Monoxyde d'azote et mémoire olfactive : du rat au mouton... La mise en évidence de la synthèse de monoxyde d'azote (NO) dans les neurones à la suite d'une activation des récepteurs du glutamate par l'équipe de John Garthwaite en 1988 [1] a bouleversé les schémas classiques de la neurotransmission. En effet, le NO, gaz diffusible, est capable de véhiculer librement des informations du neurone dans lequel il est synthétisé vers les neurones adjacents. Cette propriété a rapidement conduit de nombreux auteurs à suggérer que le NO constituait le messager transsynaptique rétrograde impliqué dans la potentialisation à long terme (LTP), un modèle de mémoire au niveau cellulaire particulièrement bien caractérisé, hypothèse qui a récemment été démontrée sans ambiguïté par le groupe de Kandel [2]. Des études comportementales réalisées parallèlement à ces expériences d'électrophysiologie ont également permis de mettre en évidence l'implication du NO dans certaines formes d'apprentissage. Ainsi, le groupe d'Andréas Böhme, des Laboratoires Rhône-Poulenc Rorer, a démontré en 1993 que l'administration périphérique à des rats d'un inhibiteur de la NO-synthase, la N^{ω}-nitro-L-arginine, diminuait leur faculté d'apprentissage dans un test de mémorisation de l'espace [3]. Ces auteurs ont également observé que la mémoire olfactive était altérée par ce traitement. En effet, dans un test de reconnaissance sociale fondé sur la mémoire olfactive, la durée de la période d'exploration de rats juvéniles par des rats adultes qui leur sont familiers est significativement accrue lorsqu'ils ont été traités par l'inhibiteur de la NO-synthase. Le rôle du NO dans la mémoire olfactive vient d'être également confirmé dans une étude réalisée chez le mouton [4]. Pendant les deux heures qui suivent la naissance de leurs agneaux, les brebis apprennent à reconnaître spécifiquement l'odeur de leurs agneaux et cet apprentissage implique des changements de l'efficacité synaptique dans le bulbe olfactif, notamment au niveau des synapses réciproques entre les cellules mitrales (excitatrices) et cellules granulaires (inhibitrices). Plusieurs données comportementales démontrent d'abord l'implication du NO dans ce processus d'apprentissage : (1) il est inhibé par la perfusion dans le bulbe olfactif (par microdialyse) de N^{ω}-nitro-L-arginine ou d'ODQ, un inhibiteur de la guanylyl cyclase cytosolique ; (2) l'effet inhibiteur de la N^{ω}-nitro-L-arginine, mais pas celui de l'ODQ, peut être inversé par une perfusion de SNAP, un agent libérant spontanément du NO, suggérant que l'effet du NO implique une activation de la guanylyl cyclase ; (3) cette période d'apprentissage s'accompagne d'une libération importante de NO et de GMP cyclique dans le bulbe olfactif, à l'origine d'une libération accrue de glutamate ; (4) il faut enfin noter qu'au terme de cette période d'apprentissage, la reconnaissance des agneaux par leur mère devient indépendante du NO : l'odeur de l'agneau provoque alors une libération importante de glutamate dans le bulbe olfactif ne requérant plus la formation de NO. Au terme de leur étude, les auteurs proposent un modèle séduisant dans lequel le NO est l'origine de modifications de l'efficacité de circuits neuronaux localisés dans le bulbe olfactif, responsables de la formation de la mémoire olfactive, permettant aux brebis de reconnaître leurs propres agneaux : la naissance est suivie d'une diminution de l'activité des cellules granulaires, à l'origine d'une désinhibition des cellules mitrales. Il s'ensuit une libération accrue de glutamate provoquant une formation de NO dans les cellules mitrales et granulaires. Le NO, selon un mécanisme paracrine et autocrine, active alors la guanylyl cyclase sélectivement localisée dans les cellules mitrales. Le GMPc est à l'origine d'une augmentation prolongée de la sensibilité des cellules mitrales responsable du phénomène d'apprentissage. Le NO pourrait donc être impliqué dans de nombreux processus de mémorisation faisant intervenir des mécanismes très différents.

[1. Garthwaite J, *et al. Nature* 1988 ; 336 : 385-8.]
[2. Arancio O, *et al. Cell* 1996 ; 87 : 1025-35.]
[3. Böhme GA, *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 9191-4.]
[4. Kendrick KM, *et al. Nature* 1997 ; 388 : 670-4.]

Méthylation de protéines au programme de la différenciation neuronale par le NGF ! Familière aux biologistes moléculaires, la méthylation des gènes est reconnue comme un processus déterminant dans la régulation transcriptionnelle. Récemment prise en considération, la méthylation des protéines pourrait, elle aussi, constituer un élément essentiel de la signalisation, voire de la différenciation cellulaire. En effet, une équipe new-yorkaise vient de démontrer que l'induction de la différenciation des cellules PC12 (phéochromocytomes de rat) en cellules nerveuses par le facteur neurotrophique NGF *(nerve growth factor)* met en jeu un processus de méthylation/déméthylation de protéines cellulaires spécifiques d'origines nucléaire, cytosolique et membranaire [1]. Parmi les nombreuses protéines concernées, treize (de 50 à 68 kDa) ont été distinctement identifiées : le degré de méthylation est augmenté pour 6 d'entre elles, et diminué pour 4 autres ; 3 protéines sont nouvellement méthylées. L'effet du NGF est relativement spécifique : l'insuline est inactive, et l'EGF stimule la méthylation de 3 protéines, protéines d'ailleurs déméthylées par le NGF. La méthylation des protéines a lieu entre 1 heure et 8 heures après l'ajout du facteur neurotrophique et, comme la déméthylation, persiste au moins 4 jours, période au cours de laquelle 50 % des cellules PC12 développent des neurites. Fait important, un inhibiteur spécifique du processus

de méthylation, le DHCA (*9-(trans-2', trans-3'-dihydrocyclopent-4'-enyl)-adenine*), capable de bloquer l'effet du NGF sur la méthylation des protéines, bloque également la poussée neuritique normalement induite par le NGF. En outre, le DHCA ne modifie ni la croissance ni l'apoptose cellulaires, ni la phosphorylation par le NGF du récepteur tyrosine kinase (Trk), de la tyrosine hydroxylase ou d'autres protéines. Seule une diminution de la phosphorylation de deux protéines impliquées dans la poussée neuritique (chartine et β-tubuline) est observée. Alors que les effets du DHCA sont retardés et diminués lorsque les cellules sont préincubées avec le NGF, ils sont rapidement inversés après retrait de l'agent. La méthylation des protéines est donc clairement mise en jeu lors de l'induction de la croissance neuritique par le NGF. Alors que de nombreuses protéines carboxyméthylées ou amino-méthylées sont déjà identifiées (protéines de la famille Ras et Rho, histones, calmoduline, actine ...), il est probable que ces nouveaux éléments conduiront à mieux comprendre les voies impliquées dans la transmission du signal et, pourquoi pas, dans la différenciation cellulaire.

[1. Cimato TR, *et al. J Cell Biol* 1997 ; 138 : 1089-103.]

Un gène *per* murin, nouvelle pièce de l'horloge biologique des mammifères. S'il est un sujet que les lecteurs de *médecine/sciences* ont pu suivre régulièrement depuis la première année de notre parution, c'est bien celui du mécanisme moléculaire des rythmes biologiques. C'est ainsi que nous avons présenté, successivement, le rôle du gène *period (per)* de drosophile (*m/s n° 4, vol. 2, p. 223)*, de l'interaction de son produit avec celui du gène *timeless (tim)* [1], puis des systèmes équivalents chez *Neurospora crassa (m/s n° 8-9, vol. 13, p. 1074)*, et enfin de la découverte du gène *Clock* de souris *(m/s n° 11, vol. 12, p. 1261)*. Nous avons également indiqué le rôle essentiel que joue probablement le noyau supra-chiasmatique dans le contrôle des rythmes biologiques [2]. Enfin, nous avons vu récemment que la plupart des produits de ces gènes impliqués dans le contrôle des rythmes biologiques avaient un domaine protéique conservé, le domaine PAS, qui semble jouer habituellement un rôle dans l'interaction entre protéines *(m/s n° 8-9, vol. 13, p. 1074)*. Deux équipes différentes viennent de décrire, l'une dans la revue *Cell* [3] et l'autre dans la revue *Nature* [4], les gènes *per* de mammifère, de souris et d'homme. Le premier groupe, localisé à Houston (TX, USA) travaillait sur un tout autre sujet et cherchait à isoler des gènes codant pour des protéines régulatrices sur le chromosome 17. Parmi les produits de leur chasse, ils isolèrent ainsi un gène *RIGUI* chez l'homme (et son équivalent *m-rigui* chez la souris) ; les protéines déduites avaient 44 % de similitude en acides aminés avec la protéine PER, et lui ressemblaient encore plus dans la région PAS. La seconde équipe, japonaise (Tokyo et Kobé), cherchait manifestement des gènes *per* de mammifère et utilisa pour les isoler une technique sophistiquée de PCR ciblée vers la région PAS. Alors que la protéine CLOCK, identifiée cette année, est clairement un facteur de transcription possédant un domaine de dimérisation bHLH comme de probables facteurs homologues chez *Neurospora crassa (m/s n° 8/9, vol. 13, p. 1074)*, les protéines PER de drosophile de souris ou d'homme sont dépourvues d'un tel domaine bHLH et on n'a aucune indication qu'elles codent pour des facteurs de transcription. Cependant, chez la drosophile, on sait que la protéine PER, hétérodimérisée avec la protéine TIM, est transportée dans le noyau où elle joue probablement son rôle régulateur [1]. On peut donc supposer que les protéines PER de mammifère doivent, de même, avoir un partenaire, qui pourrait être l'homologue de la protéine TIM de drosophile. Une observation renforce le sentiment selon lequel les protéines PER de mammifère pourraient jouer un rôle dans les mécanismes des horloges biologiques : les deux équipes montrent en effet que l'accumulation de l'ARN messager *per* au niveau du noyau supra-chiasmatique est maximal à 11 heures du matin alors que le messager est à peine détectable à 11 heures du soir. Il est probable que les gènes *m-rigui* et *per* sont identiques, quoique l'équipe américaine rapporte l'existence dans la séquence codante d'une région potentielle bHLH, non notée par l'équipe japonaise. De plus, une oscillation du messager *m-rigui* est rapportée dans la rétine. Quelle est la relation entre la protéine CLOCK et la protéine PER/RIGUI ? CLOCK est un facteur de transcription qui possède également un domaine PAS. Est-il le partenaire de PER/RIGUI, jouant le même rôle que TIM chez la drosophile ? Ou bien ces deux molécules font-elles partie d'une même cascade, jouant un rôle à des niveaux différents ? Nul doute que les progrès qui seront maintenant faits dans l'isolement des différents composants des horloges biologiques de mammifères seront rapides.

[1. Couderc J. *Med Sci* 1996 ; 12 : 798-801.]
[2. Mick G, Jouvet M. *Med Sci* 1995 ; 11 : 52-61.]
[3. Sun SZ, *et al. Cell* 1997 ; 90 : 1003-11.]
[4. Tei H, *et al. Nature* 1997 ; 389 : 512-6.]

DISPONIBLE EN VIDÉOCASSETTE
La journée Jean-Claude DREYFUS
RÉCEPTEURS ET MALADIES
Paris le 19 septembre 1997
sur deux vidéocassettes VHS
Nombreux autres congrès, liste sur demande
Pour information, contacter :
Professeur Gérard MELKI
Tél. : 02 99 33 69 64 - Fax : 02 99 33 68 78
E-MAIL : gérard.melki@univ-rennes1.fr