiatement une immobilité après un choc sous leurs pieds, les souris knock-out mGluR7 ont montré en comparaison des niveaux d'immobilités significativement réduits dans les deux paradigmes de conditionnement de la peur testés, c'est-à-dire après un choc électrique immédiat et après un choc retardé. Cependant, les souris knock-out ne présentaient aucune des anomalies de la sensibilité à la douleur et de l'activité locomotrice.

Afin d'examiner un autre comportement dépendant de l'amygdale, les souris mGluR7^{-/-} et leurs homologues de type sauvage ont également été soumises au Teste de l'aversion gustative (CTA). Chez les souris de type sauvage, l'application de la saccharine, suivie par une injection intrapéritonéale de l'agent induisant un malaise, le chlorure de lithium (LiCl) a donné lieu à une association entre la saccharine et LiCl. Cette association a provoqué une forte réaction d'aversion envers la saccharine. En revanche, les souris knock-out mGluR7 n'ont pas réussi à associer le goût et le renforçateur négatif dans les expériences CTA. Pourtant, les souris mGluR7^{-/-} ne présentaient pas d'anomalies pour la préférence de goût et de la sensibilité à la toxicité du LiCl.

Ensemble, ces résultats indiquent que la délétion du récepteur mGluR7 provoque une perturbation significative de deux comportements distincts, mais tous deux dépendant de l'amygdale. La fonction de l'amygdale étant absolument essentielle à l'expression de ces deux paradigmes comportementaux distincts, ces travaux suggèrent que mGluR7 est essentiel dans la fonction de l'amygdale.

3. Les souris dépourvues du récepteur métabotrope au glutamate mGluR7 présentent un effet antidépresseur et anxiolytique.

La neurotransmission glutamatergique est considérée comme fortement impliquée dans la physiopathologie des troubles affectifs tels que la dépression et l'anxiété majeure. De tous les récepteurs au glutamate (mGluRs), le rôle des récepteurs métabotropes au glutamate du Groupe III (mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8) est le moins étudié dans l'anxiété et la dépression, principalement en raison du manque d'outils pharmacologiques spécifiques.

Pour cette raison, les profils de comportement des souris transgéniques portant une délétion ciblée du gène codant pour le récepteur au glutamate mGluR7 (mGluR7^{-/-}) dans les modèles animaux de dépression et d'anxiété ont été observés. Les souris mGluR7^{-/-} ont ainsi été comparées avec des souris de type sauvage (wt) issues de la même portée. Ainsi les souris mGluR7^{-/-} ont montré beaucoup moins d'immobilité, à la fois dans le test de comportement de la nage forcée, et dans le test de suspension caudale, ces deux paradigmes comportementaux étant largement utilisés pour prévoir l'activité d'un médicament antidépresseur. Les souris mGluR7^{-/-} se comportent comme des souris de type sauvage sous l'effet d'un médicament antidépresseur.

De plus, les souris mGluR7^{-/-} souris présentaient également une activité anxiolytique dans quatre tests comportementaux différents, à savoir la zone de lumière-obscurité, le labyrinthe surélevé, le test de l'escalier, et le test de l'hyperthermie induite par le stress, alors que leur performance cognitive était normale dans le test de l'évitement passif.

En outre, l'analyse de l'activité locomotrice dans un environnement nouveau a démontré que les souris mGluR7^{-/-} ont été seulement légèrement plus actives que leurs homologues de type sauvage dans les premières minutes après le placement dans la chambre.

Ensemble, ces données expérimentales suggèrent que le récepteur mGluR7 joue un rôle central dans les mécanismes cellulaires et moléculaires qui régulent les réponses comportementales à l'état aversif. Par conséquent, les médicaments agissant sur le récepteur mGluR7 pourraient fournir de nouveaux traitements pour les troubles psychiatriques tels que la dépression et l'anxiété.

4. Des souris dépourvues du récepteur métabotrope au glutamate de type 7 démontrent une sensibilité accrue aux crises épileptiques.

Afin d'étudier la fonction du récepteur métabotrope mGluR7, des souris transgéniques dépourvues de ce sous-type de récepteur (mGluR7^{-/-}) ont été générées par la recombinaison homologe d'un vecteur de ciblage du gène mGluR7 dans des cellules souches (ES) de souris. Après la découverte fortuite d'un phénotype épileptique évoqué par un stimulus sensoriel, lorsque nous changions les souris mGluR7^{-/-} de cage, nous avons testé deux agents pharmacologiques convulsivants connus, le pentylènetétrazole (PTZ), et la bicuculline, un antagoniste compétitif du récepteur GABA_A. Lorsque ces deux agents convulsivants sont administrés à des doses subliminaires (40 mg/kg en injection intrapéritonéale pour le PTZ, et 2,5 mg/kg en injection sous-cutanée pour la bicuculline) à des souris knock-out mGluR7^{-/-}, âgées

de 12 semaines et plus, tous deux induisent irrémédiablement de dramatiques crises d'épilepsie. Ces mêmes doses de PTZ et de bicuculline n'ont jamais provoqué de crises d'épilepsie lorsqu'elles étaient administrées à des souris de type sauvage, à des souris hétérozygotes mGluR7+/-, ainsi qu'à des souris knock-out pour d'autres récepteurs mGluRs du groupe III, tel que mGluR4-/- et mGluR8-/.

Ces crises d'épilepsie induites par administration de doses subliminaires de PTZ à des souris mGluR7-/- ont été inhibées par trois médicaments anticonvulsivants standards, l'éthosuximide (ESM), le clonazepam (CZP), et le valproate (VPA). Ces trois médicaments ont également supprimé les crises d'épilepsie observées dans les souris knock-out et leurs homologues de type sauvage après injection d'une 70 mg/kg de PTZ, dose de PTZ requise normalement pour l'induction de crises d'épilepsie chez la souris. Il est intéressant de noter que l'agoniste sélectif des récepteurs mGluRs du sous-groupe III, le (R, S)-4-phosphonophenylglycine (PPG), qui a démontré des effets anticonvulsivants dans plusieurs modèles d'épilepsie n'a eu aucun effet sur les crises d'épilepsie induite par le PTZ dans les souris mGluR7 -/-, alors qu'il protégeait non seulement les souris de type sauvage, mais également les souris knock-out pour les autres récepteurs du sous-groupe III. Conformément à l'absence de signes d'activité épileptique en l'absence de stimuli spécifiques, les souris mGluR7 (-/-) n'ont montré aucun changement majeur dans les propriétés synaptiques standards mesuré sur deux types de préparations. Néanmoins, sur des tranches d'hippocampe issues de souris mGluR7-/-, l'excitabilité des synapses glutamatergiques a légèrement augmenté par rapport aux observations effectuées sur des préparations issues de souris de type sauvage. De même, une facilitation de fréquence a également été observée dans les tranches corticales mGluR7-/-, suggérant un rôle de régulateur dépendant de la fréquence dans les terminaux présynaptiques pour le mGluR7.

Nos résultats suggèrent également que les récepteurs mGluR7 ont un rôle unique dans la régulation de l'excitabilité neuronale et que ces récepteurs peuvent être une nouvelle cible pour le développement de médicaments anticonvulsivants.

5. Altération de la plasticité synaptique à court terme dans les souris transgéniques dépourvues du récepteur métabotrope au glutamate mGluR7.

Huit différents sous-types de récepteurs métabotrope au glutamate (mGluRs) ont été identifiés, dont deux, le mGluR5 et le mGluR7 sont fortement exprimés au niveau des synapses entre les neurones pyramidaux de la région CA3 et les neurones de la région CA1 de l'hippocampe.

Cette entrée, appelée la voie collatérale de commissure Schaffer, affiche une robuste potentialisation à long terme (PLT), un processus censé utiliser des mécanismes moléculaires, des processus clés impliqués dans la base synaptique de l'apprentissage et de la mémoire.

Afin d'étudier la possible fonction du récepteur mGluR7 dans la PLT, un sous-type pour lequel aucun antagoniste spécifique n'existe, des souris transgénique mGluR7^{-/-} ont été générées par recombinaison homologe dans des cellules embryonnaires souches.

Ainsi, à l'instar de leur homologue de type sauvage, la PLT a pu être induite dans les souris mGluR7^{-/-}, et une fois que la potentialisation a atteint un niveau stable, aucune différence dans l'ampleur de la PLT n'a pu être observée dans les souris mGluR7^{-/-} par rapport à leurs homologues de type sauvage, issues de la même portée.

Toutefois, la phase initiale de la PLT, connue sous le nom de potentialisation à court terme (PST), a quant à elle, été fortement atténuée dans les souris mGluR7^{-/-}.

De plus, il y avait moins de facilitation de fréquence durant, et moins de potentialisation post-tétanique après, l'application d'un train à haute fréquence dans les souris mGluR7^{-/-}.

Ces résultats démontrent que l'absence de récepteurs mGluR7 engendre des altérations de la plasticité synaptique à court terme dans l'hippocampe.

6. L'absence de récepteur métabotrope au glutamate mGluR7 altère sélectivement la mémoire de travail à court terme, mais pas la mémoire à long terme.

Les récepteurs métabotrope au glutamate (mGluRs), et en particulier les récepteurs mGluRs du groupe III (c'est-à-dire les sous-types 4, 6, 7, 8) ont été décrits comme jouant un rôle clé dans la plasticité synaptique, dans l'apprentissage et la mémoire. Ainsi l'effet de l'ablation du

récepteur mGluR7 a été investi dans différents paradigmes d'apprentissage appliqué à des souris mGluR7 knock-out, ainsi qu'à leur homologue de type sauvage.

En utilisant deux paramètres de conditionnement différents, l'habituation et l'inhibition par pré-pulse (« *pre-pulse inhibition* » - PPI), dans le test de comportement de la réponse du sursaut acoustique (ASR), aucune différence n'a été observée entre les souris mGluR7 knock-out (KO) et les souris de type sauvage (WT) issues de la même portée.

Dans un essai en champ libre (open field), aucune différence n'a été observée entre les souris mGluR7 -/- et leurs homologues de type sauvage. Aussi bien au niveau de leur l'activité motrice, que dans leur comportement exploratoire et le comportement craintif.

Ainsi, l'absence de récepteur mGluR7 n'a aucun effet sur le traitement sensorimoteur, l'apprentissage non associatif, l'activité motrice et l'orientation spatiale.

Dans un le test du labyrinthe en T, encore une fois aucune différence n'a été observée entre les deux groupes de souris.

Cependant, lorsque l'on augmente les exigences quant à l'utilisation de la mémoire de travail, par exemple dans l'expérience du labyrinthe à 4 bras, et dans le labyrinthe à 8 bras, les souris mgluR7 KO commettent nettement plus d'erreurs que leurs homologues de type sauvage. Une différence hautement significative entre les deux groupes de souris est ainsi apparue et elle a persisté sur l'ensemble des 9 jours que dure l'expérience.

Dans un labyrinthe à 4 bras avec 2 bras fermés, les souris mGluR7 KO et celle de type sauvage ont commis le même nombre d'erreurs démontrant ainsi que leur mémoire à long terme n'est pas affecté.

Ensemble, ces résultats suggèrent que l'absence du récepteur mGluR7 affecte principalement la mémoire de travail à court terme, mais que les performances de la mémoire à long terme ne semblent pas pour autant affectées. De plus, la mémoire à court terme n'apparaît affectée que lorsque les tâches d'apprentissage deviennent plus complexes.

III. Discussion.

1. La modulation pharmacologique du récepteur mGluR7 valide son rôle dans la cognition et les émotions.
2. La sensibilité aux crises d'épilepsie observée dans les souris mGluR7 knock-out.
3. Le mGluR7 et la plasticité synaptique.
4. mGluR7 : Polymorphismes et troubles cliniques

1. La modulation pharmacologique du récepteur mGluR7 valide son rôle dans la cognition et les émotions

La modulation d'un récepteur au niveau pharmacologique offre de nombreux avantages par rapport à l'utilisation de souris knock-out quant à l'étude de sa fonction. En effet, un modulateur pharmacologique peut être appliqué à l'animal adulte à un moment donné et connu, évitant ainsi toutes confusions dues aux effets compensatoires de développement décrits dans les souris knock-out.

Cependant, l'utilisation d'agents pharmacologiques a également démontré des limites, par exemple leur spécificité. Si un outil pharmacologique agit sur d'autres sites cibles du cerveau, son effet peut fausser les résultats. De plus, les récepteurs cibles peuvent également posséder des cycles complexes d'internalisation ultérieure à l'activation, ce qui peut également affecter les résultats observés. Une grande partie de ce que nous savons à propos de récepteur mGluR7 provient d'études avec l'agoniste L-(+)-acide 2-amino-4-phosphonobutyrique (L-AP4), un agoniste des récepteurs mGluRs qui active tous les récepteurs du groupe III. Ainsi, les premières études de comportement utilisant le labyrinthe aquatique de Morris, ont démontré que l'administration intracérébroventriculaire (i.c. v) de L-AP4 produit un déficit dans l'apprentissage et la mémoire (Hölscher et al., 1996).

La découverte et le développement de composés ciblant spécifiquement le récepteur mGluR7 a malheureusement pris beaucoup de retard par rapport aux agents pharmacologiques agissant sur les groupes de types I (mGluR5) et sur le groupe II (mGlu2/3), ces derniers étant déjà en essai clinique alors qu'aucun outil moléculaire ne permettait encore de sonder la fonction de mGluR7 (Nicoletti et al., 2011).

Cette situation a partiellement évolué avec la découverte du premier agoniste allostérique sélectif pour mGluR7 en 2005 (Mitsukawa et al., 2005), ainsi que par le développement d'un premier antagoniste spécifique du récepteur mGluR7 en 2007 (Suzuki et al., 2007).

Alors que les études, utilisant des agonistes et des antagonistes non sélectifs des récepteurs mGluRs du groupe III ont livré des informations extrêmement confuses, souvent contradictoires concernant le rôle du récepteur mGluR7 dans l'anxiété, la dépression et les comportements liés à la cognition, l'utilisation d'outils pharmacologiques spécifiques a semé un doute encore plus important (Cryan & Dev, 1997) (O'Connor et al., 2010).

Ainsi, le premier agoniste allostérique sélectif découvert pour le récepteur mGluR7, le N, N-dibenzhydrylethane-1,2-diamine (AMN082) a induit à la fois un effet anxiogène et un effet de type

anxiolytique et antidépresseur dans les réponses comportementales observé chez la souris (Mitsukawa et al., 2006) (Palazzo et al., 2008) (Palucha et al., 2007) (Stachowicz et al., 2008) (Dobi et al., 2013).

Si l'activation du récepteur mGluR7 par l'agoniste sélectif AMN082 provoque chez la souris des réponses comportementales de type anxiolytique et antidépresseur, ces effets semblent en contradiction totale avec les changements de comportement (anxiolytique-antidépresseur) observés chez les souris dépourvues de récepteur mGluR7. Interrogeant par ce fait la validation des travaux décrit dans cette thèse. Il est toutefois important de noter que l'agoniste AMN082 a été décrit pour induire une internalisation rapide et de longue durée du récepteur mGluR7, ce qui pourrait se traduire par un antagonisme fonctionnel du récepteur (Pelkey et al., 2007).

De plus, le métabolite primaire de l'agoniste AMN082, le N-benzhydrylethane -1,2-diamine, inhibe les transporteurs de la recapture de la sérotonine et la noradrénaline (Sukoff Rizzo et al., 2011).

Ensemble, ces résultats pourraient expliquer les résultats contradictoires obtenus in vivo. Néanmoins, comme pour l'AMN082, deux modulateurs allostériques négatifs (NAMS) pour mGluR7 ont démontré des résultats disparates dans les paradigmes de comportement, et ce malgré des propriétés pharmacologiques très similaires in vitro. Ainsi l'application de l'ADX71743 a démontré de effets anxiolytiques robustes dans le labyrinthe en croix surélevé (EPM) et le test le test d'enfouissement « Marble Burying », alors que le premier antagoniste sélectif découvert pour le récepteur mGluR7, le MMPIP n'a montré aucun effet sur une batterie de tests de comportement visant l'anxiété et la dépression, il a en revanche été actif dans les tâches spatiales d'apprentissage (Kalinichev et al., 2013) (Hikichi et al., 2010) (Nakamura et al., 2010).

Comme dans le cas de l'agoniste AMN082, ces deux modulateurs allostériques négatifs NAMS agissent sur le récepteur mGluR7 via des sites allostériques dans les domaines lipophiles du récepteur plutôt que sur les domaines de l'extrémité N-terminale « Venus fly trap » (VFTD) et il est connu qu'une lipophilie accrue de composés peut être associée à des effets indésirables non spécifiques. De plus, des ligands allostériques simples et/ou différents ne portent pas nécessairement sur l'ensemble des voies de signalisation en aval d'un GPCR donné (Niswender et al., 2010).

Sans pour autant clore le débat, la découverte et la caractérisation, l'année dernière, du premier antagoniste allostérique agissant sur le domaine VFTD de l'extrémité N-terminale du récepteur mGluR7 potentialise les observations effectuées sur les souris mGluR7 knock-out quant à la fonction de ce récepteur dans l'anxiété et la dépression (Gee et al., 2014).

En effet, l'application sur des souris de l'antagoniste allostérique sélectif au récepteur mGluR7, XAP044, démontre un large spectre d'effets antidépresseur et anxiolytique dans différents paradigmes comportementaux. Ainsi l'XAP044 réduit l'immobilité (« freezing ») dans le conditionnement de la peur et réduit l'anxiété innée, des résultats parfaitement compatibles avec les phénotypes observés à partir des souris déficientes pour le récepteur mGluR7.

2. La susceptibilité à l'épilepsie.

Les récepteurs métabotrope au glutamate du type III, c'est-à-dire mGluR4, mGluR7 et mGluR8 sont localisés sur la membrane des neurones présynaptique dans la zone active de la libération de neurotransmetteurs (Kosinski et al., 1999) (Kinoshita et al., 1998) (Li et al., 1997).

Le neurotransmetteur L-glutamate synaptique peut donc activer les trois sous-types de récepteurs, régulant ainsi négativement sa propre libération. En effet, la signalisation historiquement décrite pour tous les membres des récepteurs mGluRs du groupe III, y compris mGluR7, était médiée par la protéine G_i sensible à la toxine Pertussis. G_i provoquant une baisse d'AMP cyclique intracellulaire qui entraîne une réduction d'influx de calcium dans l'espace présynaptique et finalement la libération de glutamate par dépolarisation membranaire (Niswender & Conn, 2010).

Toutefois, le glutamate se lie avec une affinité relativement élevée aux récepteurs mGluR8 et mGluR4, mais affiche une très faible affinité pour les récepteurs de mGlu7 (Schoepp et al., 1999), suggérant ainsi que les récepteurs mGluR7 ne peuvent être recrutés que par des concentrations élevées de glutamate libéré dans des conditions de haute activité synaptique. De ce fait, pour les auteurs de la revue séminale « Metabotropic glutamate receptors : From the workbench to the bedside » parue en 2011, il n'est pas surprenant que les souris dépourvues de récepteurs mGlu7 montrent une sensibilité accrue aux crises d'épilepsie (Nicoletti et al., 2011).

D'autant plus qu'il existe une intégration présynaptique entre les récepteurs $GABA_B$, les récepteurs mGluR7 et les récepteurs de l'adénosine A1, qui interagissent fonctionnellement dans la réduction de la libération de glutamate médiée par les canaux Ca^{2+} sensibles au voltage de type N (Martín et al., 2008).

Il a cependant également été montré que l'exposition répétée à l'agoniste non sélectif du groupe III des récepteurs mGluRs, L-AP4, provoque une facilitation de la libération de glutamate, un signal médié

par l'hydrolyse d'inositol triphosphate et la translocation de Munc-13-1, une protéine essentielle à l'amorçage des vésicules synaptiques (Martín et al., 2010).

Ainsi, la régulation de la libération de glutamate médié par le récepteur mGluR7 n'est pas forcément aussi univoque que précédemment pensé, et de plus, elle est strictement dépendante de l'activité.

3. Le mGluR7 et la plasticité synaptique.

La transmission synaptique n'est pas un phénomène linéaire, la réponse de l'élément post-synaptique à l'excitation de la terminaison présynaptique est variable. Il existe des processus adaptatifs qui permettent l'intégration du signal à l'échelle synaptique. L'ensemble de ces modifications constitue la plasticité, c'est-à-dire la capacité d'une synapse à adapter son activité en fonction des stimulations qu'elle reçoit et de l'environnement synaptique. Il est aujourd'hui largement admis que la plasticité synaptique est le principal mécanisme utilisé par le cerveau pour permettre l'acquisition et le stockage de l'information.

La plasticité synaptique à long terme est définie par un changement de l'efficacité synaptique entre deux neurones qui dépend de leurs activités et qui s'inscrit dans une longue durée. La plasticité à long terme peut modifier la force synaptique de manière bidirectionnelle, soit en l'augmentant, on parle alors de potentialisation à long terme (PLT), ou en la diminuant par la dépression à long terme (DLP). La plupart des renseignements concernant les fondements moléculaires et cellulaires de la plasticité synaptique proviennent d'études de potentialisation à long terme (PLT) dans l'hippocampe (Yang & Calakos, 2013).

La PLT est une augmentation de l'efficacité synaptique qui est induite dans la minute et qui dure plusieurs heures ou jours. Dans la plupart des voies de l'hippocampe, par exemple celle des cellules pyramidales du CA3 qui envoient des axones, appelés les fibres collatérales de Schaffer, à travers le stratum pyramidal vers l'aire du CA1, l'induction de la PLT nécessite l'activation synaptique transitoire du récepteur N-méthyl- D-aspartate (NMDA) (Bliss & Collingridge, 1993) (Kullmann et al., 2000) (Luscher et al., 2000).

Il en résulte une augmentation persistante de l'amplitude de la transmission synaptique au travers des récepteurs ionotropiques du glutamate AMPA et NMDA. En plus des récepteurs NMDA, il semblerait que dans certaines circonstances, les récepteurs métabotropes au glutamate (mGluRs) seraient également impliqués dans l'induction de la PLT. Ainsi il a été démontré que l'antagoniste compétitif non

sélectif des mGluRs, le MCPG bloque l'induction de la PLT dans certaines conditions (Bashir et al., 1993) (Bortolotto et al., 1994).

Le MCPG est un antagoniste à large spectre, car il agit sur différents mGluRs (mGluR1, mGluR2, mGluR3, mGluR5 et mGluR8) et depuis sa découverte en 1994, de nombreux antagonistes ont été développés, dont certains agissant spécifiquement sur un unique mGluR (Schoepp et al., 1999) (Niswender & Conn, 2010).

Néanmoins, pour quelques mGluRs, dont mGluR7, il n'en existait jusqu'à très récemment aucun. Par contre, de nombreux membres de la famille des mGluRs ont été délétés par recombinaison homologe dans des souris transgéniques et les effets de ces délétions ont pu être étudiés au niveau de la transmission synaptique (Aiba et al., 1994) (Conquet et al., 1994) (Pekhletski et al., 1996) (Yokoi et al., 1996) (Lu et al., 1997).

Les mGluR5 et mGluR7 sont les deux membres de la famille des mGluRs les plus exprimés à la surface des neurones qui constituent les synapses de la région CA1 de l'hippocampe et représentent ainsi les sous-types les plus à même de réguler l'induction de la PLT de ces synapses. La délétion du récepteur mGluR5 prévient l'induction de la PLT NMDA-dépendante et n'affecte pas la PLT médié par le récepteur AMPA (Jia et al., 1998).

En inactivant le récepteur mGluR7 dans le cerveau de souris knock-out, nous avons tout d'abord montré qu'il n'y pas de différences notables dans les propriétés synaptiques de base au niveau de la région CA1 de l'hippocampe. Par contre, si la PLT peut être induite normalement, la phase précoce de la PLT, également appelé STP pour « short-term potentiation » est considérablement réduite si on la compare à la même STP obtenu dans des souris de type sauvage. Il s'agit là d'une observation très intéressante, car pour la première fois, un résultat expérimental suggère que le niveau de la STP peut être régulé indépendamment du niveau de la PLT. En effet, jusqu'alors les traitements affectant l'induction tétanique de la potentiation synaptique, soit dépriment en parallèle la STP et la PLT, soit bloquent complètement la PLT. C'est par exemple le cas pour tous les inhibiteurs de protéines kinases ou toutes les inactivations génétiques des gènes de protéines kinases (Malinow et al., 1989) (Silva et al., 1992b).

Ainsi, l'ensemble de ces travaux ont conduit à l'hypothèse que le processus de la PLT succède en série à la STP, sous-entendant que la STP est nécessaire, mais ne conduit pas forcément à la PLT (Hanse & Gustafsson, 1994).

En démontrant dans le cerveau des souris knock-out pour mGluR7 que la STP est affectée, mais que la PLT est normale, nous suggérons au contraire que ces deux procédés sont peut-être indépendants.

De même, la facilitation de fréquence et la potentialisation post-tétanique ont également été affectées par l'absence de récepteur mGluR7 présynaptique. Ces deux paradigmes d'électrophysiologie sont autant de formes de changement plastique d'une même synapse. La facilitation correspond à l'augmentation à court terme du nombre de vésicules exocytées suite à un potentiel d'action, alors que la potentialisation post-tétanique relève de l'apparition de potentiels postsynaptiques augmentés en réponse à une stimulation à haute fréquence. Ainsi le mGluR7 influence non seulement la transmission synaptique de haute fréquence, mais également la plasticité synaptique à court terme de l'hippocampe.

4. mGluR7 : polymorphismes et troubles cliniques

Il existe un certain nombre de polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) pour le gène du récepteur mGluR7 (GRM7) et quelques études ont démontré leur relation avec des troubles neuropsychiatriques cliniques. La schizophrénie a ainsi été étudiée et les résultats obtenus ont démontré qu'il y avait un gène de susceptibilité de la schizophrénie cartographié dans le voisinage immédiat de la région GRM7, 3p26.1 - p25.1 (Pulver et al., 1995), résultats par ailleurs soutenus par une méta-analyse plus récente (Lewis et al., 2003).

Il existe bel et bien un lien heuristique entre les changements, tant au niveau cellulaire que du comportement observé chez les souris knock-out pour le récepteur mGluR7, et les symptômes cognitifs négatifs de la schizophrénie. En effet, on estime qu'un dysfonctionnement cognitif se produit dans 75 % à 85 % des patients atteints de schizophrénie, et celui-ci précède très souvent l'apparition des autres symptômes (Reichenberg et al., 2006).

Ainsi, la mémoire de travail qui est affectée chez les souris knock-out pour le récepteur mGluR7 est, entre autres, l'un des domaines cognitifs primaires cruciaux pour le développement de cibles thérapeutiques pour le traitement de la cognition dans la schizophrénie (Nuechterlein et al., 2004).

De même, l'ablation du récepteur mGluR7 chez la souris provoque une dérégulation de l'axe hypothalamo- hypophyso-surrénalien et une augmentation du niveau d'expression de la protéine BDNF dans l'hippocampe (Mitsukawa et al., 2005).

Et le dérèglement de la production ou de la libération de la protéine BDNF est également associé chez l'homme à des troubles neuropsychiatriques, comme la schizophrénie (Harrison & Weinberger, 2005).

En outre, une association entre le polymorphisme de val66met du gène BDNF et le volume de l'hippocampe chez les humains, en particulier chez les patients souffrant de schizophrénie a été montrée (Szeszko et al., 2005).

Si les premières études réalisées ont été largement négatives, plus récemment, plusieurs études indépendantes ont néanmoins confirmé un lien entre le gène du récepteur mGluR7, GRM7, et la schizophrénie (Ohtsuki et al., 2008) (Shibata et al., 2009) (Niu et al., 2015).

Cependant, il est clair que des études supplémentaires sont absolument nécessaires avant de disséquer véritablement le rôle spécifique du récepteur mGluR7 dans un groupe de domaines ou de symptômes donnés qui correspondrait à cette maladie.

Par ailleurs, il y a quelques années, une étude d'association pangénomique de la réponse au méthylphénidate chez des enfants atteints d'un trouble déficitaire de l'attention avec hyperactivité (TDAH) a été menée, et bien que les auteurs n'ont pas réussi à identifier une association qui répondraient aux critères de signification statistique, des évidences expérimentales suggéraient la corrélation d'un SNP dans le gène GRM7 avec ce trouble (Mick et al., 2008)

De toute évidence une validation plus poussée dans des études à plus grande échelle était alors nécessaire. Ainsi, plus récemment, deux études coréennes suggéraient que le polymorphisme rs37952452 GRM7 pourrait jouer un rôle dans la réponse au traitement par le méthylphénidate chez les enfants atteints de TDAH (Park et al., 2013) (Park et al., 2014).

Bien que ces résultats semblent très controversés, ces études ont ouvert la voie quant à l'exploration de variants génétiques pour le gène du récepteur mGluR7 dans d'autres troubles associés à un dysfonctionnement cognitif et à l'émotivité altérée. Ainsi, la présence de variants génétiques pour les troubles du spectre autistique (TSA) a été étudiée pour le gène GRM7 dans une étude de cas-témoins. Vingt-et-un SNP, statistiquement significatifs ont été démontrés dans trois groupes de patients, établissant pour la première fois un lien génétique entre le gène GRM7 et l'autisme (Yang & Pan, 2013).

Plus récemment encore, une délétion de 303 kb sur la bande chromosomique 3p26.1 qui comprend cinq exons du gène GRM7 a été décrite dans un patient souffrant d'autisme, suggérant une corrélation entre un dysfonctionnement du récepteur métabotrope mGluR7 et les troubles du spectre autistique (Liu et al., 2015).

Publications

1. Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 7 Ablation Causes Deficit in Fear Responses and Conditioned Taste Aversion
2. Antidepressant and anxiolytic-like effects in mice lacking the group III metabotropic glutamate receptor mGluR7
3. Increased Seizure Susceptibility in Mice Lacking Metabotropic Glutamate receptor 7
4. Altered Short-Term Synaptic Plasticity in Mice Lacking the Metabotropic Glutamate Receptor mGlu7
5. Lack of the metabotropic glutamate receptor subtype 7 selectively impairs short-term working memory but not long-term memory

Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 7 Ablation Causes Deficit in Fear Response and Conditioned Taste Aversion

Miwako Masugi,¹ Mineto Yokoi,¹ Ryuichi Shigemoto,² Keiko Muguruma,³ Yasuyoshi Watanabe,³ Gilles Sansig,⁴ Herman van der Putten,⁴ and Shigetada Nakanishi¹

Departments of ¹Biological Sciences and ²Morphological Brain Science, Kyoto University Faculty of Medicine, Kyoto 606-8501, Japan, ³Department of Neuroscience, Osaka Bioscience Institute, Suita, Osaka 565-0874, Japan, and ⁴Novartis Pharma AG, Nervous System Department, CH-4002 Basel, Switzerland

Metabotropic glutamate receptors (mGluRs) consist of eight different subtypes and exert their effects on second messengers and ion channels via G-proteins. The function of individual mGluR subtypes in the CNS, however, largely remains to be clarified. We examined the fear response of freezing after electric shock in wild-type and mGluR7^{-/-} knockout littermates. Wild-type mice displayed freezing immediately after and 1 d after footshock. In comparison, mGluR7^{-/-} knockout mice showed significantly reduced levels in both immediate postshock and delayed freezing responses. However, the knockout mice exhibited no abnormalities in pain sensitivity and locomotor activity. To further examine amygdala-dependent behavior, we performed conditioned taste aversion (CTA) experiments. In wild-type mice, the administration of saccharin followed by intraperitoneal injection of the malaise-inducing agent LiCl resulted in an association between saccharin and LiCl. This

association caused strong CTA toward saccharin. In contrast, mGluR7^{-/-} knockout mice failed to associate between the taste and the negative reinforcer in CTA experiments. Again, the knockout mice showed no abnormalities in taste preference and in the sensitivity to LiCl toxicity. These results indicate that mGluR7 deficiency causes an impairment of two distinct amygdala-dependent behavioral paradigms. Immunohistochemical and immunoelectron-microscopic analyses showed that mGluR7 is highly expressed in amygdala and preferentially localized at the presynaptic axon terminals of glutamatergic neurons. Together, these findings strongly suggest that mGluR7 is involved in neural processes subserving amygdala-dependent aversive responses.

Key words: metabotropic glutamate receptor subtype 7; knockout mice; presynaptic receptor; fear response; conditioned taste aversion; amygdala

Glutamate receptors mediate most excitatory synaptic transmission in the CNS and play important roles in synaptic plasticity, neuronal development, and neurodegeneration (Mayer and Westbrook, 1987; Nakanishi, 1992; Hollmann and Heinemann, 1994; Nakanishi and Masu, 1994). Metabotropic glutamate receptors (mGluRs) are coupled to intracellular signal transduction via G-proteins and exert their effects on second messengers and ion channels (Nakanishi, 1994; Pin and Duvoisin, 1995; Conn and Pin, 1997). Eight different mGluR subtypes (mGluR1–mGluR8) have thus far been cloned and are classified into three groups according to their sequence identity, agonist selectivities, and signal transduction mechanisms. mGluR7 is a member of group III mGluRs. This receptor is coupled to inhibition of cyclic AMP cascade as shown in heterologously mGluR7-expressing cells and selectively activated by L-2-amino-4-phosphonobutyrate (L-AP4) (Okamoto et al., 1994; Saugstad et al., 1994). Compared with other mGluRs, mGluR7 is the most highly conserved across different mammalian species (Makoff et al., 1996). mGluR7 is

widely distributed throughout the CNS (Kinzie et al., 1995; Ohishi et al., 1995; Bradley et al., 1996; Kinoshita et al., 1998). It is localized presynaptically close to release sites and has a low affinity for L-glutamate (Okamoto et al., 1994; Saugstad et al., 1994; Shigemoto et al., 1996, 1997; Kinoshita et al., 1998). Furthermore, presynaptic inhibition of glutamate release by L-AP4 has been observed in many glutamatergic projection neurons (Forsythe and Clements, 1990; Baskys and Malenka, 1991; Rainnie and Shinnick-Gallagher, 1992). Although mGluR7 has been postulated to play an important role in synaptic modulation, a lack of pharmacological tools prevents a clear definition of such roles in brain function.

In this investigation, we used mGluR7-deficient mice generated by targeted disruption of the mGluR7 gene and attempted to examine possible functions of mGluR7 in the CNS. Here, we report that mGluR7-deficient mice show a marked reduction in fear-mediated freezing responses during electric footshocks. In addition, these mice show an impairment in the ability to associate between a taste stimulus and a malaise-evoking LiCl injection [conditioned taste aversion (CTA)]. Because the amygdala function is essential for these two distinct behavioral paradigms, our results together with several control experiments strongly suggest that mGluR7 is critical in amygdala function.

MATERIALS AND METHODS

Generation of knockout mice. The detailed procedures for generation of mGluR7-deficient mice are elsewhere (G. Sansig and H. van der Putten, unpublished observations). Briefly, genomic clones containing the first coding exon of the mGluR7 gene were isolated from the 129/SvJ strain.

Received Sept. 17, 1998; revised Nov. 20, 1998; accepted Nov. 20, 1998.

This work was supported in part by research grants from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan, the Ministry of Health and Welfare of Japan, the Sankyo Foundation, the Yamanouchi Foundation, and the Biomolecular Engineering Research Institute. We thank Takashi Yamamoto for advice on CTA experiments, Fumitaka Ushikubi for advice on the nociception test, Markus Schroeder for back-crossing of mutant mice, Ayae Kinoshita for the kind gift of antibodies, Akira Uesugi for photography, and Kumlesh K. Dev for careful reading of this manuscript.

Correspondence should be addressed to Shigetada Nakanishi, Department of Biological Sciences, Kyoto University Faculty of Medicine, Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan.

Copyright © 1999 Society for Neuroscience 0270-6474/99/190955-09\$05.00/0

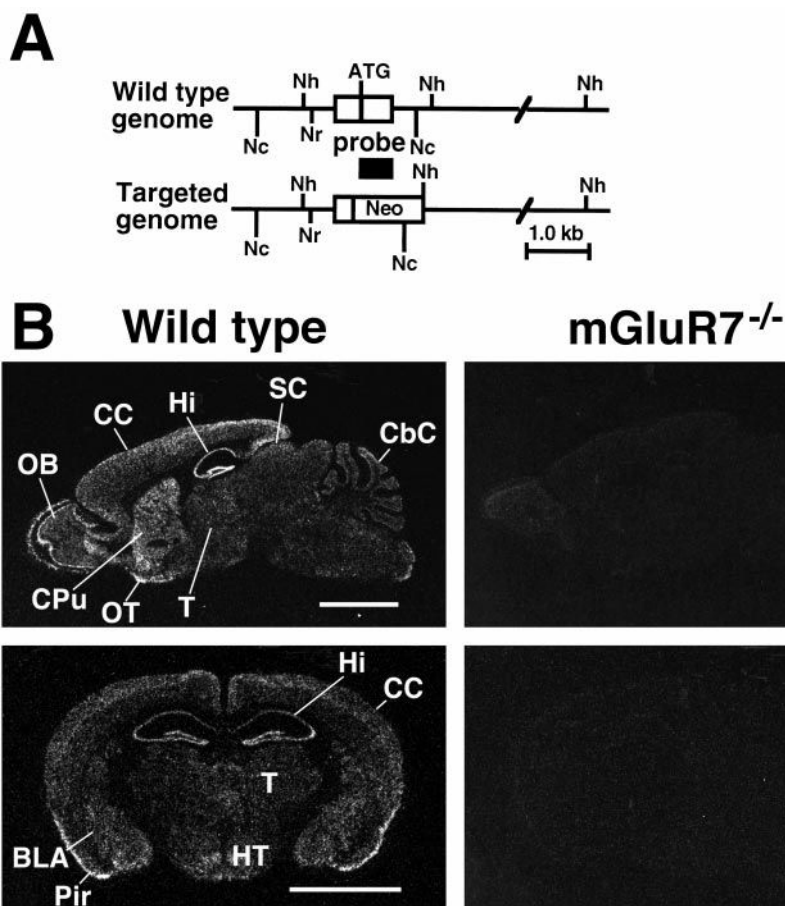


Figure 1. Targeted disruption of the mGluR7 gene. **A**, A scheme of the mGluR7 genomic DNA and its disrupted gene. The first coding exon is indicated by a box. *Neo*, Neomycin-resistance gene; *ATG*, translation initiation site. Restriction endonuclease cleavage sites: *Nh*, *NheI*; *Nr*, *NruI*; *Nc*, *NcoI*. Location of the probe used for *in situ* hybridization analysis is indicated under the exon. **B**, Negative film images of *in situ* hybridization of sagittal (top) and coronal sections (bottom), showing the distribution of mGluR7 mRNA in brain sections of wild-type mice (left) and the lack of mGluR7 mRNA in sections of mGluR7^{-/-} knockout mice (right). *BLA*, Basolateral amygdaloid nucleus; *CbC*, cerebellar cortex; *CC*, cerebral cortex; *CPu*, caudate putamen; *Hi*, hippocampus; *HT*, hypothalamus; *OB*, olfactory bulb; *OT*, olfactory tubercle; *Pir*, piriform cortex; *SC*, superior colliculus; *T*, thalamus. Scale bar, 3 mm.

A part of the first coding exon comprising the 5' untranslated region and the first 164 amino acids of mGluR7 was then replaced with the neomycin-resistance gene by homologous recombination in E14 (129/Ola) embryonic stem (ES) cells. Several chimeras were obtained by aggregation with the resultant ES cells. Homozygous mGluR7^{-/-} knockout and wild-type mice were generated by mating heterozygous mGluR7^{+/-} mice. Gender-matched littermates of these mice at ages of 6–8 weeks were used unless stated otherwise. Heterozygous mGluR7^{+/-} knockout mice were also generated by serially back-crossing into the C57BL/6 genetic background. In most experiments of fear responses and those of locomotor activity, defecation and urination, gender-matched littermates of mGluR7^{-/-} knockout and wild-type mice generated by back-crossing for seven generations were used at the age of 6–8 weeks.

Animal handling. Three to six mice were housed per stainless steel cage (30 × 17 × 12 cm) at room temperature in a 12 hr light/dark cycle with light onset at 8 A.M. Food pellets and tap water were available *ad libitum* unless stated otherwise. For all but hot-plate and tail-flick tests, mice were housed individually for at least 1 week before the experiment. All behavioral experiments were conducted between 1 and 8 P.M.

Histological analysis. *In situ* hybridization was performed as described previously (Ohishi et al., 1995). The ³⁵S-labeled antisense riboprobe that was used contained nucleotide residues 16–473 of pmGR7 (Okamoto et al., 1994). The corresponding sense probe was used as control. Immunohistochemical analysis was performed on frozen microtome sections (30 μm) as described previously (Kinoshita et al., 1998). Immunoelectron-microscopic analysis was performed as described previously (Kinoshita et al., 1998). The primary antibodies used were as follows: affinity-purified rabbit IgG against mGluR7a, rabbit IgG against mGluR7b (Shigemoto et al., 1997), guinea pig IgG against mGluR4a (Kinoshita et al., 1996b), and affinity-purified guinea pig IgG against mGluR8 (Kinoshita et al., 1996a). The secondary antibodies used were biotinylated goat antibody against rabbit IgG or guinea pig IgG (Vector Labs, Burlingame, CA). Nissl staining was performed with 1% cresyl violet in sections mounted onto MAS-coated glass slides (Matsunami, Osaka, Japan).

Fear responses. Freezing was used as an index of fear response and was

assessed by recording animal movements on video. Freezing involved the absence of all movements except for those related to respiration. Both stereotyped crouching posture and standing motionless were scored as freezing (Blanchard and Blanchard, 1969). After individual mice had been kept in stainless steel cages for at least 1 week, they were placed individually into a new chamber enclosed by a sound-attenuating cubicle (Coulbourn Instruments, Allentown, PA). After 3 min with no stimuli presented, the mice received either 10 × 1 sec or 3 × 1 sec electric footshocks (0.7 mA) with 1 min intershock intervals. Electric shock was generated by a grid floor shocker that was controlled by the HABITEST Universal Linc using L2T2 Operant Control Software (Coulbourn Instruments). The percentage of freezing response was determined before and immediately after each shock stimulus. This percentage was calculated by scoring the number of positive freezing responses divided by the total number of samples at 2 sec intervals in a 1 min time period (i.e., 30 samples per minute). To determine any retention of the conditioned fear response, footshock-treated mice were returned to their home cages and kept for 24 hr. Immediately after the mice were returned to the footshock chamber, the percentage of freezing response was determined every 1 min with time sampling of every 6 sec (i.e., 10 samples per minute).

Pain sensitivity. Naive mice were placed individually into the same chamber used for fear response and 3 min later were given a train of 1 sec electric shocks at 10 sec intervals with the following progression: 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, and 0.60 mA. The intensity of electric shocks that evoked vocalization (a cry separated from the initial awareness response), jump (jump, run, or prance), and flinch (a startle response different from the normal activity) was determined. Hot-plate test was performed as described by Eddy and Leimbach (1953). Mice were kept on the apparatus maintained at 25°C for 1 min and then placed on a metal surface maintained at 55°C (Ultra Hot Plate, Tuchi, Japan). The latency of jump and first avoidance (vigorous hindpaw shake, lick, or jump) was recorded for a maximum of 30 sec. Tail-flick test was performed as reported by D'Amour and Smith (1941). Mice were handled for a week until they became tame with handling. The mouse's tail was placed over a slit under which a photoelectric cell (Ugo Basile, Italy) was located. When heat was focused onto the tail, the mouse responded by

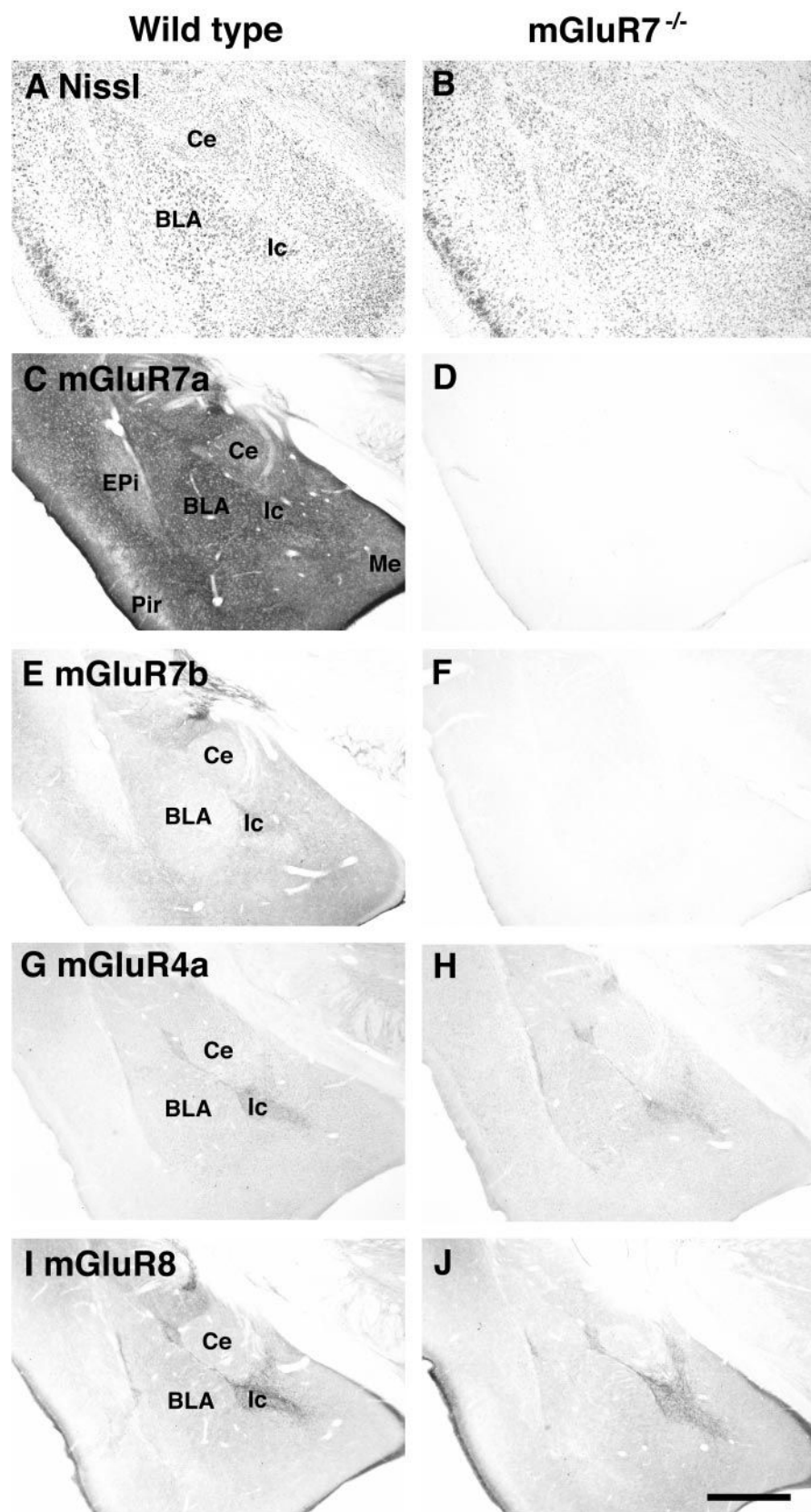


Figure 2. Histological and immunohistochemical analyses. Light microscope images of coronal sections are shown. No obvious change in the morphology of the amygdala was detected with Nissl staining of the mGluR7^{-/-} knockout mouse as compared with the wild-type control (*A, B*). Moderate to intense immunostaining of mGluR7a and weak immunostaining of mGluR7b were observed in the amygdala of wild-type mice, but these immunostainings totally disappeared in sections of mGluR7^{-/-} knockout mice (*C–F*). No obvious change in the patterns and extents of mGluR4a and mGluR8 immunostainings was detected between wild-type and mGluR7^{-/-} knockout mice (*G–J*). *BLA*, Basolateral amygdaloid nucleus; *Ce*, central amygdaloid nucleus; *Epi*, endpiriform nucleus; *Ic*, intercalated nucleus; *Me*, medial amygdaloid nucleus; *Pir*, piriform cortex. Scale bar, 500 μ m.

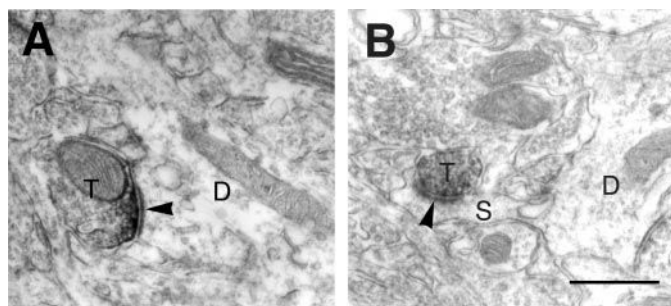


Figure 3. Immunoelectron-microscopic analysis. Electron micrographs showing immunoreactivity for mGluR7a in the BLA. Immunoreactive products for mGluR7a were accumulated along presynaptic membrane specialization in axon terminals (*T*), making asymmetrical synapses (arrowheads) on dendrites (*D* in *A*) and spines (*S* in *B*). Scale bar, 0.5 μ m.

flicking its tail out of the slit. As a result, light passed through the slit and activated a photocell that in turn stopped the recording timer automatically (a maximal recording of 20 sec); measurement of each mouse was repeated twice and averaged.

Open field. Spontaneous locomotor activity was assessed over a 30 min session with an infrared activity monitor (Coulbourn Instruments) in a chamber to which mice had not been previously exposed. The chamber was kept under a dim light and was sound-attenuated. The frequency of defecations (boluses) and urinations (spots) was recorded simultaneously.

Conditioned taste aversion. Mice were kept in polypropylene cages ($24 \times 17 \times 12$ cm). They were deprived of water for 20 hr and trained to drink water from two bottles for 20 min. Forty minutes later, the mice were supplied with water for 3 hr and again deprived of water for 20 hr. This training was repeated five times (training days). On days 6 and 7 (conditioning days 1 and 2), the mice were presented with 0.005 M saccharin sodium salt instead of water. Immediately thereafter they were injected with 0.15 M LiCl (2% of body weight) intraperitoneally as the malaise-inducing agent or with saline as control. Forty minutes later, they were presented with water for 3 hr and then deprived of water for 20 hr. On day 8 (a rest day), the mice were presented with water in the same way as described in training days. CTA was tested on days 9 and 10. In this test, the mice were presented with two bottles, one containing saccharin and the other containing water, and their liquid consumption was recorded by weighing the two bottles before and after testing. The preference score was defined as saccharin/water + saccharin (milliliters consumed); the higher the preference score, the more the mice prefer saccharin to water. The average of total liquid consumption was ~ 0.99 ml. Two out of 39 mice tested showed $<50\%$ of this average of consumption and were omitted from the data analysis. The difference in sensitivity to various taste stimuli (0.005 M saccharin, 0.1 M NaCl, and 0.01 M HCl) was examined after 5 d training as described above.

RESULTS

Histological analysis

mGluR7 $^{-/-}$ knockout mice were generated by replacing the first coding exon of the mGluR7 gene with the neomycin-resistance gene (Fig. 1*A*). *In situ* hybridization, using the antisense probe corresponding to the first mGluR7 coding exon, indicated that mGluR7 mRNA is expressed in many brain regions of wild-type mice and that this expression is completely lost in homozygous mGluR7 $^{-/-}$ knockout mice (Fig. 1*B*). No hybridization was observed in adjacent sections using the sense probe as control (data not shown). We performed histological and immunohistochemical analyses on brain sections of wild-type and mGluR7 $^{-/-}$ knockout mice (Fig. 2). Particular attention was given to the amygdala on the basis of behavioral analyses described in the next section. No gross anatomical change in the amygdala of mGluR7 $^{-/-}$ knockout mice was detected by Nissl staining (Fig. 2*A,B*). The distribution pattern of the two mGluR7 splice variants, mGluR7a and mGluR7b, was examined by using antibodies against the C-terminal sequences specific to the two variants of

mGluR7. In wild-type mice, moderate to intense mGluR7a immunoreactivity was diffusely distributed in the basolateral amygdaloid nucleus (BLA), central amygdaloid nucleus (Ce), and intercalated nucleus (Ic) (Fig. 2*C*). mGluR7b immunoreactivity was weak but was clearly observed in the Ic (Fig. 2*E*). In mGluR7 $^{-/-}$ knockout mice, neither mGluR7a nor mGluR7b immunoreactivity was detected throughout the brain, including the amygdala (Fig. 2*D,F*). Together, these results indicate that expression of mGluR7 is ablated in these knockout mice.

We also examined patterns and extents of immunostaining of other group III mGluRs. Both mGluR4a and mGluR8 immunoreactivities were relatively weak in the amygdala. However, immunostaining was localized in the Ic and in the border region between BLA, Ce, and Ic (Fig. 2*G,I*). No alteration in the pattern and extent of immunoreactivities for both mGluR4a and mGluR8 was noted in mGluR7 $^{-/-}$ knockout mice (Fig. 2*H,J*). Therefore, it appears that ablation of mGluR7 expression in knockout mice has no effect on expression of other group III mGluRs in the amygdala.

The subcellular localization of mGluR7a immunoreactivity in the BLA of wild-type mice was examined by immunoelectron-microscopic analysis. Most intense immunoreactivity in the axon terminals was observed in asymmetrical synaptic contacts with dendritic profiles (Fig. 3*A*). Moderate immunoreactivity for mGluR7a was also observed in some terminals making asymmetrical synapses with spines (Fig. 3*B*) and in preterminal portion of small unmyelinated axons filled with vesicles (data not shown). This analysis showed that mGluR7a is specialized in the axon terminals of glutamatergic neurons.

Fear responses

Young mGluR7 $^{-/-}$ knockout mice appeared normal in behavior until ~ 12 weeks of age. Mice over 12 weeks old developed epilepsy, particularly when they were placed into a new chamber (Sansig and van der Putten, unpublished observations). Therefore, all behavioral trials were conducted on 6- to 8-week-old animals.

Animals show a stereotyped immobile crouching posture and stand motionless after footshock. This freezing response is an indicator of activation of the fear system (Blanchard and Blanchard, 1969; Bouton and Bolles, 1980; Fanselow, 1980). Figure 4 shows the mean percentage of freezing exhibited by wild-type and mGluR7 $^{-/-}$ knockout mice. Before footshock, neither wild-type nor knockout mice exhibited freezing behavior. During the three 1 min intervals after footshock, wild-type mice displayed immediate postshock freezing that increased by repeated presentations of footshocks (Fig. 4*A*). mGluR7 $^{-/-}$ knockout mice froze after footshock, but this freezing was significantly reduced in these knockout mice (Fig. 4*A*). In the above experiments, gender-matched littermates derived from heterozygous mGluR7 $^{+/-}$ mice were used. However, the genetic background of individual animals was a different mixture of the 129 and C57BL/6 strains. Because different strains have been reported to exhibit differences in freezing response (Chen et al., 1996), we back-crossed the original mGluR7 $^{-/-}$ knockout mice into the C57BL/6 genetic background for seven generations and examined fear response of littermates derived from these mice in more detail. When repetitive footshocks were applied to wild-type mice with 1 min intervals, they showed immediate postshock freezing (Fig. 4*B*). The frequency of this freezing response increased over the number of footshocks and reached a maximal level during seven to eight times of repeated footshock applications. mGluR7 $^{-/-}$ knockout

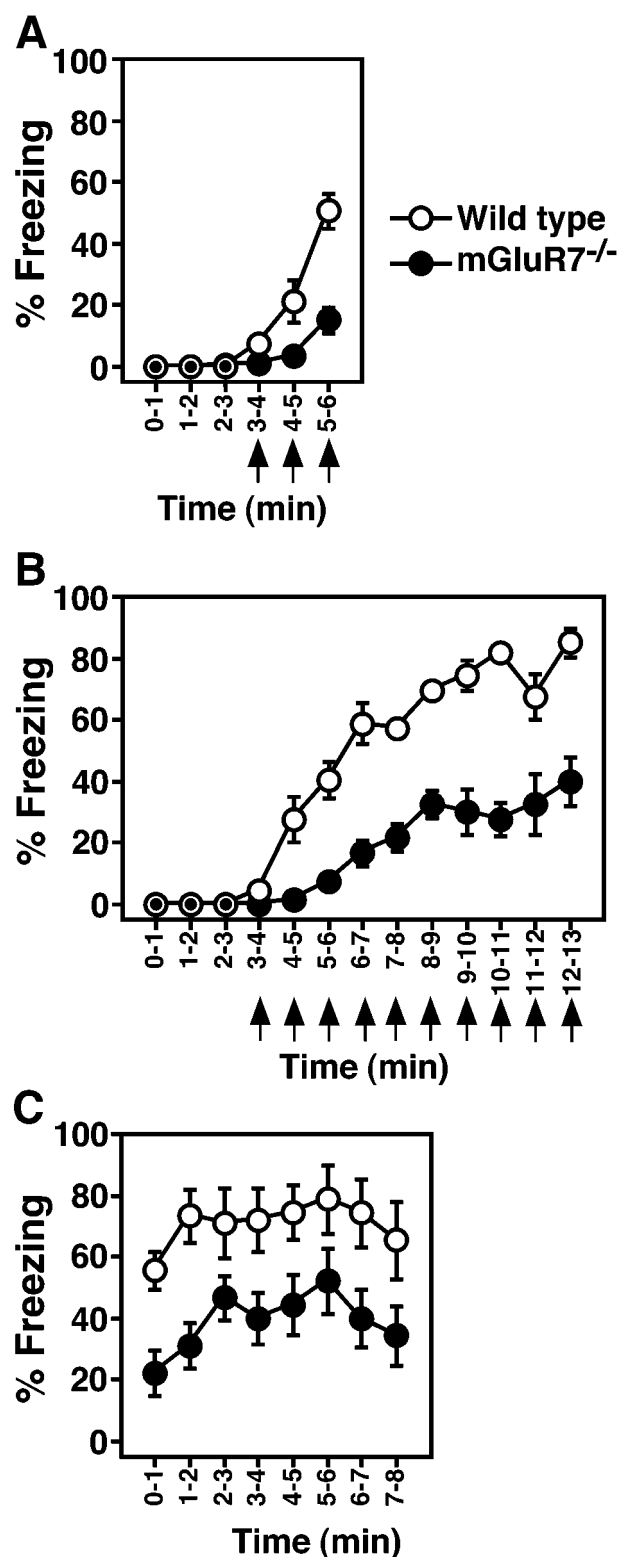


Figure 4. Freezing responses. *A*, Mean percentages of freezing immediately after footshocks. Percentage freezing was determined by time-sampling at 2 sec intervals. Three $\times$ 1 sec footshocks (0.7 mA, arrows) were given at 3, 4, and 5 min after animals had been placed in a new footshock-equipped chamber. Data points and bars represent mean $\pm$ SEM, respectively ($n = 11$). ANOVA with repeated measures revealed a significant main effect of genotype ($F_{(1,20)} = 18.5$, $p = 0.0004$) and a significant interaction between genotype and time ($F_{(5,100)} = 14.2$, $p < 0.0001$). *B*, Mean percentages of freezing before and during 10 footshocks were determined as described in *A*. The mGluR7^{-/-} knockout mice used

mice clearly exhibited an immediate postshock freezing response. However, the frequency of this response was significantly less than that seen in wild-type mice throughout the points of repetitive footshocks. Furthermore, the freezing response in mGluR7^{-/-} knockout mice reached a plateau phase at about a half of the maximal freezing response of wild-type mice (Fig. 4*B*). We also examined the freezing response 24 hr after footshock (Fig. 4*C*). When wild-type animals were returned to the shock chamber, they froze in the absence of footshock with similar maximal levels compared with the immediate postshock freezing. This observation indicates a retention of the fear response. The return of knockout mice into the footshock chamber also evoked freezing response, but the level of freezing in knockout mice was significantly lower than that of wild-type mice (Fig. 4*C*). However, this level was comparable to that of the immediate postshock freezing seen in these mice. These results indicate that mGluR7^{-/-} knockout mice show an impairment of fear-mediated freezing response but retain the ability to express the once memorized fear response.

Reduced pain could result in less freezing (Fanselow and Bolles, 1979). We tested whether the mGluR7 mutation may change nociceptive reactions to electric shock under the conditions used for the freezing studies. We measured the minimal currents required to elicit three stereotyped reactions against footshock: flinch, jump, and vocalization. Figure 5*A* indicates that there was no significant difference in these nociceptive reactions between mGluR7^{-/-} knockout and wild-type mice. We also examined pain sensitivity of the two genotypes with three additional behavioral analyses: tail-flick, hot-plate avoidance, and hot-plate jump. For all three analyses, mGluR7^{-/-} knockout mice showed thresholds comparable to those of wild-type mice (Fig. 5*B*). It is therefore unlikely that the attenuated freezing response of mGluR7^{-/-} knockout mice is caused by reduced pain sensitivity.

Change in motor activity or autonomic alteration may also affect the frequency of fear response. Under open-field conditions, we compared locomotor activity and the frequency of defecation and urination of wild-type and mGluR7^{-/-} mutant mice. This analysis indicated no significant difference in the locomotor activity or number of defecations and urinations between these two genotypes (Fig. 6*A,B*). These results strongly suggest that the reduced fear response of mGluR7^{-/-} knockout mice is caused by a fear-specific abnormality rather than modifications in freezing-related sensory or motor processing capacities.

Conditioned taste aversion

Lesion and pharmacological analyses have indicated that the amygdala plays an essential role in establishment of fear response

in *B* and *C* were generated by back-crossing the original mGluR7^{-/-} knockout mice into the C57BL/6 genetic background for seven generations. Data points and bars in *B* and *C* represent mean $\pm$ SEM, respectively ($n = 9$). ANOVA with repeated measures revealed a significant main effect of genotype ($F_{(1,16)} = 57.9$, $p < 0.0001$) and a significant interaction between genotype and time ($F_{(12,192)} = 10.8$, $p < 0.0001$). *C*, The footshock-treated animals in *B* were returned to their home cages for 24 hr. Immediately after the mice were returned to the footshock chamber, percentage freezing was determined by time-sampling at 6 sec intervals. ANOVA with repeated measures revealed a significant main effect of genotype ($F_{(1,16)} = 9.0$, $p = 0.0085$) and a nonsignificant interaction between genotype and time ($F_{(7,112)} = 0.36$, $p = 0.92$). Overall, mGluR7^{-/-} knockout mice exhibited significantly less freezing than wild-type, immediately after and 24 hr after footshock.

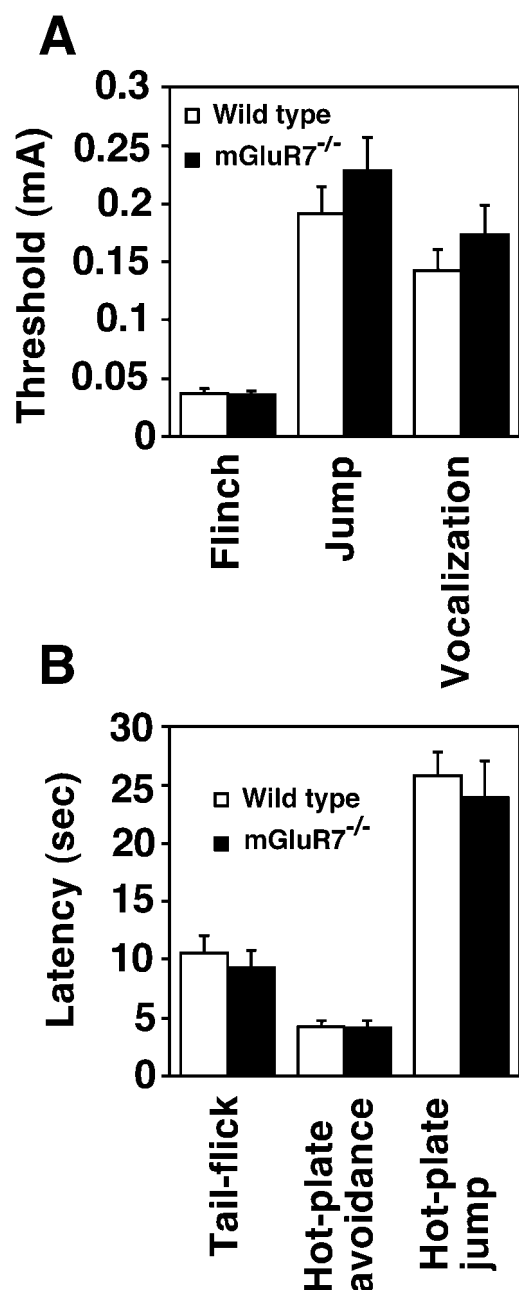


Figure 5. Pain sensitivity. *A*, The minimal amounts of currents required to elicit flinch, jump, and vocalization in responses to footshock were determined for wild-type and mGluR7^{-/-} knockout mice ($n = 16$). *B*, The latencies for first avoidance and jump in the hot-plate test and for tail-flick were determined for the two genotypes ($n = 6$). Columns and bars represent mean $\pm$ SEM, respectively. Statistical analyses using Student's *t* test indicated no difference in any of the behavioral tests between the two genotypes: for flinch ($t_{(30)} = 0.26$, $p = 0.80$), jump ($t_{(30)} = -1.0$, $p = 0.32$), vocalization ($t_{(30)} = -0.99$, $p = 0.33$), tail-flick ($t_{(10)} = 0.63$, $p = 0.54$), first avoidance ($t_{(10)} = 0.11$, $p = 0.92$), and jump in the hot-plate test ($t_{(10)} = 0.51$, $p = 0.62$).

to contextual cues such as an experimental chamber (Blanchard and Blanchard, 1972; Davis et al., 1994; Maren and Fanselow, 1996; Rogan and LeDoux, 1996), although lasting memory in fear response is dependent on both amygdala and hippocampal functions (Phillips and LeDoux, 1992). To study another amygdala-dependent task in mGluR7-deficient mice, we performed CTA experiments (Yamamoto et al., 1994) (Fig. 7). In CTA studies,

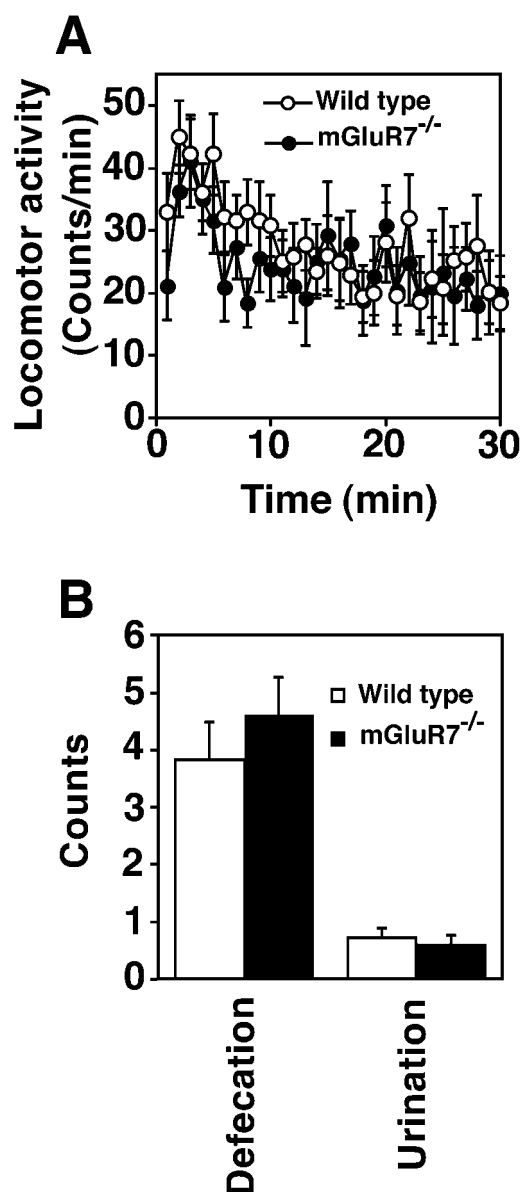


Figure 6. Open-field test. *A*, Spontaneous locomotor activity of wild-type and mGluR7^{-/-} knockout mice ($n = 9$) was determined by the total amount of activity during each 1 min time period after the animals had been placed in a novel open-field environment. ANOVA with repeated measures indicated no reliable difference in genotype ($F_{(1,16)} = 0.32$, $p = 0.58$) or interaction between genotype and time ($F_{(29,464)} = 0.69$, $p = 0.89$) in locomotor activity. *B*, Mean numbers of defecations and urinations of the two genotypes ($n = 18$) were determined for the first 30 min after the animals had been placed in a novel open-field environment. Data points and bars represent mean $\pm$ SEM, respectively. There was no statistical difference in any of the tests between two genotypes by Student's *t* test: for defecations ($t_{(34)} = 0.85$, $p = 0.40$) and urinations ($t_{(34)} = -0.52$, $p = 0.61$). In both *A* and *B*, mGluR7^{-/-} knockout and wild-type mice generated by back-crossing into the C57BL/6 genetic background for seven generations were used.

animals learn the taste stimuli that cause a toxic effect and remember to avoid repeated food intake. Strong CTA can be established in animals by administering saccharin followed by intraperitoneal injection of LiCl, an agent that elicits transient visceral malaise.

Animals were presented with saccharin and then subjected to an intraperitoneal injection of either LiCl or saline. This taste

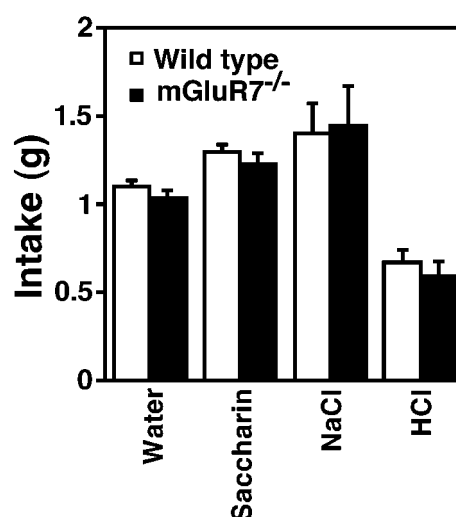


Figure 8. Taste preference. The preference for different taste solutions was examined. Columns and bars represent mean $\pm$ SEM, respectively. Statistical analysis by Student's *t* test indicated no significant change in taste preference between wild-type (wt) and knockout (ko) mice: for water ($n_{wt} = 61$ and $n_{ko} = 55$; $t_{(114)} = 1.0$, $p = 0.30$), saccharin ($n_{wt} = 61$ and $n_{ko} = 55$; $t_{(114)} = 0.91$, $p = 0.36$), NaCl ($n_{wt} = 18$ and $n_{ko} = 11$; $t_{(27)} = -0.14$, $p = 0.89$), and HCl ($n_{wt} = 18$ and $n_{ko} = 11$; $t_{(27)} = 0.73$, $p = 0.47$). Statistical analysis with Student's *t* test revealed that compared with water, both wild-type and mGluR7^{-/-} knockout mice drank more saccharin (wt: $t_{(120)} = -3.5$, $p = 0.0007$; ko: $t_{(108)} = -2.6$, $p = 0.012$) and NaCl (wt: $t_{(77)} = -2.7$, $p = 0.0086$; ko: $t_{(64)} = -2.8$, $p = 0.006$) and less HCl (wt: $t_{(77)} = 5.4$, $p < 0.0001$; ko: $t_{(64)} = 3.9$, $p = 0.0002$).

took from the LiCl injection to the first occurrence of a “lying on the belly” posture (Meachum and Bernstein, 1990). Results indicated no difference in the toxic effect of LiCl injection between the two genotypes (data not shown). The mGluR7^{-/-} knockout mice therefore showed no abnormalities in taste preference and in sensitivity to LiCl toxicity.

The present behavioral analysis of mGluR7^{-/-} knockout mice indicates that mGluR7 deficiency results in a marked reduction of freezing response to electric footshock and an impairment of CTA. In these knockout mice, a freezing deficit was observed both immediately (immediate postshock freezing) and 1 d (delayed freezing) after the shock presentation. Considerable evidence indicates that both types of freezing are conditional responses resulting from an association between the contextual cues of the chamber and the footshock (Blanchard et al., 1976; Bolles and Collier, 1976; Fanselow, 1986). Several control experiments have indicated that mGluR7 deficiency caused neither sensory nor motor performance deficits. In CTA experiments, the knockout mice failed to learn to avoid the taste stimulus that was paired with transient malaise. These mice were normal in taste preference and the sensitivity to LiCl toxicity. Thus, mGluR7 ablation impairs the ability to associate unconditional aversive stimuli and conditional stimuli in both fear and CTA responses.

Various brain areas have been implicated in the process of conditioned fear response and CTA behavior. The amygdala constitutes a major element of the fear-conditioning circuitry (Davis et al., 1994; Maren and Fanselow, 1996; Rogan and LeDoux, 1996). Amygdala lesion blocks both immediate postshock and delayed freezing responses (Kim et al., 1993). Our results show a functional deficit of both immediate postshock and de-

layed freezing responses in mGluR7^{-/-} knockout mice that is consistent with amygdala dysfunction. The hippocampus is also crucial in dealing with fear response of a highly complex stimulus such as environmental context (Selden et al., 1991; Kim and Fanselow, 1992; Phillips and LeDoux, 1992; Kim et al., 1993). However, neurotoxic NMDA-mediated lesion of the dorsal hippocampus (DH) has been shown to disrupt delayed freezing but preserve immediate postshock freezing (Maren et al., 1997). In contrast, recent reports of electrolytic DH lesion analysis have indicated that the DH is involved in both the acquisition and expression of conditioned fear responses (Maren and Fanselow, 1997; Maren et al., 1997). Because mGluR7 is widely expressed in various brain regions including the hippocampus, it is possible that impaired fear responses in mGluR7 deficiency may result from functional deficits of the hippocampus. In addition, the periaqueductal gray is thought to be important in both the acquisition and expression of fear response (De Oca et al., 1998). Nonetheless, lesion of the periaqueductal gray has been shown to leave CTA memory unchanged (De Oca et al., 1998). In CTA behavior, it is generally accepted that the gustatory cortex, the parabrachial nucleus, and the amygdala play a pivotal role in the process of aversion learning (Yamamoto et al., 1994). Particularly, the indispensable role of the amygdala in CTA learning has been shown repeatedly by a number of different approaches (Rolls and Rolls, 1973; Nachman and Ashe, 1974; Simbayi et al., 1986). The present study has demonstrated that mGluR7 deficiency results in severe impairments of both conditioned fear responses and CTA. Therefore, these findings strongly suggest that mGluR7 is involved in neural processes that subserve amygdala-dependent aversion learning.

Various neurotransmitters and neuropeptides are involved in neural mechanisms of amygdala function. The involvement of NMDA and GABA_A receptors in conditioned fear response has been reported by intra-BLA infusion of NMDA receptor antagonists and the GABA_A receptor agonist muscimol (Miserendino et al., 1990; Fanselow and Kim, 1994; Helmstetter and Bellgowan, 1994; Maren et al., 1996; Muller et al., 1997). Furthermore, as in other brain systems, NMDA receptor function has been shown to be of mechanistic importance in the plasticity underlying amygdala-dependent fear conditioning (Maren, 1996; Rogan and LeDoux, 1996). We attempted to explore possible changes in functional NMDA receptors and/or GABA_A receptors in mGluR7^{-/-} knockout mice. *In vitro* quantitative autoradiography was examined in serial brain sections using the labeled NMDA receptor antagonist [³H]MK-801 and the benzodiazepine receptor antagonist [³H]Ro 15-1788. For both ligands, no significant differences were observed in the amygdala of the two genotypes (data not shown). We further extended *in vitro* autoradiography to other ligands that have been implicated in fear response (Graeff, 1994; Hamon, 1994). These included serotonin 1A receptor agonist [³H]8-hydroxy-2-(di-*N*-dipropylamino)tetralin, serotonin 2 receptor antagonist [³H]ketanserin, dopamine D1 receptor antagonist [³H]SCH-23390, dopamine D2 receptor antagonist [³H]*N*-methylpiperone, β -adrenergic receptor antagonist [³H]dihydroalprenolol, a partial inverse agonist of benzodiazepine receptor [³H]Ro 15-4513, and glutamate receptor agonist [³H]kainate. None of these ligands showed any significant difference in their bindings at the amygdala between wild-type and mGluR7^{-/-} knockout mice (data not shown).

Amygdala converges information from the cortex and various subcortical structures via glutamatergic projections, and it also sends outputs to several brain regions. Electrophysiological anal-

ysis indicated that application of L-AP4 to amygdala slices reduces amplitudes of EPSPs but not the response to exogenous application of AMPA (Rainnie and Shinnick-Gallagher, 1992). Although this L-AP4-responsive receptor subtype remains to be identified, it is likely that the L-AP4-evoked reduction of EPSPs is mediated by mGluR7, which is most highly expressed in the amygdala among group III mGluR subtypes. Our immunoelectron-microscopic analysis further indicated that mGluR7 immunoreactivity is preferentially localized in the presynaptic site of asymmetrical glutamatergic synapses of amygdala neurons. Thus, it is most likely that mGluR7 serves as a presynaptic autoreceptor in glutamatergic synapses and modulates excitatory synaptic transmission in the amygdala. Furthermore, in the CA1 region of hippocampal slices, Bushell et al. (1996) found a reduction in high-frequency synaptic transmission, post-tetanic potentiation, and short-term potentiation in mGluR7^{-/-} knockout mice. These results were taken to suggest that mGluR7 is involved in short-term synaptic plasticity in the hippocampal CA1 region. Learning is believed to be embodied in persistent change in the transmission properties of neurons. Although the mechanism underlying the functional deficit in mGluR7^{-/-} knockout mice awaits further investigation, the conspicuous behavioral abnormality of these mice will provide a useful system for investigating the mechanism underlying aversive responses.

REFERENCES

- Baskys A, Malenka RC (1991) Agonists at metabotropic glutamate receptors presynaptically inhibit EPSCs in neonatal rat hippocampus. *J Physiol (Lond)* 444:687–701.
- Blanchard DC, Blanchard RJ (1972) Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *J Comp Physiol Psychol* 81:281–290.
- Blanchard RJ, Blanchard DC (1969) Crouching as an index of fear. *J Comp Physiol Psychol* 67:370–375.
- Blanchard RJ, Fukunaga KK, Blanchard DC (1976) Environmental control of defensive reactions to footshock. *Bull Psychon Soc* 8:129–130.
- Bolles RC, Collier AC (1976) The effect of predictive cues on freezing in rats. *Anim Learn Behav* 4:6–8.
- Bouton ME, Bolles RC (1980) Conditioned fear assessed by freezing and by the suppression of three different baselines. *Anim Learn Behav* 8:429–434.
- Bradley SR, Levey AI, Hersch SM, Conn PJ (1996) Immunocytochemical localization of group III metabotropic glutamate receptors in the hippocampus with subtype-specific antibodies. *J Neurosci* 16:2044–2056.
- Bushell TJ, Sansig G, Shigemoto R, Flor P, Kuhn R, Knoepfel T, Scheiroeder M, Collett VL, Collingridge GL, van der Putten H (1996) An impairment of hippocampal synaptic plasticity in mice lacking mGlu7 receptors. *Neuropharmacology* 35:A6.
- Chen C, Kim JJ, Thompson RF, Tonegawa S (1996) Hippocampal lesions impair contextual fear conditioning in two strains of mice. *Behav Neurosci* 110:1177–1180.
- Conn PJ, Pin J-P (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:205–237.
- D'Amour FE, Smith DL (1941) A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther* 72:74–79.
- Davis M, Rainnie D, Cassell M (1994) Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *Trends Neurosci* 17:208–214.
- De Oca BM, DeCola JP, Maren S, Fanselow MS (1998) Distinct regions of the periaqueductal gray are involved in the acquisition and expression of defensive responses. *J Neurosci* 18:3426–3432.
- Eddy NB, Leimbach D (1953) Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. *J Pharmacol Exp Ther* 107:385–393.
- Fanselow MS (1980) Conditional and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlov J Biol Sci* 15:177–182.
- Fanselow MS (1986) Associative vs topographical accounts of the immediate shock-freezing deficit in rats: implications for the response selection rules governing species-specific defensive reactions. *Learn Motiv* 17:16–39.
- Fanselow MS, Bolles RC (1979) Naloxone and shock-elicited freezing in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 93:736–744.

- Fanselow MS, Kim JJ (1994) Acquisition of contextual Pavlovian fear conditioning is blocked by application of an NMDA receptor antagonist D,L-2-amino-5-phosphonovaleric acid to the basolateral amygdala. *Behav Neurosci* 108:210–212.
- Flynn FW, Grill HJ, Schwartz GJ, Norgren R (1991) Central gustatory lesions: I. Preference and taste reactivity tests. *Behav Neurosci* 105:933–943.
- Forsythe ID, Clements JD (1990) Presynaptic glutamate receptors depress excitatory monosynaptic transmission between mouse hippocampal neurones. *J Physiol (Lond)* 429:1–16.
- Graeff FG (1994) Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Braz J Med Biol Res* 27:811–829.
- Hamon M (1994) Neuropharmacology of anxiety: perspectives and prospects. *Trends Pharmacol Sci* 15:36–39.
- Helmstetter FJ, Bellgowan PS (1994) Effects of muscimol applied to the basolateral amygdala on acquisition and expression of contextual fear conditioning in rats. *Behav Neurosci* 108:1005–1009.
- Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31–108.
- Kim JJ, Fanselow MS (1992) Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 256:675–677.
- Kim JJ, Rison RA, Fanselow MS (1993) Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short- and long-term contextual fear. *Behav Neurosci* 107:1093–1098.
- Kinoshita A, Ohishi H, Neki A, Nomura S, Shigemoto R, Takada M, Nakanishi S, Mizuno N (1996a) Presynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR8, in the rhinencephalic areas: a light and electron microscope study in the rat. *Neurosci Lett* 207:61–64.
- Kinoshita A, Ohishi H, Nomura S, Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N (1996b) Presynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR4, in the cerebellar cortex: a light and electron microscope study in the rat. *Neurosci Lett* 207:199–202.
- Kinoshita A, Shigemoto R, Ohishi H, van der Putten H, Mizuno N (1998) Immunohistochemical localization of metabotropic glutamate receptors, mGluR7a and mGluR7b, in the central nervous system of the adult rat and mouse: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 393:332–352.
- Kinzie JM, Saugstad JA, Westbrook GL, Segerson TP (1995) Distribution of metabotropic glutamate receptor 7 messenger RNA in the developing and adult rat brain. *Neuroscience* 69:167–176.
- Makoff A, Pilling C, Harrington K, Emson P (1996) Human metabotropic glutamate receptor type 7: molecular cloning and mRNA distribution in the CNS. *Brain Res Mol Brain Res* 40:165–170.
- Maren S (1996) Synaptic transmission and plasticity in the amygdala. An emerging physiology of fear conditioning circuits. *Mol Neurobiol* 13:1–22.
- Maren S, Fanselow MS (1996) The amygdala and fear conditioning: has the nut been cracked? *Neuron* 16:237–240.
- Maren S, Fanselow MS (1997) Electrolytic lesions of the fimbria/fornix, dorsal hippocampus, or entorhinal cortex produce anterograde deficits in contextual fear conditioning in rats. *Neurobiol Learn Mem* 67:142–9.
- Maren S, Aharonov G, Stote DL, Fanselow MS (1996) N-methyl-D-aspartate receptors in the basolateral amygdala are required for both acquisition and expression of conditional fear in rats. *Behav Neurosci* 110:1365–1374.
- Maren S, Aharonov G, Fanselow MS (1997) Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. *Behav Brain Res* 88:261–274.
- Mayer ML, Westbrook GL (1987) The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog Neurobiol* 28:197–276.
- Meachum CL, Bernstein IL (1990) Conditioned responses to a taste conditioned stimulus paired with lithium chloride administration. *Behav Neurosci* 104:711–715.
- Miserendino MJD, Sananes CB, Melia KR, Davis M (1990) Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. *Nature* 345:716–718.
- Muller J, Corodimas KP, Fridel Z, LeDoux JE (1997) Functional inactivation of the lateral and basal nuclei of the amygdala by muscimol infusion prevents fear conditioning to an explicit conditioned stimulus and to contextual stimuli. *Behav Neurosci* 111:683–691.
- Nachman M, Ashe JH (1974) Effects of basolateral amygdala lesions on neophobia, learned taste aversions, and sodium appetite in rats. *J Comp Physiol Psychol* 87:622–643.
- Nakanishi S (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258:597–603.
- Nakanishi S (1994) Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation, and plasticity. *Neuron* 13:1031–1037.
- Nakanishi S, Masu M (1994) Molecular diversity and functions of glutamate receptors. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 23:319–348.
- Ohishi H, Akazawa C, Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N (1995) Distributions of the mRNAs for L-2-amino-4-phosphonobutyratesensitive metabotropic glutamate receptors, mGluR4 and mGluR7, in the rat brain. *J Comp Neurol* 360:555–570.
- Okamoto N, Hori S, Akazawa C, Hayashi Y, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S (1994) Molecular characterization of a new metabotropic glutamate receptor mGluR7 coupled to inhibitory cyclic AMP signal transduction. *J Biol Chem* 269:1231–1236.
- Phillips RG, LeDoux JE (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 106:274–285.
- Pin J-P, Duvoisin R (1995) The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34:1–26.
- Rainnie DG, Shinnick-Gallagher P (1992) Trans-ACPD and L-APB presynaptically inhibit excitatory glutamatergic transmission in the basolateral amygdala (BLA). *Neurosci Lett* 139:87–91.
- Rogan MT, LeDoux JE (1996) Emotion: systems, cells, synaptic plasticity. *Cell* 85:469–475.
- Rolls BJ, Rolls ET (1973) Effects of lesions in the basolateral amygdala on fluid intake in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 83:240–247.
- Saugstad JA, Kinzie JM, Mulvihill ER, Segerson TP, Westbrook GL (1994) Cloning and expression of a new member of the L-2-amino-4-phosphonobutyric acid-sensitive class of metabotropic glutamate receptors. *Mol Pharmacol* 45:367–372.
- Selden NRW, Everitt BJ, Jarrard LE, Robbins TW (1991) Complementary roles for the amygdala and hippocampus in aversive conditioning to explicit and contextual cues. *Neuroscience* 42:335–350.
- Shigemoto R, Kulik A, Roberts JD, Ohishi H, Nusser Z, Kaneko T, Somogyi P (1996) Target-cell-specific concentration of a metabotropic glutamate receptor in the presynaptic active zone. *Nature* 381:523–525.
- Shigemoto R, Kinoshita A, Wada E, Nomura S, Ohishi H, Takada M, Flor PJ, Neki A, Abe T, Nakanishi S, Mizuno N (1997) Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J Neurosci* 17:7503–7522.
- Simbayi LC, Boakes RA, Burton MJ (1986) Effects of basolateral amygdala lesions on taste aversions produced by lactose and lithium chloride in the rat. *Behav Neurosci* 100:455–465.
- Yamamoto T, Shimura T, Sako N, Yasoshima Y, Sakai N (1994) Neural substrates for conditioned taste aversion in the rat. *Behav Brain Res* 65:123–137.
- Yamamoto T, Fujimoto Y, Shimura T, Sakai N (1995) Conditioned taste aversion in rats with excitotoxic brain lesions. *Neurosci Res* 22:31–49.

Antidepressant and anxiolytic-like effects in mice lacking the group III metabotropic glutamate receptor mGluR7

John F. Cryan, Peter H. Kelly, Hans C. Neijt, Gilles Sansig, Peter J. Flor and Herman van Der Putten

Nervous System Research, Novartis Institutes for BioMedical Sciences, Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland

Abstract

Glutamatergic neurotransmission has been strongly implicated in the pathophysiology of affective disorders, such as major depression and anxiety. Of all glutamate receptors, the role of group III metabotropic glutamate receptors (mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8) in such disorders is the least investigated because of the lack of specific pharmacological tools. To this end, we examined the behavioural profiles of mice with a targeted deletion of the gene for mGluR7 (mGluR7^{-/-}) in animal models of depression and anxiety. mGluR7^{-/-} mice were compared with wild-type (mGluR7^{+/+}) littermates and showed substantially less behavioural immobility in both the forced swim test and the tail suspension test. Both behavioural paradigms are widely used to predict antidepressant-like activity. Further, mGluR7^{-/-} mice displayed anxiolytic activity in four different behavioural tests, i.e. the light–dark box, the elevated plus maze, the staircase test, and the stress-induced hyperthermia test, while their cognitive performance was normal in the passive avoidance paradigm. Analysis of locomotor activity in a novel environment demonstrated that mGluR7^{-/-} mice were slightly more active in the initial minutes following placement in the chamber only. Together, these data suggest that mGluR7 may play a pivotal role in mechanisms that regulate behavioural responses to aversive states. Therefore, drugs acting at mGluR7 may provide novel treatments for psychiatric disorders such as depression and anxiety.

Introduction

Glutamate (L-Glu) is the major excitatory neurotransmitter in the adult central nervous system. Its fast actions are mediated by ionotropic receptors. In addition, three groups comprised of eight G-protein-coupled metabotropic glutamate receptors (mGluR) mediate slower modulatory actions of L-Glu on neurotransmitter release and cell excitability (Nakanishi, 1994; Conn & Pin, 1997; Schoepp, 2001). In recent years there has been a resurgence of interest in the role of L-Glu in affective disorders such as depression and anxiety (Skolnick *et al.*, 2002; Stewart & Reid, 2002; Krystal *et al.*, 2002; Walker & Davis, 2002). It is becoming clear that manipulation of the glutamatergic system by selective activation/antagonism of various mGluRs can lead to anxiolytic- and/or antidepressant-like effects (Spooren *et al.*, 2000; Chojnacka-Wojcik *et al.*, 2001; Tatarczynska *et al.*, 2001a; Tatarczynska *et al.*, 2001b).

The availability of selective systemically active ligands and several gene knockouts for group I (mGluR1 and mGluR5) and group II receptors (mGluR2 and mGluR3) has substantially aided the elucidation of the role of these mGluR subtypes in brain function (Schoepp, 2001; Spooren *et al.*, 2001). The development of systemically active group III mGluR subtype-selective agents is lagging behind and hampers elucidating the roles of these subtypes in brain function and disease. Nonetheless, studies with group III mGluR-selective but subtype-nonselective compounds and group III mGluR subtype-selective knockout mice have been used successfully to unmask some of their roles of in-brain function. Accordingly, mGluR4 appears to have roles in neuroprotection (Bruno *et al.*, 2000), seizure-threshold (Snead *et al.*, 2000), spatial learning and memory (Pekhletski *et al.*,

1996; Gerlai *et al.*, 1998). mGluR6^{-/-} mice have dysfunction of the ON visual pathway (Masu *et al.*, 1995). mGluR8-deficient mice have increased anxiety-related behaviour (Linden *et al.*, 2002) and subtle performance deficits in some learning tasks (Gerlai *et al.*, 2002). Mice lacking mGluR7, which is the most highly conserved of mGluR subtypes across different mammalian species (Makoff *et al.*, 1996), have a decreased seizure-threshold (Sansig *et al.*, 2001), deficits in amygdala-dependent behaviours (fear response and conditioned taste aversion), but show no alterations in locomotor activity or pain sensitivity (Masugi *et al.*, 1999). Electrophysiological analysis in mGluR7^{-/-} mice further suggests that this receptor is a frequency-dependent regulator of neurotransmitter release (Sansig *et al.*, 2001), and alters short-term synaptic plasticity in the hippocampus (Bushell *et al.*, 2002).

mGluR7 is abundant in brain regions that are known to be critical for the manifestation of anxiolysis and antidepressant action, such as the amygdala, hippocampus and the locus coeruleus (Kinoshita *et al.*, 1998). Group III mGluRs modulate excitatory neurotransmission in the nucleus locus coeruleus (Dube & Marshall, 2000), and regulate a variety of other nonglutamatergic neurotransmitters directly or indirectly (reviewed in Cartmell & Schoepp, 2000). The latter is not surprising as mGluR7 is present in presynaptic terminals of glutamatergic, γ -aminobutyric acid (GABA)ergic and other nonglutamatergic neurons (Bradley *et al.*, 1996; Shigemoto *et al.*, 1996; Shigemoto *et al.*, 1997; Kinoshita *et al.*, 1998; Dalezios *et al.*, 2002). While these findings suggest that mGluR7 could be involved in regulating circuitries that are key in psychiatric conditions, only a limited number of studies have investigated such a proposition in animal models of psychopathology. Further, all such studies have used nonselective, group III mGluR ligands. Chojnacka-Wojcik *et al.* (1997) have shown that after intrahippocampal administration, an antagonist of group III mGlu receptors (R,S)-alpha-methylserine-

Correspondence: Dr J. F. Cryan, as above.
E-mail: john_f.cryan@pharma.novartis.com

Received 12 February 2003, revised 19 March 2003, accepted 26 March 2003

O-phosphate (MSOP) induced anxiolytic effects in a modified Vogel test of anxiety. However, this same research group has shown that a selective group III mGluR agonist, L-serine-O-phosphate (L-SOP), had a similar anticonflict effect (Tatarczynska *et al.*, 2001a). On the other hand, another recent study has demonstrated that the intrahippocampal injection of a different group III-preferring agonist, s-2-amino-4-phosphonobutyrate (LAP-4), failed to alter elevated plus maze behaviour in the rat (Szapiro *et al.*, 2001). Therefore, in the absence of selective mGluR7 ligands, we used mGluR7^{-/-} mice to better test the hypothesis that mGluR7 could be involved in regulating circuitries that are involved in psychiatric disorders using a number of paradigms that are widely used to predict anxiolytic and antidepressant action.

Materials and methods

Animals

mGluR7^{-/-} mice were generated as described previously from E14 (129/Ola) embryonic stem cells (Sansig *et al.*, 2001). Larger age-matched groups of mGluR7^{-/-} and mGluR7^{+/+} mice were generated using a specific pathogen-free (SPF) breeding colony of 30 F14,B6-mGluR7^{+/+} males mating with 60–90 F14,B6-mGluR7^{+/+} females. All the mice in the studies reported here carried wild-type or mutant mGluR7 alleles on a 14th generation C57BL/6 genetic background. Mice were weaned at the age of 3 weeks, when tail biopsies were also taken for genotyping. One–three gender-matched littermates were housed per cage. Subsequently, genotyped mice were moved to a nonSPF conventional facility in which their behaviour was assessed at the ages of 10–14 weeks. Housing was at room temperature, in a 12 h light : dark cycle, with lights on at 06.00 h. Food pellets and tap water were available *ad libitum* unless stated otherwise. All behavioural experiments were conducted during the light cycle. Experimentally naïve animals were used in all experiments, with the following exceptions: (i) those tested in the tail suspension test had previously undergone the forced swim test 1 week earlier; (ii) those tested for passive avoidance had previously been used in the staircase test; (iii) those used in the elevated plus maze were used earlier for the primary observation test (POT). All animal experiments were subject to institutional review and conducted in accordance with the Veterinary Authority of Basel-Stadt, Switzerland.

POT

A battery of behavioural and physiological observations were made to investigate if mGluR7^{-/-} mice had any gross differences compared with mGluR7^{+/+} mice. This was important to investigate, as these mice have been shown previously to develop an enhanced susceptibility to seizures between the ages of 8–12 weeks. This increase in spontaneous seizure episodes was primarily detected upon cage change. Also, it was specific to certain bedding material, and observed mainly in animals that were housed permanently under SPF conditions (Sansig *et al.*, 2001). The observations quantified were the presence of twitches, tremor, convulsions, piloerection, stereotyped behaviour, lacrimation, salivation, ptosis, catelepsy, passivity, falling convulsion and ataxia. In addition, the frequency and quality of breathing was observed. Alterations in skin colour, tail position, pelvic position, limb tone, abdominal tone and pupil width were observed. The nature of locomotion, motility in cage, rearing and grouping of animals was quantified, as was their overall flight and fear reaction. In addition, novelty behaviour was observed and a series of reflexes checked, including pinna reflex, toepinch, tailpinch and provoked biting. Body temperature was also quantified. This battery of tests has been vali-

dated in our laboratories to detect stimulant and sedative effects in mice in addition to other effects of pharmacological agents.

The forced swim test

The mouse forced swim test is the most widely used test to assess alterations in depression-like behaviour in genetically modified animals (Cryan *et al.*, 2002). It was conducted as previously described (Cryan *et al.*, 2001). Briefly, mice were placed individually into Plexiglas cylinders (24 cm tall × 21 cm in internal diameter) filled with water (23–25 °C) to a depth of 15 cm. All test sessions were recorded by a video camera positioned directly above the cylinders. Videotapes were subsequently scored blind by a trained observer. The behavioural measure scored from videotape was the duration of immobility during the last 4 min of the test period. A mouse was judged to be immobile when making only those movements necessary to keep its head above water.

The tail suspension test

The tail suspension test is another well-characterized test for assessing depression-like and antidepressant-like activity (Porsolt, 2000; Cryan *et al.*, 2002; Cryan *et al.*, 2003). The test was carried out essentially as described previously (Steru *et al.*, 1985). Mice were individually suspended by the tail to a horizontal ring-stand bar (distance from floor = 30 cm) using adhesive tape (distance from tip of tail = 2 cm). Typically, mice demonstrated several escape-orientated behaviours interspersed with temporally increasing bouts of immobility. A 6-min test session was employed, which was videotaped. Videotapes were subsequently scored by a highly trained observer who was unaware of the treatment. The parameter recorded was the number of seconds spent immobile. In anticipation of tail climbing behaviour, which confounds interpretation of data and has been previously described in C57/Bl6 animals (Mayorga & Lucki, 2001), the background strain which the mGluR7 allele was backcrossed on, larger than usual numbers of animals ($n = 23$) were tested in the tail suspension test.

Light–dark box

The light–dark box test was carried out essentially as described by Holmes *et al.* (2002). The apparatus consisted of a clear Plexiglas cage (44 × 21 × 21 cm) separated into two compartments by a partition, which had a small opening (12 × 5 cm) at floor level. The open compartment was open topped, transparent and brightly illuminated by a 60 Watt desk lamp overhead. The smaller compartment was 14 cm long and made from black Plexiglas. It was covered on top also by black Plexiglas. Mice were individually placed in the centre of the brightly lit compartment, facing away from the partition and allowed to freely explore the apparatus for 10 min. The apparatus was cleaned thoroughly between subjects. The number of light–dark transitions made was recorded by a trained observer.

Elevated plus maze

The elevated plus maze was carried out as described previously (Rodgers *et al.*, 1997). It comprised two open arms (30 × 5 cm) and two enclosed arms (30 × 5 × 15 cm), which extended from a common central platform (5 × 5 cm). The configuration formed the shape of a plus sign, with like arms arranged opposite one another, and the apparatus was elevated 60 cm above floor level on a central pedestal. The maze floor was made of black Plexiglas, while the side- and end-walls of the enclosed arms were made from clear Plexiglas. Grip on the open arms was facilitated by inclusion of a small raised edge (0.25 cm) around their perimeter. Animals were transported from the holding room to the laboratory at least 1 h before testing. Mice were placed

onto the central platform facing an enclosed arm. A 6-min trial was performed and, between subjects, the maze was thoroughly cleaned. Direct registrations were made by an observer sitting close to the maze using the following conventional parameters: number of open and closed arm entries (arm entry defined as all four paws entering an arm), time spent on open arms (excluding the central platform).

Staircase test

The test was carried out essentially as described by Simiand *et al.* (1984) and consisted of placing an experimentally naïve mouse in an enclosed staircase with five steps made of grey plastic. Each step was 2.5 cm in height, 7.5 cm in length and 11 cm in width. The apparatus was 45 cm in length, with one end 12 cm and the other 25 cm in height. The number of steps climbed and rearings made in a 3-min period were observed. The step-climbing count was increased every time the animal moved from one step to another in the ascending direction. The apparatus was briefly wiped with a wet paper towel and dried between animals. Animals were singly housed and moved to the testing room at least 1 h prior to testing commenced.

Stress-induced hyperthermia (SIH)

The test procedure for the modified SIH was adapted from Van der Heyden *et al.* (1997). Mice were singly housed overnight in the testing room with free access to water and food. Rectal temperature was measured in each mouse twice, i.e. at $t = 0$ min (T_1) and $t = +15$ min (T_2). The first measurement of temperature serves as the stressor and results in a rapid hyperthermic response. The difference in temperature ($T_2 - T_1$) was considered to reflect the SIH. Time-points were based on previous experiments which showed that a $T_2 - T_1$ interval of 15 min was optimal in terms of SIH (Spooren *et al.*, 2002). Rectal temperature was measured to the nearest 0.1 °C by an ELLAB instruments (Copenhagen, Denmark) thermometer Model DM 852 by inserting a lubricated thermistor probe model PRA-22002-A (ELLAB) 2.2 mm diameter 20 mm into the rectum; the mouse was hand-held at the base of the tail during this determination and the thermistor probe was left in place for 15 s.

Locomotor activity

Locomotor activity was analysed in a novel environment. The activity monitor consisted of a black and white video camera, mounted in the top-centre of an enclosure (60 × 40 × 50 cm), whereby a cage (55 × 33 × 19 cm) was positioned in the enclosure. Each second, a single video frame was acquired with a highly accurate, programmable, monochrome frame grabber board (Data Translation, Marlboro, MA, USA; type DT3155). Using in-house developed software, digitized pixels of two successive frames were compared, and the total number of pixels with altered intensity was counted (independently for pixels with increased and decreased intensity). This allowed the detection of the animal's position within the cage (the centre of pixels with decreased intensity, because animals were dark compared with background). Distance travelled (distance in cm between centres of activity when movement was > 10% body size) was analysed and stored every 5 min.

Passive avoidance test

As deficits in conditioned taste aversion were previously ascribed for these mice, we sought to investigate whether they had any cognitive deficits in the passive avoidance test. Before passive avoidance training, mice were housed singly. One-trial step-through passive avoidance training was performed as previously described in detail (Venable & Kelly, 1990). In brief, on the training trial, each mouse was placed singly into the light side of a two-compartment trough-shaped appa-

ratus. The door to the dark compartment was opened and, simultaneously, timing by a computer was initiated. When the mouse broke a photocell beam located 10.5 cm into the dark compartment, the latency from opening the door to the animal breaking the beam (step-through latency) was automatically recorded and a Campden Instruments 521 C Shock Source was automatically activated. This resulted in the application of a footshock (0.5 mA rectangular current waves) between the stainless steel plates, which comprised the dark compartment. The footshock lasted a maximum of 5 s or until the animal escaped back to the light compartment. In the present experiments, all animals escaped back to the light compartment within 5 s. Animals which did not enter the dark compartment within 150 s on the training trial were given a training latency of 150 s, received no footshock, and were excluded from the memory retention test. The memory retention test was performed on the day following the training trial and was identical to it except that no footshock was administered. Maximum latency in the retention test was 300 s.

Statistics

Forced swim test, tail suspension test, elevated plus maze, staircase test, SIH and passive avoidance data were analysed using one-way analysis of variance (ANOVA), with genotype as factor. Light-dark box and locomotor activity were analysed using a repeated-measure ANOVA, with genotype as the between factor and time as the within subject variable. Statistically significant effects were followed where appropriate with Fisher's post-hoc tests. The level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

POT

Unlike mGluR7^{-/-} mice kept under SPF conditions where spontaneous seizures were observed as reported earlier (Sansig *et al.*, 2001), this phenotype was not apparent in mGluR7^{-/-} mice kept in our nonSPF facilities in which all behavioural assessments were carried out. To assess whether ablation of mGluR7 receptors had any other effects on gross behaviour and physiology, mGluR7^{-/-} mice were subjected to an extensive POT battery. Other than a mild reduction in provoked biting observed in mGluR7^{-/-} mice, these tests revealed no significant differences between mGluR7^{-/-} and mGluR7^{+/+} mice in any of the other 29 parameters assessed (see Materials and methods), including locomotion in and out of home-cage.

Depression-like behaviour in mGluR7^{-/-} mice

In light of the pronounced localization of mGluR7 in regions known to be implicated in depression and the mediation of the antidepressant response, we investigated whether mGluR7^{-/-} mice had an altered behaviour in the forced swim test and the tail suspension test. These tests are the two most widely used paradigms for assessing alterations in depression-related behaviour in genetically altered animals (Porsolt, 2000; Cryan *et al.*, 2002; Seong *et al.*, 2002).

The forced swim test

As shown in Fig. 1A, mGluR7^{-/-} mice had significantly lower immobility scores than their mGluR7^{+/+} counterparts ($F_{1,46} = 13.53$, $P = 0.001$), which is indicative of an antidepressant-like phenotype in mGluR7^{-/-} mice.

The tail suspension test

The test revealed (Fig. 1B) that mGluR7^{-/-} mice had significantly lower immobility scores than age- and sex-matched mGluR7^{+/+} mice from the same set of litters ($F_{1,30} = 68.74$, $P < 0.001$). The outcomes in

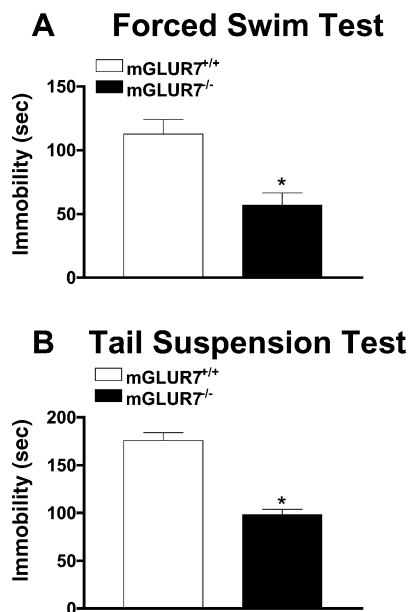


FIG. 1. Antidepressant-like activity in mGluR7^{-/-} mice. (A) mGluR7^{-/-} mice ($n=24$) had a much lower immobility score than mGluR7^{+/+} ($n=24$) in the mouse forced swim test, which indicates an antidepressant-like effect. (B) Similarly, mGluR7^{-/-} mice ($n=19$) had a much lower immobility score than mGluR7^{+/+} ($n=13$) in the mouse tail suspension test, which is also indicative of an antidepressant-like effect. All bars represent mean values, with vertical lines indicating 1 SEM. *Groups that differed significantly from mGluR7^{+/+} mice.

both forced swim test and the tail suspension test are therefore indicative of an antidepressant-like phenotype in mGluR7^{-/-} mice. One of the drawbacks of the tail suspension test is that certain strains of mice climb up their tail onto the supporting bar (or other support), making it impossible to interpret the behaviour of such animals in terms of depression-related behaviour, as they are no longer in an inescapable situation. Mayorga & Lucki (2001) recently demonstrated that C57/Bl6 mice have a very high incidence of tail climbing compared with other strains. Indeed, in our studies 14 out of 46 mice (30%) (of which four mice were mGluR7^{-/-} and 10 mGluR7^{+/+}) climbed their tails. This climbing is to be predicted given that the mGluR7 mutant allele was backcrossed for 14 generations onto the C57/Bl6 background strain. We excluded all animals from analysis that showed tail climbing in order not to confound our behavioural analysis. Furthermore, based on the limited dataset on tail climbing in

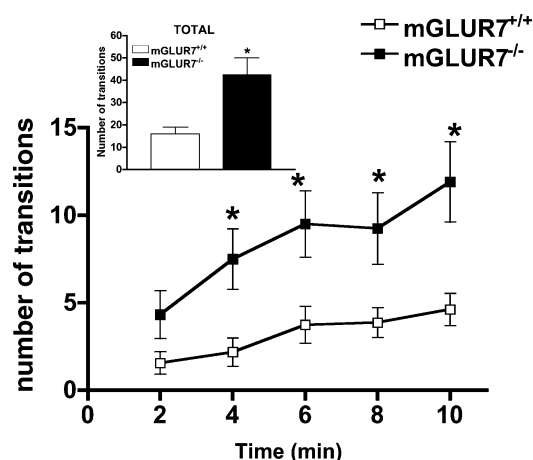


FIG. 2. Anxiolytic-like effects of mGluR7^{-/-} mice in the light-dark box test. (A) mGluR7^{-/-} mice ($n=12$) had a markedly higher number of transitions between the dark and light compartments throughout the 10 min of the test when compared with mGluR7^{+/+} animals ($n=16$). (Inset) Analysis of the total number of light-dark transitions further demonstrates that mGluR7^{-/-} mice are less anxious than their wild-type counterparts. All data points or bars represent mean values, with vertical lines indicating 1 SEM. *Groups that differed significantly from mGluR7^{+/+} mice.

the literature, it is difficult to give any significance to the fact that slightly less mGluR7^{-/-} mice climbed their tails than did wild-type controls.

Anxiety-like behaviour in mGluR7^{-/-} mice

Three distinct behavioural and one physiological paradigm were used to assess anxiety-related behaviours in mGluR7^{-/-} mice.

The light-dark box

Upon being placed in the lit side of the apparatus, some freezing behaviour was observed in many of the mGluR7^{+/+} mice (7/16, 44%) as compared with only 2/12 (17%) mGluR7^{-/-} mice failed to enter the dark compartment within 6 min. These observations are in agreement with previous findings that showed a decrease in freezing behaviour in mGluR7^{-/-} mice (Masugi *et al.*, 1999). In a similar manner, ANOVA revealed that: (i) mGluR7^{-/-} mice had a significantly higher number of transitions between the light and dark compartments ($F_{1,26} = 12.62$, $P = 0.001$); and (ii) their number of transitions increased during the test ($F_{4,104} = 9.27$, $P < 0.001$). Altogether, these effects are indicative of anxiolytic-like behaviour of mGluR7^{-/-} mice (Fig. 2).

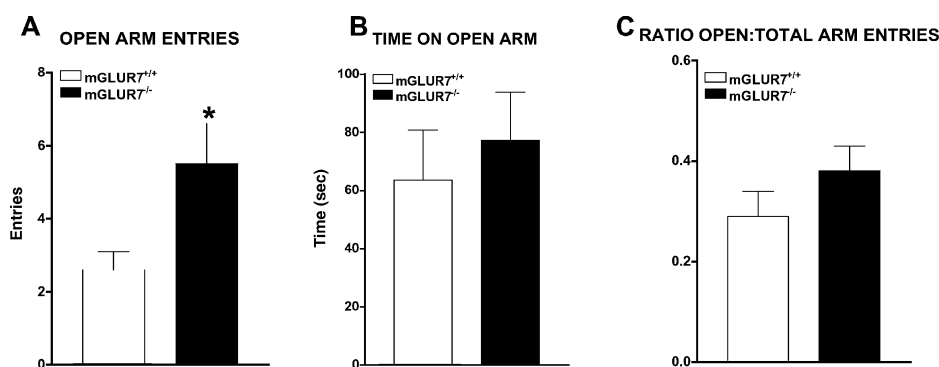


FIG. 3. Anxiolytic-like effects of mGluR7^{-/-} mice in the elevated plus maze. (A) mGluR7^{-/-} mice ($n=24$) had significantly more entries into the open arms of the elevated plus maze compared with mGluR7^{+/+} mice ($n=24$). (B) mGluR7^{-/-} mice did not have a significant increase in the time spent on the open arms compared with mGluR7^{+/+} mice. (C) mGluR7^{-/-} mice had an increased ratio of open : total arm entries compared with mGluR7^{+/+} mice. However, this failed to reach the level of statistical significance. All bars represent mean values with vertical lines indicating 1 SEM. *Groups that differed significantly from mGluR7^{+/+} mice.

The elevated plus maze

In the elevated plus maze (Fig. 3), mGluR7^{-/-} mice had a significantly higher number of open arm entries as compared with their mGluR7^{+/+} littermates ($F_{1,46} = 6.07$, $P = 0.018$). There was no difference between both genotypes on the number of closed arm entries (data not shown), supporting the proposition that the anxiolytic-like behavioural effects of mGluR7^{-/-} mice are not due to nonspecific alterations on locomotor activity. The ratio of open arm : total arm entries was somewhat higher (31%) in mGluR7^{-/-} mice as compared with mGluR7^{+/+} mice, but this difference did not reach statistical significance. Likewise, mGluR7^{-/-} mice showed a nonsignificant trend to spend more time (27% more as compared with mGluR7^{+/+} mice) on the open arms. Although the magnitude of the response was not as pronounced as that commonly observed after treatment with benzodiazepine-type anxiolytics (Lister, 1987; Griebel *et al.*, 2000), the behavioural effects associated with the lack of mGluR7 in the elevated plus maze are consistent with anxiolytic-like behaviour in these mice.

The staircase test

As shown in Fig. 4, mGluR7^{-/-} mice had a significantly lower number of rearings in the staircase test than mGluR7^{+/+} littermates ($F_{1,29} = 12.30$, $P = 0.002$). There was no difference between both genotypes on the number of steps climbed, again (see elevated plus maze) supporting the interpretation that the effects are not attributable to nonspecific effects on locomotor activity caused by the lack of mGluR7. The ratio of steps : rears, the primary index of anxiolysis in this test (Simiand *et al.*, 1984), was significantly higher ($F_{1,29} = 12.62$, $P = 0.001$) in mGluR7^{-/-} as compared with mGluR7^{+/+} mice. Furthermore, in the novel environment, mGluR7^{-/-} unlike mGluR7^{+/+} mice showed a strong trend toward a significant reduction in urination

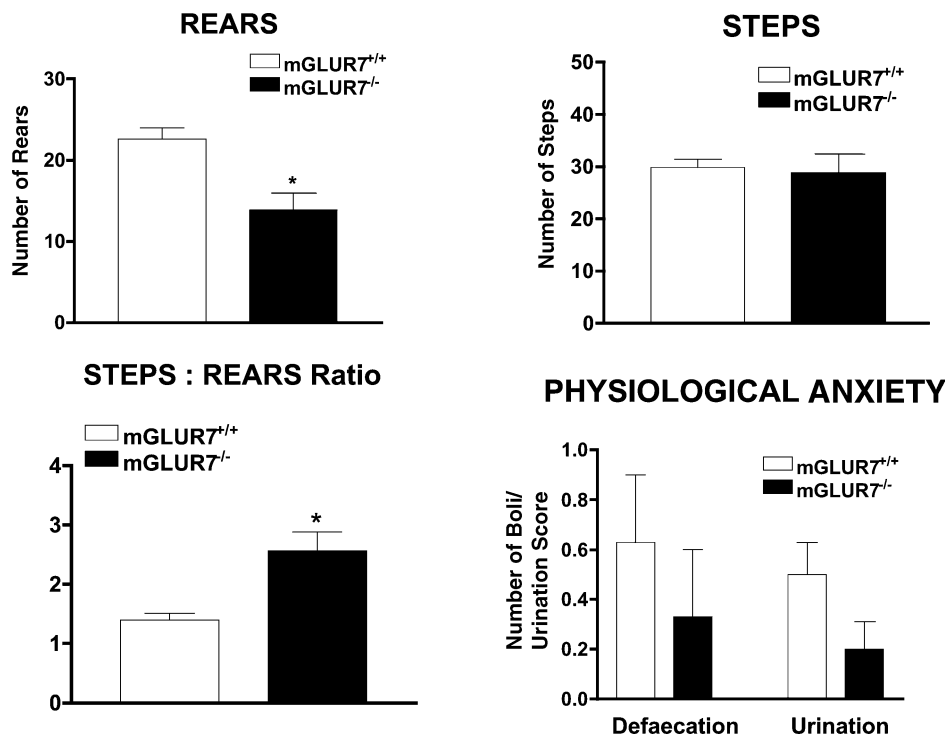


FIG. 4. Anxiolytic-like effects of mGluR7^{-/-} mice in the staircase test. (A) mGluR7^{-/-} mice ($n = 16$) had significantly less rearings in the staircase apparatus compared with mGluR7^{+/+} mice ($n = 16$). (B) mGluR7^{-/-} and mGluR7^{+/+} mice did not differ in the total number of steps climbed. (C) mGluR7^{-/-} mice had an increased ratio of steps : rearings as compared with mGluR7^{+/+} mice, which is the primary indicator of reduced anxiety in this test. (D) mGluR7^{-/-} mice did not manifest the physiological aspects of anxiety to the same extent as mGluR7^{+/+} mice. This is indicated by the reduced amount of urination and defaecation in the mGluR7^{-/-} mice compared with mGluR7^{+/+} mice. All bars represent mean values, with vertical lines indicating 1 SEM. *Groups that differed significantly from mGluR7^{+/+} mice.

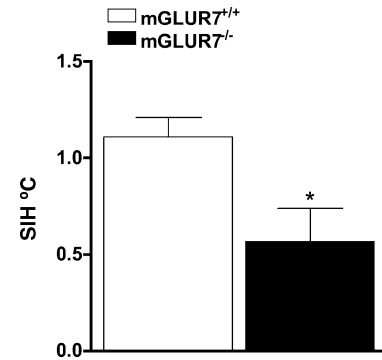


FIG. 5. Anxiolytic-like effects of mGluR7^{-/-} mice in the SIH test. The effects are shown of mGluR7^{-/-} and mGluR7^{+/+} mice in the SIH test, a physiological test of anticipatory anxiety. mGluR7^{-/-} mice ($n = 10$) had a much lower SIH than mGluR7^{+/+} ($n = 10$) mice, which is indicative of a reduced anxiety. Bars represent mean values, with vertical lines indicating 1 SEM. *Groups that differed significantly from saline-treated animals.

($F_{1,29} = 3.16$, $P = 0.086$) and production of faecal boli ($F_{1,29} = 2.39$, $P = 0.133$). Sixty-nine per cent of mGluR7^{+/+} mice showed signs of physiological anxiety (defecation or urination) compared with 25% of mGluR7^{-/-} mice.

The SIH test

Similar to what we had seen in our POT battery, there was no significant difference in basal temperature (T_1) between mGluR7^{-/-} and mGluR7^{+/+} mice (mean $\pm$ SEM = 36.1 ± 0.14 °C for mGluR7^{+/+} mice; 36.3 ± 0.19 °C for mGluR7^{-/-} animals). However, 15 min

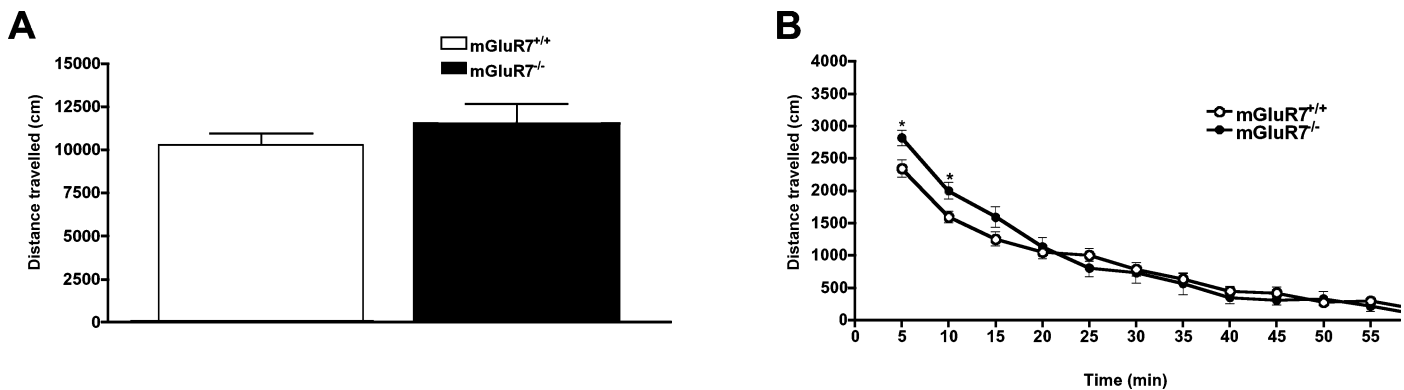


FIG. 6. The effects of mGluR7^{-/-} mice on locomotor activity. (A) mGluR7^{-/-} mice ($n = 11$) did not differ from their wild-type controls ($n = 16$) on locomotor activity over the entire 60 min observed. Bars represent mean values, with vertical lines indicating 1 SEM. (B) mGluR7^{-/-} mice had significantly higher activity during the first 10 min of the testing period only compared with their wild-type controls. Datapoints represent mean values, with vertical lines indicating 1 SEM. *Groups that differed significantly from saline-treated animals.

following mild stress (T_2) [the taking of the initial temperature (at T_1) serves as the stressor], the body temperature of mGluR7^{-/-} animals was significantly lower than that of mGluR7^{+/+} mice ($F_{1,18} = 5.98$, $P = 0.025$, data not shown). When SIH was calculated ($T_2 - T_1$), mGluR7^{-/-} as compared with mGluR7^{+/+} mice had significantly reduced SIH ($F_{1,18} = 7.48$, $P = 0.014$), which is indicative of an attenuated anticipatory anxiety in mGluR7^{-/-} mice (Fig. 5).

Locomotor activity in mGluR7^{-/-} mice

As many of the behavioural parameters analysed are exploration based, we analysed the effects of mGluR7^{-/-} mice on basal locomotor activity (Fig. 6). There was no difference in total locomotor activity between the genotypes over the entire 60-min period ($F_{1,25} = 0.98$, $P = 0.331$). However, there was a significant effect of time on locomotor activity ($F_{11,275} = 144.90$, $P < 0.001$) and a significant time-genotype interaction ($F_{11,275} = 3.75$, $P < 0.001$). Post-hoc analysis revealed that mGluR7^{-/-} mice had a higher activity level at the first two time-points tested only (5 and 10 min).

Normal passive avoidance learning in mGluR7^{-/-} mice

Previous evidence suggested a deficit in amygdala-dependent memory processing in mGluR7^{-/-} mice using a conditioned taste-aversion paradigm (Masugi *et al.*, 1999). To analyse whether the animals had any deficit in a different cognitive task, they were tested in a passive avoidance learning paradigm. On the training day, mGluR7^{-/-} and mGluR7^{+/+} mice showed no significant differences in behaviour,

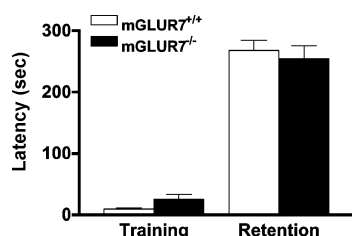


FIG. 7. mGluR7^{-/-} mice have normal passive avoidance learning. On the training day, mGluR7^{-/-} mice ($n = 16$) had a slightly reduced latency to enter the dark compartment compared with mGluR7^{+/+} mice ($n = 16$). On the retention test day, both genotypes equally well avoided the compartment where they had previously been shocked. All bars represent mean values, with vertical lines indicating 1 SEM. *Groups that differed significantly from saline-treated animals.

although it took most mGluR7^{-/-} mice longer to enter the dark chamber ($F_{1,30} = 3.20$, $P = 0.084$), which is again consistent with an anxiolytic-like phenotype. On the retention test day (Fig. 7), both mGluR7^{-/-} as well as mGluR7^{+/+} mice showed equal avoidance of the dark compartment in which they had been previously shocked ($F_{1,30} = 0.25$, $P = 0.619$). These results indicate that mGluR7^{-/-} mice successfully learn to avoid the aversive stimuli in this test. In agreement with the results in the staircase test (see above), during the retention test mGluR7^{-/-} mice had a significantly reduced urination score as compared with mGluR7^{+/+} mice (0.69 vs. 0.19).

Discussion

The present studies demonstrate that selective ablation of the group III mGlu receptor subtype mGluR7 is associated with changes in animal behavioural paradigms predictive of antidepressant and anxiolytic action. Our findings suggest that drugs acting at mGluR7 may provide novel treatments for psychiatric disorders such as depression and anxiety.

The forced swim test is the most widely used pharmacological model to assess antidepressant activity in rodents. This is largely due to its ease of use, reliability across laboratories and its ability to detect activity of a broad spectrum of clinically effective antidepressants (Cryan *et al.*, 2002). Furthermore, this test is the most widely used paradigm to assess depression and antidepressant-related phenotypes in genetically altered mice (Porsolt, 2000; Cryan *et al.*, 2002; Seong *et al.*, 2002). The magnitude of reduced immobility of the mGluR7^{-/-} mice in this test is similar to that which we and others have reported for a variety of antidepressants, including selective monoamine reuptake or oxidase inhibitors (Porsolt *et al.*, 1977; Cryan *et al.*, 2001).

The tail suspension test is similar to the forced swim test in the constructs that it purports to assess (immobility) and for its ability to detect a broad spectrum of antidepressants (Steru *et al.*, 1985). Nonetheless, it is becoming clear that both tests are probably different from each other in terms of the biological substrates that underlie their observed behaviours (Bai *et al.*, 2001). Accordingly, it is believed that using both tests can give complementary and/or converging information on activities of novel potential antidepressants or molecular pathways, including those altered in genetically modified animals (Porsolt, 2000; Bai *et al.*, 2001; Conti *et al.*, 2002; Cryan *et al.*, 2003). In both tests, the behavioural responses

comprise a coping strategy (Thierry *et al.*, 1984) in which immobility behaviours represent the psychological concept of 'entrapment' described in clinical depression (Dixon, 1998; Gilbert & Allan, 1998; Lucki, 2001). From our current data it is clear that a lack of mGluR7 receptors alters one or more important molecular mechanisms underlying such behaviours. mGluR7 is highly abundant in areas such as nucleus locus coeruleus, lateral septal nucleus, frontal cortex, amygdala and hippocampus. All are thought to be critically involved in modulation of antidepressant activity in paradigms such as the forced swim and tail suspension tests and in clinically depressed patients. Therefore, the mGluR7 receptor may be an innovative target for developing therapeutic agents to treat major depression.

In the light–dark box test, mGluR7^{-/-} mice had an increased number of transitions between dark and light sides in the box, which implicates a role for mGluR7 in anxiety-related behaviour. In further support of this notion, mGluR7^{-/-} mice were also less inhibited at exploring the dark compartment and did not freeze as much as mGluR7^{+/+} mice once placed in the apparatus. Likewise, mGluR7^{-/-} mice displayed anxiolytic-like behaviour in the elevated plus maze. Whilst both tests rest upon similar naturalistic conflicts between the tendency to explore a novel environment and aversive properties of a brightly lit, open area, the elevated plus maze also includes two additional anxiety-provoking environmental parameters (height and a totally open area) (Crawley, 2000). The use of both the light–dark box and the elevated plus maze tests, as reported here, is thought to be important to better examine anxiety-like behaviour (Griebel *et al.*, 2000). In particular, it has been described that mice of the strain C57BL/6, onto which the mGluR7 mutant allele was backcrossed for 14 generations, can vary in baseline anxiety and differential sensitivity to anxiolytics between these two paradigms (Griebel *et al.*, 2000). The anxiolytic-like behaviour of mGluR7^{-/-} mice in the elevated plus maze is not as robust as that seen in the light–dark box test, nor is it as pronounced as in animals treated with benzodiazepines (Griebel *et al.*, 2000). Further evidence for the anxiolytic-like activity of mGluR7^{-/-} mice is from the staircase test. Here, we observed a reduction specifically in rearings, without any changes in the number of steps climbed by mGluR7^{-/-} vs. mGluR7^{+/+} mice. Such a behavioural pattern in this test is quite selective for anxiolytic agents. Stimulant drugs, for example, tend to affect both parameters (Simiand *et al.*, 1984). A further indicator of decreased anxiety was a reduction (albeit not quite statistically significant) in the number of faecal boli and urinations of mGluR7^{-/-} mice as compared with mGluR7^{+/+} littermates in this test. These parameters provide an independent index of the altered physiological response of mGluR7^{-/-} mice to the aversive environment (Gray & Lalljee, 1974).

The SIH test offers a more parametric analysis of the physiological response to anxiety (in this case the anticipatory anxiety caused by an acute stressor) than that in the staircase test whereby physiological responses to stress are auxiliary to the behavioural readouts. Also, this test has been validated extensively as a preclinical paradigm useful to detect conventional and putative anxiolytics, including drugs acting through group I and group II mGluRs (Spooren *et al.*, 2002; Olivier *et al.*, 2003). Brodtkin *et al.* (2002) have recently shown that the SIH test can detect anxiolytic-like effects in genetically modified animals. In these studies, mGluR5 knockout animals had a reduced SIH which is in accordance with the ability of mGluR5 receptor antagonists to reverse this hyperthermia (Brodtkin *et al.*, 2002; Spooren *et al.*, 2002). In line with our observed effects in the above exploration-based anxiety models, mGluR7^{-/-} mice also had significantly reduced SIH. By using multiple tests that are thought

to model different facets of the anxiety syndrome, we believe to have minimized the contribution of major confounding external and internal factors (Griebel *et al.*, 2000; Holmes, 2001; Belzung, 2001) other than the mutant allele.

As many of the tests employed here have a motor component to their readout of antidepressant or anxiolytic activity, we examined basal locomotor activity of knockout and wild-type mice in a novel environment. Although there was no overall difference in locomotor activity over the 60-min testing period between the genotypes, mGluR7^{-/-} mice were slightly more active during the initial period after placement in the apparatus. Previous data from Masugi *et al.* (1999) using an open field failed to demonstrate any effect of deletion of mGluR7 on basal locomotion. It could be argued that this mild increase in activity observed here may contribute to the observed anxiolytic/antidepressant-like phenotype of the mice, and indeed such an influence is impossible to rule out. However, the converse could also be reasoned, i.e. that a mild increase in activity may be due to the fact that the animals are less anxious and therefore behaviourally disinhibited upon presentation with novel stimuli. This latter assumption is strengthened by a number of assertions. First, both the clear reductions in SIH and the trend toward a significant reduction in the physiological readouts observed in the staircase and passive avoidance tests are independent of locomotor activity. Secondly, in the staircase test and elevated plus maze there were no significant differences between genotypes on indices of hyperactivity (number of steps climbed and closed arm entries, respectively). Thirdly, the magnitude of the antidepressant and/or anxiolytic effects is quantitatively much greater in most of the tests than that seen on locomotor activity, the exception being the elevated plus maze. Fourthly, mGluR7^{-/-} mice show a reduction in rearing in the staircase test (present data) and a significant decrease in vertical activity in a novel environment (J. F. Cryan, unpublished observations) which is not consistent with hyperactivity. Fifthly, when the animals were observed in their home-cage for the POT, no overt change in locomotion was observed. Finally, in the passive avoidance apparatus, mGluR7^{-/-} mice have a trend toward an increased training latency which can possibly be interpreted as being less anxious in the bright compartment, hyperactivity would more likely be manifested as a reduction in latency to enter the dark compartment. For these reasons, reductions in anxiety and alterations in coping behaviour appear to be a more plausible explanation for the pattern of results in the various tests than hyperactivity *per se*.

Of all group III mGluRs, mGluR7 is the most widely distributed presynaptic auto- and heteroreceptor in the brain. Like most other group III mGluRs, it is thought to provide mainly negative feedback limiting transmitter release at synapses in a frequency-dependent fashion (Sansig *et al.*, 2001; Bushell *et al.*, 2002; Losonczy *et al.*, 2002; for review, see Cartmell & Schoepp, 2000). Its widespread distribution in the brain, especially in regions known to be critical in emotional behaviours, makes it a challenge to understand whether the effects reported here are based on changes in a specific transmitter system, such as the noradrenergic, serotonergic, GABAergic, glutamatergic and/or dopaminergic system. Further, we cannot rule out that potential developmental compensatory changes have occurred in mGluR7^{-/-} mice that may impact their behaviour. The development of selective mGluR7 ligands will significantly address such issues and aid in the dissection of the exact role of this receptor in depression and anxiety.

Further evidence for a role of mGluR7 in depression comes from the work of Neugebauer *et al.* (2000). They have shown a loss of sensitivity to the inhibiting effects of group III mGluR agonists following withdrawal from chronic cocaine, and they postulate that such a loss, which is similar to what we have artificially generated in

our mGluR7^{-/-} mice, may counteract adaptive changes such as increases in anxiety and depression seen in cocaine withdrawal. Similarly, Kenny and colleagues (Kenny and Markou, personal communication) have shown that antagonists of presynaptic group II mGluRs may have anti-anhedonic effects similar to that of certain fast-acting antidepressant agents, further confirming that blockade of the presynaptic inhibition of glutamate may be a useful strategy for the development of novel antidepressant agents. Accordingly, our current data provide novel evidence that selective modulation of mGluR7 may provide clinical benefit in psychiatric disorders such as depression and anxiety.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the expert technical help of Christine Hunn, Hugo Buerki, Stefan Imobersteg and Hans-Peter Schlecht. We also thank the special animal facilities staff of Novartis Pharma for their continued assistance. Furthermore, we would like to thank Dr Kumlesh K. Dev and Dr Michelle E. Page for critical reading of the manuscript.

Abbreviations

ANOVA, analysis of variance; GABA, γ -aminobutyric acid; LAP-4, s-2-amino-4-phosphonobutyrate; L-Glu, glutamate; L-SOP, L-serine-O-phosphate; mGluR, metabotropic glutamate receptor; MSOP, (R,S)-alpha-methylserine-O-phosphate; POT, primary observation test; SIH, stress-induced hypothermia; SPF, specific pathogen-free.

References

- Bai, F., Li, X., Clay, M., Lindstrom, T. & Skolnick, P. (2001) Intra- and interstrain differences in models of 'behavioral despair'. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **70**, 187–192.
- Belzung, C. (2001) The genetic basis of the pharmacological effects of anxiolytics: a review based on rodent models. *Behav. Pharmacol.*, **12**, 451–460.
- Bradley, S.R., Levey, A.I., Hersch, S.M. & Conn, P.J. (1996) Immunocytochemical localization of group III metabotropic glutamate receptors in the hippocampus with subtype-specific antibodies. *J. Neurosci.*, **16**, 2044–2056.
- Brodtkin, J., Bradbury, M., Busse, C., Warren, N., Bristow, L.J. & Varney, M.A. (2002) Reduced stress induced hyperthermia in mGluR5 knockout mice. *Eur. J. Neurosci.*, **16**, 2241–2244.
- Bruno, V., Battaglia, G., Ksiazek, I., van der Putten, H., Catania, M.V., Giuffrida, R., Lukic, S., Leonhardt, T., Inderbitzin, W., Gasparini, F., Kuhn, R., Hampson, D.R., Nicoletti, F. & Flor, P.J. (2000) Selective activation of mGlu4 metabotropic receptors is protective against excitotoxic neuronal death. *J. Neurosci.*, **20**, 6413–6420.
- Bushell, T.J., Sansig, G., Collett, V.J., van der Putten, H. & Collingridge, G.L. (2002) Altered short-term synaptic plasticity in mice lacking the metabotropic glutamate receptor mGlu7. *Scientific World J.*, **2**, 730–737.
- Cartmell, J. & Schoepp, D.D. (2000) Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *J. Neurochem.*, **75**, 889–907.
- Chojnacka-Wojcik, E., Kłodzinska, A. & Pilc, A. (2001) Glutamate receptor ligands as anxiolytics. *Curr. Opin. Invest. Drugs*, **2**, 1112–1119.
- Chojnacka-Wojcik, E., Tatarczynska, E. & Pilc, A. (1997) The anxiolytic-like effect of metabotropic glutamate receptor antagonists after intrahippocampal injection in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **29**, 153–156.
- Conn, P.J. & Pin, J.P. (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **37**, 205–237.
- Conti, A.C., Cryan, J.F., Dalvi, A., Lucki, I. & Blendy, J.A. (2002) cAMP response element-binding protein is essential for the upregulation of brain-derived neurotrophic factor transcription, but not the behavioral or endocrine responses to antidepressant drugs. *J. Neurosci.*, **22**, 3262–3268.
- Crawley, J.N. (2000) *What's Wrong with my Mouse? Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice*. Wiley-Liss, New York.
- Cryan, J.F., Dalvi, A., Jin, S.H., Hirsch, B.R., Lucki, I. & Thomas, S.A. (2001) Use of dopamine-beta-hydroxylase-deficient mice to determine the role of norepinephrine in the mechanism of action of antidepressant drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **298**, 651–657.
- Cryan, J.F., Hoyer, D. & Markou, A. (2003) Withdrawal from chronic amphetamine induces depression-like behavioural effects in rodents. *Biol. Psychiatry*, in press.
- Cryan, J.F., Markou, A. & Lucki, I. (2002) Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol. Sci.*, **23**, 238–245.
- Dalezios, Y., Lujan, R., Shigemoto, R., Roberts, J.D. & Somogyi, P. (2002) Enrichment of mGluR7a in the presynaptic active zones of GABAergic and non-GABAergic terminals on interneurons in the rat somatosensory cortex. *Cereb. Cortex*, **12**, 961–974.
- Dixon, A.K. (1998) Ethological strategies for defence in animals and humans: their role in some psychiatric disorders. *Br. J. Med. Psychol.*, **71**, 417–445.
- Dube, G.R. & Marshall, K. (2000) Activity-dependent activation of presynaptic metabotropic glutamate receptors in locus coeruleus. *J. Neurophysiol.*, **83**, 1141–1149.
- Gerlai, R., Adams, B., Fitch, T., Chaney, S. & Baez, M. (2002) Performance deficits of mGluR8 knockout mice in learning tasks: the effects of null mutation and the background genotype. *Neuropharmacology*, **43**, 235.
- Gerlai, R., Roder, J.C. & Hampson, D.R. (1998) Altered spatial learning and memory in mice lacking the mGluR4 subtype of metabotropic glutamate receptor. *Behav. Neurosci.*, **112**, 525–532.
- Gilbert, P. & Allan, S. (1998) The role of defeat and entrapment (arrested flight) in depression: an exploration of an evolutionary view. *Psychol. Med.*, **28**, 585–598.
- Gray, J.A. & Lalljee, B. (1974) Sex differences in emotional behaviour in the rat: correlation between open-field defecation and active avoidance. *Anim. Behav.*, **22**, 856–861.
- Griebel, G., Belzung, C., Perrault, G. & Sanger, D.J. (2000) Differences in anxiety-related behaviours and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice. *Psychopharmacology (Berl.)*, **148**, 164–170.
- Holmes, A. (2001) Targeted gene mutation approaches to the study of anxiety-like behavior in mice. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **25**, 261–273.
- Holmes, A., Yang, R.J. & Crawley, J.N. (2002) Evaluation of an anxiety-related phenotype in galanin overexpressing transgenic mice. *J. Mol. Neurosci.*, **18**, 151–165.
- Kinoshita, A., Shigemoto, R., Ohishi, H., van der Putten, H. & Mizuno, N. (1998) Immunohistochemical localization of metabotropic glutamate receptors, mGluR7a and mGluR7b, in the central nervous system of the adult rat and mouse: a light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.*, **393**, 332–352.
- Krystal, J.H., Sanacora, G., Blumberg, H., Anand, A., Charney, D.S., Marek, G., Epperson, C.N., Goddard, A. & Mason, G.F. (2002) Glutamate and GABA systems as targets for novel antidepressant and mood-stabilizing treatments. *Mol. Psychiatry*, **7**, S71–S80.
- Linden, A., Johnson, B., Peters, S., Shannon, H., Tian, M. & Wang, Y., Yu, J., Koster, A., Baez, M. & Schoepp, D.D. (2002) Increased anxiety-related behavior in mice deficient for metabotropic glutamate 8 (mGlu8) receptor. *Neuropharmacology*, **43**, 251.
- Lister, R.G. (1987) The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl.)*, **92**, 180–185.
- Losonczy, A., Zhang, L., Shigemoto, R., Somogyi, P. & Nusser, Z. (2002) Cell type dependence and variability in the short-term plasticity of EPSCs in identified mouse hippocampal interneurons. *J. Physiol. (Lond.)*, **542**, 193–210.
- Lucki, I. (2001) A prescription to resist proscriptions for murine models of depression. *Psychopharmacology (Berl.)*, **153**, 395–398.
- Makoff, A., Pilling, C., Harrington, K. & Emson, P. (1996) Human metabotropic glutamate receptor type 7: molecular cloning and mRNA distribution in the CNS. *Mol. Brain Res.*, **40**, 165–170.
- Masu, M., Iwakabe, H., Tagawa, Y., Miyoshi, T., Yamashita, M., Fukuda, Y., Sasaki, H., Hiroi, K., Nakamura, Y., Shigemoto, R., Takada, M., Nakamura, K., Nakao, K., Kabsuki, M. & Nakanishi, S. (1995) Specific deficit of the ON response in visual transmission by targeted disruption of the mGluR6 gene. *Cell*, **80**, 757–765.
- Masugi, M., Yokoi, M., Shigemoto, R., Muguruma, K., Watanabe, Y., Sansig, G., van der Putten, H. & Nakanishi, S. (1999) Metabotropic glutamate receptor subtype 7 ablation causes deficit in fear response and conditioned taste aversion. *J. Neurosci.*, **19**, 955–963.
- Mayorga, A.J. & Lucki, I. (2001) Limitations on the use of the C57BL/6 mouse in the tail suspension test. *Psychopharmacology (Berl.)*, **155**, 110–112.
- Nakanishi, S. (1994) Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation, and plasticity. *Neuron*, **13**, 1031–1037.
- Neugebauer, V., Zinebi, F., Russell, R., Gallagher, J.P. & Shinnick-Gallagher, P. (2000) Cocaine and kindling alter the sensitivity of group II and III metabotropic glutamate receptors in the central amygdala. *J. Neurophysiol.*, **84**, 759–770.
- Olivier, B., Zethof, T., Pattij, T., van Boogaert, M., van Oorschot, R., Leahy, C., Oosting, R., Bouwknicht, A., Veening, J., van der Gugten, J. & Groenink, L.

- (2003) Stress-induced hyperthermia and anxiety: pharmacological validation. *Eur. J. Pharmacol.*, **463**, 117–132.
- Pekhletski, R., Gerlai, R., Overstreet, L.S., Huang, X.P., Agopyan, N., Slater, N.T., Abramow-Newerly, W., Roder, J.C. & Hampson, D.R. (1996) Impaired cerebellar synaptic plasticity and motor performance in mice lacking the mGluR4 subtype of metabotropic glutamate receptor. *J. Neurosci.*, **16**, 6364–6373.
- Porsolt, R.D. (2000) Animal models of depression: utility for transgenic research. *Rev. Neurosci.*, **11**, 53–58.
- Porsolt, R.D., Bertin, A. & Jalfre, M. (1977) Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. International Pharmacodyn. Ther.*, **11**, 327–336.
- Rodgers, R.J., Cutler, M.G. & Jackson, J.E. (1997) Behavioural effects in mice of subchronic chlordiazepoxide, maprotiline and fluvoxamine. II. The elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **57**, 127–136.
- Sansig, G., Bushell, T.J., Clarke, V.R., Rozov, A., Burnashev, N., Portet, C., Gasparini, F., Schmutz, M., Klebs, K., Shigemoto, R., Flor, P.J., Kuhn, R., Knoepfel, T., Schroeder, M., Hampson, D.R., Collett, V.J., Zhang, C., Duvoisin, R.M., Collingridge, G.L. & van Der Putten, H. (2001) Increased seizure susceptibility in mice lacking metabotropic glutamate receptor 7. *J. Neurosci.*, **21**, 8734–8745.
- Schoepp, D.D. (2001) Unveiling the functions of presynaptic metabotropic glutamate receptors in the central nervous system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **299**, 12–20.
- Seong, E., Seasholtz, A.F. & Burmeister, M. (2002) Mouse models for psychiatric disorders. *Trends Genet.*, **18**, 643–650.
- Shigemoto, R., Kinoshita, A., Wada, E., Nomura, S., Ohishi, H., Takada, M., Flor, P.J., Neki, A., Abe, T., Nakanishi, S. & Mizuno, N. (1997) Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J. Neurosci.*, **17**, 7503–7522.
- Shigemoto, R., Kulik, A., Roberts, J.D., Ohishi, H., Nusser, Z., Kaneko, T. & Somogyi, P. (1996) Target-cell-specific concentration of a metabotropic glutamate receptor in the presynaptic active zone. *Nature*, **381**, 523–525.
- Simiand, J., Keane, P.E. & Morre, M. (1984) The staircase test in mice: a simple and efficient procedure for primary screening of anxiolytic agents. *Psychopharmacology (Berl.)*, **84**, 48–53.
- Skolnick, P. (2002) Modulation of glutamate receptors: strategies for the development of novel antidepressants. *Amino Acids*, **23**, 153–159.
- Snead, O.C. 3rd, Banerjee, P.K., Burnham, M. & Hampson, D. (2000) Modulation of absence seizures by the GABA (A) receptor: a critical role for metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4). *J. Neurosci.*, **20**, 6218–6224.
- Spooren, W.P., Gasparini, F., Salt, T.E. & Kuhn, R. (2001) Novel allosteric antagonists shed light on mglu (5) receptors and CNS disorders. *Trends Pharmacol. Sci.*, **22**, 331–337.
- Spooren, W.P., Schoeffer, P., Gasparini, F., Kuhn, R. & Gentsch, C. (2002) Pharmacological and endocrinological characterisation of stress-induced hyperthermia in singly housed mice using classical and candidate anxiolytics (LY314582, MPEP and NKP608). *Eur. J. Pharmacol.*, **435**, 161–170.
- Spooren, W.P., Vassout, A., Neijt, H.C., Kuhn, R., Gasparini, F., Roux, S., Porsolt, R.D. & Gentsch, C. (2000) Anxiolytic-like effects of the prototypal metabotropic glutamate receptor 5 antagonist 2-methyl-6-(phenylethynyl) pyridine in rodents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **295**, 1267–1275.
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B. & Simon, P. (1985) The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl.)*, **85**, 367–370.
- Stewart, C.A. & Reid, I.C. (2002) Antidepressant mechanisms: functional and molecular correlates of excitatory amino acid neurotransmission. *Mol. Psychiatry*, **7**, S15–S22.
- Szapiro, G., Barros, D.M., Ardenghi, P., Vianna, M.R., Choi, H., Silva, T., Medina, J.H. & Izquierdo, I. (2001) Facilitation and inhibition of retrieval in two aversive tasks in rats by intrahippocampal infusion of agonists of specific glutamate metabotropic receptor subtypes. *Psychopharmacology (Berl.)*, **156**, 397–401.
- Tatarczynska, E., Klodzinska, A., Krocza, B., Chojnacka-Wojcik, E. & Pilc, A. (2001a) The antianxiety-like effects of antagonists of group I and agonists of group II and III metabotropic glutamate receptors after intrahippocampal administration. *Psychopharmacology (Berl.)*, **158**, 94–99.
- Tatarczynska, E., Klodzinska, A., Chojnacka-Wojcik, E., Palucha, A., Gasparini, F., Kuhn, R. & Pilc, A. (2001b) Potential anxiolytic- and antidepressant-like effects of MPEP, a potent, selective and systemically active mGlu5 receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.*, **132**, 1423–1430.
- Thierry, B., Steru, L., Chermat, R. & Simon, P. (1984) Searching-waiting strategy: a candidate for an evolutionary model of depression? *Behav. Neural Biol.*, **41**, 180–189.
- Van der Heyden, J.A., Zethof, T.J. & Olivier, B. (1997) Stress-induced hyperthermia in singly housed mice. *Physiol. Behav.*, **62**, 463–470.
- Venable, N. & Kelly, P.H. (1990) Effects of NMDA receptor antagonists on passive avoidance learning and retrieval in rats and mice. *Psychopharmacology (Berl.)*, **100**, 215–221.
- Walker, D.L. & Davis, M. (2002) The role of amygdala glutamate receptors in fear learning, fear-potentiated startle, and extinction. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **71**, 379–392.

Increased Seizure Susceptibility in Mice Lacking Metabotropic Glutamate Receptor 7

Gilles Sansig,¹ Trevor J. Bushell,² Vernon R. J. Clarke,² Andrei Rozov,³ Nail Burnashev,³ Chantal Portet,¹ Fabrizio Gasparini,¹ Markus Schmutz,¹ Klaus Klebs,¹ Ryuichi Shigemoto,⁴ Peter J. Flor,¹ Rainer Kuhn,¹ Thomas Knoepfel,¹ Markus Schroeder,¹ David R. Hampson,⁵ Valerie J. Collett,² Congxiao Zhang,⁶ Robert M. Duvoisin,⁶ Graham L. Collingridge,² and Herman van der Putten¹

¹Nervous System Department, Novartis Pharma AG, CH-4002 Basel, Switzerland, ²Medical Research Council Center for Synaptic Plasticity, Department of Anatomy, The School of Medical Sciences, University of Bristol, Bristol, BS8 1TD, United Kingdom, ³Abteilung Zellphysiologie, Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, D-69120 Heidelberg, Germany, ⁴Division of Cerebral Structure, National Institute for Physiological Sciences, Myodaiji, Okazaki 444-8585, Japan, ⁵Faculty of Pharmacy and Department of Pharmacology, University of Toronto, Ontario, Canada M5S 2S2, and ⁶Margaret M. Dyson Vision Research Institute, Department of Ophthalmology, Cornell University Medical College, New York, New York 10021

To study the role of mGlu7 receptors (mGluR7), we used homologous recombination to generate mice lacking this metabotropic receptor subtype (mGluR7^{-/-}). After the serendipitous discovery of a sensory stimulus-evoked epileptic phenotype, we tested two convulsant drugs, pentylenetetrazole (PTZ) and bicuculline. In animals aged 12 weeks and older, subthreshold doses of these drugs induced seizures in mGluR7^{-/-}, but not in mGluR7^{+/-} mice. PTZ-induced seizures were inhibited by three standard anticonvulsant drugs, but not by the group III selective mGluR agonist (R,S)-4-phosphonophenylglycine (PPG). Consistent with the lack of signs of epileptic activity in the absence of specific stimuli, mGluR7^{-/-} mice showed no

major changes in synaptic properties in two slice preparations. However, slightly increased excitability was evident in hippocampal slices. In addition, there was slower recovery from frequency facilitation in cortical slices, suggesting a role for mGluR7 as a frequency-dependent regulator in presynaptic terminals. Our findings suggest that mGluR7 receptors have a unique role in regulating neuronal excitability and that these receptors may be a novel target for the development of anti-convulsant drugs.

Key words: epilepsy; mGluR7; knock-out; mice; group III mGluR; (R,S)-4-phosphonophenylglycine

An imbalance in glutamatergic excitatory neurotransmission and GABAergic synaptic inhibition in the vertebrate CNS can cause seizures and may be a major cause of epilepsy. There is, therefore, considerable interest in how these neurotransmitter systems are regulated physiologically. Metabotropic glutamate receptors (mGluRs) couple to G-proteins and can modulate L-glutamate release, GABA release, and neuronal excitability (Conn and Pin, 1997). They are subdivided into groups I (mGluR1, mGluR5), II (mGluR2, mGluR3), and III (mGluR4, mGluR6, mGluR7,

mGluR8) on the basis of homology, intracellular messengers, and ligand selectivity (Conn and Pin, 1997). mGluR7 is the most highly conserved member, and its mGluR7a-isoform is distributed widely throughout the CNS (Kinzie et al., 1995; Ohishi et al., 1995; Bradley et al., 1996; Brandstaetter et al., 1996; Flor et al., 1997; Shigemoto et al., 1997). The two isoforms of the receptor are localized presynaptically, close to release sites (Bradley et al., 1996; Brandstaetter et al., 1996; Shigemoto et al., 1996; Kinoshita et al., 1998).

In recombinant expression systems L-2-amino-4-phosphonobutyrate (L-AP4), L-serine-O-phosphate (L-SOP), and (R,S)-4-phosphonophenylglycine [(R,S)PPG] activate mGluR7 and its coupling to adenylate cyclase inhibition (Gasparini et al., 1999). Among the group III mGluRs, mGluR7 has the lowest affinity for these group III mGluR selective ligands and the endogenous ligand L-glutamate (Okamoto et al., 1994; Saugstad et al., 1994; Flor et al., 1997). In a variety of preparations L-AP4 and L-SOP reduce excitatory synaptic transmission (Koerner and Cotman, 1981; Davies and Watkins, 1982; Lanthorn et al., 1984; Anson and Collins, 1987; Bushell et al., 1995; Manzoni and Bockaert, 1995; Vignes et al., 1995; Pisani et al., 1997) via a putative presynaptic mechanism (Baskys and Malenka, 1991; Gereau and Conn, 1995) or via heterosynaptic effects on interneuron terminals (Salt and Eaton, 1995; Wan and Cahusac, 1995; Cartmell and Schoepp, 2000; Semyanov and Kullmann, 2000).

The notion that group III mGluRs are potential targets for

Received April 9, 2001; revised July 30, 2001; accepted Sept. 5, 2001.

This work was supported in part by the Biotechnology and Biological Sciences Research Council and Medical Research Council (UK). We thank Doris Ruegg for sequencing, Gemma Texido and Klaus Rajewsky for pTV-0 DNA, J.-F. Pin for mGluR8 cDNA, K. von Figura for E14 ES cells, Pedro Grandes for histological examination of brain sections, Christoph Wiessner for help with plots and statistics, Valerie Schuler for help with Western blots, and the team of the Novartis special strain breeding facility for their support.

G.S. and T.J.B. contributed equally to this work.

Correspondence should be addressed to Herman van der Putten, Nervous System Department, Novartis Pharma AG, K125.5.13, CH-4002 Basel, Switzerland. E-mail: p_herman.van_der_putten@pharma.novartis.com.

T. Knoepfel's present address: Laboratory for Neuronal Circuit Dynamics, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN) Brain Science Institute, 2-1 Hirosawa, Wako-Shi, Saitama 351-0198, Japan.

T. Bushell's present address: Imperial College, Department of Biophysics, Prince Consort Road, London SW7 2BW, UK.

C. Zhang's present address: National Eye Institute, National Institutes of Health, 10 Center Drive, Bethesda, MD 20982-1857.

R. Duvoisin's present address: Neurological Sciences Institute, Oregon Health Sciences University, Portland, OR 97201.

Copyright © 2001 Society for Neuroscience 0270-6474/01/218734-12\$15.00/0

novel antiepileptic drugs is supported by results in rodent models of epilepsy in which group III selective agonists showed prolonged anticonvulsant actions [L-AP4, L-SOP (Tizzano et al., 1995; Tang et al., 1997); (R,S)-PPG (Chapman et al., 1999; Gasparini et al., 1999); L-SOP (Yip et al., 2001)] and increased seizure threshold (L-AP4; Suzuki et al., 1999) or seizure latency (Thomsen and Dalby, 1998). In addition, in epilepsy the changes have been noted in the agonist sensitivity (Neugebauer et al., 2000), expression (Aronica et al., 1997; Liu et al., 2000; Yip et al., 2001), and receptor responses of group III mGluRs (Holmes et al., 1996; Neugebauer et al., 1997; Dietrich et al., 1999; Klapstein et al., 1999).

The lack of specific ligands to address mGluR7 function prompted us to generate mice lacking these receptors. A previous study that used these animals revealed deficits in taste aversion and fear responses (Masugi et al., 1999). The present study describes a role of mGluR7 in epilepsy.

MATERIALS AND METHODS

Generation of mGluR7^{-/-} mice

A genomic fragment of the mouse mGluR7 gene was isolated from a 129SV/J λFIX phage library (Stratagene, La Jolla, CA) and probed with a human mGluR7 cDNA. A 2.055 kb *NheI*–*NheI* DNA fragment comprising the first coding exon was sequenced. It contained 405 bp of 5'-untranslated region (UTR); as judged by homology to rat mGluR7 cDNA, followed by codons for the first 164 amino acids of mouse mGluR7. The targeting vector was constructed by inserting a 0.6 kb *NruI*–*XhoI* DNA fragment (comprising 115 bp of 5'-UTR) 5' of the pMCNeo cassette into a *StuI*–*XhoI* cleaved pTV-0 vector that contains the herpes virus thymidine kinase (TK) gene for negative selection. A 7 kb *NheI*–*NheI* DNA fragment comprising genomic sequences downstream of the 2.055 kb *NheI*–*NheI* fragment was inserted into a *NheI* site located between pMCNeo and pMCTK in pTV-0. Proper targeting resulted in deleting 0.585 kb of the first coding exon and 0.73 kb of the next intron of the mGluR7 gene. Embryonic day 14 (E14) embryonic stem (ES) cells [129/Ola; genotype A^w (agouti), c^{ch} (albino), p (pink-eyed dilution)] were transfected with 30 μg of *NotI*-linearized and dideoxynucleotide-end-filled (using Klenow enzyme) targeting vector by electroporation (250 V and 500 μF; Bio-Rad Gene Pulser, Munich, Germany). G418 (600 μg/ml) and Ganciclovir (Gancv; 2 μM) selection were applied 24 and 48 hr later, respectively. DNA from double-resistant ES colonies was subjected to PCR analysis by using either one of two PCR primers matching sequences in the *NheI*–*NruI* fragment located just 5' to, but not contained within, the targeting vector (primer-1, 5'-cttctgccagagctgacagctcaaag-3'; primer-2, 5'-gtcagcaccatcatcgactcatc-3') and either one of two primers located in the *neo* gene (primer-3, 5'-gcgtgcaatccatctgttcaatgg-3'; primer-4, 5'-gcgctgacagccggaacacg-3'). Combinations of primer-1 or primer-2 and either one of two primers matching sequences in the coding region of the first coding exon (primer-5, 5'-gaaagtgcagcagctgttcgagcg-3'; primer-6, 5'-gatgttgctacatcatgatggagacg-3') served to detect the presence of a wild-type mGluR7 allele. Two of 112 G418^rGancv^r double-resistant ES cell clones carried a correctly targeted mGluR7 allele, as assessed by PCR and confirmed by Southern blot analysis of genomic DNA digested with *NheI* and *NcoI*, respectively, and probed with probe A (158 bp *NheI*–*NruI* fragment), probe B (0.6 kb *NruI*–*XhoI* fragment), and a *neo* gene probe (probe D) (Fig. 1). Southern blot analysis that used a complete mGluR7 cDNA probe (probe D) revealed no additional rearrangements in the locus (data not shown). Wild-type (+) and mutant alleles (–) are indicated by the presence of a 2 kb (+) versus 1.8 kb (–) *NheI* and a 2.5 kb (+) versus a 2.3 kb (–) *NcoI* DNA fragment when probed with probe A or B (Fig. 1a,b). The diagnostic sizes for a properly targeted mGluR7 allele when probed with *neo* (probe D) are 1.8 kb (*NheI*) and 2.3 kb (*NcoI*). Both ES clones were used successfully to produce germ line chimeras (11 for each clone) by aggregation for 2–3 hr with 10⁶ ES cells per milliliter.

Genotyping

F1 mice carrying a targeted mGluR7 allele were identified by Southern blot analysis (Fig. 1b). F2 mice, derived from matings of pairs of heterozygous parents, were screened by PCR and used pairs of one of three

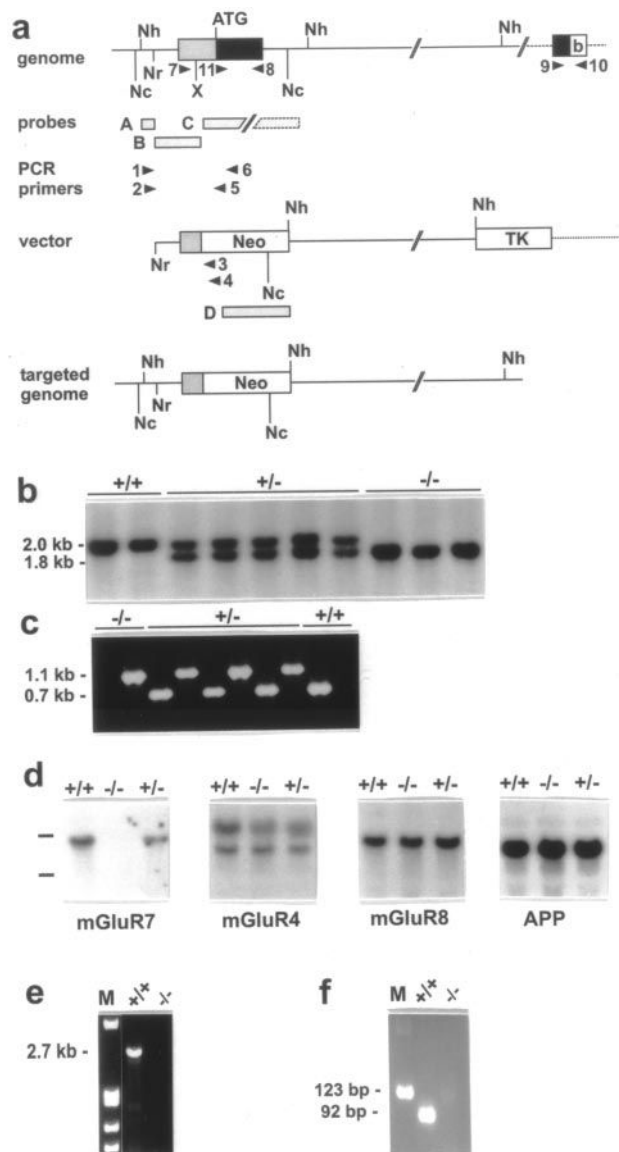


Figure 1. Targeted disruption of the mouse mGluR7 gene and its molecular analysis. *a*, Scheme of mGluR7 genomic DNA, targeting vector, disrupted gene, probes (stippled bars), and PCR primers (arrows). *Neo*, Neomycin resistance gene; *TK*, herpes virus thymidine kinase gene; *Nh*, *NheI*; *Nc*, *NcoI*; *Nr*, *NruI*; *X*, *XhoI*. *b*, Southern blot analysis. Shown is the result of a representative litter of F2 mice obtained by crossing a pair of mGluR7^{+/-} F1 mice. DNA was *NheI* digested. Probe A was used (as shown in *a*). Wild-type and mutant alleles are represented by DNA fragments of 2.055 and 1.885 kb, respectively. *c*, PCR genotyping. Example of a typical PCR result with the use of tail DNA of mGluR7^{+/+}, mGluR7^{+/-}, and mGluR7^{-/-} mice. Primer pairs 1 + 3 yield a 1.1 kb product (mutant allele). Primers 7 + 8 yield a 0.7 kb DNA fragment (wild-type allele). *d*, Northern blot analysis. Total RNA was isolated from mGluR7^{+/+}, mGluR7^{+/-}, and mGluR7^{-/-} brains. cDNA probes were APP, mGluR7, mGluR4, and mGluR8. *e*, *f*, RT-PCR. mGluR7b-specific RT-PCR products of expected sizes 2.7 kb (primers 11 + 10) and 0.092 kb (primers 9 + 10) were detected readily with mGluR7^{+/+}, but not with mGluR7^{-/-}, brain RNA as a template.

different forward primers (5'-cttctgccagagctgacagctcaaag-3' or 5'-gtcagcaccatcatcgactcatc-3' or 5'-acagctcaagatcagactcaggggc-3' or 5'-ctcccataagtcagcacaatc-3') and one of two *Neo*-specific primers (primer-3 or primer-4) (Fig. 1a) to detect the targeted allele. A combination of primer-7 (5'-gagagatggatagcaagcaggag-3') and primer-8 (5'-gtgtccctggaacaagtgtccag-3') served to detect the endogenous mGluR7 allele in mGluR7^{+/+} and mGluR7^{+/-} mice and to confirm its absence in

mGluR7^{-/-} mice. mGluR4 mutant mice were genotyped as described previously (Pekhletski et al., 1996). mGluR8 (Duvoisin et al., 1995) mutant mice (R. Duvoisin and C. Zhang, unpublished results) were genotyped by PCR (hot-start PCR, TaqStart antibody; Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions. Annealing was 45 sec at 68°C; primer extension was at 74°C for 45 sec for 34 cycles. One combination of two primers (taactaccaggtggacgaactctc; cacaaggtgtg-gcaatgatcc) was used to diagnose the endogenous mGluR8 allele in mGluR8^{+/+} and mGluR8^{+/-} mice and to confirm its absence in mGluR8^{-/-} mice. Another primer (taatatcggaagtggacgtgggac) combined with the first one shown above served to detect the targeted allele.

DNA and RNA analysis

Southern and Northern blot analyses, sequencing, PCR, and RT-PCR were performed according to standard protocols. For Northern blot analysis the following probes were used: a 3 kb *EcoRI* fragment of mouse amyloid precursor protein (APP) cDNA, a 3 kb *HindIII* fragment of human mGluR7b cDNA, a 0.57 kb *PstI* human mGluR4 cDNA fragment (encoding amino acids 520–710), and a 1.150 kb rat mGluR8 cDNA probe (encoding amino acids 1–350 of mGluR8). Hybridization with APP cDNA served as a control for loading equivalent amounts of total brain RNA in each lane. RT-PCR of mGluR7^{+/+} and mGluR7^{-/-} brain RNA was performed with several pairs of oligonucleotide primers, including primer-1 and primer-4, primer-1 and primer-10, primer-11 and primer-10, and primer-9 and primer-10. Primer-9 and primer-10 were designed specifically to detect sequences comprising exon b (92 bp) encoding one of two (a and b) C-terminal splice variants of mGluR7 (Flor et al., 1997).

Western blot and immunocytochemical analysis

Immunoblot procedures and immunocytochemistry were as described previously (Shigemoto et al., 1996, 1997; Kinoshita et al., 1998). Briefly, for Western blot analysis the crude membrane preparations from mouse cerebellum, hippocampus, and combined brain regions other than the cerebellum and hippocampus were separated by 7% SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. The membranes were reacted with an affinity-purified antibody for mGluR7a (Shigemoto et al., 1996). For detection, an alkaline phosphatase-labeled anti-rabbit secondary antibody (Chemicon, Temecula, CA) was used. For immunocytochemistry, wild-type and mGluR7^{-/-} mice were anesthetized deeply and perfused transcardially with 3.5% paraformaldehyde, 1% picric acid, and 0.05% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.3. The brains were removed, cryoprotected (30% sucrose in 0.1 M PB overnight at 4°C), and cut on a freezing microtome. The 40-μm-thick sections were incubated with antibodies for mGluR7a, mGluR7b, mGluR4a, or mGluR8a (Shigemoto et al., 1997; Kinoshita et al., 1998) in PBS containing 2% normal goat serum and 0.1% Triton X-100 overnight at 15°C. After washes in PBS the sections were incubated with biotinylated goat anti-rabbit or goat anti-guinea pig IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Then the sections were washed again, reacted with the ABC kit (Vector Laboratories), and finally incubated with 0.05% diaminobenzidine and 0.0006% hydrogen peroxide.

Chromosomal mapping of the mGluR7 gene

A 129 mouse bacterial artificial chromosome (BAC) was identified and isolated by the PCR screening of a genomic 129SV DNA bank in pBeloBAC11 (Research Genetics, Huntsville, AL). The PCR primers were 7 and 8 (Fig. 1). These amplified specifically the first coding exon of the mGluR7 gene, as confirmed by sequencing. Southern blot analysis was performed with a mGluR7 cDNA probe to confirm the presence of unrearranged and diagnostic mGluR7 genomic DNA fragments. For fluorescent *in situ* hybridization (FISH), BAC DNA was labeled with digoxigenin-dUTP by nick translation and hybridized to normal metaphase chromosomes derived from mouse embryo fibroblasts. These analyses were performed at Genome Systems (St. Louis, MO).

Electrophysiology

Hippocampus. The 400-μm-thick slices were prepared from 5- to 29-week-old mutant mice and littermate wild types via standard procedures, as described previously (Conquet et al., 1994). Slices were submerged in a medium that comprised (in mM) 124 NaCl, 3 KCl, 26 NaHCO₃, 1.4 NaH₂PO₄, 1 MgSO₄, 2 CaCl₂, and 10 D-glucose (bubbled with 95% O₂/5% CO₂, pH 7.4); the medium was perfused at a rate of ~4 ml/min (29–31°C). Extracellular recordings were obtained from stratum radi-

tum or stratum pyramidale of area CA1 in response to low-frequency (0.033 Hz) stimulation of the Schaffer collateral–commissural pathway. For each protocol one slice was used per animal; hence *n* values give the number of slices per mice used. Results were analyzed via Student's *t* tests or ANOVA, with *p* < 0.05 taken to indicate statistical significance. Animals were genotyped by PCR and presented to the experimenter in a randomized and blind manner.

Neocortex. Brain slice preparation and visualization of neurons in the living slice are described previously (Stuart et al., 1993; Markram et al., 1997). During recordings the slices were maintained at room temperature (20–24°C) in extracellular solution consisting of (in mM) 125 NaCl, 2.5 KCl, 25 glucose, 25 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, and 1 MgCl₂, pH 7.2. Whole-cell voltage recordings were performed simultaneously from two neurons with pipettes filled with (in mM) 115 K-gluconate, 20 KCl, 4 ATP-Mg, 10 phosphocreatine, 0.3 GTP, and 10 HEPES, pH 7.3 (310 mOsm). In synaptically connected neurons a suprathreshold intracellular stimulation of presynaptic pyramidal cells evoked depolarizing EPSPs. Presynaptic pyramidal cells were stimulated with a 10 Hz train of two to three suprathreshold current pulses. Typically, the trains were delivered at intervals of 5–7 sec for mGluR7^{+/+} mice and at 30 sec for mGluR7^{-/-} mice so that recovery from short-term modification was complete, as evidenced by the lack of systematic changes in the amplitude of the first EPSP of a train during successive trains of stimuli. For recovery from facilitation measurements, two action potentials delayed at variable time intervals (Δt) were delivered every 30 sec in both mGluR7^{+/+} and mGluR7^{-/-} mice. Voltage traces that are shown are averages of 50–100 sweeps. The amplitude of the first EPSP of the train is defined as the difference between the peak of the EPSP and baseline. For the second (or third) EPSP the amplitude is the difference between the peak of the EPSP and the baseline measured just before the onset of the EPSP. Stimulus delivery, data acquisition, and analyses were performed with macros in IGOR (Wavemetrics, Lake Oswego, OR).

Drug administration

Pentylenetetrazole (PTZ; Metrazol, Knoll AG, Liestal, Switzerland) was given intraperitoneally at a subthreshold dose of 40 mg/kg or at a suprathreshold dose of either 60 (in mGluR4 wild types and mutants) or 70 mg/kg (in mGluR7 and mGluR8 wild types and mutants). A dose of 40 mg/kg PTZ induced clonic or clonic-tonic seizures in mGluR7^{-/-} mice only, whereas it failed to induce seizures that were visible behaviorally in mGluR4^{+/+}, mGluR4^{+/-}, mGluR4^{-/-}, mGluR7^{+/+}, mGluR7^{+/-}, mGluR8^{+/+}, mGluR8^{+/-}, or mGluR8^{-/-} mice. A PTZ dose of 70 mg/kg induced clonic seizures of ~5 sec duration in at least 90% of all of the mGluR mutant and wild-type mice. Anticonvulsant drugs were given 1 hr before PTZ. Doses used in mGluR7^{+/+}, mGluR7^{+/-}, and mGluR7^{-/-} mice treated with 40 mg/kg PTZ were as follows: valproate (VPA; Depakine, Sanofi, Paris, France) (500 mg/kg, p.o.), ethosuximide (ESM; Galenica, Berne, Switzerland) (500 mg/kg, p.o.), clonazepam (CZP; Rivotril, Roche, Gipf-Oberfrick, Switzerland) (0.1 mg/kg, p.o.). In the experiment in which mGluR7 mutant mice were given 70 mg/kg PTZ (see Fig. 4, black bars), at 1 hr before PTZ the mice received placebo (water, p.o.), 500 mg/kg VPA, 750 mg/kg ESM, or 1 mg/kg CZP. In this experiment the dosing of ESM and CZP was increased to assure maximum chances of success for counteracting the seizures in mGluR7^{-/-} mice. Note that a dose of 70 mg/kg PTZ is far above threshold in mGluR7^{-/-} mice. Bicuculline (Sigma, St. Louis, MO) was given subcutaneously at 2.5 mg/kg (mGluR7^{+/+} and mGluR7^{-/-} mice) or 3.5 mg/kg [Maus Auszucht Geigy (MAG) mice]. (R,S)-4-phosphonophenylglycine (PPG; Tocris, Bristol, UK) was dissolved in 0.9% NaCl, pH-adjusted to 6–7, and injected intracerebroventricularly into the mice under light Fluothane anesthesia. Injection volume was 2.5 μl/mouse. Intracerebroventricular administration of PPG in 0.9% NaCl or placebo (0.9% NaCl) occurred 15 min before PTZ was given. Doses required to evoke seizures in ≥80% of anesthetized (and 0.9% NaCl placebo injected intracerebroventricularly) wild-type (OF-1, MAG, 129Ola×C57BL/6) or heterozygous mGluR4, mGluR7, or mGluR8 mutant mice with different and mixed genetic backgrounds including 129Sv/J×CD-1 (mGluR4), 129Ola×C57BL/6 or 129Ola×BALB/c (mGluR7), and 129Sv/J×C57BL/6 (mGluR8) were 60 mg/kg (for 129×CD-1) and 70 mg/kg (for all others). Concentrations and application modes are indicated in the text and legends. All whole animal experiments were approved and conducted according to the Swiss legislation and guidelines on animal experimentation.

Seizure scoring

Mice were considered protected from seizures and scored as such when neither clonic nor clonic-tonic seizures were observed within the first 10 min after PTZ treatment and within 30 min after bicuculline treatment. After PTZ or bicuculline treatment, clonic convulsions (myoclonic jerks, forelimb clonus) of ~5 sec duration and clonic-tonic (hindlimb extension) convulsions were scored by using behavioral monitoring, as described previously (Schmutz et al., 1990).

EEG recordings

Stainless steel screw electrodes were implanted bilaterally over the frontal and parietal cortex under isoflurane/O₂/N₂O (0.5 l/min) anesthesia. An indifferent electrode served as ground electrode and was positioned at bregma F1.6/12.5. All screw electrodes were connected by insulated stainless steel wiring to a four-pole socket embedded in dental cement. The electroencephalogram (EEG) that was analyzed was the differential between the frontal (bregma F – 1.0/13.2) and parietal (F – 3.0/13.2) electrodes of the same hemisphere compared with the combined reference electrodes. Bipolar leads from the mice were recorded via cables connected to a slipstring system, at the earliest 21 d after the operation. The behavior of the animals, which were housed singly in wooden observation cages measuring 32 × 32 × 40 cm, was observed over a closed circuit TV system. The EEGs were amplified by an isolated four-channel bipolar EEG amplifier (Spectralab EEG-2104, Kilchberg, Switzerland), recorded on a thermorecorder (MTK95, Astromed), and collected on a personal computer.

RESULTS

Generation of mGluR7^{-/-} mice

mGluR7^{-/-} mice were generated by homologous recombination (Fig. 1*a*). They completely lacked mGluR7 mRNA (Fig. 1*d–f*) in agreement with previously shown *in situ* hybridization results (Masugi et al., 1999). mGluR7a (Fig. 2*a–c*) and mGluR7b proteins (data not shown) were absent in mGluR7^{-/-} mice. Brain mRNA expression levels for other group III mGluRs (mGluR4 and mGluR8) were unchanged (Fig. 1*d*). Gross histological abnormalities in brains of mice aged 12 weeks were not apparent, neither in standard hematoxylin and eosin-stained sections nor after immunohistology. The latter analysis included antibodies specific for the group III mGluRs mGluR4a and mGluR8a, respectively, as well as antibodies directed against other mGluR subtypes (Shigemoto et al., 1997) (data not shown).

Previous observations in 6- to 8-week-old animals from our colony also had not revealed any histological abnormalities (Masugi et al., 1999). Aging and health status of mGluR7^{-/-} mice did not differ from mGluR7^{+/-} littermates, except for a slight reduction in body weight (mGluR7^{-/-}, 25 ± 4 gm, *n* = 10 vs mGluR7^{+/-}, 31 ± 3 gm, *n* = 9; age 4 months) and poor fecundity. There was no major morbidity except for seizures in mice aged from 10 to 12 weeks and abnormal fear and conditioned taste aversion responses in mice aged 6–8 weeks (Masugi et al., 1999).

An epilepsy-prone phenotype of mGluR7^{-/-} mice

Spontaneous seizures were precipitated repeatedly in standard pathogen-free (SPF) mGluR7^{-/-} mice. The seizures were observed in mice aged from 10 weeks to 9 months (oldest age that was examined), but not in 6- to 8-week-old mGluR7^{-/-} mice. They were never observed in mGluR7^{+/+} or mGluR7^{+/-} littermates, but an observer (unaware of the genotype) was able to detect the phenotype in 17 of 20 mGluR7^{-/-} mice.

These sensory stimulus-evoked seizure episodes occurred after cage transfer. The seizures were clonic (myoclonic jerks, forelimb clonus) and sometimes tonic in nature. A lag phase of ≥3 d generally was required before mGluR7^{-/-} mice showed renewed susceptibility to the same type of stimulus. Whatever its chemical nature (so far unresolved), it derived from the bedding material

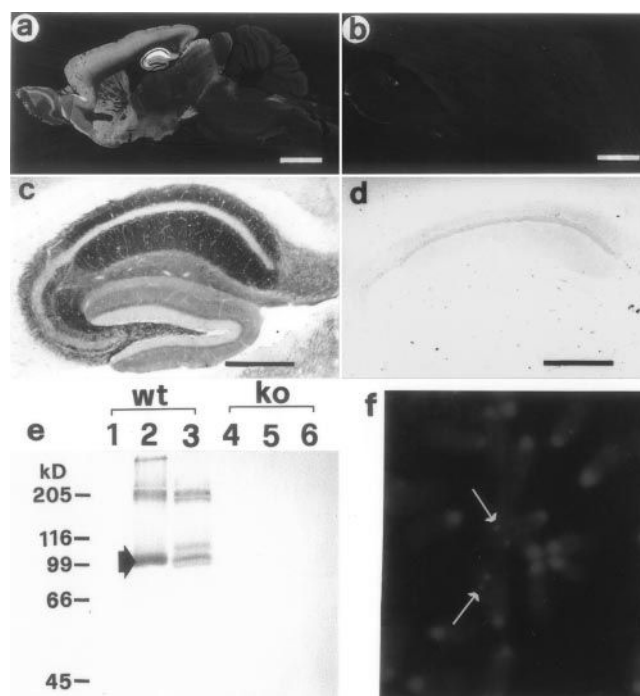


Figure 2. Lack of mGluR7 protein in mGluR7^{-/-} mice. *a–d*, Immunocytochemical analysis comparing reactivity of the mGluR7a-specific antibody in a brain section of a mGluR7^{+/+} mouse (*a*) and hippocampus shown enlarged in *c*) and lack of reactivity in mGluR7^{-/-} mouse brain (*b*) and hippocampus shown enlarged in *d*). Scale bars: 2 mm (white horizontal line in *a*, *b*) and 400 μm (black horizontal line in *c*, *d*), respectively. *e*, Immunoblot that uses a polyclonal rabbit mGluR7a-specific antibody (Shigemoto et al., 1996, 1997; Kinoshita et al., 1998) of homogenates of mGluR7^{+/+} (wt) and mGluR7^{-/-} (ko) brain regions, including cerebellum [lanes 1, 4; serving also as a negative control because this brain region contains undetectable levels of mGluR7a (Kinoshita et al., 1998)], hippocampus (lanes 2, 5), and the other combined brain regions without hippocampus and cerebellum (lanes 3, 6). The arrow indicates the position in the gel of the bulk of mGluR7a protein. *f*, Localization of the mouse mGluR7 gene to chromosome 6E1 by fluorescent *in situ* hybridization (FISH). White arrows indicate the position of the fluorescent signal on chromosome 6.

and, most likely, was olfactory in nature (data not shown). Its further characterization proved difficult because of the variability that was seen in seizure frequency with different batches of bedding material. Interestingly, a series of other visual, vestibular, and olfactory sensory stimuli that were tested failed to identify another stimulus that was evoking seizures (data not shown). In contrast, two chemical convulsants reproducibly evoked seizures in mGluR7^{-/-} mice at doses that were significantly below threshold for mGluR7^{+/-} and mGluR7^{+/+} mice (see below).

The epilepsy-prone phenotypes appeared in mGluR7^{-/-} mice derived from two independently targeted ES cell clones and in mutants with different genetic backgrounds [in 129Ola×C57BL/6 hybrid mice and in mice back-crossed for several generations on either C57BL/6 (F3–F14) or BALB/c (F6)].

The mouse mGluR7 gene was localized to chromosome 6E1 (Fig. 2*f*), and 70 kb of 129Ola mouse genomic DNA was sequenced around the disrupted mGluR7 exon (S. D. McDonald, S. Goff, H. van der Putten, unpublished results). Neither procedure provided links to genes (other than the mGluR7 gene) known for predisposing to epilepsy (Allen and Walsh, 1996; McNamara and Puranam, 1998; Bate and Gardiner, 1999; Frankel, 1999), strongly

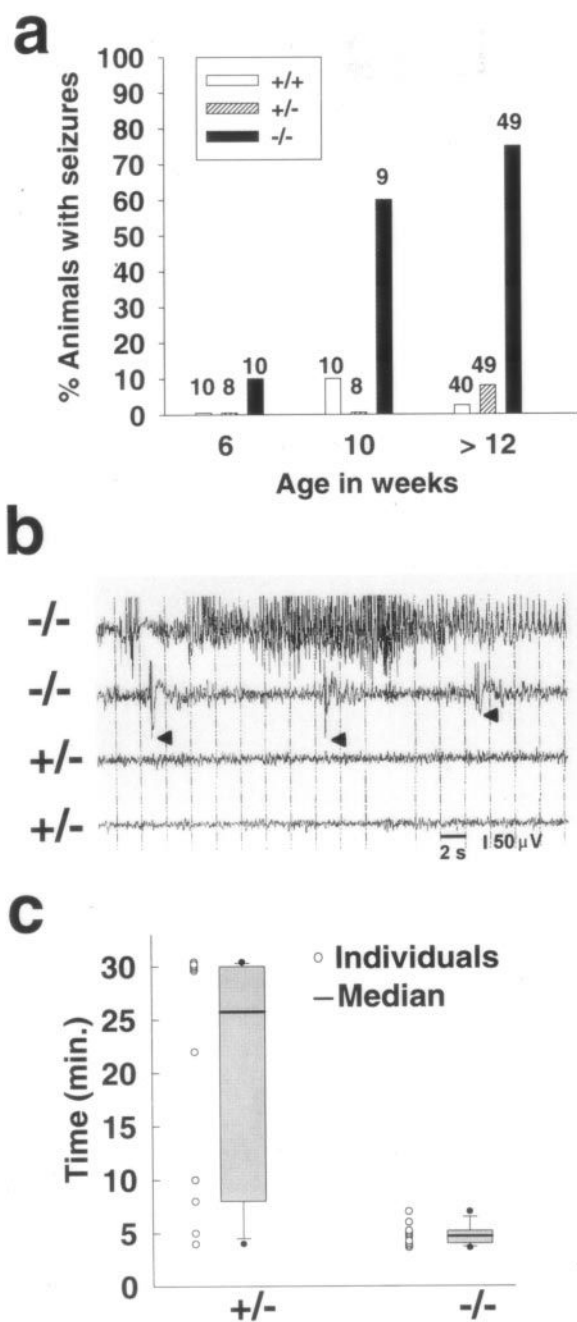


Figure 3. Increased PTZ susceptibility of mGluR7^{-/-} mice to convulsant drugs. *a*, Age-dependent development of a seizure-prone phenotype in mGluR7^{-/-} mice (129Ola×C57BL/6 and 129Ola×BALB/c mixed strain backgrounds). Groups of 8–10 mGluR7^{+/+}, mGluR7^{+/-}, and mGluR7^{-/-} mice aged 6, 10, and older than 12 weeks (this last group included a group of nine mGluR7^{+/+} and nine mGluR7^{-/-} mice aged 36 weeks) were given PTZ (40 mg/kg, i.p.). Seizures (tonic in mGluR7^{+/+} and mGluR7^{+/-} mice, and either tonic or tonic-clonic in mGluR7^{-/-} mice) were scored behaviorally. Animals were considered protected from the convulsant effect of PTZ when neither clonic nor clonic-tonic convulsions were observed within the first 10 min after PTZ (Schmutz et al., 1990). The numbers above the bars correspond to the number of mice tested in an age group. The group aged >12 weeks included groups of mGluR7^{+/+}, mGluR7^{+/-}, and mGluR7^{-/-} mice aged 12–14, 14–18, and 22–24 weeks, respectively. It also included one group aged 36 weeks, of nine mGluR7^{+/+} and nine mGluR7^{-/-} mice, but no mGluR7^{+/-} mice. Of these mice, one of nine mGluR7^{+/+} and eight of nine mGluR7^{-/-} showed seizures. Confidence limits in the groups of >12 weeks were ±10% for the mGluR7^{+/+} groups and ±15% for the mGluR7^{-/-} groups.

suggesting that it is the homozygous mutant mGluR7 genotype that determines the epilepsy-prone phenotype in these mice.

mGluR7^{-/-} mice have a lower seizure threshold for convulsants

The initial discovery of sensory stimulus-evoked seizures was not suitable as an experimental paradigm for further studies, first because of the unresolved chemical nature of the stimulus and second because of the great degree of variability in seizure incidence of mGluR7^{-/-} mice housed in different environments. Nevertheless, our initial findings in SPF-housed mGluR7^{-/-} mice suggested a significantly reduced threshold for seizures in these mice. Our failure to identify another defined sensory stimulus that could provoke seizures reproducibly in mGluR7^{-/-} mice prompted us to test subconvulsant doses of two drugs, pentylenetetrazole (PTZ) and bicuculline.

When administered intraperitoneally at a dose of 40 mg/kg, PTZ is generally subthreshold for inducing clonic seizures in control animals. In mice 12 weeks and older, it induced seizures in 1 of 40 mGluR7^{+/+} and in 4 of 49 mGluR7^{+/-} mice. In contrast, it evoked seizures in the majority of mGluR7^{-/-} littermate mice (43 of 58; 74%) (Fig. 3*a*). Note that all of these mice were aged 10 weeks or older before testing to assure development of the epilepsy-prone phenotype in mGluR7^{-/-} mice. The PTZ-evoked seizures in mGluR7^{-/-} mice were frequently both clonic and tonic in nature and were followed by death (>50% of the mice). For comparison, in mGluR7^{+/+} and mGluR7^{+/-} mice, 70 mg/kg PTZ was required to produce seizures that consistently were generally only clonic in nature.

In mice aged 6 weeks the PTZ (40 mg/kg) failed to evoke seizures in a statistically significant manner (Kruskal–Wallis one-way ANOVA on ranks, $p = 0.407$). In only 1 of 10 mGluR7^{-/-} mice were the seizures observed. When this mouse was eliminated from the group and the others were retested (40 mg/kg PTZ) at age 10 weeks, six of nine mGluR7^{-/-} mice showed clonic seizures. In parallel and at both ages only one mouse of two groups of $n = 10$ mGluR7^{+/+} mice (MAG; parental strains, NIH and Maus Inzucht Geigy) and no mGluR7^{+/-} mice showed seizures ($p = 0.003$, Kruskal–Wallis one-way ANOVA on ranks revealed a significant difference among the genotypes; $p = 0.023$, Mann–Whitney rank-sum test for +/+ vs -/-).

Five different groups ($n = 9$ –10 per group and genotype) of

b, Electrographic seizures in mGluR7^{-/-} mice. EEGs recorded for 1 week and for 24 hr continuously in freely moving mGluR7^{-/-} and mGluR7^{+/-} mice (each group $n = 4$, aged 16–20 weeks) revealed no spontaneous epileptiform activity (data not shown). After the 1 week of recording the same mice were given 40 mg/kg PTZ, and the seizures were recorded by behavior as well as by electroencephalography. For each genotype group two representative EEG recordings from two different individuals are shown, starting at 210 sec after PTZ injection. The top two traces are from two different mGluR7^{-/-} mice; the bottom two traces are from two different mGluR7^{+/-} mice. The first mGluR7^{-/-} mouse (top trace) had tonic-clonic seizures; the second mGluR7^{-/-} mouse (second trace from top) had clonic seizures manifested behaviorally as body jerks (arrowheads in EEG). None of the mGluR7^{+/-} mice (bottom two traces) showed epileptiform activity. Time scale is shown in seconds, and amplitude is in microvolts. *c*, Increased susceptibility to seizures for the GABA_A receptor antagonist bicuculline, as shown by comparing two groups of 10 mGluR7^{+/+} and mGluR7^{-/-} mice (aged 14–16 weeks) that were given 2.5 mg/kg bicuculline. Seizures were scored behaviorally. Plotted is the time in minutes for individual animals to develop clonic seizures. Observation time was 30 min after drug application, and mice plotted at this value were without seizures.

mGluR7^{-/-}, mGluR7^{+/-}, and mGluR7^{+/+} mice were tested at ages 12–36 weeks, and the overall results are shown (Fig. 3a). One of 40 (2.5%) mGluR7^{+/+} and 4 of 49 (8%) mGluR7^{+/-} mice showed seizures (clonic only). In contrast, 37 of 49 (75%) mGluR7^{-/-} mice showed clonic seizures that often (in >60% of these mice) progressed to tonic seizures. Often, mGluR7^{-/-} mice with tonic seizures died. Statistical significance for the results in the groups aged >12 weeks is given by pairwise comparison of the genotype groups with the Mann–Whitney rank-sum test ($p < 0.001$ for the $+/+$ vs $-/-$ and the $+/-$ vs $-/-$ groups; $p > 0.05$ and no statistical significance when comparing $+/+$ and $+/-$ groups). At age 36 weeks, differences in PTZ sensitivity remained statistically significant ($p = 0.002$, Mann–Whitney rank-sum test; comparison of a single group of nine mGluR7^{+/-} and nine mGluR7^{-/-} mice).

Spontaneous epileptiform activity was not detected during 1 week of continuous (24 hr/d) EEG recordings by using bilaterally implanted frontal and parietal electrodes in mGluR7^{+/-} ($n = 4$) and mGluR7^{-/-} ($n = 4$) mice. A subsequent injection of PTZ (40 mg/kg, i.p.) rapidly triggered epileptiform discharges and seizure manifestations that were specific to the mGluR7^{-/-} mice. The same dose of PTZ injected into the mGluR7^{+/-} mice triggered no detectable discharges (Fig. 3b), indicating a significantly reduced threshold for PTZ-induced discharges and seizures in the mGluR7^{-/-} mice.

Susceptibility to seizures also was increased for the competitive GABA_A receptor antagonist bicuculline. Two groups of 10 mGluR7^{+/-} and mGluR7^{-/-} mice (aged 14–16 weeks) were given 2.5 mg/kg bicuculline subcutaneously and were observed for 30 min. The latency to first seizure was plotted (Fig. 3c) for individual animals showing clonic seizures. Mice plotted at the 30 min value were without seizures. The median (horizontal bar in bold) for each group was 4 min (mGluR7^{-/-}, 25% at 4 min and 75% at 5 min) versus 26 min (mGluR7^{+/-}, 25% at 8 min and 75% at 30 min), respectively (Mann–Whitney rank-sum test, $p = 0.003$). For reference, nine of nine mGluR7^{+/+} MAG mice treated with the same lot, and for MAG mice a standard suprathreshold dose of 3.5 mg/kg bicuculline, showed clonic seizures with a mean onset time of 3.2 min (data not shown).

Effects of standard anticonvulsant drugs

Three widely used mechanistically different antiepileptic drugs (White, 1997), ethosuximide (ESM), clonazepam (CZP), and valproate (VPA), were tested in mGluR7^{-/-} mice for protection from PTZ-evoked seizures (Fig. 4).

First (Fig. 4a,b, gray bars), three groups of 10 mGluR7^{+/-} and 10 mGluR7^{-/-} mice (all aged 14–20 weeks) received pretreatment (1 hr before 40 mg/kg PTZ, i.p.) with an antiepileptic drug (CZP, 0.1 mg/kg, p.o.; ESM, 500 mg/kg, p.o.; VPA, 500 mg/kg, p.o.). In parallel, another group of 10 mGluR7^{+/-} and 10 mGluR7^{-/-} mice and, in addition, 10 mGluR7^{+/+} wild-type (MAG) mice received a placebo (Methocel as reference for ESM and CZP; water compared with VPA). At 1 hr after placebo or anticonvulsant drug treatment all of the mice were given PTZ (40 mg/kg, i.p.). PTZ induced seizures in 60–90% of each of the placebo-treated mGluR7^{-/-} groups ($n = 3 \times 10$), but not in any of the placebo-treated mGluR7^{+/-} ($n = 3 \times 10$) or mGluR7^{+/+} (MAG; $n = 3 \times 10$) mice. ESM, CZP, and VPA protected 100% of the mGluR7^{-/-} mice ($n = 10$ per group and compound) from PTZ-induced seizures (statistical significance for each drug-treated versus placebo group is given by $p < 0.05$, Mann–Whitney rank-sum test).

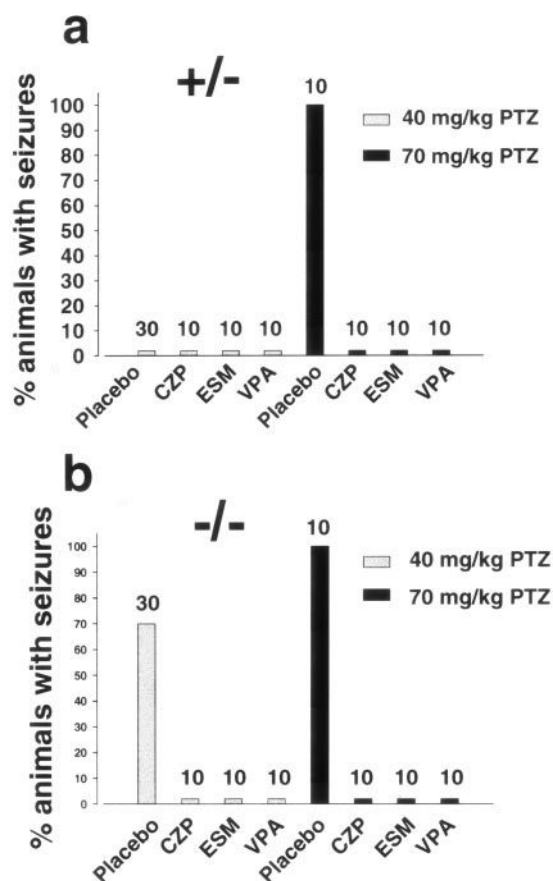


Figure 4. The actions of three standard anticonvulsants are unimpaired in mGluR7^{-/-} mice. *a, b*, Plotted is the percentage of mice with seizures, scored behaviorally, for a period of 10 min in response to PTZ (40 or 70 mg/kg) given intraperitoneally. The number above each bar indicates the group size. The gray bars represent groups of mice given 40 mg/kg PTZ that were pretreated 1 hr before PTZ with either placebo (Methocel in two groups of $n = 10$ per genotype and as reference for ESM and CZP; water was the placebo in one group of $n = 10$ per genotype and compared with VPA) or anticonvulsant (0.1 mg/kg CZP, p.o.; 500 mg/kg ESM, p.o.; or 500 mg/kg VPA, p.o.). The black bars in *a* and *b* represent groups of 10 mice per genotype that had received PTZ (70 mg/kg, i.p.). At 1 hr before PTZ all of the mice in a group had received the placebo (water, p.o.), CZP (1 mg/kg, p.o.), ESM (750 mg/kg, p.o.), or ESM (500 mg/kg). Unlike in mGluR7^{-/-} mice (*b*), the 40 mg/kg PTZ dose is below threshold for inducing seizures in mGluR7^{+/-} (*a*) and wild types (mGluR7^{+/+} mice; data not shown). Therefore, mGluR7^{+/-} mice displayed no seizures, regardless of pretreatment with placebo or anticonvulsant. In contrast, 70% of all mGluR7^{-/-} mice showed clonic or clonic-tonic seizures when given placebo (*b*). The injection of 70 mg/kg PTZ evoked seizures (clonic in mGluR7^{+/-} and mGluR7^{+/+} mice; clonic or clonic-tonic in mGluR7^{-/-} mice) in at least 90% of all placebo-treated mice, regardless of their mGluR7 genotype. CZP, ESM, and VPA fully protected from PTZ-induced clonic seizures in mGluR7^{+/-} (black bars in *a*) and mGluR7^{+/+} mice (data not shown) as well as from PTZ-induced clonic or clonic-tonic seizures in mGluR7^{-/-} mice.

All three anticonvulsant drugs also provided protection in mGluR7^{-/-} mice when challenged with 70 mg/kg PTZ (Fig. 4a,b, black bars), a dose that evoked clonic seizures in at least 90% all mGluR7^{+/-} (Fig. 4b) and mGluR7^{+/+} mice (data not shown). In this experiment we increased the dose of ESM (to 750 instead of 500 mg/kg) and CZP (to 1 mg/kg instead of 0.1 mg/kg). VPA dosing (500 mg/kg) was not increased, because this can cause lethality in mice. Given that all three anticonvulsants protected mGluR7^{-/-} mice from either 40 or 70 mg/kg PTZ-

induced seizures, we conclude that mGluR7 receptors do not contribute significantly to mechanisms underlying the action of these antiepileptics.

Anticonvulsant effects of PPG are diminished greatly in mGluR7^{-/-} mice

The group III mGluR selective agonist PPG has shown potent and sustained anticonvulsant actions in several rodent models of epilepsy (Chapman et al., 1999; Gasparini et al., 1999). Therefore, we compared its anticonvulsant action against PTZ-evoked seizures in mGluR7^{-/-} mice and two other mGluR group III mutant mice, the mGluR4^{-/-} and mGluR8^{-/-} mutants. All of the mice used in these experiments were aged from 12 to 20 weeks before testing to allow for development of the seizure-prone phenotype in the mGluR7^{-/-} mice. Also, we tested different doses of PTZ to determine, in each of the strain backgrounds of the different mutants, a dose that evoked clonic convulsions in 80% or more of the mice under the experimental conditions that were used, i.e., light Fluothane anesthesia, intracerebroventricular injection of placebo (0.9% NaCl), followed 15 min later by intraperitoneal injection of PTZ. Determining these experimental conditions was necessary because PPG is not active when given systemically (Gasparini et al., 1999), and, when given intracerebroventricularly, it requires brief anesthesia that increases PTZ thresholds (data not shown). In addition, PTZ thresholds depend on multiple chromosomal loci that differ between mouse strains (Kosobud et al., 1992; Ferraro et al., 1999), and mGluR4^{-/-}, mGluR7^{-/-}, and mGluR8^{-/-} mutant mice have mixed and different genetic contributions from a number of strains. Accordingly, the PTZ doses required under our experimental conditions were 60 mg/kg in mGluR4 mutants (129Sv/J×CD1) and 70 mg/kg in mGluR7 [(129Ola×C57BL/6) and (129Ola×C57BL/6)×BALB/c] and mGluR8 [(129×C57BL/6)×C57BL/6] mutants.

Next, dose responses for PPG (see Gasparini et al., 1999) (data not shown) in the different heterozygous mGluR mutant mice revealed that 634 nmol intracerebroventricularly (2.2 mg/kg) could protect ≥70% of the different heterozygous mutant mice from seizures induced by PTZ. This protective effect of PPG was reduced dramatically in mGluR7^{-/-}, but not in mGluR4^{-/-} and mGluR8^{-/-} mice (Fig. 5). The loss of the anticonvulsant activity of PPG in mGluR7^{-/-} mice treated with 70 mg/kg PTZ was specific to PPG because CZP, ESM, and VPA provided complete protection in both mGluR7^{+/+} and mGluR7^{-/-} mice challenged with this dose of PTZ (Fig. 4a,b; 70 mg/kg PTZ dose results are represented by black bars in the histograms).

Altered excitability in hippocampal slices

Because of similarities between seizures observed in mGluR7^{-/-} mice and those known to involve limbic systems, we examined electrophysiological responses in hippocampal slices. We focused primarily on synaptic transmission in the CA1 region because CA3-derived Schaffer collateral–commissural terminals are rich in mGluR7a (Shigemoto et al., 1996, 1997) (Fig. 2c) and CA3 is a major trigger region for discharge activity that can propagate to CA1 and beyond in different models of epileptic discharge (Wong and Traub, 1983; Barbarosie and Avoli, 1997). Input–output curves relating the initial slope of the field EPSP to either stimulus intensity or presynaptic fiber volley amplitude revealed no significant differences between mGluR7^{-/-} and mGluR7^{+/+}

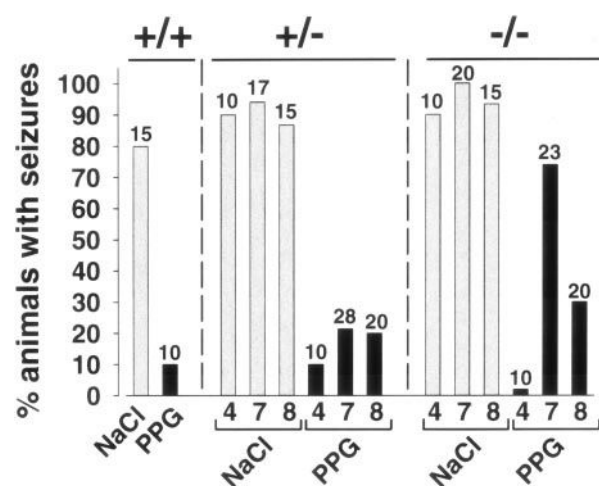


Figure 5. Greatly reduced anticonvulsant action of PPG in mGluR7^{-/-} mice. Shown are the protective effects of 634 nmol of PPG intracerebroventricularly (black bars) versus 0.9% NaCl (gray bars) in mGluR7^{+/+} mice (+/+) and the different mGluR^{+/-} and mGluR^{-/-} mutant mice as indicated by the numbers 4, 7, and 8 on the horizontal axis (all mice aged ≥12 weeks). PPG was given intracerebroventricularly 15 min before the intraperitoneal injection of PTZ [60 mg/kg in mGluR4 mutants; 70 mg/kg in all wild types (+/+) and other mGluR mutants]. Seizures were scored behaviorally for a period of 10 min (Schmutz et al., 1990). The numbers above the bars indicate the number of mice per group. The protective effects of PPG versus NaCl were 78% (22 of 28) versus 6% (1 of 17) in mice with one mutant mGluR7 allele and 26% (6 of 23) versus 0% (0 of 20) in mice with two mutant mGluR7 alleles. Unlike a comparison of the protective effect of PPG between mGluR7^{+/-} and mGluR7^{-/-} mice, there were no statistically significant differences in the protective action of PPG when mGluR4^{+/-}, mGluR4^{-/-}, mGluR8^{+/-}, and mGluR8^{-/-} groups were compared (all $p > 0.05$). Confidence limits for the groups $n > 10$ were ±10%. For PPG versus NaCl comparisons in all groups, p values were <0.001 (Kruskal–Wallis one-way ANOVA on ranks, Dunn's test). Other values were mGluR7^{-/-} versus mGluR7^{+/+} (wild type), $p = 0.004$; mGluR7^{-/-} versus mGluR4^{-/-}, $p < 0.001$; mGluR7^{-/-} versus mGluR8^{-/-}, $p = 0.014$ (Mann–Whitney rank–sum tests).

mice (Fig. 6a,b). Paired pulse facilitation was also similar between groups. For example, with an interpulse interval of 50 msec the facilitation ratios in CA1 were 1.45 ± 0.04 ($n = 9$) and 1.49 ± 0.03 ($n = 9$), respectively.

Next, we determined whether hippocampal slices from mGluR7^{-/-} mice were more excitable when the stimulus intensity was increased to evoke a population spike and activate GABAergic synapses polysynaptically (Fig. 6c,d). In the absence of PTZ a very small secondary population spike was apparent in 8 of 11 slices from null mice (0.067 ± 0.020 of the first population spike) but only in 1 of 10 slices from controls (0.009 ± 0.011 of the first population spike; Student's t test, $p < 0.05$). Thus, slices prepared from mGluR7^{-/-} mice were slightly more excitable under control conditions.

Given the lower seizure threshold of mGluR7^{-/-} mice to PTZ, we examined the effects of PTZ on synaptic transmission in CA1. PTZ caused a reduction in synaptic inhibition, manifest as a concentration-dependent appearance of multiple population spikes in both mGluR7^{-/-} and wild-type mice (Fig. 6c,d). The effect was such that differences in excitability between mGluR7^{-/-} and wild-type littermates, observed in the absence of PTZ, were no longer evident when higher concentrations of PTZ (1–4 mM) were used.

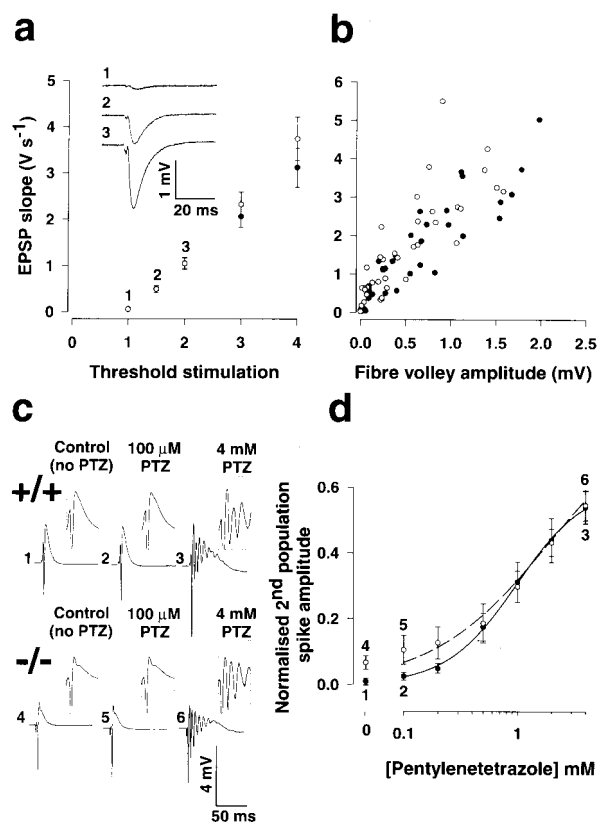


Figure 6. Increased excitability in the CA1 region of hippocampal slices from mGluR7^{-/-} mice. *a*, Plotted is the slope of the field EPSP, recorded in stratum radiatum, versus relative stimulus strength, expressed as a function of the threshold intensity (i.e., the intensity at which a response is just detectable in single records) for mGluR7^{-/-} and mGluR7^{+/+} mice. The traces are averages of successive responses from a typical mGluR7^{-/-} mouse at the times indicated (1–3); the input–output curves show no significant difference in excitatory synaptic transmission between wild-type ($n = 14$) and null mice ($n = 12$). *b*, Input–output curve, relating the slope of the field EPSP to the presynaptic fiber volley amplitude. *c*, Examples of somatic field recordings from wild-type (1–3) and mGluR7^{-/-} mice (4–6) to illustrate the effects of increasing concentrations of PTZ. The insets are a magnification (2.5 $\times$) of the windows shown in *c1* and *c4* to illustrate the generation of multiple population spikes on a faster time base. Field potentials were recorded from stratum pyramidale and input–output curves that were constructed. Then the stimulus intensity was set at that which produced a first population spike of $\sim 30\%$ of the maximum, and PTZ was applied sequentially in increasing concentrations. *d*, Pooled data for 10 wild-type and 11 mGluR7^{-/-} mice (aged between 8 and 29 weeks) of the amplitude of the second population spike, expressed as a function of the primary population spike, versus PTZ concentration. Open symbols, mGluR7^{-/-} mice; filled symbols, littermate wild types, throughout.

Altered frequency-dependent facilitation in mGluR7^{-/-} mice

To investigate mechanisms that might underlie the changes in excitability, we turned to a different slice preparation and studied transmission between synaptically coupled pyramidal neurons and bitufted interneurons in layer 2/3 of the neocortex. This synapse contains a high density of presynaptic mGluR receptors, including mGluR7 (Shigemoto et al., 1996), and it demonstrates frequency-dependent facilitation (Reyes et al., 1998), which is believed to arise from the elevation of Ca²⁺ at the presynaptic release site (Zucker, 1994; Fisher et al., 1997; Rozov et al., 2001).

As seen in the hippocampus (see paired pulse data in previous section), facilitation in response to brief trains of two or three

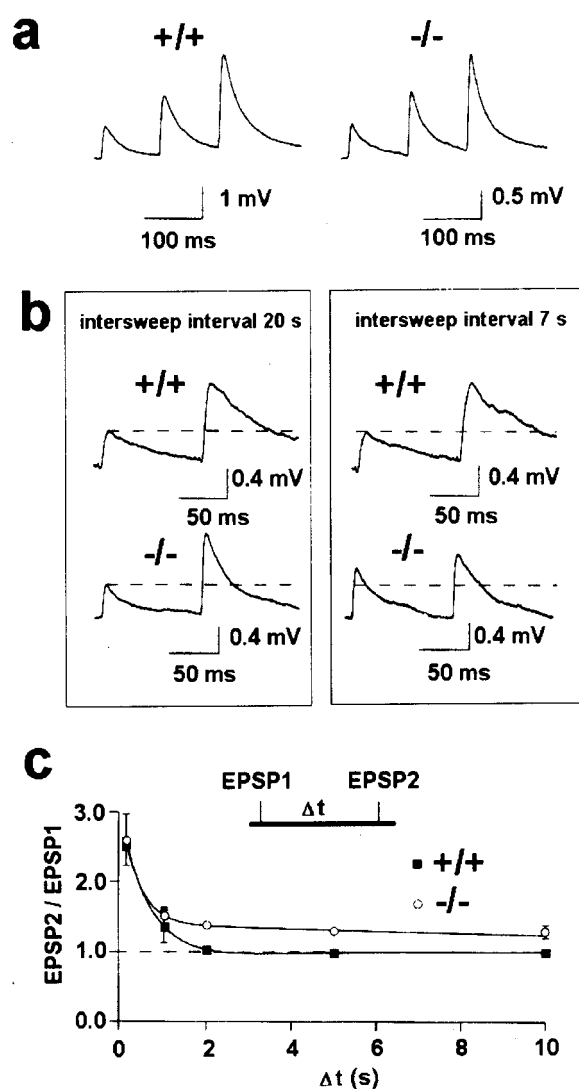


Figure 7. Altered recovery from paired pulse facilitation in mGluR7^{-/-} mice. Simultaneous whole-cell paired recordings from synaptically connected pyramidal and bitufted neurons in layer 2/3 of mGluR7^{+/+} ($n = 9$) and mGluR7^{-/-} ($n = 7$) mice (P14; neocortex). *a*, Averaged EPSPs ($n = 50$ –100) recorded from bitufted neurons of mGluR7^{+/+} and mGluR7^{-/-} mice in response to a train of three action potentials evoked in a projecting pyramidal neuron at 10 Hz. Time intervals between trains (intersweep intervals) were 30 sec in both cases. *b*, Averaged EPSPs of 50–100 sweeps recorded from bitufted neurons in response to two action potentials that were evoked in pyramidal neurons with a 100 msec time interval. The difference between the left and right traces is the intersweep interval (time between subsequent pairs of action potentials). For the left traces it was 20 sec, and for the right traces it was 7 sec, as indicated above the traces. The top traces in each box represent recordings from mGluR7^{+/+} mice, and the bottom traces are from mGluR7^{-/-} mice. For each genotype the representative recordings that are shown (i.e., averaged EPSPs of 50–100 sweeps) are from the same bitufted neuron. *c*, Time course of recovery from facilitation measured in bitufted neurons. The ratios of the mean EPSP amplitudes (EPSP2/EPSP1) were plotted against Δt .

action potentials (at 10 Hz in this preparation) was similar in mGluR7^{-/-} and mGluR7^{+/+} mice, provided that the intersweep interval time was sufficiently long (Fig. 7*a*; in both cases intersweep interval was 30 sec). However, a marked difference was observed among mice when recovery from facilitation was studied. In one set of experiments paired pulses were delivered with a fixed interpulse interval of 100 msec, but the interval between

paired pulses (intersweep interval) was varied between 5 and 30 sec (Fig. 7*b*). Averaged EPSPs recorded from the same bitufted neuron (see *left trace* in *a*) in a mGluR7^{+/+} mouse in response to a train (10 Hz) of two action potentials delivered at 20 sec (left) and 7 sec (right) intersweep intervals shows that the amplitude of the first EPSP (EPSP1) and the paired pulse facilitation ratio (EPSP2/EPSP1) were similar at 20 and 7 sec intersweep interval times. In this mouse the EPSP1 amplitudes were 0.46 and 0.49 mV, and EPSP2/EPSP1 ratios were 2.24 and 2.12 at the 20 and 7 sec intersweep intervals, respectively. In the mGluR7^{-/-} mouse (*bottom traces*) the EPSP1 amplitude increased from 0.39 mV at the 20 sec intersweep interval to 0.75 mV at the 7 sec intersweep interval, and the EPSP2/EPSP1 ratio decreased from 2.61 to 1.28 at the 20 and 7 sec intersweep intervals, respectively. Overall, in this set of experiments the EPSP1 amplitudes with the 7 sec intersweep interval were $100 \pm 12\%$ of those measured with 20 sec interval, and the EPSP2/EPSP1 ratios were 2.51 ± 0.28 and 2.56 ± 0.47 at the 20 and 7 sec intersweep intervals, respectively, in mGluR7^{+/+} mice ($n = 4$). In the mGluR7^{-/-} group the EPSP1 amplitudes with the 7 sec intersweep interval were 59.7 $\pm$ 28.3% larger than those recorded at the 20 sec interval. EPSP2/EPSP1 ratios decreased from 2.87 ± 0.88 to 1.27 ± 0.03 for 20 and 7 sec, respectively. In summary, in mGluR7^{+/+} mice the facilitation recovered within 5–7 sec, as observed previously with rats (Reyes et al., 1998). In contrast, in mGluR7^{-/-} mice full recovery from facilitation required 20–30 sec.

In a separate set of experiments the time course of recovery from facilitation was calculated by using a repeated paired pulse protocol. Every 30 sec a train of two action potentials (indicated as EPSP1 and EPSP2) was evoked. One of several different time intervals was chosen ($\Delta t = 0.1, 1, 2, 5$, and 10 sec, respectively) between action potentials 1 and 2, and 50–100 individual sweeps were averaged for each Δt . The intersweep intervals thus were kept constant at 30 sec in all of these experiments to allow the facilitation to recover in mGluR7^{-/-} mice also. The plot shows the summarized results of delivering paired pulses with the different interpulse intervals. In mGluR7^{+/+} mice the recovery from facilitation was evident by 2 sec, whereas even after 10 sec the recovery in mGluR7^{-/-} mice was still incomplete (Fig. 7*c*).

DISCUSSION

Epilepsy-prone phenotype of mGluR7^{-/-} mice, but not other mGluR-deficient mice

In contrast to gene ablations of mGluR 1, 2, 4, 5, 6, and 8, respectively (Aiba et al., 1994; Conquet et al., 1994; Masu et al., 1995; Pekhletski et al., 1996; Yokoi et al., 1996; Lu et al., 1997; Duvoisin and Zhang, unpublished observations), gene disruption of mGluR7 predisposes to epilepsy. This points toward an important role of this particular group III mGluR in regulating the balance between excitatory and inhibitory transmission. The reduced thresholds for PTZ, bicuculline, and sensory stimulus-evoked seizures in mGluR7^{-/-} mice are acute results of the absence in adult tissue of a single or both isoforms of mGluR7 receptors. Alternatively, they are a consequence of absence of the receptor throughout development. Addressing these questions awaits the development of mGluR7-specific antagonists, conditional knock-outs, or mGluR7^{-/-} mice in which receptor expression is reconstituted in the adult.

In either case the mGluR7^{-/-} mouse provides an interesting model of epilepsy, given that (1) the seizure susceptibility phenotype develops gradually, (2) they are uniquely associated with an ablation of this and no other mGluR subtype, and (3) when

evoked by PTZ, the seizures are responsive to representatives of three major classes of anticonvulsants [ethosuximide is thought to act via modulation of Na⁺ and Ca²⁺ channels (Coulter et al., 1989); clonazepam, a benzodiazepine, increases the frequency of GABA_A receptor chloride channel opening and is especially potent in preventing PTZ-induced seizures (Henriksen, 1998); valproate is a drug with a broad preclinical and clinical profile but is poorly understood mechanistically (McLean and Macdonald, 1986; Kelly et al., 1990; Rogawski and Porter, 1990; Van Erp et al., 1990; Zona and Avoli, 1990)]. Apparently, mGluR7 does not contribute significantly to mechanisms underlying the actions of these antiepileptics.

In contrast, mGluR7 appears to be an important mediator of a mechanistically different (and potentially clinically viable) anticonvulsant principle, namely, the activation of group III mGluRs. This was shown here by using the group III mGluR selective agonist PPG, which proved effective against PTZ-induced seizures in mGluR4^{-/-}, mGluR8^{-/-}, and mGluR7^{+/+}, but not mGluR7^{-/-}, mice under experimental conditions in which PTZ evoked primarily clonic seizures. These findings are somewhat surprising, because PPG is least potent on mGluR7 of all of the human and rat recombinant group III mGluRs for the inhibition of forskolin-stimulated cAMP accumulation in mammalian cells (Nakajima et al., 1993; Okamoto et al., 1994; Conn and Pin, 1997; Gasparini et al., 1999). PPG also is anticonvulsant against sound-induced seizures in DBA/2 mice and genetically epilepsy-prone rats (Chapman et al., 1999) in the mouse maximal electroshock model (Gasparini et al., 1999) and in the mouse PTZ model (Fig. 5). Unlike L-AP4 and L-SOP, PPG lacks proconvulsant activity, and its anticonvulsant effects last much longer than those of L-AP4 or L-SOP (Chapman et al., 1999; Gasparini et al., 1999). However, PPG is not active when given systemically, and the compound has sedative effects (Chapman et al., 1999; our unpublished results). Therefore, novel compounds are needed to evaluate the potential of group III and, in particular, mGluR7-selective drugs for treating epilepsy and/or other disorders (Masugi et al., 1999). A recent finding that further strengthens a role for mGluR7 receptors in epilepsy is its selective upregulation in the inferior colliculus of genetically epilepsy-prone (GEP) rats. This was shown to be associated with a prolonged anticonvulsant effect of intracollicular administered L-SOP against sound-induced seizures in GEP rats (Yip et al., 2001).

One very limited gene polymorphism study in patients (Goodwin et al., 2000) could not provide a link between the mGluR7 gene and epilepsy. This also applies to other group III mGluRs. However, the mGluR7 gene spans 600 kb (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/AceView/acequery.cgi?db=300&ORG=hs&term=GM7>), and more detailed studies need to be performed by using a large number of single nucleotide polymorphisms across the locus before any firm conclusions can be drawn regarding linkage to disease in human.

Interestingly, mGluR4^{-/-} compared with mGluR4^{+/+} mutant mice showed a differential resistance to absence-like seizures induced by 30 mg/kg PTZ (Snead et al., 2000). This finding seems to support a facilitating role of mGluR4 in absence-like seizures. At higher doses PTZ (40–60 mg/kg) evoked clonic convulsions and showed no difference in susceptibility between wild-type and mGluR4^{-/-} mutant mice (Snead et al., 2000). PTZ injections (60 mg/kg) in mGluR4^{-/-} mice under our and different experimental conditions confirmed this. We failed to reveal a role for mGluR4 in mediating the anticonvulsant action of PPG in our PTZ paradigm, but another potent mGluR4 agonist has been

shown to increase the latency of seizure onset in a different PTZ-induced tonic seizure paradigm (Thomsen and Dalby, 1998). Therefore, dependent on the seizure paradigm that is used, the role of particular group III mGluRs may differ.

This hypothesis is tempting, given findings in neuroprotection experiments. When we used different magnitudes of a toxic (NMDA) insult, low doses of PPG substantially reduced toxicity in mGluR4^{+/-} mice, but not in mGluR4^{-/-} mice, whereas higher doses were protective in both genotypes, suggesting that another receptor might play a more important role in protection at higher doses (Bruno et al., 2000).

Potential mechanisms underlying the epileptic phenotype

The very small excitability changes detected in the untreated mGluR7^{-/-} hippocampal slices are consistent and correlate well with the absence of seizures in the mGluR7^{-/-} mice *in vivo* under normal circumstances. The weak epileptogenic effects seen in mGluR7^{-/-} hippocampal slices with a subthreshold concentration of PTZ (for control slices) are consistent with the increased seizure susceptibility for PTZ in the mGluR7^{-/-} mice *in vivo*. The lack of a difference between mGluR7^{-/-} and their wild-type littermates in the excitability in slices exposed to PTZ and, in particular, at higher concentrations of PTZ is suggestive of a common expression mechanism, namely, a net reduction in GABAergic synaptic inhibition, for the two epileptogenic situations (absence of mGluR7 and presence of PTZ).

Recovery from facilitation reflects the restoration of presynaptic Ca²⁺ levels by extrusion while synapses are not active (Zucker, 1994; Fisher et al., 1997). Our results in the paired stimulus paradigms (Fig. 7) are consistent with the hypothesis that deletion of mGluR7 affects a (slow) component involved in presynaptic Ca²⁺ homeostasis. Resolving the underlying molecular mechanism remains a challenge, not only because of the multiple mechanisms implicated in presynaptic Ca²⁺ regulation (Na⁺-Ca²⁺ exchange, uptake in mitochondria, the plasma membrane Ca²⁺ ATPase) [see Zenisek and Matthews (2000) and references therein] but also because mGluR7 has been linked to multiple effector pathways (Saugstad et al., 1996; Nakajima et al., 1999; O'Connor et al., 1999; Perroy et al., 2000). Regardless of which exact molecular mechanism will prove operational, a delayed recovery from facilitation as observed in mGluR7^{-/-} slices may account, at least in part, for an epilepsy-prone phenotype, given that such alterations share some features that are observed when (presynaptic) K⁺ channels are blocked by convulsant drugs (see, for example, Juhng et al., 1999). The mGluR7-deficient mouse adds to a large and growing list of novel models of epilepsy as a result of gene ablation, recently also including mice that lack the metabotropic receptor for GABA (Prosser et al., 2001; Schuler et al., 2001). Its uniqueness lies in the fact (1) that only few cases have been reported in which the epileptic phenotype is associated and/or caused by a specific presynaptic defect (such as synapsin deficiency; Rosahl et al., 1995) and (2) that no other mGluR gene ablation (mGluR1, 2, 4, 5, and 8) has resulted in an epileptic phenotype despite the fact that two of these receptors (mGluR4 and 8) have a strikingly similar presynaptic location. Given that mGluR4, mGluR7, and mGluR8 modulate different presynaptic parameters and show differential expression patterns (Shigemoto et al., 1997), these receptors might serve as distinct frequency-dependent synaptic transmission filters that accommodate fine tuning and information transfer under normal homeostatic and pathological conditions (for review, see Thomson,

2000). Dissecting the molecular signaling mechanisms underlying mGluR7 and its frequency-dependent regulation of neurotransmission may shed light on why this receptor might have potential as a drug target in epilepsy and/or other indications (Masugi et al., 1999).

REFERENCES

- Aiba A, Kano M, Chen C, Stanton ME, Fox GD, Herrup K, Zwingman TA, Tonegawa S (1994) Deficient cerebellar long-term depression and impaired motor learning in mGluR1 mutant mice. *Cell* 79:377–388.
- Allen KM, Walsh C (1996) Shaking down new epilepsy genes. *Nat Med* 2:516–518.
- Anson J, Collins GG (1987) Possible presynaptic actions of 2-amino-4-phosphonobutyrate in rat olfactory cortex. *Br J Pharmacol* 91:753–761.
- Aronica EM, Gorter JA, Paupard MC, Grooms SY, Bennett MV, Zukin RS (1997) Status epilepticus-induced alterations in metabotropic glutamate receptor expression in young and adult rats. *J Neurosci* 17:8588–8595.
- Barbarosie M, Avoli M (1997) CA3-driven hippocampal–entorhinal loop controls rather than sustains *in vitro* limbic seizures. *J Neurosci* 17:9308–9314.
- Baskys A, Malenka RC (1991) Agonists at metabotropic glutamate receptors presynaptically inhibit EPSCs in neonatal rat hippocampus. *J Physiol (Lond)* 444:687–701.
- Bate L, Gardiner M (1999) Genetics of inherited epilepsies. *Epileptic Disord* 1:7–19.
- Bradley S, Levey AI, Hersch SM, Conn JP (1996) Immunocytochemical localization of group III metabotropic glutamate receptors in the hippocampus with subtype-specific antibodies. *J Neurosci* 16:2044–2056.
- Brandstaetter JH, Koulen P, Kuhn R, van der Putten H, Waessle H (1996) Compartmental localization of a metabotropic glutamate receptor (mGluR7): two different active sites at a retinal synapse. *J Neurosci* 16:4749–4756.
- Bruno V, Battaglia G, Ksiazek I, van der Putten H, Catania MV, Giuffrida R, Lukic S, Leonhardt T, Inderbitzin W, Gasparini F, Kuhn R, Hampson D, Nicoletti F, Flor P (2000) Selective activation of mGluR4 metabotropic glutamate receptors is protective against excitotoxic neuronal death. *J Neurosci* 20:6413–6420.
- Bushell TJ, Jane DE, Tse HW, Watkins JC, Davies CH, Garthwaite J, Collingridge GL (1995) Antagonism of the synaptic depressant actions of L-AP4 in the lateral perforant path by MAP4. *Neuropharmacology* 34:239–241.
- Cartmell J, Schoepp DD (2000) Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *J Neurochem* 75:889–907.
- Chapman AG, Nanan K, Yip P, Meldrum BS (1999) Anticonvulsant activity of a metabotropic glutamate receptor 8 preferential agonist (R,S)-4-phosphonophenylglycine. *Eur J Pharmacol* 383:23–27.
- Conn PJ, Pin JF (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:205–237.
- Conquet F, Bashir ZI, Davies CH, Daniel H, Ferraguti F, Bordi F, Franz-Bacon K, Reggiani A, Matarese V, Conde F, Collingridge GL, Crepel F (1994) Motor deficit and impairment of synaptic plasticity in mice lacking mGluR1. *Nature* 372:237–243.
- Coulter DA, Huguenard JR, Prince DA (1989) Specific petit mal anti-convulsants reduce calcium currents in thalamic neurons. *Neurosci Lett* 13:74–78.
- Davies J, Watkins JC (1982) Actions of D and L forms of 2-amino-5-phosphonovaleate and 2-amino-4-phosphonobutyrate in the cat spinal cord. *Brain Res* 235:378–386.
- Dietrich D, Kral T, Clusmann H, Friedl M, Schramm J (1999) Reduced function of L-AP4 metabotropic glutamate receptors in human epileptic sclerotic hippocampus. *Eur J Neurosci* 11:1109–1113.
- Duvoisin RM, Zhang C, Ramonell K (1995) A novel metabotropic glutamate receptor expressed in the retina and olfactory bulb. *J Neurosci* 15:3075–3083.
- Ferraro TN, Golden GT, Smith GG, St. Jean P, Schork NJ, Mulholland N, Ballas C, Schill J, Buono RJ, Berrettini WH (1999) Mapping loci for pentylenetetrazol-induced seizure susceptibility in mice. *J Neurosci* 19:6733–6739.
- Fisher SA, Fisher TM, Carew TJ (1997) Multiple overlapping processes underlying short-term synaptic enhancement. *Trends Neurosci* 20:170–177.
- Flor PJ, van der Putten H, Ruegg D, Lukic S, Leonhardt T, Bence M, Sansig G, Knopfel T, Kuhn R (1997) A novel splice variant of a metabotropic glutamate receptor, human mGluR7b. *Neuropharmacology* 36:153–159.
- Frankel WN (1999) Detecting genes in new and old mouse models for epilepsy: a prospectus through the magnifying glass. *Epilepsy Res* 36:97–110.
- Gasparini F, Bruno V, Battaglia G, Lukic S, Leonhardt T, Inderbitzin W, Laurie D, Sommer B, Varney MA, Hess SD, Johnson EC, Kuhn R, Urwyler S, Sauer D, Portet C, Schmutz M, Nicoletti F, Flor PJ (1999)

- (*R,S*)-4-phosphonophenylglycine, a potent and selective group III metabotropic glutamate receptor agonist, is anticonvulsive and neuroprotective *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther* 289:1678–1687.
- Gereau 4th RW, Conn PJ (1995) Multiple presynaptic metabotropic glutamate receptors modulate excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal area CA1. *J Neurosci* 15:6879–6889.
- Goodwin H, Curran N, Chioza B, Blower J, Nashef L, Asherson P, Makoff AJ (2000) No association found between polymorphisms in genes encoding mGluR7 and mGluR8 and idiopathic generalized epilepsy in a case control study. *Epilepsy Res* 39:27–31.
- Henrikson O (1998) An overview of benzodiazepines in seizure management. *Epilepsia* 39[Suppl 1]:S2–S6.
- Holmes KH, Keele NB, Shinnick-Gallagher P (1996) Loss of mGluR-mediated hyperpolarizations and increase in mGluR depolarizations in basolateral amygdala neurons in kindling-induced epilepsy. *J Neurophysiol* 76:2808–2812.
- Juhng KN, Kokate TG, Yamaguchi S, Kim BY, Rogowski RS, Blaustein MP, Rogawski MA (1999) Induction of seizures by the potent K⁺ channel-blocking scorpion venom peptide toxins tityustoxin-K α and pandinustoxin-K α . *Epilepsy Res* 34:177–186.
- Kelly KM, Gross RA, Macdonald RL (1990) Valproic acid selectively reduces the low-threshold (T) calcium current in rat nodose neurons. *Neurosci Lett* 116:233–238.
- Kinoshita A, Shigemoto R, Ohishi H, van der Putten H, Mizuno N (1998) Immunohistochemical localization of metabotropic glutamate receptors, mGluR7a and mGluR7b, in the central nervous system of the adult rat and mouse: a light and electron microscopy study. *J Comp Neurol* 393:332–352.
- Kinzie JM, Saugstad JA, Westbrook GJ, Segerson TP (1995) Distribution of metabotropic glutamate receptor 7 messenger RNA in the developing and adult rat brain. *Neuroscience* 69:167–176.
- Klapstein GJ, Meldrum BS, Mody I (1999) Decreased sensitivity to group III mGluR agonists in the lateral perforant path following kindling. *Neuropharmacology* 38:927–933.
- Koerner JF, Cotman CW (1981) Micromolar L-2-amino-4-phosphonobutyric acid selectively inhibits perforant path synapses from lateral entorhinal cortex. *Brain Res* 216:192–198.
- Kosobud AE, Cross SJ, Crabbe JC (1992) Neural sensitivity to pentylenetetrazol convulsions in inbred and selectively bred mice. *Brain Res* 592:122–128.
- Lanthorn TH, Ganong AH, Cotman CW (1984) 2-Amino-4-phosphonobutyrate selectively blocks mossy fiber-CA3 responses in guinea pig but not rat hippocampus. *Brain Res* 290:174–178.
- Liu AA, Becker A, Behle K, Beck H, Maltschek B, Conn PJ, Kuhn R, Nitsch R, Plaschke M, Schramm J, Elger CE, Wiestler OD, Blumcke I (2000) Up-regulation of the metabotropic glutamate receptor mGluR4 in hippocampal neurons with reduced seizure vulnerability. *Ann Neurol* 47:26–35.
- Lu Y-M, Jia Z, Janus C, Henderson JT, Gerlai R, Wojtowicz JM, Roder JC (1997) Mice lacking metabotropic glutamate receptor 5 show impaired learning and reduced CA1 long-term potentiation (LTP) but normal CA3 LTP. *J Neurosci* 17:5196–5205.
- Manzoni O, Bockaert J (1995) Metabotropic glutamate receptors inhibiting excitatory synapses in the CA1 area of rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 7:2518–2523.
- Markram H, Lübke J, Frotscher M, Roth A, Sakmann B (1997) Physiology and anatomy of synaptic connections between thick-tufted pyramidal neurons in the developing rat neocortex. *J Physiol (Lond)* 500:409–440.
- Masu M, Iwakabe H, Tagawa Y, Miyoshi T, Yamashita M, Fukuda Y, Sasaki H, Hiroi K, Nakamura Y, Shigemoto R (1995) Specific deficit of the ON response in visual transmission by targeted disruption of the mGluR6 gene. *Cell* 80:757–765.
- Masugi M, Yokoi M, Shigemoto R, Muguruma K, Watanabe Y, Sansig G, van der Putten H, Nakanishi S (1999) Metabotropic glutamate receptor subtype 7 ablation causes deficit in fear response and taste aversion. *J Neurosci* 19:955–963.
- McLean MJ, Macdonald RL (1986) Sodium valproate, but not ethosuximide, produces use- and voltage-dependent limitation of high frequency repetitive firing of action potentials of mouse central neurons in cell culture. *J Pharmacol Exp Ther* 237:1001–1011.
- McNamara JO, Puranam RS (1998) Epilepsy genetics: an abundance of riches for biologists. *Curr Biol* 8:R168–R170.
- Nakajima Y, Iwakabe H, Akazawa C, Nawa H, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S (1993) Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-phosphonobutyrate. *J Biol Chem* 268:11868–11873.
- Nakajima Y, Yamamoto T, Nakayama T, Nakanishi S (1999) A relationship between protein kinase C phosphorylation and calmodulin binding to the metabotropic glutamate receptor subtype 7. *J Biol Chem* 274:27573–27577.
- Neugebauer V, Keele NB, Shinnick-Gallagher P (1997) Loss of long-lasting potentiation mediated by group III mGluRs in amygdala neurons in kindling-induced epileptogenesis. *J Neurophysiol* 78:3475–3478.
- Neugebauer V, Zinebi F, Russell R, Gallagher JP, Shinnick-Gallagher P (2000) Cocaine and kindling alter the sensitivity to group II and III metabotropic glutamate receptors in the central amygdala. *J Neurophysiol* 84:759–770.
- O'Connor V, El Far O, Bofill-Cardona E, Nanoff C, Freissmuth M, Karschin A, Airas JM, Betz H, Boehm S (1999) Calmodulin dependence of presynaptic metabotropic glutamate receptor signaling. *Science* 286:1180–1184.
- Ohishi H, Akazawa C, Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno NJ (1995) Distributions of the mRNAs for L-2-amino-4-phosphonobutyrate-sensitive metabotropic glutamate receptors, mGluR4 and mGluR7, in the rat brain. *J Comp Neurol* 360:555–570.
- Okamoto N, Hori S, Akazawa C, Hayashi Y, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S (1994) Molecular characterization of a new metabotropic glutamate receptor mGluR7 coupled to inhibitory cyclic AMP signal transduction. *J Biol Chem* 269:1231–1236.
- Pekhletski R, Gerlai R, Overstreet LS, Huang XP, Agopyan N, Slater NT, Abramow-Newerly W, Roder JC, Hampson DR (1996) Impaired cerebellar synaptic plasticity and motor performance in mice lacking the mGluR4 subtype of metabotropic receptor. *J Neurosci* 16:6364–6373.
- Perroy J, Prezeau L, De Waard M, Shigemoto R, Bockaert J, Fagni L (2000) Selective blockade of P/Q-type calcium channels by the metabotropic glutamate receptor type 7 involves a phospholipase C pathway in neurons. *J Neurosci* 20:7896–7904.
- Pisani A, Calabresi P, Centonze D, Bernardi G (1997) Activation of group III metabotropic glutamate receptors depresses glutamatergic transmission at corticostriatal synapse. *Neuropharmacology* 36:845–851.
- Prosser HM, Gill GH, Hirst WD, Grau E, Robbins M, Calver A, Soffin EM, Farmer CE, Lanneau C, Gray J, Schenck E, Warmerdam BS, Clapham C, Reavill C, Rogers DC, Stean T, Upton N, Humphreys K, Randall A, Geppert M, Davies CH, Pangalos MN (2001) Epileptogenesis and enhanced prepulse inhibition in GABA_{B1}-deficient mice. *Mol Cell Neurosci* 17:1059–1070.
- Reyes A, Lujan R, Rosov A, Burnashev N, Somogyi P, Sakmann B (1998) Target cell-specific facilitation and depression in neocortical circuits. *Nat Neurosci* 1:279–285.
- Rogawski MA, Porter RJ (1990) Antiepileptic drugs: pharmacological mechanisms and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds. *Pharmacol Rev* 42:223–286.
- Rosahl TW, Spillane D, Missler M, Herz J, Selig DK, Wolff JR, Hammer RE, Malenka RC, Sudhof TC (1995) Essential functions of synapsin I and II in synaptic vesicles. *Nature* 375:488–493.
- Rozov A, Burnashev N, Sakmann B, Neher E (2001) Transmitter release modulation by intracellular Ca²⁺ buffers in facilitating and depressing nerve terminals of pyramidal cells in layer 2/3 of the rat neocortex indicates a target cell-specific difference in presynaptic calcium dynamics. *J Physiol (Lond)* 531:807–826.
- Salt TE, Eaton SA (1995) Modulation of sensory neurone excitatory and inhibitory responses in the ventrobasal thalamus by activation of metabotropic excitatory amino acid receptors. *Neuropharmacology* 34:1043–1051.
- Saugstad JA, Kinzie JM, Milvihiill ER, Segerson TP, Westbrook GL (1994) Cloning and expression of a new member of the L-2-amino-4-phosphonobutyrate acid-sensitive class of metabotropic glutamate receptors. *Mol Pharmacol* 45:367–372.
- Saugstad JA, Segerson TP, Westbrook GL (1996) Metabotropic glutamate receptors activate G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci* 16:5979–5985.
- Schmutz M, Portet C, Jeker A, Klebs K, Vassout A, Allgeier H, Heckendorf R, Fagg GE, Olpe HR, van Riesen H (1990) The competitive NMDA receptor antagonists CGP37849 and CGP39551 are potent, orally active anti-convulsants in rodents. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 342:61–66.
- Schuler V, Lüscher C, Blanchet C, Klix N, Sansig G, Klebs K, Schmutz M, Heid J, Gentry C, Urban L, Fox A, Jaton A-L, Vigouret J-M, Pozza M, Kelly PH, Mosbacher J, Froestl W, Käslein E, Korn R, Bischoff S, Kaupmann K, van der Putten H, Bettler B (2001) Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA_B responses in mice lacking GABA_{B1}. *Neuron* 31:1–12.
- Semyanov A, Kullmann D (2000) Modulation of GABAergic signaling among interneurons by metabotropic glutamate receptors. *Neuron* 25:663–672.
- Shigemoto R, Kulik A, Roberts JDB, Ohishi H, Nusser Z, Kaneko T, Somogyi P (1996) Target cell-specific concentration of a metabotropic glutamate receptor in the presynaptic active zone. *Nature* 381:523–525.
- Shigemoto R, Kinoshita A, Wada E, Nomura S, Ohishi H, Takada M, Flor PJ, Neki A, Abe T, Nakanishi S, Mizuno N (1997) Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J Neurosci* 17:7503–7522.
- Snead III OC, Banerjee PK, Burnham M, Hampson D (2000) Modulation of absence seizures by the GABA_A receptor: a critical role for metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4). *J Neurosci* 20:6218–6224.

- Stuart GJ, Dodt HU, Sakmann B (1993) Patch clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared video microscopy. *Pflügers Arch* 423:511–518.
- Suzuki T, Shimizu N, Tsuda M, Soma M, Misawa M (1999) Role of metabotropic glutamate receptors in the hypersusceptibility to pentylenetetrazole-induced seizures during diazepam withdrawal. *Eur J Pharmacol* 369:163–168.
- Tang E, Yip PK, Chapman AG, Jane DE, Meldrum BS (1997) Prolonged anticonvulsant action of glutamate metabotropic receptor agonists in inferior colliculus of genetically epilepsy-prone rats. *Eur J Pharmacol* 327:109–115.
- Thomsen C, Dalby NO (1998) Roles of glutamate receptor subtypes in modulation of pentylenetetrazole-induced seizure activity in mice. *Neuropharmacology* 37:1465–1473.
- Thomson AM (2000) Molecular frequency filters at central synapses. *Prog Neurobiol* 62:159–196.
- Tizzano JP, Griffey KI, Schoepp DD (1995) Receptor subtypes linked to metabotropic glutamate receptor agonist-mediated limbic seizures in mice. *Ann NY Acad Sci* 765:230–235.
- Van Erp MG, Van Dongen AM, Van den Berg RJ (1990) Voltage-dependent action of valproate on potassium channels in frog node of Ranvier. *Eur J Pharmacol* 184:151–161.
- Vignes M, Clarke VR, Davies CH, Chambers A, Jane DE, Watkins JC, Collingridge GL (1995) Pharmacological evidence for an involvement of group II and group III mGluRs in the presynaptic regulation of excitatory synaptic responses in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Neuropharmacology* 34:973–982.
- Wan H, Cahusac PM (1995) The effects of L-AP4 and L-serine-O-phosphate on inhibition in primary somatosensory cortex of the adult rat in vivo. *Neuropharmacology* 34:1053–1062.
- White HS (1997) Clinical significance of animal seizure models and mechanism of action studies of potential antiepileptic drugs. *Epilepsia* 38[Suppl 1]:S9–S17.
- Wong RK, Traub RD (1983) Synchronized burst discharge in disinhibited hippocampal slice. I. Initiation in CA2–CA3 region. *J Neurophysiol* 49:442–458.
- Yip PK, Meldrum BS, Rattay M (2001) Elevated levels of group III metabotropic glutamate receptors in the inferior colliculus of genetically epilepsy-prone rats following intracollicular administration of L-serine-O-phosphate. *J Neurochem* 78:13–23.
- Yokoi M, Kobayashi K, Manabe T, Takahashi T, Sakaguchi I, Katsuura G, Shigemoto R, Ohishi H, Nomura S, Nakamura K, Nakao K, Katsuki M, Nakanishi S (1996) Impairment of hippocampal mossy fiber LTD in mice lacking mGluR2. *Science* 273:645–647.
- Zenisek D, Matthews G (2000) The role of mitochondria in presynaptic calcium handling at a ribbon synapse. *Neuron* 25:229–237.
- Zona C, Avoli M (1990) Effects induced by the antiepileptic drug valproic acid upon the ionic currents recorded in rat neocortical neurons in cell culture. *Exp Brain Res* 81:313–317.
- Zucker RS (1994) Calcium and short-term synaptic plasticity. *Neth J Zool* 44:495–512.

Altered Short-Term Synaptic Plasticity in Mice Lacking the Metabotropic Glutamate Receptor mGlu7

Trevor J. Bushell^{1,2}, Gilles Sansig³, Valerie J. Collett¹, Herman van der Putten³, and Graham L. Collingridge^{1,*}

¹MRC Centre for Synaptic Plasticity, Department of Anatomy, The School of Medical Sciences, University of Bristol, University Walk, Bristol, BS8 1TD, U.K.; ²Biophysics Section, Blackett Laboratory, Department of Biological Sciences, Imperial College of Science, Technology and Medicine, Prince Consort Road, London, SW7 2BW, U.K.; ³Nervous System Department, Novartis Pharma AG, CH-4002 Basel, Switzerland

Received November 15, 2001; Revised January 24, 2002; Accepted January 29, 2002; Published March 15, 2002

Eight subtypes of metabotropic glutamate (mGlu) receptors have been identified of which two, mGlu5 and mGlu7, are highly expressed at synapses made between CA3 and CA1 pyramidal neurons in the hippocampus. This input, the Schaffer collateral-commissural pathway, displays robust long-term potentiation (LTP), a process believed to utilise molecular mechanisms that are key processes involved in the synaptic basis of learning and memory. To investigate the possible function in LTP of mGlu7 receptors, a subtype for which no specific antagonists exist, we generated a mouse lacking this receptor, by homologous recombination. We found that LTP could be induced in mGlu7^{-/-} mice and that once the potentiation had reached a stable level there was no difference in the magnitude of LTP between mGlu7^{-/-} mice and their littermate controls. However, the initial decremental phase of LTP, known as short-term potentiation (STP), was greatly attenuated in the mGlu7^{-/-} mouse. In addition, there was less frequency facilitation during, and less post-tetanic potentiation following, a high frequency train in the mGlu7^{-/-} mouse. These results show that the absence of mGlu7 receptors results in alterations in short-term synaptic plasticity in the hippocampus.

KEY WORDS: mGluR7, mGlu7 receptor, metabotropic glutamate receptor, hippocampus, hippocampal, CA1, Schaffer collateral-commissural pathway, synaptic transmission, synaptic plasticity, long-term potentiation, short-term potentiation, LTP, STP, knockout, homologous recombination

DOMAINS: cognition, genetics (mouse), higher level brain function, intercellular communication, learning and memory, neuroscience, signalling, molecular biology, molecular engineering, molecular pharmacology, trans membrane signaling

*Corresponding author. Email: t.bushell@ic.ac.uk; gilles.sansig@pharma.novartis.com; V.J.Collett@Bris.ac.uk; p_herman_van_der_putten@pharma.novartis.com; G.L.Collingridge@Bris.ac.uk
©2002 with author.

INTRODUCTION

It is widely believed that synaptic plasticity is the primary mechanism utilised by the brain to enable the acquisition and storage of information. Most information concerning the molecular and cellular basis of synaptic plasticity has been derived from studies of long-term potentiation (LTP) in the hippocampus[1,2,3]. LTP is an increase in synaptic efficiency that is induced within a minute and lasts for many hours or days. In most hippocampal pathways, such as the Schaffer collateral-commissural inputs from CA3 to CA1 neurons, the induction of LTP requires the transient synaptic activation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors[1,2,3]. This results in a persistent increase in the amplitude of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) and NMDA receptor-mediated synaptic transmission. The mechanisms that are involved following the activation of NMDA receptors, to result in the long-lasting increase in synaptic efficiency, are not fully understood but are the subject of intense investigation[4,5,6,7]. In addition to NMDA receptors, there is considerable evidence that mGlu receptors are also involved in the induction of LTP, under certain circumstances. The most direct evidence comes from studies using the mGlu receptor antagonist α -methyl-4-carboxyphenylglycine (MCPG), which has been shown to block the induction of LTP under some[8,9,10] but not all[10,11,12] conditions.

MCPG is a “broad spectrum” antagonist since it acts on several (mGlu1, mGlu2, mGlu3, mGlu5, and mGlu8) of the mGlu receptors subtypes (mGlu1-mGlu8) that have been identified by cloning[13]. Since the discovery of MCPG[14], there have been many more mGlu receptor antagonists developed, including some that are specific for a single mGlu receptor subtype[13](see also URL: <http://www.bris.ac.uk/Depts/Synaptic/info/pharmacology/mGlu.html>). However, potent subtype-specific mGlu receptor antagonists are still lacking for many of the mGlu receptor subtypes, in particular mGlu7. An alternative strategy to investigate the functional roles of mGlu receptors is to use homologous recombination gene targeting. This has the advantage of a highly specific elimination of the receptor of interest but the disadvantage of potential developmental compensation. Most of the members of the mGlu receptor family have been “knocked out” and the effects of the deletion on synaptic function investigated[15,16,17,18,19](see also URL: <http://www.bris.ac.uk/Depts/Synaptic/info/tools.html>). At CA1 synapses the two mGlu receptors that are expressed at the highest levels are mGlu5 and mGlu7[20,21,22,23]. Thus, these are the two most likely mGlu receptor subtypes to be involved in the induction of LTP at these synapses. Deletion of mGlu5 receptors prevents the induction of LTP of NMDA receptor-mediated synaptic transmission without affecting LTP of AMPA receptor-mediated synaptic transmission[24]. However, the function of mGlu7 receptors in synaptic plasticity at CA1 synapses is unknown.

We have generated an mGlu7 knockout[25]. Previously we have reported that this knockout results in deficits in taste aversion and fear responses[26] and a predisposition to epilepsy[25]. In the present study, we have compared LTP at CA1 synapses in this knockout. We find that LTP can be induced normally in the mGlu7 knockout. However, there is an impairment of the earliest phase of LTP, known as short-term potentiation (STP), and an impairment in both frequency facilitation and post-tetanic potentiation.

METHODS

Mice were generated by homologous recombination gene targeting as described previously[25]. Slices (400 μ m thick) were prepared from the hippocampi of 5–10 week old mutant mice and littermate wildtypes using standard procedures. The slices were submerged in a medium which comprised (mM): NaCl 124; KCl 3; NaHCO₃ 26; NaH₂PO₄ 1.4; MgSO₄ 1; CaCl₂ 2; D-glucose 10; (bubbled with 95% O₂/5% CO₂; pH 7.4), and were perfused at a rate of approximately 4 ml

min⁻¹ (29–31°C). Extracellular recordings were obtained from stratum radiatum of area CA1 in response to low frequency (0.033 Hz) stimulation of the Schaffer collateral-commissural pathway. Measurements of the slope of the field EPSP were used throughout. Tetanic stimulation (100 Hz, 1 s, test intensity) was delivered at the times indicated by arrows (Fig. 1a,b). Data acquisition and analysis was performed using the “LTP” program (URL: <http://www.ltp-program.com/>). For each protocol, one slice was used per animal, hence n values give the number of slices/mice used. Statistical significance was determined using a repeated measures ANOVA and unpaired Students t-tests. * Denotes $p < 0.05$. Animals were genotyped by PCR and presented to the experimenter in a randomised and blind manner.

RESULTS

We have reported previously that there are no obvious differences in basal synaptic properties in the CA1 region of hippocampal slices[25]. We applied a single tetanus (100 Hz, 1 s, test intensity) to mGlu7 receptor knockouts (n = 12) and littermate controls (n = 14). The level of LTP, measured at 60 min following tetanic stimulation, was not significantly different between groups (Fig. 1). However, the initial phase of potentiation, which is commonly referred to as STP, was markedly reduced in the mutant mice. For example, the initial measure of potentiation, obtained between 0.5 and 2 min, for the respective groups was $89 \pm 15\%$ and $163 \pm 21\%$ ($p < 0.01$) and the differences remained statistically different for 16 min following tetanic stimulation (Fig. 1).

To determine whether there were differences in the synaptic responses during, and shortly following, high frequency transmission in the two groups of mice a second set of experiments were performed. In these experiments, LTP was firstly saturated by applying multiple tetani, so that high frequency responses could be analysed without the complications of the induction of LTP or the presence of pharmacological antagonists. Twenty shocks delivered at 100 Hz were followed by a test pulse delivered either 50 or 500 ms later. During the high frequency train, the size of individual AMPA receptor-mediated EPSPs increased and then decreased in both groups. However, from approximately 30–40 ms into the train, the EPSPs were smaller, relative to the first EPSP of the train, in the mutant mice (Fig. 2). The post-tetanic response, assessed as the ratio of the test EPSP to the first EPSP in the train, was also reduced in the mutant mice (Fig. 2); the ratios obtained, using respective interpulse intervals of 50 and 500 ms, were 2.16 ± 0.01 and 0.88 ± 0.07 for wild-type (n = 8) and 1.43 ± 0.11 and 0.65 ± 0.05 for mutant (n = 8) mice ($p < 0.05$). In addition to changes in EPSPs, there was also a reduction in the size of the summated IPSPs during and following the train in mutant mice (Fig. 2).

DISCUSSION

In the present study we have identified differences in the response to high frequency stimulation between mGlu7 knockout mice and their wildtype littermates. The absence of mGlu7 receptors was associated with a depression in synaptic transmission during and following the high frequency train and a reduction in STP.

Although these effects can be attributed to the absence of mGlu7 receptors it is not possible to determine whether it is the acute loss of these receptors or a consequence of their absence during development that leads to these alterations in synaptic transmission and plasticity. This will require the development of conditional mGlu7 receptor knockout mice or specific mGlu7 receptor antagonists. However, some discussion of this issue is warranted. Although there are currently no selective mGlu7 receptor antagonists, compounds that inhibit mGlu7 receptors together with other mGlu receptor subtypes do exist. The most potent of these is LY341495, with

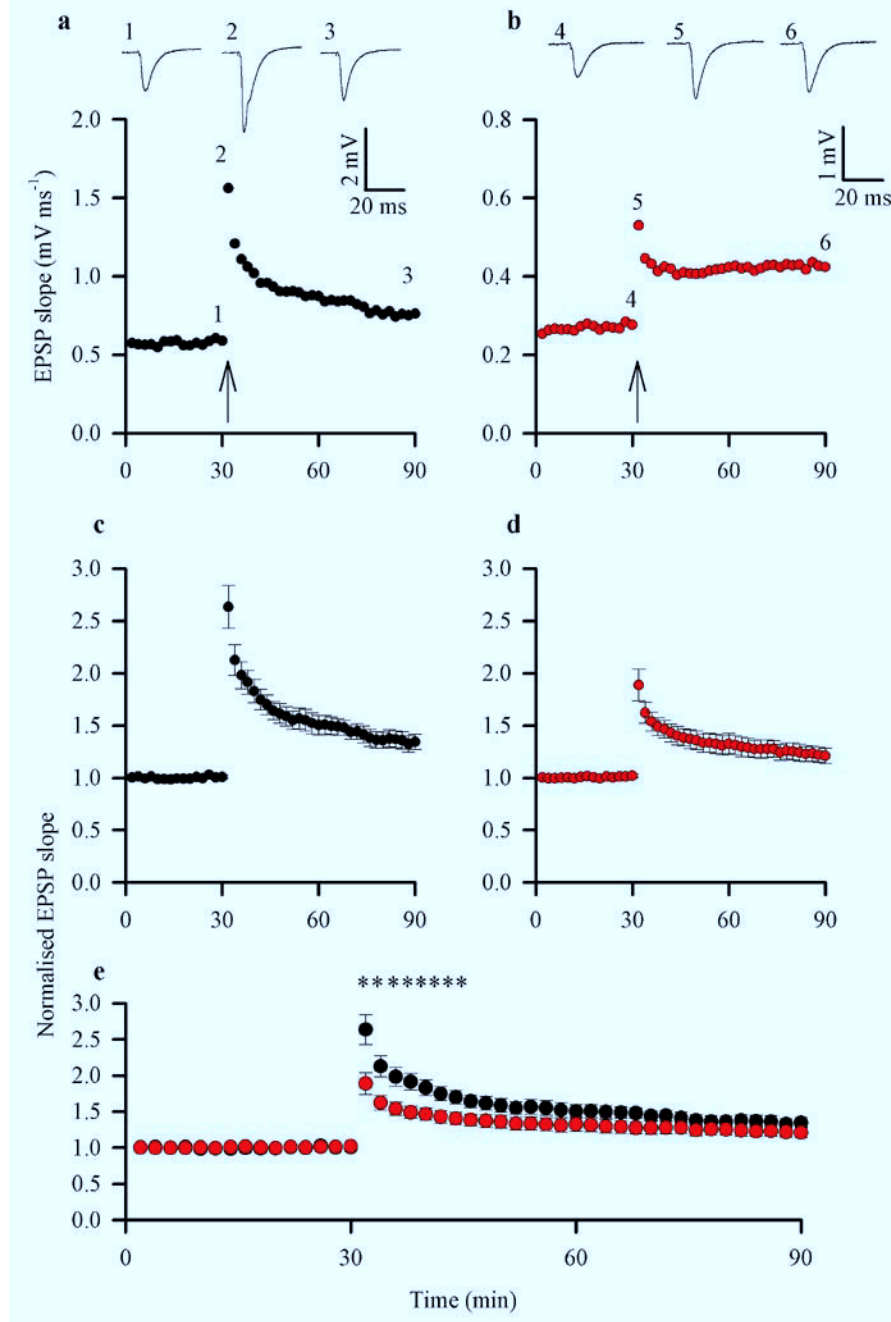


FIGURE 1. STP is reduced in mGlu7 knockout mice. Representative examples of individual experiments are shown for wildtype (a) and mGlu7 knockout (b) mice. The corresponding pooled data for 14 slices from wildtype (c) and 12 slices from mGlu7 knockout (d) mice are superimposed (e) to illustrate the extent of the deficit in STP.

an IC₅₀ of approximately 1 μ M[27] at mGlu7 receptors. LY341495 (100 μ M) does not affect STP or LTP at CA1 synapses[28]. This suggests that either the effects observed with the mGlu7 knockout are developmental in origin or that the effects of LY341495 on mGlu7 receptors is compensated for by the simultaneous antagonism of other mGlu receptor subtypes.

If the alterations in the mGlu7 receptor knockout are due to the acute loss of receptor (i.e., would be mimicked by a specific mGluR receptor antagonist) the implication is that mGlu7

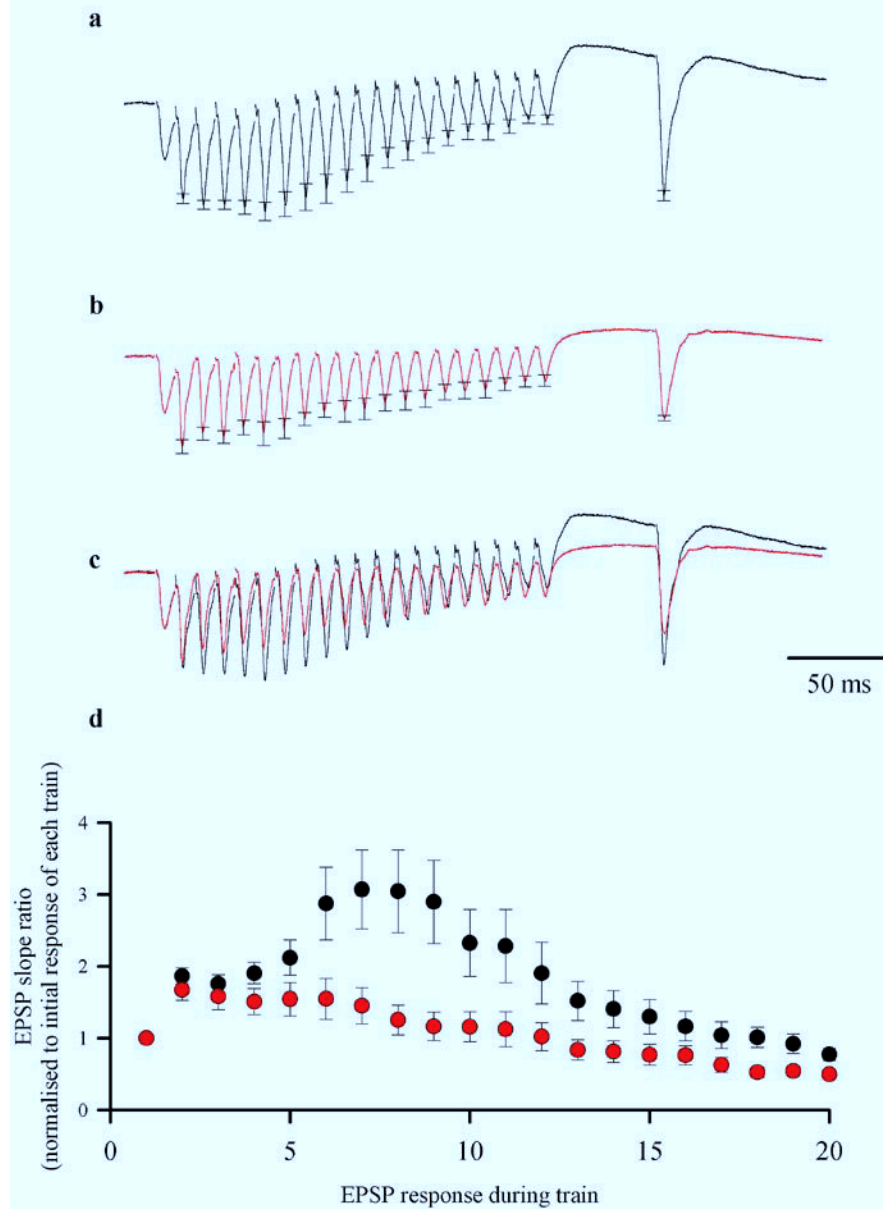


FIGURE 2. High frequency synaptic transmission is reduced in mGlu7 knockout mice. Pooled traces illustrating reduced AMPA receptor-mediated EPSPs during the train and in response to the test pulse for 8 slices from wildtype (a) and 8 slices from mGlu7 knockout (b) mice. The ratio of each EPSP in relation to the initial response of each train is shown superimposed (c).

receptors function as facilitatory autoreceptors at these synapses. Their well-established presynaptic location[21,29] close to release sites[21], together with their low affinity for L-glutamate, makes them ideally placed to function as autoreceptors. How their activation could lead to enhanced L-glutamate release is a matter for speculation. One possibility, based on work using retinal horizontal cells, is via stimulation of guanylyl cyclase, elevation of cGMP and inhibition of potassium channels[30].

The alterations in the activation of AMPA and GABA receptors during the high frequency train means that it is likely that the level of activation of NMDA receptors was also different[1]. Presumably, in both sets of mice there was sufficient synaptic activation of NMDA receptors for

LTP to be induced normally. However it is possible that with different patterns of activation, such as those closer to the threshold for LTP induction, differences in LTP might be observed.

An interesting observation, under the conditions of the present experiments, is that the stable level of LTP generated was not directly related to the initial level of STP. Treatments that affect tetanus-induced synaptic potentiation generally either depress STP and LTP in parallel or, like many protein kinase inhibitors and targeted deletions of protein kinase genes, selectively block LTP[31,32,33,34,35,36]. This has led to the belief that STP and LTP are serial processes where STP is required for, but does not necessarily lead to, LTP[37,38]. The present results suggest, however, that the level of STP can be regulated independently of the level of stable LTP.

In conclusion, our experiments suggest that mGlu7 receptors influence high frequency synaptic transmission and short-term synaptic plasticity in the hippocampus.

ACKNOWLEDGEMENTS

Supported by the MRC.

REFERENCES

1. Bliss, T.V. and Collingridge, G.L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**, 31–39.
2. Kullmann, D.M., Asztely, F., and Walker, M.C. (2000) The role of mammalian ionotropic receptors in synaptic plasticity: LTP, LTD and epilepsy. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 1551–1561.
3. Luscher, C., Nicoll, R.A., Malenka, R.C., and Muller, D. (2000) Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane. *Nat. Neurosci.* **3**, 545–550.
4. Sanes, J.R. and Lichtman, J.W. (2000) Can molecules explain long-term potentiation? *Nat. Neurosci.* **2**, 597–604.
5. Gnegy, M.E. (2000) Ca^{2+} /calmodulin signaling in NMDA-induced synaptic plasticity. *Crit. Rev. Neurobiol.* **14**, 91–129.
6. MacDonald, J.F., Kotecha, S.A., Lu, W.Y., and Jackson, M.F. (2001) Convergence of PKC-dependent kinase signal cascades on NMDA receptors. *Curr. Drug Targets* **2**, 299–312.
7. Winder, D.G. and Schramm, N.L. (2001) Plasticity and behavior. New genetic techniques to address multiple forms and functions. *Physiol. Behav.* **73**, 763–780.
8. Bashir, Z.I., Bortolotto, Z.A., Davies, C.H., Berretta, N., Irving, A.J., Seal, A.J., Henley, J.M., Jane, D.E., Watkins, J.C., and Collingridge, G.L. (1993) Induction of LTP in the hippocampus needs synaptic activation of glutamate metabotropic receptors. *Nature* **363**, 347–350.
9. Sergueeva, O.A., Fedorov, N.B., and Reymann, K.G. (1993) An antagonist of glutamate metabotropic receptors, (RS)-alpha-methyl-4-carboxyphenylglycine, prevents the LTP-related increase in postsynaptic AMPA sensitivity in hippocampal slices. *Neuropharmacology* **32**, 933–935.
10. Bortolotto, Z.A., Bashir, Z.I., Davies, C.H., and Collingridge, G.L. (1994) A molecular switch activated by metabotropic glutamate receptors regulates induction of long-term potentiation. *Nature* **368**, 740–743.
11. Selig, D.K., Lee, H.K., Bear, M.F., and Malenka, R.C. (1995) Reexamination of the effects of MCPG on hippocampal LTP, LTD, and depotentiation. *J. Neurophysiol.* **74**, 1075–1082.
12. Thomas, M.J. and O'Dell, T.J. (1995) The molecular switch hypothesis fails to explain the inconsistent effects of the metabotropic glutamate receptor antagonist MCPG on long-term potentiation. *Brain Res.* **695**, 45–52.
13. Schoepp, D.D., Jane, D.E., and Monn, J.A. (1999) Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* **38**, 1431–1476.
14. Eaton, S.A., Jane, D.E., Jones, P.L., Porter, R.H., Pook, P.C., Sunter, D.C., Udvarhelyi, P.M., Roberts, P.J., Salt, T.E., and Watkins, J.C. (1993) Competitive antagonism at metabotropic glutamate receptors by (S)-4-carboxyphenylglycine and (RS)-alpha-methyl-4-carboxyphenylglycine. *Eur. J. Pharmacol.* **244**, 195–197.
15. Aiba, A., Chen, C., Herrup, K., Rosenmund, C., Stevens, C.F., and Tonegawa, S. (1994) Reduced hippocampal long-term potentiation and context-specific deficit in associative learning in mGluR1 mutant mice. *Cell* **79**, 365–375.
16. Conquet, F., Bashir, Z.I., Davies, C.H., Daniel, H., Ferraguti, F., Bordi, F., Franz-Bacon, K., Reggiani, A., Matarrese, V., Conde, F., Collingridge, G.L., and Crepel, F. (1994) Motor deficit and impairment of synaptic plasticity in mice lacking mGluR1. *Nature* **372**, 237–243.

17. Pekhletski, R., Gerlai, R., Overstreet, L.S., Huang, X.P., Agopyan, N., Slater, N.T., Abramow-Newerly, W., Roder, J.C., and Hampson, D.R. (1996) Impaired cerebellar synaptic plasticity and motor performance in mice lacking the mGluR4 subtype of metabotropic glutamate receptor. *J. Neurosci.* **16**, 6364–6373.
18. Yokoi, M., Kobayashi, K., Manabe, T., Takahashi, T., Sakaguchi, I., Katsuura, G., Shigemoto, R., Ohishi, H., Nomura, S., Nakamura, K., Nakao, K., Katsuki, M., and Nakanishi, S. (1996) Impairment of hippocampal mossy fiber LTD in mice lacking mGluR2. *Science* **273**, 645–647.
19. Lu, Y.M., Jia, Z., Janus, C., Henderson, J.T., Gerlai, R., Wojtowicz, J.M., and Roder, J.C. (1997) Mice lacking metabotropic glutamate receptor 5 show impaired learning and reduced CA1 long-term potentiation (LTP) but normal CA3 LTP. *J. Neurosci.* **17**, 5196–5205.
20. Shigemoto, R., Nomura, S., Ohishi, H., Sugihara, H., Nakanishi, S., and Mizuno, N. (1993) Immunohistochemical localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR5, in the rat brain. *Neurosci. Lett.* **163**, 53–57.
21. Shigemoto, R., Kulik, A., Roberts, J.D., Ohishi, H., Nusser, Z., Kaneko, T., and Somogyi, P. (1996) Target-cell-specific concentration of a metabotropic glutamate receptor in the presynaptic active zone. *Nature* **381**, 523–525.
22. Shigemoto, R., Kinoshita, A., Wada, E., Nomura, S., Ohishi, H., Takada, M., Flor, P.J., Neki, A., Abe, T., Nakanishi, S., and Mizuno, N. (1997) Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* **17**, 7503–7522.
23. Lujan, R., Nusser, Z., Roberts, J.D., Shigemoto, R., and Somogyi, P. (1996) Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* **8**, 1488–1500.
24. Jia, Z., Lu, Y., Henderson, J., Taverna, F., Romano, C., Abramow-Newerly, W., Wojtowicz, J.M., and Roder, J. (1998) Selective abolition of the NMDA component of long-term potentiation in mice lacking mGluR5. *Learning Memory* **5**, 331–343.
25. Sansig, G., Bushell, T.J., Clarke, V.R.J., Rozov, A., Burnashev, N., Portet, C., Gasparini, F., Schmutz, M., Klebs, K., Shigemoto, R., Flor, P.J., Kuhn, R., Knoepfel, T., Schroeder, M., Hampson, D.R., Collett, V.J., Zhang, C., Duvoisin, R.M., Collingridge, G.L., and van der Putten, H. Increased seizure-susceptibility in mice lacking the metabotropic glutamate receptor mGluR7. *J. Neurosci.* **21**, 8734–8745.
26. Masugi, M., Yokoi, M., Shigemoto, R., Muguruma, K., Watanabe, Y., Sansig, G., van der Putten, H., and Nakanishi, S. (1999) Metabotropic glutamate receptor subtype 7 ablation causes deficit in fear response and conditioned taste aversion. *J. Neurosci.* **19**, 955–963.
27. Kingston, A.E., Ornstein, P.L., Wright, R.A., Johnson, B.G., Mayne, N.G., Burnett, J.P., Belagaje, R., Wu, S., and Schoepp, D.D. (1998) LY341495 is a nanomolar potent and selective antagonist of group II metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* **37**, 1–12.
28. Fitzjohn, S.M., Bortolotto, Z.A., Palmer, M.J., Doherty, A.J., Ornstein, P.L., Schoepp, D.D., Kingston, A.E., Lodge, D., and Collingridge, G.L. (1998) The potent mGlu receptor antagonist LY341495 identifies roles for both cloned and novel mGlu receptors in hippocampal synaptic plasticity. *Neuropharmacology* **37**, 1445–1458.
29. Bradley, S., Levey, A.I., Hersch, S.M., and Conn, P.J. (1996) Immunocytochemical localization of group III metabotropic glutamate receptors in the hippocampus with subtype-specific antibodies. *J. Neurosci.* **16**, 2044–2056.
30. Dixon, D.B. and Copenhagen, D.R. (1997) Metabotropic glutamate receptor-mediated suppression of an inward rectifier current is linked via a cGMP cascade. *J. Neurosci.* **17**, 8945–8954.
31. Lovinger, D.M., Wong, K.L., Murakami, K., and Routtenberg, A. (1987) Protein kinase C inhibitors eliminate hippocampal long-term potentiation. *Brain Res.* **436**, 177–183.
32. Reymann, K.G., Brodemann, R., Kase, H., and Matthies, H. (1988) Inhibitors of calmodulin and protein kinase C block different phases of hippocampal long-term potentiation. *Brain Res.* **461**, 388–392.
33. Malenka, R.C., Kauer, J.A., Perkel, D.J., Mauk, M.D., Kelly, P.T., Nicoll, R.A., and Waxham, M.N. (1989) An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature* **340**, 554–557.
34. Malinow, R., Schulman, H., and Tsien, R.W. (1989) Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* **245**, 862–866.
35. Grant, S.G.N., O'Dell, T.J., Karl, K.A., Stein, P.L., Soriano, P., and Kandel, E.R. (1992) Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in *fyn* mutant mice. *Science* **258**, 1903–1910.
36. Silva, A.J., Stevens, C.F., Tonegawa, S., and Wang, Y. (1992) Deficient hippocampal long-term potentiation in a-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* **257**, 201–206.
37. Hanse, E. and Gustaffson, B. (1994) Onset and stabilization of NMDA receptor-dependent hippocampal long-term potentiation. *Neurosci. Res.* **20**, 15–25.
38. Hanse, E. and Gustaffson, B. (1994) Staurosporine impairs both short-term and long-term potentiation in the dentate gyrus *in vitro*. *Neuroscience* **58**, 263–274.

This article should be referenced as follows:

Bushell, T.J., Sansig, G., Collett, V.J., van der Putten, H., and Collingridge, G.L. (2002) Altered short-term synaptic plasticity in mice lacking the metabotropic glutamate receptor mGlu7. *TheScientificWorldJOURNAL* **2**, 730–737.

Handling Editor:

Joseph LeDoux, Principal Editor for *Learning and Memory* — a domain of *TheScientificWorldJOURNAL*.

Research report

Lack of the metabotropic glutamate receptor subtype 7 selectively impairs short-term working memory but not long-term memory

Christian Hölscher^{a,*}, Susanne Schmid^b, Peter K.D. Pilz^b, Gilles Sansig^c,
Herman van der Putten^c, Claudia F. Plappert^b^a Department of Cognitive Neuroscience, University of Tübingen, Auf der Morgenstelle 28, Germany^b Zoologisches Institut, University of Tübingen, Auf der Morgenstelle 28, Germany^c Novartis Pharma AG, Nervous System Department, 4002 Basel, Switzerland

Received 4 March 2004; received in revised form 19 March 2004; accepted 19 March 2004

Available online 27 April 2004

Abstract

Metabotropic glutamate receptors (mGluRs), and in particular the mGluR group III receptors (subtypes 4, 6, 7, 8) are known to play a role in synaptic plasticity and learning. Here, we report the effect of mGluR7 gene ablation in different learning paradigms. In the acoustic startle response (ASR), no differences were seen between knockout (KO) mice and wildtype (WT) littermates in parameters including prepulse inhibition and habituation. In an open field test, no differences were seen between genotypes in motor activity, exploratory behaviour, and fearful behaviour. In a T-maze reinforced alternation working memory (WM) task, again no difference was seen between groups. However, when increasing the demands on working-memory in a 4-arm and 8-arm maze task, KO mice committed more WM errors than WT littermates thereby uncovering a highly significant difference between the two groups that persisted every day for the whole 9 days of the experiment. In a 4-arm maze with 2 arms baited, KO and wildtype mice committed the same number of LTM errors, whereas KOs committed more WM errors. Altogether, these findings suggest that a lack of mGluR7 mainly impairs short-term working but not long-term memory performance while having no effect on sensorimotor processing, non-associative learning, motor activity and spatial orientation. The effects on WM are task-dependent and become apparent in more complex but not simple learning tasks. We discuss how mGluR7 could influence WM. © 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Transgenic; Knock-out; Mice; Synaptic plasticity; mGluR; Learning; Startle; Spatial

1. Introduction

Metabotropic glutamate receptors (mGluRs) are a family of glutamate-sensitive receptors that are coupled to intracellular signal transduction via G-proteins [32]. mGluRs play important roles in the regulation of CNS synaptic plasticity [1,36,17], and also in some processes of memory formation [37,23].

Eight different mGluR subtypes have been identified so far and these are classified into three groups according to sequence identity, agonist selectivity and signal transduction mechanism [39,40]. Pharmacological blockade of mGluR group III receptors (subtypes 4, 6, 7, 8) was shown to have profound effects on the induction of synaptic plasticity [31,26], synaptic depression [46], and spatial learning

[19,18]. However, it has remained difficult to assign selective and specific roles and individual contributions of each of the different group III mGluR subtypes to synaptic plasticity as well as behavioural (e.g. learning and memory components) because of a lack of selective pharmacological tools.

To this end we and other have generated mice lacking only a single subtype of each of the three group III mGluRs. These mice provide insight into the physiological role of each group III mGluR in synaptic transmission as well as their possible role in anxiety, memory, and other complex brain functions.

In this study we report on a role of mGluR7 in working memory. There is some evidence from earlier work that suggests a role in mechanisms of learning and memory. For instance, mGluR7 KO mice have a reduced freezing response to electric footshock and changed conditioned taste aversion [27]. Also, the receptor is distributed widely throughout the CNS and occurs in areas that are vital for learning and memory such as the hippocampus, the entorhinal cor-

* Corresponding author. Tel.: +49-7071-2974604;
fax: +49-7071-292891.

E-mail address: christian.hoelscher@uni-tuebingen.de (C. Hölscher).

tex, the peri-amygdaloid cortex and layer 1 of the neocortex [24,22]. Here we expand on the role of mGluR7 in learning and memory. We show that mGluR7 deficient mice are not impaired in a non-associative habituation task. Despite earlier findings implying group III mGluRs in synaptic depression as it occurs in the primary startle circuit [46], we also show that sensorimotor processing is unimpaired in mGluR7 deficient mice by analysing operational measures including prepulse inhibition (PPI) of the Acoustic Startle Response (ASR, see e.g. [9,47]). PPI is evoked by a non-startling stimulus preceding the startle stimulus at specific time intervals (Plappert and Pilz, submitted) and changes in PPI would indicate impaired stimulus processing. Finally, we tested mGluR7 deficient mice in spatial tasks of different complexities (open field, T-maze, 4- and 8-arm maze) that require increased capacity of short-term working memory and/or normal long-term memory performance. We show a normal ability of mGluR7 KO mice to navigate in complex environments but deficits in learning and recall of the information during phases that require short-term working but not long-term memory performance.

2. Materials and methods

2.1. Generation of knock-out mice

The generation of mGluR7-deficient mice has been described elsewhere [38]. Part of the first coding exon comprising the 5' untranslated region and the first 164 amino acids of mGluR7 was replaced with the neomycin-resistance gene by homologous recombination in E14 (129/Ola) embryonic stem (ES) cells. Aggregation with properly targeted ES cell clones yielded germ-line chimeras that were crossed with C57BL/6 mice for 15 generations. Homozygous mGluR7^{-/-} and wild-type (+/+) mice were generated by mating F15,B6-backcross generation mice heterozygous (+/-) for the mGluR7 mutant gene and their gender-matched littermate offspring aged >12 weeks were used in the behavioural studies reported here. Animals were genotyped by PCR. All animals were trained in the different experiments in the order presented here.

2.2. Housing

Animals were housed individually in polyester cages with metal grid lids in temperature-regulated rooms (21 °C) with a 12-h light:12-h dark cycle. Animals were tested during the light cycle. Food pellets and water was available ad libitum. In experiments that involved food reward, animals were food deprived for 6 h before the start of each experiment. Food pellets used in the reward experiments were choco krispies (Kellogg's).

In the startle experiments, four groups were tested. Group 1: homozygous KO males, $n = 7$; group 2: homozygous KO females, $n = 8$; group 3: homozygous WT females, $n = 9$; group 4: homozygous WT males, $n = 12$.

2.3. Startle response

The startle response was measured in a "ballistic chamber" that was illuminated by a 9-W cold light bulb and was located inside a sound attenuating enclosure. The chamber consisted of a platform on which a wire mesh test cage (5 cm × 9 cm × 5 cm) could be fixed. The platform was mounted on piezo accelerometers. The voltage output of the accelerometer was first amplified and then filtered from 2 to 500 Hz (Electronic workshop, University of Tübingen, Germany, Piezo-Amp-System). The resulting voltage was sampled using an analog-to-digital converter card (Microstar data acquisition processor DAP 1200) installed in a computer. Startle amplitude was calculated as the difference between peak-to-peak voltage during a time window of 50 ms after stimulus onset and the peak-to-peak voltage taken 50 ms before stimulus onset.

Acoustic stimuli and steady background noise were generated by a computer using a digital signal processor board (SigGen, Medav, Uthenreuth, Germany) and delivered through a loudspeaker (HTH 8.7, Visaton, Haan, Germany) placed 35 cm from the test cage. The sound pressure level (SPL) within the cage was measured with a 0.5 inch condenser microphone (Bruel & Kjaer, Langen, Germany, model 4133) with a measuring amplifier (Bruel & Kjaer, model 2606). Startle stimuli were broad-band noise pulses with 20 ms duration and 0 ms rise/decay times. Prepulses had a frequency of 14 kHz. At this frequency range the hearing threshold of mice is lowest [10] and the hearing capability is therefore least subjected to possible age- or strain-related hearing loss that concerns mainly high frequencies. Their level in dB is given in SPL PEAK re. 0.02 mPa. Prepulses had a rise time of 0.4 ms in all cases. Prepulse duration was 20 ms if the prepulse preceded the startle stimulus by more than 20 ms, in which case the decay time of the prepulse was 0.4 ms. If the prepulse started less than 20 ms before the startle stimulus, it ended when the startle stimulus started with a decay time of 0 ms. The stimuli were superimposed on 33 dB SPL RMS ("root mean square") of broadband background noise, which was constant throughout the experiments. The experiments were performed in three identical experimental set-ups.

3. Procedure

3.1. Startle habituation

The mice were adapted to the experimental procedure on 3 consecutive days prior to the first experimental day by placing them into the test cage for 5 min. Testing began after an additional adaptation time of 5 min before stimulation and was performed on 5 consecutive days. The mice received 100 acoustic startle stimuli (110 dB SPL PEAK) per day. The interstimulus interval was 20 s. In six cases startle

amplitudes could not be registered due to a technical failure. The intersession interval for each animal was 1 day.

3.2. Startle PPI

Testing consisted of a habituation phase and a test phase. During the habituation phase 20 startle stimuli (noise, 115 dB SPL, 20 ms duration, 0 ms rise-decay times) were presented which were superimposed by a 35 dB SPL RMS steady background noise. During the test phase, startle stimuli were given alone or were preceded by a 14 kHz prepulse of 65 dB SPL. Three different time intervals between prepulse onset and startle stimulus onset were used: 12.5, 50, and 100 ms. A total of 28 presentations was given for the startle stimulus-alone condition and 14 presentations for each prepulse-startle stimulus condition with an ITI of 15 s. Possible responses to prepulses were calculated as the difference between peak-to-peak voltage during the time window 50 ms before and 50 ms after prepulse onset. Prepulses elicited no ASR at any SPL; the mean measures were always within 1 SD of 0 mV. The ASRs to the 20 initial habituating startle stimuli were not analysed. The mice were tested on 5 consecutive days to achieve maximum PPI [33].

In the following experiments, two groups were tested. Group 1: homozygous KO mice, $n = 9$; group 2: homozygous WT mice, $n = 10$. No gender difference had been observed in these tasks, and male and female groups were merged.

3.3. Open field

The open field was made of white PVC coated chip board. The size was 100 cm $\times$ 120 cm surface area with 35 cm high walls. A grid of lines that made up 15 cm $\times$ 15 cm squares had been drawn on the floor area. Animals were given 3 min each in the arena. We measured how many lines were crossed (a measure of motor activity), how often the animals reared at the walls (exploratory behaviour), how often they groomed (unstressed), and how many faecal pellets were dropped (stress) (see [11] for technical details). This and the following experiments took place in a room (2.80 m $\times$ 4.50 m) with several salient landmarks such as a door, a bench, and several black cardboard figures (squares, triangles, strips, ca. 50 cm length) attached to the walls. The room was dimly lit by four 20 W lights in each corner. Animals were tested for 5 days.

3.4. T-maze task

3.4.1. Pretraining

Animals were put on a diet of 80% their free feeding diet a week before the experiments started. Animals were also made familiar with the maze for 2 days by leaving the animal to explore for 5 min each day. During this time, food pellets were scattered along the arms to encourage exploratory behaviour.

The T-maze was constructed from chip board with white PVC coating. The length of each of the 3 arms was 68 cm, width 17 cm, and height 35 cm. At the end of the two choice arms, a black plastic dish was attached. In this dish, a 0.5 g cocoa flavoured cereal (choco krispies, Kellogg's) was placed during baiting.

Each animal received 8 runs per day. The task consisted of a reinforced alternation task in which the arm was baited that had not been visited previously. The animal was taken out of the arm after the visit of an arm and put back to its cage. The next run was started after a delay of 5 s. A visit of the same arm was considered a working memory error. Experiments were conducted for 3 consecutive days. The intersession interval for each animal was 1 day (see [35] for technical details).

3.5. 4-arm (plus maze) task

The 4-arm maze was constructed from chip board with white PVC coating. The length of each arm was 68 cm, width 17 cm, and height 35 cm. At the end of each arm a square black plastic dish with 5 cm side length was attached.

3.5.1. Working memory task

All arms were baited in the experiments. The aim of the task was to retrieve all food pellets. Visits of arms that already had been visited in the run were considered working memory errors. Each animal had 4 runs per day for 5 days.

3.5.2. Long-term memory task

In this task, 2 out of 4 arms were baited. The aim of the task was to retrieve all food pellets. Visits of arms that already had been visited in the run were considered working memory errors. Visits of arms that were never baited were considered long-term memory errors after the first run. Each animal had 4 runs per day for 5 days. The intersession interval for each animal was 1 day.

3.6. 8-arm (radial arm) maze

The 8-arm maze was constructed from chip board with white PVC coating. The length of each arm was 68 cm, width 17 cm, and height 35 cm. The diameter of the central platform was 50 cm. At the end of each arm a square black plastic dish with 5 cm side length was attached.

3.6.1. Working memory task

All arms were baited. The aim of the task was to retrieve all food pellets. Visits of arms that already had been visited in the run were considered working memory errors. Each animal had 2 runs per day for 9 days. There was a gap of 2 days after day 5 of training.

3.6.2. Long-term memory task

In this task, 4 out of 8 arms were baited. The same arms were baited throughout the experiments. The aim of the task

was to retrieve all food pellets. Visits of arms that already had been visited in the run were considered working memory errors. On day 2, visits of arms that were never baited were considered reference memory errors, which is a type of long-term memory error in this design since the animals had 1 day to learn which arms were baited. Each animal had 2 runs per day for 6 days. WM was also analysed in this task, with multiple entries of arms considered as WM errors. The intersession interval for each animal was 1 day (see [20] for details).

3.6.3. Statistics

After startle testing, an average value was calculated for each measure shown (block or IPI) for each mouse. Then the mean of these values $\pm$ S.E.M. was calculated. Significance is reported if $P < 0.05$.

Two-way repeated measures ANOVA or ANCOVA (Statistica) were used to analyse differences between groups, effects over time, and interactions. In order to investigate WM differences between days, a Newman–Keuls multiple comparison test was applied post-hoc to the ANOVA analysis in some data sets. Gender effects were reported if significant.

4. Results

4.1. Startle response

4.1.1. Habituation

There were no differences in ASR amplitude or short-term habituation within the test session between KO mice and wildtype mice. The mean ASR over 5 days decreased over the blocks of stimuli (mean of 10 values) identically in both genotypes (Fig. 1; repeated measures ANCOVA: no effect of genotype $F < 1$, significant trend over the blocks, $F(1, 354) = 14.3$, $P = 0.0002$, but no interaction between trend over blocks and genotype, $F < 1$). The startle amplitude was higher in males than in females in both genotypes (KO: 34% higher startle amplitude in males, WT: 44%; ANCOVA: significant effect of gender, $F(1, 354) = 73.5$, $P < 0.0001$, but no significant interaction between gender and genotype, $F(1, 354) = 1.14$, $P = 0.29$).

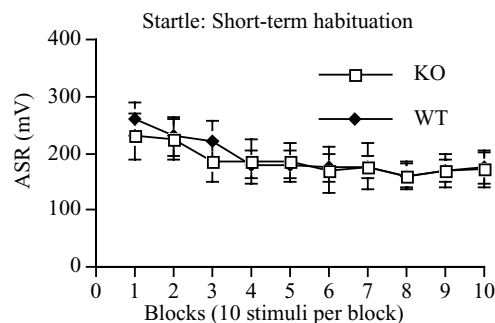


Fig. 1. Short-term habituation of the acoustic startle response (ASR). No difference was found between wildtype (WT) and mGluR7-knockout (KO) mice (WT: $n = 21$, KO: $n = 15$). Each block: mean of 10 responses.

There was no difference in long-term habituation over the test days between the KO mice and the wildtype mice. The mean ASR amplitude of the first block (mean of 10 values; Fig. 2a) decreased over the 5 test days identically in both genotypes (Fig. 2b; ANCOVA of ASR of first block: no effect of genotype ($F < 1$, significant trend over days, $F(1, 168) = 14.1$, $P = 0.0002$, but no interaction between trend over days and genotype, $F < 1$), with a significant effect of gender, ($F(1, 168) = 20.9$, $P = 0.0001$, males reacted stronger than females, but no interaction between gender and genotype, $F(1, 168) = 2.62$, $P = 0.11$). Like the first block, the mean ASR over all responses of one day decreased over days similarly in both genotypes (ANCOVA: no effect of genotype $F < 1$, significant trend over days, $F(1, 168) = 3.96$, $P = 0.048$, but no interaction between trend over days and genotype, $F < 1$, significant effect of gender, $F(1, 168) = 29.7$, $P = 0.0001$, males reacted stronger than females, but no interaction between gender and genotype $F < 1$).

4.1.2. PPI

There was no difference in PPI between the KO mice and the wildtype mice (ANOVA: no effect of genotype $F < 1$). In both genotypes PPI occurred at the longer IPIs of 50 and 100 ms (Fig. 3; ANOVA: significant effect of IPI, $F(2, 98) = 18.2$, $P < 0.0001$, no interaction between IPI and genotype $F < 1$). PPI was lower in males than in females

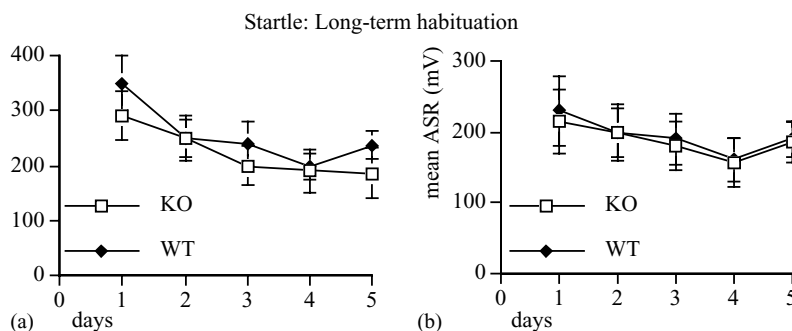


Fig. 2. Long-term habituation of ASR. (a) Decrease of the ASR during the first block of each day, (b) decrease of the average ASR over all stimuli of each day (n : see Fig. 1). No difference was found between genotypes.

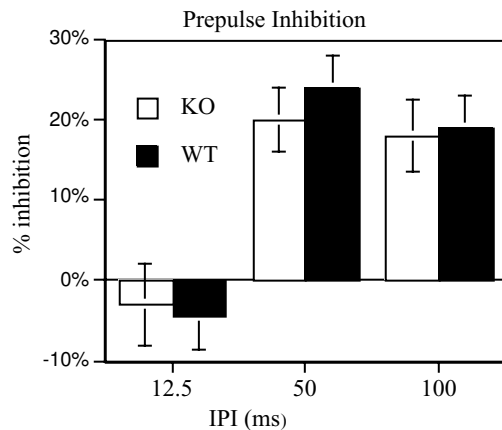


Fig. 3. Prepulse inhibition to interpulse intervals (IPI) of 12.5, 50, or 100 ms between prepulse and startle stimulus (n : see Fig. 1). IPI was observed at the 50 and 100 ms time points. No difference was found between genotypes.

in both genotypes (ANOVA: significant effect of gender, $F(1, 98) = 6.7$, $P = 0.01$, but no interaction between gender and genotype, $F < 1$), this difference being constant for all IPIs (no significant interaction between IPI and gender, $F < 1$).

4.1.3. Open field

There was no difference between the two genotypes in terms of number of line crossings per time, rearings, groomings or faecal pellets dropped (see Fig. 4).

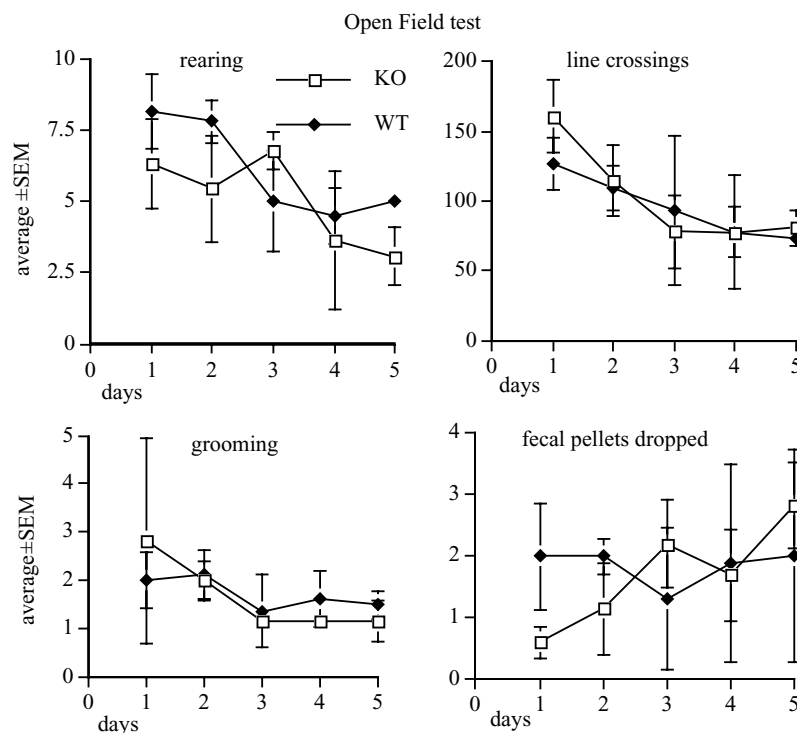


Fig. 4. Results from open field assessments. No difference was found between groups in exploration (rearing), motor activity (line crossings in 3 min), and stress response (grooming episode, fecal pellets dropped in the task) in ANOVA assessments. Homozygous KO mice $n = 9$; homozygous WT mice $n = 10$.

4.1.4. T-maze task (WM task)

There was no difference in the numbers of working memory errors committed in the reinforced alternation task. The average number of WM errors committed per 8 runs over 6 days were: KO 2.7 ± 1.1 S.E.M., WT 2.2 ± 0.9 S.E.M. errors. On the last day, the average number of WM errors committed was 0.8 ± 0.2 S.E.M. in the KO group and 0.5 ± 0.3 in the WT group.

4.1.5. 4-arm maze, all arms baited (WM task)

There was a significant difference between genotypes in this task. KO mice made more WM errors in these tasks as shown in a two-way ANOVA test, $F(1, 17) = 9.4$, $P = 0.006$. Both groups committed fewer errors over time $F(4, 68) = 3.6$, $P = 0.009$, no interaction was observed (see Fig. 5).

4.1.6. 8-arm maze, all arms baited (WM task)

KO animals committed more WM errors than WT mice in this task (see Fig. 6). This difference in WM error numbers was significant. A two-way ANOVA showed a difference between groups, $F(1, 17) = 27$, $P < 0.0001$, and a decrease over time $F(8, 136) = 3.8$, $P < 0.0005$. No interaction was observed (see Fig. 6).

4.1.7. 4-arm maze task, two arms baited (LTM + WM task)

There was no difference between groups in numbers of WM errors committed, even though there was a clear tendency for KO mice to commit more errors in the first 2 days.

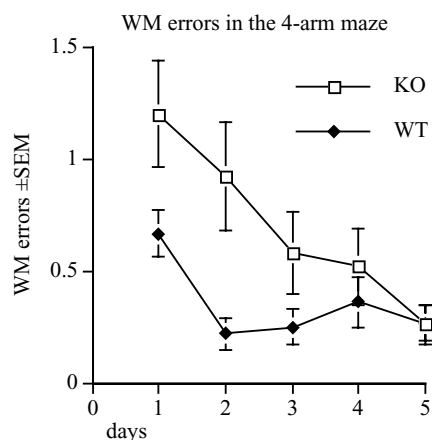


Fig. 5. WM errors committed by the animals in a 4-arm maze task, all arms baited. Six runs per day were given. There was a difference between genotypes in ANOVA tests, KO mice committed more WM errors than WT litter mates ($P = 0.006$). Also, both groups committed fewer errors over time ($P = 0.009$).

In addition, the numbers of LTM errors committed by groups were identical. No tendency of impairment of LTM formation in the KO group was observed. Both genotypes learned the task, and the performances of both genotypes were not different. A two-way ANOVA showed a significant change over time in LTM errors, $F(4, 60) = 7.6$, $P < 0.0005$, indicating that the animals learned the task. No interaction was observed (see Fig. 7).

4.1.8. 8-arm maze task, 4 arms baited (WM + LTM task)

There was a significant difference between KO and WT groups in the number of WM errors (two-way ANOVA, $F(1, 32) = 7.6$, $P = 0.009$). In a post-hoc Newman–Keuls multiple comparison test for each day, it was found that there was a persistent difference between numbers of WM errors

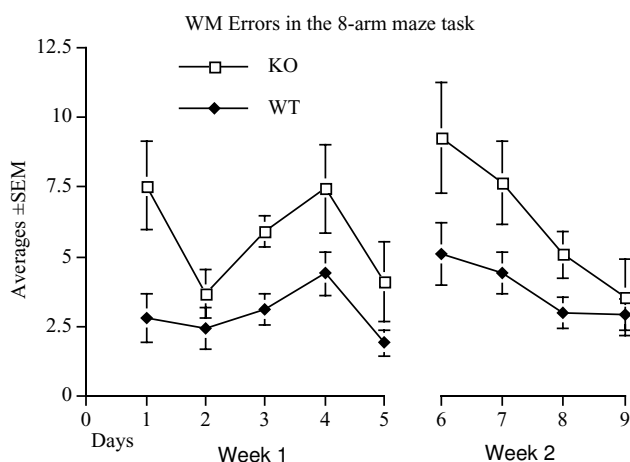


Fig. 6. WM errors committed in the 8-arm maze task. KO animals made more WM errors in this task ($P < 0.0001$). Additionally, both genotypes learned the task as numbers of errors were reduced over the course of the task ($P < 0.0005$).

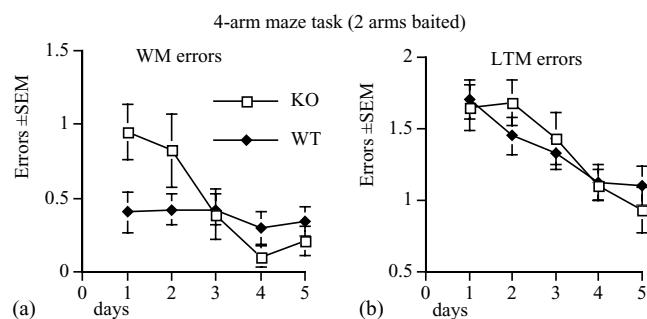


Fig. 7. WM and LTM errors committed in a 4-arm maze task, 2 arms were baited. There was no difference between genotypes in WM and LTM errors. Both genotypes had learned the LTM task since there was a significant reduction of LTM errors over time ($P < 0.0005$).

committed when comparing KO and wild type groups (days 3, 4, 6: $P < 0.05$, day 5: $P < 0.01$). There was no difference in the number of LTM errors committed between the groups. However, there was no reduction of errors over the course of training, showing that the animals did not learn the task (see Fig. 8).

5. Discussion

The present results demonstrate that mice lacking mGluR7 show selective performance deficits in tasks assessing short-term working memory (WM) but not in tasks for long-term memory (LTM). Moreover, the WM deficits are not apparent in simple tasks such as the T-maze reinforced alternation test. This is most likely due to the fact that the demands on WM are relatively low, since the delay between runs was short and the animal needed to remember only the previously visited arm. Only when increasing the demands on WM performance in tests such as the 4-arm and, in particular, the 8-arm radial maze, mGluR7 $^{-/-}$ mice make consistently more WM errors than their wild-type littermate controls. It is interesting to note that the number of WM errors in the 4-arm maze was reduced after several days of training, and that the difference between groups disappeared. At the same time, the number of LTM errors committed went down, indicating that the animals had learned the task and therefore did not have the need to explore and to remember all arms during the task. This hypothesis is supported by the results in the 8-arm maze test with only 4 arms baited. Here, the number of WM errors remained consistently high in the KO group even after a week of training (see Fig. 8). The number of LTM errors was not decreased in neither KO nor control group, which shows that the animals did not learn this task and did not develop a strategy to preferably visit the baited arms over non-baited arms, which would have reduced the WM load considerably. There was no compensation for the impaired WM, showing that the WM impairment is long lasting. In the maze tasks in which the animals learned the task even-

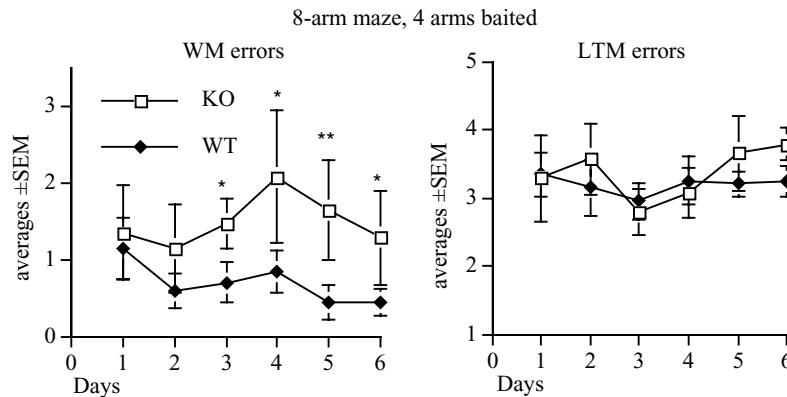


Fig. 8. WM errors in a 8-arm task, 4 arms were baited. The number of WM errors committed was higher in the KO group ($P = 0.009$). This deficit was visible until the last day (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$). No difference was observed in numbers of LTM errors committed. However, there was no decrease in numbers of LTM errors over 6 days, showing that neither group had learned the task.

tually, the numbers of WM errors were reduced most likely because the animals had learned a strategy to retrieve the bait and therefore had less need to explore all arms. This strategy reduced WM load considerably and prevented them from making excessive WM errors.

These results demonstrate that the WM impairment is long lasting, and that the impairment is quite selective for WM only. This is in agreement with previous findings, where no effects of mGluR7 gene ablation have been noted in other tests that include a 24 h LTM component in a passive avoidance task [7] and delayed freezing [27].

It is very unlikely that the lack of mGluR7 impairs WM performance in the tasks used in some non-selective fashion. Hearing and perception of acoustic stimuli in the associated startle response were not affected, showing that mGluR7 $^{-/-}$ mice have normal abilities in sensorimotor processing (for further evidence see also [7,27]) and non-associative learning. We also found no impairments in either vision, spatial orientation, motor activity or sensory-motor control. Lack of motivation, which represents another possible confound in studies of cognitive performance, also seemed to play no role. mGluR7 $^{-/-}$ and mGluR7 $+/+$ mice showed equal motivated behaviour to food and the retrieval of food pellets. Further support for specific defects in WM of mGluR7 $^{-/-}$ mice also comes from their behaviour in a novel object recognition task [45]. As LTM seems unaffected in mGluR7 $^{-/-}$ mice, our findings highlight a selective impairment of performance in short-term working memory that is caused by the lack of this receptor.

Of course, our results can not exclude the possibility that mGluR7 also plays a role in tasks where mGluR7 $^{-/-}$ mice failed to show deficits. There is always the confound of functional compensation in mice in which a gene is lacking throughout development. With respect to WM, however, putative functional compensatory mechanisms for the lack of mGluR7 may either not exist, were not recruited, or failed to completely mask the effects of its absence on WM. Therefore, this receptor seems to play a critical role in WM performance.

WM is the process of actively holding information “on-line” in the brain and manipulating it to guide behaviour [30]. Accordingly, WM is thought to be a temporary store whose contents of information are continually updated, scanned and manipulated in response to immediate information processing demands—a critical building block for normal cognition—essential for higher cognitive function and goal-directed behaviour.

There are several non-mutually exclusive hypotheses how mGluR7 function may affect WM that firstly take into account the widespread occurrence of this receptor in brain areas involved in WM including frontal cortex and hippocampus. Secondly, they take into account the role of this receptor as a presynaptic frequency-dependent regulator of neurotransmission [38]. In the hippocampus, the lack of mGluR7 is associated with selective defects in short-term potentiation (STP). STP is a transient period of decaying field excitatory synaptic potentials (f-EPSPs) that often leads to a plateau of continuously potentiated f-EPSP. The latter is referred to as long-term potentiation (LTP). The lack of mGluR7 also affects post-tetanic potentiation (PTP) but not LTP after high after high frequency stimulation (HFS) of the Schaffer collateral-CA1 pathway [5]. NMDA receptors play a role in both STP and LTP in the CA1 region of the hippocampus. Activation of these receptors leads to a subsequent influx and rise in the post-synaptic levels of Ca^{2+} , which is obligatory for the induction of both STP and LTP [6,42,43]. Potentiation induced by HFS in CA1 has three phases: (i) a second-long phase of decaying fEPSPs termed post-tetanic potentiation (PTP); (ii) a longer-lasting (20–60 min) phase of a slow decrease in synaptic efficacy (STP); and (iii) a plateau of potentiated field potentials termed LTP. NMDA receptors have a role in STP and LTP but not in the induction of PTP which is caused by a presynaptic accumulation of Ca^{2+} during tetanisation and that shows a rapid (<1 s) decay reflecting the clearance of Ca^{2+} from presynaptic terminals [42,49]. The observed selective effects on STP but not LTP on the one hand, and short-term but not long-term memory are intriguing. LTP, which was

first described by Bliss and Lømo [2], is currently the main model of long-lasting synaptic memory in the mammalian brain (see also [13]). Long-term memory in mGluR7^{−/−} mice was namely indistinguishable from that in wild-type littermates in several tests shown here and in previous papers [7,27]. An STP-like phenomenon has been observed during exploratory learning in rats [28], suggesting that transient types of potentiation might be involved in memory encoding. Recently, a detailed electrophysiological analysis of STP has revealed that it represents a transient form of LTP (t-LTP; [44]) as opposed to the more classical form of sustained (s) LTP that is proposed to correlate with LTM. t-LTP (STP) and s-LTP can be considered two independent phenomena that function as a continuum during dynamic modulation of synaptic transmission and they can be either co-expressed or expressed independently [8,41,44]. t-LTP and s-LTP differ in a large number of ways, including differences in induction (frequency of synaptic events in t-LTP rather than number in s-LTP), expression (presynaptic for t-LTP as an enhanced probability of release, mainly post-synaptic for s-LTP), and maintenance. The maintenance and induction of t-LTP (unlike those of s-LTP) can hardly be separated from each other. Synaptic activity that induces t-LTP also has the ability to erase it again. Since activation of NMDA receptors favours the induction of t-LTP, its amount present at any given time after its induction depends on a balance between a use-dependent reduction in the probability of release and a concurrent re-induction of potentiation via activation of NMDA receptors [44]. Accordingly, the latter authors propose that t-LTP (STP) might enable and represent an electrophysiological correlate for the formation of transient and temporally independent memory-maps in the brain that may be used (for up to 6 h), forgotten, re-initiated or converted to a more permanent memory. Together with our earlier findings that mGluR7 deficiency selectively affects STP but not LTP in CA1 [5], and is needed for proper frequency-dependent modulation of transmitter release [38] the current selective impairments of mGluR7^{−/−} mice in WM performance seem in support of the hypothesis recently put forward by Volianskis and Jensen [44]. Also note that hippocampal lesions or pharmacological blockade of hippocampal activity produces impairments in WM such as the ability of rodents to bridge short time-delays introduced in an 8-arm maze task [4]. And NMDA antagonists, infused i.c.v., greatly impair the rodent's ability to cope with such short time delays [4]; for discussion see also [15,34]. Previous studies of knockout mouse strains have shown similar memory impairments that were selective to WM and not to LTM [35,48]. These results show that quite different alterations of parameters of synaptic efficacy produce very similar memory impairments, and demonstrate that LTM is not directly dependent on intact WM.

Since an impairment in forming WM was consistently found, but LTM was unimpaired, one has to address how LTM could form without fully functional WM. One model that would offer an elegant solution to this problem is the hy-

pothesis that working memory is supported by reverberating circuits in hippocampal loops from CA1 to CA3 or CA3 to the dentate gyrus [12,21,25]. Such an 'active memory' could support information for some time without necessarily affecting synaptic plasticity. In this model, mGluR7 could play a role in the induction and maintenance of network oscillations in the cortex and hippocampus that support such active memories. It has been postulated that WM is maintained by oscillations such as Theta and Gamma which can be seen in EEG recordings; in this model, neuronal spikes are kept in a temporal order by Theta and Gamma oscillations [21,25]. Such a temporal order has been found in EEG and single cell recording studies in the hippocampus of freely moving rats [29]. In addition, it has been shown that mGluRs are functionally involved in inducing and maintaining EEG oscillations in the hippocampus [3], and that the blockade or activation of mGluRs affect some form of synaptic plasticity that is dependent on Theta oscillations [14,16]. Interestingly enough, in EEG recordings of mGluR7 KO mice during performance of learning tasks, changes in Theta activity was observed (manuscript in prep). Hence, if the control of endogenous network oscillations in the hippocampus is compromised, spike timing and the support of WM by active memory circuit activity that dynamically store information would be affected. This would lead to a reduced ability of the hippocampus to support active memory and WM without directly affecting synaptic plasticity and therefore LTM [14].

We conclude that the mGluR7 subtype plays an important role in the maintenance of working memory, most likely by changing selective frequency-dependent synaptic plasticity systems, by changing Theta/Gamma network oscillation properties in the hippocampus, or both. Further investigation of the neuronal activity in learning animals will have to be conducted in order to assess if there are changes in Theta/Gamma activity and in spike timing during the performance of WM tasks.

References

- [1] Bashir ZI, Bortolotto ZA, Davies CH, Berretta N, Irving AJ, Seal AJ, et al. Induction of LTP in the hippocampus needs synaptic activation of glutamate metabotropic receptors. *Nature* 1993;363:347–50.
- [2] Bliss T, Lømo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol (Lond)* 1973;232:331–56.
- [3] Boddeke H, Best R, Boeijinga PH. Synchronous 20 Hz rhythmic activity in hippocampal networks induced by activation of metabotropic glutamate receptors in vitro. *Neuroscience* 1997;76:653–8.
- [4] Bolhuis JJ, Reid IC. Effects of intraventricular infusion of the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist AP5 on spatial memory of rats in a radial arm maze. *Behav Brain Res* 1992;47:151–7.
- [5] Bushell T, Sansig G, Collett V, van der Putten H, Collingridge G. Altered short-term synaptic plasticity in mice lacking the metabotropic glutamate receptor mGlu7. *Sci World* 2002;2:730–7.
- [6] Collingridge G, Kehl S, McLennan H. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol* 1983;334:33–46.

- [7] Cryan JF, Kelly PH, Neijt HC, Sansig G, Flor PJ, Van der Putten H. Antidepressant and anxiolytic-like effects in mice lacking the group III metabotropic glutamate receptor mGluR7. *Eur J Neurosci* 2003;17:2409–17.
- [8] Debanne D, Gahwiler BH, Thompson SM. Heterogeneity of synaptic plasticity at unitary CA3-CA1 and CA3-CA3 connections in rat hippocampal slice cultures. *J Neurosci* 1999;19:10664–71.
- [9] Dulawa SC, Geyer MA. Effects of strain and serotonergic agents on prepulse inhibition and habituation in mice. *Neuropharmacology* 2002;39:2170–9.
- [10] Ehret G. Development of absolute auditory thresholds in the house mouse (*Mus musculus*). *J Am Audiol Soc* 1976;1:179–84.
- [11] Hata T, Nishimura Y, Kita T, Itoh E, Kawabata A. The abnormal open-field behavior of SART-stressed rats and effects of some drugs on it. *Jpn J Pharmacol* 1988;48:479–90.
- [12] Hebb DO. The organization of behavior. New York: Wiley; 1949.
- [13] Hölscher C. Synaptic plasticity and learning and memory: LTP and beyond. *J Neurosci Res* 1999;58:62–75.
- [14] Hölscher C. Metabotropic glutamate receptors control gating of spike transmission in the hippocampus area CA1. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;73:307–16.
- [15] Hölscher C. Time, space, and hippocampal functions. *Rev Neurosci* 2003;14:253–84.
- [16] Hölscher C, Anwyl R, Rowan M. Stimulation on the positive phase of hippocampal theta rhythm induces long-term potentiation which can be depotentiated by stimulation on the negative phase in area CA1 in vivo. *J Neurosci* 1997;17:6470–7.
- [17] Hölscher C, Anwyl R, Rowan MJ. Activation of group II metabotropic glutamate receptors blocks induction of long-term potentiation and depotentiation in area CA1 of the rat in vivo. *Eur J Pharmacol* 1997;322:155–63.
- [18] Hölscher C, Gigg J, O'Mara S. Metabotropic glutamate receptor activation and blockade. Consequences for long-term potentiation, learning and neurotoxicity. *Neurosci Biobehav Rev* 1999;23:399–410.
- [19] Hölscher C, McGlinchey L, Rowan MJ. L-AP4 (L-(+)-2-amino-4-phosphonobutyric acid) induced impairment of spatial learning in the rat is antagonized by MAP4 ((S)-2-amino-2-methyl-4-phosphonobutanoic acid). *Behav Brain Res* 1996;81:69–79.
- [20] Jarrard LE. Selective hippocampal lesion and behavior: effects of kainic acid lesions on performance of place and cue tasks. *Behav Neurosci* 1983;97:873–89.
- [21] Jensen O. Information transfer between rhythmically coupled networks: reading the hippocampal phase code. *Neural Comput* 2001;13:2743–61.
- [22] Kinoshita A, Ohishi H, Neki A, Nomura S, Shigemoto R, Takada M, et al. Presynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR8, in the rhinencephalic areas: a light and electron microscope study in the rat. *Neurosci Lett* 1996;207:61–4.
- [23] Kinoshita A, Shigemoto R, Ohishi H, van der Putten H, Mizuno N. Immunohistochemical localization of metabotropic glutamate receptors, mGluR7a and mGluR7b, in the central nervous system of the adult rat and mouse: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 1998;393:332–52.
- [24] Kinzie JM, Saugstad JA, Westbrook GL, Segerson TP. Distribution of metabotropic glutamate receptor 7 messenger RNA in the developing and adult rat brain. *Neuroscience* 1995;69:167–76.
- [25] Lisman J. Relating hippocampal circuitry to function: recall of memory sequences by reciprocal dentate-CA3 interactions. *Neuron* 1999;22:233–42.
- [26] Manahan-Vaughan D, Reymann KG. Regional and developmental profile of modulation of hippocampal synaptic transmission and LTP by AP4-sensitive mGluRs in vivo. *Neuropharmacology* 1995;34:995–1005.
- [27] Masugi M, Yokoi M, Shigemoto R, Muguruma K, Watanabe Y, Sansig G, et al. Metabotropic glutamate receptor subtype 7 ablation causes deficit in fear response and conditioned taste aversion. *J Neurosci* 1999;19:955–63.
- [28] Moser EI, Moser MB, Andersen P. Potentiation of dentate synapses initiated by exploratory learning in rats: dissociation from brain temperature, motor activity, and arousal. *Learn Mem* 1994;1:55–73.
- [29] O'Keefe J, Recce ML. Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus* 1993;3:317–30.
- [30] Olton DS, Becker JT, Handelmann GE. Hippocampus. *Behav Brain Sci* 1979;2:313–65.
- [31] Peterson NL, Kroona HB, Johnson RL, Koerner JF. Activity of the conformationally rigid 2-amino-4-phosphonobutanoic acid (AP4) analogue (RS)-1-amino-3-(phosphonomethylene)cyclobutane-1-carboxylic acid (cyclobutylene AP5) on evoked responses in the perforant pathway of rat hippocampus. *Brain Res* 1992;571:162–4.
- [32] Pin J-P, Duvoisin R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 1995;34:1–26.
- [33] Plappert CF, Pilz PKD, Schnitzler H-U. Factors governing prepulse inhibition and prepulse facilitation of the acoustic startle response in mice. *Behav Brain Res* 2004; in press.
- [34] Rawlins JNP. Association across time: the hippocampus as a temporary memory store. *Behav Brain Sci* 1985;8:479–96.
- [35] Reisel D, Bannerman DM, Schmitt WB, Deacon RM, Flint J, Borchardt T, et al. Spatial memory dissociations in mice lacking GluR1. *Nat Neurosci* 2002;5:868–73.
- [36] Richter-Levin G, Errington ML, Maegawa H, Bliss TVP. Activation of metabotropic glutamate receptors is necessary for long-term potentiation in the dentate gyrus and for spatial learning. *Neuropharmacology* 1994;33:853–7.
- [37] Riedel G, Wetzel W, Reymann KG. (R,S)- α -Methyl-4-carboxyphenylglycine (MCPG) blocks spatial learning in rats and long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo. *Neurosci Lett* 1994;167:141–4.
- [38] Sansig G, Bushell TJ, Clarke VR, Rozov A, Burnashev N, Portet C, et al. Increased seizure susceptibility in mice lacking metabotropic glutamate receptor 7. *J Neurosci* 2001;21:8734–45.
- [39] Saugstad JA, Kinzie JM, Mulvihill ER, Segerson TP, Westbrook GL. Cloning and expression of a new member of the L-2-amino-4-phosphonobutyric acid-sensitive class of metabotropic glutamate receptors. *Mol Pharmacol* 1994;45:367–72.
- [40] Saugstad JA, Kinzie JM, Shinohara MM, Segerson TP, Westbrook GL. Cloning and expression of rat metabotropic glutamate receptor 8 reveals a distinct pharmacological profile. *Mol Pharmacol* 1997;51:119–25.
- [41] Schulz PE, Fitzgibbons JC. Differing mechanisms of expression for short- and long-term potentiation. *J Neurophysiol* 1997;78:321–34.
- [42] Stevens CF, Tonegawa S, Wang Y. The role of calcium-calmodulin kinase II in three forms of synaptic plasticity. *Curr Biol* 1994;4:687–93.
- [43] Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 1996;87:1327–38.
- [44] Volianskis A, Jensen M. Transient and sustained types of long-term potentiation in the CA1 area of the rat hippocampus. *J Physiol* 2003;550:459–492.
- [45] Wan H, Collett V, van der Putten H, Bashir Z, Collingridge G, Brown M. Metabotropic glutamate receptor mGluR7 and recognition memory. *Soc Neurosci Meeting* 2001 [abstract 188].
- [46] Weber M, Schnitzler H, Schmid S. Synaptic plasticity in the acoustic startle pathway: the neuronal basis for short-term habituation? *Eur J Neurosci* 2002;16:1325–32.
- [47] Willott JF, Carlson S. Modification of the acoustic startle response in hearing-impaired C57BL/6J mice: prepulse augmentation and prolongation of prepulse inhibition. *Behav Neurosci* 1995;109:396–403.
- [48] Zeng H, Chattarji S, Barbarosie M, Rondi RL, Philpot BD, Miyakawa T, et al. Forebrain-specific calcineurin knockout selectively impairs bidirectional synaptic plasticity and working/episodic-like memory. *Cell* 2001;107:617–29.
- [49] Zucker RS. Calcium- and activity-dependent synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 1999;9:305–13.

Abstract

Metabotropic glutamate receptors (mGluRs) consist of eight different subtypes and exert their effects on second messengers and ion channels via G-proteins. The function of individual mGluR subtypes in the CNS, however, largely remains to be clarified. To study the role of mGluR7 receptors, we used homologous recombination to generate mice lacking this metabotropic receptor subtype (mGluR7).

Immunohistochemical and immunoelectron-microscopic analyses showed that mGluR7 is highly expressed in amygdala and preferentially localized at the presynaptic axon terminals of glutamatergic neurons, suggesting strongly that mGluR7 is involved in neural processes subserving amygdala-dependent aversive responses. To examine amygdala-dependent behavior, we examined first the fear response of freezing after electric shock in wild-type and mGluR7 (mGluR7^{-/-}) knockout littermates. Wild-type mice displayed freezing immediately after footshock. In comparison, mGluR7 knockout mice showed significantly reduced levels in both immediate postshock and delayed freezing responses. However, the knockout mice exhibited no abnormalities in pain sensitivity and locomotor activity. Secondly, we performed conditioned taste aversion (CTA) experiments. In wild-type mice, the administration of saccharin followed by intraperitoneal injection of the malaise-inducing agent LiCl resulted in an association between saccharin and LiCl. This association caused strong CTA toward saccharin. In contrast, mGluR7 knockout mice failed to associate between the taste and the negative reinforcer in CTA experiments. Again, the knockout mice showed no abnormalities in taste preference and in the sensitivity to LiCl toxicity. These results indicated that mGluR7 deficiency causes an impairment of two distinct amygdala-dependent behavioral paradigms.

Because the amygdala function is essential for these two distinct behavioral paradigms, our results suggest that mGluR7 is critical in amygdala function.

The amygdala is a brain region that is known to be critical for the manifestation of anxiolysis and antidepressant action and glutamatergic neurotransmission has been strongly implicated in the pathophysiology of affective disorders. To this end we analyzed the behavioral profiles of mGluR7^{-/-} mice in animal models of depression and anxiety. mGluR7^{-/-} mice were compared to wildtype littermates and showed substantially less behavioural immobility in both the forced swim test and the tail suspension test. Both behavioural paradigms are widely used to predict antidepressant-like activity. Further, mGluR7^{-/-} mice displayed anxiolytic activity in four different behavioural tests namely the light-dark box, the elevated plus maze, the staircase test, and the stress-induced hyperthermia test, while

their cognitive performance was normal in the passive avoidance paradigm. Analysis of locomotor activity in a novel environment demonstrated that mGluR7^{-/-} mice were slightly more active in the initial minutes following placement in the chamber only. Together, these data suggest that mGluR7 may play a pivotal role in mechanisms that regulate behavioural responses to aversive states.

Moreover, this study demonstrates that selective ablation of mGluR7 is associated with changes in animal behavioural paradigms predictive of antidepressant and anxiolytic action.

Furthermore, after the serendipitous discovery of a sensory stimulus-evoked epileptic phenotype in mGluR7 knockout mice, we tested two convulsant drugs, pentylenetetrazole (PTZ) and bicuculline.

In animals aged 12 weeks and older, subthreshold doses of these drugs induced seizures in mGluR7^{-/-}, but not in mGluR7^{+/-}, mice. PTZ-induced seizures were inhibited by three standard anticonvulsant drugs, but not by the group III selective mGluR agonist (R,S)-4-phosphonophenylglycine (PPG). Consistent with the lack of signs of epileptic activity in the absence of specific stimuli, mGluR7^{-/-} mice showed no major changes in synaptic properties in two slice preparations. However, slightly increased excitability was evident in hippocampal slices. In addition, there was slower recovery from frequency facilitation in cortical slices, suggesting a role for mGluR7 as a frequency-dependent regulator in presynaptic terminals.

Moreover, mGluR7 is highly expressed at synapses made between CA3 and CA1 pyramidal neurons in the hippocampus. This input, the Schaffer collateral-commissural pathway, displays robust long-term potentiation (LTP), a process believed to utilise molecular mechanisms that are key processes involved in the synaptic basis of learning and memory. We found that LTP could be induced in mGluR7^{-/-} mice and that once the potentiation had reached a stable level there was no difference in the magnitude of LTP between mGluR7^{-/-} mice and their littermate controls. However, the initial decremental phase of LTP, known as short-term potentiation (STP), was greatly attenuated in the mGluR7^{-/-} mouse. In addition, there was less frequency facilitation during, and less post-tetanic potentiation following, a high frequency train in the mGluR7^{-/-} mouse showing that the absence of mGluR7 receptors results in alterations in short-term synaptic plasticity in the hippocampus.

Based on this electrophysiological result, we expand on the role of mGluR7 in learning and memory by describing the effect of mGluR7 gene ablation in different learning paradigms. In the acoustic startle response (ASR), no differences were seen between knockout mice and wildtype littermates in parameters including prepulse inhibition and habituation. In an open field test, no differences were seen between genotypes in motor activity, exploratory behaviour, and fearful behaviour. In a T-maze reinforced alternation working memory (WM) task, again no difference was seen between groups.

However, when increasing the demands on working-memory in a 4-arm and 8-arm maze task, KO mice committed more WM errors than WT littermates thereby uncovering a highly significant difference between the two groups that persisted every day for the whole 9 days of the experiment. In a 4-arm maze with 2 arms baited, KO and wildtype mice committed the same number of LTM errors, whereas KOs committed more WM errors. Altogether, these findings suggest that a lack of mGluR7 mainly impairs short-term working but not long-term memory performance while having no effect on sensorimotor processing, non-associative learning, motor activity and spatial orientation.

Bibliographie

- Abel, T., Nguyen, P.V., Barad, M., Deuel, T.A., Kandel, E.R., 1997. Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell* 88, 615–626.
- Aiba, A., Chen, C., Herrup, K., Rosenmund, C., Stevens, C.F., Tonegawa, S., 1994. Reduced hippocampal long-term potentiation and context-specific deficit in associative learning in mGluR1 mutant mice. *Cell* 79, 365–375.
- André, C., Bustany, P., Cyrulnik, B., Janssen, T., Oughourlian, J.-M., Van Eersel, P., 2012. Votre cerveau n’a pas fini de vous étonner. Albin Michel.
- Anisman, H., Matheson, K., 2005. Stress, depression, and anhedonia: caveats concerning animal model. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 525–546.
- Arnsten, A.F., 2009. Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 410–422.
- Bailey, C.H., Barco, A., Hawkins, R., Kandel, E.R., 2008. Molecular studies of learning and memory in Aplysia and the hippocampus: a comparative analysis of implicit and explicit memory storage., in: *Learning and Memory: A Comprehensive Reference*. Elsevier Press, pp. 11–29.
- Bailey, C.H., Kandel, E.R., 1993. Structural changes accompanying memory storage. *Annu. Rev. Physiol.* 55, 397–426.
- Bannerman, D.M., Sprengel, R., 2007. Remembering the subtle differences. *Sci.-N. Y. THEN Wash.-, Neuroscience* 317, 94–99.
- Barden, N., 2004. Implication of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the physiopathology of depression. *J. Psychiatry Neurosci.* 29, 185–193.
- Bartsch, D., Ghirardi, M., Skehel, P.A., Karl, K.A., Herder, S.P., Chen, M., Bailey, C.H., Kandel, E.R., 1995. Aplysia CREB2 represses long-term facilitation: Relief of repression converts transient facilitation into long-term functional and structural change. *Cell* 83, 979–992.
- Bashir, Z.I., Bortolotto, Z.A., Davies, C.H., Berretta, N., Irving, A.J., Seal, A.J., Henley, J.M., Jane, D.E., Watkins, J.C., Collingridge, G.L., 1993. Induction of LTP in the hippocampus needs synaptic activation of glutamate metabotropic receptors. *Nature* 363, 347–350.
- Bennett, M.R., 2000. The concept of long term potentiation of transmission at synapses. *Prog. Neurobiol.* 60, 109–137.
- Bertaso, F., Lill, Y., Airas, J.M., Espeut, J., Blahos, J., Bockaert, J., Fagni, L., Betz, H., El Far, O., 2006. MacMARCKS interacts with the metabotropic glutamate receptor type 7 and modulates Gprotein-mediated constitutive inhibition of calcium channels. *J. Neurochem.* 99, 288–298.
- Bertaso, F., Zhang, C., Scheschonka, A., De Bock, F., Fontanaud, P., Marin, P., Huganir, R.L., Betz, H., Bockaert, J., Fagni, L., Lerner-Natoli, M., 2008. PICK1 uncoupling from mGluR7a causes absence-like seizures. *Nat. Neurosci.* 11, 940–948.
- Bliss, T.V., Collingridge, G.L., 1993. A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31–39.
- Bortolotto, Z.A., Bashir, Z.I., Davies, C.H., Collingridge, G.L., 1994. A molecular switch activated by metabotropic glutamate receptors regulates induction of long-term potentiation. *Nature* 368, 740–743.

- Boudin, H., Doan, A., Xia, J., Shigemoto, R., Huganir, R.L., Worley, P., Craig, A.M., 2000. Presynaptic clustering of mGluR7a requires the PICK1 PDZ domain binding site. *Neuron* 28, 485–497.
- Bourtchouladze, R., Frenguelli, B., Blendy, J., Cioffi, D., Schutz, G., Silva, A.J., 1994. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* 79, 59–68.
- Bouton, M.E., 2004. Context and behavioral processes in extinction. *Learn. Mem.* 11, 485–494.
- Bushell, T.J., Sansig, G., Collett, V.J., Van der Putten, H., Collingridge, G.L., 2002. Altered short-term synaptic plasticity in mice lacking the metabotropic glutamate receptor mGlu7. *Sci. World J.* 2, 730–737.
- Callaerts-Vegh, Z., Beckers, T., Ball, S.M., Baeyens, F., Callaerts, P.F., Cryan, J.F., Molnar, E., D’Hooge, R., 2006. Concomitant deficits in working memory and fear extinction are functionally dissociated from reduced anxiety in metabotropic glutamate receptor 7-deficient mice. *J. Neurosci.* 26, 6573–6582.
- Capecchi, M.R., 2005. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat. Rev. Genet.* 6, 507–512.
- Carasatorre, M., Ramirez-Amaya, V., 2012. Network, cellular, and molecular mechanisms underlying long-term memory formation., in: *Neurogenesis and Neural Plasticity*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 73–115.
- Cartmell, J., Monn, J.A., Schoepp, D.D., 2000. Attenuation of specific PCP-evoked behaviors by the potent mGlu2/3 receptor agonist, LY379268 and comparison with the atypical antipsychotic, clozapine. *Psychopharmacology (Berl.)* 148, 423–429.
- Castellucci, V.F., Kandel, E.R., 1976. Presynaptic facilitation as a mechanism for behavioral sensitization in *Aplysia*. *Science* 194, 1176–1178.
- Castren, E., 2004. Neurotrophic effects of antidepressant drugs. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4, 58–64.
- Conn, P.J., Pin, J.P., 1997. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37, 205–237.
- Conquet, F., Bashir, Z.I., Davies, C.H., Daniel, H., Ferraguti, F., Bordi, F., Franz-Bacon, K., Reggiani, A., Matarese, V., Conde, F., Collingridge, G.L., Crepel, F., 1994. Motor deficit and impairment of synaptic plasticity in mice lacking mGluR1. *Nature* 372, 237–243.
- Corcoran, K.A., Maren, S., 2001. Hippocampal inactivation disrupts contextual retrieval of fear memory after extinction. *J. Neurosci.* 21, 1720–1726.
- Corkin, S., 1997. Preface. *Neuropsychologia* 35, 927–928.
- Coutinho, V., Knöpfel, T., 2002. Metabotropic glutamate receptors: Electrical and chemical signaling properties. *Neuroscientist* 8, 551–561.
- Craigh, H., Bailey, C.H., Chen, M., 1988. Long-term memory in *Aplysia* modulates the total number of varicosities of single identified sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 2373–2377.
- Crawley, J.N., 2008. Behavioral Phenotyping Strategies for Mutant Mice. *Neuron* 57, 809–818.
- Crawley, J.N., 1999. Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain Res.* 835, 18–26.
- Cryan, J.F., Dev, K.K., 1997. The glutamatergic system as a potential therapeutic target for the treatment of anxiety disorders., in: *Handbook of Anxiety and Fear*. Elsevier.
- Cryan, J.F., Holmes, A., 2005. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 775–790.
- Cryan, J.F., Kelly, P.H., Neijt, H.C., Sansig, G., Flor, P.J., Van der Putten, H., 2003. Antidepressant and anxiolytic-like effects in mice lacking the group III metabotropic glutamate receptor mGluR7. *Eur. J. Neurosci.* 17, 2409–2417.
- Cryan, J.F., Leonard, B.E., 2000. 5-HT_{1A} and beyond: the role of serotonin and its receptors in depression and the antidepressant response. *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.* 15, 113–135.

- Dalgleish, T., 2004. The emotional brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 583–589.
- Damasio, A.R., 2010. *L'erreur de Descartes*. Odile Jacob.
- Dash, P.K., Moore, A.N., Kobori, N., Runyan, J.D., 2007. Molecular activity underlying working memory. *Learn. Mem.* 14, 554–563.
- DeBiasi, A., Conn, P.J., Pin, J.P., Nicoletti, F., 2001. Molecular determinants of metabotropic glutamate receptor signaling. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 114–120.
- De Kloet, E.R., Joëls, M., Holsboer, F., 2005. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 463–475.
- Delgado, M.R., Olsson, A., Phelps, E.A., 2006. Extending animal models of fear conditioning to humans. *Biol. Psychol.* 73, 39–48.
- Dev, K.K., Nakanishi, S., Henley, J.M., 2001. Regulation of mglu(7) receptors by proteins that interact with the intracellular C-terminus. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 355–361.
- Dinan, T.G., 1994. Glucocorticoids and the genesis of depressive illness. A psychobiological model. *Br. J. Psychiatry* 164, 365–371.
- Dobi, A., Sartori, S.B., Busti, D., Van der Putten, H., Singewald, N., Shigemoto, R., Ferraguti, F., 2013. Neural substrates for the distinct effects of presynaptic group III metabotropic glutamate receptors on extinction of contextual fear conditioning in mice. *Neuropharmacology* 66, 274–289.
- Doetschman, T., Gregg, R.G., Maeda, N., Hooper, M.L., Melton, D.W., S. Thompson, Smithies, O., 1987. Targeted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 330, 576–8.
- Doumazane, E., Scholler, P., Zwier, J.M., Trinquet, E., Rondard, P., Pin, J.P., 2011. A new approach to analyze cell surface protein complexes reveals specific heterodimeric metabotropic glutamate receptors. *FASEB J.* 25, 66–67.
- Edelman, G.M., 2004. Plus vaste que le ciel : une nouvelle théorie générale du cerveau., *Sciences*. Odile Jacob.
- El Far, O., Airas, J.M., Wishmeyer, E., Nehring, R.B., Karschin, A., Betz, H., 2000. Interaction of the C-terminal tail region of the metabotropic glutamate receptor 7 with the protein kinase C substrate PICK1. *Eur. J. Neurosci.* 12, 4215–4221.
- El Far, O., Betz, H., 2002. G-protein-coupled receptors for neurotransmitter amino acids: C-terminal tails, crowded signalosomes. *Biochem. J.* 365, 329–336.
- Engelmann, M., Landgraf, R., Wotjak, C.T., 2004. The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front. Neuroendocrinol.* 25, 132–149.
- Evans, M.J., Kaufman, M.H., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–6.
- Fagni, L., Chavis, P., Ango, F., Bockaert, J., 2000. Complex interactions between mGluRs, intracellular Ca²⁺ stores and ion channels in neurons. *Trends Neurosci.* 23, 80–88.
- Fanselow, M.S., Poulos, A.M., 2005. The neuroscience of mammalian associative learning. *Annu. Rev. Physiol.* 56, 207–234.
- Fendt, P., Imobersteg, S., Peterlik, D., Chaperon, F., Mattes, C., Wittmann, C., Olpe, H.R., Mosbacher, J., Vranesic, I., Van der Putten, H., McAllister, K.H., Flor, P.J., Gee, C.E., 2013. Differential roles of mGlu(7) and mGlu(8) in amygdala-dependent behavior and physiology. *Neuropharmacology* 72, 215–223.
- Ferraguti, F., Shigemoto, R., 2006. Metabotropic glutamate receptors. *Cell Tissue Res.* 326, 483–504.
- Flor, P.J., Van der Putten, H., Rüegg, D., Lukic, S., Leonhardt, T., Bence, M., Sansig, G., Knoepfel, T., Kuhn, R., 1997. A novel splice variant of a metabotropic glutamate receptor, human mGluR7b. *Neuropharmacology* 36, 153–159.
- Franklin, T.B., Mansuy, I.M., 2013. The Neural Bases of Emotions, in: *Neurosciences-From Molecule to Behavior: A University Textbook*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 525–552.

- Gee, C.E., Peterlik, D., Neuhäuser, C., Bouhelal, R., Kaupmann, K., Laue, G., Uschold-Schmidt, N., Feuerbach, D., Zimmermann, K., Ofner, S., Cryan, J.F., Van der Putten, H., Fendt, M., Vranesic, I., Glatthar, R., Flor, P.J., 2014. Blocking metabotropic glutamate receptor subtype 7 (mGlu7) via the Venus flytrap domain (VFTD) inhibits amygdala plasticity, stress, and anxiety-related behavior. *J. Biol. Chem.* 289, 10975–10987.
- Gerlai, R.T., 2001. Bridging the gap from gene to behavior: Recombinant DNA techniques merge with behavioral neurobiology. *Physiol. Behav.* 73, 671.
- Givens, B.S., Olton, D.S., 1990. Cholinergic and GABAergic modulation of medial septal area: effect on working memory. *Behav. Neurosci.* 104, 849–855.
- Goddyn, H., Callaerts-Vegh, Z., Stroobants, S., Dirikx, T., Vansteenwegen, D., Hermans, D., Van der Putten, H., D'Hooze, R., 2008. Deficits in acquisition and extinction of conditioned responses in mGluR7 knockout mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* 90, 103–111.
- Hacking, D.F., 2008. “Knock, and it shall be opened”: Knocking out and knocking in to reveal mechanisms of disease and novel therapies. *Early Hum. Dev.* 84, 821–827.
- Hanse, E., Gustafsson, B., 1994. Staurosporine impairs both short-term and long-term potentiation in the dentate gyrus in vitro. *Neuroscience* 58, 263–274.
- Harrison, P.J., Weinberger, D.R., 2005. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol. Psychiatry* 10, 40–68.
- Hawkins, R., Abrams, T.W., Kandel, E.R., 1983. A cellular mechanism of classical conditioning in *Aplysia*: activity-dependent amplification of presynaptic facilitation. *Science* 400–405.
- Hawkins, R., Kandel, E.R., 1984. Is there a cell-biological alphabet for simple forms of learning? *Psychol. Rev.* 91, 375–391.
- Herman, J.P., Ostrander, M.M., Mueller, N.K., Figueiredo, H., 2005. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 29, 1201–1213.
- Herry, C., Ciocchi, S., Senn, V., Demmou, L., Muller, C., Luthi, A., 2008. Switching on and off fear by distinct neuronal circuits. *Nature* 454, 600–606.
- Hikichi, H., Murai, T., Okuda, S., Maehara, S., Satow, A., Ise, S., Nishino, M., Suzuki, G., Takehara, H., Hata, M., Ohta, H., 2010. Effects of a novel metabotropic glutamate receptor 7 negative allosteric modulator, 6-(4-methoxyphenyl)-5-methyl-3-pyridin-4-ylisoxazonolo[4,5-c]pyridin-4(5H)-one (MMPiP), on the central nervous system in rodents. *Eur. J. Pharmacol.* 639, 106–114.
- Holsboer, F., 2000. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* 23, 477–501.
- Holsboer, F., Bender, W., Benkert, O., Klein, H.E., Schmauss, M., 1980. Diagnostic value of dexamethasone suppression test in depression. *The Lancet* 316, 706.
- Hölscher, C., McGlinchey, L., Rowan, M.J., 1996. L-AP4 (L-(+)-2-amino-4-phosphonobutyric acid) induced impairment of spatial learning in the rat is antagonized by MAP4 ((S)-2-amino-2-methyl-4-phosphonobutanoic acid). *Behav. Brain Res.* 81, 69–79.
- Hölscher, C., Schmid, S., Pilz, P.K., Sansig, G., Van der Putten, H., Plappert, C.F., 2005. Lack of the metabotropic glutamate receptor subtype 7 selectively modulates Theta rhythm and working memory. *Learn. Mem.* 12, 450–455.
- Hölscher, C., Schmid, S., Pilz, P.K., Sansig, G., Van der Putten, H., Plappert, C.F., 2004. Lack of the metabotropic glutamate receptor subtype 7 selectively impairs short-term working memory but not long-term memory. *Behav. Brain Res.* 154, 473–781.
- Hoshaw, B.A., Malberg, J.E., Lucki, I., 2005. Central administration of IGF-I and BDNF leads to long-lasting antidepressant-like effects. *Brain Res.* 1037, 204–208.
- Humeau, Y., Reisel, D., Johnson, A.W., Borchardt, T., Jensen, V., Gebhardt, C., Bosch, V., Gass, P., Bannerman, D.M., Good, M.A., Hvalby, Ø., Sprengel, R., Lüthi, A., 2007. A pathway-specific

- function for different AMPA receptor subunits in amygdala long-term potentiation and fear conditioning. *J. Neurosci.* 27, 10947–10956.
- Iacovelli, L., Felicioni, M., Nisticò, R., Nicoletti, F., DeBiasi, A., 2014. Selective regulation of recombinantly expressed mGlu7 metabotropic glutamate receptors by G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Neuropharmacology* 77, 303–312.
- Jia, Z., Henderson, J.T., Taverna, F., Romano, C., Abramow-Newerly, W., Wojtowicz, J.M., Roder, J.C., 1998. Selective abolition of the NMDA component of long-term potentiation in mice lacking mGluR5. *Learn. Mem.* 5, 331–343.
- Joyner, A.L., Sedivy, J.M., 2000. Gene targeting: a practical approach. Oxford University Press, Oxford, New York.
- Kalinichev, M., Rouillier, M., Girard, F., Royer-Urios, I., Bournique, B., Finn, T., Charvin, D., Campo, B., Le Poul, E., Mutel, V., Poli, S., Neale, S.A., Salt, T.E., Lütjens, R., 2013. ADX71743, a potent and selective negative allosteric modulator of metabotropic glutamate receptor 7: In vitro and in vivo characterization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 344, 624–636.
- Kandel, E., Hawkins, R., 1992. Les bases biologiques de l'apprentissage. *Pour Sci.* 181, 70–78.
- Kandel, E.R., 2012a. Principles of Neural Science, 5th edition. ed. McGraw Hill Professional.
- Kandel, E.R., 2012b. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Mol. Brain* 5, 14.
- Kandel, E.R., 2009. The biology of memory: A forty-year perspective. *J. Neurosci.* 29, 12748–12756.
- Kandel, E.R., 2001. The molecular biology of memory storage: A dialogue between genes and synapses. *Science* 1030–1038.
- Kandel, E.R., Dudai, Y., Mayford, M., 2014. The Molecular and Systems Biology of Memory. *Cell* 157, 163–186.
- Kendler, K.S., Karkowski, L.M., Prescott, C.A., 1999. Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *Am. J. Psychiatry* 156, 837–841.
- Kile, B.T., Hilton, D.J., 2005. The art and design of genetic screens: mouse. *Nat. Rev. Genet.* 6, 557–67.
- Kinoshita, E., Shigemoto, R., Ohishi, H., Van der Putten, H., Mizuno, N., 1998. Immunohistochemical localization of metabotropic glutamate receptors, mGluR7a and mGluR7b, in the central nervous system of the adult rat and mouse: a light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* 393, 332–352.
- Klak, K., Palucha, A., Branski, P., Sowa, M., Pilc, A., 2007. Combined administration of PHCCC, a positive allosteric modulator of mGlu4 receptors and ACPT-I, mGlu III receptor agonist evokes antidepressant-like effects in rats. *Amino Acids* 32, 169–172.
- Kloet, E.R., Derijk, R., 2004. Signaling pathways in brain involved in predisposition and pathogenesis of stress-related disease: genetic and kinetic factors affecting the MR/GR balance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1032, 14–24.
- Knoepfel, T., Kuhn, R., Allgeier, H., 1995. Metabotropic glutamate receptors: novel targets for drug development. *J. Med. Chem.* 38, 1417–1426.
- Knöpfel, T., Uusisaari, M., 2007. Modulation of excitation by metabotropic glutamate receptors., in: Regulation of Excitatory Neurotransmission. Springer Berlin Heidelberg, pp. 163–175.
- Kolb, B., Whishaw, I.Q., 2013. Cerveau et Comportement. De Boeck.
- Kosinski, C.M., Risso Bradley, S., Conn, P.J., Levey, A.L., Landwehrmeyer, G.B., Penney, J.B.J., Young, A.B., Standaert, D.G., 1999. Localization of metabotropic glutamate receptor 7 mRNA and mGluR7a protein in the rat basal ganglia. *J. Comp. Neurol.* 415, 266–284.
- Kullmann, D.M., Asztely, F., Walker, M.C., 2000. The role of mammalian ionotropic receptors in synaptic plasticity: LTP, LTD and epilepsy. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 57, 1551–1561.
- Ledoux, J., 2005. Le Cerveau des émotions. Odile Jacob.
- LeDoux, J.E., 1993. Emotional memory systems in the brain. *Behav. Brain Res.* 58, 69–79.

- Lee, H., Simpson, G.V., Logothetis, N.K., Rainer, G., 2005. Phase locking of single neuron activity to theta oscillations during working memory in monkey extrastriate visual cortex. *Neuron* 45, 147–155.
- Leitch, M.M., Ingram, C.D., Young, A.H., McQuade, R., Gartside, S.E., 2003. Flattening the corticosterone rhythm attenuates 5-HT_{1A} autoreceptor function in the rat: relevance for depression. *Neuropharmacology* 28, 119–125.
- Lewis, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., Burge, C.B., 2003. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115, 787–798.
- Li, H., Ohishi, H., Kinoshita, E., Shigemoto, R., Nomura, S., Mizuno, N., 1997. Localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR7, in axon terminals of presumed nociceptive, primary afferent fibers in the superficial layers of the spinal dorsal horn: an electron microscope study in the rat. *Neurosci. Lett.* 223, 153–156.
- Liu, Y., Zhang, Y., Zhao, D., Dong, R., Yang, X., Tammimies, K., Uddin, M., Scherer, S.W., Gai, Z., 2015. Rare de novo deletion of metabotropic glutamate receptor 7 (GRM7) gene in a patient with autism spectrum disorder. *Am. J. Med. Genet., Part B: Neuropsychiatric Genetics* 168, 258–264.
- Lupien, S.J., McEwen, B.S., Gunnar, M.R., Heim, C., 2009. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 434–445.
- Luscher, C., Nicoll, R.A., Malenka, R.C., Muller, D., 2000. Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane. *Nat. Neurosci.* 3, 545–550.
- Luthi, A., Van der Putten, H., Botteri, F.M., Mansuy, I.M., Meins, M., Frey, U., Sansig, G., Portet, C., Schmutz, M., Schroder, M., Nitsch, C., Laurent, J.-P., Monard, D., 1997. Endogenous serine protease inhibitor modulates epileptic activity and hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci.* 17, 4688–99.
- Lu, Y.M., Jia, Z., Janus, C., Henderson, J.T., Gerlai, R., Wojtowicz, J.M., Roder, J.C., 1997. Mice lacking metabotropic glutamate receptor 5 show impaired learning and reduced CA1 long-term potentiation (LTP) but normal CA3 LTP. *J. Neurosci.* 17, 5196–5205.
- Malinow, R., Schulman, H., Tsien, R.W., 1989. Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* 225, 862866.
- Mansour, S.L., Thomas, K.R., Capecchi, M.R., 1988. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 336, 348–52.
- Martin, G.G., 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 7634–7638.
- Martín, R., Durroux, T., Ciruela, F., Torres, M., Pin, J.P., Sánchez-Prieto, J., 2010. The metabotropic glutamate receptor mGlu7 activates phospholipase C, translocates munc-13-1 protein, and potentiates glutamate release at cerebrocortical nerve terminals. *J. Biol. Chem.* 285, 17907–17917.
- Martín, R., Ladera, C., Bartolomé-Martín, D., Torres, M., Sánchez-Prieto, J., 2008. The inhibition of release by mGlu7 receptors is independent of the Ca²⁺ channel type but associated to GABAB and adenosine A1 receptors. *Neuropharmacology* 55, 464–473.
- Masugi, M., Yokoi, M., Shigemoto, R., Muguruma, K., Watanabe, Y., Sansig, G., Van der Putten, H., Nakanishi, S., 1999. Metabotropic glutamate receptor subtype 7 ablation causes deficit in fear response and conditioned taste aversion. *J. Neurosci.* 19, 955–963.
- Mayford, M., Siegelbaum, S.A., Kandel, E.R., 2012. Synapses and Memory Storage. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012. doi:10.1101/cshperspect.a005751
- McEwen, B.S., 2007. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol. Rev.* 87, 873–904.
- Mick, E., Neale, B., Middleton, F.A., McGough, J.J., Faraone, S.V., 2008. Genome-wide association study of response to methylphenidate in 187 children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am. J. Med. Genet., Part B: Neuropsychiatric Genetics* 147, 1412–1418.

- Milner, B., Squire, L.R., Kandel, E.R., 1998. Cognitive Neuroscience Review and the Study of Memory. *Neuron* 20, 445–468.
- Mitsukawa, K., Mombereau, C., Lotscher, E., Uzunov, D.P., Van der Putten, H., Flor, P.J., Cryan, J.F., 2006. Metabotropic glutamate receptor subtype 7 ablation causes dysregulation of the HPA axis and increases hippocampal BDNF protein levels: implications for stress-related psychiatric disorders. *Neuropharmacology* 51, 1112–1122.
- Mitsukawa, K., Yamamoto, R., Ofner, S., Nozulak, J., Pescott, O., Lukic, S., Stoehr, N., Mombereau, C., Kuhn, R., McAllister, K.H., Van der Putten, H., Cryan, J.F., Flor, P.J., 2005. A selective metabotropic glutamate receptor 7 agonist: activation of receptor signaling via an allosteric site modulates stress parameters in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 18712–18717.
- Mohajeri, M.H., Bartsch, U., Van der Putten, H., Sansig, G., Mucke, L., Schachner, M., 1996. Neurite outgrowth on non-permissive substrates in vitro is enhanced by ectopic expression of the neural adhesion molecule L1 by mouse astrocytes. *European J. Neurosci.* 8, 1085–97.
- Morris, G.M., 2003. Long-term potentiation and memory. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B: Biological Sciences* 358, 643–647.
- Nakamura, M., Kurihara, H., Suzuki, G., Mitsuya, M., Ohkubo, M., Ohta, H., 2010. Isoxazolopyridone derivatives as allosteric metabotropic glutamate receptor 7 antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 726–729.
- Nemeroff, C.B., Vale, W.W., 2005. The neurobiology of depression: inroads to treatment and new drug discovery. *J. Clin. Psychiatry*, suppl 7 66, 5–13.
- Nicoletti, F., Collingridge, G.L., Conn, P.J., Ferraguti, F., Schoepp, D.D., Wroblewski, J.T., Pin, J.P., 2011. Metabotropic glutamate receptors: From the workbench to the bedside. *Neuropharmacology* 60, 1017–1041.
- Niswender, C.M., Conn, P.J., 2010. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50, 295–322.
- Niswender, C.M., Johnson, K.A., Miller, N.R., Ayala, J.E., Luo, Q., Williams, R., Saleh, S., Orton, D., Weaver, C.D., Conn, P.J., 2010. Context-dependent pharmacology exhibited by negative allosteric modulators of metabotropic glutamate receptor 7. *Mol. Pharmacol.* 77, 459–468.
- Niu, W., Huang, X., Chen, S., Li, X., Wu, X., Cao, Y., Zhang, R., Bi, Y., Yang, F., Wang, L., Li, W., Xu, Y., He, L., He, G., 2015. Association study of GRM7 polymorphisms and schizophrenia in the Chinese Han population. *Neurosci. Lett.* 604, 109–112.
- Nuechterlein, K.H., Barch, D.H., Gold, J.M., Goldberg, T.E., Green, M.F., Heaton, R.K., 2004. Identification of separable cognitive factors in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 72, 29–39.
- O'Connor, R.M., Finger, B.C., Flor, P.J., Cryan, J.F., 2010. Metabotropic glutamate receptor 7: at the interface of cognition and emotion. *Eur. J. Pharmacol.* 639, 123–31.
- O'Connor, V., El Far, O., Bofill-Cardona, E., Nanoff, C., Freissmuth, M., Karschin, A., Airas, J.M., Betz, H., Boehm, S., 1999. Calmodulin dependence of presynaptic metabotropic glutamate receptor signaling. *Science* 286, 1180–1184.
- Ohtsuki, T., Koga, M., Ishiguro, Y., Horiuchi, Y., Arai, M., Niizato, K., Itokawa, M., Inada, T., Iwata, N., Iritani, S., Ozaki, N., Kunugi, H., Ujike, H., Watanabe, Y., Someya, T., Arinami, T., 2008. A polymorphism of the metabotropic glutamate receptor mGluR7 (GRM7) gene is associated with schizophrenia. *Schizophr. Res.* 101, 9–16.
- Okamoto, N., Hori, S., Akazawa, C., Hayashi, Y., Shigemoto, R., Mizuno, N., Nakanishi, S., 1994. Molecular Characterization of a New Metabotropic Glutamate Receptor mGluR7 Coupled to Inhibitory CyclicA MP Signal Transduction. *J. Biol. Chem.* 269, 1231–1236.
- Oliveira, L.C., Nobre, M.J., Brandao, M.L., Landeira-Fernandez, J., 2004. Role of amygdala in conditioned and unconditioned fear generated in the periaqueductal gray. *Neuroreport* 15, 2281–2285.

- Palazzo, E., Fu, Y., Ji, G., Maione, S., Neugebauer, V., 2008. Group III mGluR7 and mGluR8 in the amygdala differentially modulate nocifensive and affective pain behaviors. *Neuropharmacology*. *Neuropharmacology* 55, 537–545.
- Palmiter, R.D., Brinster, R.L., 1985. Transgenic mice. *Cell* 41, 343–5.
- Palucha, A., Klak, K., Branski, P., Van der Putten, H., Flor, P.J., Pilc, A., 2007. Activation of the mGlu7 receptor elicits antidepressant-like effects in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 194, 555–562.
- Park, S., Jung, S.W., Kim, B.N., Cho, S.C., Shin, M.S., Yoo, H.J., Cho, D.Y., Chung, U.S., Son, J.W., Kim, H.W., 2013. Association between the GRM7 rs3792452 polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder in a Korean sample. *Behav. Brain Funct.* 9.
- Park, S., Kim, B.N., Cho, S.C., Kim, J.W., Shin, M.S., Yoo, H.J., Han, D.H., Cheong, J.H., 2014. The metabotropic glutamate receptor subtype 7 rs3792452 polymorphism is associated with the response to methylphenidate in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* 24, 223–227.
- Pavlopoulos, E., Trifillieff, P., Chevalayre, V., Fioriti, L., Zairis, S., Pagano, A., Malleret, A., Kandel, E.R., 2011. Neuralized activates CPEB3: A function of nonproteolytic ubiquitin in synaptic plasticity and memory storage. *Cell* 147, 1369–1383.
- Paylor, R., Spencer, C.M., Yuva-Paylor, L.A., Pieke-Dahl, S., 2006. The use of behavioral test batteries, II: Effect of test interval. *Physiol. Behav.* 87, 95–102.
- Pekhletski, R., Gerlai, R., Overstreet, L.S., Huang, X.P., Agopyan, N., Slater, N.T., Abramow-Newerly, W., Roder, J.C., Hampson, D.R., 1996. Impaired cerebellar synaptic plasticity and motor performance in mice lacking the mGluR4 subtype of metabotropic glutamate receptor. *J. Neurosci.* 16, 6364–6373.
- Pelkey, K.A., Yuan, X., Lavezzari, G., Roche, K.W., McBain, C.J., 2007. mGluR7 undergoes rapid internalization in response to activation by the allosteric agonist AMN082. *Neuropharmacology* 52, 108–117.
- Perroy, J., Prezeau, L., De Waard, M., Shigemoto, R., Bockaert, J., Fagni, L., 2000. Selective blockade of P/Q-type calcium channels by the metabotropic glutamate receptor type 7 involves a phospholipase C pathway in neurons. *J. Neurosci.* 20, 7896–7904.
- Pin, J.P., Duvoisin, R.M., 1995. The Metabotropic Glutamate Receptors: Structure and Functions. *Neuropharmacology* 34, 1–26.
- Pulver, A.E., Lasseter, V.K., Kasch, L., Wolyniec, P., Nestadt, G., Blouin, J., Kimberland, M., Babb, R., Vouriis, S., Chen, H., Laloti, M., Morris, M.A., Karayiorgou, M., Ott, J., Meyers, D., Antonarakis, S.E., Housman, D., Kazazian, H.H., 1995. Schizophrenia: a genome scan targets chromosomes 3p and 8p as potential sites of susceptibility genes. *Am. J. Med. Genet.* 60, 252–260.
- Reichenberg, A., Weiser, M., Rapp, M.A., Rabinowitz, J., Caspi, A., Schmeidler, J., Knobler, H.Y., Lubin, G., Nahon, D., Harvey, P.D., Davidson, M., 2006. Premorbid intra-individual variability in intellectual performance and risk for schizophrenia: a population-based study. *Schizophr. Res.* 85, 49–57.
- Rescola, R.A., Wagner, A.R., 1972. A theory of Pavlovian conditioning: Variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement., in: *Classical Conditioning II: Current Research and Theory*. New York.
- Riedel, G., Casabona, G., Reymann, K.G., 1995. Inhibition of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats by the metabotropic glutamate receptor antagonist MCPG. *J. Neurosci.* 15, 87–98.
- Robertson, E., Badley, A., Kuehn, M., Evans, M., 1986. Germline transmission of genes introduced into cultured pluripotent cells by retroviral vector. *Nature* 323, 445–448.
- Rodrigues, S.M., LeDoux, J.E., Sapolsky, R.M., 2009. The influence of stress hormones on fear circuitry. *Annu. Rev. Neuroscience* 32, 289–313.
- Rodrigues, S.M., Schafe, G.E., LeDoux, J.E., 2004. Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala. *Neuron* 44, 75–91.

- Roozendaal, B., Williams, C.L., McGaugh, J.L., 1999. Glucocorticoid receptor activation in the rat nucleus of the solitary tract facilitates memory consolidation: involvement of the basolateral amygdala. *Eur. J. Neurosci.* 11, 1317–1323.
- Sandi, C., 2004. Stress, cognitive impairment and cell adhesion molecules. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 917–930.
- Sansig, G., Bushell, T.J., Clarke, T.J., Rozov, A., Burnashev, N., Portet, C., Gasparini, F., Schmutz, M., Klebs, K., Shigemoto, R., Flor, P.J., Kuhn, R., Knoepfel, T., Schroeder, M., Hampson, D.R., Collett, V.J., Zhang, C., Duvoisin, R.M., Collingridge, G.L., Van der Putten, H., 2001. Increased seizure susceptibility in mice lacking metabotropic glutamate receptor 7. *J. Neurosci.* 21, 8734–8745.
- Saugstad, J.A., Kinzie, J.M., Mulvihill, E.R., Segerson, T.P., Westbrook, G.L., 1994. Cloning and expression of a new member of the L-2-amino-4 phosphonobutyric acid-sensitive class of metabotropic glutamate receptors. *Mol. Pharmacol.* 45, 367–372.
- Schoepp, D.D., Jane, D.E., Monn, J.A., 1999. Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* 38, 1431–1476.
- Selden, N.R.W., Everitt, B.J., Jarrard, L.E., Robbins, T.W., 1991. Complementary roles for the amygdala and hippocampus in aversive conditioning to explicit and contextual cues. *Neuroscience* 42, 335–350.
- Serrano, P., Friedman, E.L., Kenney, J., Taubenfeld, S.M., Zimmerman, J.M., Hanna, J., Alberini, C., Kelley, A.E., Maren, S., Rudy, J.W., Yin, J.C., Sacktor, T.C., Fenton, A.A., 2008. PKMzeta maintains spatial, instrumental, and classically conditioned long-term memories. *PLOS Biol.* 6, 2698–706.
- Shepherd, G.M., 2009. *Creating Modern Neuroscience: The Revolutionary 1950s.*, 1 edition. ed. Oxford University Press.
- Shepherd, G.M., 1994. *Neurobiology*, 3rd edition. ed. Oxford University Press.
- Shibata, H., Tani, A., Chikuhara, T., Kikuta, R., Sakai, M., Ninomiya, H., Tashiro, N., Iwata, N., Ozaki, N., Fukumaki, Y., 2009. Association study of polymorphisms in the group III metabotropic glutamate receptor genes, GRM4 and GRM7, with schizophrenia. *Psychiatry Res.* 167, 88–96.
- Shigemoto, R., Kinoshita, E., Wada, E., Nomura, S., Ohishi, H., Takada, M., Flor, P.J., Neki, A., Abe, T., Nakanishi, S., Mizuno, N., 1997. Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 17, 7503–7522.
- Siegl, S., Flor, P.J., Fendt, M., 2008. Amygdaloid metabotropic glutamate receptor subtype 7 is involved in the acquisition of conditioned fear. *Neuroreport* 19, 1147–1150.
- Silva, A.J., Paylor, R., Wehner, J.M., Tonegawa, S., 1992a. Impaired spatial learning in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 257, 206–211.
- Silva, A.J., Stevens, C.F., Tonegawa, S., Wang, Y., 1992b. Deficient hippocampal long-term potentiation in a-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 257, 201–206.
- Smithies, O., Gregg, R.G., Boggs, S.S., Koralewski, M.A., Kucherlapati, R.S., 1985. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature* 317, 230–4.
- Squire, L., Kandel, E., 2005. *La mémoire*. Flammarion.
- Stachowicz, K., Branski, P., Klak, K., Van der Putten, H., Cryan, J.F., Flor, P.J., Andrzej, P., 2008. Selective activation of metabotropic G-protein-coupled glutamate 7 receptor elicits anxiolytic-like effects in mice by modulating GABAergic neurotransmission. *Behav. Pharmacol.* 19, 597–603.
- Ströhle, F., Holsboer, F., 2003. Stress responsive neurohormones in depression and anxiety. *Pharmacopsychiatry* 36, 207–214.
- Sukoff Rizzo, S.J., Leonard, S.K., Gilbert, A., Dollings, P., Smith, D.L., Zhang, M.Y., Lock, T., Kowal, D., Kramer, A., Randall, A., Huselton, C., Vishwanathan, K., Tse, S.Y., Butera, J., Ring, R.H., Rosenzweig-Lipson, S., Hughes, Z.A., Dunlop, J., 2011. The metabotropic glutamate receptor 7 allosteric modulator AMN082: A monoaminergic agent in disguise? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 338, 345–352.

- Suzuki, G., Tsukamoto, N., Fushiki, H., Kawagishi, A., Nakamura, M., Kurihara, H., Mitsuya, M., Ohkubo, M., Ohta, H., 2007. In vitro pharmacological characterization of novel isoxazolopyridone derivatives as allosteric metabotropic glutamate receptor 7 antagonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 323, 147–156.
- Swanson, C.J., Bures, M., Johnson, M.P., Linden, A.M., Monn, J.A., Schoepp, D.D., 2005. Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 131–144.
- Swanson, L.W., 2012. *Brain Architecture : understanding the basic plan.*, 2d edition. ed. Oxford University Press.
- Szeszko, P.R., Ardekani, B.A., Ashtari, M., Kumra, S., Robinson, D.G., Sevy, S., Gunduz-Bruce, H., Malhotra, A.K., Kane, J.M., Bilder, R.M., Lim, K.O., 2005. White matter abnormalities in first-episode schizophrenia or schizoaffective disorder: a diffusion tensor imaging study. *Am. J. Psychiatry* 162, 602–605.
- Thomas, K.R., Capecchi, M.R., 1987. Site-Directed Mutagenesis by Gene Targeting in Mouse Embryo-Derived Stem Cells. *Cell* 51, 503–512.
- Thomas, K.R., Polger, K.R., Capecchi, M.R., 1986. High Frequency Targeting of Genes to Specific Sites in the Mammalian Genome. *Cell* 44, 419–428.
- Tonegawa, S., Lill, Y., Erzurumlu, R.S., Jhaveri, S., Chen, C., Goday, Y., Paylor, R., Silva, A.J., Kim, J.J., Wehner, J.M., Stevens, C.F., Abeliovich, A., 1995. The gene knockout technology for the analysis of learning and memory, and neural development., in: *Gene Expression In Teh Central Nervous System, Progress In Brain Research.* pp. 3–14.
- Van Ameringen, M., Mancini, C., Szechtman, H., Nahmias, C., Oakman, J.M., Hall, G.B.C., Pipe, B., Farvolden, 2004. A PET provocation study of generalized social phobia. *Psychiatry Res. Neuroimaging* 132, 13–18.
- van der Staay, F.J., Steckler, T., 2001. Behavioural phenotyping of mouse mutants. *Behav. Brain Res.* 125, 3–12.
- Vincent, J.-D., Liedo, P.-M., 2013. *Le Cerveau sur mesure.* Odile Jacob.
- Waterson, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J.F., 2002. Mouse genome sequencing consortium. *Nature* 420, 520–62.
- Wong, E.A., Capecchi, M.R., 1986. Analysis of homologous recombination in cultured mammalian cells in transient expression and stable transformation assays. *Somat. Cell Mol. Genet.* 12, 63–72.
- Yang, Y., Calakos, N., 2013. Presynaptic long-term plasticity. *Front. Synaptic Neurosci.* 5, 8.
- Yang, Y., Pan, C., 2013. Role of metabotropic glutamate receptor 7 in autism spectrum disorders: a pilot study. *Life Sci.* 92, 149–153.
- Yokoi, M., Kobayashi, K., Manabe, T., Takahashi, T., Sakaguchi, I., Katsuura, G., Shigemoto, R., Ohishi, H., Nomura, S., Nakamura, M., Nakao, K., Katsuki, M., Nakanishi, S., 1996. Impairment of hippocampal mossy fiber LTD in mice lacking mGluR2. *Science* 273, 645–647.
- Zhang, C., Bertaso, F., Eulenburg, V., Lerner-Natoli, M., Herin, G.A., Bauer, L., Bockaert, J., Fagni, L., Betz, H., Scheschonka, A., 2008. Knock-in mice lacking the PDZ-ligand motif of mGluR7a show impaired PKC-dependent autoinhibition of glutamate release, spatial working memory deficits, and increased susceptibility to pentylenetetrazol. *J. Neurosci.* 28, 8604–8614.

Des souris *knock-out* pour le récepteur métabotrope au glutamate mGluR7 révèlent son rôle dans la cognition et les émotions

L'un des domaines clés de la recherche en neurosciences modernes consiste à comprendre les interactions complexes entre le stress et la génétique qui conduisent à la manifestation de troubles tels que la dépression, l'anxiété et le dysfonctionnement cognitif. Des preuves de plus en plus nombreuses suggèrent que le système glutamatergique peut être une cible thérapeutique pertinente pour de tels troubles. Le glutamate est le neurotransmetteur utilisé par la grande majorité des synapses excitatrices dans le cerveau. Et les sous-types des récepteurs métabotropique au glutamate (mGluR1 – mGluR8) agissent avant tout comme d'importants régulateurs postsynaptiques de la neurotransmission dans le système nerveux central (SNC), en fournissant un mécanisme par lequel les réponses synaptiques rapides à travers des canaux cationiques dépendants du glutamate peuvent être affinées. Ainsi, les récepteurs mGluR participent à une grande variété de fonctions du système nerveux central. Au sein de la famille des récepteurs métabotropiques au glutamate, le récepteur présynaptique mGluR7 montre la conservation évolutive la plus élevée et on pense qu'il agit comme un régulateur de la libération de neurotransmetteurs. Le récepteur mGluR7 est également le plus largement distribué des récepteurs présynaptiques mGluR, présent sur une large gamme de synapses démontrées comme critiques à la fois dans le fonctionnement normal du système nerveux central, mais également dans une large gamme de troubles psychiatriques et neurologiques. De plus, un nombre croissant de preuves expérimentales suggèrent que le récepteur mGluR7 est non seulement un acteur clé dans l'élaboration de réponses synaptiques au niveau des synapses glutamatergiques, mais qu'il est également un régulateur clé de la transmission GABAergique inhibitrice. Le développement d'outils pharmacologiques et génétiques sélectifs a permis le démantèlement de la fonction du récepteur mGluR7 dans une multitude de processus physiologiques et comportementaux. Ainsi les souris *knock-out* ont mis en évidence un rôle du récepteur mGluR7 dans l'anxiété, le conditionnement de la peur, l'aversion, l'apprentissage et la mémoire spatiale. De plus, ces souris dépourvues du récepteur métabotrope mGluR7 démontrent une sensibilité accrue aux crises épileptiques suggérant un rôle unique de ce récepteur dans la régulation de l'excitabilité neuronale. De même, une altération de la plasticité synaptique à court terme dans les souris transgéniques dépourvues du récepteur métabotrope au glutamate mGluR7 démontre que l'absence de récepteurs mGluR7 engendre des altérations de la plasticité synaptique à court terme dans l'hippocampe. En outre, la découverte et la caractérisation récente du premier antagoniste allostérique agissant sur le domaine VFTD de l'extrémité N-terminale du récepteur mGluR7 potentialise définitivement les observations effectuées sur les souris mGluR7 *knock-out* quant à la fonction de ce récepteur dans l'anxiété et la dépression. Ensemble, ces données suggèrent que le récepteur mGluR7 est un important régulateur de la fonction glutamatergique, de la peur, de l'aversion et de la cognition et donc ce récepteur représente une cible thérapeutique innovante pour les troubles liés au stress à l'interface de la cognition et de l'anxiété.

Metabotropic glutamate receptors (mGluRs) consist of eight different subtypes and exert their effects on second messengers and ion channels via G-proteins. The function of individual mGluR subtypes in the CNS, however, largely remains to be clarified. To study the role of mGluR7 receptors, we used homologous recombination to generate mice lacking this metabotropic receptor subtype (mGluR7). Immunohistochemical and immunoelectron-microscopic analyses showed that mGluR7 is highly expressed in amygdala and preferentially localized at the presynaptic axon terminals of glutamatergic neurons, suggesting strongly that mGluR7 is involved in neural processes subserving amygdala-dependent aversive responses. To examine amygdala-dependent behavior, we examined first the fear response of freezing after electric shock in wild-type and mGluR7 (mGluR7^{-/-}) knockout littermates. Wild-type mice displayed freezing immediately after footshock. In comparison, mGluR7 knockout mice showed significantly reduced levels in both immediate postshock and delayed freezing responses. However, the knockout mice exhibited no abnormalities in pain sensitivity and locomotor activity. Secondly, we performed conditioned taste aversion (CTA) experiments. In wild-type mice, the administration of saccharin followed by intraperitoneal injection of the malaise-inducing agent LiCl resulted in an association between saccharin and LiCl. This association caused strong CTA toward saccharin. In contrast, mGluR7 knockout mice failed to associate between the taste and the negative reinforcer in CTA experiments. Again, the knockout mice showed no abnormalities in taste preference and in the sensitivity to LiCl toxicity. These results indicated that mGluR7 deficiency causes an impairment of two distinct amygdala-dependent behavioral paradigms. Because the amygdala function is essential for these two distinct behavioral paradigms, our results suggest that mGluR7 is critical in amygdala function. The amygdala is a brain region that is known to be critical for the manifestation of anxiolysis and antidepressant action and glutamatergic neurotransmission has been strongly implicated in the pathophysiology of affective disorders. To this end we analyzed the behavioral profiles of mGluR7^{-/-} mice in animal models of depression and anxiety. mGluR7^{-/-} mice were compared to wildtype littermates and showed substantially less behavioural immobility in both the forced swim test and the tail suspension test. Both behavioural paradigms are widely used to predict antidepressant-like activity. Further, mGluR7^{-/-} mice displayed anxiolytic activity in four different behavioural tests namely the light-dark box, the elevated plus maze, the staircase test, and the stress-induced hyperthermia test, while their cognitive performance was normal in the passive avoidance paradigm. Analysis of locomotor activity in a novel environment demonstrated that mGluR7^{-/-} mice were slightly more active in the initial minutes following placement in the chamber only. Together, these data suggest that mGluR7 may play a pivotal role in mechanisms that regulate behavioural responses to aversive states. Moreover, this studies demonstrate that selective ablation of mGluR7 is associated with changes in animal behavioural paradigms predictive of antidepressant and anxiolytic action. Furthermore, after the serendipitous discovery of a sensory stimulus-evoked epileptic phenotype in mGluR7 knockout mice, we tested two convulsant drugs, pentylenetetrazole (PTZ) and bicuculline. In animals aged 12 weeks and older, subthreshold doses of these drugs induced seizures in mGluR7^{-/-}, but not in mGluR7^{+/-}, mice. PTZ-induced seizures were inhibited by three standard anticonvulsant drugs, but not by the group III selective mGluR agonist (R,S)-4-phosphonophenylglycine (PPG). Consistent with the lack of signs of epileptic activity in the absence of specific stimuli, mGluR7^{-/-} mice showed no major changes in synaptic properties in two slice preparations. However, slightly increased excitability was evident in hippocampal slices. In addition, there was slower recovery from frequency facilitation in cortical slices, suggesting a role for mGluR7 as a frequency-dependent regulator in presynaptic terminals.

Moreover, mGluR7 is highly expressed at synapses made between CA3 and CA1 pyramidal neurons in the hippocampus. This input, the Schaffer collateral-commissural pathway, displays robust long-term potentiation (LTP), a process believed to utilise molecular mechanisms that are key processes involved in the synaptic basis of learning and memory. We found that LTP could be induced in mGluR7^{-/-} mice and that once the potentiation had reached a stable level there was no difference in the magnitude of LTP between mGluR7^{-/-} mice and their littermate controls. However, the initial decremental phase of LTP, known as short-term potentiation (STP), was greatly attenuated in the mGluR7^{-/-} mouse. In addition, there was less frequency facilitation during, and less post-tetanic potentiation following, a high frequency train in the mGluR7^{-/-} mouse showing that the absence of mGluR7 receptors results in alterations in short-term synaptic

plasticity in the hippocampus. Based on this Electrophysiological results, we expand on the role of mGluR7 in learning and memory by describing the effect of mGluR7 gene ablation in different learning paradigms. In the acoustic startle response (ASR), no differences were seen between knockout mice and wildtype littermates in parameters including prepulse inhibition and habituation. In an open field test, no differences were seen between genotypes in motor activity, exploratory behaviour, and fearful behaviour. In a T-maze reinforced alternation working memory (WM) task, again no difference was seen between groups. However, when increasing the demands on working-memory in a 4-arm and 8-arm maze task, KO mice committed more WM errors than WT littermates thereby uncovering a highly significant difference between the two groups that persisted every day for the whole 9 days of the experiment. In a 4-arm maze with 2 arms baited, KO and wildtype mice committed the same number of LTM errors, whereas KOs committed more WM errors. Altogether, these findings suggest that a lack of mGluR7 mainly impairs short-term working but not long-term memory performance while having no effect on sensorimotor processing, non-associative learning, motor activity and spatial orientation.