

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

L'IMPLICATION DE LA PROTÉINE RIBOSOMALE P70 S6K
DANS L'APPRENTISSAGE MOTEUR CHEZ LA SOURIS

MÉMOIRE PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA
MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
ANNE-SOPHIE ALLAIN

AOÛT 2021

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

I am among those who think that science has great beauty. A scientist in his laboratory is not a mere technician: he is also a child confronting natural phenomena that impress him as though they were fairy tales.

- Marie Curie

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur Michel Cyr pour m'avoir donné la chance d'initier mon travail en recherche dans son laboratoire lors de mon stage de fin de baccalauréat et durant ma maitrise. Son support, sa confiance et ses précieux conseils me serviront certainement dans le futur. Merci de m'avoir permis de grandir intellectuellement, d'avoir été aussi disponible et de m'avoir guidé tous au long de mon parcours aux cycles supérieurs. Vous avez beaucoup influencé mon futur dans le domaine de la recherche en neuroscience, au plaisir de se rencontrer dans un futur congrès.

Un merci tout particulier à Élise Pépin, pour sa patience, son honnêteté et surtout sa grande disponibilité, merci d'avoir cru en moi et de m'avoir permis d'apprendre autant lors de mes débuts au laboratoire. Merci à Maxence Brouillette d'avoir fait partie de mon équipe de recherche, même si notre collaboration fut courte, j'ai beaucoup appris avec lui et ce fut un plaisir. Je tiens à remercier la stagiaire au baccalauréat en biologie médicale Amélie Derome que j'ai encadrée. J'ai pu acquérir des compétences de leaderships et une maitrise des techniques afin de les communiquer. Merci à mes collègues des laboratoires de Marc Germain et Geneviève Pépin, ce fut un plaisir de partager l'espace de travail avec vous tous. Je souhaite aussi donner toute ma gratitude aux techniciens et techniciennes de l'animalerie de l'UQTR, particulièrement à Nadia Desnoyers et Christel Perron pour leur temps et leur patience.

Je souhaite remercier ma famille, mes parents et mon frère, de m'avoir accompagné tout au long de mon cheminement, rien n'aurait été possible sans votre soutien, votre aide et votre écoute. Et un énorme merci tout personnel pour mon copain, Cédrick, pour son écoute lorsque je lui décrivais mes expériences avec passion, pour son aide précieuse de correcteur grammaticale et pour sa patience tout au long de ma maitrise.

Je tiens à remercier finalement le laboratoire de Michel Cyr pour le soutien financier lors de ma première année de maitrise ainsi que le Fonds de recherche du Québec – Santé pour la bourse de maitrise lors de ma deuxième année.

Bref, merci à vous tous qui m'avez aidé à votre façon.

RÉSUMÉ

La mémoire comme nous la connaissons est possible suite à un réarrangement des neurones lorsque nous sommes soumis à un nouvel apprentissage, la cible mammifère de la rapamycine (mTOR) est connue pour jouer un rôle central. Par exemple, les changements neuronaux et les processus biologiques qui sont associés à l'autisme, une condition où les enfants ont un retard d'apprentissage moteur, sont associés à des dysfonctionnements de la voie de signalisation mTOR. Cependant, nous ne connaissons toujours pas l'implication exacte de la voie de signalisation dans les processus moléculaires de l'apprentissage moteur, ce qui fait encore l'objet de recherches approfondies. Une étude récente a montré que mTOR utilise des partenaires moléculaires comme la protéine ribosomale S6 kinase beta-1 (p70 S6K) pour initier la formation de nouvelles connexions neuronales. Notre recherche a permis d'établir le rôle de mTOR et p70 S6K lors de l'apprentissage intra et intersession d'une tâche motrice complexe chez la souris en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques sélectifs, soit la rapamycine et le PF4708671 respectivement. En utilisant trois cohortes de souris, nous avons étudié l'effet des traitements pendant l'apprentissage du rotarod accéléré au jour 1, 2 et 3. La première cohorte a été injectée 1 heure ou 15 minutes avant les entraînements pour étudier l'effet intrasessions. La deuxième cohorte a été injectée après les entraînements pour examiner l'effet intersessions. La troisième cohorte a été injectée avant le jour 4, sans injection les jours 1, 2 et 3. Cette dernière cohorte a également été testée pour la force motrice et la coordination. Nos résultats démontrent que la voie de signalisation, via la protéine p70 S6K, joue un rôle essentiel lors de l'apprentissage intrasession. En revanche, elle pourrait ne pas être nécessaire pour l'apprentissage intersession. De plus, nous établissons que l'activation de P70 S6K ne serait pas impliquée dans l'exécution ainsi que les capacités motrices lorsqu'une tâche est déjà apprise. L'impact de la voie mTOR sur les compétences d'apprentissage moteur est important afin de mieux comprendre les bases de la neurophysiologie et des maladies neurologiques affectant le mouvement.

Mots-clés : Apprentissage moteur, mémoire motrice, mTOR, P70 S6K, Rapamycine, PF4706871.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ	iv
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	x
CHAPITRE I.....	1
INTRODUCTION	1
1.1 La mémoire	1
1.1.1 La mémoire explicite.....	2
1.1.2 La mémoire implicite	2
1.2 L'initiation et exécution d'un mouvement.....	4
1.3 L'apprentissage d'une tâche motrice	7
1.4 Le striatum et l'apprentissage moteur	10
1.5 La mémoire motrice au niveau moléculaire.....	12
1.6 Voie de signalisation mTOR	15
1.6.1 Protéine mTOR	15
1.6.2 Régulation de mTORC1.....	17
1.6.3 Protéine P70 S6K et sa régulation.....	19
1.7 Inhibition de la voie de signalisation mTORC1.....	21
1.7.1 La rapamycine.....	21
1.7.2 Le PF4708671	23
CHAPITRE II	24
RATIONNELLE ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHES.....	24
2.1 Est-ce que l'administration de la rapamycine et de PF4708671 affecte la voie de signalisation mTOR dans le striatum de cerveau de souris?	24
2.2 Est-ce que les inhibiteurs de la voie de signalisation mTOR ont un impact sur l'exécution, la coordination et la capacité motrice des souris?	26
2.3 Est-ce que l'inhibition de la voie de signalisation mTOR impacte l'effet intersession d'un nouvel apprentissage moteur chez la souris?	27
2.4 Est-ce que l'inhibition de la voie de signalisation mTOR impacte l'effet intrasession d'un nouvel apprentissage moteur chez la souris?	28

CHAPITRE III.....	29
MÉTHODOLOGIE	29
3.1 Animaux.....	29
3.2 Analyse biochimique.....	29
3.2.1 Échantillons.....	29
3.2.2 Western blot	30
3.2.3 Stripage de membrane.....	31
3.3 Traitements pharmacologiques	32
3.4 Tests moteurs	32
3.4.1 Rotarod accéléré.....	32
3.4.2 « Wire suspension test ».....	33
3.4.3 « Beam test ».....	34
3.5 Description des groupes expérimentaux	34
3.6 L'analyse des données	36
CHAPITRE IV	37
RÉSULTATS	37
4.1 Effet de l'administration de la rapamycine et du PF4708671 sur la quantité des protéines impliquées dans la voie de signalisation mTOR dans le striatum de souris	37
4.2 Impact de l'inhibition de la voie de signalisation mTOR sur l'exécution, la coordination et la capacité motrice des souris.....	40
4.3 Impact de l'inhibition de la voie de signalisation mTOR sur l'effet intersession d'un nouvel apprentissage moteur chez la souris.....	42
4.4 Impact de l'inhibition de la voie de signalisation mTOR sur l'effet intrasession d'un nouvel apprentissage moteur chez la souris.....	44
CHAPITRE V.....	48
DISCUSSION	48
5.1 Effet de l'administration de la rapamycine et du PF4708671 sur la voie de signalisation mTOR au niveau moléculaire dans le striatum de souris	48
5.2 Impact de l'inhibition de la voie de signalisation mTOR sur l'exécution, la coordination et la capacité motrice des souris.....	50
5.3 Impact de l'inhibition de la voie de signalisation mTOR sur l'effet intersession d'un nouvel apprentissage moteur chez la souris.....	51
5.4 Impact de l'inhibition de la voie de signalisation mTOR sur l'effet intrasession d'un nouvel apprentissage moteur chez la souris.....	52

CHAPITRE VI.....	59
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE	59
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	63

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
3.1 Liste des anticorps primaires utilisés pour la technique de Western Blot	31

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Représentation des différents types de mémoire	1
1.2	Différentes régions du cerveau humain impliquées dans la réalisation d'un mouvement.....	4
1.3	Organisation des structures nerveuses impliquées dans le contrôle des mouvements chez l'humain	7
1.4	Schéma des différentes phases de l'apprentissage moteur	9
1.5	Traduction par la protéine mTORC1	13
1.6	Complexe mTORC1 et les substrats qu'il régule	16
1.7	Modèle de voie de signalisation mTORC1	18
1.8	Modèle de signalisation de P70 S6K	20
1.9	Schéma de la voie de signalisation mTOR et l'impact de l'inhibition de la rapamycine	22
3.1	Rotarod.....	33
3.2	« Wire suspension test »	33
3.3	« Beam test ».....	34
3.4	Modèle expérimental	35
4.1	Effets des traitements à la rapamycine et du PF4708671 sur la quantité des protéines de la voie mTOR dans le striatum	39
4.2	Effet des inhibiteurs de mTOR et de P70, par la rapamycine et le PF4708671 respectivement, sur des tests de la capacité motrice.....	42
4.3	Effet de la rapamycine et du PF4708671 sur l'apprentissage intersession	44
4.4	Effet de la rapamycine sur l'apprentissage moteur intrasession.....	45
4.5	Effet du PF4708671 sur l'apprentissage moteur intrasession.....	47
51	Implication de la voie des MAP kinases dans l'activation de mTOR et P70 S6K	57

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

4E-BP1/2	eIF4E-binding proteins 1 and 2
ARNm	ARN messager
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
DEPTOR	DEP domain-containing mTOR-interacting protein
DLS	Région dorso-latérale du striatum
DMS	Région dorso-médiale du striatum
eEF2K	Eukaryotic elongation factor-2 kinase
eIF4GI	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1
eIF4B	Eukaryotic translation initiation factor 4B
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinases 1/2
FKBP12	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
GAPs	GTPase-Activating Proteins
IGF	Insulin-like growth factor-1
IP	Intrapéritonéale
KO	Knock-out
LTP	Potentialisation à long terme
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MEK1/2	Mitogen-activated protein kinase kinase 1/2
mLST8	Mammalian lethal with SEC13 protein 8
mTOR	Mammalian target of rapamycin
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex 1
mTORC2	Mammalian target of rapamycin complex 2
NMDA	N-méthyl-D-aspartate

PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKCa	Protein kinase C alpha type
PRAS40	Proline-rich Akt substrate of 40 kDa
RAPTOR	Regulatory-associated protein of mTOR
Rheb	Ras homolog enriched in brain
Rictor	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
rpS6	Ribosomal subunit protein S6
Ser	Sérine
SGK1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
Thr	Thréonine
TSC1/2	Tuberous sclerosis complex 1 and 2

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 La mémoire

La mémoire est un phénomène fondamental et essentiel à la survie. En effet, chez l'humain, les souvenirs façonnent notre identité, nos souvenirs guident nos pensées et nos décisions. Sur la base de leur durée, la mémoire peut être classée en mémoire à court terme et à long terme. Ces deux types de mémoire peuvent être distingués sur la base de leurs mécanismes biologique. En effet, la mémoire à court terme repose sur des réseaux existants tandis que la mémoire à long terme repose sur des changements structurels et fonctionnels dans le cerveau (Bisaz, Travaglia et al. 2014).

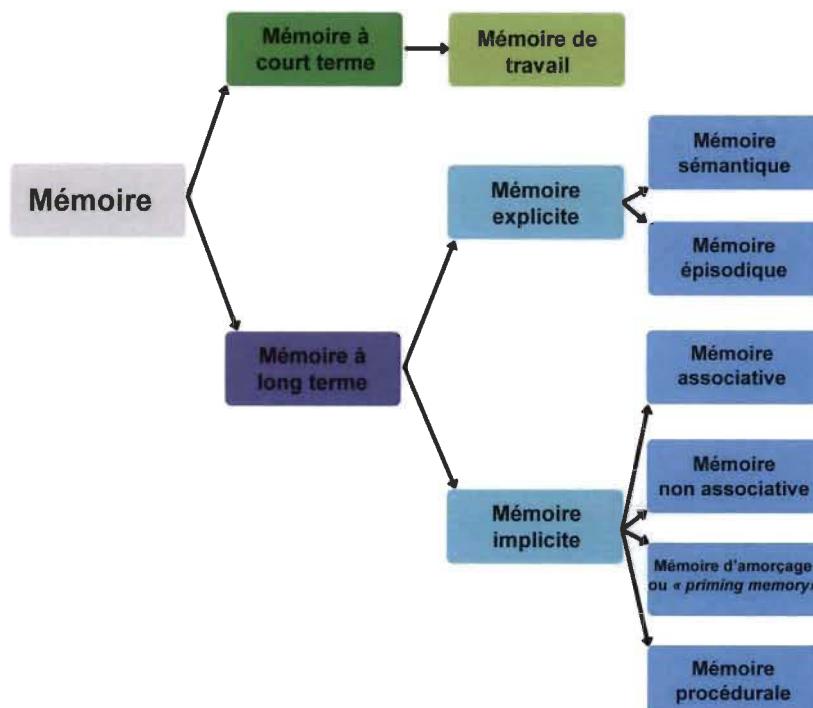


Figure 1.1 Représentation des différents types de mémoire.

(Adapté de (Camina et Guell 2017))

La mémoire à long terme peut être divisée en deux façons distinctes d'emmagasiner l'information, soit de façon consciente (explicite) ou de façon inconsciente (implicite). La mémoire implicite est la capacité de se rappeler des informations de façon inconsciente (Camina et Guell 2017).

1.1.1 La mémoire explicite

La mémoire explicite comprend deux grands types, soit la mémoire sémantique et la mémoire épisodique.

La mémoire sémantique est l'un des traits les plus caractéristiques de l'être humain, elle englobe toutes les connaissances que nous avons. Par exemple, c'est la mémoire sémantique qui nous permet de nous souvenir des noms, des numéros de téléphone, des faits historiques, les associations entre les concepts, etc. Ce type de mémoire est celui dont on fait régulièrement référence et où certaines pathologies de la mémoire peuvent agir (Binder et Desai 2011). La mémoire épisodique, quant à elle, est la capacité d'apprendre, de stocker et de récupérer des informations lors d'expériences personnelles qui se produise dans la vie de tous les jours. Ces informations sont souvent des moments et des lieux d'évènement marquant (Dickerson et Eichenbaum 2010).

1.1.2 La mémoire implicite

La mémoire implicite est la capacité de se rappeler des informations de façon inconsciente. Celle-ci peut être séparée en quatre différents types, soit la mémoire associative, non associative, d'amorçage ou « priming » et la mémoire procédurale.

La mémoire associative est le stockage ainsi que la récupération d'information par l'association avec d'autres informations. Un très bon exemple de ce type de mémoire est le conditionnement opérant, bien étudier par Pavlov en 1927. En effet, le chien de Pavlov

avait associé le bruit de cloche avec la présence de nourriture, et donc le chien salivait au simple bruit de la cloche (Rehman, Mahabadi et al. 2021). La mémoire non associative, quant à elle, fait référence à un comportement nouvellement appris par l'exposition répétée à un stimulus isolé. Ce type de mémoire est expliqué, entre autres, par le fonctionnement de l'habituation et de la sensibilisation (Camina et Guell 2017), par exemple la régulation par le cycle circadien (Fernandez, Lyons et al. 2003). Pour ce qui est de la mémoire d'amorçage ou « priming », elle fait référence à l'effet par lequel l'exposition à un certain stimulus est capable d'influencer la réponse à des stimuli présentés dans le futur (Camina et Guell 2017). Par exemple, si on demande à une personne d'associer un mot à la couleur « jaune », elle aura plus de chance de choisir le mot « banane » plutôt que d'autres mots sur une liste de suggestions.

Finalement, dans cet ouvrage, je me suis intéressé particulièrement à la mémoire procédurale chez la souris. Autant chez l'humain que chez l'animal, ce dernier type de mémoire participe au rappel des compétences motrices ainsi qu'exécutives permettant l'élaboration d'une séquence de mouvements moteurs. En effet, ces informations sont récupérées de manière automatique afin de mettre en œuvre des séquences motrices complexes (Camina et Guell 2017). Cet apprentissage se fait de façon progressive après plusieurs répétitions. De plus, une fois appris, les mouvements ne sont jamais totalement oubliés et peuvent être exécutés rapidement (Lum, Conti-Ramsden et al. 2012). La mémoire procédurale est celle qui nous permet, par exemple, de faire de la bicyclette et de nous en souvenir même après une longue pause (Mochizuki-Kawai 2008).

1.2 L'initiation et exécution d'un mouvement

Les séquences de mouvements sont hautement coordonnées et organisées de manière hiérarchique dans plusieurs structures cérébrales spécialisées. Une multitude d'investigations, chez l'animal et chez l'humain, a permis de distinguer certaines régions du cerveau nécessaires à l'exécution et la mémorisation motrice : l'hippocampe, le cortex, le cervelet ainsi que les ganglions de la base (Karni, Meyer et al. 1998, Muellbacher, Ziemann et al. 2002, Seidler, Purushotham et al. 2002, Ungerleider, Doyon et al. 2002). Ces derniers sont constitués du globus pallidus, du noyau sous-thalamique, de la substance noire (pars reticulata et pars compacta) et du striatum (noyaux caudés et putamen). Ces grandes régions ont été étudiées autant chez l'animal que chez l'humain, la figure 1.2 est une représentation de celles-ci dans le cerveau humain (**figure 1.2**).

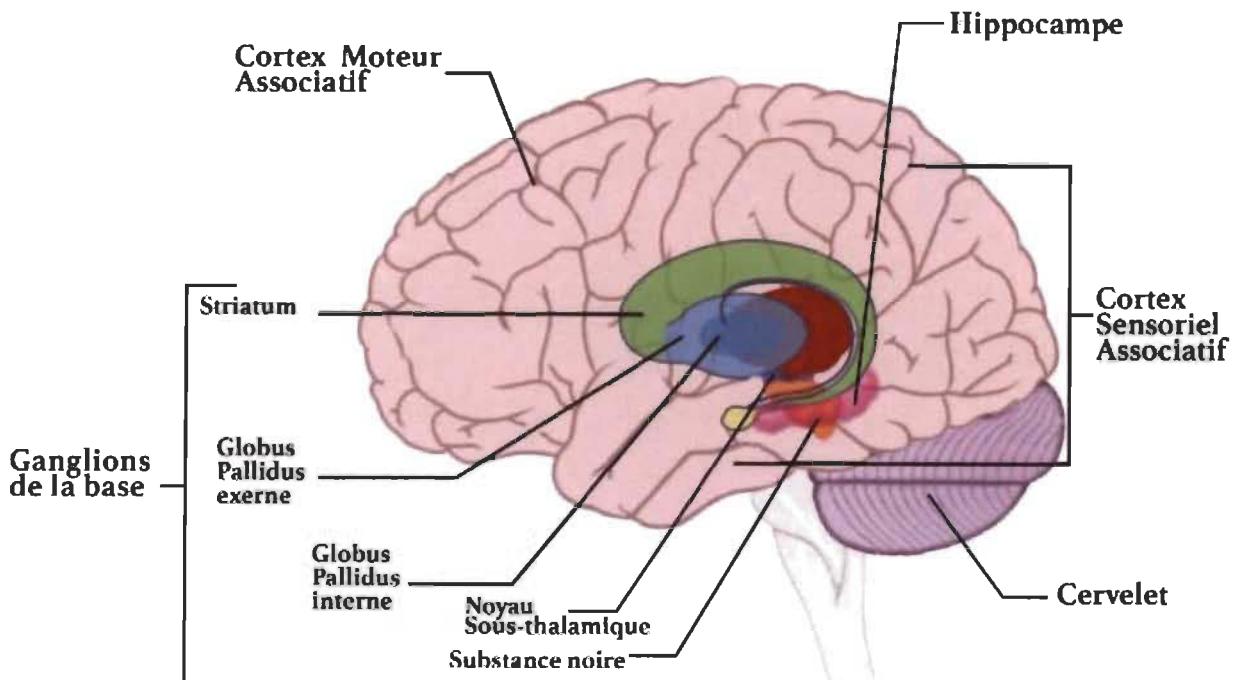


Figure 1.2 Différentes régions du cerveau humain impliquées dans la réalisation d'un mouvement.

(Adapté de (Colder 2015))

Chaque région du cerveau a un rôle précis et travail en concert avec les autres afin de donner un mouvement fluide et exact, voici une description résumée de leurs rôles. Tout d'abord, le cortex qui est le chef d'orchestre du mouvement, c'est lui qui reçoit l'information de toutes les régions et qui planifie le mouvement. Plusieurs parties du cortex sont sollicitées, le cortex moteur bien sûr, mais aussi par exemple si on veut prendre un verre d'eau pour boire, dès qu'on touche au verre notre cortex somatosensoriel reçoit l'information et la cascade commence avec de pouvoir bien faire le mouvement (Bear 4^e éd., 2015). Par la suite, l'information est envoyée au cervelet qui évalue l'« erreur motrice », soit ce qui est souhaité versus le mouvement effectivement effectué. En d'autres mots, il s'assurera que le mouvement est bien fait et sans trop d'accrochages. Les patients ayant une lésion au niveau du cervelet auront ainsi une perturbation persistante dans l'exécution des mouvements (Purves, 6^e éd, 2019). L'hippocampe, quant à lui, est important dans l'organisation spatiale lors de l'initiation d'un mouvement. Il a été découvert, chez le rat, que celui-ci est également très important lors d'un apprentissage et pour la mémoire procédurale en concert avec le striatum (Gould et al., 2002). Les ganglions de la base vont ensuite supprimer les mouvements non désirés afin de préparer l'initiation du mouvement. Toutes ses informations seront renvoyées au cortex qui va finalement initier le mouvement à l'aide du tronc cérébral, des motoneurones, ainsi que les muscles (Purves, 6^e éd, 2019). Il est possible de retrouver ce type de réseau chez l'animal à un niveau relativement plus simple.

Lorsqu'un mouvement ou une séquence de mouvements moteurs, aussi appelé tâche motrice, est initié chez l'humain, la participation de plusieurs structures sera nécessaire. Chacune d'entre elles a des rôles bien précis. Il est possible de diviser les

circuits nerveux intervenant dans le contrôle du mouvement en quatre sous-systèmes, où chacun d'entre eux apporte une contribution spécifique au mouvement (**figure 1.3**)(Purves, 6^e éd, 2019).

- Le premier est le circuit de la substance grise de la moelle épinière et du tegmentum du tronc cérébral. Ce circuit repose, entre autres, sur les motoneurones alpha qui partent du tronc cérébral vers les muscles squelettiques ainsi que leur contact avec les neurones des circuits locaux. Tous les mouvements, volontaires ou non, passent par ce circuit.
- Le deuxième circuit est celui des neurones ayant leur corps cellulaire dans le tronc cérébral ou le cortex, les neurones moteurs supra segmentaires. Ces derniers descendent s'articuler avec les neurones des circuits locaux. Les voies descendantes venant du cortex sont nécessaires au déclenchement des mouvements volontaires.
- Le troisième circuit est celui du cervelet. Ce dernier a une fonction servomécanique, c'est-à-dire qu'il détecte la différence entre le mouvement souhaité et celui exécuté pour en réduire l'écart. Il permet donc d'avoir un mouvement exécuté de façon précise.
- Le quatrième et dernier circuit est celui des ganglions de la base. Ce circuit supprime les mouvements non désirés et va préparer les neurones moteurs au déclenchement du mouvement. Les ganglions de la base agissent donc afin d'avoir un mouvement fluide et une bonne initiation de celui-ci (Purves, 6^e éd, 2019). Il est suggéré que le striatum serait d'une importance capitale dans la réalisation et l'apprentissage d'une tâche motrice, entre

autres grâce au circuit cortico-striatal (Brem, Ran et al. 2013, Dayan et Cohen 2011).

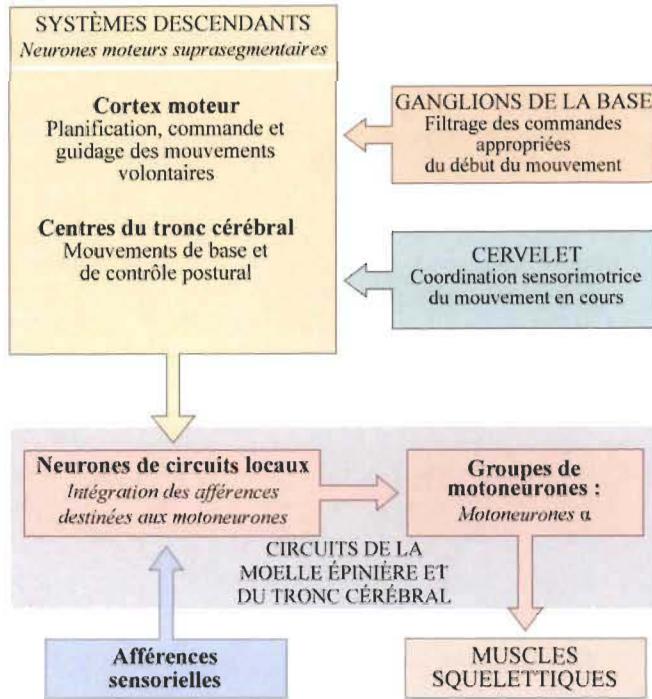


Figure 1.3 Organisation des structures nerveuses impliquées dans le contrôle des mouvements chez l'humain.

(Purves 6^e éd, 2019)

1.3 L'apprentissage d'une tâche motrice

Depuis plusieurs années, l'apprentissage moteur a été étudié à l'aide de plusieurs modèles animaux et permet de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui y sont reliés. En outre, chez l'humain, les techniques d'imagerie cérébrale ont permis de faire une corrélation entre l'apprentissage chez l'humain et certaines découvertes fait chez l'animal. En effet, il semblerait qu'une répétition, en plusieurs séances, d'une même tâche motrice pourrait mener à l'exécution presque automatique, sans avoir à y réfléchir longuement, par exemple nouer ses lacets de chaussure. L'apprentissage de nouvelles

tâches motrices de cette sorte serait également possible tout au long de notre vie, même à l'âge adulte (Karni, Meyer et al. 1998).

La mémoire procédurale nécessite le passage à travers diverses phases d'apprentissage moteur, voir **figure 1.4** tirer d'une étude chez l'humain. Tout d'abord, il y a une phase rapide, lors de la première série d'essais, où il est possible d'observer une grande amélioration des performances (Doyon 2008). Chez l'animal, nous avons remarqué que pendant cette phase rapide, les entrées des cortex associatifs dans le striatum dorso-médial sont renforcées (Yin, Mulcare et al. 2009). Il est donc possible de dire qu'un apprentissage est fait à l'intérieur d'une même séance, ce qu'on appelle l'effet intrasession. Par la suite, lorsqu'il y a une pause inactive, l'effet intersession, où le cerveau va faire un tri des informations permettant de maintenir et même d'augmenter la performance en début d'entraînement lors du prochain entraînement. Finalement, lors des séances suivantes, il y a une phase lente d'apprentissage où les performances saturent et s'améliorent beaucoup moins rapidement que lors des premiers essais. Cette phase permet de stabiliser les performances et d'automatiser la tâche afin de permettre une mémorisation à long terme (Doyon 2008, Dayan et Cohen 2011). Selon des données recueillies chez l'animal, il est probable que des changements physiologiques neuronaux, appelés la plasticité cérébrale, soient à la base de ces différentes phases, mais ceux-ci peuvent se produire à différents moments de l'apprentissage ainsi que dans différentes structures liées à la motricité (Wachter, Rohrich et al. 2010, Papale et Hooks 2018).

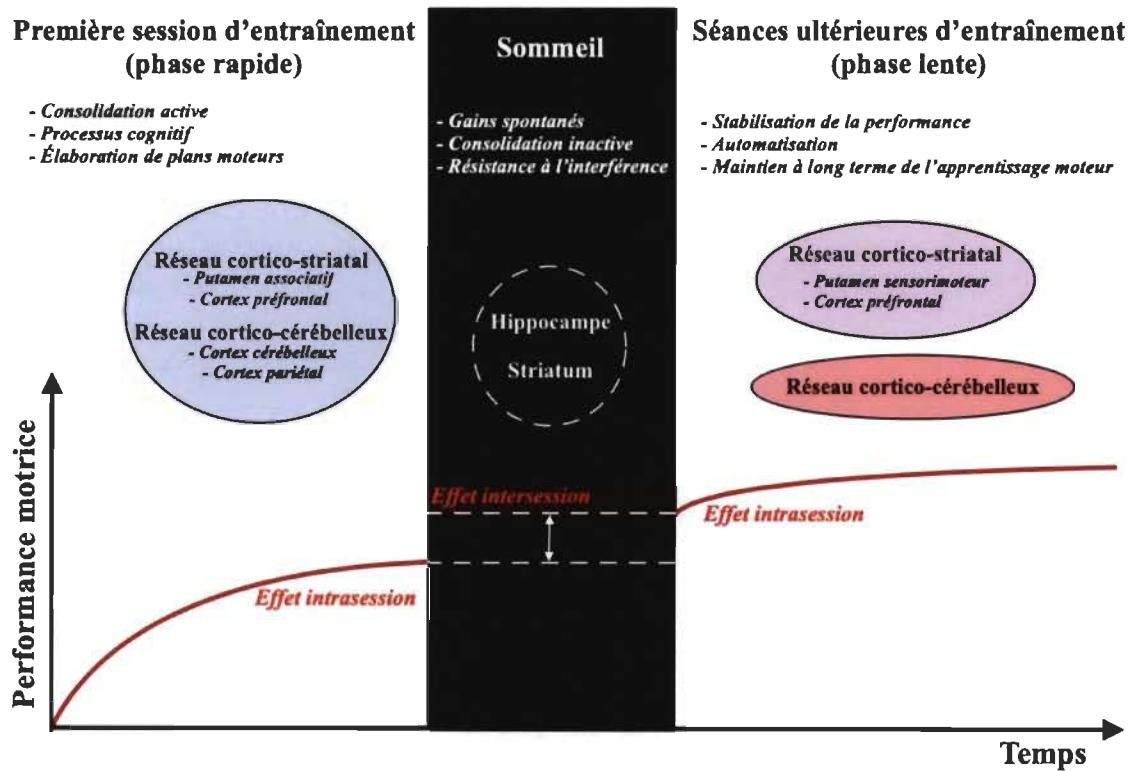


Figure 1.4 Schéma des différentes phases de l'apprentissage moteur.

(Adapté de (Doyon, Orban et al. 2011))

Comme expliqué précédemment, l'effet intersession, entre deux entraînements moteurs, est très important pour stabiliser et renforcer l'apprentissage moteur. Selon des études de neuroimagerie chez l'humain, nous avons découvert que cette phase serait liée à l'hippocampe en interaction avec le striatum (Albouy, King et al. 2013). En effet, le cerveau a besoin d'un moment de repos afin d'assimiler les différentes informations et améliorer les performances acquises durant une séance. C'est grâce à cet apprentissage intersession que l'acquisition de la tâche motrice est stable et se transférera ainsi une mémoire à long terme (Krakauer et Shadmehr 2006, Korman, Doyon et al. 2007, Albouy, King et al. 2013). Certaines études chez l'animal tendent à démontrer que le sommeil aide à améliorer les performances lors de cette phase. Effectivement, le sommeil entraînerait de grandes améliorations dans le phénomène d'apprentissage moteur indépendamment de

l'apprentissage intrasession (Walker, Brakefield et al. 2003, Robertson, Pascual-Leone et al. 2004, Papale et Hooks 2018).

1.4 Le striatum et l'apprentissage moteur

Comme expliqué précédemment, le striatum est une région des ganglions de la base (Camina et Guell 2017). Chez la souris, celui-ci est l'équivalent de la fusion du noyau caudé et putamen de l'humain (Brem, Ran et al. 2013). Il est important de savoir que la plasticité neuronale est le réarrangement du réseau neuronal avec la création de nouvelles connexions ou la répression de certaines permettant un réseau rapide et efficace (Kolb et Gibb 2011). Lorsque ce phénomène se produit dans le striatum, il permet aux circuits des ganglions de la base d'interagir avec d'autres structures et de contribuer ainsi au traitement de la mémoire procédurale (Haber, Fudge et al. 2000).

Chez les rongeurs, il fut découvert que le striatum dorsal est divisé en deux grandes sections ayant des rôles différents. Tout d'abord, nous avons la partie dorso-médiale du striatum (DMS), aussi appelé striatum « associatif », qui reçoit les entrées des aires associatives du cortex (Makino et al., 2016). Le DMS est particulièrement impliqué dans la phase rapide d'apprentissage, il est possible d'observer une augmentation des synapses lors de l'apprentissage d'une nouvelle tâche motrice. De plus, lors de cette phase rapide, il est possible d'observer une grande sensibilité au glutamate par les neurones à épine moyenne, neurones principaux du striatum, impliquant une potentialisation lors d'un apprentissage moteur (Yin et al., 2009). D'un autre côté, la région dorso-latérale du striatum (DLS), ou striatum « sensorimoteur », reçoit les entrées sensorielles et motrices du cortex. Le DLS est plutôt impliqué dans la phase lente d'apprentissage lorsque les

performances commencent à plafonner. Par contre, la sensibilité glutamatergique des « *medium spiny neurons* » dans cette phase est augmentée n'est présente que lors d'un entraînement prolongé (Makino et al., 2016). Dans cet ouvrage, nous nous intéressons particulièrement au striatum dorso-médial dû à son impliqué dans la phase rapide d'apprentissage moteur.

Il fut établi que la mémoire procédurale est fortement associée au striatum (Squire et Zola 1998). Effectivement, il est suggéré, par des expériences réalisées autant *in vivo* qu'*ex vivo*, qu'une réorganisation fonctionnelle est réalisée dans le striatum autant lors de l'apprentissage intrasession qu'intersession. Ces modifications synaptiques durables dues à un apprentissage se produisent en quelques millisecondes et pourraient durer plusieurs heures, voire plusieurs jours (Brasted et Wise 2004, Pisani, Centonze et al. 2005). Il est aussi démontré qu'il y aurait un lien entre des modifications neuronales et les variations d'activité du striatum en lien avec l'apprentissage moteur chez la souris (Costa, Cohen et al. 2004, Yin, Mulcare et al. 2009, Wachter, Rohrich et al. 2010).

Il est intéressant de noter que certaines pathologies chez l'humain nous en apprennent un peu plus sur l'importance du striatum dans le mouvement moteur. Par exemple, la maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative qui affecte le contrôle des mouvements volontaires dont les symptômes moteurs sont associés à la dégénérescence des neurones dopaminergiques entre la substance noire et le striatum. La maladie de Huntington est une autre maladie neurodégénérative associée à des troubles du mouvement qui découle d'une forte dégénérescence des neurones du striatum, en particulier dans le noyau caudé (Harris, Shneyder et al. 2009). Ces deux pathologies résultent donc d'un dérèglement fonctionnel au niveau des ganglions de la base pour

lequel le striatum est directement impliqué. Ceci confirme que le striatum est une structure clef dans l'exécution, l'apprentissage et la mémorisation motrice autant chez l'humain que chez l'animal.

1.5 L'apprentissage et la mémoire motrice au niveau moléculaire

La plasticité cérébrale est la capacité du système nerveux à se moduler en réponse aux stimulus de son environnement en réorganisant sa structure, ses fonctions ou ses connexions avec les neurones ou autres cellules du système nerveux (Kolb et Gibb 2011, Mateos-Aparicio et Rodriguez-Moreno 2019). Les neurones vont en effet créer des synapses les unes avec les autres permettant une connexion électrochimique. Ces réseaux sont modifiables et de nouvelles connexions se formeront tout au long de notre vie (Hoeffner et Klann 2010). La plasticité cérébrale serait ainsi à la base même d'un nouvel apprentissage moteur (Martin, Barad et al. 2000). L'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse protéique chez la souris a permis de déterminer que la traduction protéique est un processus important dans de nombreux aspects de la plasticité (Hernandez et Abel 2008). Selon Sossin et Lacaille, la traduction pourrait également être nécessaire aux modifications à long terme (Sossin et Lacaille 2010). En effet, les formes de mémoire à long terme nécessitent la synthèse de nouveaux d'ARNm et de nouvelles protéines contrairement à la mémoire à court terme où les processus ne durent que quelques minutes (Martin, Barad et al. 2000, Hernandez et Abel 2008).

L'importance de la traduction fut démontrée en modulant l'activité de certaines voies de signalisation chez le rongeur, entre autres celle de mTORC1, et cette modulation peut entraîner certains déficits dans les phénomènes de mémoire (Costa-Mattioli, Sossin et al. 2009, Sossin et Lacaille 2010). Il fut également démontré que la traduction est importante dans la plasticité cérébrale et l'apprentissage (Graber, McCamphill et al. 2013). Chez les mammifères, mTOR semble moduler la traduction d'ARNm par la régulation de l'état de phosphorylation de ses protéines effectrices comme P70 S6K, 4E BP, eIF4GI et d'autres (**figure 1.5**) (Raught, Gingras et al. 2001, Carroll, Dyer et al. 2006). Il existe également des preuves que mTOCR1 est actif au niveau des synapses lors d'un apprentissage. En effet, lorsqu'il y a déficience d'activateur (souris TSC2^{+/−} et TSC1^{+/−}) de la voie, les souris ont des troubles de plasticité synaptique durable et donc de mémoire à long terme. (Costa-Mattioli et al. 2009). Une étude démontre que la synthèse protéique dépendante de mTOR pendant le sommeil est notable lors de la consolidation. En outre, mTOR favorise la phosphorylation des régulateurs de la synthèse protéine, 4E-BP1 et eEF2, ainsi que la traduction des ARNm liés à la création de nouvelles connexions synaptiques (Seibt, Dumoulin et al. 2012).

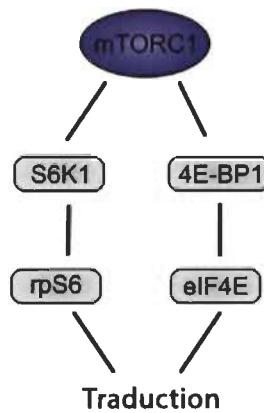


Figure 1.5 Traduction par la protéine mTORC1.

Contrôle l'initiation de la traduction via les protéines effectrices P70 S6K, rpS6, 4E-BP1 et eIF4E. (Adapté de (Switon, Kotulska et al. 2017))

Il est bien connu que la voie de signalisation mTOR semble être étroitement liée à la mémoire (Meikle, Pollizzi et al. 2008, Lin, de Gooijer et al. 2017, MacCallum et Blundell 2020). Par contre, son importance sur l'apprentissage intersession n'est pas encore connue à ce jour. Comme expliquer précédemment, la mémoire à long terme serait fortement influencée par mTORC1 dû à son contrôle dans la synthèse des protéines. En effet, plusieurs études chez la souris utilisant la rapamycine affirment que l'inhibition de mTOR bloque, en partie, la formation de mémoire à long terme (Glover, Ressler et al. 2010, Gafford, Parsons et al. 2011, Deli, Schipany et al. 2012, Halloran, Hussong et al. 2012, Jobim, Pedroso et al. 2012). La voie de signalisation mTOR est un régulateur considérable dans la croissance et la régénération des axones dans le système nerveux central (Park, Liu et al. 2008). Plus précisément, un groupe de chercheurs a démontré un lien entre l'inhibition de mTORC1 par la rapamycine et la mémoire liée à la peur. En effet, les souris injectées avec cet inhibiteur pharmacologique avaient un retard dans l'apprentissage et la mémorisation de la peur contextuelle (MacCallum et Blundell 2020). En outre, des souris transgéniques spécifiquement « knock-out » pour les interneurones inhibiteurs (SOM-INs) ont révélé de nouvelles connaissances sur l'activité de mTORC1 et sa fonction sur l'hippocampe. La perte de mTORC1 dans ce type neuronal altère la peur contextuelle et la mémoire spatiale à long terme, révélant donc l'importance de mTORC1 dans ce type de processus (Artinian, Jordan et al. 2019).

Par contre, le rôle de cette voie de signalisation en générale et l'effet de son inhibition dans l'apprentissage, la consolidation et l'exécution motrice restent peu connus.

1.6 Voie de signalisation mTOR

La voie de signalisation mTOR est connue comme étant importante dans la régulation de la traduction de protéine, et donc pourrait avoir un rôle dans la plasticité cérébrale. En effet, il fut démontré à mainte reprise que son inhibition, chez la souris, affecte les processus de mémoire (Bekinschtein et al. 2007, Blundell et al. 2008, Glover et al. 2010, Gafford et al. 2011, Deli et al. 2012, Halloran et al. 2012, Jobim et al. 2012). Son rôle dans le contrôle de la traduction et la plasticité synaptique de longue durée est notamment suspecté (Hoeffer et Klann 2010). Par contre, nous ne savons toujours pas quelles protéines de la voie sont importantes ainsi que les fenêtres d'activations de celles-ci.

1.6.1 Protéine mTOR

La protéine mTOR est une sérine-thréonine kinase, de 250 kilos dalton très conservé durant l'évolution. Elle est exprimée de façon ubiquitaire dans toutes les cellules, mais en plus forte concentration dans les neurones du système nerveux central (Bockaert et Marin 2015, Saxton et Sabatini 2017). D'un point de vue moléculaire, cette protéine est composée de deux grands complexes (mTORC1 et mTORC2). Le premier complexe est présent dans des phénomènes comme la prolifération, la croissance cellulaire (axones et dendrites), la transcription et la synaptogénèse (Bergeron, Chagniel et al. 2014). Contrairement à mTORC1, on en sait beaucoup moins sur mTORC2. Principalement, nous savons que mTORC2 participe à la survie des cellules par l'activation d'Akt et de SGK1. De plus, ce complexe aurait aussi un rôle dans la régulation des protéasomes, et la régulation du cytosquelette (Switon, Kotulska et al. 2017). Au niveau moléculaire, il est associé avec la protéine Rictor et régule également l'organisation du cytosquelette

d'actine par l'activation de PKCa, paxilline et petites GTPases, Rho et Rac (Laplante et Sabatini 2012).

Pour ce projet, je me concentrerai sur le premier complexe puisqu'il semble être impliqué dans l'apprentissage et la mémoire, comme mentionné précédemment. Ce complexe est composé de plusieurs protéines, dont mLST8, PRAS40, DEPTOR, voir **figure 1.6** (Hoeffner et Klann 2010). mTORC1, est associé à une protéine régulatrice « Raptor » et interagit avec les substrats 4EBP ainsi que P70 S6K afin d'initier la traduction de nouvelles protéines (Hay et Sonenberg 2004). L'activité de mTORC1 semble être au centre de la formation et du maintien des synapses. Le maintien à long terme et l'adaptabilité des synapses sont cruciaux pour la fonction ainsi que la survie des neurones chez la souris (Hou et Klann 2004, Banko, Merhav et al. 2007). De plus, l'activation seule de mTORC1 serait suffisante pour modifier la forme et la fonction des synapses. Son activation aurait un rôle notable dans le phénomène de plasticité synaptique dans le système nerveux central (LiCausi et Hartman 2018).

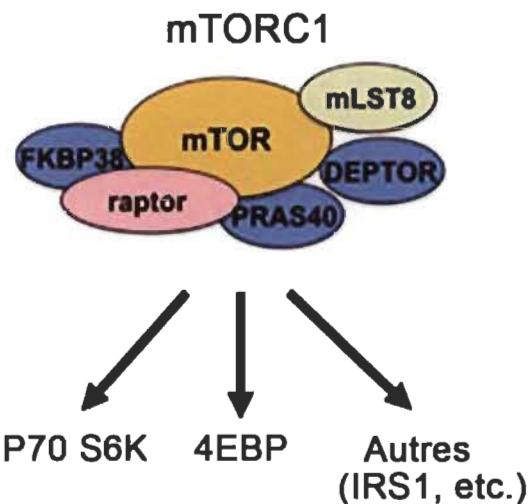


Figure 1.6 Complex mTORC1 et les substrats qu'il régule.
(Adapté de (Yoon et Choi 2016))

1.6.2 Régulation de mTORC1

Le domaine catalytique KIN de mTORC1 se trouve à l'extrémité C-terminale. Ce domaine contient les sites de phosphorylation de mTOR soit à la thréonine 2446, la sérine 2448 et la sérine 2481. La sérine 2448 est la région cible de phosphorylation par Akt et P70 S6K, ceci sera discuté plus en détail dans la section régulation de la voie de signalisation. Le domaine FRB est, indirectement, un site de régulation positive. Il est proposé que la protéine FKBP12 serait le principal répresseur de l'activité mTORC1 dans les cellules du système nerveux central (Switon, Kotulska et al. 2017).

Il faut savoir qu'il y a plusieurs activateurs de la voie de signalisation mTORC1, que ce soit des nutriments, facteurs de croissance, molécules de guidances ou neurotransmetteurs (Takei et Nawa 2014). Suite à la liaison d'un activateur avec son récepteur respectif, deux chemins sont possibles, soit la voie PI3K (**figure 1.7**, gauche) ou la voie des MAPK (**figure 1.7**, droite). Pour la voie PI3K, il y a activation de Akt alors que pour la voie des MAPK il y a activation de Ras et ERK. Par la suite, les deux voies convergent vers les complexes tuberous sclerosis protéines 1 and 2 (TSC1 et TSC2). Ces derniers vont se dissocier suite à leur phosphorylation et TSC2, en tant que répresseur, sera dégradée par ubiquitination (Li, Inoki et al. 2002, Nellist, Goedbloed et al. 2002, Shumway, Li et al. 2003). TSC1 va agir avec d'autres composantes comme la protéine d'activation GTPase (GAP) afin d'activer Ras homolog enriched in brain (Rheb), qui a la capacité de se lier directement à mTORC1 et de l'activer par phosphorylation (Long, Lin et al. 2005, Takei et Nawa 2014). De plus, d'autres régulateurs sont reconnus pour impacter l'activité de mTORC1, par exemple l'oxygène, l'état énergétique, ou encore d'autres facteurs de croissance régulant l'activité de la GAP du TSC1/2 (Graber,

McCamphill et al. 2013). Après son activation, mTOR va influencer deux voies importantes dans la synthèse de protéine. Plus précisément, après phosphorylation, il y a soit une répression de 4EB-P et de eIF4E, ou une activation de P70 S6K et S6rp (LiCausi et Hartman 2018). Il faut noter qu'il y a plusieurs activateurs de mTOR et que les deux voies détaillées ici sont celles qui sont le mieux connues et qui, selon les expérimentations du laboratoire, méritent de plus amples recherches pour mieux les comprendre. Pour ce projet, je me concentrerai particulièrement sur P70 S6K, substrat de mTORC1.

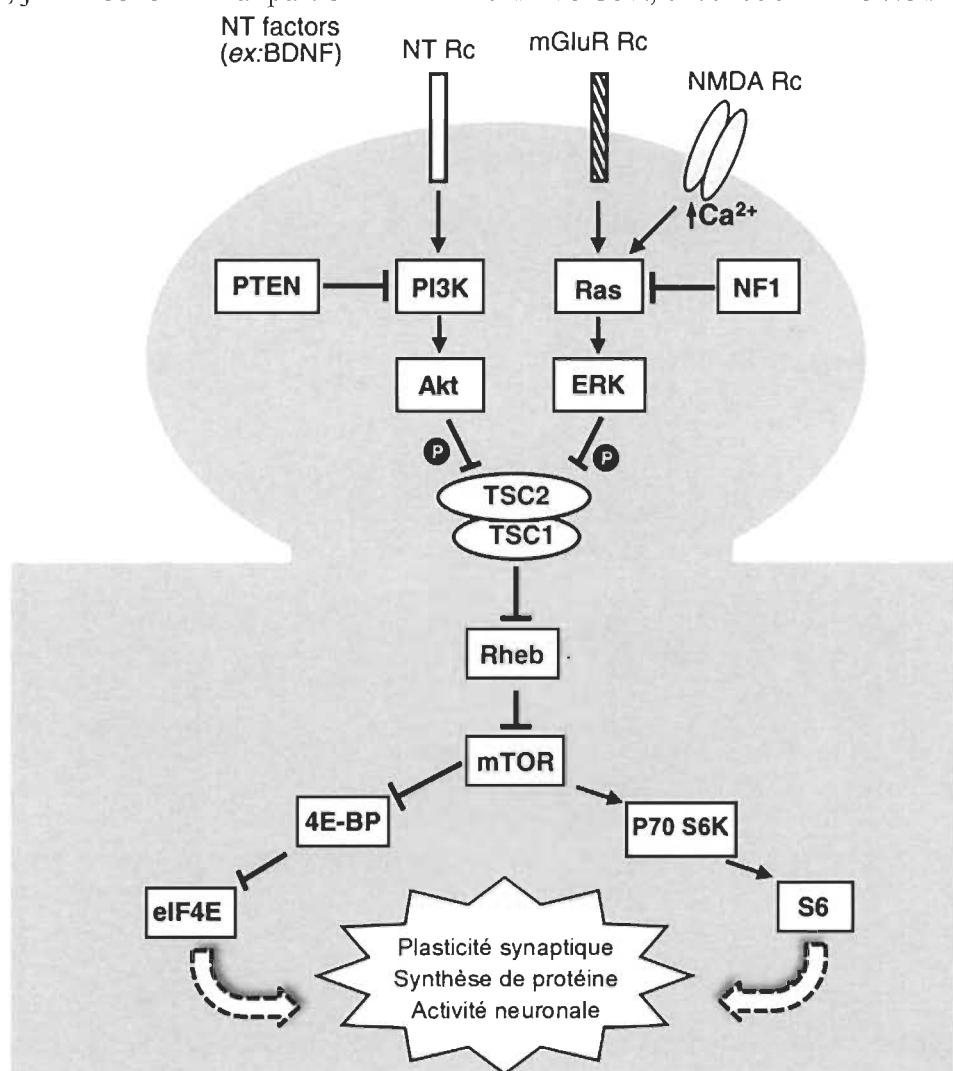


Figure 1.7 Modèle de voie de signalisation mTORC1.

(Adapté de (Bahl, Chiang et al. 2013))

1.6.3 Protéine P70 S6K et sa régulation

P70 S6K est une sérine/thréonine kinase existante sous deux isoformes, S6K1 et S6K2, tous deux exprimées au cerveau (Graber, McCamphill et al. 2013). L'isoforme S6K1 est le substrat le mieux caractérisé dans la littérature. Le rôle de P70 S6K est crucial dans la régulation de synthèse de protéines et de la croissance cellulaire suite à son activation par mTOR (Pearce, Alton et al. 2010). Il est démontré que les souris « knock-out » pour P70 S6K1 sont plus petites que les souris « wild-type » lors de la naissance (Pearce, Alton et al. 2010) et présentent des déficits de l'apprentissage spatial et dans la mémoire contextuelle de la peur, entre autres (Antion, Hou et al. 2008).

La régulation de P70 S6K se réalise sur ces sites catalytiques critiques Thr229, Thr389, Thr421, Ser424, mais il y aurait un total d'au moins 7 sites catalytiques voir **figure 1.8** (Pearce, Alton et al. 2010). Une première phosphorylation est faite par une protéine de la famille des MAP kinases, soit ERK, P38 ou CDC2 (Zhang, Gao et al. 2013). La deuxième phosphorylation au site Thr389 est faite par mTORC1 (Lehman et Gomez-Cambronero 2002). Suite à l'action de mTORC1, la liaison de PDK1 sur P70 S6K est maintenant possible afin de phosphoryler la thréonine 229 (Pearce, Alton et al. 2010, Zhang, Gao et al. 2013). La phosphorylation de mTOR et PDK1 sont primordiale pour l'activation complète de la protéine. Particulièrement, une mutation au niveau de la phosphorylation de mTOR au site de la Thr289 aboli l'activation de P70 S6K (Goodman, 2014). Lorsque P70 S6K est active, elle agit sur la protéine ribosomale S6 (rpS6), composante de la sous-unité 40S du ribosome, permettant la traduction de nouvelles protéines (Ma et Blenis 2009). La protéine rpS6 agit également sur les facteurs

d'activation de l'ARN polymérase eLF4B et eEF2K impliqués dans l'étape d'élongation de la synthèse protéique (Pearce, Alton et al. 2010). Une autre fonction très intéressante dans notre contexte est la phosphorylation de mTOR sur la sérine 2448. En effet, P70 S6K a été démontré pour phosphoryler mTOR sur des cellules *in vitro* ayant été traiter à la rapamycine (Chiang et Abraham, 2005). Cette fonction n'est par contre toujours pas bien connue et n'a jamais été étudié dans un modèle animal.

Bien que la plupart de ces études aient été caractérisées dans des modèles de cellules humaines en culture, soit des cellules mitotiques, il semble que ces voies de signalisation, notamment celle de P70 S6K, soient aussi retrouvées dans les cellules neuronales et chez l'animal.

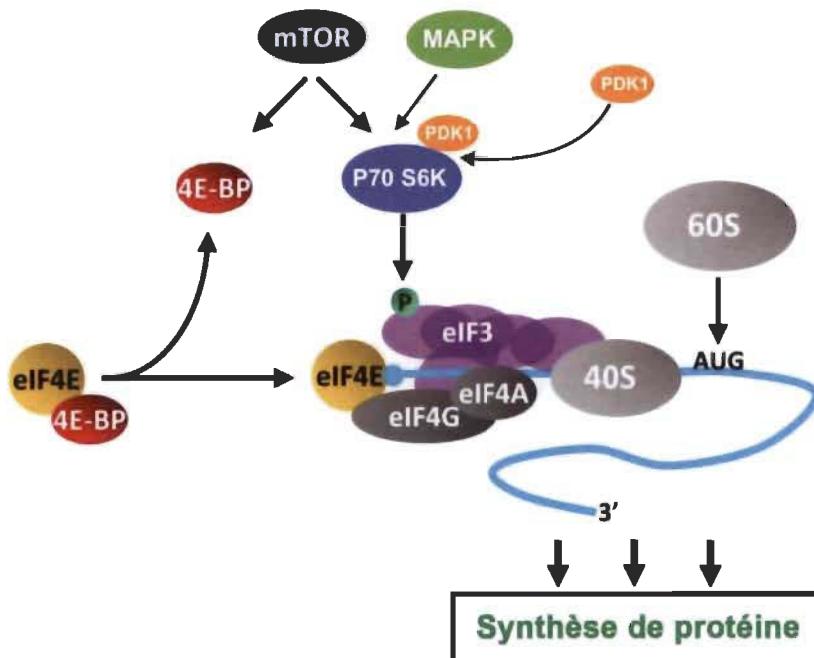


Figure 1.8 Modèle de signalisation de P70 S6K.

(Adapté de (Martineau, Muller et al. 2014))

1.7 Inhibition de la voie de signalisation mTORC1

Il existe certaines façons d'inhiber des protéines d'intérêt dans un modèle *in vivo*. En effet, les « small interferent ARN » (siARN) sont maintenant utilisés en science afin d'inhiber un gène ou une protéine dans des contextes autant *in vitro* qu'*in vivo* (Dana, Chalbatani et al. 2017). Les souris knock-out (KO) pour des gènes sont aussi une autre façon d'étudier l'importance de certaines protéines dans un contexte *in vivo*, entre autres pour les mécanismes de comportement. Il existe plusieurs types d'inhibitions KO par exemple une inactivation complète ou encore de tissus spécifiques (Nelson 1997). Par contre, il peut être difficile d'utiliser cette inhibition lorsque les protéines sont ubiquitaires et ont des rôles considérables dans plusieurs mécanismes cellulaires. C'est le cas de la voie de signalisation mTOR où les souris knock-out complet pour la protéine ne sont pas viables. Pour ce projet, nous avons fait appel à des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques afin d'étudier le rôle des protéines mTOR et P70 S6K, soit la rapamycine et PF4708671 respectivement.

1.7.1 *La rapamycine*

La rapamycine fût initialement découverte comme un métabolite antifongique produite par la *Streptomyces hygroscopicus*. Elle a ensuite été utilisée comme immunosuppresseur et anti-proliférateur dans les cellules de mammifères. Finalement, il a été démontré qu'elle possède de puissants effets inhibiteurs de l'activation de mTOR et P70 S6K (Li, Kim et al. 2014).

Les mécanismes moléculaires exacts de l'action de la rapamycine ne sont pas encore bien connus (Chiang et Abraham 2005). Comme cité précédemment, la sensibilité de mTOR avec la rapamycine liée à FKBP12 pourrait être dû à la compétition entre cette liaison de deux protéines et Raptor pour la liaison du domaine FRB. (Hoeffter et Klann 2010, Gruber, McCamphill et al. 2013) La liaison de rapamycine-FKBP12 bloquerait directement l'accès du substrat au site catalytique FRB tel qu'illustré à la **figure 1.9**.

Il faut savoir que selon la littérature seul mTORC1 est sensible à la rapamycine. Par contre, il faut savoir qu'une exposition à long terme pourrait affecter mTORC2 dans certains types de cellules lors de la synthèse de nouvelles protéines mTOR (Laplante et Sabatini 2012).

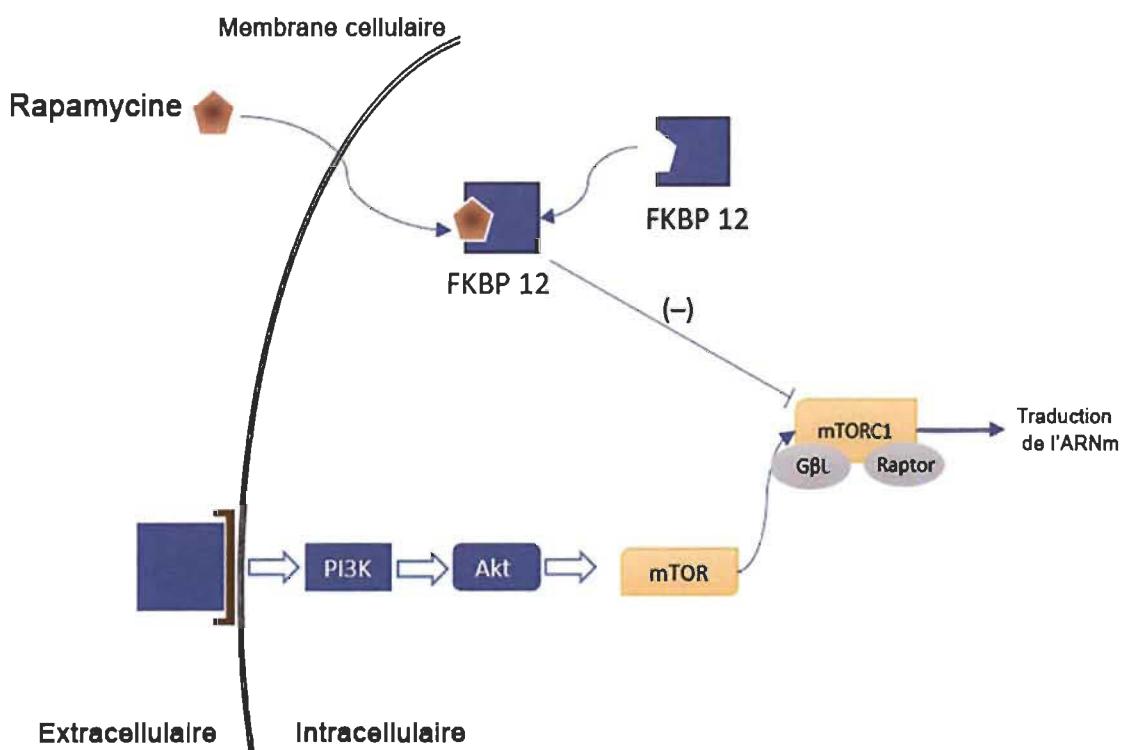


Figure 1.9 Schéma de la voie de signalisation mTOR et l'impact de l'inhibition de la rapamycine.

(Adapté de (Muhammad Hassan 2017))

1.7.2 Le PF4708671

PF4708671 est le premier inhibiteur spécifique de P70 S6K1 rapporté et caractérisé dans la littérature. Cet inhibiteur étant relativement nouveau, très peu d'études sont disponibles sur le mécanisme moléculaire de celui-ci. Ce qui est certain, c'est que PF4708671 inhibe la phosphorylation de P70 S6K ainsi que les deux substrats mTOR (Ser²⁴⁴⁸) et Rictor (Thr¹¹³⁵) dans des modèles de cellule en cultures. Ce qui est intéressant c'est que PF4708671 n'affecte pas la phosphorylation de 4^E-BP1, la deuxième isoforme de P70 (S6K2) ainsi que les protéines en aval de P70 S6K (Pearce, Alton et al. 2010). Cet inhibiteur permet donc de distinguer sélectivement la voie mTORC1/P70 S6K1 versus mTORC1/4^E-BP1.

CHAPITRE II

RATIONNELLE ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHES

De récentes études au laboratoire du professeur Michel Cyr ont permis de démontrer que la voie de signalisation mTOR joue un rôle essentiel dans la mémorisation d'une nouvelle tâche motrice complexe. L'inhibition de l'activité de mTOR au cerveau de souris saine ralentie considérablement les processus d'apprentissage et de mémorisation motrice sur le rotarod accéléré (Bergeron, Chagniel et al. 2014). Il est également connu que la voie de signalisation est importante au processus intersession, soit la consolidation (Costa-Mattioli, Sossin et al. 2009). Par contre, l'étape précise du processus d'apprentissage moteur, soit intra ou intersession, ainsi que les partenaires moléculaires de mTOR impliquée demeurent toujours inconnue. L'objectif principal de ce projet est d'étudier l'impact de la voie de signalisation mTOR dans les différents processus d'apprentissage moteur chez la souris, via les protéines mTOR et P70 S6K, en utilisant deux inhibiteurs pharmacologiques spécifiques, soit la rapamycine et le PF4708671. Ce grand objectif fut divisé en différent sous objectif qui nous permettra d'en connaître un peu plus sur les protéines mTOR et P70 S6K autant au niveau moléculaire que comportementale.

2.1 Est-ce que l'administration de la rapamycine et de PF4708671 affecte la voie de signalisation mTOR dans le striatum de cerveau de souris?

Il faut souligner que la protéine mTOR phosphorylée sur la sérine 2448 est un biomarqueur très utilisé pour démontrer l'état d'activation de la voie de signalisation ainsi que de l'état d'activation de mTOR elle-même (Chiang et Abraham 2005). Notamment,

la rapamycine est reconnue pour affecter l'activité de mTOR dû à sa compétition avec Raptor au niveau du domaine KIN (Hoefffer et Klann 2010). Une fois activée, mTOR est reconnue pour phosphoryler certains substrats dont la thréonine 389 de la protéine P70 S6K ainsi que les séries 235 et 236 ou séries 240 et 244 de la protéine S6rp (Bekinschtein, Katche et al. 2007, Al-Ali, Ding et al. 2017). Le PF4708671 est connu pour affecter la phosphorylation de P70 S6K sur sa thr-389. Il faut se souvenir que des études *in vitro* nous permettent de conclure qu'une fois active, P70 S6K peut à son tour phosphoryler la protéine mTOR sur la ser-2448, cette fonction pourrait être une hypothèse de l'importance de P70 S6K dans notre contexte (Hoefffer et Klann 2010). De plus, la rapamycine est bien caractérisée comme inhibiteur de mTOR. Pour ce projet, il n'a pas été obligatoire de faire des doses-réponses puisque son utilisation dans le modèle murin est effectivement bien rapportée dans la littérature (Glover, Ressler et al. 2010, Halloran, Hussong et al. 2012, Li, Kim et al. 2014). Il est démontré qu'à une dose de 40mg/kg, la mémoire est efficacement affectée, mais pas le mouvement locomoteur (Blundell, Kouzer et al. 2008, MacCallum et Blundell 2020). De plus, cette dose de 40mg/kg a déjà été utilisée par notre laboratoire en 2014 (Bergeron, Chagniel et al. 2014). Pour le PF4708671, il est possible de trouver certaines études utilisant cet inhibiteur de P70 S6K chez les souris avec injection i.p., mais ses paramètres pharmacocinétiques demeurent moins bien connu (Kam, Kang et al. 2020, MacCallum et Blundell 2020). Par contre, une courbe dose-réponse a déjà été rapportée dans la littérature montrant que la dose de 50 mg/kg est suffisante pour entraîner une inhibition significative en comparaison aux souris contrôles (Huynh, Santini et al. 2014). Ceci nous permet de déterminer que la dose de 50 mg/kg par injection intrapéritonéale semble se situer à l'intérieur de la fenêtre thérapeutique, soit une

dose suffisamment élevée pour entraîner une inhibition de P70 S6K dans le cerveau des souris sans impacter leur motricité ou induire des effets secondaires observables.

Afin de déterminer l'impact de la rapamycine et du PF4708671 sur l'inhibition de la signalisation de la voie mTOR, je propose d'évaluer la quantité de protéines totales et phosphorylées de mTOR et de ses cibles moléculaires P70 S6K et S6rp au cerveau de souris traitée 1 heure avant le sacrifice. Je ferai des analyses par Western Blot avec des échantillons contenant le striatum puisque, comme expliqué dans la section introduction, il est suggéré qu'il ait une importance capitale dans la réalisation, l'apprentissage et la mémorisation motrice (Ungerleider, Doyon et al. 2002).

2.2 Est-ce que les inhibiteurs de la voie de signalisation mTOR ont un impact sur l'exécution, la coordination et la capacité motrice des souris?

Dans ce deuxième objectif, nous voulons voir les effets de la rapamycine et du PF4708671 sur les capacités motrices des souris. En effet, afin que le seul paramètre d'amélioration ou non des habiletés motrices du rotarod soit évaluer lors de l'apprentissage moteur, nous devons nous assurer que les deux inhibiteurs n'ont aucun effet sur les capacités motrices telles la coordination et la force motrice. Les souris seront ainsi soumises à différents tests moteurs , il est donc important s'assurer que l'a capacité motrice ne soit pas un paramètre interférant. Dans cette optique, les prises de mesures des tests seront faites une fois que les tâches motrices seront pleinement acquises par les souris. Les tests effectués seront le rotarod accéléré, le « beam test » et le « wire suspension » et les mesures seront prises 1 heure après l'injection de la rapamycine et du PF4708671. Le rotarod accéléré sera utilisé afin d'évaluer l'exécution motrice et la coordination. Le

rotarod est une tâche motrice très complexe et il sera évident de percevoir des effets des inhibiteurs de la voie mTOR sur la performance des souris sur ce test. Ce test est aussi très utilisé dans le domaine moteur et facile à quantifier, c'est pourquoi nous pensons que c'est le test de choix dans ce projet (Buitrago, Schulz et al. 2004). Le « *beam test* », quant à lui, permet de mesurer la coordination motrice ainsi que l'équilibre. Finalement, le « *wire suspension* » est un test qui permet de mesurer la force musculaire, la capacité motrice ainsi que la coordination des souris (Chagniel, Robitaille et al. 2012). Le temps écoulé pour effectuer les tâches motrices sera comparé entre les différents groupes traités par les inhibiteurs pharmacologiques ou le véhicule.

2.3 Est-ce que l'inhibition de la voie de signalisation mTOR impacte l'effet intersession d'un nouvel apprentissage moteur chez la souris?

Selon la littérature, il est suggéré que les pauses inactives entre deux séances d'entrainements moteurs, effet intersession, sont très importantes pour les processus d'apprentissage moteur. En effet, ce serait durant cette période que les phénomènes de plasticité cérébrale dans le striatum seraient enclenchés permettant une mémoire motrice à long terme (Ungerleider, Doyon et al., 2002). Cette phase de consolidation permet de conserver et même d'augmenter les performances acquises entre deux entraînements, soit un effet intersession (Doyon, 2008). Ce troisième objectif consiste à vérifier l'effet intersession, donc entre deux sessions d'apprentissage moteur. Pour ce faire, j'utiliserai les deux inhibiteurs pharmacologiques de la voie de signalisation mTOR, rapamycine et PF4708671, injectés par voie intrapéritonéale aux souris directement après les séances de rotarod accéléré. Nous pourrons ainsi comparer les effets des traitements en début de séance le jour suivant. Puisqu'il a été démontré par plusieurs méthodes que la voie de

signalisation mTOR est impliquée dans le phénomène de mémorisation (Meikle, Pollizzi et al. 2008, Lin, de Gooijer et al. 2017, MacCallum et Blundell 2020). Par contre, l'importance de la voie sur l'effet intersession lors des premiers jours d'apprentissage moteur n'est pas encore connue à ce jour. Il sera donc très intéressant de voir la nécessité de mTORC1 ainsi que P70 S6K dans cette phase d'apprentissage.

2.4 Est-ce que l'inhibition de la voie de signalisation mTOR impacte l'effet intrasession d'un nouvel apprentissage moteur chez la souris?

Ce dernier objectif permet d'approfondir les connaissances sur l'impact de la voie de signalisation mTOR durant la période active d'entraînement, effet intrasession. En effet, il a été démontrer que la protéine mTOR serait nécessaire à l'intérieur d'une même séance d'entraînement (Bergeron et al., 2014). Par contre, l'étude de ses partenaires moléculaires, soit P70 S6K, n'a toujours pas été faite dans un contexte d'apprentissage moteur. De plus, la fenêtre d'activation de ses protéines suite au début d'un entraînement n'est toujours pas connue. Dans cet objectif, j'injecterai les inhibiteurs pharmacologiques par voie i.p. chez les souris avant leur apprentissage moteur sur le rotarod accéléré durant 3 jours consécutifs. Également, j'ai trouvé pertinent d'ajouter une constante de temps afin d'en savoir plus sur la fenêtre d'activation des protéines, les souris seront ainsi injectées soit 1 heure ou 15 minutes avant le début de la séance. Nous comparerons, par la suite, les différents comportements entre les groupes selon le traitement et le temps écoulé entre les injections et l'entraînement moteur. Ces informations pourront ainsi nous en dire plus sur l'activité des différentes protéines de la voie de signalisation, mTOR et P70 S6K, lors de l'apprentissage d'une tâche motrice complexe chez la souris.

CHAPITRE III

MÉTHODOLOGIE

3.1 Animaux

Des souris mâles C57BL/6j âgées de 10 à 12 semaines (Charles River Laboratories, QC, CAN) étaient hébergées individuellement dans des cages avec de la nourriture et de l'eau disponibles en tout temps. Toutes les souris ont eu le même environnement et ont été soumises à la même batterie de manipulation au même moment chaque jour d'expérimentation. Les souris avaient un cycle de 14 h lumière / 10 h d'obscurité à 22°C. Toutes les expériences étaient approuvées et réalisées selon les recommandations du Comité institutionnel de protection et d'utilisation des animaux de l'Université du Québec à Trois-Rivières conformément au Conseil canadien de protection des animaux.

3.2 Analyse biochimique

3.2.1 Échantillons

Les souris étaient injectées aux traitements respectifs 1 heure avant l'anesthésie par inhalation à l'isoflurane 5 % jusqu'à l'absence de réflexe. Il y avait ensuite extraction des cerveaux de la boîte crânienne pour en disséquer rapidement les striatums et les placer dans un tube sur la glace sèche, puis conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. L'utilisation du tampon de lyse RIPA permettait d'extraire les protéines par broyage dans

un mélange avec des inhibiteurs de protéases (completeTM, Sigma-Aldrich) et de phosphatases (PhosSTOPTM, Sigma-Aldrich) puis dosé par la méthode de Bradford.

3.2.2 *Western blot*

La technique SDS-PAGE (électrophorèse sur gel de dodécylsulfate de sodium – polyacrylamide) avec un gel à 10 % avait été utilisé afin de séparer les protéines d'intérêts, soit mTOR (279 kDa), P70 S6K (70 kDa), GAPDH (36 kDa) ainsi que S6rp (32 kDa). Pour chaque groupe d'échantillon en triplicata ($n = 6$), une quantité de 40 µg de protéines était chargée après une dénaturation de 5 minutes à 95 °C. À la fin de la migration, les protéines furent transférées sur une membrane de nitrocellulose. Le blocage avec une solution de TBS-tween et de 5 % serum d'albumine bovine (BSA) durant 1 heure à température de la pièce permettait d'empêcher des liaisons non spécifiques lors de l'incubation avec les anticorps. Chaque anticorps primaire était incubé pendant toute la nuit à 4 °C avant de débuter les étapes de la révélation, le tableau 1 présente les différents anticorps primaires ainsi que les dilutions utilisées dans du TBS-tween + 1 % BSA. Les étapes subséquentes étaient constituées d'une incubation d'une heure à température pièce avec les anticorps secondaires correspondants, soit anti-souris ou anti-lapin « *anti-mouse* et *anti-rabbit IgG HRP-linked* » (Cell signaling, #7076 et #7074, 1:5000) dans TBS-tween + 1 % BSA, suivi par une série de lavages dans du TBS-tween et la réaction de chimioluminescence (SuperSignal West Femto et substrat Pico, ThermoFisher). Les bandes étaient révélées et quantifiées à l'aide du logiciel Vision Works Images Acquisition et Analysis Softaware (UVP Bioimaging, Upland, CA, É.-U.). L'analyse densitométrique fut exprimée en densité optique relative avec une exposition séquentielle d'un total de 4 min 25 sec. Afin de déterminer que les bandes choisies étaient celles reliées

à nos protéines d'intérêts, un marqueur poids moléculaire coloré (Cell Signaling #12949) fut utilisé ainsi que le poids moléculaire rapporté dans la littérature pour chacune les quatre protéines analysées.

3.2.3 Stripage de membrane

Suite à une première révélation, notamment celle avec des anticorps détectant des protéines phosphorylées, un stripage de la même membrane était réalisé afin de permettre une deuxième hybridation avec une seconde série d'anticorps, soit les anticorps détectant à la fois les protéines phosphorylées et non phosphorylées (totales). À l'aide d'une solution de glycine acide avec un pH de 2,2 toujours à température pièce les membranes furent stripper. Les membranes étaient mises en contact avec la solution de glycine acide deux fois 10 minutes suivit de 3 lavages de 5 minutes au TBS-Tween. Suite à un deuxième blocage de 1 heure, toujours au TBS-tween + 5 % BSA, les anticorps détectant les protéines totales furent incubés toute la nuit à 4 °C et révélé comme précédemment.

Tableau 3.1 Liste des anticorps primaires utilisés pour la technique de Western Blot

Anticorps primaire	Fournisseur et # catalogue	Phosphorylation ciblée	Dilution
Rabbit mAb phospho-mTOR	Cell signaling, #5536	Serine 2448	1 :750
Rabbit mTOR	Cell signaling, #2972	-	1 :1000
Mouse mAb phospho-P70 S6K	Cell signaling, #9206	Thréonine 389	1 :1000
Rabbit P70 S6K	Cell signaling, #9202	-	1 :1000
Rabbit mAb phospho-S6rp	Cell signaling, #4858	Sérine 235-236	1 :1000
Rabbit mAb phospho-S6rp	Cell signaling, #5364	Sérine 240-244	1 :1000
Mouse mAb S6rp	Cell signaling, #2317	-	1 :1000
Rabbit GAPDH (HRP conjugate)	Cell signaling, #8884	-	1 :1000

3.3 Traitements pharmacologiques

Tel que décrit précédemment dans l'article Bergeron et al (Bergeron, Chagniel et al., 2014), la rapamycine (LC laboratories, Woburn, MA, USA) était dissoute dans 1 % DMSO, 5 % Tween-80 et Phosphate-buffered saline (PBS) 1X et injectée par voie intrapéritonéale (i.p.) à une dose de 40 mg/kg. Le PF4708671 (Tocris, ON, Canada) fut dissous 1 % DMSO, 10 % Tween-80 et PBS 1X et injecté par voie i.p. à une dose de 50 mg/kg tel que décrit dans l'article de Korey K. (Kam, Kang et al. 2020). Les contrôles ont été injectés par voie i.p. avec le véhicule 1 % dimethylsulfoxyde (DMSO), 10 % Tween-80 et PBS 1X.

3.4 Tests moteurs

3.4.1 Rotarod accéléré

Le *rotarod accéléré* (AccuScan Instruments, U.S.A.) permettait évaluer l'apprentissage moteur comme décrit précédemment et fut utilisé à mainte reprise au laboratoire (Bergeron, Chagniel et al. 2014). Composé d'un cylindre suspendu, le rotarod accélérerait à une vitesse constante de 4 à 40 tours/min en 300 secondes. La souris avait 10 essais durant trois ou quatre jours consécutifs (voir **fig. 3.1**) et le temps fut enregistré pour chaque essai. Un essai se terminait lorsque les souris tombaient ou lorsqu'elles atteignaient 300 secondes. Un temps d'acclimatation de 60 secondes était accordé en début de chaque journée et un temps de repos de 60 secondes entre chaque essai. Dans ce test moteur, les animaux vont modifier leur patron de marche afin d'améliorer leur

performance à chaque essai indépendamment de la capacité motrice ou encore de la forme physique (Buitrago, Schulz et al. 2004).



Figure 3.1 Rotarod.

3.4.2 « Wire suspension test »

Ce test consistait à suspendre la souris par les pattes au milieu d'un câble (longueur 80 cm, hauteur 25 cm) fixé entre deux plates-formes. Le « *wire suspension* », un test de coordination et de force motrice bien connue au laboratoire, où le temps nécessaire pour atteindre l'une des plates-formes avait été enregistré. Le temps maximal autorisé pour terminer chaque test était fixé à 60 secondes (Chagniel, Robitaille et al. 2012).



Figure 3.2 « Wire suspension test ».

3.4.3 « Beam test »

Ce test consistait en une poutre de 1 mètre avec une surface plane de 6 mm de large. La poutre devait être maintenue sur deux supports situés à 50 cm du sol. Le « *beam test* » était un test de coordination motrice déjà maîtrisé par le laboratoire. Le temps que les souris mettaient pour traverser la poutre avait été mesuré pour un temps maximal de 60 secondes (Luong, Carlisle et al. 2011).



Figure 3.3 « Beam test ».

3.5 Description des groupes expérimentaux

Nos travaux étaient séparés en quatre cohortes de souris distinctes. Chaque cohorte comprenait un groupe A traité au véhicule, un groupe B traité à la rapamycine et un groupe C traité au PF4708671. Tous les groupes contenaient 6 souris qui ont été soumises aux mêmes conditions expérimentales.

La **figure 3.5A** représente le modèle expérimental utilisé afin d'évaluer l'effet de la rapamycine et du PF4708671 sur l'exécution et la capacité motrice avec notre première cohorte. Pour ce faire, les souris ont d'abord appris le rotarod accéléré pour ensuite être injectées à leur traitement 1 heure avant le début du jour 4. Afin de s'assurer l'élimination

des drogues, la même cohorte a ensuite été soumise à un préentraînement du « beam test » et du « wire suspension » au jour suivant, soit le jour 5, sans aucun traitement. Elles ont finalement été injectées au jour 6, 1 heure avant les tests. Nous comparions l'effet pré-injection avec celle post-injection. Le sacrifice était fait à la fin du jour 6.

Pour l'objectif 2, l'effet des traitements sur la phase de consolidation soit l'effet intersession (**Fig. 3.5B**), nous avons utilisé les souris d'une deuxième cohorte. Celles-ci étaient injectées par voie i.p. avec les différents traitements directement après la séance d'entraînement au jour 1 et 2, pour ensuite vérifier l'effet au jour suivant soit le 2 et le 3.

Pour le dernier objectif, nous voulions savoir l'effet de la rapamycine et du PF4708671 à l'intérieur d'une même séance d'entraînement, soit l'effet intrasession (**Fig. 3.5C**). Les souris avaient été séparées en deux groupes, la troisième cohorte était injectée 15 minutes et la quatrième 1 heure avant le rotarod accéléré chaque jour.

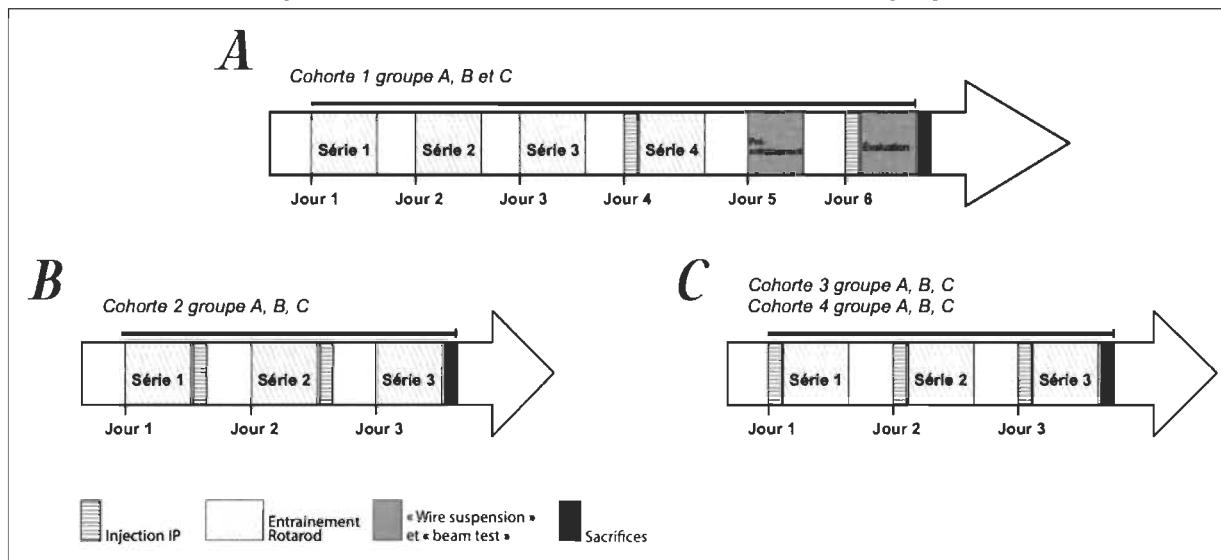


Figure 3.4 Modèle expérimental.

Tous les animaux ont eu le même environnement et étaient soumis aux mêmes tests. (A) Effet de la rapamycine et du PF4708671 sur l'exécution et la capacité motrice chez les souris de la cohorte 1. (B) Effet des inhibiteurs sur la phase de consolidation, effet intersession. La cohorte 2 était soumise aux injections i.p. après le dernier essai de rotarod aux jours 1 et 2. (C) Effet des inhibiteurs sur une même séance de rotarod, effet intrasession. Les souris de la cohorte 3 étaient injectées 15 minutes avant l'entraînement puis la cohorte 4 injectée 1 heure avant le Rotarod aux jours 1-2-3.

3.6 L'analyse des données

Les données étaient analysées en utilisant le logiciel Graph Pad Prism (version 5.0, Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) pour effectuer un one-way ANOVA suivie des tests post hoc Newman-Keuls ou un two-way ANOVA suivie du test post hoc de Bonferroni. Les données étaient rapportées sous forme de moyenne \pm SEM. et la signification statistique, fixée à P <0,05.

CHAPITRE IV

RÉSULTATS

4.1 Effet de l'administration de la rapamycine et du PF4708671 sur la quantité des protéines impliquées dans la voie de signalisation mTOR dans le striatum de souris

Premièrement, nous voulons vérifier l'effet de la rapamycine et du PF4708671 sur les quantités de protéines impliquées dans la voie de signalisation mTOR. Pour ce faire, nous utilisons le Western Blot à l'aide d'échantillons de striatum recueillis chez les souris qui ont reçu le traitement respectif une heure avant le sacrifice. Afin de mesurer la quantité totale de protéine, nous utilisons un anticorps qui reconnaît toutes les formes de la protéine, autant active que non active. Afin de déterminer indirectement le niveau d'inhibition de la rapamycine et du PF4708671, nous comparons les quantités de protéines phosphorylées chez les souris traitées avec les souris contrôles. Les sites de phosphorylation utilisés pour l'étude les protéines de la voie mTOR, sont associés à une conformation active. L'enzyme GAPDH est utilisé comme contrôle négatif. Puisque cette protéine est stable et ubiquitaire dans les cellules, elle nous permet de s'assurer que nous chargeons la même quantité de protéine dans chaque puits lors des expérimentations Western Blot (Barber et al., 2005). Les statistiques sont calculées à l'aide d'une moyenne à partir de triplicata de 6 souris par groupe, puis rapporter en pourcentage. Nous avons ensuite réalisé un ANOVA de type « one-way », suivie du test post hoc Newman-Keuls ($*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$).

Tout d'abord, pour la protéine mTOR (**fig 4.1A**), nos résultats démontrent qu'il n'y a aucune différence entre les groupes traités avec la rapamycine, le PF4708671 ou encore le véhicule, lorsqu'un anticorps reconnaissant toutes les formes de mTOR (mTOR total) est utilisé. Par contre, lorsque nous mesurons sélectivement la quantité de la protéine mTOR phosphorylée sur la sérine 2448, un site couramment utilisé pour reconnaître la forme active de mTOR, il est possible d'observer une diminution de 50 % après l'injection de la rapamycine en comparaison avec l'injection du véhicule ($p = 0,0239$). Pour le traitement au PF4708671, il en est autrement, car aucune différence n'est observée sur les niveaux de mTOR phosphorylée à la sérine 2448 ($p = 0,2552$). Au niveau de la protéine P70 S6K (**fig 4.1B**), l'analyse de la quantité de protéines totales ne démontre aucune différence statistiquement significative entre les groupes traités avec le véhicule, la rapamycine ou le PF4708671. En revanche, la quantité de P70 S6K phosphorylée sur le site catalytique de mTOR, la thréonine 389, diminue de 40% après le traitement à la rapamycine ($p = 0,0282$) et de 32% pour le PF4708671 ($p = 0,0355$).

Finalement, nous trouvons pertinent d'aller voir la quantité de protéine active, soit phosphorylée, pour un substrat commun de mTOR et P70 S6K, afin de voir l'étendu de l'inhibition de mTOR et de P70 S6K plus loin dans la voie de signalisation. Pour ce faire, nous utilisons la protéine S6rp (**fig. 4.1C**). Le premier graphique à gauche montre qu'il n'y a pas de différence entre les traitements pour la protéine totale. Toutefois, l'inhibition à la rapamycine diminue de 91 % les niveaux de S6rp phosphorylée sur les séries 235/236 ($p < 0,0001$) et de 69 % pour S6rp phosphorylée sur les séries 244/246 ($p < 0,0001$). Pour ce qui est de PF4708671, son inhibition diminue la quantité de protéine

phosphorylée de 40 % sur les séries 235/236 ($p = 0,0287$) et de 41 % sur les séries 244/246 ($p = 0,0061$).

Est-ce que ces inhibitions rapportées au niveau biochimique seront suffisamment élevées pour traduire des effets sur la mémorisation et l'apprentissage d'une nouvelle tâche motrice complexe est une excellente question. Les éléments de réponses se trouvent dans mes résultats subséquents.

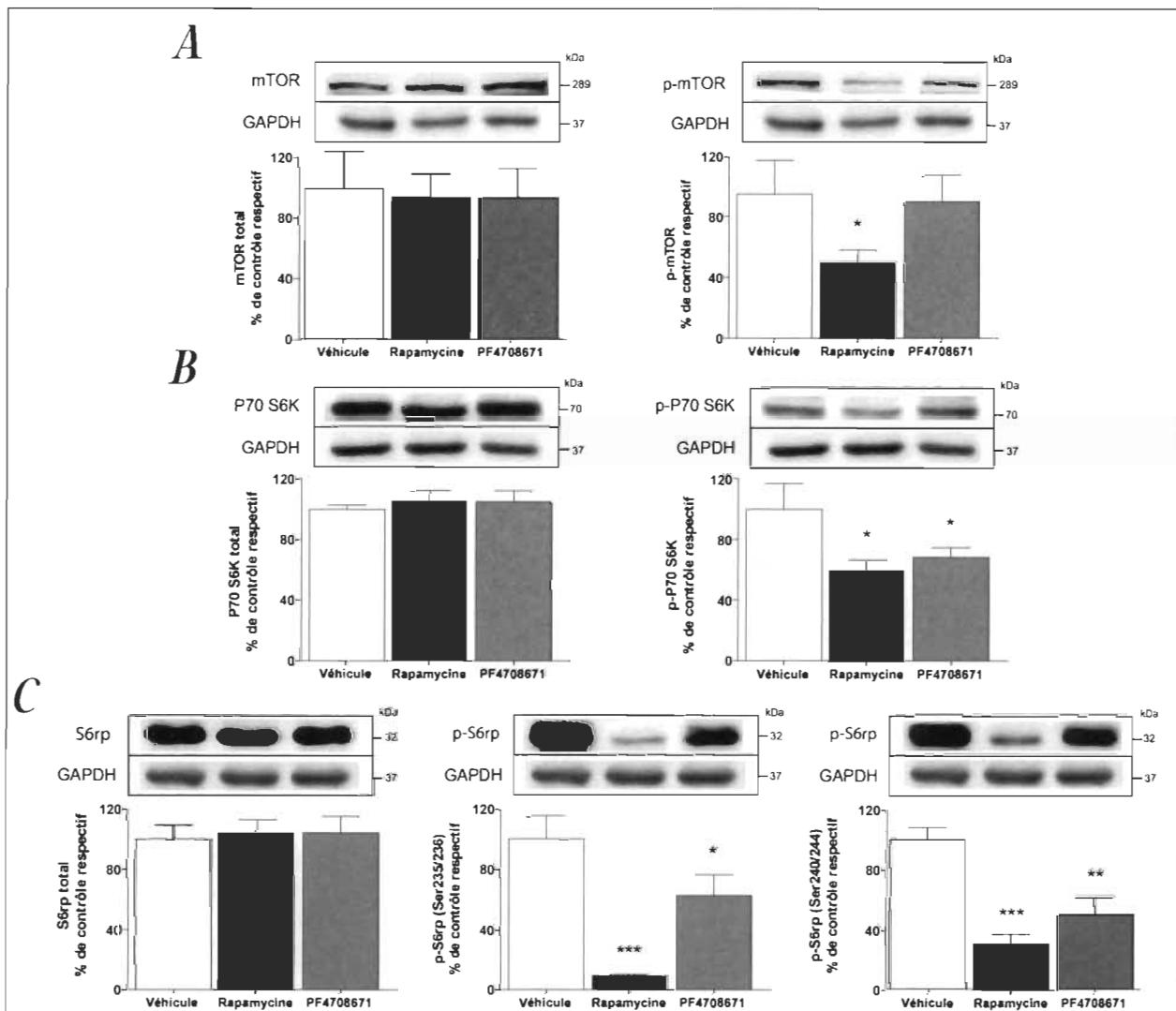


Figure 4.1 Effets des traitements à la rapamycine et du PF4708671 sur la quantité des protéines de la voie mTOR dans le striatum.

Les quantités des protéines totales et phosphorylées (A) de mTOR, (B) de P70 S6K, et (C) de S6rp sont évaluées par Western blot dans le striatum de souris après 1 heure après l'injection par voie i.p. avec le véhicule (1% DMSO, 10% Tween-80, PBS 1X), la rapamycine (40 mg/kg) ou le PF4708671 (50 mg/kg). Les données, exprimées par rapport à la quantité de GAPDH, représentent la moyenne de la densité optique

relative en triplicata de mTOR, P70 S6K et S6rp (exprimées en pourcentage des valeurs de contrôle) \pm S.E.M., n = 6 souris/groupe. *p < 0,05, **p<0,01, ***p < 0,001 vs groupe véhicule respectif.

4.2 Impact de l'inhibition de la voie de signalisation mTOR sur l'exécution, la coordination et la capacité motrice des souris

Pour ce deuxième objectif, nous voulons évaluer les effets de la rapamycine et du PF4708671 sur l'exécution, la coordination et la capacité motrices chez la souris lorsqu'une tâche est déjà apprise. Pour ce faire, nous avons préentraîné des souris à certains tests moteurs afin qu'elles puissent exécuter les tâches pleinement de façon automatique et avec aisance. Une fois que les tests sont acquis par les souris, nous leur injectons l'un ou l'autre des deux composés pharmacologiques ou le véhicule. Donc, dans cet objectif, seules les capacités motrices, dont la coordination et la force motrice sont en cause et aucunement l'apprentissage. Tel que décrit dans la méthodologie, nous utilisons le rotarod accéléré, le « *beam test* » et le « *wire suspension test* », **figure 4.2**.

Tout d'abord, la **figure 4.2A** présente les résultats obtenus pour le rotarod accéléré, soit le temps passé sur le cylindre en fonction des dix différents essais. La courbe d'apprentissage moteur des jours 1 à 3 est en accord avec les différentes phases d'un apprentissage moteur qui sont rapportées dans la littérature (Bureau, Carrier et al. 2010, Chagniel, Bergeron et al. 2014). En outre, nous pouvons observer sur le rotarod l'atteinte d'un plateau à 300 secondes au jour 3, ce qui nous indique que la tâche est pleinement apprise. Nous voulons apporter votre attention sur la comparaison des performances entre le jour 3 et le jour 4 (**fig. 4.2B**), qui est fait l'aide des deux premiers essais et des deux derniers essais. En effet, ces résultats illustrent qu'il n'y a aucune différence significative entre les souris traitées par l'un ou l'autre des deux inhibiteurs et les contrôles au jour 4 (p = 0,5499). De plus, il n'y a aucune différence entre les performances du jour 3 et du

jour 4, même après traitement, les souris font toutes près de 300 secondes à chaque essai. L'analyse statistique sont réalisées à l'aide d'une ANOVA à mesures répétées dans les deux sens, suivie du test post hoc de Bonferroni.

Par la suite, pour le « *beam test* » (**fig. 4.2C**), où la coordination est grandement affectée par la fine largeur du « *beam* », il est possible de remarquer que les souris contrôles prennent en moyenne 4 secondes pour traverser d'une plateforme à l'autre. Les souris injectées à la rapamycine, quant à elle, prennent en moyenne 5 secondes et un peu plus de 4 secondes pour celles injectées au PF4708671, cette différence est acceptable et est l'erreur relative au test (Carter et al., 2001). Il n'y a donc aucune différence significative entre les souris traitées avec les inhibiteurs et les contrôles pour la tâche du « *beam test* » ($p = 0,1491$). Les deux trainements ne semblent donc pas affecter la coordination des souris pour ce test. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide d'un « one-way » ANOVA, suivie du test post hoc Newman-Keuls.

Finalement, le « *wire suspension test* » (**fig. 4.2D**), où la coordination et la force motrice est en cause, nos analyses illustrent aucune différence observable entre les différents groupes de traitements ($p = 0,8286$). Effectivement, les souris prennent toutes en moyenne 8 secondes pour traverser d'un côté à l'autre du fil suspendu qu'elles soient traitées au véhicule, à la rapamycine ou au PF4708671. Les analyses statistiques sont également réalisées à l'aide d'un « one-way » ANOVA, suivie du test post hoc Newman-Keuls.

À la lumière de ses résultats, il est possible de conclure que les deux inhibiteurs pharmacologiques ne semblent pas affecter pas la motricité et la force des souris sur des tâches motrices déjà apprises.

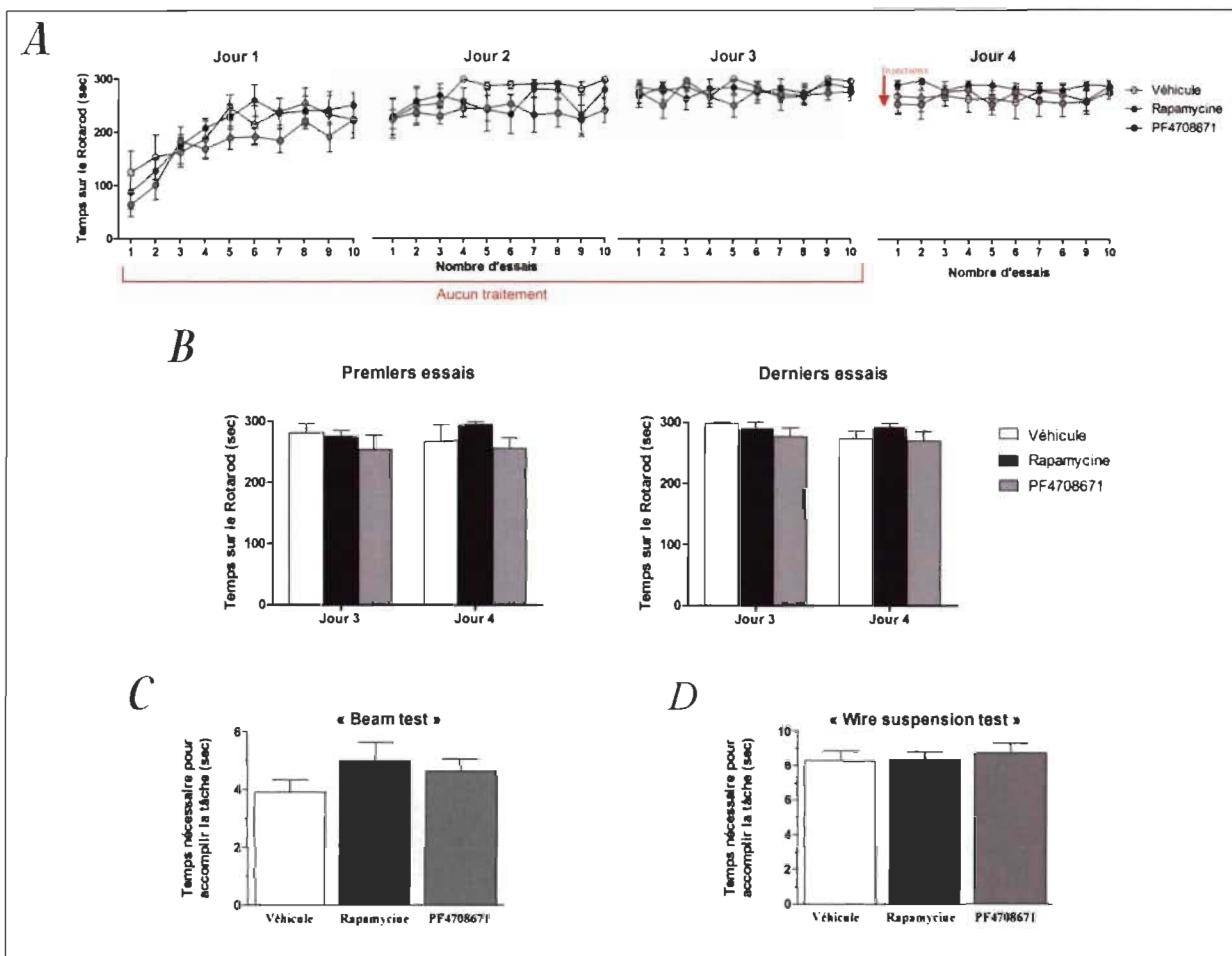


Figure 4.2 Effet des inhibiteurs de mTOR et de P70, par la rapamycine et le PF4708671 respectivement, sur des tests de la capacité motrice.

(A) Le test du rotarod accéléré est réalisé par des souris sans traitement aux jours 1, 2 et 3, qui ont été traitées par voie i.p. avec le véhicule (1% DMSO, 10% Tween-80, PBS 1X), la rapamycine (40 mg/kg) ou le PF4708671 (50 mg/kg) avant de poursuivre le test au jour 4. Les valeurs représentent la moyenne de temps sur le rotarod en secondes, \pm S.E.M., n = 6 souris/groupe. (B) Moyennes des deux premiers et des deux derniers essais aux jours 3 et 4 d'entraînement sur le rotarod. Les valeurs représentent la période de temps moyen sur le rotarod, en seconde, \pm S.E.M., n = 6 souris/groupe. La coordination et la force motrice sont évaluées avec le (C) « beam test » et le (D) « wire suspension test ». Les données représentent la période de temps moyen, en secondes, nécessaire afin d'accomplir la tâche par les souris traitées au véhicule, à la rapamycine et au PF4708671 \pm S.E.M., n = 6 souris/groupe.

4.3 Impact de l'inhibition de la voie de signalisation mTOR sur l'effet intersession d'un nouvel apprentissage moteur chez la souris

Ce troisième objectif vise à déterminer l'importance de mTOR et de P70 S6K entre deux entraînements d'apprentissage moteur, soit l'effet intersession. Pour ce faire, nous utilisons l'apprentissage du rotarod accéléré comme tâche motrice complexe, et les souris

sont injectées à la rapamycine, au PF4708671 ou au véhicule directement à la fin d'un entraînement. Par la suite, nous vérifions la différence entre la fin d'une journée et le début de l'entraînement ultérieur, tel que décrit dans la méthodologie (**fig. 3.5B**).

Selon les résultats du rotarod accéléré détaillé à la **figure 4.3A**, les souris de tous les groupes démontrent des courbes d'apprentissage moteur normales et semblables à ce qui est reporté dans la littérature (Buitrago, Schulz et al. 2004). Je porte votre attention sur la comparaison les moyennes des deux derniers essais d'une journée versus les deux premiers essais du jour suivant (**fig. 4.3B**). À ce niveau, aucune différence à la baisse n'est visible entre le jour 1 et le jour 2 (rapamycine $p = 0,9919$ et PF4708671 $p = 0,6924$). En fait, les souris sont meilleures le jour suivant une séance d'entraînement. Pour ce qui est de la différence entre le jour 2 et le jour 3, il est possible de remarquer que les souris maintiennent leur niveau de performance et donc aucune différence n'est significative (rapamycine $p = 0,6662$ et PF4708671 $p = 0,4651$). Toutes les analyses sont réalisées à l'aide d'une ANOVA à mesures répétées dans les deux sens, suivie du test post hoc de Bonferroni.

Selon nos résultats, il ne semble ainsi pas y avoir d'effet pour les traitements lorsque l'injection est faite après l'apprentissage d'une nouvelle tâche motrice, soit sur l'effet intersession.

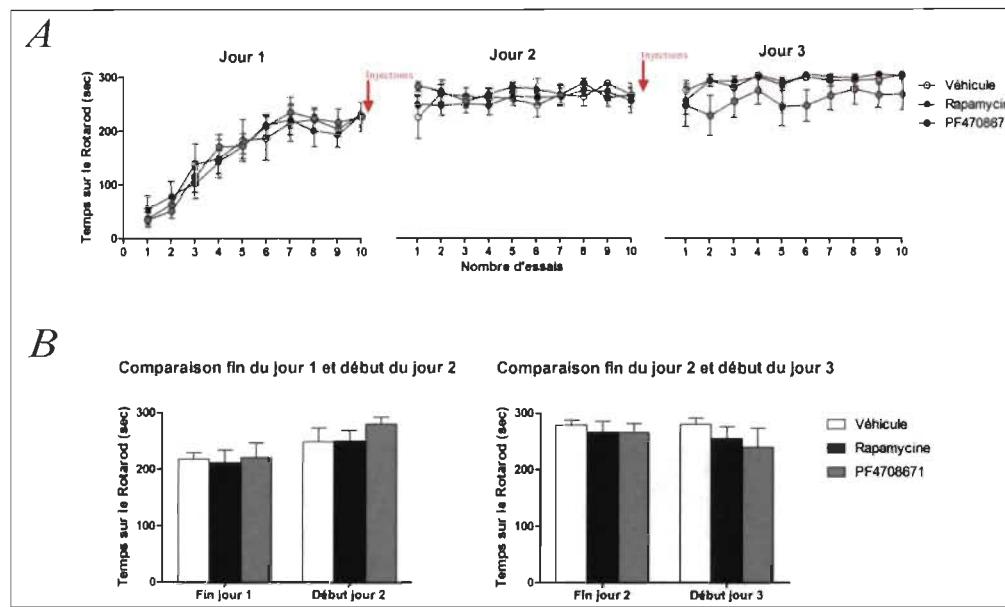


Figure 4.3 Effet de la rapamycine et du PF4708671 sur l'apprentissage intersession.

(A) Temps passé sur le rotarod accéléré par les souris injectées par voie i.p. avec le véhicule (1% DMSO, 10% Tween-80, PBS 1X), la rapamycine (40 mg/kg) ou le PF4708671 (50 mg/kg) directement après les jours 1 et 2. (B) Comparaison des deux derniers essais d'un jour avec les deux premiers essais du jour suivant. Les valeurs représentent la période de temps moyen sur le rotarod, en seconde, \pm S.E.M., n = 6 souris/groupe.

4.4 Impact de l'inhibition de la voie de signalisation mTOR sur l'effet intrasession d'un nouvel apprentissage moteur chez la souris

Finalement, ce dernier objectif vise à démontrer l'effet de l'inhibition de la voie de signalisation mTOR sur un apprentissage moteur intrasession. Pour ce faire, nous utilisons la rapamycine et le PF4708671, mais ici injectée avant l'apprentissage du rotarod accéléré, tel que décrit dans la méthodologie (fig. 3.5C). Les souris reçoivent un traitement i.p. soit 1 heure ou 15 minutes avant les séances d'entraînement. Il est ainsi possible de comparer l'apprentissage moteur intrasession entre les différents groupes à chacun des jours d'entraînement et à l'intérieur de deux « fenêtres d'activations » de nos inhibiteurs.

La figure 4.4A présente les résultats du rotarod accéléré pour les souris soumises au traitement à la rapamycine 1 heure ou 15 minutes avant l'entraînement moteur. Le premier graphique est le temps passé sur le rotarod en fonction des essais sur les trois premiers jours d'entraînement. Aucune différence significative n'est visible entre les groupes au jour 1 (Début 1h $p = 0,2695$ et 15min $p = 0,1572$; Fin 1h $p = 0,5206$ et 15min $p = 0,8531$) tandis qu'au jour 2, il y a une faible baisse pour les souris injectées à la rapamycine 1 heure avant l'apprentissage. Cependant, il est important de noter que cet écart n'est pas significativement différent des souris contrôles (Début $p = 0,0813$; Fin $p = 0,2834$) et elle se résorbe au jour suivant. Il n'y a aucune différence pour les souris injectées 15 minutes avant le rotarod au jour 2 (Début $p = 0,8717$; Fin $p = 0,8284$). Au jour 3, tous les groupes de souris voient leur performance saturer à environ 300 secondes (1h $p = 0,9475$ et 15min $p = 0,9997$). De plus, le deuxième graphique en 4.4B nous confirme qu'il n'y a aucune différence significative dans l'analyse de l'apprentissage moteur en comparant les moyennes des deux premiers avec celles des deux derniers essais.

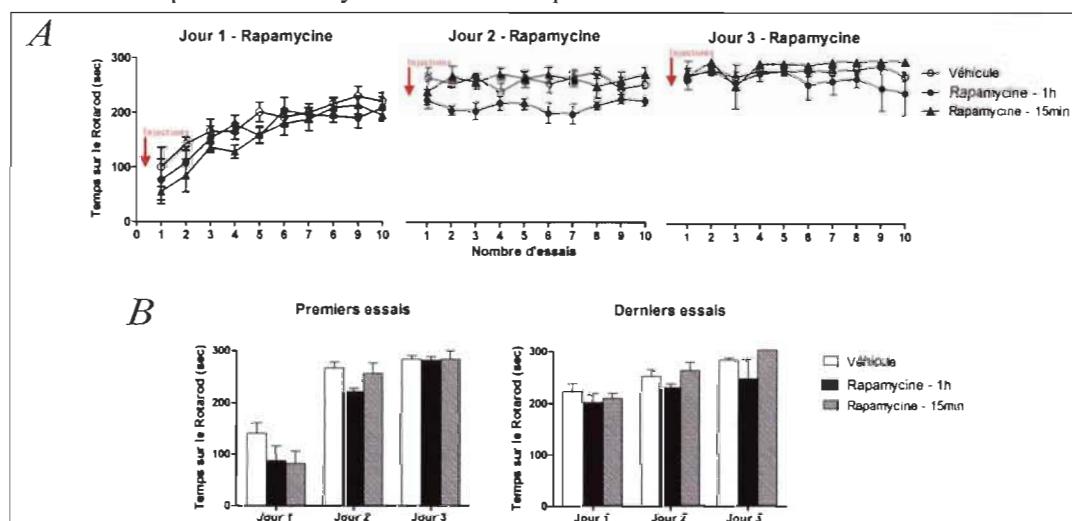


Figure 4.4 Effet de la rapamycine sur l'apprentissage moteur intrasession

(A) Temps passé sur le rotarod accéléré par les souris injectées par voie i.p. avec le véhicule (1% DMSO, 10% Tween-80, PBS 1X) et la rapamycine (40 mg/kg) 1 heure ou 15 minutes avant les séances. (B) L'apprentissage est analysé en regroupant les deux premiers et les deux derniers essais chaque jour d'entraînement. Les valeurs représentent la période de temps moyen sur le rotarod, en seconde, \pm S.E.M., $n = 6$ souris/groupe et $n = 12$ souris contrôle.

En revanche, lorsque les souris sont injectées avec le PF4708671, il est possible de remarquer des résultats significativement différents. Notamment, à la **figure 4.5A**, il est possible de voir, visuellement, une différence notable entre les groupes traiter au PF4708671 en comparaison aux contrôles. L'analyse statistique des moyennes des deux premiers et deux derniers essais, **figure 4.5B**, permet de déterminer que des différences significatives sont présentes entre les souris traitées au PF4708671 et celles au véhicule autant au début qu'à la fin des séances d'entraînement pour chacune des journées analysées. En effet, nous remarquons dès le jour 1 une diminution des performances sur le Rotarod accéléré pour les souris injectées au PF4708671. Dès le début du premier jour d'entraînement, les souris injectées 15 minutes avant le début de l'entraînement démontrent des performances inférieures à celles observées pour les deux autres groupes ($p = 0,0185$). Cette différence est toujours perceptive à la fin de cette journée de rotarod ($p = 0,0367$). La différence entre les contrôles et les deux groupes de souris traitées au PF4708671 s'intensifie également lors des premiers essais du jours 2 (1h $p = 0,0244$ et 15min $p = 0,0185$) et du jour 3 (1h $p = 0,0382$ et 15min $p = 0,0406$). Finalement, la tendance à la baisse reste significative à la fin du jour 2 (1h $p = 0,0493$ et 15min $p = 0,0213$) et uniquement pour l'injection 1 heure du jour 3 ($p = 0,459$). Toutes les analyses sont réalisées à l'aide d'une ANOVA à mesures répétées dans les deux sens, suivie du test post hoc de Bonferroni.

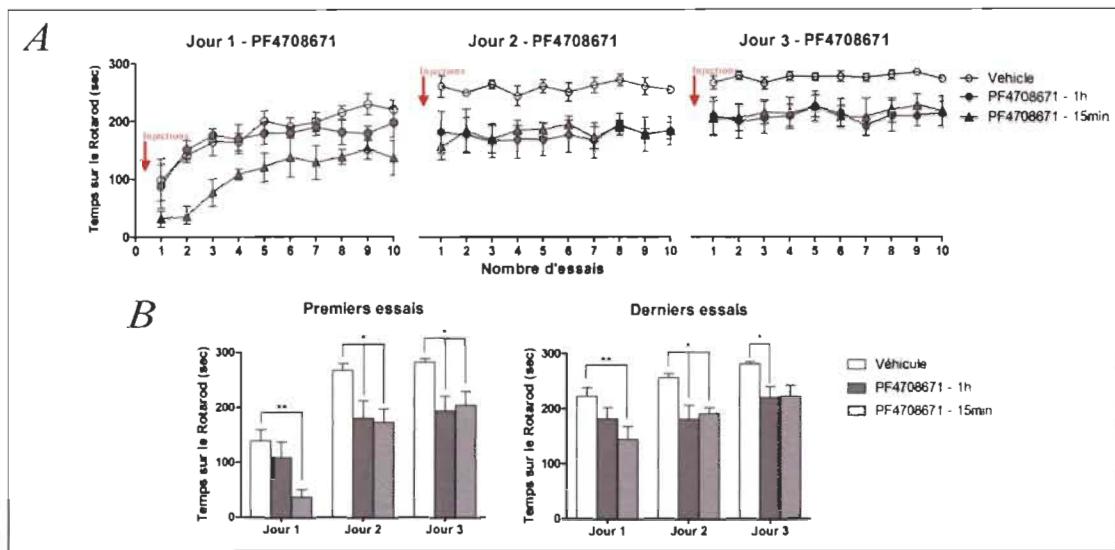


Figure 4.5 Effet du PF4708671 sur l'apprentissage moteur intrasession.

(A) Temps passé sur le rotarod accéléré par les souris injectées avec le véhicule (1% DMSO, 10% Tween-80, PBS 1X) et le PF4708671 (50 mg/kg). (B) L'apprentissage est analysé en regroupant les deux premiers et les deux derniers essais chaque jour d'entraînement. Les valeurs représentent la période de temps moyen sur le rotarod, en seconde, \pm S.E.M., $n = 6$ souris/groupe et $n = 12$ souris contrôle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs groupe véhicule respectif.

CHAPITRE V

DISCUSSION

Ces travaux de recherche s'intéressent à l'implication de la voie de signalisation mTOR dans les différentes phases de l'apprentissage moteur. Nous démontrons qu'une inhibition de plus de 35% de la protéine P70 S6K au striatum de souris est associée à un retard considérable de la mémorisation d'un nouvel apprentissage moteur à l'intérieur d'une même session d'entraînement (effet intrasession), et ce, sans affecter les processus de mémorisation qui s'opèrent entre les sessions d'entraînement (effet intersession) ainsi que la motricité générale des souris. Les résultats sont discutés dans ce chapitre.

5.1 Effet de l'administration de la rapamycine et du PF4708671 sur la voie de signalisation mTOR au niveau moléculaire dans le striatum de souris

Les résultats de mes expérimentations démontrent que les doses utilisées de rapamycine et du PF4708671 inhibent les protéines de la voie mTOR au striatum des souris à des niveaux tous supérieurs à 32 %. Notamment, lorsque nous examinons l'inhibition sur la protéine rpS6, qui est en aval de mTOR et P70 S6K, il est possible de distinguer l'effet des deux inhibiteurs pharmacologiques. L'inhibition de rpS6 est très marquée pour les striatums de souris injectées à la rapamycine, soit plus de 91%. Là où c'est intéressant, c'est qu'il est recensé dans la littérature que l'activité rpS6 serait augmentée pendant la plasticité synaptique et pourrait même être utilisée pour estimer l'état d'activité neuronale dans le striatum de souris (Bertran-Gonzalez, Chieng et al. 2012, Biever, Valjent et al. 2015). Les résultats d'inhibition pour des injections i.p. avec

la rapamycine se comparent aussi avec la littérature, soit environ de 40% à 50% d'inhibition dans certaines structures du cerveau des souris (Spilman, Podlutskaya et al. 2010, Bergeron, Chagniel et al. 2014). Cependant, pour le PF4708671, puisque c'est un inhibiteur relativement nouveau, il y a très peu d'étude où son inhibition est testée au niveau moléculaire. Néanmoins, la dose de 50 mg/kg a été utilisée à quelques reprises dans des études sur la mémoire chez la souris. Il est connu qu'avec cette dose, l'inhibition est significative pour la protéine P70 S6K, ce qui se compare avec nos résultats de western blot (Huynh, Santini et al. 2014). Également, selon ces résultats, il est possible d'utiliser la rapamycine à 40 mg/kg et le PF4708671 à 50 mg/kg afin de vérifier le rôle de mTOR et P70 S6K lors de l'apprentissage moteur chez la souris.

Il est important de savoir que la technique de western blot a utilisé des échantillons de cerveau de souris qui correspondent à un mélange de différentes cellules contenues dans la région disséquée. En effet, le striatum est composé de plusieurs types cellulaires, dont des neurones, des astrocytes, des oligodendrocytes, des cellules immunitaires, des épendymocytes ainsi que des cellules vasculaires (Gokce, Stanley et al. 2016). Nos résultats obtenus avec la technique de western blot incluent donc tous les types cellulaires, et non pas uniquement les neurones. Par contre, il est déjà bien démontré que l'effet principal d'un apprentissage moteur influence majoritairement les cellules neuronales dues à la forte création de nouvelles connexions entre les neurones du cerveau (Karni, Meyer et al. 1998). De plus, il fut démontré, plus récemment, que chez la souris la voie de signalisation mTOR serait importante dans les oligodendrocytes. Par contre, il faut savoir que dans ce type de cellule, lorsque mTOR est inhibé par la rapamycine il semble y avoir une compensation par ERK 1/2 diminuant les impacts comportementaux de la perte de

mTOR (Dai et al., 2014). Suite à ses informations et afin d'être plus précis, nous aurions pu faire la séparation des cellules par neurocytométrie afin d'avoir uniquement les neurones du striatum et ensuite faire les westerns blots (Martin, Xu et al. 2017) ou encore, utiliser la technique d'immunofluorescence. Par contre, notre but est simplement de vérifier si l'activité des protéines est inhibée par les traitements au niveau du cerveau des souris. Ainsi, nos résultats permettent ainsi de conclure que les deux inhibiteurs se rendent au striatum de souris et inhibe les protéines d'intérêt à des niveaux significativement différents des souris contrôles.

5.2 Impact de l'inhibition de la voie de signalisation mTOR sur l'exécution, la coordination et la capacité motrice des souris

Afin de bien étudier l'apprentissage moteur chez les souris, il est important de s'assurer que les résultats obtenus à la suite de l'injection des inhibiteurs ne soient pas le reflet d'une incapacité physique ou psychique à effectuer la tâche motrice. C'est pourquoi nous avons préentraîné les souris avant d'effectuer l'injection d'inhibiteurs au test du rotarod accéléré, du « *beam test* » et du « *wire suspension test* ». Aucun conditionnement, comme par exemple des chocs électriques lorsque les souris tombent du rotarod, n'a été utilisé pour forcer la souris à rester sur le rotarod ou l'obliger à réaliser la tâche (Krzyszton, Sparkman et al. 2008). Nous pouvons alors suggérer que la principale composante responsable de l'amélioration des habiletés motrices sur le rotarod vient de l'apprentissage moteur et non pas de la peur ou de l'anxiété de tomber en bas de la barre. Nos résultats montrent que la rapamycine et le PF4708671 n'ont aucune influence sur les performances des souris durant la réalisation de ces trois tests lorsque la tâche motrice est déjà apprise. Ainsi nos résultats suggèrent que les deux inhibiteurs aux doses utilisées n'ont pas d'effets sur l'orientation spatiale, la coordination, la somnolence, l'état de vigilance ainsi que la

force musculaire des souris; des altérations qui auraient toutes fortement influencé la performance des souris à aux tests moteurs. De plus, bien qu'il soit démontré qu'une inhibition de mTOR par la rapamycine affecte les muscles chez la souris (Goodman, 2014), les résultats obtenus nous permettent de conclure que la dose utilisée est parfaite puisqu'elle n'affecte ni la force ni les capacités motrices des souris.

Dans la littérature, il est possible de trouver d'autres évidences, chez la souris, permettant d'affirmer que les capacités motrices des souris ne sont pas altérées de façon générale aux doses utilisées (Blundell, Kouser et al. 2008, Huynh, Santini et al. 2014, Bockaert et Marin 2015, MacCallum et Blundell 2020). En particulier, les résultats du rotarod accéléré se comparent directement avec la littérature lors de l'utilisation de la rapamycine chez la souris, où il est possible de voir un retard dans l'apprentissage des souris (Deli, Schipany et al. 2012, Bergeron, Chagniel et al. 2014). À notre connaissance, notre étude est la première à vérifier les effets de la rapamycine et du PF4708671 en incluant une aussi grande batterie de tests pour mesurer directement la force motrice et la coordination.

5.3 Impact de l'inhibition de la voie de signalisation mTOR sur l'effet intersession d'un nouvel apprentissage moteur chez la souris

Nos résultats tendent à démontrer que lorsque les injections des inhibiteurs sont faites à la fin des séances d'entraînement, il n'y a aucun effet sur les performances du rotarod accéléré. Ainsi les inhibiteurs ne semblent pas affecter les processus intersession. Ces résultats se comparent avec des études antérieures où l'inhibition de mTORC1 et de P70 S6K chez la souris directement après l'apprentissage n'a aucun effet sur la formation ou la persistance de la mémoire de la peur (Bekinschtein, Katche et al. 2007, MacCallum

et Blundell 2020). Cependant, certains groupes de chercheurs établissent que l'effet intersession est important lors de l'apprentissage de nouvelles tâches motrices. Ces études ont été faites chez l'humain à l'aide du « finger tapping task » ainsi que chez le rongeur à l'aide du rotarod accéléré. Dans les deux cas, les sujets étant privés de sommeil ou ayant un sommeil interrompu avaient un apprentissage retardé en comparaison avec ceux qui avaient un sommeil normal (Kuriyama, 2004, Nagai, de Vivo et al. 2017, Kam, Kang et al. 2020). Il faut noter que, dans ce projet, une seule injection était faite à la fin de l'entraînement pour couvrir une période d'environ 24 heures. Puisque nous ne connaissons pas très bien la pharmacocinétique des inhibiteurs, il est probable que ceux-ci n'agissent à leur pic d'activité que pendant quelques heures. Dans la littérature, il est démontré que la demi-vie de la rapamycine serait relativement longue, soit environ 15 heures chez la souris (MacCallum et Blundell 2020). Pour le PF4708671, nous n'avons trouvé aucune donnée pharmacocinétique estimant la demi-vie plasmatique. Sachant que ces deux inhibiteurs abaissent les niveaux de p-mTOR, p-P70 S6K et p-S6rp au striatum de souris, il serait alors opportun de mesurer par western blot la quantité de ces protéines au striatum 20 heures après les injections. Ainsi nous pourrions vérifier que la raison de ces résultats négatifs n'est pas une inhibition trop faible de la voie mTOR. Par contre, nos résultats comportementaux suggèrent que ce ne serait pas les protéines mTOR et P70 S6K qui agiraient de façon importante dans l'effet intersession.

5.4 Impact de l'inhibition de la voie de signalisation mTOR sur l'effet intrasession d'un nouvel apprentissage moteur chez la souris

Tout d'abord, nos résultats démontrent qu'il n'a aucune différence significative entre les performances sur le rotarod des souris traitées à la rapamycine en comparaison avec les contrôles, peu importe l'attente de 15 minutes ou d'une heure après les injections.

Ceci est en contradiction avec certaines études qui montrent un lien direct entre l'inhibition de mTORC1 et l'apprentissage ou la mémoire chez le rongeur (Hoeffter et Klann 2010, Bergeron, Chagniel et al. 2014). Des considérations expérimentales pourraient expliquer ces différences dans les résultats obtenus. Par exemple, l'étude de Bergeron Y et al 2014 a utilisé des injections intracraniales de rapamycine directement dans le striatum des souris qui serait ainsi plus spécifique puisque seul le striatum est inhibé par la rapamycine. Également, l'utilisation de souris « knock-out » de la protéine Tsc, un effecteur de l'activation de mTORC1, ont un grand déficit d'apprentissage et de mémoire ainsi qu'une diminution de la plasticité synaptique par Hoeffter et Klann 2010. D'un autre côté, ceci pourrait aussi s'expliquer par l'utilisation d'injections systémiques de rapamycine et de la fenêtre d'activation de la protéine mTOR lors d'un apprentissage. Effectivement, il est possible que la protéine soit activée à plus grande échelle à l'extérieur des fenêtres utilisées dans notre contexte. Si nous gardons en tête que la voie de signalisation mTOR est particulièrement activée via la protéine P70 S6K, je me demande s'il serait possible qu'un pourcentage suffisamment grand de la protéine demeure actif malgré une inhibition de mTOR dans les neurones du striatum, diminuant ainsi l'effet de la rapamycine? C'est une question qui mériterait d'être investiguée davantage.

Nos résultats démontrent également que l'inhibition de la protéine P70 S6K par le PF4708671 affecte l'apprentissage moteur intrasession peu importe la fenêtre d'action et à une plus grande échelle lorsque l'injection est faite 15 minutes avant le rotarod. De plus, le PF4708671 ne semble pas bloquer complètement l'apprentissage moteur intrasession, il semble plutôt le retarder. En effet, il est possible d'observer que les souris vont tout de même atteindre le maximum de performance sur le rotarod, mais plus tardivement que les

souris contrôles. Puisqu'aucune étude n'a évalué le rôle de P70 S6K dans notre contexte de l'apprentissage d'une nouvelle tâche motrice, il est difficile de comparer nos données. Par contre, il est possible de voir des résultats similaires dans une étude, soit un retard d'apprentissage moteur des souris. Cette dernière utilisait le PF4708671 pour évaluer l'importance de P70 lors du sommeil durant l'apprentissage du rotarod accéléré (Kam, Kang et al. 2020). Il fut également établi que les souris déficientes en P70 S6K1 par le « knock-out » (KO) de la protéine ont des déficits précoces de la mémoire cognitive basée sur des tâches multiples. Ceux-ci soulèvent que la délétion de P70 S6K1 entraîne des déficits de la plasticité synaptique à l'intérieur de la région de l'hippocampe aux cerveaux de souris (Antion, Merhav et al. 2008). Donc, ces études additionnées à la nôtre démontrent que P70 S6K semble avoir un rôle important dans les processus de mémoire de façon générale.

De plus, il serait intéressant de vérifier si ce retard d'apprentissage se résorbe après une pause d'entraînement de longue durée. En effet, selon nos résultats, l'inhibiteur spécifique de P70 S6K ne semble pas affecter l'effet intersession, donc la consolidation. La question est de savoir si les processus de consolidation peuvent compenser suite au retard occasionné par le PF4708671 en début d'apprentissage. Il serait donc pertinent comparer les performances sur le rotarod entre les souris contrôles et celles traitées au PF4708671 au jour 8 après une période de 4 jours sans entraînement. Cette approche expérimentale permettrait de vérifier cette hypothèse et d'ainsi nous en apprendre plus sur le rôle de P70 S6K dans le contexte d'une pause d'entraînement ou d'un long laps de temps intersession.

En outre, ce projet démontre pour la première fois, à notre connaissance, que l'effet sur l'apprentissage vu dans les études avec mTOR semble être indirectement lié à une diminution d'activité de P70 S6K. Par conséquent, puisque P70 S6K est un substrat de mTOR, lors de l'inhibition avec la rapamycine il y a indirectement diminution de P70 S6K actif et de son substrat rpS6, tel que déterminer par nos résultats à l'objectif 1 du projet. Ceci établit donc, à un niveau plus précis, que la protéine vitale à l'intérieur de la voie de signalisation mTOR serait P70 S6K. Cependant, il faut savoir que nous nous basons au niveau comportemental et non pas moléculaire. Il serait ainsi intéressant d'investiguer plus en détail ces résultats avec une autre méthode d'inhibition soit à l'aide de souris knock-out ou encore d'injections intra-crânienne. Par contre, les résultats comportementaux obtenus tendent à démontrer que P70 S6K serait d'une grande importance dans l'apprentissage intrasession.

Un autre résultat me laisse perplexe. Lorsque l'effet intrasession avec le PF4708671 a été vérifié, les souris traitées avaient des performances sur le rotarod déjà plus faibles que les souris contrôles dès les premiers essais. Nous avons bien démontré que les capacités motrices ne sont pas altérées après l'injection de PF4708671. Par contre, ne nous pouvons mettre de côté l'hypothèse que des troubles cognitifs, par exemple une baisse de la motivation due à l'injection de PF4708671, pourraient influencer les performances sur le rotarod. De plus, chez l'humain, il est bien établi que l'anxiété et le stress peuvent effectivement affecter l'apprentissage moteur puisqu'il réduit l'efficacité du traitement d'information au cerveau (Anderson, Di Nota et al. 2019). Afin d'écartier cette hypothèse, il serait possible de faire certains tests de comportement anxieux ou de motivation, par exemple le « Open Field», le « Elevated Plus Maze » ou des tests

d'exploration, après injection du PF4708671. Ces tests nous donneraient des informations sur l'état de la motivation des souris suite aux traitements (Masini, Bonito-Oliva et al. 2018, Spangenberg et Wichman 2018). À notre connaissance, aucune étude ne fait de lien entre des comportements anxieux ou le manque de motivation après l'injection de PF4708671 chez la souris. Il serait alors pertinent d'investiguer les troubles anxieux et le stress dans nos conditions avec et sans traitement au PF4708671.

Il serait également intéressant de voir si inhibition de P70 S6K altère les processus de synaptogénèse lors de l'apprentissage d'une nouvelle tâche motrice. Dans le modèle animal, il est suggéré par la littérature que P70 S6K aurait un rôle dans la création de nouvelles synapses entre les neurones, permettant ainsi la formation d'une mémoire à long terme (Cammalleri, Lutjens et al. 2003, Antion, Merhav et al. 2008, Cheng, Locke et al. 2011). Ce processus est une composante considérable lors de l'apprentissage moteur et la mémoire procédurale (Ungerleider, Doyon et al. 2002, Costa-Mattioli, Sossin et al. 2009). Aucune étude n'a investigué ce lien directement chez la souris, il serait donc intéressant d'obtenir de plus ample information sur la possibilité que P70 S6K induise la synaptogénèse lors de l'apprentissage d'une nouvelle tâche motrice. Hypothèse qui sera discutée plus en détail dans la section perspective de recherche.

Finalement, notre laboratoire a longtemps étudié l'impact de la voie de signalisation des MAP kinase dans les neurones lors de l'apprentissage moteur. Là où ces études se rejoignent est au niveau de l'activation des protéines mTOR et P70 S6K. En effet, comme expliqué dans l'introduction et schématisé dans la **figure 5.1**, la voie des MAP kinases permet l'activation de TC1/2 par sa déphosphorylation et ainsi active mTORC1. De plus, afin d'être actif, P70 S6K nécessite une phosphorylation par l'une des MAP kinase (ERK,

P38 ou CDC2) (Zhang, Gao et al. 2013). À ce propos, notre laboratoire a démontré, il y a quelques années, que la protéine ERK est importante de l'apprentissage de nouvelle tâche

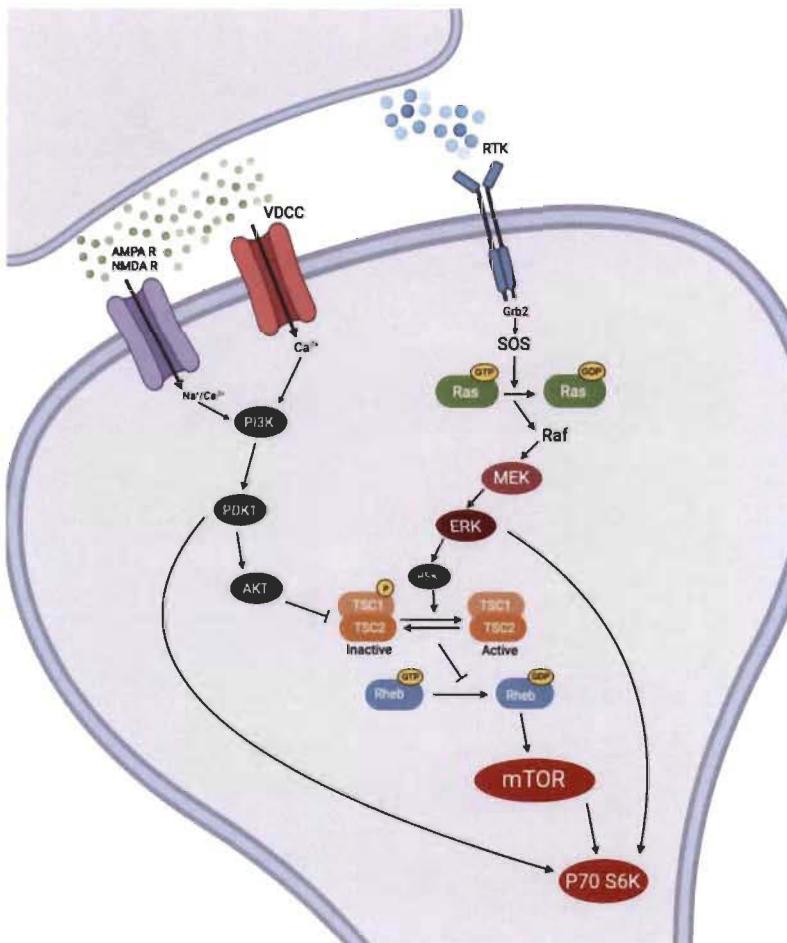


Figure 5.1 Implication de la voie des MAP kinases dans l'activation de mTOR et P70 S6K

Voie de signalisation menant à l'activation de mTOR et P70 S6K. Les récepteurs et canaux représentés ne sont pas les seuls pouvant enclencher les voies de signalisation, ils sont mis en exemple. L'activation de la protéine mTOR est faite à la suite d'une cascade de signalisation impliquant plusieurs protéines, dont PI3K, PDK1, AKT ainsi que la voie des MAP kinase regroupant entre autres MEK et ERK. De plus, l'activation de P70 S6K est faite suite à la phosphorylation par ERK, suivit de celle de mTOR et finalisé par PDK1. (Adapté de (Bockaert et Marin 2015) et créer avec BioRender.com)

motrice complexe chez la souris (Bureau, Carrier et al. 2010). Plus d'investigations seraient pertinentes afin de faire un lien direct entre l'inhibition des deux protéines et leur rôle lors de l'apprentissage moteur. Il serait ainsi très intéressant de voir la réponse

comportementale à la suite d'une double inhibition chez la souris. Une autre étude du laboratoire démontre l'importance et l'augmentation des récepteurs NMDA, important régulateur de la plasticité des synapses, dans le striatum lors de l'apprentissage moteur (D'amours, Bureau et al., 2011). En effet, lors de l'injection d'inhibiteur des récepteurs NMDA directement dans la partie dorsale du striatum, nous établissons que ces récepteurs sont essentiels à la phase lente, soit la mémoire à long terme. Dans l'analyse des résultats il était possible d'observer une diminution des performances sur le rotarod accéléré au jour 3 ainsi qu'au jour 8 (Lemay-Clermont et al., 2011). Serait-il possible que la blocade des récepteurs NMDA diminue ainsi toute la cascade d'évènement, dont l'inactivation de mTOR et de P70 S6K, résultant une diminution de la plasticité cérébrale et donc de la consolidation? Finalement, le laboratoire a aussi étudié la protéine Akt3, un isoforme presqu'uniquement exprimée au cerveau, à l'aide d'une souris knock-out (KO). Nous avons observé un retard dans l'apprentissage des souris KO en comparaison avec les contrôles « wild-type » qui n'ont pas la délétion, et ce sans aucune atteinte des capacités motrices. Un peu comme P70 S6K, Akt semble retarder l'apprentissage moteur uniquement, mais n'affecte pas la force ou la coordination des souris (Ouimet, Pepin et al. 2019). Il est donc possible de voir à quel point la voie de signalisation mTOR est importante et il est pertinent d'en savoir plus à son sujet.

CHAPITRE VI

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

En utilisant des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques ainsi que la souris, nous démontrons que la voie de signalisation, via la protéine p70 S6K, joue un rôle nécessaire dans l'apprentissage intrasession. En revanche, elle pourrait ne pas être nécessaire pour l'apprentissage intersession. De plus, nous établissons que l'activation de la voie de signalisation mTOR, soit mTORC1 et P70 S6K, ne serait pas impliquée dans l'exécution ainsi que les capacités motrices lorsqu'une tâche est déjà apprise.

Ces résultats ont soulevé certaines hypothèses et perspectives de recherche qui mériteraient une investigation plus poussée que nous pourrions faire avec le modèle animal de souris. Tout d'abord, le type d'injection peut faire une grande différence dans un projet *in vivo*. Comme précisé précédemment, nous avons fait des injections intrapéritonéales, mais il est possible qu'avec des injections intracrâniennes directement dans les structures du cerveau de souris l'inhibition ait un plus grand impact. En outre, dans une publication antérieure du laboratoire, nous avons remarqué une différence de précision entre des injections systémiques et des injections intrastriatale de la rapamycine lors de l'apprentissage du rotarod accéléré (Bergeron, Chagniel et al. 2014). En effet, avec des injections intracérébrales, il est possible de cibler spécifiquement certaines structures liées à l'apprentissage ou l'exécution motrice, par exemple le striatum, le cortex, le cervelet, sans affecter les autres systèmes de la souris (Richevaux L 2019). Une autre méthode qui mérite d'être exploitée pour voir l'effet exact de la délétion des protéines

d'intérêt serait l'utilisation de souris « knock-out » (KO). La délétion d'une protéine par le knock-out permet d'avoir une inhibition complète soit de façon constitutive chez la souris ou encore dans une seule structure, tissu spécifique, permettant ainsi que connaître le rôle exact de la protéine dans un tissu sans affecter d'autres composantes (Hall, Limaye et al. 2009). Il pourrait alors être intéressant d'utiliser des souris avec les protéines d'intérêt, mTOR et P70 S6K, KO tissu-spécifique au niveau du cerveau, en ciblant, si possible, certaines structures importantes dans l'apprentissage et la mémorisation motrice. Dans la littérature, autant chez les vertébrés que les non-vertébrés, aucun modèle n'inclut la délétion homozygote du gène mTOR n'est viable. La raison est due à son rôle d'envergure dans le développement neuronal (Takei et Nawa 2014). Il faut aussi savoir que pour les souris transgéniques hétérozygotes pour le gène mTOR, il ne semble y avoir aucune différence sur le développement ou encore sur le cycle cellulaire (Gangloff, Mueller et al. 2004). Cependant, des modèles murins ayant des délétions de protéines en aval ou en amont de la voie de signalisation mTOR ont été générés, soit Raptor, Rictor, MLST8 et Rheb 1, ce type de délétion pourrait être utilisé pour l'étude du rôle précis de mTORC1 ou mTORC2 selon la délétion ciblée (Guertin, Stevens et al. 2006, Zou, Zhou et al. 2011). Ceci expliquerait donc la grande place de mTOR dans le développement des êtres vivants et de leur système nerveux (Hoefffer et Klann 2010). Il existe également des modèles murins avec une délétion P70 S6K et il serait possible de tester leur aptitude motrice dans notre contexte (Shima, Pende et al. 1998, Arriola Apelo, Neuman et al. 2016).

Concernant le rôle possible de la protéine P70 S6K dans les processus de synaptogénèse. Il serait intéressant d'évaluer la quantité de synapses par

immunofluorescence lors d'un apprentissage moteur et de comparer des souris ayant une inhibition de P70 S6K avec des souris sans traitement. D'ailleurs, il existe une technique de préparation de tissus permettant, par microscopie à immunofluorescence, d'évaluer la plasticité synaptique des neurones de différentes structures agissant dans l'apprentissage et l'exécution motrice. Cette technique se base sur la co-localisation de marqueurs pré et post-synaptique définie par les synapses (McLeod, Marzo et al. 2017). Cette technique nous permettrait ainsi de voir précisément la différence du nombre de synapses entre des souris contrôles et celle injectée avec l'inhibiteur de P70 S6K, le PF4708671.

Il a été démontré que l'exercice active la voie de signalisation mTOR et améliore l'apprentissage des habiletés motrices de façon générale. Dans notre étude, en accord avec la littérature (Chen, Zheng et al. 2019), la voie de signalisation mTOR est nécessaire et importante à l'apprentissage moteur. Mais est-ce que l'action de mTOR sur l'adaptation du réseau neuronal pourrait être augmentée par l'entraînement physique? Pour répondre à cette question, il serait intéressant de soumettre les souris à un entraînement sur un tapis roulant, ou encore de la course dans une roue d'exercice, avant l'apprentissage du rotarod afin de voir si les souris apprennent la tâche plus rapidement (Lin, Chen et al. 2012). Cette expérience pourrait être faite d'un point de vue comportemental ainsi que moléculaire en évaluant l'activation de la voie de signalisation mTOR.

En conclusion, comprendre les processus moléculaires et les comportements moteurs est primordial et vu la complexité du système nerveux central ceci nécessite des recherches avancées. Nous pensons que notre étude constitue une avancée d'envergure relative sur les connaissances de l'apprentissage moteur au niveau moléculaire particulièrement de la voie de signalisation mTOR via la protéine P70 S6K. L'impact de

la voie mTOR sur les compétences d'apprentissage moteur est important afin de mieux comprendre les bases de la neurophysiologie et des maladies neurodégénératives. Ainsi, cette étude permettrait la découverte de nouvelles cibles de traitement pour les pathologies impliquant la motricité. Par exemple, il fut démontré que la voie de signalisation mTOR est impliquée dans l'autisme idiopathique qui est un type d'autisme qui serait réversible (Cioana, Michalski et al. 2020). Le trouble du spectre de l'autisme est aussi souvent relié à un retard dans le développement moteur des enfants qui en sont atteints (Ganesan, Balasubramanian et al. 2019). Ainsi, la voie de signalisation mTOR, précisément avec la protéine P70 S6K tel que démontré dans cette recherche, pourrait être une avenue thérapeutique intéressante afin de diminuer les retards moteurs des enfants et leur permettre d'avoir un développement plus normal.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Al-Ali, H., Y. Ding, T. Slepak, W. Wu, Y. Sun, Y. Martinez, X. M. Xu, V. P. Lemmon and J. L. Bixby (2017). "The mTOR Substrate S6 Kinase 1 (S6K1) Is a Negative Regulator of Axon Regeneration and a Potential Drug Target for Central Nervous System Injury." *J Neurosci* **37**(30): 7079-7095.
2. Albouy, G., B. R. King, P. Maquet and J. Doyon (2013). "Hippocampus and striatum: dynamics and interaction during acquisition and sleep-related motor sequence memory consolidation." *Hippocampus* **23**(11): 985-1004.
3. Anderson, G. S., P. M. Di Nota, G. A. S. Metz and J. P. Andersen (2019). "The Impact of Acute Stress Physiology on Skilled Motor Performance: Implications for Policing." *Front Psychol* **10**: 2501.
4. Antion, M. D., L. Hou, H. Wong, C. A. Hoeffer and E. Klann (2008). "mGluR-dependent long-term depression is associated with increased phosphorylation of S6 and synthesis of elongation factor 1A but remains expressed in S6K-deficient mice." *Mol Cell Biol* **28**(9): 2996-3007.
5. Antion, M. D., M. Merhav, C. A. Hoeffer, G. Reis, S. C. Kozma, G. Thomas, E. M. Schuman, K. Rosenblum and E. Klann (2008). "Removal of S6K1 and S6K2 leads to divergent alterations in learning, memory, and synaptic plasticity." *Learn Mem* **15**(1): 29-38.
6. Arriola Apelo, S. I., J. C. Neuman, E. L. Baar, F. A. Syed, N. E. Cummings, H. K. Brar, C. P. Pumper, M. E. Kimple and D. W. Lamming (2016). "Alternative rapamycin treatment regimens mitigate the impact of rapamycin on glucose homeostasis and the immune system." *Aging Cell* **15**(1): 28-38.
7. Artinian, J., A. Jordan, A. Khlaifia, E. Honore, A. La Fontaine, A. S. Racine, I. Laplante and J. C. Lacaille (2019). "Regulation of Hippocampal Memory by mTORC1 in Somatostatin Interneurons." *J Neurosci* **39**(43): 8439-8456.
8. Bahl, S., C. Chiang, R. L. Beauchamp, B. M. Neale, M. J. Daly, J. F. Gusella, M. E. Talkowski and V. Ramesh (2013). "Lack of association of rare functional variants in TSC1/TSC2 genes with autism spectrum disorder." *Mol Autism* **4**(1): 5.
9. Banko, J. L., M. Merhav, E. Stern, N. Sonenberg, K. Rosenblum and E. Klann (2007). "Behavioral alterations in mice lacking the translation repressor 4E-BP2." *Neurobiol Learn Mem* **87**(2): 248-256.
10. Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ (2005). "GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues." *Physiological genomics* **21**(3):389-95.

11. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA, Nieoullon A (2016). "Neurosciences : à la découverte du cerveau." Paris: Éditions Pradel. 4^eed.
12. Bekinschtein, P., C. Katche, L. N. Slipczuk, L. M. Igaz, M. Cammarota, I. Izquierdo and J. H. Medina (2007). "mTOR signaling in the hippocampus is necessary for memory formation." Neurobiol Learn Mem **87**(2): 303-307.
13. Bergeron, Y., L. Chagniel, G. Bureau, G. Massicotte and M. Cyr (2014). "mTOR signaling contributes to motor skill learning in mice." Front Mol Neurosci **7**: 26.
14. Bertran-Gonzalez, J., B. C. Chieng, V. Laurent, E. Valjent and B. W. Balleine (2012). "Striatal cholinergic interneurons display activity-related phosphorylation of ribosomal protein S6." PLoS One **7**(12): e53195.
15. Biever, A., E. Valjent and E. Puighermanal (2015). "Ribosomal Protein S6 Phosphorylation in the Nervous System: From Regulation to Function." Front Mol Neurosci **8**: 75.
16. Binder, J. R. and R. H. Desai (2011). "The neurobiology of semantic memory." Trends Cogn Sci **15**(11): 527-536.
17. Bisaz, R., A. Travaglia and C. M. Alberini (2014). "The neurobiological bases of memory formation: from physiological conditions to psychopathology." Psychopathology **47**(6): 347-356.
18. Blundell, J., M. Kouzer and C. M. Powell (2008). "Systemic inhibition of mammalian target of rapamycin inhibits fear memory reconsolidation." Neurobiol Learn Mem **90**(1): 28-35.
19. Bockaert, J. and P. Marin (2015). "mTOR in Brain Physiology and Pathologies." Physiol Rev **95**(4): 1157-1187.
20. Brasted, P. J. and S. P. Wise (2004). "Comparison of learning-related neuronal activity in the dorsal premotor cortex and striatum." Eur J Neurosci **19**(3): 721-740.
21. Brem, A. K., K. Ran and A. Pascual-Leone (2013). "Learning and memory." Handb Clin Neurol **116**: 693-737.
22. Buitrago, M. M., J. B. Schulz, J. Dichgans and A. R. Luft (2004). "Short and long-term motor skill learning in an accelerated rotarod training paradigm." Neurobiol Learn Mem **81**(3): 211-216.
23. Bureau, G., M. Carrier, M. Lebel and M. Cyr (2010). "Intrastriatal inhibition of extracellular signal-regulated kinases impaired the consolidation phase of motor skill learning." Neurobiol Learn Mem **94**(1): 107-115.

24. Camina, E. and F. Guell (2017). "The Neuroanatomical, Neurophysiological and Psychological Basis of Memory: Current Models and Their Origins." *Front Pharmacol* **8**: 438.
25. Cammalleri, M., R. Lutjens, F. Berton, A. R. King, C. Simpson, W. Francesconi and P. P. Sanna (2003). "Time-restricted role for dendritic activation of the mTOR-p70S6K pathway in the induction of late-phase long-term potentiation in the CA1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(24): 14368-14373.
26. Carroll, M., J. Dyer and W. S. Sossin (2006). "Serotonin increases phosphorylation of synaptic 4EBP through TOR, but eukaryotic initiation factor 4E levels do not limit somatic cap-dependent translation in aplysia neurons." *Mol Cell Biol* **26**(22): 8586-8598.
27. Carter RJ, Morton J, Dunnett SB (2001). "Motor coordination and balance in rodents. Current protocols in neuroscience." Chapter 8:Unit 8 12.
28. Chagniel, L., Y. Bergeron, G. Bureau, G. Massicotte and M. Cyr (2014). "Regulation of tyrosine phosphatase STEP61 by protein kinase A during motor skill learning in mice." *PLoS One* **9**(1): e86988.
29. Chagniel, L., C. Robitaille, C. Lacharite-Mueller, G. Bureau and M. Cyr (2012). "Partial dopamine depletion in MPTP-treated mice differentially altered motor skill learning and action control." *Behav Brain Res* **228**(1): 9-15.
30. Chen, K., Y. Zheng, J. A. Wei, H. Ouyang, X. Huang, F. Zhang, C. S. W. Lai, C. Ren, K. F. So and L. Zhang (2019). "Exercise training improves motor skill learning via selective activation of mTOR." *Sci Adv* **5**(7): eaaw1888.
31. Cheng, L., C. Locke and G. W. Davis (2011). "S6 kinase localizes to the presynaptic active zone and functions with PDK1 to control synapse development." *J Cell Biol* **194**(6): 921-935.
32. Chiang, G. G. and R. T. Abraham (2005). "Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase." *J Biol Chem* **280**(27): 25485-25490.
33. Cioana, M., B. Michalski and M. Fahnestock (2020). "Insulin-Like Growth Factor and Insulin-Like Growth Factor Receptor Expression in Human Idiopathic Autism Fusiform Gyrus Tissue." *Autism Res* **13**(6): 897-907.
34. Colder, B. (2015). "The basal ganglia select the expected sensory input used for predictive coding." *Front Comput Neurosci* **9**: 119.
35. Costa, R. M., D. Cohen and M. A. Nicolelis (2004). "Differential corticostratial plasticity during fast and slow motor skill learning in mice." *Curr Biol* **14**(13): 1124-1134.

36. Costa-Mattioli, M., W. S. Sossin, E. Klann and N. Sonnenberg (2009). "Translational control of long-lasting synaptic plasticity and memory." Neuron **61**(1): 10-26.
37. Dai J, Bercury KK, Macklin WB (2014). "Interaction of mTOR and Erk1/2 signaling to regulate oligodendrocyte differentiation." Glia. **62**(12): 2096-109.
38. D'Amours G, Bureau G, Boily MJ, Cyr M (2011). "Differential gene expression profiling in the mouse brain during motor skill learning: focus on the striatum structure." Behavioural brain research. **221**(1):108-17.
39. Dana, H., G. M. Chalbatani, H. Mahmoodzadeh, R. Karimloo, O. Rezaiean, A. Moradzadeh, N. Mehmadoost, F. Moazzen, A. Mazraeh, V. Marmari, M. Ebrahimi, M. M. Rashno, S. J. Abadi and E. Gharagouzlo (2017). "Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA." Int J Biomed Sci **13**(2): 48-57.
40. Dayan, E. and L. G. Cohen (2011). "Neuroplasticity subserving motor skill learning." Neuron **72**(3): 443-454.
41. Deli, A., K. Schipany, M. Rosner, H. Hoger, A. Pollak, L. Li, M. Hengstschlager and G. Lubec (2012). "Blocking mTORC1 activity by rapamycin leads to impairment of spatial memory retrieval but not acquisition in C57BL/6J mice." Behav Brain Res **229**(2): 320-324.
42. Dickerson, B. C. and H. Eichenbaum (2010). "The episodic memory system: neurocircuitry and disorders." Neuropsychopharmacology **35**(1): 86-104.
43. Doyon, J. (2008). "Motor sequence learning and movement disorders." Curr Opin Neurol **21**(4): 478-483.
44. Doyon, J., P. Orban, M. Barakat, K. Debas, O. Lungu, G. Albouy, S. Fogel, S. Proulx, S. Laventure, J. Deslauriers, C. Duchesne, J. Carrier and H. Benali (2011). "[Functional brain plasticity associated with motor learning]." Med Sci (Paris) **27**(4): 413-420.
45. Fernandez, R. I., L. C. Lyons, J. Levenson, O. Khabour and A. Eskin (2003). "Circadian modulation of long-term sensitization in Aplysia." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 14415-14420.
46. Gafford, G. M., R. G. Parsons and F. J. Helmstetter (2011). "Consolidation and reconsolidation of contextual fear memory requires mammalian target of rapamycin-dependent translation in the dorsal hippocampus." Neuroscience **182**: 98-104.
47. Ganesan, H., V. Balasubramanian, M. Iyer, A. Venugopal, M. D. Subramaniam, S. G. Cho and B. Vellingiri (2019). "mTOR signalling pathway - A root cause for idiopathic autism?" BMB Rep **52**(7): 424-433.

48. Gangloff, Y. G., M. Mueller, S. G. Dann, P. Svoboda, M. Sticker, J. F. Spetz, S. H. Um, E. J. Brown, S. Cereghini, G. Thomas and S. C. Kozma (2004). "Disruption of the mouse mTOR gene leads to early postimplantation lethality and prohibits embryonic stem cell development." *Mol Cell Biol* **24**(21): 9508-9516.
49. Glover, E. M., K. J. Ressler and M. Davis (2010). "Differing effects of systemically administered rapamycin on consolidation and reconsolidation of context vs. cued fear memories." *Learn Mem* **17**(11): 577-581.
50. Gokce, O., G. M. Stanley, B. Treutlein, N. F. Neff, J. G. Camp, R. C. Malenka, P. E. Rothwell, M. V. Fuccillo, T. C. Sudhof and S. R. Quake (2016). "Cellular Taxonomy of the Mouse Striatum as Revealed by Single-Cell RNA-Seq." *Cell Rep* **16**(4): 1126-1137.
51. Goodman CA (2014). "The role of mTORC1 in regulating protein synthesis and skeletal muscle mass in response to various mechanical stimuli." *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. **166**:43-95.
52. Gould TJ, Rowe WB, Heman KL, Mesches MH, Young DA, Rose GM, et al. (2002). "Effects of hippocampal lesions on patterned motor learning in the rat." *Brain research bulletin*. **58**(6):581-6.
53. Graber, T. E., P. K. McCamphill and W. S. Sossin (2013). "A recollection of mTOR signaling in learning and memory." *Learn Mem* **20**(10): 518-530.
54. Guertin, D. A., D. M. Stevens, C. C. Thoreen, A. A. Burds, N. Y. Kalaany, J. Moffat, M. Brown, K. J. Fitzgerald and D. M. Sabatini (2006). "Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1." *Dev Cell* **11**(6): 859-871.
55. Haber, S. N., J. L. Fudge and N. R. McFarland (2000). "Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum." *J Neurosci* **20**(6): 2369-2382.
56. Hall, B., A. Limaye and A. B. Kulkarni (2009). "Overview: generation of gene knockout mice." *Curr Protoc Cell Biol Chapter 19*: Unit 19 12 19 12 11-17.
57. Halloran, J., S. A. Hussong, R. Burbank, N. Podlutskaya, K. E. Fischer, L. B. Sloane, S. N. Austad, R. Strong, A. Richardson, M. J. Hart and V. Galvan (2012). "Chronic inhibition of mammalian target of rapamycin by rapamycin modulates cognitive and non-cognitive components of behavior throughout lifespan in mice." *Neuroscience* **223**: 102-113.
58. Harris, M. K., N. Shneyder, A. Borazanci, E. Korniychuk, R. E. Kelley and A. Minagar (2009). "Movement disorders." *Med Clin North Am* **93**(2): 371-388, viii.

59. Hay, N. and N. Sonenberg (2004). "Upstream and downstream of mTOR." *Genes Dev* **18**(16): 1926-1945.
60. Hernandez, P. J. and T. Abel (2008). "The role of protein synthesis in memory consolidation: progress amid decades of debate." *Neurobiol Learn Mem* **89**(3): 293-311.
61. Hoeffer, C. A. and E. Klann (2010). "mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease." *Trends Neurosci* **33**(2): 67-75.
62. Hou, L. and E. Klann (2004). "Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression." *J Neurosci* **24**(28): 6352-6361.
63. Huynh, T. N., E. Santini and E. Klann (2014). "Requirement of Mammalian target of rapamycin complex 1 downstream effectors in cued fear memory reconsolidation and its persistence." *J Neurosci* **34**(27): 9034-9039.
64. Jobim, P. F., T. R. Pedroso, R. R. Christoff, A. Werencicz, N. Maurmann, G. K. Reolon and R. Roesler (2012). "Inhibition of mTOR by rapamycin in the amygdala or hippocampus impairs formation and reconsolidation of inhibitory avoidance memory." *Neurobiol Learn Mem* **97**(1): 105-112.
65. Kam, K., M. Kang, C. Y. Eren, W. D. Pettibone, H. Bowling, S. Taveras, A. Ly, R. K. Chen, N. V. Berryman, E. Klann and A. W. Varga (2020). "Interactions between sleep disruption, motor learning, and p70 S6 kinase 1 signaling." *Sleep* **43**(3).
66. Karni, A., G. Meyer, C. Rey-Hipolito, P. Jezzard, M. M. Adams, R. Turner and L. G. Ungerleider (1998). "The acquisition of skilled motor performance: fast and slow experience-driven changes in primary motor cortex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(3): 861-868.
67. Kolb, B. and R. Gibb (2011). "Brain plasticity and behaviour in the developing brain." *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry* **20**(4): 265-276.
68. Korman, M., J. Doyon, J. Doljansky, J. Carrier, Y. Dagan and A. Karni (2007). "Daytime sleep condenses the time course of motor memory consolidation." *Nat Neurosci* **10**(9): 1206-1213.
69. Krakauer, J. W. and R. Shadmehr (2006). "Consolidation of motor memory." *Trends Neurosci* **29**(1): 58-64.
70. Krzyszton, C. P., N. L. Sparkman, R. W. Grant, J. B. Buchanan, S. R. Broussard, J. Woods and R. W. Johnson (2008). "Exacerbated fatigue and motor deficits in interleukin-10-deficient mice after peripheral immune stimulation." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **295**(4): R1109-1114.

71. Laplante, M. and D. M. Sabatini (2012). "mTOR signaling in growth control and disease." *Cell* **149**(2): 274-293.
72. Lehman, J. A. and J. Gomez-Cambronero (2002). "Molecular crosstalk between p70S6k and MAPK cell signaling pathways." *Biochem Biophys Res Commun* **293**(1): 463-469.
73. Lemay-Clermont J, Robitaille C, Auberson YP, Bureau G, Cyr M (2011). "Blockade of NMDA receptors 2A subunit in the dorsal striatum impairs the learning of a complex motor skill." *Behavioral neuroscience*. **125**(5):714-23.
74. Li, J., S. G. Kim and J. Blenis (2014). "Rapamycin: one drug, many effects." *Cell Metab* **19**(3): 373-379.
75. Li, Y., K. Inoki, R. Yeung and K. L. Guan (2002). "Regulation of TSC2 by 14-3-3 binding." *J Biol Chem* **277**(47): 44593-44596.
76. LiCausi, F. and N. W. Hartman (2018). "Role of mTOR Complexes in Neurogenesis." *Int J Mol Sci* **19**(5).
77. Lin, F., M. C. de Gooijer, D. Hanekamp, G. Chandrasekaran, L. C. Buil, N. Thota, R. W. Sparidans, J. H. Beijnen, T. Wurdinger and O. van Tellingen (2017). "PI3K-mTOR Pathway Inhibition Exhibits Efficacy Against High-grade Glioma in Clinically Relevant Mouse Models." *Clin Cancer Res* **23**(5): 1286-1298.
78. Lin, T. W., S. J. Chen, T. Y. Huang, C. Y. Chang, J. I. Chuang, F. S. Wu, Y. M. Kuo and C. J. Jen (2012). "Different types of exercise induce differential effects on neuronal adaptations and memory performance." *Neurobiol Learn Mem* **97**(1): 140-147.
79. Long, X., Y. Lin, S. Ortiz-Vega, K. Yonezawa and J. Avruch (2005). "Rheb binds and regulates the mTOR kinase." *Curr Biol* **15**(8): 702-713.
80. Lum, J. A., G. Conti-Ramsden, D. Page and M. T. Ullman (2012). "Working, declarative and procedural memory in specific language impairment." *Cortex* **48**(9): 1138-1154.
81. Luong, T. N., H. J. Carlisle, A. Southwell and P. H. Patterson (2011). "Assessment of motor balance and coordination in mice using the balance beam." *J Vis Exp*(49).
82. Ma, X. M. and J. Blenis (2009). "Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(5): 307-318.
83. MacCallum, P. E. and J. Blundell (2020). "The mTORC1 inhibitor rapamycin and the mTORC1/2 inhibitor AZD2014 impair the consolidation and persistence of contextual fear memory." *Psychopharmacology (Berl)* **237**(9): 2795-2808.

84. Makino H, Hwang EJ, Hedrick NG, Komiyama T (2016). "Circuit Mechanisms of Sensorimotor Learning." *Neuron*. **92**(4):705-21.
85. Martin, D., J. Xu, C. Porretta and C. D. Nichols (2017). "Neurocytometry: Flow Cytometric Sorting of Specific Neuronal Populations from Human and Rodent Brain." *ACS Chem Neurosci* **8**(2): 356-367.
86. Martin, K. C., M. Barad and E. R. Kandel (2000). "Local protein synthesis and its role in synapse-specific plasticity." *Curr Opin Neurobiol* **10**(5): 587-592.
87. Martineau, Y., D. Muller and S. Pyronnet (2014). "Targeting protein synthesis in cancer cells." *Oncoscience* **1**(7): 484-485.
88. Masini, D., A. Bonito-Oliva, M. Bertho and G. Fisone (2018). "Inhibition of mTORC1 Signaling Reverts Cognitive and Affective Deficits in a Mouse Model of Parkinson's Disease." *Front Neurol* **9**: 208.
89. Mateos-Aparicio, P. and A. Rodriguez-Moreno (2019). "The Impact of Studying Brain Plasticity." *Front Cell Neurosci* **13**: 66.
90. McLeod, F., A. Marzo, M. Podpolny, S. Galli and P. Salinas (2017). "Evaluation of Synapse Density in Hippocampal Rodent Brain Slices." *J Vis Exp*(128).
91. Meikle, L., K. Pollizzi, A. Egnor, I. Kramvis, H. Lane, M. Sahin and D. J. Kwiatkowski (2008). "Response of a neuronal model of tuberous sclerosis to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors: effects on mTORC1 and Akt signaling lead to improved survival and function." *J Neurosci* **28**(21): 5422-5432.
92. Mochizuki-Kawai, H. (2008). "[Neural basis of procedural memory]." *Brain Nerve* **60**(7): 825-832.
93. Muellbacher, W., U. Ziemann, J. Wissel, N. Dang, M. Kofler, S. Facchini, B. Boroojerdi, W. Poewe and M. Hallett (2002). "Early consolidation in human primary motor cortex." *Nature* **415**(6872): 640-644.
94. Muhammad Hassan, M. S. H., Rubbia Afridi, Mohammad Ali Sadiq, Yasir J. Sepah, Quan Dong Nguyen (2017). "The Role of Sirolimus in the Management of Uveitis." *Retinal Physician* **14**: 40-44.
95. Nagai, H., L. de Vivo, M. Bellesi, M. F. Ghilardi, G. Tononi and C. Cirelli (2017). "Sleep Consolidates Motor Learning of Complex Movement Sequences in Mice." *Sleep* **40**(2).
96. Nellist, M., M. A. Goedbloed, C. de Winter, B. Verhaaf, A. Jankie, A. J. Reuser, A. M. van den Ouwehand, P. van der Sluijs and D. J. Halley (2002). "Identification and characterization of the interaction between tuberin and 14-3-3zeta." *J Biol Chem* **277**(42): 39417-39424.

97. Nelson, R. J. (1997). "The use of genetic "knockout" mice in behavioral endocrinology research." *Horm Behav* **31**(3): 188-196.
98. Ouimet B, Pepin E, Bergeron Y, Chagniel L, Beaulieu JM, Massicotte G and Michel Cyr (2019). "Motor learning deficits and striatal GSK-3 hyperactivity in Akt3 knockout mice." *Behavioral neuroscience*. **133**(1):135-43.
99. Papale, A. E. and B. M. Hooks (2018). "Circuit changes in motor cortex during motor skill learning." *Neuroscience* **368**: 283-297.
100. Park, K. K., K. Liu, Y. Hu, P. D. Smith, C. Wang, B. Cai, B. Xu, L. Connolly, I. Kramvis, M. Sahin and Z. He (2008). "Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the PTEN/mTOR pathway." *Science* **322**(5903): 963-966.
101. Pearce, L. R., G. R. Alton, D. T. Richter, J. C. Kath, L. Lingardo, J. Chapman, C. Hwang and D. R. Alessi (2010). "Characterization of PF-4708671, a novel and highly specific inhibitor of p70 ribosomal S6 kinase (S6K1)." *Biochem J* **431**(2): 245-255.
102. Pisani, A., D. Centonze, G. Bernardi and P. Calabresi (2005). "Striatal synaptic plasticity: implications for motor learning and Parkinson's disease." *Mov Disord* **20**(4): 395-402.
103. Purves D. Neurosciences. 6e édition. ed. xxiii, 790 pages, 142 pages
104. Raught, B., A. C. Gingras and N. Sonenberg (2001). "The target of rapamycin (TOR) proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(13): 7037-7044.
105. Rehman, I., N. Mahabadi, T. Sanvictores and C. I. Rehman (2021). Classical Conditioning. *StatPearls*. Treasure Island (FL).
106. Richevaux L, S. L., Beraneck M, Fricker D (2019). "In Vivo Intracerebral Stereotaxic Injections for Optogenetic Stimulation of Long-Range Inputs in Mouse Brain Slices." *JoVe Journal, Neuroscience*.
107. Robertson, E. M., A. Pascual-Leone and R. C. Miall (2004). "Current concepts in procedural consolidation." *Nat Rev Neurosci* **5**(7): 576-582.
108. Sarbassov, D. D., S. M. Ali, S. Sengupta, J. H. Sheen, P. P. Hsu, A. F. Bagley, A. L. Markhard and D. M. Sabatini (2006). "Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB." *Mol Cell* **22**(2): 159-168.
109. Saxton, R. A. and D. M. Sabatini (2017). "mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease." *Cell* **168**(6): 960-976.
110. Seibt, J., M. C. Dumoulin, S. J. Aton, T. Coleman, A. Watson, N. Naidoo and M. G. Frank (2012). "Protein synthesis during sleep consolidates cortical plasticity in vivo." *Curr Biol* **22**(8): 676-682.

111. Seidler, R. D., A. Purushotham, S. G. Kim, K. Ugurbil, D. Willingham and J. Ashe (2002). "Cerebellum activation associated with performance change but not motor learning." *Science* **296**(5575): 2043-2046.
112. Shima, H., M. Pende, Y. Chen, S. Fumagalli, G. Thomas and S. C. Kozma (1998). "Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase." *EMBO J* **17**(22): 6649-6659.
113. Shumway, S. D., Y. Li and Y. Xiong (2003). "14-3-3beta binds to and negatively regulates the tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) tumor suppressor gene product, tuberin." *J Biol Chem* **278**(4): 2089-2092.
114. Sossin, W. S. and J. C. Lacaille (2010). "Mechanisms of translational regulation in synaptic plasticity." *Curr Opin Neurobiol* **20**(4): 450-456.
115. Spangenberg, E. M. F. and A. Wichman (2018). "Methods for Investigating the Motivation of Mice to Explore and Access Food Rewards." *J Am Assoc Lab Anim Sci* **57**(3): 244-252.
116. Spilman, P., N. Podlutskaya, M. J. Hart, J. Debnath, O. Gorostiza, D. Bredesen, A. Richardson, R. Strong and V. Galvan (2010). "Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease." *PLoS One* **5**(4): e9979.
117. Squire, L. R. and S. M. Zola (1998). "Episodic memory, semantic memory, and amnesia." *Hippocampus* **8**(3): 205-211.
118. Switon, K., K. Kotulska, A. Janusz-Kaminska, J. Zmorzynska and J. Jaworski (2017). "Molecular neurobiology of mTOR." *Neuroscience* **341**: 112-153.
119. Takei, N. and H. Nawa (2014). "mTOR signaling and its roles in normal and abnormal brain development." *Front Mol Neurosci* **7**: 28.
120. Ungerleider, L. G., J. Doyon and A. Karni (2002). "Imaging brain plasticity during motor skill learning." *Neurobiol Learn Mem* **78**(3): 553-564.
121. Wachter, T., S. Rohrich, A. Frank, K. Molina-Luna, A. Pekanovic, B. Hertler, M. Schubring-Giese and A. R. Luft (2010). "Motor skill learning depends on protein synthesis in the dorsal striatum after training." *Exp Brain Res* **200**(3-4): 319-323.
122. Walker, M. P., T. Brakefield, J. Seidman, A. Morgan, J. A. Hobson and R. Stickgold (2003). "Sleep and the time course of motor skill learning." *Learn Mem* **10**(4): 275-284.
123. Yin, H. H., S. P. Mulcare, M. R. Hilario, E. Clouse, T. Holloway, M. I. Davis, A. C. Hansson, D. M. Lovinger and R. M. Costa (2009). "Dynamic reorganization

- of striatal circuits during the acquisition and consolidation of a skill." Nat Neurosci **12**(3): 333-341.
124. Yoon, M. S. and C. S. Choi (2016). "The role of amino acid-induced mammalian target of rapamycin complex 1(mTORC1) signaling in insulin resistance." Exp Mol Med **48**(1): e201.
125. Zhang, J., Z. Gao and J. Ye (2013). "Phosphorylation and degradation of S6K1 (p70S6K1) in response to persistent JNK1 Activation." Biochim Biophys Acta **1832**(12): 1980-1988.
126. Zou, J., L. Zhou, X. X. Du, Y. Ji, J. Xu, J. Tian, W. Jiang, Y. Zou, S. Yu, L. Gan, M. Luo, Q. Yang, Y. Cui, W. Yang, X. Xia, M. Chen, X. Zhao, Y. Shen, P. Y. Chen, P. F. Worley and B. Xiao (2011). "Rheb1 is required for mTORC1 and myelination in postnatal brain development." Dev Cell **20**(1): 97-108.