

constituerait leur mise à l'épreuve. Si l'hypothèse de l'allocation de lien était venue assez naturellement, il n'en était pas de même de sa validation. Ce test devait attendre le moment propice.

La situation a changé quand Denise Cai et Justin Shobe, tous deux alors au laboratoire, se sont joints au projet. Denise Cai proposa une expérience astucieuse: Justin Shobe et elle ont commencé à placer des souris dans deux cages au cours de la même journée, à cinq heures d'intervalle, dans l'espoir que les souvenirs des deux cages se trouveraient connectés l'un à l'autre. Plus tard, ils leur administrèrent un léger choc électrique alors qu'elles étaient dans la seconde cage. Comme prévu, quand, ensuite, les souris ont à nouveau été placées dans la cage où elles avaient reçu le choc électrique, elles se sont immobilisées, probablement parce qu'elles se rappelaient avoir reçu un tel choc en ce lieu. L'immobilisation est une réaction naturelle chez les souris apeurées, parce que la plupart des prédateurs les détectent alors moins facilement.

Le résultat clé est apparu lorsque Denise Cai et Justin Shobe ont placé les souris dans la première cage, où elles n'avaient jamais reçu de choc électrique. Nous pensions que si les souvenirs des deux cages étaient liés, les souris placées dans la première se rappelleraient du choc électrique reçu dans la seconde et, par anticipation, s'immobiliseraient – et c'est exactement ce qui s'est produit.

Nous avons aussi prédit que les deux souvenirs auraient moins de chances d'être liés s'ils étaient séparés de sept jours. Et effectivement, les souris replacées dans la première cage ne semblaient pas se souvenir de la deuxième lorsque l'intervalle de temps entre les deux premières expositions dépassait une semaine. En général, au-delà d'une journée d'intervalle, les souvenirs ne s'associaient pas.

UN MICROSCOPE PORTABLE POUR SOURIS

Aussi excitantes que fussent ces découvertes comportementales, elles ne suffisaient pas à confirmer une prédiction essentielle découlant de notre hypothèse: l'idée que les souvenirs individuels formés à peu de temps d'intervalle soient stockés dans une même zone du cerveau, au sein de populations neuronales se recouvrant partiellement. Ce recouvrement physique devait lier les souvenirs, de sorte que le rappel de l'un entraîne celui de l'autre.

Pour tester l'hypothèse d'allocation de lien, il fallait idéalement être en mesure de voir les souvenirs dans le cerveau au moment où ils se forment. Des techniques d'imagerie des neurones *in vivo* existaient déjà, mais elles nécessitaient de maintenir la tête de l'animal immobile, fixée à de gros microscopes, un

montage incompatible avec les expériences de comportement que nous devions mener.

Par chance, la bonne technique est apparue juste au moment où nous en avions le plus besoin. Lors d'un séminaire à l'UCLA auquel j'assistais, Mark Schnitzer, de l'université Stanford, décrit un tout petit microscope que son laboratoire venait d'inventer, capable de visualiser l'activité de neurones dans le cerveau de souris libres de se déplacer. Ce microscope de 2 à 3 grammes était porté par l'animal comme un chapeau. Cet instrument s'est révélé idéal pour pister les neurones activés par un souvenir donné. Il nous a permis de savoir si ces mêmes neurones deviennent actifs quelques heures après, lorsqu'un autre souvenir est créé – c'est-à-dire qu'il a permis de tester notre prédiction.

Nous étions si excités par cette invention, que nous avons décidé d'en créer notre propre version. Nous nous sommes associés avec les laboratoires de Peyman Golshani et Baljit Khakh, tous deux établis à UCLA, et avons embauché un chercheur postdoctoral du nom de Daniel Aharoni, qui s'attela à la mise au point de ce que nous appellerions plus tard les miniscopes de l'UCLA. Équipé d'une lentille insérée à proximité immédiate des cellules nerveuses, l'appareil est fixé au crâne de la souris et reste stable tout au long des tests qu'elle subit.

Deux souvenirs formés à peu de temps d'intervalle ont plus de chances d'être liés

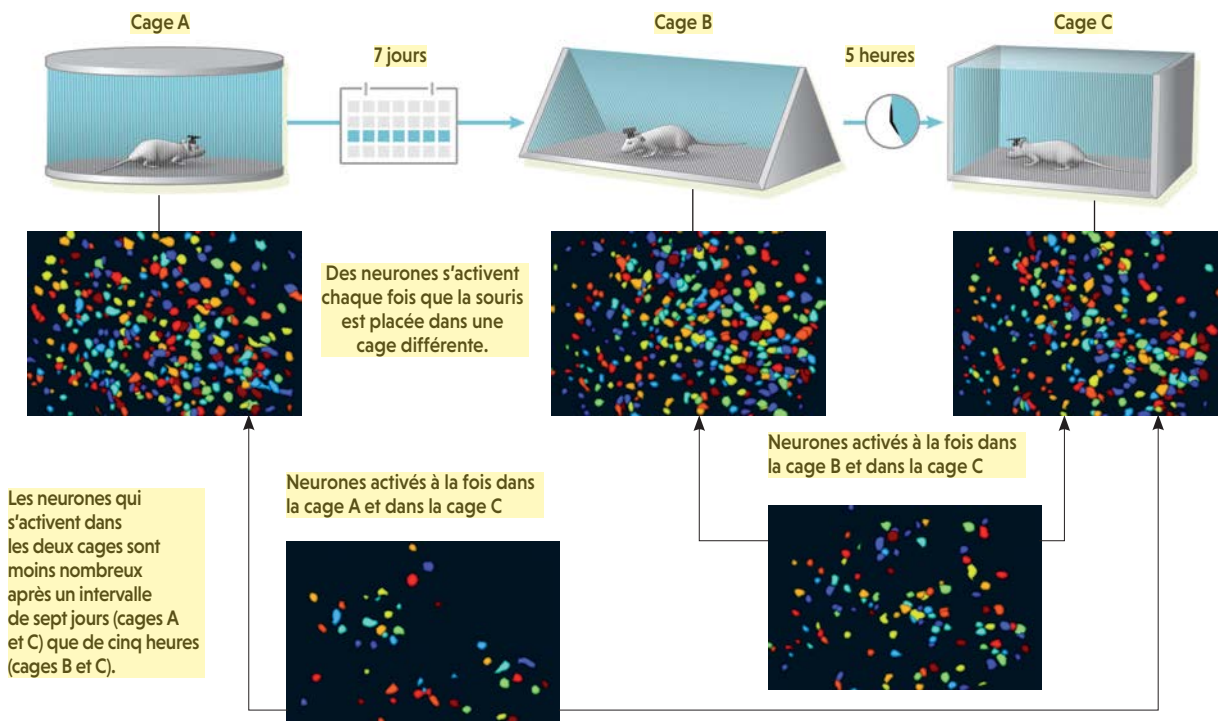
Pour visualiser uniquement les neurones activés par un souvenir, nous avons utilisé une autre technique dite d'indicateur de calcium codé génétiquement. Il s'agit d'injecter à l'animal une molécule qui devient fluorescente en présence de calcium: or un neurone qui s'active absorbe le calcium présent dans le milieu extracellulaire... Et devient donc visible au microscope.

Nous avons décidé de nous concentrer sur la région CA1 de l'hippocampe en raison de son rôle dans l'apprentissage et la mémorisation des lieux – par exemple, les cages que ➤

COMMENT NOTRE CERVEAU RELIE LES SOUVENIRS

L'instant « proustien » – quand un souvenir en appelle un autre – a désormais une base cérébrale ! Des expériences ont révélé qu'une souris placée dans deux cages B et C associe les souvenirs de ces deux cages si elle les a explorées à moins de cinq heures d'intervalle. Elle n'associe pas, en revanche, les souvenirs de cages A et C où elle a été placée à une semaine d'intervalle.

L'association mnésique des cages B et C se produit parce que les souvenirs de ces deux endroits se sont enregistrés dans des ensembles de neurones qui se recouvrent, contrairement aux souvenirs des cages A et C. Dès lors, quand la souris est replacée dans la cage B, le rappel de son souvenir réactive nombre de neurones communs aux souvenirs des deux cages, ce qui ravive le souvenir de la cage C.



➤ nous avons utilisées dans nos expériences de comportement. Les souris coiffées de leurs miniscopes ont été placées dans les deux cages: nous voulions savoir si l'intervalle de temps entre les placements dans les deux cages déterminait quels neurones étaient activés dans les deux cas.

Les résultats ont dépassé nos espérances. Lorsque les souris reliaient les souvenirs des deux cages, de nombreux neurones de l'aire CA1 qui étaient actifs quand les animaux se trouvaient dans la première cage étaient aussi activés quand ils exploraient la seconde. Si l'intervalle entre les deux visites était de cinq heures, les souris formaient deux souvenirs dans un ensemble similaire de neurones. Si on laissait s'écouler une semaine entre les visites des deux cages, les souvenirs activaient deux ensembles de neurones disjoints.

Cette découverte confirmait une prémisse essentielle de l'hypothèse d'allocation de lien:

les souvenirs s'associent quand ils sont stockés dans des ensembles de neurones qui se recouvrent au moins en partie. De sorte que si vous réactivez un premier ensemble de neurones codant un premier souvenir, celui-ci stimule l'autre ensemble et facilite le rappel du second souvenir.

LES SOUVENIRS SUIVIS À LA TRACE

Pour valider plus solidement encore les résultats obtenus avec les miniscopes, Denise Cai s'est tournée vers une autre méthode mise au point par Mark Mayford, aujourd'hui à l'université de Californie à San Diego. Cette technique, nommée système TetTag (pour *tetracycline tag*), permet de marquer les neurones activés dans le cerveau d'une souris quand elle forme le souvenir d'une cage où elle est placée, à l'aide d'une sonde fluorescente qui reste ensuite active pendant des semaines.

Grâce à des études *post mortem* sur les animaux, on compare alors les neurones activés récemment – repérables grâce à l'activité des gènes exprimés immédiatement après la formation du souvenir – avec ceux signalés par le marqueur à longue durée. Cette étape identifie non seulement les neurones activés par un événement – auquel cas un neurone ne présente qu'un seul marqueur fluorescent –, mais aussi ceux qui sont sollicités par deux événements distincts: dans ce cas, deux marqueurs différents sont visibles au microscope.

UNE COMPÉTITION ENTRE NEURONES

En utilisant le même montage expérimental que précédemment, Denise Cai et son équipe ont montré que pendant un court intervalle de cinq heures, le recouvrement entre les neurones qui codent chacun des deux souvenirs – les neurones avec deux marqueurs – était nettement plus important que si les deux souvenirs avaient mis en œuvre des assemblées aléatoires de neurones. En revanche, si les deux événements mémorisés étaient séparés d'une semaine, le recouvrement ne dépassait pas la répartition aléatoire.

D'autres expériences réalisées par l'équipe de Sheena Josselyn à Toronto ont apporté des preuves supplémentaires de la validité de notre hypothèse d'allocation de lien. Non seulement elle a réalisé une nouvelle version de notre expérience de marquage neuronal, mais elle a aussi apporté de nouveaux indices comportementaux. Cette fois, les souris étaient non pas placées dans des contextes différents, comme

dans nos travaux, mais entraînées à distinguer deux sons différents, chacun associé à un choc électrique, les deux événements se produisant à des intervalles de temps différents. Lorsque six heures ou moins séparaient les deux événements, les souris s'immobilisaient ensuite plus longtemps à l'écoute du second son (sans électrochoc), signe que le souvenir associé à ce son était renforcé. Au-delà de six heures, ce n'était plus le cas. Les chercheurs de Toronto ont par ailleurs montré que lors du premier stimulus, dans l'amygdale latérale (une région importante dans le conditionnement de la peur), la proportion de neurones où la protéine CREB était activée augmentait pendant les six premières heures, puis redevenait normale dans les heures suivantes. En jouant sur l'excitabilité de ces neurones par optogénétique, les chercheurs ont alors montré qu'un phénomène de compétition détermine à quels neurones sont assignés deux souvenirs. Ils en proposent le scénario suivant: le premier événement augmente l'excitabilité d'un groupe de neurones – le lieu de son souvenir – en y augmentant l'activité de CREB. Si le deuxième événement a lieu dans les six heures suivantes, l'activité accrue de CREB favorise l'ancrage du second souvenir dans un groupe de neurones qui recouvre partiellement le premier, ce qui renforce le second souvenir. Au-delà de six heures, en revanche, tous les neurones ont *a priori* la même chance d'accueillir le deuxième souvenir, et il n'y a pas de recouvrement.

DEUX SOUVENIRS LIÉS SÉPARÉS AU LASER

Récemment, Kaoru Inokuchi et ses collègues de l'université de Toyama, au Japon, ont poussé cette analyse un cran plus loin. Ils ont utilisé la technique d'optogénétique pour inactiver, par de la lumière laser, le groupe de neurones partageant deux souvenirs émotionnels différents sans altérer l'activité des autres neurones, dont ceux propres et uniques à chacun des deux souvenirs. Les chercheurs ont montré qu'en inactivant les cellules partagées, ils abolissaient le lien entre les deux souvenirs, sans perturber le rappel de chaque souvenir individuel. Cette expérience élégante a fourni la preuve directe que les neurones partagés par deux souvenirs constituent le liant de notre mémoire.

Nous avons ensuite décidé d'étudier les liens entre souvenirs chez des souris plus âgées. Comparées aux jeunes, celles-ci produisent moins de protéine CREB dans leur cerveau, y compris dans les neurones de l'aire CA1 de l'hippocampe. Il en résulte une moindre excitabilité, ce qui nous a amenés à prédire que les souris âgées devraient rencontrer des difficultés à lier différents souvenirs. C'est pourquoi Denise Cai et ses collègues ont entrepris de répéter sur des animaux âgés une grande ➤

Chez les souris âgées, les souvenirs sont moins liés car les réseaux de neurones qui les stockent se recouvrent moins. Mais on peut restaurer ce lien