

Unité d'enseignement de M1, semestre 1, module court  
Janvier 2025

## Module Technologique de Neurosciences

### **Olfaction, adaptation, apprentissage et oubli chez le nématode *Caenorhabditis elegans***

Responsable : Dr. Emmanuel Culetto, Université Paris-Saclay, Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC), Gif-sur-Yvette.  
emmanuel.culetto@universite-paris-saclay.fr/ emmanuel.culetto@i2bc.paris-saclay.fr

« Vous avez tracé le chemin qui va du ver jusqu'à l'homme, et il vous est resté beaucoup du ver. »

*F. Nietzsche (Ainsi parlait Zarathoustra, Prologue)*

#### **Anatomie et organisation générale du nématode *Caenorhabditis elegans*.**

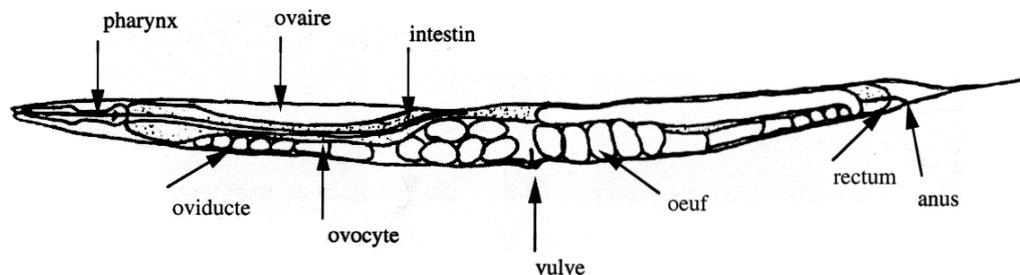
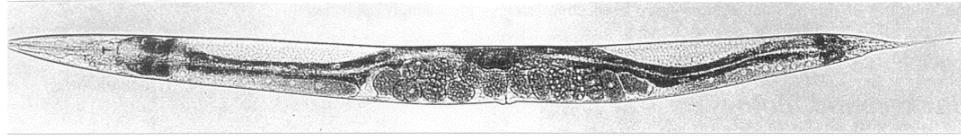
Les nématodes ou vers ronds sont des métazoaires protostomiens filiformes, à symétrie bilatérale. Leur corps revêtu d'une épaisse cuticule est non segmenté. Ils sont triblastiques et acoelomates. Le plan d'organisation anatomique est simple : il est constitué d'un premier tube comprenant la cuticule, l'hypoderme, les muscles et les cellules nerveuses ; celui-ci est séparé d'un second tube par une vaste cavité viscérale. Ce second tube est constitué du tube digestif. Les gonades sont elles, incluses dans la cavité générale. Les nématodes ont colonisé pratiquement tous les milieux (terrestres, marins et biologiques). *Caenorhabditis elegans* est un ver nématode qui vit libre dans le sol où il se nourrit de bactéries.

À la fin des années 1960, **Sydney Brenner** avait dressé un ensemble de pré-requis pour choisir un modèle biologique pluricellulaire l'autorisant à mener à bien une étude complète des mécanismes de développement du système nerveux et de son fonctionnement chez un métazoaire. Son choix s'est porté sur *Caenorhabditis elegans*. Cette décision a été particulièrement judicieuse car ce nématode présente de nombreux avantages expérimentaux qui en ont fait un modèle de choix en biologie.

#### **1.1. Quelques éléments d'anatomie**

##### **1. 1. 1. Morphologie**

*C. elegans* se présente sous la forme d'un petit corps cylindrique de 1 mm de long et de 70-80 micromètre de diamètre (stade adulte, figure 1). La bouche est située à l'extrémité antérieure. L'anus se situe en position postérieure subterminale. Alors que les hermaphrodites possèdent une queue qui se termine en pointe, celle des mâles se distingue par la présence d'une structure complexe en forme d'éventail comprenant les neurones et les muscles impliqués dans la copulation.



**Figure 1. Anatomie d'un animal adulte hermaphrodite.** Photographie et schéma d'une vue latérale sous observation microscopique. La partie antérieure est à gauche et le côté ventral est dirigé vers le bas.

### 1. 1. 2. Appareil digestif

*C. elegans* se nourrit de bactéries. Elles sont ingérées grâce à la dépression causée par les contractions rythmiques du pharynx qui fonctionne comme une pompe musculaire autonome, aspirant les bactéries, les broyant et les faisant passer dans l'intestin. L'intestin est constitué de cellules multifonctionnelles. Elles sécrètent des enzymes et absorbent les nutriments, constituant aussi le principal organe de stockage. L'intestin se connecte au rectum par l'intermédiaire d'une valve qui est actionnée par trois types de muscles: intestinaux, rectaux et anaux. L'appareil excréteur est de type tubulaire. Il est formé d'une seule cellule dont le cytoplasme forme 2 canaux logés dans les champs ectodermiques latéraux sur toute la longueur de l'animal. Ces canaux débouchent sur un pore excréteur ventral situé juste en-dessous du pharynx.

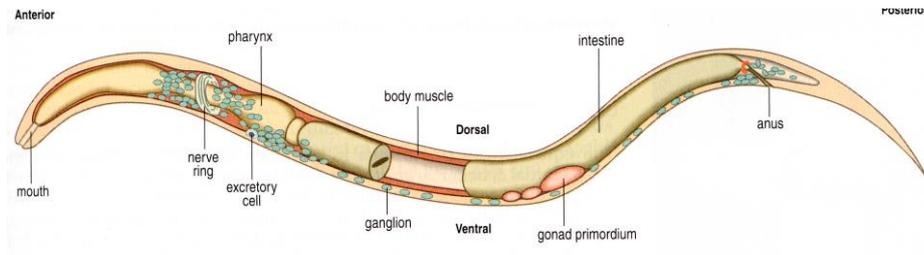
### 1. 1. 3. Le système de reproduction

Dans les populations de *C. elegans* coexistent des hermaphrodites et des mâles. Les mâles ne représentent qu'un animal sur 500 environ. Le système reproducteur de l'hermaphrodite est composé d'une gonade qui comprend deux ovaires recourbés symétriques qui aboutissent dans deux spermathèques puis dans l'utérus commun au centre de l'animal. La vulve est un orifice dans l'épiderme en position ventrale qui permet la ponte des oeufs et la copulation avec les mâles. À l'extrémité distale de chaque ovaire, se trouve un syncytium constitué des noyaux des cellules germinales. Les 300 premières cellules à s'engager dans la partie proximale de la gonade pour subir la méiose donnent les cellules germinales mâles qui sont stockées dans les spermathèques (situées dans la partie proximale de la gonade). Les cellules germinales restantes forment les ovocytes. Les ovocytes se déplacent vers la partie proximale pour atteindre leur maturité au passage de la spermathèque où l'autofécondation a lieu. L'œuf est expulsé 450 minutes après la fécondation. L'embryon se développe en une

larve L1 qui éclot 800 min après la première division de l'œuf. Puis le développement se poursuit à travers 3 autres stades larvaires (L2, L3, L4) avant d'atteindre le stade jeune adulte.

#### 1. 1. 4. Le système nerveux

L'hermaphrodite compte 302 neurones de 118 types différents. La plupart des neurones sont regroupés dans des ganglions de la tête autour du pharynx (Figure 2). L'anneau nerveux, qui entoure la partie centrale du pharynx, ne comporte pas de corps cellulaire mais de très nombreux faisceaux et connexions nerveuses. La corde nerveuse ventrale contient les corps cellulaires des motoneurones et les prolongements axonaux. La corde nerveuse dorsale n'est composée que de projections nerveuses.



**Figure 2. Représentation schématique du système nerveux chez *C. elegans*.** Vue générale du système nerveux d'une larve L1. Les ganglions nerveux de la tête se situent de part et d'autre de l'anneau nerveux (constitué de prolongements nerveux sans corps cellulaire). Les ganglions rétrovésiculaire et préanal limitent la corde nerveuse ventrale constituée de nombreux neurones et de prolongements nerveux. La corde dorsale ne comporte pas de neurones.

#### 1. 1. 5. Le déplacement s'effectue par un mouvement sinusoïdal

La musculature du corps de l'animal est responsable du mouvement. Elle est composée de 95 cellules mononucléaires organisées en quatre rangées: 2 dorsales et 2 ventrales. Chaque rangée comprend 23 ou 24 cellules musculaires qui se superposent en partie. Ces cellules musculaires contiennent des unités de contraction (sarcomères) composées de stries obliques.

Le nématode est posé sur le flanc. Il se déplace vers l'avant, en initiant une flexion au niveau de la tête qui se propage tout le long du corps vers l'arrière. Le mouvement de propagation sinusoïdal est entretenu par la contraction alternative, coordonnée, des muscles dorsaux et ventraux. Ces contractions alternatives sont provoquées par des interactions entre les motoneurones inhibiteurs et activateurs de la corde nerveuse ventrale.

#### 1. 2. Avantages expérimentaux.

Le corps transparent de *C. elegans* permet de suivre toutes les étapes de son développement par une observation directe. L'utilisation d'une optique Nomarski (contraste d'interférence différentiel) ajoute le relief à cette observation par transparence. C'est un animal qui s'élève très facilement en laboratoire à 20°C sur un milieu gélosé dans des boîtes de Pétriensemencées avec une souche d'*E. coli*. Il se caractérise par une grande prolificité puisqu'un hermaphrodite peut donner naissance par autofécondation à 300 individus qui deviendront adultes en 3 jours (Brenner, 1974). Son organisation simple (959 cellules somatiques chez l'hermaphrodite dont 302 neurones) a permis l'établissement du lignage cellulaire (Sulston, 1988) et de la topographie exacte de toutes les connexions nerveuses, puisque invariantes d'un individu à l'autre (White et al., 1986).

L'isolement de mutants est facilité par la ségrégation rapide d'homozygotes due à l'autofécondation des hermaphrodites. Les mâles servent alors aux croisements dirigés par

l'expérimentateur. L'obtention de nombreux mutants a permis d'établir une carte génétique extrêmement détaillée et précise. Les premiers travaux de S. Brenner (1974) ont permis la sélection de plus de 700 mutants et l'établissement de groupes de liaison, confirmant la présence de 6 chromosomes. *C. elegans* possède un génome relativement compact de 98 Mb (20 fois le génome de *Escherichia coli*, 1/30 du génome humain) réparti en cinq autosomes et un chromosome sexuel (les hermaphrodites sont XX, et les mâles XO). En 1998 le séquençage de son génome a été terminé.

La transgénèse des nématodes est relativement aisée. Elle permet le clonage par transformation et l'étude *in vivo* de séquences régulatrices contrôlant un gène rapporteur.

Des découvertes biologiques majeures ont été obtenues grâce à utilisation du modèle *C. elegans* comme l'élucidation de la voie génétique de la mort cellulaire programmée (Hengartner & Horvitz, 1994). D'ailleurs, les trois chercheurs impliqués, Sydney Brenner, H. Robert Horvitz et John E. Sulston, ont reçu le **Prix Nobel en 2002**. *C. elegans* a aussi permis : la mise en évidence de molécules comme la nétrine impliquée dans la guidance axonale (Ishii et al., 1992); la découverte du mécanisme épigénétique d'inactivation des gènes par ARN double brin (le mécanisme de RNAi, Andrew Fire et Craig Mello, **Prix Nobel en 2006**) ; L'utilisation et le développement du gène rapporteur GFP (Martin Chalfie **Prix Nobel 2009**), la découverte des microARNs régulateurs de l'expression des gènes par Victor Ambros et Gary Ruvkun (**Prix Nobel 2024**).

De plus le nématode *C. elegans* permet de modéliser l'étude de certaines pathologies humaines. Par exemple, le gène *sel-12* de *C. elegans* présente 50% d'homologie avec les deux gènes de préséniline ps1 et ps2, dont les mutations sont liées aux cas familiaux de maladie d'Alzheimer (Rogaev et al., 1995). Les auteurs ont montré que l'expression des gènes humains ps1 et ps2 dans le mutant *C. elegans sel-12* permettent au nématode de retrouver un phénotype sauvage (Levitan et al., 1996). Cette homologie de séquence et de fonction permet de penser que les gènes *sel-12* et ps1/ps2 agissent de façon similaire. Des expériences de génétique sur *C. elegans* permettront de trouver les gènes dont les produits interagissent avec *sel-12*, par exemple en recherchant des mutants suppresseurs, puis de remonter aux homologues humains.

Le nématode *C. elegans* est donc un des principaux organismes utilisés en biologie. Il est plus que probable que les avantages expérimentaux de cet animal seront à l'origine d'avancées importantes dans la connaissance de la physiopathologie de certaines maladies ; ce type de connaissance est actuellement une des clés manquantes pour mettre en place des solutions thérapeutiques.

#### ***Nomenclature utilisée pour les mutants, gènes et protéines chez C. elegans :***

*Par convention, les gènes de C. elegans sont désignés par trois lettres minuscules en italiques suivies d'un chiffre. Les trois lettres se réfèrent soit au gène (ace: acétylcholinesterase; myo: myosine; cha: choline acétyltransférase), soit au phénotype observé lorsque le gène est muté (unc: "uncoordinated"; smg: "small morphogenetic defects in genitalia"). Pour un même produit ou un même phénotype, les différents gènes responsables sont numérotés dans l'ordre de leur identification (ace-1, ace-2, ace-3). Le code constitué d'une lettre et d'un numéro entre parenthèse qui suit le nom d'un gène désigne l'allèle du gène considéré (ex : lin-3 (e134) caractérise l'allèle e134 du gène lin-3). Les produits des gènes (les protéines) sont désignés par les mêmes trois lettres en majuscules (ACE-1, le produit du gène ace-1, l'acétylcholinestérase de classe A)*

# **Olfaction : attraction, répulsion, chez le nématode *Caenorhabditis elegans***

## **I. Préambule**

Un des problèmes de la neurobiologie moderne est de comprendre comment les organismes peuvent discriminer une odeur particulière parmi des centaines d'autres, comment se fait au niveau d'un neurone olfactif cette reconnaissance et la nature des processus moléculaires impliqués. Le mécanisme de la sensation chimique, chimiosensation, est une des fonctions neuronales dont la compréhension nécessite une approche des processus neuronaux aux niveaux moléculaire et cellulaire. C'est un vrai problème de neurobiologie intégrative puisqu'elle nécessite une approche multidirectionnelle. Le nématode *C. elegans* est un très bon modèle animal pour essayer de répondre à cette question du fait de la facilité à le manipuler au niveau génétique et la possibilité de réaliser des ablations cellulaires très ciblées.

Le nématode comme la plupart des organismes pluricellulaires doit pouvoir intégrer les informations provenant de son environnement et modifier en conséquence son comportement. *Caenorhabditis elegans*, vit dans les interstices du sol, à l'interface air-eau/sol ou à la surface de fruits en décomposition. Il est exposé en permanence aux informations chimiques qui sont à la fois transportées par l'eau et par l'air. En fait, sa perception du milieu extérieur repose essentiellement sur ces informations qui lui permettent donc de gérer la compétition pour la nourriture avec d'autres espèces, d'éviter les prédateurs et composés toxiques. Le nématode est notamment très sensible aux molécules qui sont émises par ces proies, les bactéries, qui produisent des métabolites secondaires comme des alcools (à petite chaîne carbonée), des esters, des cétones.

Le nématode est donc capable de transformer la présence d'une molécule chimique en un message moléculaire. Cette détection est ensuite intégrée par son système nerveux qui provoque alors une modification *ad hoc* de son comportement.

## **II. Objectifs**

Cette séance de TP a pour objectif de montrer comment aborder l'étude intégrée du comportement d'un animal. L'étude du comportement est complexe à envisager parce qu'elle doit intégrer l'étude d'une série de phénotypes élémentaires. Il est nécessaire de réaliser une description exhaustive du comportement avant d'entreprendre une étude de celui-ci. Il faut dans un premier temps, définir la stratégie utilisée pour quantifier le comportement à étudier. Cette démarche doit permettre d'établir une mesure simple, reproductible du comportement de manière à pouvoir mettre en évidence toutes modifications. Cela nécessite de contrôler le stade de développement des animaux utilisés pour réaliser les mesures et de contrôler de façon précise l'environnement dans lequel sont effectuées ces mesures.

Vous choisirez et mettrez en œuvre un protocole expérimental rigoureux vous permettant de montrer que (i) le nématode peut détecter un grand nombre de composés volatiles différents, (ii) ces composés peuvent être soit des molécules attractives soit des répulsifs soit des molécules neutres, (iii) que le nématode exerce une préférence pour certains composés attractifs, (VI) qu'il est possible de déterminer la nature des gènes impliqués dans ces différents aspects de l'olfaction en travaillant sur différents mutants *C. elegans* de l'olfaction.

## **III. Protocoles expérimentaux**

### **1. Souches animales utilisées**

Les animaux au stade jeune adulte de souche sauvage N2 (variété Bristol) et des mutants obtenus à partir de la souche N2 par mutagenèse aléatoire.

## 2. Test de la réponse chimiotactique d'une population de *C. elegans* : le test olfactif de Bargmann.

Lorsqu'on place un animal sur une boîte de Pétri, qui contient une substance volatile déposée en un point de la boîte, celui-ci s'oriente rapidement et s'approche de la source attractive. Les animaux se déplacent sans aucune difficulté sur cette surface. Cette observation a permis de mettre en place une étude de la réponse chimiotactique d'une population de *C. elegans*. Cette expérimentation est réalisée en créant sur les boîtes NGM un gradient d'une substance volatile puis en analysant l'accumulation éventuelle des animaux vers la source attractive.

Les boîtes de Pétri contiennent 10 ml d'une gélose d'agar (17g/l d'eau), et différents sels (MgSO<sub>4</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM, phosphate de potassium 5 mM pH 6). Deux marques sont réalisées au dos de la boîte au niveau de deux points diamétralement opposés et à 13 mm du bord de l'agar. Sur l'agar, la substance à tester est déposée au niveau d'une marque A et 1 microlitre d'éthanol est déposé au niveau de la seconde marque (B).

Pour tester la chimiotaxie, nous utilisons des boites NGM fraîches et exemptes de bactéries, de 85 mm de diamètre. Quelques minutes avant l'utilisation des boites test, nous déposons 1 µL d'azide de sodium à 1 M à côté des points A et B pour immobiliser les vers. Nous ajoutons, au niveau du point A, 2 µL de diacétyl (ou n'importe quelle molécule à tester) à une dilution de 1:1 000 (ou une autre dilution selon la molécule testée), et 2 µL d'éthanol au niveau du point B. Puis, environ 100 vers sont transférés au centre de la boîte à l'aide d'une pipette. Les vers sont délicatement séchés à l'aide d'un Kimwipe, les couvercles des boites doivent ensuite restés fermés. Les vers sont laissés libres de leurs mouvements pendant 30 minutes. Ensuite, le nombre de vers présents sur le côté odorant (A) de la boîte et dans une région équivalente (B) de l'autre côté de la boîte est compté. Les vers se trouvant dans la région du point de départ sont exclus du comptage.

**L'indice de chimiotaxie est calculé à l'aide de la formule suivante : Indice de chimiotaxie = (nombre de vers côté A - nombre de vers côté B)/(nombre de vers côté A + nombre de vers côté B). Cet index peut varier entre +1 (attraction parfaite) et -1 (répulsion parfaite).**

## 3. Préparation des substances volatiles à tester

Les substances et les concentrations (entre parenthèse) à tester sur les souches sauvages sont : le 2,3 butanedione =diacétyl (1:1000,10<sup>-3</sup>), le benzaldehyde (1:200, 5.10<sup>-3</sup>), l'isoamylacool et l'éthanol (pur, 10<sup>0</sup>).

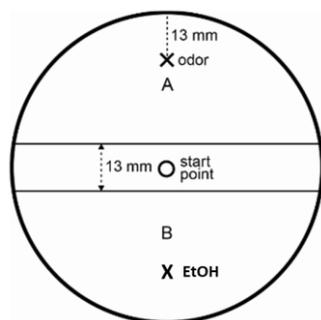


Schéma illustrant l'annotation des boites pour l'expérience de chimiotactisme.

# **Adaptation, apprentissage et oubli chez le nématode *Caenorhabditis elegans***

## **I. Préambule**

Une des propriétés les plus étonnantes du cerveau humain est sa capacité à stocker un très grand nombre d'informations tirées de l'expérience et d'en récupérer la plus grande partie à volonté. On donne le nom d'apprentissage au processus par lequel notre cerveau acquiert de nouvelles informations et celui de mémoire au mécanisme de stockage et de récupération de ces informations. Mais la capacité d'oubli est aussi importante pour le fonctionnement du cerveau et le contrôle de son comportement de l'organisme.

Les organismes font généralement face à un environnement complexe dont les paramètres physico-chimiques peuvent changer dans l'espace et dans le temps. Cette situation challenge constamment un organisme l'obligeant à s'adapter en temps réel et ceci d'autant plus que les conditions deviennent drastiques et/ou qu'elles changent rapidement. Pour ce faire, des mécanismes d'anticipation existent qui permettent de prédire un scénario futur en se basant sur des expériences passées sur des souvenirs sur la mémoire des événements passés. C'est en cela que la mémoire associée joue un rôle central puisque des indices conditionnant rencontrés dans le passé évoque un souvenir et par association prédise une situation imminente de changement.

On apprend beaucoup par l'expérience. Quand on rencontre de manière répétée un signal qui est couplé soit à une récompense soit à une punition on finit par retenir que les deux arrivent ensemble. Ce phénomène est appelé apprentissage par association. Dans le cerveau différentes groupes de neurones sont responsables du signal qui est associé d'une part au signal information d'une part et d'autre part de la récompense ou de la punition. L'apprentissage et la mémoire sont des capacités probablement universelles chez les animaux il est intéressant d'étudier ces mécanismes chez un modèle animal comme *C. elegans*. Au cours de ce TP on va apprendre comment tester expérimentalement chez *C. elegans* sa capacité à apprendre à associer une odeur avec un autre stimuli, enseigner à un nématode qu'une odeur est prédictive d'une situation particulière et qu'il est aussi capable d'oublier ce souvenir et qu'il existe des gènes qui contrôlent ces différents mécanismes à l'origine de comportement complexes chez *C. elegans*.

On peut émettre l'hypothèse que l'oubli implique aussi un processus mécanisme neuronal actif. Le nématode est probablement aussi capable de s'adapter. L'adaptation ou diminution de la perception d'un stimulus de l'environnement, est un modulateur important de l'activité nerveuse et permet en fait aux animaux de se concentrer sur les changements de perception d'un stimulus plutôt que sur une stimulation statique dans le temps. Le nématode doit être aussi capable d'oublier qu'il a été confronté à un stimulus attractif, c'est-à-dire oublier son adaptation olfactive.

L'oubli actif c'est-à-dire le mécanisme qui permet à des souvenirs d'être perdus est important pour les animaux pour prévenir des interférences entre souvenirs.

## **II. Objectifs**

L'objectif de cette séance est d'utiliser un protocole de conditionnement permettant de tester la capacité d'un nématode à apprendre par association entre deux expériences sensorielle et physiologique : présence d'une odeur et pH acide.

Puis, de montrer que le nématode est capable d'oublier ce souvenir et qu'il existe des gènes qui contrôlent ce mécanisme de l'oubli.

## **III. Protocole :Conditionnement par aversion**

Les vers au stade jeune adulte synchronisés ont été délicatement rincés de leurs boîtes d'élevage à l'aide d'un tampon (solution CTX) et transférés dans des tubes Eppendorf standard

à l'aide d'une pipette. Après une période de décantation de 1 minute, le surnageant a été soigneusement retiré et remplacé par 700 µl de CTX. Ce processus de lavage a été répété 5 fois pour assurer l'élimination complète de toute bactérie résiduelle. Lors du dernier lavage, le tampon M9 a été utilisé à la place du CTX. Ensuite, les vers ont été soumis à une période d'inanition de 2 heures en les plaçant sur des plaques NGM fraîches exemptes de bactéries. Après la période d'inanition, les vers ont été collectés dans de nouveaux tubes Eppendorf, et l'excès de surnageant a été délicatement éliminé.

Dans chaque tube, 250 µl de la solution de conditionnement ou de la solution de contrôle ont été ajoutés. Les solutions de conditionnement comprenaient du diacétyl dans une dilution de 1:10 000, du HCl 1 mM (pH = 3) ou une combinaison des deux. Les vers ont ensuite été incubés avec la solution de conditionnement pendant 15 minutes au total. Pendant toute cette période, les tubes ont été placés sur le côté sur une étagère isolée afin de minimiser les perturbations environnementales et de faciliter la dispersion des vers dans le tube. Environ 30 secondes avant la fin de la période de conditionnement de 15 minutes, les tubes ont été remis en position verticale, ce qui a permis aux vers de se stabiliser pendant environ 25 secondes. Après la période de conditionnement de 15 minutes, la solution de conditionnement a été soigneusement aspirée et les vers ont été rincés une fois avec 700 µl de CTX. Après le rinçage, les tubes ont été brièvement centrifugés pendant 1 minute dans une mini-centrifugeuse à 1 000 tours/minute, et le surnageant a été éliminé.

Le test de chimiotaxie a été effectué immédiatement après le rinçage des vers. Cependant, pour tester la mémoire à des moments ultérieurs, c'est-à-dire pour tester la rétention de la mémoire après conditionnement, les vers ont été transférés sur des plaques NGM fraîches préensemencées avec des bactéries OP50 et incubées à 15°C, après quoi les vers ont été prélevés des plaques et lavés trois fois avec 700 µl de CTX avant de procéder à l'essai de chimiotaxie.

### **Règles de sécurité**

**-Porter systématiquement une blouse dans la salle de TP**

**-Manger ou boire dans la salle de TP est formellement défendu**

**-Trier et jeter les différents déchets générés par les expériences dans les conteneurs adéquats (sacs autoclave, conteneur à verre, etc...)**

**-En cas de blessure ou de malaise, notifier le plus vite possible l'enseignant qui encadre la séance de TP**